

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
19 avril 2018 (19.04.2018)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2018/069597 A1

(51) Classification internationale des brevets :

A61K 38/12 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)
A61K 31/635 (2006.01) *A61K 31/575* (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2017/052635

(22) Date de dépôt international :

28 septembre 2017 (28.09.2017)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

1659884 13 octobre 2016 (13.10.2016) FR

(71) **Déposants :** FONDATION MEDITERRANEE INFECTION [—/FR] ; Faculté de Médecine, 27, boulevard Jean Moulin, 13005 Marseille (FR). UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE [FR/FR] ; 58 boulevard Charles Livon, 13284 Marseille Cedex 7 (FR). ASSISTANCE PUBLIQUE - HOPITAUX DE MARSEILLE [—/FR] ; 80 rue Brochier, 13005 Marseille (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR] ; 3 rue Michel Ange, 75016 Paris (FR). INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) [—/FR] ; 101, rue de Tolbiac, 75013 Paris (FR).

(72) **Inventeurs :** ROLAIN, Jean-Marc ; 52 rue sainte Victoire, 13006 Marseille (FR). LE PAGE, Stéphanie ; 4 rue du Docteur Frederic Granier, 13007 Marseille (FR). OKDAH, Liliane ; 38 Boulevard Jean Moulin, 13005 Marseille (FR).

(74) **Mandataire :** DOMANGE, Maxime et al. ; Cabinet Beau de Lomenie, 232 Avenue du Prado, 13008 Marseille (FR).

(81) **États désignés** (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible*) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) **États désignés** (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible*) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée:

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

(54) **Title:** COMBINATION OF ANTIBIOTIC COMPOUNDS THAT IS EFFECTIVE AGAINST ENTEROBACTERIA

(54) **Titre :** ASSOCIATION DE COMPOSES ANTIBIOTIQUES EFFICACE CONTRE DES ENTÉROBACTÉRIES

(57) **Abstract:** The present invention relates to a combination of a first antibiotic compound, Colistin, and a second antibiotic compound, selected from among Sulfadiazine and fusidic acid, for use in therapeutic treatment against pathogenic enterobacteria which are not naturally intrinsically resistant, but which have acquired resistance to at least Colistin.

(57) **Abstrégé :** La présente invention concerne une association d'un premier composé antibiotique la Colistine et un second composé antibiotique choisi parmi la Sulfadiazine et l'acide fusidique pour une utilisation dans un traitement thérapeutique contre les entérobactéries pathogènes non naturellement intrinsèquement résistantes mais ayant acquis une résistance contre au moins la Colistine.



WO 2018/069597 A1

Association de composés antibiotiques efficace contre des entérobactéries

La présente invention concerne une nouvelle combinaison d'antibiotiques ayant un effet bactéricide synergique contre des entérobactéries. Plus précisément, cette association est une association synergique d'anciens antibiotiques connus, ladite association étant efficace dans la lutte contre les entérobactéries multirésistantes ayant acquis une multirésistance, ou au moins efficace contre les entérobactéries résistantes à au moins l'un des deux antibiotiques concernés, et/ou pour empêcher l'apparition de résistance des dites entérobactéries contre les dits antibiotiques.

Les bactéries sont dites « multirésistantes » (BMR) aux antibiotiques du fait de l'accumulation de résistances acquises vis-à-vis d'au moins 3 familles d'antibiotiques.

Les infections causées par des entérobactéries multi-résistantes représentent un problème de santé majeur à travers le monde.

Les Entérobactéries (à savoir le famille des *Enterobacteriaceae*) constituent l'une des plus importantes familles de bactéries, autant du point de vue quantitatif (plus d'une quarantaine de genres) que du point de vue qualitatif. Elles regroupent ainsi de nombreux genres, très ubiquitaires, et ceux-ci sont fréquemment rencontrés en pathologie infectieuse. Elles sont les hôtes de l'homme et des animaux chez lesquels elles résident principalement au niveau de l'intestin. On peut cependant les retrouver dans la cavité buccale, les régions humides de la peau en particulier le périnée, les fosses nasales et les voies génitales féminines dans lesquelles elles peuvent constituer une flore transitaire. L'espèce *Escherichia coli* y joue un rôle prépondérant en raison de sa présence constante et de sa large prédominance sur les autres espèces. D'autres espèces ont une présence moins marquée tel que des bactéries des genres *Proteus* et *Klebsiella* ainsi que *Citrobacter*, *Hafnia*, *Providencia*, *Enterobacter* à la présence plus irrégulière.

La définition des entérobactéries repose sur les critères suivants : bacilles Gram négatifs et fermentantes (attaquant le glucose par voie fermentaire), dépourvus d'oxydase et réduisant les nitrates.

Leur pathologie est non spécifique mais tient surtout du « terrain » : un sujet immunodéprimé ne réagit pas comme un sujet sain. La polyrésistance aux antibiotiques que ces bactéries provient de mutations chromosomiques ou de plasmides de résistance.

Les espèces pathogènes possèdent une grande variabilité dans leur comportement et

leur agressivité chez l'hôte. On distingue alors deux groupes d'entérobactéries pathogènes : Les pathogènes strictes et les pathogènes opportunistes.

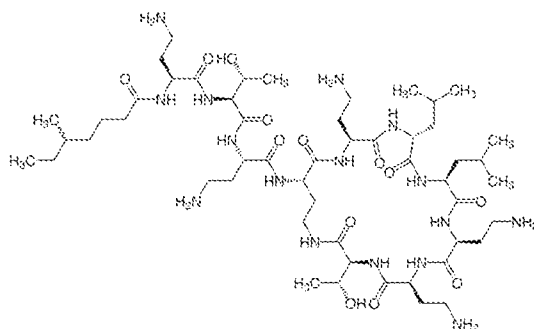
Les entérobactéries pathogènes strictes entraînent souvent une infection dont la gravité dépend de leur point d'entrée. Introduites par un aliment contaminé, elles provoqueront des troubles intestinaux en adhérant sur la muqueuse intestinale puis en traversant la barrière entérocytaire. Les symptômes se caractérisent souvent par des diarrhées importantes suivies d'une déshydratation (grave chez le nourrisson).

Les entérobactéries pathogènes opportunistes ne disposent pas d'un pouvoir pathogène suffisant pour déclencher une pathologie chez un hôte sain. Elles sont en revanche susceptibles de déclencher des infections chez des sujets immunodéprimés comme des septicémies surtout en milieu hospitalier (par exemple, *Klebsiella*), responsables d'infections respiratoires, urinaires, abdominales en particulier iatrogènes en post-opératoire. L'espèce *Klebsiella pneumoniae* est le plus souvent responsable d'infections respiratoires.

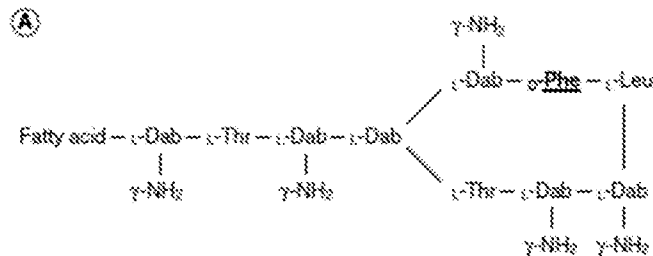
Elles peuvent être présentes dans l'intestin et faire partie intégrante de sa flore commensale, c'est ainsi que l'espèce *Escherichia coli* est responsable d'infection urinaire (en particulier chez la femme) ainsi que responsable de gastro-entérite infantile.

Klebsiella pneumoniae et *Escherichia coli* à elles deux représentent 90% des infections par des entérobactéries.

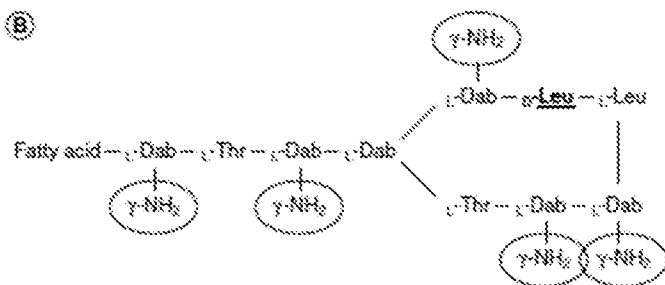
La Colistine un produit obtenu par fermentation de *Paenibacillus polymyxa* est constituée de composés peptidiques polycationiques à savoir la Colistine A de formule (Ia) laquelle comprend une chaîne d'acide gras: (S)-6-methyloctanoyl et/ou la colistine B de formule (Ib) ci-après laquelle comprend (chaîne d'acide gras: 6-methylheptanoyl)[1]. Il s'agit d'une classe d'antibiotique développé dans les années 1950.



(Ia) : Colistine A (aussi dénommée polymyxine B)



(Ib) : Colistine B (aussi dénommée polymyxine E)



La Colistine est administrée soit par voie parentérale sous la forme d'une prodrogue inactive : le Colistiméthate de sodium (CMS), soit par voie orale ou topique sous forme de sulfate de Colistine.

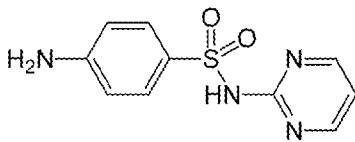
La Colistine a été utilisée pour traiter des entérobactéries non naturellement intrinsèquement résistantes, notamment sur des souches *E. coli* et *Klebsiella pneumoniae*. Mais, on a constaté l'émergence de résistances acquise par mutation chromosomique spontanée vis à vis de la Colistine. La Colistine est un antibiotique qui possède un fort pouvoir d'induction de mutants résistants spontanés au sein d'une même population bactérienne.

Une synergie d'action entre la Colistine et le Sulfafurazole, contre certaines bactéries *Proteus sp* naturellement intrinsèquement résistantes à la Colistine et au Sulfafurazole a été rapportée en 1963 par Russel et coll. [3]. Mais le sulfafurazole n'est plus disponible dans le commerce. D'autre part, le mécanisme de résistance des souches intrinsèquement résistantes à la Colistine est différent de celui de souches non intrinsèquement résistantes à la Colistine mais résistantes à la Colistine de façon acquise par mutation chromosomique spontanée (non transférable) notamment dans le gène *mgrB* ou par l'acquisition d'un plasmide de résistance (transférable de bactérie à bactérie) notamment un plasmide portant le gène *mcr-1*.

La Polymyxine B – un antibiotique qui n'est plus fabriqué- a aussi été testée en combinaison avec la Sulfadiazine contre une bactérie non fermentante *Serratia marcescens*, une bactérie naturellement intrinsèquement résistante à la Polymyxine B en 1970 par Greenfield et col. [4]. Là encore, n'ont été testées que des souches intrinsèquement
5 résistantes à la Polymyxine B et pas des souches non intrinsèquement résistantes à la Colistine mais résistantes à la Colistine de façon acquise.

La Sulfadiazine (4-amino-N-(pyrimidin-2-yl) benzène sulfonamide) de formule (II) est un antibiotique de la famille des sulfamides qui possède une activité antibactérienne utilisée entre autre pour désinfecter les brulures mais surtout utilisée en association avec la
10 pyriméthamine comme antiparasitaire pour traiter les infections à *Toxoplasma gondii* l'agent de la toxoplasmose.

(II) :



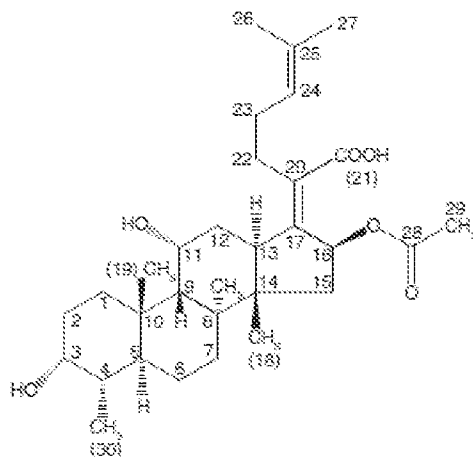
La Sulfadiazine, bien qu'active in vitro sur les entérobactéries, n'est jamais utilisée
15 séparément en thérapeutique car elle sélectionne systématiquement des mutants résistants.

Le traitement de veaux infectés par une bactérie *E.coli* sensible à la Colistine mais ayant acquis une résistance contre la Sulfadiazine, par une association de Colistine et Sulfadiazine a été décrit [11].

Le traitement de bactéries *Proteus* par l'association Colistine-Sulfadiazine a été décrit
20 [12], les bactéries *proteus* traitées étant des entérobactéries intrinsèquement résistantes à la Colistine et non pas à résistance acquise à la Colistine. Le génome des bactéries *Proteus* est très différent de celui des autres entérobactéries avec notamment un taux de GC inférieur à 38% contre un taux de GC supérieur à 50% chez les autres entérobactéries. Des études récentes montrent que cette résistance intrinsèque des souches de *Proteus* est
25 causée par l'activation d'un opéron dénommé opéron arn qui code pour un sucre, l'arabinose sur le LPS de la membrane externe. Néanmoins, le support moléculaire précis de l'activation de cet opéron reste inconnu à ce jour. Mais aucune mutation chromosomique n'a été déterminée contrairement au cas des entérobactéries à résistance acquises.

Une synergie d'activité de la Colistine en combinaison avec la Triméthoprim-Sulfaméthoxazole (SXT), ou la Triméthoprim (TMP) (TMP n'est pas un antibiotique) contre des isolats d'une souche de *Klebsiella pneumoniae* de laboratoire rendue artificiellement résistante à la Colistine a été rapportée par Vidaillac et col. En 2012 [2]. Mais, la souche testée n'était pas résistante au Triméthoprim-Sulfaméthoxazole (SXT) et au Triméthoprim seul (TMP). La souche de *Klebsiella pneumoniae* était une souche de laboratoire initialement sensible à la Colistine et rendue artificiellement résistante à la Colistine en laboratoire par création de mutants spontanés résistants à la colistine à partir de géloses enrichies avec des concentrations croissantes de colistine selon un mécanisme connu. Il s'agit donc d'un mécanisme de résistance différent de celui des souches ayant acquis une résistance par mutation chromosomique spontanée ou par l'acquisition d'un plasmide.

L'acide fusidique (formule III) est un antibiotique actif contre les bactéries Gram+, notamment anti-staphylococcique synthétisé par des champignons : *Fusidium coccineum* qui a été utilisé en Europe depuis plus de 40 ans pour traiter les infections de la peau ainsi que les infections de l'os et des articulations chroniques [7]. C'est un antibiotique stéroïdien et le seul membre commercialisé de la classe des fusidanes.



(III) :

L'acide fusidique inhibe la synthèse des protéines en se liant au facteur d'élongation : EF-G-PIB, bloquant la translocation des ARN de transfert sur le ribosome ainsi que la progression du ribosome sur l'ARN messager. De nombreuses mutations peuvent se produire au niveau du gène *FuSa* qui code pour le facteur d'élongation EF-G, et certaines de ces mutations peuvent conduire à une résistance de haut niveau (concentration minimale inhibitrice [CMI] > 64mg/L). La résistance de bas niveau (<8mg/L) est plus fréquente et elle

est médiée par des gènes *fusB*, *fusC* et *fusD* qui codent pour des petites protéines qui protègent le EF-G-PIB. Les gènes codant pour ces protéines sont propagés par des plasmides et peuvent être sélectionnés principalement par l'utilisation d'antibiotique topique.

L'acide fusidique sous forme de fusidate de sodium est bien absorbé après administration avec une biodisponibilité <90%. Il possède une longue demi-vie plasmatique ~ 10-14h.

Une étude récente (8) montre un effet synergique de la combinaison de Colistine et acide fusidique contre une souche d'une bactérie *Acinetobacter baumannii* résistante à la colistine, bactérie non fermentante n'appartenant pas à la classe des entérobactéries. D'autre part, les souches testées ne sont pas des souches cliniques mais des souches rendues artificiellement résistantes à la Colistine en laboratoire sans que le gène muté ne soit indiqué. Dans une autre étude récente [10], il a été montré que chez les bactéries *Acinetobacter*, le gène de résistance à la Colistine est le plus souvent le gène *pmrA*/*pmrB*, alors que dans les entérobactéries, ce sont principalement les gènes *mgrB* pour les mutations chromosomiques et un plasmide portant un gène *mcr-1* pour les mutations plasmidiques qui sont impliqués dans la résistance à la Colistine.

GB 2 128 617 décrit l'utilisation de dérivés hydrolysés de la Colistine, à savoir un nanopeptide dépourvu de l'acide diamino-butyrique terminal substitué par une chaîne d'acide gras en combinaison avec l'acide fusidique pour traiter des entérobactéries *Salmonella typhimurium* et *E. Coli* sensibles à la Colistine (voir tableau 1).

L'association synergique de Colistine et acide fusidique a été décrite [9] pour le traitement d'une bactérie non fermentante, souche *P.aeruginosa*, résistante à la Colistine. *P.aeruginosa* est une bactérie non fermentante qui n'appartient pas aux entérobactéries, d'une part et d'autre part, ces souches *P.aeruginosa* présentent une résistance acquise par des mutations chromosomiques dans des gènes *phoQ* et *pmrB*. Les gènes *phoQ* et *pmrB* des entérobactéries présentent des distinctions génomiques importantes par rapport aux gènes analogues dans *Pseudomonas aeruginosa*. En outre, et surtout, dans les entérobactéries ayant acquis une résistance à la Colistine, il a été montré que ce sont principalement les gènes *mgrB* pour les mutations chromosomiques et un plasmide portant un gène *mcr-1* pour les mutations plasmidiques qui sont impliqués dans la résistance à la Colistine.

Selon la présente invention, il a été possible à l'aide d'une nouvelle méthodologie de « criblage » décrite ci-après de détecter des synergies d'action entre 2 antibiotiques vis à vis

d'entérobactéries ayant acquis une résistance aux deux antibiotiques par mutation chromosomique spontanée ou par l'acquisition d'un plasmide, ainsi que vis à vis d'entérobactéries sensibles aux deux antibiotiques, notamment par la méthode dite du bouchon de champagne, mise en œuvre sur un large panel de bactéries, en testant plusieurs combinaisons d'antibiotiques dont des combinaisons de Colistine et de plusieurs dérivés des sulfamides dont la Sulfadiazine et la combinaison de Colistine et acide fusidique.

Ainsi, selon la présente invention, on a découvert que l'association de Colistine et Sulfadiazine, molécules encore disponibles dans le commerce possédant des mécanismes d'action différents, présentent une activité synergique supérieure aux associations de Colistine et d'autres sulfamides testés contre des bactéries multirésistantes du type entérobactéries Gram négative fermentantes, non naturellement intrinsèquement résistantes à la Colistine et à la Sulfadiazine mais ayant acquis cette résistance, notamment *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli*.

Cette combinaison de Colistine et Sulfadiazine n'a jamais été rapportée comme active contre des souches cliniques isolées multi-résistantes, notamment résistantes à la Colistine et/ou aux Sulfamides contre des souches non naturellement intrinsèquement résistantes mais résistantes par acquisition de cette résistance par mutation chromosomique spontanée ou par l'acquisition d'un plasmide et/ou pour empêcher ou réduire l'apparition de résistance contre les dits antibiotiques pour des souches sensibles.

On constate que les effets bactériostatique (inhibiteur de croissance) et bactéricide de cette association s'observent à des concentrations plus faibles quand les 2 molécules antibiotiques se trouvent en combinaison par rapport à chaque molécule antibiotique prise séparément. Autrement dit, une concentration X de Colistine et Y de Sulfadiazine montrent des effets inhibiteurs et bactéricides en combinaison qui n'existent pas pour les mêmes concentrations X et Y pour chaque molécule prise séparément, et ce sur toutes les entérobactéries testées.

Il ne découlait pas de l'Etat de la technique que l'association de Colistine et Sulfadiazine pouvait présenter une synergie sur des entérobactéries à résistances acquises qui sont des bactéries dont la similitude des génomes (vis-à-vis des bactéries *Proteus* à résistance intrinsèque) d'une part et/ou des mécanismes de résistances à la Colistine (vis-à-vis de la bactérie *E. Coli* sensibles à la Colistine) sont substantiellement différents

De même, alors que l'acide fusidique n'est pas actif contre les entérobactéries, selon la présente invention, on a découvert que l'association de Colistine et acide fusidique présente une activité synergique contre des bactéries multi résistantes du type entérobactéries Gram négative fermentantes, non naturellement intrinsèquement résistantes à la Colistine mais ayant acquis cette résistance, notamment *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli*.

La combinaison de Colistine et acide fusidique n'a jamais été rapportée comme active contre des souches cliniques isolées multi-résistantes, notamment résistantes à la Colistine contre des souches non naturellement intrinsèquement résistantes mais résistantes par acquisition de cette résistance par mutation chromosomique spontanée ou par l'acquisition d'un plasmide et/ou pour empêcher ou réduire l'apparition de résistance contre les dits antibiotiques pour des souches sensibles.

Plus précisément la présente invention fournit une association d'un premier composé antibiotique la Colistine et un second composé antibiotique choisi parmi la Sulfadiazine et l'acide fusidique, pour une utilisation dans un traitement thérapeutique contre les entérobactéries pathogènes

Plus particulièrement, la présente invention fournit une association de Colistine et Sulfadiazine contre les entérobactéries non naturellement intrinsèquement résistantes mais ayant acquis une résistance contre au moins la Colistine et/ou la Sulfadiazine, notamment contre une bactérie multi résistante.

Plus particulièrement encore, la présente invention fournit une association de Colistine et acide fusidique contre les entérobactéries, notamment les entérobactéries pathogènes, de préférence contre des entérobactéries non naturellement intrinsèquement résistantes mais ayant acquis une résistance contre au moins la Colistine, notamment contre une bactérie multi résistante.

Parmi les entérobactéries pathogènes, on cite plus particulièrement les bactéries suivantes *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Providencia*, *Morganella*, *Citrobacter*, *Hafnia* et *Yersinia*.

Plus particulièrement, dans l'association la Colistine est sous forme de sulfate de Colistine.

Plus particulièrement encore, l'association de sulfate de Colistine et de Sulfadiazine selon la présente invention est pour une application par voie orale ou par voie topique. On entend ici par « voie orale » : (a) par voie buccale notamment sous forme solide notamment de comprimé ou sous forme liquide ou (b) par voie naso-gastrique (c'est-à-dire à travers une sonde passant par le nez et rejoignant le tube digestif) notamment sous forme liquide.

Dans un autre mode de réalisation d'une association pour une utilisation selon la présente invention, la Colistine est sous forme d'une prodrogue inactive le colistiméthate de sodium (aussi dénommée méthanesulfonate de colistine sodique ou sulfométhate de colistine sodique).

Plus particulièrement encore, l'association comprenant le colistiméthate de sodium est pour une application par voie parentérale ou voie orale.

Plus particulièrement encore, pour le traitement d'une infection, dans l'association de sulfate de Colistine et de Sulfadiazine selon la présente invention la sulfate de Colistine ou le colistiméthate de sodium est utilisée à une concentration de 0.25 à 2.5 millions d'unités moléculaires toutes les 6 heures, soit environ 1 à 10 millions d'unités moléculaires /24h, de préférence de 2 à 5 millions d'unités moléculaires /24h et la Sulfadiazine est utilisée à une concentration de 1 à 3 g/24h.

Pour un traitement par voie orale de décontamination digestive avant une greffe fécale pour les patients présentant des bactéries multi-résistantes, le sulfate de Colistine ou la colistiméthate de sodium est utilisé à un dosage de 2,5 à 50 millions d'unités moléculaires par jour et la Sulfadiazine est utilisée à un dosage de 500 mg à 2,5g par jour, l'association étant administrée pendant 4 jours avant la greffe.

Plus particulièrement encore, pour le traitement d'une infection, dans l'association de sulfate de Colistine et acide fusidique selon la présente invention la sulfate de Colistine ou le colistiméthate de sodium est utilisée à une concentration 0.25 à 2.5 millions d'unités moléculaires toutes les 6 heures, soit environ 1 à 10 millions d'unité /24h, de préférence de 2 à 5 millions d'unités moléculaires /24h et l'acide fusidique sous forme de fusidate de sodium est utilisée à une concentration de 1 à 3 g/24h, de préférence 2 à 2,5 g/24h.

Pour un traitement par voie orale de décontamination digestive avant une greffe fécale pour les patients présentant des bactéries multi-résistantes, le sulfate de Colistine ou la colistiméthate de sodium est utilisé à un dosage de 2,5 à 50 millions d'unités moléculaires par jour et l'acide fusidique sous forme de fusidate de sodium est utilisé à un dosage de 1 à

5 g par jour, de préférence 2 à 3 g/jour, l'association étant administrée pendant 4 jours avant la greffe.

Plus particulièrement encore, l'association selon la présente invention est mise en œuvre pour une utilisation dans un traitement thérapeutique contre des entérobactéries choisies parmi les bactéries des genres *Klebsiella* et *Escherichia*.

Plus particulièrement encore, l'association selon la présente invention est mise en œuvre pour une utilisation dans un traitement thérapeutique contre des entérobactéries choisies parmi les bactéries *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli*.

Comme rapporté dans la description détaillée de la présente demande de brevet, l'association de Colistine et Sulfadiazine est davantage active contre lesdites entérobactéries bactéries à résistance acquise contre la Colistine que l'association de Colistine et sulfaméthoxazole ainsi que l'association de Colistine et acide fusidique.

La présente invention fournit également une composition pharmaceutique comprenant une association d'au moins deux dits composés antibiotiques en quantités thérapeutiquement efficaces pour une utilisation selon l'invention.

Plus particulièrement encore, la composition pharmaceutique se présente sous forme administrable par voie parentérale, par voie orale ou par voie topique.

Plus particulièrement encore, la composition pharmaceutique administrable par voie parentérale ou par voie orale se présente (a) sous forme de comprimé ou (b) de poudre pour être administrée sous forme de solution ou (c) sous forme d'aérosol.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaitront à la lumière de la description détaillée qui va suivre faite en référence aux figures dans lesquelles :

- la figure 1 illustre la méthode de criblage à haut débit permettant de voir l'apparition d'un phénomène de synergie entre 2 molécules anciennes possédant des mécanismes d'action différents par le test dit du bouchon de champagne (rond vide= CT (colistine), rond noir= SUL ('sulfadiazine) ou FA (acide fusidique);

- la figure 2 représente le positionnement des bandelettes E-test pour le « E-test croisé » avec les CMI de A seule et CMI de B seul et CMI de la combinaison A+B (avec deux antibiotiques A et B), les graduations reflètent les concentrations (fortes/faibles

concentrations en haut/bas de la graduation verticale et à gauche/droite de la graduation horizontale ;

- les figures 3A et 3B sont des exemples d'un plan de microplaques permettant de voir, figure 3A si la combinaison Colistine-Sulfadiazine (figure 3A) et la combinaison Colistine-acide fusidique (figure 3B) possèdent une activité (MH : milieu de culture Mueller-Hinton seul, BA+MH= MH+bactérie, SUL : Sulfadiazine, CT : Colistine, FA : acide fusidique) par la méthode de micro dilution en plaque ou méthode de l'échiquier (Checkerboard) ;

- les figures 4A et 4B représente un résultat de test de la méthode de criblage dit du bouchon de champagne entre la Colistine et la Sulfadiazine sur une souche de *Proteus vulgaris* (figure 4A) et entre la Colistine et l'acide fusidique sur une souche de *Klebsiella pneumoniae* (A=pas de synergie, B= effet synergique) ;

- la figure 5A représente des photos présentant les CMI de Colistine suite au dépôt des E-test de Colistine sur des géloses prétraités par des antibiotiques avec: A) bandelette E-test de Colistine seule (A)) et avec Sulfadiazine dans le milieu à différentes concentrations (B) à E)), après 18 h d'incubation sur une souche de *Klebsiella pneumoniae* TH 21 ;

- la figure 5B représente des photos présentant les résultats d'une synergie d'action d'une combinaison d'antibiotiques par lecture des diamètres d'inhibition de l'acide fusidique sur des géloses prétraités avec de la colistine sur une souche de *Klebsiella pneumoniae* avec l'acide fusidique seul (A) et sur gélose supplémentée avec de la Colistine (B et C).

- la figure 6 représente des photos de résultats des E-test pour l'obtention des CMI de: A) la Colistine, B) le Triméthoprim-Sulfaméthoxazole, C) le Sulfaméthoxazole, D) le Triméthoprim, et la lecture des E-test croisés pour les associations suivantes: E) la Colistine+ Triméthoprim-Sulfaméthoxazole, F) la Colistine + Sulfaméthoxazole et G) la Colistine + Triméthoprim sur une souche de *Klebsiella pneumoniae* TH 21

- la figure 7 est un exemple de résultat d'une plaque du test de micro dilution en plaque sur une souche de *Klebsiella pneumoniae* TH 21 mis en évidence par un colorant (apparaissant en grisé sur la figure 7) en présence de bactéries vivantes ;

- la figure 8 est un exemple d'un isobologramme pour des souches de *Klebsiella pneumoniae* ayant montrées une synergie par la technique de microdilution en plaque entre la Colistine et la Sulfadiazine ; et

- les figures 9A et 9B représentent les courbes de cinétiques de bactéricidie pour l'association Colistine et Sulfadiazine sur une souche de *Klebsiella pneumoniae* (figure 9A) et *E. coli* (figure 9B) et -la figure 9C pour l'association Colistine et Acide fusidique sur une souche de *Klebsiella pneumoniae* ; la concentration bactérienne (C) est donnée en ordonnée sous la forme log10 en CFu/mc et le temps est donné en heures en dessous.

1. Matériels.

1.1) Souches bactériennes.

- 55 souches cliniques ont été utilisées présentes dans le laboratoire (URMITE UM 63 CNRS 7278 IRD 198 INSERM U1905, Méditerranée Infection, Facultés de Médecine et de Pharmacie) et de différentes origines : Laos, Thaïlande et France. Ces souches comprennent -53 souches cliniques résistantes à la Colistine : 29 souches de *Klebsiella pneumoniae* (KP), et 24 souches d'*Escherichia coli* (*E.coli*), et

- 2 souches d'*Escherichia coli* (*E.Coli*) étaient sensibles à la Colistine, et

- 36 souches étaient résistantes à la Sulfadiazine dont 13 souches *Klebsiella pneumoniae* et 23 souches d'*Escherichia coli* et 17 sensibles à la Sulfadiazine dont 16 souches *Klebsiella pneumoniae* et 1 souches d'*Escherichia coli*, et

- 36 souches étaient résistantes à la Colistine et à la Sulfadiazine dont 13 souches *Klebsiella pneumoniae* et 23 souches d'*Escherichia coli*.

- Toutes les souches étaient résistantes à l'acide fusidique.

1.2) Antibiotiques.

Le sulfate de Colistine, l'acide fusidique et la Sulfadiazine ont été achetés auprès de la société Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

Le sulfate de Colistine est fraîchement préparé selon les directives de l'EUCAST (European committee on antimicrobial susceptibility testing) dans un solvant approprié. La Sulfadiazine a été dissoute dans du DMSO (diméthylsulfoxyde).

Des Bandelettes d'E-tests de Colistine (CT), de Sulfaméthoxazole (SMX) et de Triméthoprime-Sulfaméthoxazole (SXT) ont été utilisées (Biomerieux, Craonne, France). Les concentrations présentes sur les bandelette d'E-test sont comprises entre 0,016 et 256

µg / ml pour la Colistine, 0,064 et 1024 µg / ml pour le Sulfaméthoxazole, 0,002 et 32 µg / ml pour le Triméthoprim-Sulfaméthoxazole, et 0,002 à 32 µg / ml pour le Triméthoprim.

L'acide fusidique a été dissout dans l'eau distillée stérile. Des Bandelettes d'E-tests de colistine (CT), d'acide fusidique ont été utilisées (Biomerieux, Craponne, France). Les concentrations présentes sur les bandelettes d'E-test sont comprises entre 0,016 et 256 µg / ml pour la colistine et entre 0.016 à 256 µg / ml pour l'acide fusidique.

2. Méthodes.

2.1) Test de sensibilité.

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des Colistine, acide fusidique, Sulfaméthoxazole, Triméthoprim et Sulfaméthoxazole-Triméthoprim ont été déterminées par la méthode des E-test par diffusion sur milieu gélosé en accord avec les recommandations de l'EUCAST.

Pour une souche testée, l'inoculum est obtenu à partir de cultures fraîches sur milieu TSA (Trypticase Soy Agar) après 18-24h de pousse dans une étuve à 37°. Une suspension bactérienne est ensuite réalisée en mettant une quantité de bactéries dans un tube d'eau stérile jusqu'à l'obtention d'une opacité de 0,5 McFarland correspondant à une concentration bactérienne de 1×10^8 UFC/ml. Cette suspension est ensuiteensemencée sur gélose Mueller-Hinton (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France) par écouvillonnage (technique manuelle de référence) toujours en accord avec les recommandations de l'EUCAST. Cette technique consiste à tremper un écouvillon stérile dans la suspension, d'enlever l'excès d'inoculum par pression sur le bord du tube, d'écouvillonner régulièrement la gélose en tournant la plaque de 60° (dans au moins 3 directions différentes) jusqu' à ensemencement de la totalité de la surface. On vient ensuite déposer la bandelette d'E-test qui contient un gradient croissant d'antibiotique d'une extrémité à l'autre. Les concentrations d'antibiotiques sont écrites directement sur cette bandelette afin d'en faciliter la lecture. La gélose est ensuite incubée pendant 24h dans une étuve à 37°C. La lecture de la CMI se fait à l'œil au niveau de l'intersection de la bordure de la zone d'inhibition sur la bandelette. Pour la Sulfadiazine la détermination de la CMI a été déterminée en milieu liquide. Cette technique se présente sur des plaques 96 puits. D'un côté de la plaque se trouve la gamme de dilution de la Sulfadiazine et de l'autre côté on prépare l'inoculum bactérien dans une solution liquide de Mueller-Hinton possédant une concentration en bactéries de 5×10^5 UFC/ml. On ensemence chaque tube de la gamme de façon à obtenir 50% de suspension d'antibiotique dans 50%

de suspension bactérienne. Les tubes sont alors incubés à 37°C pendant 24 heures. La CMI est déterminée par évaluation de la croissance bactérienne dans les différents tubes par mesure de l'absorbance de la solution (après agitation) dans chaque tube en utilisant un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 630 nm.

5 2.2. Test de Synergie.

2.2.1 Test du « bouchon du champagne »

Le test du bouchon de champagne consiste à vérifier s'il existe sur milieu solide une action synergique entre 2 molécules données. Cette synergie s'observe par l'apparition d'une zone d'inhibition supplémentaire entre 2 disques d'antibiotiques. Pour la réalisation de ce
10 test, les souches à tester doivent être fraîches obtenues sur milieu TSA après 18 à 24 h de pousse dans une étuve à 37°C. Des colonies bactériennes sont prélevées et mises en suspension dans de l'eau physiologique stérile jusqu'à l'obtention d'une opacité de 0.5 McFarland. L'ensemencement est alors réalisé sur des géloses carrées Mueller-Hinton (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) comme pour la réalisation d'un antibiogramme standard.
15 Des disques de Colistine (imprégnés à 50µg) sont déposés à l'aide d'une pince stérile, puis des disques vierges sont déposés à distance variable du premier disque. La distance entre les disques varie de 0 mm à 30 mm comme représenté figure 1. On prépare ensuite une solution de Sulfadiazine à 3×10^4 µg/ml et à l'aide d'une pipette on dépose 10 µl de la solution de Sulfadiazine sur les disques vierges. On les met à incuber dans l'étuve à 37°C
20 pendant 24 heures. Pour la combinaison Colistine (CT) +acide fusidique (FA), des disques d'acide fusidique (imprégnés à 10µg) sont déposés à distance variable du premier disque de colistine.

2.2.2. Méthode des E-tests ou des disques d'antibiotiques déposés sur des géloses prétraitées par des antibiotiques.

25 Ce test consiste à rajouter un antibiotique au sein de la gélose et de tester l'activité d'un autre antibiotique en déterminant sa CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) par la méthode des E-test ou de déterminer l'augmentation de la zone d'inhibition en mm par la méthode de diffusion par disques.

Une solution d'agar est préparée à l'aide d'une poudre de Mueller-Hinton pour
30 réaliser des géloses Mueller-Hinton selon les instructions du fournisseur (Biomerieux, Craponne, France). Ce milieu est autoclavé ; puis les bouteilles sont placées au bain marie à une température de 45-50°C pour obtenir une solution bien liquide. Entre temps, des

solutions contenant des concentrations différentes de Sulfadiazine et d'autres de Colistine sont réalisées (la Sulfadiazine se dissout dans le DMSO, la Colistine se dissout dans l'eau). Les bouteilles une fois retirées du bain marie sont placées sous le PSM (Poste de Sécurité Microbiologique) afin de préserver la stérilité. Un temps d'attente est alors nécessaire pour que le milieu baisse en température. Dans une flasque, un certain volume du milieu est déposé ainsi qu'un volume spécifique d'antibiotique afin d'obtenir une solution contenant la concentration finale en antibiotique souhaitée. Le mélange est ensuite homogénéisé afin d'obtenir une solution homogène, puis coulé dans des boîtes de Pétri de 90mm puis séché. Les mêmes étapes sont répétées pour la préparation des différentes concentrations. On peut noter que le DMSO n'interfère pas dans les résultats puisque son pourcentage ne dépasse pas 10 % dans le milieu et des boîtes prétraités au DMSO ont été préparées et seront utilisées comme contrôles.

2.2.3. E-test croisé.

Cette méthode a été utilisée pour montrer s'il existe une éventuelle synergie entre la Colistine (CT) et le Sulfaméthoxazole (SMX) ou la Colistine et le Triméthoprim (TMP) ou la Colistine et l'association Triméthoprim-Sulfaméthoxazole (SXT). Cette méthode a également été utilisée pour montrer s'il existe une éventuelle synergie entre la Colistine (CT) et l'acide fusidique (FA).

La première étape de cette méthode consiste à déterminer la CMI pour chaque antibiotique pris séparément pour les souches données en utilisant la méthode classique des E-test (cf partie 2.1). Une bandelette E-test correspondant à chaque antibiotique est testée et la CMI est alors déterminée par lecture directe.

Pour la deuxième étape, l'inoculum et l'ensemencement des géloses Mueller-Hinton a été réalisé de la même façon que précédemment. Deux bandelettes E-test sont placées sur la gélose en croix avec un angle de 90°. La bandelette E-test de Colistine est placée en premier puis la bandelette de l'autre antibiotique est placée au niveau du croisement des CMI respectives des deux antibiotiques (les CMI ayant été déterminées au préalable dans la première partie). Les boîtes sont alors incubées pendant 24 heures à 37°C. Après incubation, les nouvelles CMI sont alors lues directement sur les géloses suivant les mêmes règles de l'EUCAST [5].

La Figure 2 représente le positionnement des bandelettes E-test pour le « E-test croisé ».

2.2.4. Micro dilution en plaque ou méthode de l'échiquier (Checkerboard):

La sensibilité des bactéries à la Sulfadiazine, à la Colistine et à l'acide fusidique ainsi que des combinaisons de deux antibiotiques a été évaluée par une méthode de titrage en échiquier réalisée sur des micro-plaques de 96 puits[6].

Dans un premier temps, l'inoculum bactérien a été préparé à une concentration finale égale à 5×10^5 CFU/ml puis 100 µl de cet inoculum est inoculé dans chacun des puits de la plaque.

Des exemples de plans de plaques permettant de voir si les combinaisons Colistine-Sulfadiazine et Colistine-acide fusidique possèdent une activité sont représentés figure 3A pour Colistine-Sulfadiazine et figure 3B pour Colistine-acide fusique.

Pour la réalisation de l'échiquier, une série de dilutions a été préparé pour la Colistine. Les concentrations en Colistine varient de 0 à 100 µg / ml et sont déposées au niveau des puits verticaux. La Sulfadiazine et acide fusidique sont déposés dans les puits horizontaux et les concentrations varient entre 0 et 64 µg / ml. Après 24 heures d'incubation à 37 ° C, la croissance bactérienne est évaluée par mesure de l'absorbance de la solution (après agitation) dans chaque puits en utilisant un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 630 nm.

L'activité de chaque combinaison antimicrobienne est estimée en utilisant l'indice de concentration inhibitrice fractionnaire (FIC) maximale.

FIC = FIC de l'antibiotique A+ FIC de l'antibiotique B, sachant que

$$\text{FIC A} = \frac{\text{CMI A dans la combinaison}}{\text{CMI A seule}} \text{ et } \text{FIC B} = \frac{\text{CMI B dans la combinaison}}{\text{CMI B seule}}$$

Les valeurs FIC ont été interprétées selon le critère suivant: l'association d'antibiotiques possède un effet synergique lorsque la valeur de la FIC $\leq 0,5$. Toutes les expériences sont effectuées en double afin d'assurer la reproductibilité des résultats [6].

2.2.5. Etude de la bactéricidie

Les dosages pour déterminer la bactéricidie des différentes associations ont été effectués sur une souche représentative de chaque espèce. Les isolats ont été choisis pour être testés contre la Colistine seule, la Sulfadiazine seule et la combinaison Colistine-Sulfadiazine à des concentrations égales à la CMI. Les solutions de Colistine et de Sulfadiazine ont été fraîchement préparées ainsi que les suspensions bactériennes

(concentration de 5×10^5 CFU/ml dans du milieu de culture Mueller-Hinton liquide (MH)). Pour réaliser cette technique, 4 flacons (tubes) ont été mis en œuvre comme suit :

- le premier contenant uniquement la suspension bactérienne et qui va servir de contrôle.
- 5 - le deuxième contient un volume de la suspension bactérienne + 1/2 volume de solution de Colistine + 1/2 volume de milieu MH.
- le troisième contient un volume de la suspension bactérienne + 1/2 volume de solution de Sulfadiazine + 1/2 volume de milieu MH.
- 10 - le quatrième contient un volume de la suspension bactérienne + 1/2 volume de solution de Sulfadiazine + 1/2 volume de solution de Colistine.

Des échantillons de 100 µl provenant de chaque condition sont prélevés toutes les 0-2-4-6 et 24 heures. Des dilutions en cascades allant de 10^{-1} à 10^{-8} sont réalisées pour chaque échantillon prélevé. Puis, un échantillon de 100 µl de chaque dilution est étalé sur une gélose Mueller-Hinton et incubé pendant 18 à 24 heures à 37°C. Après 24h, le nombre
15 de colonies présentes sur la gélose est compté, sachant qu'une boîte est prise en compte uniquement si le nombre de colonies est compris entre 30 et 300.

La synergie est définie comme étant une diminution $\geq 2 \log_{10}$ du nombre de colonies à 24 h pour la combinaison par rapport à l'agent le plus actif seul.

L'indifférence est définie comme étant diminution $< 2 \log_{10}$ du nombre des colonies
20 à 24 h pour la combinaison par rapport au médicament le plus actif seul.

L'antagonisme est défini comme étant une augmentation $\geq 2 \log_{10}$ du nombre de colonies à 24 h pour la combinaison par rapport au médicament le plus actif seul.

3. Résultats:

3.1. Test de sensibilité

25 Les CMI des souches vis à vis des différents antibiotiques testés ont été mesurées (CMI de : la Colistine, la Sulfadiazine, le Sulfaméthoxazole, le Triméthoprim et du Sulfaméthoxazole-Triméthoprim) et sont présentées dans les tableaux 1 et 2 ci-après.

53 souches présentent une résistance à la Colistine (CT), 2 souches sont sensibles (2 souches d'*Escherichia coli*). 18 souches parmi les 55 sont sensibles au Sulfaméthoxazole

(SMX), au Triméthoprim-Sulfaméthoxazole (SXT), 17 sont sensible à la Sulfadiazine (SUL) et 21 souches sont sensibles au Triméthoprim (TMP).

Toutes les souches ont une résistance à l'acide fusidique (CMI d'au moins 256 microg/ml).

5 3.2. Test du bouchon du champagne.

Dans une première étape de « criblage », des tests du bouchon de champagne ont été réalisés entre la Colistine et la Sulfadiazine et entre la Colistine et le Triméthoprim-Sulfaméthoxazole. Toutes les souches ont été testées. Après incubation des boîtes 24h à 37°C, un effet synergique a été recherché (apparition d'une zone d'inhibition entre les 2
10 disques) entre la Colistine et le Sulfaméthoxazole-Triméthoprim en plaçant les disques à différentes distances l'un de l'autre, à savoir 5, 10, 15, 20 et 25 mm (figure 4). Pour la combinaison Colistine-Sulfadiazine, une zone de synergie (à savoir une zone d'inhibition supplémentaire entre les 2 disques d'antibiotique) est apparue pour des distances comprises entre 5, 10 et 15 mm. La figure 4A illustre le test de la méthode de criblage dit du bouchon
15 de champagne entre la Colistine et la Sulfadiazine (300µg). La partie A de la figure 4 représente une zone où il n'y a pas de synergie visible car la distance entre CT et SUL est trop grande. Mais si l'on rapproche les disques comme dans la partie B, il y a bien une zone de synergie présente entre les 2 disques pour 5, 10 et 15 mm.

Pour la combinaison entre la Colistine et l'acide fusidique, une zone de synergie
20 apparaît lorsque les disques sont à une distance de : 5, 10, 15, 20 et 25 mm La figure 4B illustre le test de la méthode de criblage dit du bouchon de champagne entre la colistine et l'acide fusidique sur une souche de *Klebsiella pneumoniae* TH54.

3.3. Méthode des E-tests ou des disques d'antibiotiques déposés sur des géloses prétraitées par des antibiotiques.

25 3.3.1 CT+SUL

Une diminution de la CMI de la Colistine a été observée en présence de différentes concentrations de Sulfadiazine: 8, 16, 32, 64, 128, 150, 200, 300 µg/ml, y compris chez les souches résistantes à la Colistine et les souches sensibles à la Colistine. Sur les 55 souches, il y a 48 souches dont la CMI a diminué d'une 1/2 dilution à 14 dilutions. Cependant, pour 3
30 souches la CMI n'a pas changé. Concernant les 48 souches présentant une diminution de la

CMI, 25 souches ont eu une diminution de la CMI à la colistine au moins supérieur à 2 dilutions alors que pour les autres sulfamides la combinaison est moins efficace.

On note que les souches sensibles au Sulfaméthoxazole, au Triméthoprime et au Triméthoprime sulfométhoxazole présentent de plus fortes diminutions de la CMI pouvant aller jusqu'à une diminution de 3 à 14 dilutions, tandis que les souches résistantes au Sulfaméthoxazole et au Triméthoprime-sulfométhoxazole, la diminution de la CMI varie entre 0,5 et 2 dilutions (Ex: *Klebsiella pneumoniae* H5500, *Klebsiella pneumoniae* TH114, *Klebsiella pneumoniae* Cl2, *Klebsiella pneumoniae* Cl3, *Escherichia coli* P10S, *Escherichia coli* FHM 19).

Les résultats sont présentés dans les tableaux 1 et 2 ci-après.

La figure 5A représente des photos présentant les CMI de Colistine suite au dépôt des E-test de Colistine (0.016-256µg/ml) sur des gélose prétraités par des antibiotiques avec: A) bandelette E-test de Colistine seule sans Sulfadiazine dans le milieu, CMI : 32 µg/ml B) E-test de Colistine et 8 µg/ml de Sulfadiazine, CMI : 4 µg/ml C) E-test de Colistine et 16 µg/ml de Sulfadiazine, CMI : 0.19 µg/ml D) E-test de Colistine et 32 µg/ml de Sulfadiazine, CMI : 0.125 µg/ml et E) E-test de Colistine et 64 µg/ml de Sulfadiazine dans le milieu, CMI : 0.125 µg/ml après 18 h d'incubation sur une souche de *Klebsiella pneumoniae* TH 21.

3.3.2 CT+FA

Une augmentation du diamètre d'inhibition a été observée par la méthode : dépôt de 10µl de colistine à 50µg sur les disques d'acide fusidique directement. Sur les 36 souches, 18 souches (50%) présentent un diamètre augmenté ≥5mm.

De même, par la méthode du dépôt de disques d'acide fusidique sur les géloses Muller Hinton préparés avec 50 µg de colistine une augmentation beaucoup plus importante des diamètres d'inhibition a été observée allant jusqu'à l'augmentation du diamètre à 28 mm.

Les résultats sont résumés dans le tableau 3 ci-après.

La Figure 5B représente des photos présentant les résultats d'une synergie d'action d'une combinaison d'antibiotiques par lecture des diamètres d'inhibition de l'acide fusidique sur des gélose prétraités avec de la colistine sur une souche de *Klebsiella pneumoniae* LH102 avec: A) utilisation d'un disque d'acide fusidique seul (FA, 10µg) sur *K.pneumoniae*

LH102 sur une gélose non supplémentée ; B) *K.pneumoniae* LH102 cultivée sur gélose MH supplémentée avec 50 µg de colistine ; C) utilisation un disque d'acide fusidique sur une souche de *K. pneumoniae* LH102 cultivée sur gélose MH supplémentée avec 50 µg de colistine.

5 3.4. E-test croisé

Les E-test croisés entre la Colistine et le Sulfaméthoxazole montrent une diminution de la CMI de la Colistine de 0 à 4 dilutions. De même, la Colistine et le Sulfaméthoxazole-Triméthoprine d'une part et la Colistine et le Triméthoprine d'autre part montrent une diminution des CMIs de la Colistine de 0 à 4 dilutions à l'exception de *Serratia marcescens*
10 où la CMI de la Colistine a diminué de 8 dilutions.

L'ensemble des résultats est présenté dans les tableaux 1, 2 et 4.

La figure 6 représente des photos présentant les résultats des E-test pour l'obtention des CMI de: A) la Colistine, B) le Triméthoprine-Sulfaméthoxazole, C) le Sulfaméthoxazole, D) le Triméthoprine, et la lecture des E-test croisés pour les associations suivantes: E) la
15 Colistine + Triméthoprine-Sulfaméthoxazole, F) la Colistine + Sulfaméthoxazole et G) la Colistine + Triméthoprine sur une souche de *Klebsiella pneumoniae* TH 21.

3.5. Microdilution en plaque ou "test du Checkerboard" :

Pour le test de micro dilution en plaque (« test du checkerboard »), toutes les souches testées ont montré une synergie vis à vis de la combinaison d'antibiotiques. En
20 effet, on constate que l'effet inhibiteur de croissance s'observe à des concentrations plus faibles quand les 2 molécules se trouvent en combinaison par rapport à chaque antibiotique pris séparément.

La figure 7 est un exemple de résultat d'une plaque du test de micro dilution en plaque sur une souche de *Klebsiella pneumoniae* TH 21. Le résultat est mis en évidence
25 après l'utilisation d'un colorant vital: l'iodonitrotetrazolium, qui donne une coloration rouge (apparaissant en grisé sur la figure 7) en présence de bactéries vivantes.

Pour la combinaison CT+FA, on constate la persistance des bactéries en présence de Colistine et même à une concentration de 25 µg/ml. De même pour l'acide fusidique, la présence de bactéries vivantes est observée aux différentes concentrations d'acide
30 fusidique: 256 µg/ml.

Pour la combinaison CT+SUL, on constate la persistance des bactéries en présence de Colistine et même à une concentration de 100 µg/ml. De même pour la Sulfadiazine, la présence de bactéries vivantes est observée aux différentes concentrations de Sulfadiazine: 8, 16, 32, 64 µg/ml.

5 Par contre, en présence de la combinaison, une inhibition de la croissance bactérienne est observée à différents niveaux de la plaque. Autrement dit, une concentration X de Colistine et Y de Sulfadiazine ou acide fusidique montrent un effet inhibiteur en combinaison qui n'existe pas pour les mêmes concentrations X et Y pour
10 chaque molécule prise seule. Ce résultat a été observé chez toutes les souches testées. Une autre façon d'analyser ce genre de test consiste à tracer un isobologramme grâce aux calculs des FIC (fractional inhibitory concentration). L'obtention d'une courbe concave est un indice de synergie ce qui est le cas pour les 4 souches présentes sur la figure 8.

La figure 8 est un exemple d'un isobologramme pour des souches de *Klebsiella pneumoniae* TH20, PTH166, LH70 et LH17 ayant montrées une synergie par la technique de
15 microdilution en plaque entre la Colistine et la Sulfadiazine.

Les résultats sont présentés au tableau 4.

3.6. Etude de la bactéricidie:

La combinaison Colistine-Sulfadiazine inhibe la croissance de toutes les souches testées dans cette étude même celles résistantes à la Colistine. Comme illustration de
20 l'activité bactéricide de cette combinaison d'antibiotiques, les résultats sur 2 souches résistantes à la Colistine: *Klebsiella pneumoniae* et *E. coli* sont explicités. Pour cette étude, les concentrations à tester ont été choisies en fonction des CMI de chaque molécule, établies par la méthode de micro dilution en plaque. Pour *Klebsiella pneumoniae*, la concentration en Colistine = 100µg/ml, la concentration en Sulfadiazine = 200 µg/ml et
25 pour *E. coli*: la concentration en Colistine = 100µg/ml, la concentration en Sulfadiazine= 100 µg/ml. Par contre, pour les concentrations de la combinaison, elles ont été choisies par la concentration la plus basse de la combinaison pouvant inhiber la croissance. Pour *Klebsiella pneumoniae* ces valeurs sont: 16µg/ml de Colistine + 8µg/ml de Sulfadiazine et pour *E. coli* ces valeurs sont : 12µg/ml de Colistine + 4µg/ml de Sulfadiazine.

30 Pour *Klebsiella pneumoniae*, la croissance bactérienne diminue de 1,5 log en présence de Colistine et de 2 log en présence de Sulfadiazine au bout de 24 h ; mais l'inhibition totale ne s'observe qu'au bout de 24h avec la combinaison.

Pour *E. coli*, il n'y a pas de diminution observée en présence de Colistine ou de Sulfadiazine seule voir même on a une augmentation de la croissance bactérienne. Par contre, on observe une diminution de 6 log (presque 100% d'inhibition) avec l'association Colistine-Sulfadiazine. Ces résultats sont présentés dans la figure ci-dessous.

5 Les Figures 9 A et 9B représentent les courbes de cinétiques de l'étude de la bactéricidie pour *Klebsiella pneumoniae* LH 70 (figure 9A) et *E. coli* FHM19 (figure 9B) avec la concentration bactérienne en ordonnées et la durée en heures en abscisses.

La Figure 9C représente la courbe de cinétique de l'étude de la bactéricidie pour *Klebsiella pneumoniae* TH54 avec l'association Colistine et Acide Fusidique avec la
10 concentration bactérienne en ordonnées et en abscisses la durée en heures.

Tous ces résultats prouvent que les combinaisons Colistine-Sulfadiazine et Colistine-Acide fusidique possèdent une activité bactéricide car l'inhibition bactérienne est totale après 24 heures d'incubation contre des bactéries multirésistantes. Ces bactéries présentent une résistance à la Colistine, à la Sulfadiazine et à l'Acide Fusidique seul, car on peut observer
15 qu'après 24 heures la courbe de croissance bactérienne est presque identique à la concentration bactérienne de départ alors qu'avec l'association la diminution est très importante.

Dans les tableaux 2A-2B et 3 « avant » signifie : la CMI prise séparément pour chaque antibiotique, et « après » signifie : nouvelles CMI lu au niveau du croisement des E-
20 tests au niveau de la synergie d'action.

Tableau 1. Présentation des CMI obtenues pour la Colistine (CT), la Sulfadiazine (SUL), le sulfaméthoxazole (SMX), le triméthoprim (TMP), le triméthoprim-sulfaméthoxazole (SXT)

5

		Mécanisme de résistance CMI limites	CMI (µg/ml)				
			CT	SMX	SXT	TMP	
			SUL				
			2 64-256	64-256	2-4	2-4	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KP LH 102		12	24	0.047	0.38	8
	KP LH 12	mgrB stop/mcr-1	32	12	0.066	0.5	16
	KP LH 131	mgrB stop /mcr-1	32	>1024	0.25	0.25	64
	KP LH 140		32	48	0.064	0.5	8
	KP LH 17		12	24	0.047	0.25	8
	KP LH 61	mgrB sub/mcr-1	24	>1024	>32	>32	64
	KP LH 70		16	64	0.047	0.25	8
	KP LH 74	mgrB sub	16	>1024	>32	>32	64
	KP LH 92	mcr-1	24	>1024	>32	>32	64
	KP LH 94		16	>1024	>32	>32	64
	KP LH 375		12	16	0.047	0.25	32
	KP H 5500		64	>1024	>32	>32	64
	KP TH 20	mgrB ISI	48	16	0.094	0.75	8
	KP TH 224		12	64	0.064	0.25	>64
	KP TH 28	mgrB IS2	16	32	0.094	1	32
	KP TH 196	mgrB ISI	12	24	0.064	0.75	64
	KP TH 54		32	64	0.094	0.25	16
	KP TH 68		48	32	0.064	0.25	8
	KP TH 34		16	48	0.094	0.38	16
	KP TH 166		3	32	0.064	0.38	8
	KP TH 21		24	32	125	0.75	16
	KP TH 213	mgrB IS3	32	8	0.047	0.5	8
	KP TH 114		16	>1024	>32	>32	>64
	KP TH 164		12	>1024	>32	>32	32
	KPcl2		8	>1024	>32	>32	200
	KPcl3		16	>1024	>32	>32	400
	<i>Kp119R</i>	mcr-1	3	>1024	>32	>32	>128
	<i>KpFHA60</i>	mcr-1	12	>1024	>32	>32	>128
	<i>KpFHM128</i>	mcr-1	6	>1024	>32	>32	>128

<i>Escherichia coli</i>	<i>E.coli FHA 102</i>		8	24	0.023	>32	8
	<i>E.coli FHM 19</i>		12	>1024	>32	>32	>128
	<i>E.coli LH 121</i>	mcr-1	16	>1024	>32	>32	>128
	<i>E.coli LH257</i>	mcr-1	12	>1024	>32	>32	>128
	<i>E.coli LH57</i>	mcr-1	8	>1024	>32	>32	>128
	<i>E.coli LH140</i>	mcr-1	12	>1024	>32	>32	>128
	<i>E.coli LH1</i>	mcr-1	6	>1024	>32	>32	>128
	<i>E.coli LH30</i>	mcr-1	6	>1024	>32	>32	>128
	<i>E.coli LH214</i>	mcr-1	6	>1024	>32	>32	>128
	<i>E.coli TH99</i>	mcr-1	4	>1024	>32	>32	>128
	<i>E.coli P6</i>	mcr-1	6	>1024	>32	>32	>128
	<i>E.coli P17</i>	mcr-1	4	>1024	>32	>32	>128
	<i>E.coli 235</i>	mcr-1	4	>1024	>32	>32	>128
	<i>E.coli SE65</i>	mcr-1	4	>1024	>32	>32	>128
	<i>E.coli MCR1</i>	mcr-1	3	>1024	>32	>32	>128
	<i>E.coli 134R</i>	mcr-1	12	>1024	0.9	0.25	>128
	<i>E.coli 143R</i>	mcr-1	3	>1024	>32	4	>128
	<i>E.coli 85R</i>	mcr-1	3	>1024	>32	>32	>128
	<i>E.coli 96R</i>	mcr-1	3	>1024	>32	>32	>128
	<i>E.coli R1</i>	mcr-1	3	24	0.032	0.125	>128
	<i>E.coli 117R</i>	mcr-1	3	>1024	>32	>32	>128
	<i>E.coli 95R</i>	mcr-1	4	>1024	>32	>32	>128
	<i>E.coli 44A</i>	mcr-1	4	>1024	>32	>32	>128
	<i>E.coli 6R</i>	mcr-1	4	>1024	>32	>32	>128
<i>E. coli sensibles</i>	<i>E.coli P7S</i>		0.125	24	0.047	0.25	4
	<i>E.coli P10S</i>		0.38	>1024	>32	>32	64

Tableau 2A. Présentation des CMI obtenues par la technique des E-tests croisés entre la Colistine (CT) et la Sulfadiazine (SUL), le sulfaméthoxazole (SMX) et le triméthoprine-sulfaméthoxazole (SXT). (« avant » signifie la CMI prise séparément pour chaque antibiotique, et « après » signifie : nouvelles CMI lu au niveau du croisement des E-tests au niveau de la synergie d'action).

Isolats	Souche	CMI(µg/ml) CT + SUL				CMI (µg/ml) CT+SMX				CMI (µg/ml) CT+SXT			
		Avant CT	SUL	Après CT	SUL	Avant CT	SMX	Après CT	SMX	Avant CT	SXT	Après CT	SXT
<i>K. pneumoniae</i>	KP LH 102	12	8	1	4	12	24	4	16	12	0.047	4	0.032
	KP LH 12	32	16	<0.016	4	32	12	8	8	32	0.066	24	0.004
	KP LH 131	32	64	16	8	32	>1024	32	1024	32	0.25	4	0.094
	KP LH 140	32	8	<0.016	4	32	48	6	16	32	0.064	8	0.047
	KP LH 17	12	8	<0.016	4	12	24	6	12	12	0.047	8	0.023
	KP LH 61	24	64	6	8	24	>1024	16	1024	24	>32	24	32
	KP LH 70	16	8	<0.016	4	16	64	3	24	16	0.047	4	0.023
	KP LH 74	16	64	6	8	16	>1024	16	1024	16	>32	16	>32
	KP LH 92	24	64	8	8	24	>1024	24	1024	24	>32	24	24
	KP LH 94	16	64	6	8	16	>1024	16	1024	16	>32	16	>32
	KP LH 375	12	32	4	4	12	16	2	16	12	0.047	0.75	0.023
	KP H 5500	64	64	32	8	64	>1024	64	1024	64*	>32	64	32
	KP TH 20	48	8	<0.016	4	48	16	12	6	48	0.094	12	0.016
	KP TH 224	12	>64	<0.016	8	12	64	2	24	12	0.064	2	0.032
	KP TH 28	16	32	0.125	4	16	32	2	12	16	0.094	2	0.047
	KP TH 196	12	64	<0.016	8	12	24	1	12	12	0.064	3	0.032
	KP TH 54	32	16	0.125	4	32	64	8	16	32	0.094	32	0.047
	KP TH 68	48	8	<0.016	4	48	32	6	12	48	0.064	6	0.032
	KP TH 34	16	16	<0.016	4	16	48	3	12	16	0.094	2	0.032
	KP TH 166	3	8	0.38	4	3	32	0.5	12	3	0.064	0.75	0.047
	KP TH 21	24	16	0.125	4	24	32	16	3	24	125	4	0.047
	KP TH 213	32	8	0.125	4	32	8	3	4	32	0.047	3	0.016
	KP TH 114	16	>64	4	8	16	>1024	16	1024	16	>32	16	32
	KP TH 164	12	32	4	8	12	>1024	8	1024	12	>32	8	32

PCT/FR2017/052635

	KPe12	8	200	6	50	8	>1024	8	1024	8	>32	8	>32
	KPe13	16	400	4	50	16	>1024	16	1024	16	>32	16	32
	119 R	3	>128	3	128	3	>1024	3	>1024	3	>32	3	>32
	FHA 60	12	>128	2.5	200	12	>1024	6	512	12	>32	12	16
	FHM 128	6	>128	5	12.5	6	>1024	4	>1024	6	>32	6	>32
	FHA 102	8	8	6	4	8	24	3	12	8	0.023	6	0.016
	FHM 19	12	8	12	4	12	>1024	12	1024	12	>32	12	32
	LH 121	16	>128	2.5	200	16	>1024	8	>1024	16	>32	8	>32
	LH 257	12	>128	5	200	12	>1024	12	>1024	12	>32	12	12
	LH 57	8	>128	5	128	8	>1024	4	>1024	8	>32	8	12
<i>E. coli</i>	LH 140	12	>128	10	128	12	>1024	4	>1024	12	>32	4	>32
	LH 1	6	>128	5	128	6	>1024	4	>1024	6	>32	4	16
	LH 30	6	>128	2.5	64	6	>1024	4	>1024	6	>32	4	>32
	LH 214	6	>128	5	200	6	>1024	4	>1024	6	>32	4	>32
	TH 99	4	>128	5	4	4	>1024	4	>1024	4	>32	4	>32
	P 6	6	>128	2.5	128	6	>1024	4	>1024	6	>32	4	>32
	P 17	4	>128	2.5	128	4	>1024	4	>1024	4	>32	3	>32
	235	4	>128	5	128	4	>1024	4	>1024	4	>32	4	16
	SE 65	4	>128	3	64	4	>1024	3	>1024	4	>32	4	>32
	MCR 1	3	>128	1.5	8	3	>1024	3	>1024	3	>32	3	>32
	134 R	12	>128	3	128	12	>1024	3	>1024	12	0.9	12	0.023
	143 R	3	>128	0.75	32	3	>1024	3	>1024	3	>1.5	3	0.38
	85 R	3	>128	1.5	128	3	>1024	3	>1024	3	>32	3	>32
	96 R	3	>128	1.5	128	3	>1024	3	>1024	3	>32	3	>32
	R 1	3	>128	0.75	32	3	24	1	6	3	0.032	3	0.006
	117 R	3	>128	3	128	3	>1024	3	>1024	3	>32	3	8
	95 R	4	>128	3	128	4	>1024	4	512	4	>32	4	16
	44 A	4	>128	2.5	200	4	>1024	4	>1024	4	>32	4	>32
	6 R	4	>128	3	32	4	>1024	4	>1024	4	>32	4	>32
<i>E. coli sensibiles</i>	P7S	0.125	4	<0.016	4	0.125	24	0.032	16	0.125	0.047	0.125	0.047
	P10S	0.38	64	0.064	8	0.38	>1024	0.38	1024	0.38	>32	0.38	>32

Tableau 2B. Présentation des CMI obtenues par la technique des E-tests croisés entre la Colistine (CT) et la Sulfadiazine (SUL), le Tméthoprim (TMP).

Isolates	Strain	CMI (µg/ml) CT + SUL				CMI (µg/ml) CT+TMP			
		Avant		Après		Avant		Après	
		CT	SUL	CT	SUL	CT	TMP	CT	TMP
<i>K. pneumoniae</i>	KP LH 102	12	8	1	4	12	0.38	1	0.38
	KP LH 12	32	16	<0.016	4	32	0.5	6	0.19
	KP LH 131	32	64	16	8	32	0.25	6	0.125
	KP LH 140	32	8	<0.016	4	32	0.5	6	0.25
	KP LH 17	12	8	<0.016	4	12	0.25	12	0.125
	KP LH 61	24	64	6	8	24	>32	24	8
	KP LH 70	16	8	<0.016	4	16	0.25	4	0.125
	KP LH 74	16	64	6	8	16	>32	16	8
	KP LH 92	24	64	8	8	24	>32	24	12
	KP LH 94	16	64	6	8	16	>32	16	12
	KP LH 375	12	32	4	4	12	0.25	3	0.125
	KP H 5500	64	64	32	8	64	>32	3	8
	KP TH 20	48	8	<0.016	4	48	0.75	6	0.25
	KP TH 224	12	>64	<0.016	8	12	0.25	3	0.125
	KP TH 28	16	32	0.125	4	16	1	2	0.38
	KP TH 196	12	64	<0.016	8	12	0.75	2	0.25
	KP TH 54	32	16	0.125	4	32	0.25	6	0.125
	KP TH 68	48	8	<0.016	4	48	0.25	12	0.094
	KP TH 34	16	16	<0.016	4	16	0.38	3	0.19
	KP TH 166	3	8	0.38	4	3	0.38	0.75	0.25
	KP TH 21	24	16	0.125	4	24	0.75	4	0.25
	KP TH 213	32	8	0.125	4	32	0.5	4	0.19
	KP TH 114	16	>64	4	8	16	>32	12	8
	KP TH 164	12	32	4	8	12	>32	12	8
	KPc12	8	200	6	50	8	>32	8	12
	KPc13	16	400	4	50	16	>32	16	8
	119 R	3	>128	3	128	3	>32	3	>32
	FHA 60	12	>128	2.5	200	12	>32	12	>32
	FHM 128	6	>128	5	12.5	12	>32	6	>32
<i>E. coli</i>	FHA 102	8	8	6	4	8	>32	8	8
	FHM 19	12	8	12	4	12	>32	12	12
	LH 121	16	>128	2.5	200	16	>32	8	>32
	LH 257	12	>128	5	200	12	>32	4	>32
	LH 57	8	>128	5	128	8	>32	4	>32
	LH 140	12	>128	10	128	12	>32	4	>32
	LH 1	6	>128	5	128	6	>32	4	>32
	LH 30	6	>128	2.5	64	6	>32	4	>32
	LH 214	6	>128	5	200	6	>32	4	>32
	TH 99	4	>128	5	4	4	>32	4	>32
	P 6	6	>128	2.5	128	6	>32	4	>32
	P 17	4	>128	2.5	128	4	>32	4	>32

	235	4	>128	5	128	4	>32	4	>32
	SE 65	4	>128	3	64	4	>32	4	12
	MCR 1	3	>128	1.5	8	3	>32	3	12
	134 R	12	>128	3	128	12	0.25	3	0.094
	143 R	3	>128	0.75	32	3	4	0.25	1
	85 R	3	>128	1.5	128	3	>32	3	>32
	96 R	3	>128	1.5	128	3	>32	3	>32
	R 1	3	>128	0.75	32	3	0.125	1	0.023
	117 R	3	>128	3	128	3	>32	0.19	6
	95 R	4	>128	3	128	4	>32	4	16
	44 A	4	>128	2.5	200	4	>32	4	>32
	6 R	4	>128	3	32	4	>32	4	>32
<i>E. coli</i> <i>sensibles</i>	P7S	0.125	4	<0.016	4	0.125	0.25	0.047	0.25
	P10S	0.38	64	0.064	8	0.38	>32	0.38	12

Tableau 3

		Colistine (CT) CMI µg/ml		Acide Fusidique (FA) CMI µg/ml	
Souches	Mécanisme de résistance	Avant	Après	Avant	Après
KP LH 12	mgrB stop/mcr-1	32	3	>256	96
KP LH 140		32	4	>256	32
KP LH 17		12	6	>256	48
KP LH 70		16	4	>256	32
KP TH 20	mgrB ISI	48	4	>256	48
KP TH 224		12	3	>256	48
KP TH 28	mgrB IS2	16	3	>256	48
KP TH 196	mgrB ISI	12	2	>256	48
KP TH 54		32	6	>256	48
KP TH 34		16	3	>256	48
KP TH 21		24	6	>256	48
KP TH 213	mgrB IS3	32	6	>256	48

KP LH 102		12	2	>256	64
KP LH 131	mgrB stop /mcr-1	32	6	>256	48
KP LH 61	mgrB sub/mcr-1	24	4	>256	64
KP LH 74	mgrB sub	16	4	>256	48
KP LH 92	mcr-1	24	4	>256	48
KP LH 94		16	3	>256	48
KP LH 375		12	3	>256	48
KP H 5500		64	4	>256	64
KP TH 68		48	8	>256	32
KP TH 166		3	0.75	>256	64
KP TH 114		16	4	>256	64
KP TH 164		12	2	>256	64
KPcl2		8	3	>256	64
KPcl3		16	1.5	>256	96
<i>E.coli P10S</i>		0.38	0.25	>256	96
<i>E.coli FHA 102</i>		8	1	>256	96

Tableau 4. Détermination de la diminution de la CMI de la Colistine en dilution si la diminution est supérieure à 2 ou inférieure à 2 dilutions. b = Nombre de dilution de raison 2 (1 dilution= division par 2 de la concentration))

Souches	Nombre de souches (b)	CT + SUL		CT + SMX		CT+ SXT		CT + TMP	
		< 2	≥ 2	< 2	≥ 2	< 2	≥ 2	< 2	≥ 2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	29	10	19	16	13	16	13	11	18
<i>Escherichia coli</i>	26	20	6	22	4	23	3	19	7
TOTAL	55	30	25	38	17	39	16	30	25

References

- [1] Y. Cai, W. Lee, and A. L. Kwa, "Polymyxin B versus colistin: an update.," *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, vol. 13, no. 12, pp. 1–17, Oct. 2015.
- [2] Vidaillac et al , *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, september 2012, Vol.56, N°9, p.4856-4861
- [3] F. E. RUSSELL, "SYNERGISM BETWEEN SULPHONAMIDE DRUGS AND ANTIBIOTICS OF THE POLYMYXIN GROUP AGAINST PROTEUS SP. IN VITRO.," *J. Clin. Pathol.*, vol. 16, pp. 362–6, Jul. 1963.
- [4] S. Greenfield and D. S. Feingold, "The synergistic action of the sulfonamides and the polymyxins against *Serratia marcescens*," *J. Infect. Dis.*, vol. 121, no. 5, pp. 555–8, May 1970.
- [5] R. L. White, D. S. Burgess, M. Manduru, and J. A. Bosso, "Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test.," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 40, no. 8, pp. 1914–8, Aug. 1996.
- [6] M. J. Hall, R. F. Middleton, and D. Westmacott, "The fractional inhibitory concentration (FIC) index as a measure of synergy.," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 11, no. 5, pp. 427–33, May 1983.
- [7] Fusidic Acid: A Bacterial Elongation Factor Inhibitor for the Oral Treatment of Acute and Chronic Staphylococcal Infections. Prabhavathi Fernandes. CSH perspectives 2016 Fernandes P
- [8] Colistin and Fusidic Acid: A Novel Potent synergistic Combination for multi-drug resistant treatment of *Acinetobacter baumannii* infections. *Antimicrob. agents Chemother.* 2015 Aug;59(8):4544-50.
- [9] Wane H. et al, abstract de présentation orale dans *Journal of Cystic Fibrosis* vol.15 (5 juin 2016) ePS06.7 (« antibiotic treatment strategy with fusidic acid on colistin resistant *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis»)
- [10] Real-time sequencing to decipher the molecular mechanism of resistance of a clinical pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolate from Marseille, France, Rolain JM

Diene SM, Kempf M, Gimenez G, Robert C, Raoult D dans AAC (Antimicrobial Agents Chemotherapy) 2013 Jan 57(1):592-6

[11] De Rycke et al, Annales de recherches vétérinaires, 1982, volume 12, n°4, pages 403-411

5 [12] Handley P S et al, Microbios 1974, vol 10 n°40 pages 211-223

REVENDEICATIONS

1. Association d'un premier composé antibiotique la Colistine et un second composé antibiotique choisi parmi la Sulfadiazine et l'Acide Fusidique pour une utilisation dans un traitement thérapeutique contre les entérobactéries pathogènes non naturellement intrinsèquement résistantes mais ayant acquis une résistance contre au moins la Colistine.

2. Association de Colistine et sulfadiazine pour une utilisation selon la revendication 1 dans un traitement thérapeutique contre les entérobactéries pathogènes non naturellement intrinsèquement résistantes mais ayant acquis une résistance contre au moins la Colistine.

3. Association de Colistine et sulfadiazine pour une utilisation selon la revendication 2 dans un traitement thérapeutique contre les entérobactéries pathogènes non naturellement intrinsèquement résistantes mais ayant acquis une résistance contre au moins la Colistine et la Sulfadiazine.

4. Association de Colistine et Acide Fusidique pour une utilisation selon la revendication 1 dans un traitement thérapeutique contre les entérobactéries pathogènes non naturellement intrinsèquement résistantes mais ayant acquis une résistance contre au moins la Colistine.

5. Association pour une utilisation selon l'une des revendications 1 à 4 dans laquelle la Colistine est sous forme de sulfate de Colistine.

6. Association pour une utilisation selon la revendication 5 pour une application par voie orale ou par voie topique.

7. Association pour une utilisation selon l'une des revendications 1 à 4 dans laquelle la Colistine est sous forme de colistiméthate de sodium.

8. Association pour une utilisation selon la revendication 7 pour une application par voie parentérale ou orale.

9. Association pour une utilisation selon l'une des revendications 1 à 8 dans un traitement thérapeutique contre des entérobactéries choisies parmi les bactéries des genres *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Providencia*, *Morganella*, *Citrobacter*, *Hafnia* et *Yersinia*.

10. Association pour une utilisation selon l'une des revendications 1 à 9 dans un traitement thérapeutique contre des entérobactéries choisies parmi les bactéries des genres *Klebsiella* et *Escherichia*.

5 11. Association pour une utilisation selon la revendication 10 dans un traitement thérapeutique contre des entérobactéries choisies parmi *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli*.

12. Association pour une utilisation selon l'une des revendications 1 à 10 dans un traitement par voie orale de décontamination digestive avant une greffe fécale.

10 13. Composition pharmaceutique comprenant une association d'au moins deux dits composés antibiotiques en quantités thérapeutiquement efficaces pour une utilisation selon l'une des revendications 1 à 12.

14. Composition pharmaceutique comprenant une association pour une utilisation selon la revendication 13 caractérisée en ce qu'elle se présente sous forme administrable par voie parentérale, par voie orale ou par voie topique.

15 15. Composition pharmaceutique comprenant une association pour une utilisation selon la revendication 14 caractérisée en ce qu'elle se présente (a) sous forme de comprimé ou (b) de poudre pour être administrée sous forme de solution ou (c) sous forme d'aérosol.

1/7

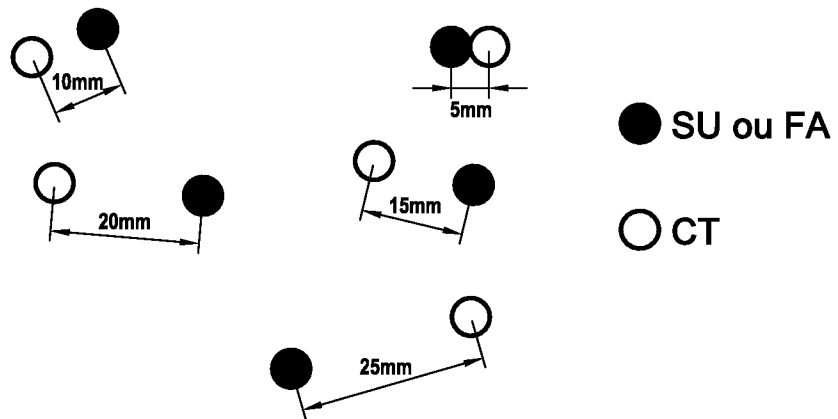


FIG.1

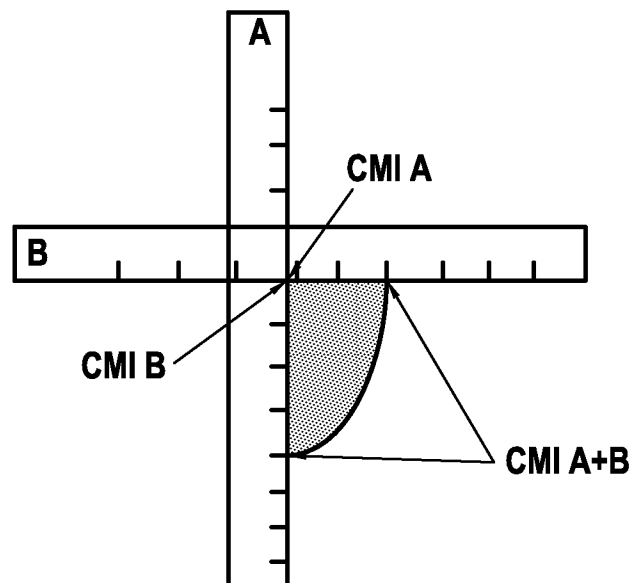


FIG.2

2/7

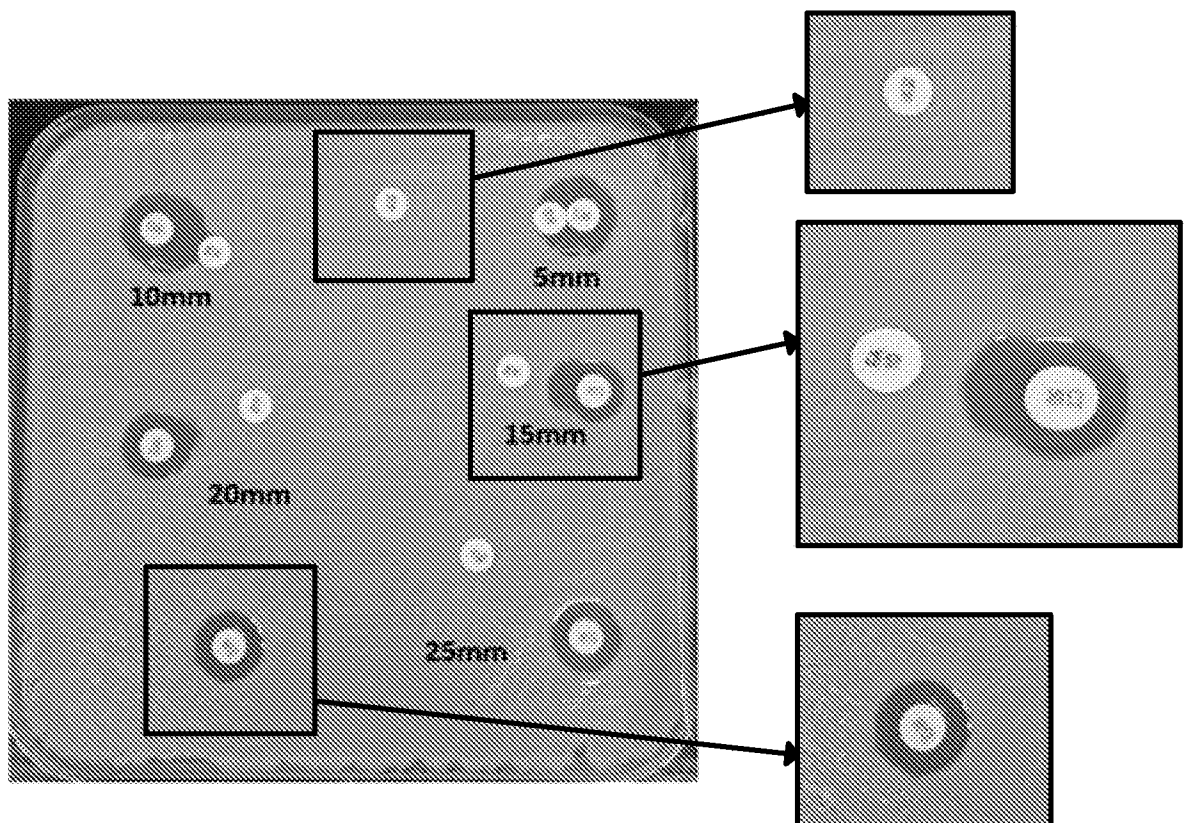
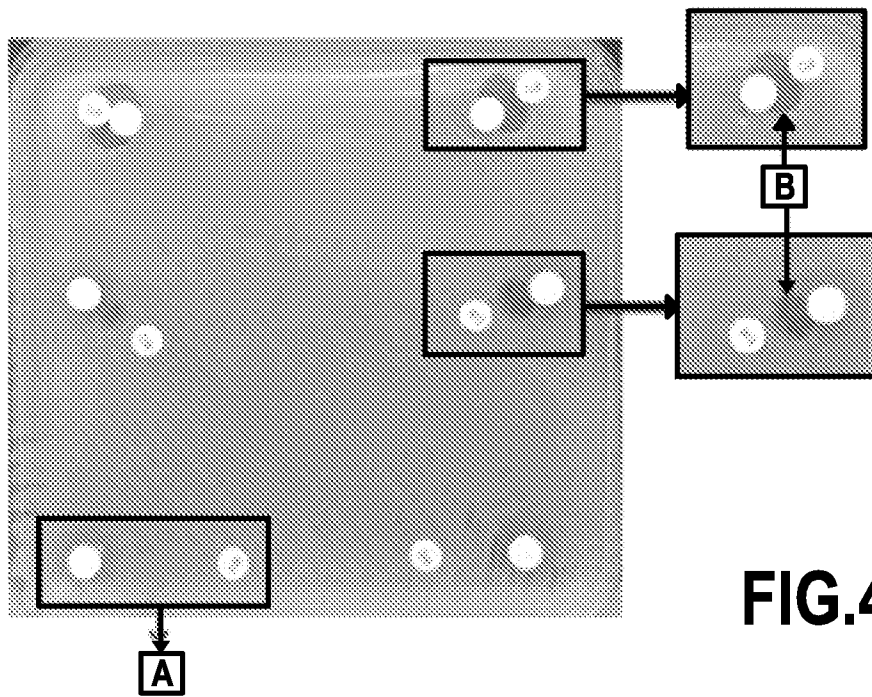
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH
B	MH	BA+MH	MH	SU 8µg/ml	SU 16µg/ml	SU 32µg/ml	SU 64µg/ml	SU 8µg/ml	SU 16µg/ml	SU 32µg/ml	SU 64µg/ml	MH
C	MH	BA+MH	CT 6.25µg/ml									
D	MH	BA+MH	CT 12.5µg/ml									
E	MH	BA+MH	CT 25µg/ml									
F	MH	BA+MH	CT 50µg/ml									
G	MH	BA+MH	CT 100µg/ml									
H	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH

FIG.3A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH
B	MH	BA+MH	MH	FA 512µg/ml	FA 256µg/ml	FA 128µg/ml	FA 64µg/ml	FA 32µg/ml	FA 16µg/ml	FA 8µg/ml	FA 4µg/ml	MH
C	MH	BA+MH	CT 50µg/ml									
D	MH	BA+MH	CT 25µg/ml									
E	MH	BA+MH	CT 12.5µg/ml									
F	MH	BA+MH	CT 6.25µg/ml									
G	MH	BA+MH	CT 3.125µg/ml									
H	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH

FIG.3B

3/7



4/7

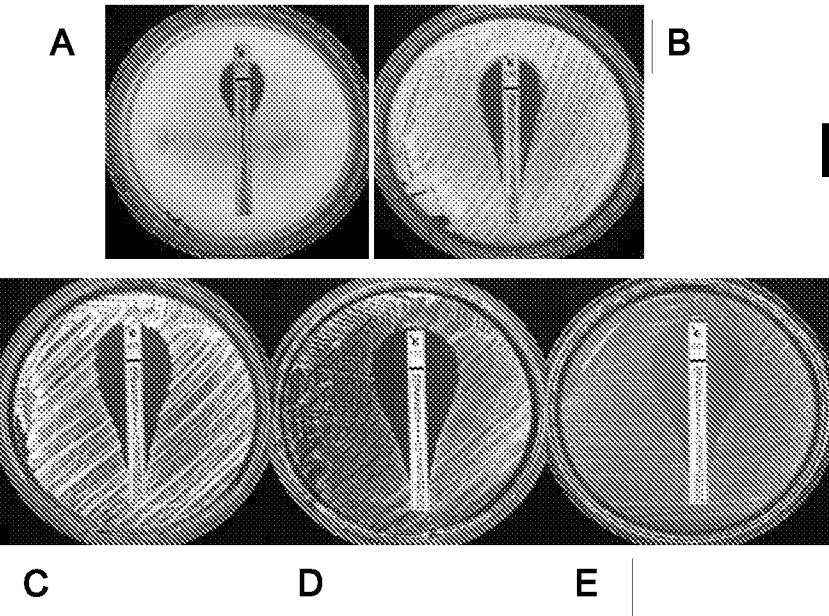


FIG. 5A

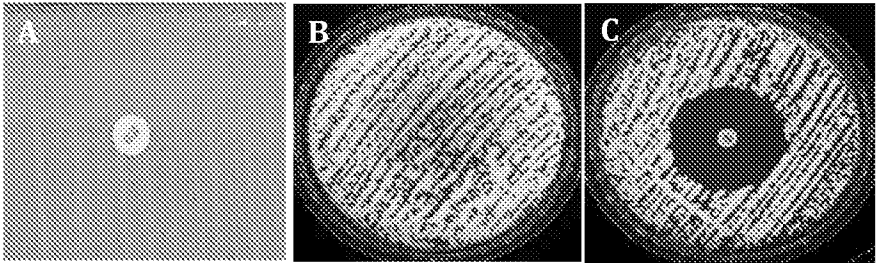


FIG. 5B

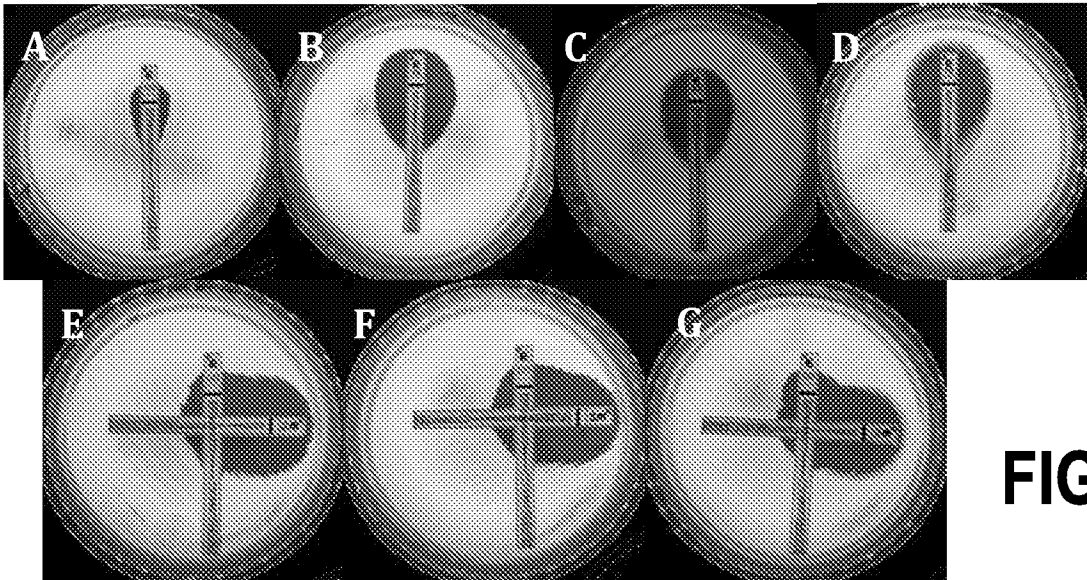
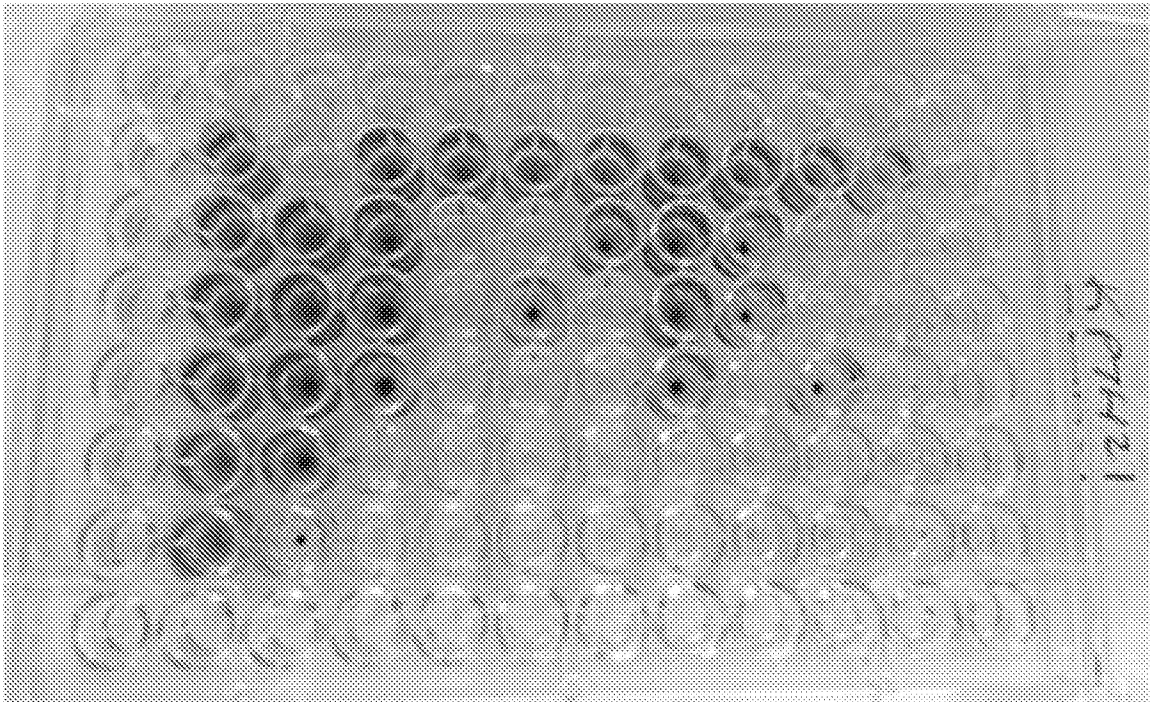
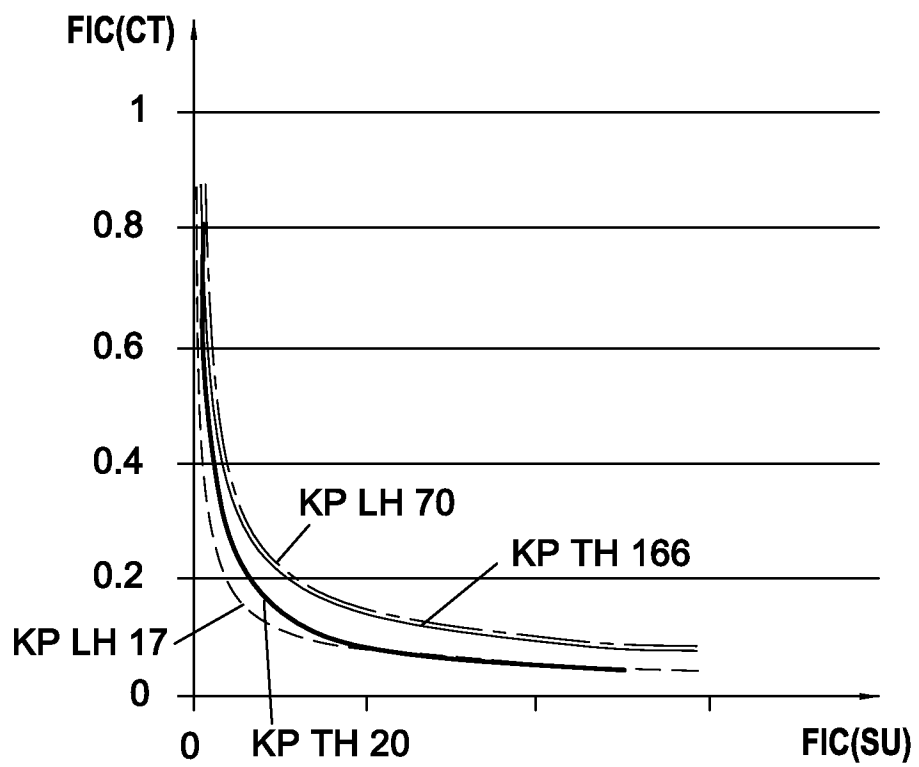
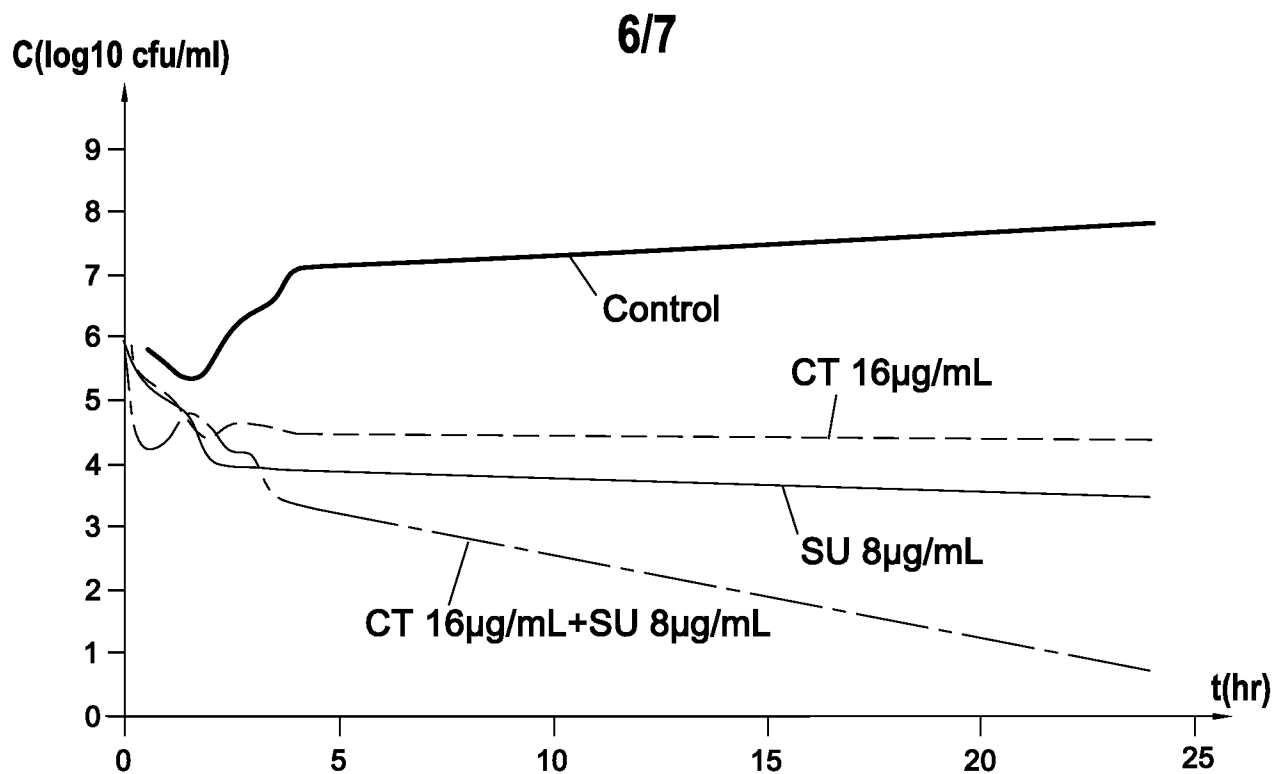
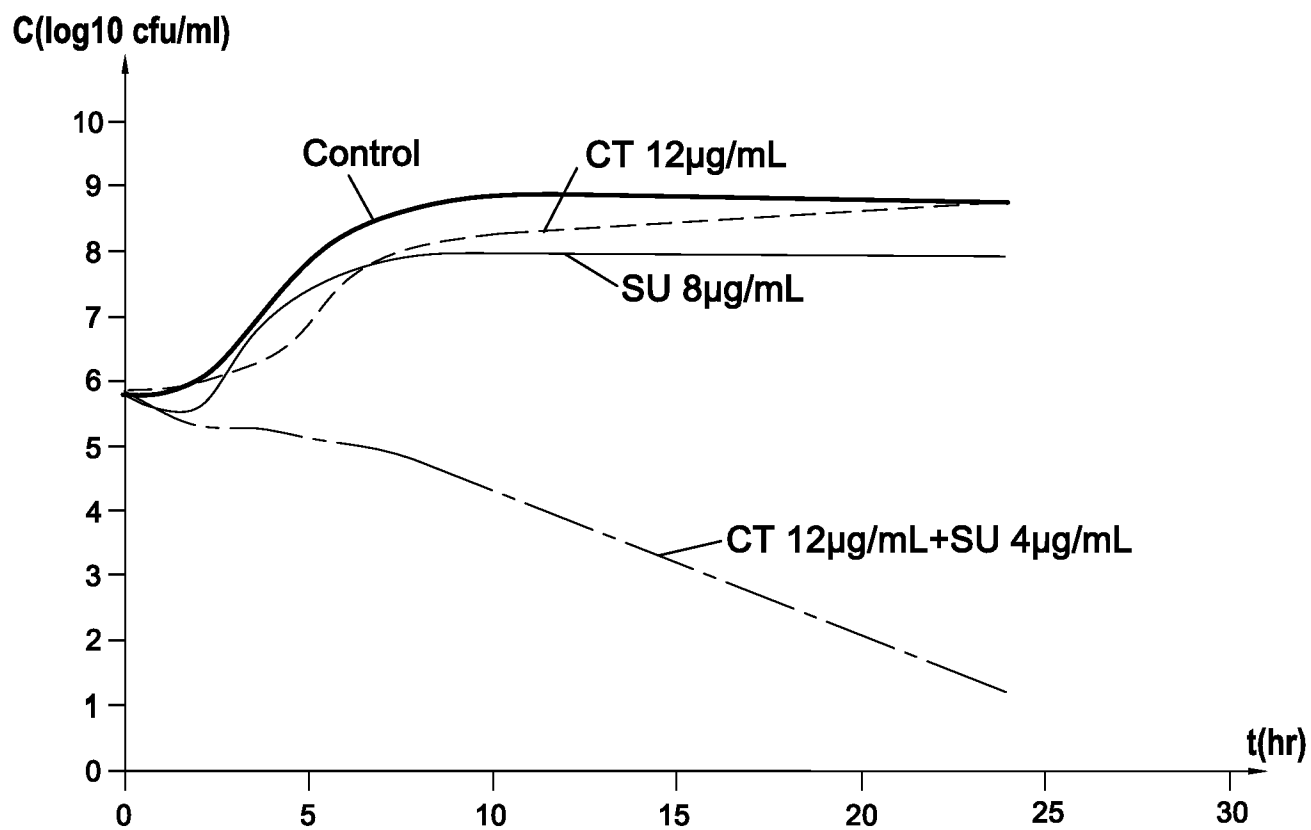


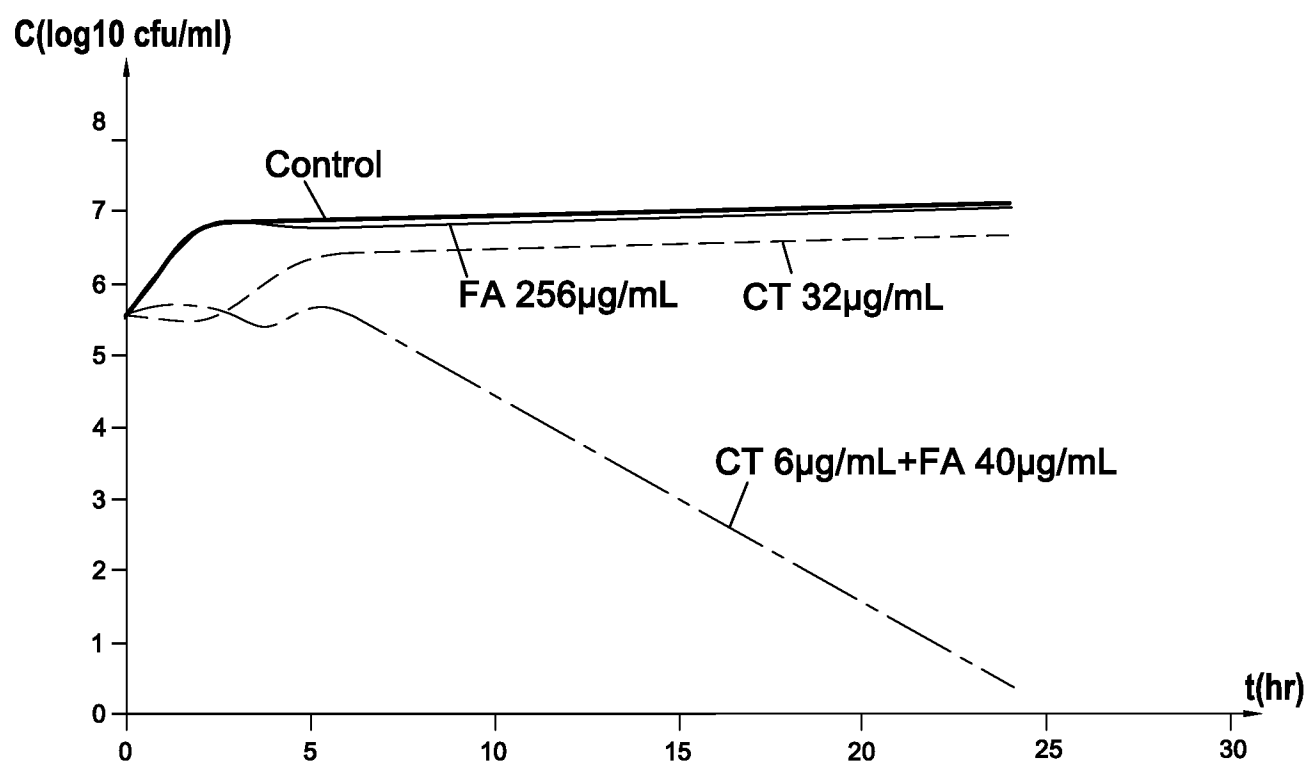
FIG. 6

5/7

**FIG.7****FIG.8**

**FIG.9A****FIG.9B**

7/7

**FIG.9C**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2017/052635

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K38/12 A61K31/635 A61P31/04 A61K31/575
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GB 2 128 617 A (VAARA MARTTI) 2 May 1984 (1984-05-02) column 2, lines 28-30; claims 6,7; examples 3,8	1,4-15
Y	----- WANE H ET AL: "ePS06.7 Antibiotic treatment strategy with fusidic acid on colistin resistant Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis", JOURNAL OF CYSTIC FIBROSIS, vol. 15, 5 June 2016 (2016-06-05), XP029572114, ISSN: 1569-1993, DOI: 10.1016/S1569-1993(16)30237-5 abstract ----- -/-	1,4-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 December 2017

Date of mailing of the international search report

22/12/2017

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Escolar Blasco, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2017/052635

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LYNETTE M. PHEE ET AL: "Colistin and Fusidic Acid, a Novel Potent Synergistic Combination for Treatment of Multidrug-Resistant Acinetobacter baumannii Infections", ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 59, no. 8, 1 August 2015 (2015-08-01), pages 4544-4550, XP055358411, ISSN: 0066-4804, DOI: 10.1128/AAC.00753-15 page 4545, right-hand column, paragraph 3 abstract -----	1,4-15
Y	Anonymous: "Eradication of Antibiotic-resistant Bacteria Through Antibiotics and Fecal Bacteriotherapy - Full Text View - ClinicalTrials.gov", 29 September 2016 (2016-09-29), XP055359163, Retrieved from the Internet: URL:https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02472600 [retrieved on 2017-03-27] Purpose; page 1 -----	12
Y	C. VIDAILLAC ET AL: "In Vitro Synergy of Colistin Combinations against Colistin-Resistant Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, and Klebsiella pneumoniae Isolates", ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 56, no. 9, 1 September 2012 (2012-09-01), pages 4856-4861, XP055358414, ISSN: 0066-4804, DOI: 10.1128/AAC.05996-11 abstract page 4860 - page 4861 -----	1-3, 5-11, 13-15
Y	R Michael ET AL: "Investigation of Synergism between Combinations of Ciprofloxacin, Polymyxin, Sulphadiazine and p -Aminobenzoic acid", J. Pharm. Pharmacol. J. Pharm. Pharmacol., 1 March 1993 (1993-03-01), pages 171-175, XP55358701, Retrieved from the Internet: URL:http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/j.2042-7158.1993.tb05527.x/asset/j.2042-7158.1993.tb05527.x.pdf?v=1&t=j0nwdxyv&s=54461d172eacf75c4d08d7ea0a21be2e79b3e3ea [retrieved on 2017-03-24] abstract -----	1-3, 5-11, 13-15
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2017/052635

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	QUESNEL L B ET AL: "Synergism between polymyxins, polysorbate and antimetabolites of folic acid synthesis, and a paper disc technique for routine testing for synergism", MICRO, CAMBRIDGE, GB, vol. 10, no. 40, 1 January 1974 (1974-01-01), pages 199-210, XP009193872, ISSN: 0026-2633 pages 203-204; figure 6 -----	1-3, 5-11, 13-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2017/052635

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB 2128617	A	02-05-1984	AU 1911983 A 12-04-1984
			DK 450083 A 07-04-1984
			EP 0113394 A1 18-07-1984
			FI 833612 A 07-04-1984
			GB 2128617 A 02-05-1984
			JP S59134764 A 02-08-1984
			NO 833633 A 09-04-1984
			US 4510132 A 09-04-1985
			ZA 8306977 B 30-05-1984

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2017/052635

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. A61K38/12 A61K31/635 A61P31/04 A61K31/575 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) A61K A61P		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	GB 2 128 617 A (VAARA MARTTI) 2 mai 1984 (1984-05-02) colonne 2, lignes 28-30; revendications 6,7; exemples 3,8	1,4-15
Y	----- WANE H ET AL: "ePS06.7 Antibiotic treatment strategy with fusidic acid on colistin resistant Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis", JOURNAL OF CYSTIC FIBROSIS, vol. 15, 5 juin 2016 (2016-06-05), XP029572114, ISSN: 1569-1993, DOI: 10.1016/S1569-1993(16)30237-5 abrégé ----- -/--	1,4-15
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 14 décembre 2017		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 22/12/2017
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Escolar Blasco, P

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	LYNETTE M. PHEE ET AL: "Colistin and Fusidic Acid, a Novel Potent Synergistic Combination for Treatment of Multidrug-Resistant Acinetobacter baumannii Infections", ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 59, no. 8, 1 août 2015 (2015-08-01), pages 4544-4550, XP055358411, ISSN: 0066-4804, DOI: 10.1128/AAC.00753-15 page 4545, colonne de droite, alinéa 3 abrégé	1,4-15
Y	----- Anonymous: "Eradication of Antibiotic-resistant Bacteria Through Antibiotics and Fecal Bacteriotherapy - Full Text View - ClinicalTrials.gov", 29 septembre 2016 (2016-09-29), XP055359163, Extrait de l'Internet: URL:https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02472600 [extrait le 2017-03-27] Purpose; page 1	12
Y	----- C. VIDAILLAC ET AL: "In Vitro Synergy of Colistin Combinations against Colistin-Resistant Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, and Klebsiella pneumoniae Isolates", ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 56, no. 9, 1 septembre 2012 (2012-09-01), pages 4856-4861, XP055358414, ISSN: 0066-4804, DOI: 10.1128/AAC.05996-11 abrégé page 4860 - page 4861	1-3, 5-11, 13-15
Y	----- R Michael ET AL: "Investigation of Synergism between Combinations of Ciprofloxacin, Polymyxin, Sulphadiazine and p -Aminobenzoic acid", J. Pharm. Pharmacol. J. Pharm. Pharmacol., 1 mars 1993 (1993-03-01), pages 171-175, XP55358701, Extrait de l'Internet: URL:http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/j.2042-7158.1993.tb05527.x/asset/j.2042-7158.1993.tb05527.x.pdf?v=1&t=j0nwdxyv&s=54461d172eacf75c4d08d7ea0a21be2e79b3e3ea [extrait le 2017-03-24] abrégé	1-3, 5-11, 13-15
	----- -/--	

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	QUESNEL L B ET AL: "Synergism between polymyxins, polysorbate and antimetabolites of folic acid synthesis, and a paper disc technique for routine testing for synergism", MICRO, CAMBRIDGE, GB, vol. 10, no. 40, 1 janvier 1974 (1974-01-01), pages 199-210, XP009193872, ISSN: 0026-2633 pages 203-204; figure 6 -----	1-3, 5-11, 13-15

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2017/052635

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
GB 2128617 A	02-05-1984	AU 1911983 A	12-04-1984
		DK 450083 A	07-04-1984
		EP 0113394 A1	18-07-1984
		FI 833612 A	07-04-1984
		GB 2128617 A	02-05-1984
		JP S59134764 A	02-08-1984
		NO 833633 A	09-04-1984
		US 4510132 A	09-04-1985
		ZA 8306977 B	30-05-1984
