



**HAL**  
open science

# Evaluation du traitement antibiotique des infections de prothèse vasculaire à *Staphylococcus aureus* : apport d'un modèle murin

Matthieu Revest

## ► To cite this version:

Matthieu Revest. Evaluation du traitement antibiotique des infections de prothèse vasculaire à *Staphylococcus aureus* : apport d'un modèle murin. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2015. Français. NNT : 2015REN1B030 . tel-01308333

**HAL Id: tel-01308333**

**<https://theses.hal.science/tel-01308333>**

Submitted on 27 Apr 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1**  
*sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne*

pour le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1**

*Mention : Biologie et sciences de la santé*

**Ecole : doctorale Vie-Agro-Santé**

présentée par

**Matthieu REVEST**

Préparée à l'unité de recherche :  
CIC Inserm 1414  
CIC Inserm : équipe thématique infection à Gram positif  
Faculté de Médecine  
Et EA 3826  
Thérapeutique clinique et expérimentale des infections  
Faculté de Médecine de Nantes

---

**Evaluation du  
traitement antibiotique  
des infections de  
prothèse vasculaire à  
*Staphylococcus  
aureus* : apport d'un  
modèle murin**

**Thèse soutenue à Rennes  
le 16 décembre 2015**

devant le jury composé de :

**Pr. Pascal Chavanet**

Professeur, Université de Bourgogne / *rapporteur*

**Pr. Frédéric Laurent**

Professeur, Université Lyon 1 / *rapporteur*

**Pr. Brice Felden**

Professeur, Université Rennes 1 / *examineur*

**Pr. Patrick Feugier**

Professeur, Université Lyon 1 / *examineur*

**Pr. Christian Michelet**

Professeur, Université Rennes 1 / *directeur de thèse*

**Pr. David Boutoille**

Professeur, Université Nantes / *co-directeur de thèse*

## **Remerciements :**

Ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide et l'investissement de très nombreuses personnes. J'ai été, et je reste, un grand lecteur de Jean-Paul Sartre, mais finalement, les autres, c'est pas forcément l'enfer, mais très souvent une aide, un soutien, un objectif et une justification.

Je remercie très vivement le Pr Pascal Chavanet d'avoir accepté de juger mon travail et d'en être le rapporteur. J'espère que vous avez trouvé à sa lecture le même plaisir que le mien à l'écoute de vos cours de DESC.

Je remercie tout aussi vivement le Pr Frédéric Laurent d'être également le rapporteur de mon travail. Ca a été un réel plaisir de te rencontrer et de travailler avec toi au sein du Grip. J'espère que ce travail te plaira.

Un très grand merci au Pr Patrick Feugier pour avoir accepté de participer à ce jury. Tu m'as fait découvrir tout un pan des infections de prothèse vasculaire qui m'était inconnu et le travail commun réalisé est, je crois, l'exemple même de la nécessité du travail multidisciplinaire pour appréhender l'intégralité d'une problématique médicale.

Un très grand merci également au Pr Brice Felden. Tu as accepté de juger mon travail et tu m'as invité à entrer dans ton laboratoire de recherche. J'y ai découvert une équipe accueillante et « scotchante » sur le plan scientifique. J'espère que mon travail, celui-ci et le prochain au sein du laboratoire, te conviendra.

Je remercie également très chaleureusement le Pr David Boutoille. Merci de toute l'aide que tu m'as apporté tout au long de ces travaux et de m'avoir encadré. Tu m'as fait rentrer dans le laboratoire de l'EA 3826 et tu as tout fait pour que tout s'y passe merveilleusement ! Tes idées et ta rigueur m'ont souvent tiré de mauvais pas !

Que dire au Pr Christian Michelet ? Vous remercier bien sûr de m'avoir encadrer pour ce travail, de vos idées, corrections, commentaires... Mais surtout, vous remercier de tout ce que vous avez fait pour moi depuis mon externat jusqu'à aujourd'hui et de ce que

vous continuez à faire. Vous m'avez fait découvrir cette merveilleuse spécialité que sont les maladies infectieuses et vous avez su, souvent avant moi, ce que je souhaitais et devais faire pour ma carrière. Vous avez su me « pousser » quand je trainais des pieds... J'espère être digne de votre enseignement et réussir à poursuivre dans la voie que vous m'avez montrée.

Un énorme merci à Jocelyne Caillon pour tout ce qu'elle a fait pour moi et pour son aide précieuse tout au long de ce travail. De même pour Cédric Jacqueline sans qui je n'aurais pas réussi à mener jusqu'au bout tous ces travaux. Merci à Virginie Le Mabecque pour l'aide plus que précieuse qu'elle m'a apportée pour les manip. Merci pour la même raison à Anne Breteche. Merci à tous les autres membres de l'équipe de l'EA 3826 et particulièrement à Gilles Potel, Karim Asehnoune, Alexis (les câlins !), Marion, Cédric, Xavier, Cindy, Sandy. Quelle équipe ! Un grand merci à Rym, Karin et Marie-Pierre d'Orsay avec lesquelles j'ai découvert un nouvel univers.

Merci aux collègues de Claude Bernard qui ont tenu la maison pendant mes absences : Solène Patrat-Delon, Pierre Fillâtre, Pierre Tattevin, Cédric Arvieux, Faouzi Souala, Jean-Marc Chapplain. Merci à tous les membres de l'équipe de Claude Bernard. On y est bien ! Merci à toute l'équipe de réanimation médicale : on y dort mal mais on s'y amuse bien.

Merci à tous les membres du Grip. En espérant que le travail initié se poursuive par des études cliniques permettant d'améliorer la prise en charge des patients.

Merci à John Coltrane, Kurt Cobain, Renaud Séchan et Roger Waters.

Merci bien sûr à tous mes amis et à ma famille pour leur soutien indéfectible même si j'ai loupé pas mal de fêtes et repas ces derniers temps...

Merci à Tophe et Olive pour le Tourmalet, le Ventoux déjà faits et le Galibier à venir.

Et surtout, merci à Simon, Arthur et Jeannette d'être ce qu'ils sont, et merci à ma Juliette qui supporte tout ça et sans qui rien n'est possible.

Ce travail a été en très grande partie réalisé à l'EA 3826 « Thérapeutiques cliniques et expérimentales des infections » de l'université de Nantes (Pr Potel) et au CIC Inserm 1414 du CHU de Rennes (Pr Bellissant).

Il a été rendu possible grâce à une bourse allouée par le collège des universitaires de maladies infectieuses et grâce à l'association pour la formation et la recherche en réanimation et infectiologie de Rennes qui a reçu une bourse du laboratoire Novartis.

**Introduction.....1**

**Partie 1 : Revue bibliographique**

---

**1. Généralités sur les prothèses vasculaires..... 3**

**2. Epidémiologie des infections de prothèses vasculaires ..... 7**

**2.1. Probabilité de survenue d’infection des prothèses vasculaires ..... 7**

        2.1.1. Avant-propos ..... 7

        2.1.2. Classifications des infections de prothèses vasculaires ..... 7

        2.1.3. Probabilité d’IPV et données démographiques ..... 8

**2.2. Fréquence relative des infections de prothèses vasculaires par rapport aux autres infections de matériel implanté ..... 10**

**2.3. Epidémiologie microbiologique ..... 11**

**2.4. Fardeau de la maladie ..... 13**

**3. Physiopathologie.....15**

    3.1. Voies de contamination..... 15

    3.2. Problématique du biofilm..... 17

**4. Modalités thérapeutiques actuelles des IPV .....20**

    4.1. Aspects chirurgicaux..... 20

    4.2. Aspects médicaux..... 24

**5. Conclusion de cette revue de la littérature .....39**

**Partie 2 : Données expérimentales**

---

**1. Objectifs.....41**

**2. Infection de matériel vasculaire à *Staphylococcus aureus* .....41**

**2.1. Mise au point du modèle..... 41**

        2.1.1. Matériels et méthodes..... 41

        2.1.2. Résultats..... 47

**2.2. Essai de sensibilisation pharmacologique ..... 50**

        2.2.1. Justifications..... 50

        2.2.2. Matériels et méthodes..... 51

        2.2.3. Résultats..... 55

<b>2.3. Efficacité comparée de différents antibiotiques dans le modèle d'infection de matériel vasculaire à <i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	<b>57</b>
2.3.1. Matériels et méthodes.....	77
2.3.2. Résultats.....	80
<b>2.4. Visualisation du biofilm</b> .....	<b>82</b>
2.4.1. Matériels et méthodes.....	82
2.4.2. Résultats.....	83
<b>Partie 3 : Discussion</b> .....	<b>91</b>
<hr/>	
<b>Conclusion</b> .....	<b>99</b>

## Liste des tableaux

### Texte de la thèse :

<b>Tableau 1.</b> Données épidémiologiques des IPV en fonction du site anatomique.....	9
<b>Tableau 2.</b> Fréquences relatives des infections sur matériel aux Etats-Unis.....	10
<b>Tableau 3.</b> Diminution de la charge bactérienne sur Dacron® selon la souche bactérienne et les protocoles thérapeutiques.....	81

### **Article 1 :** Medical treatment of prosthetic vascular graft infection : review of the literature and proposals of a working group

<b>Table 1.</b> Levels of evidence and grades of recommendations used.....	28
<b>Table 2.</b> Empirical antibiotic therapy for prosthetic vascular graft infections depending on the clinical situation.....	29
<b>Table 3.</b> Dosage, route and rate of administration of anti-infectives in prosthetic vascular graft infections.....	31
<b>Table 4.</b> Antibiotic therapy for prosthetic vascular graft infections caused by methicillin-sensitive <i>Staphylococcus</i> sp.....	32
<b>Table 5.</b> Antibiotic therapy for prosthetic vascular graft infections caused by methicillin-resistant <i>Staphylococcus</i> sp.....	32
<b>Table 6.</b> Antibiotic treatment of prosthetic vascular graft infections caused by <i>Enterobacteriaceae</i> .....	33

### **Article 2 :** New *in vitro* and *in vivo* Models to evaluate Antibiotic Efficacy in *Staphylococcus aureus* Prosthetic Vascular Graft Infection

<b>Table.</b> <i>In vitro</i> drug susceptibility testing for the bacterial strains used in this study.....	76
---	----



## Liste des figures

### Texte de la thèse :

<b>Figure 1.</b> Prothèse en polyester Dacron® .....	6
<b>Figure 2.</b> Prothèse en polyester polytétrafluoroéthylène expansé (ePTFE) microporeux.....	6
<b>Figure 3.</b> Epidémiologie microbiologique des IPV.....	14
<b>Figure 4.</b> Création et développement d'un biofilm bactérien sur matériel.....	18
<b>Figure 5.</b> Représentation schématique de l'impact du biofilm sur l'efficacité des antibiotiques.	18
<b>Figure 6.</b> Types de revascularisation pour une IPV de l'aorte abdominale.....	23
<b>Figure 7.</b> Mise au point du modèle d'infection de matériel vasculaire à <i>S. aureus</i> .....	46
<b>Figure 8a.</b> Résultats des comptes bactériens sur Dacron® « nu » explantés.....	48
<b>Figure 8b.</b> Résultats des comptes bactériens sur Dacron® incubé 24 heures avant implantation dans du sérum de souris Swiss.....	48
<b>Figure 9.</b> Exemple de gamme obtenue pour le dosage pharmacologique de cloxacilline chez la souris ayant été traitée par acide folique.....	54
<b>Figure 10a.</b> Concentration plasmatique de cloxacilline avec ou sans acide folique.....	56
<b>Figure 10b.</b> Concentration plasmatique de cloxacilline avec ou sans probénécide.....	56
<b>Figure 11.</b> Méthode de Calgary modifiée.....	78
<b>Figure 12.</b> Mesure des concentrations minimales inhibitrices au sein du biofilm associé au Dacron®.....	78
<b>Figure 13.</b> Plan expérimental des infections de matériel vasculaire chez la souris avec évaluation de l'efficacité thérapeutique de différents protocoles d'antibiothérapie.....	79
<b>Figure 14.</b> Visualisation globale du biofilm <i>in vivo</i> sur Dacron® infecté par SARM BCB8.....	85
<b>Figure 15.</b> Imagerie du Dacron®, SARM BCB8, groupe témoin.....	86
<b>Figure 16.</b> Imagerie du Dacron®, SARM BCB8, groupes daptomycine et daptomycine-rifampicine.....	86
<b>Figure 17.</b> Imagerie du Dacron®, SARM BCB8, groupes vancomycine et vancomycine-rifampicine.....	86
<b>Figure 18.</b> Visualisation globale du biofilm <i>in vivo</i> sur Dacron® infecté par SAMS 27217 : monothérapies.....	88
<b>Figure 19.</b> Visualisation globale du biofilm <i>in vivo</i> sur Dacron® infecté par SAMS 27217 : bithérapies.....	89
<b>Figure 20.</b> Visualisation du biofilm sur Dacron® traité par daptomycine-rifampicine.....	90

**Article 2:** New *in vitro* and *in vivo* Models to evaluate Antibiotic Efficacy in *Staphylococcus aureus* Prosthetic Vascular Graft Infection

**Figure 1.** Visualization of MSSA and MRSA 24h-biofilms on polystyrene and on Dacron®.....73  
**Figure 2.** Results of bacterial count on Dacron® patches and spleens after 48h of treatment for MRSA infection.....74  
**Figure 3.** Results of bacterial count on Dacron® sheets and spleen after 48h of treatment for MSSA infection.....75

# Introduction

De façon surprenante, les infections de prothèses vasculaires (IPV) ne sont pas individualisées dans un cadre nosologique spécifique. Elles sont pourtant grevées d'une très lourde morbi-mortalité et finalement relativement fréquentes par rapport aux autres infections sur matériel implanté. Leur prise en charge en est de ce fait très inhomogène d'un centre à l'autre, que ce soit sur le plan de la chirurgie que sur le plan de leur antibiothérapie. C'est de ce constat qu'est parti ce travail de thèse.

Plusieurs parties seront développées. La première tente, grâce à une revue de la littérature, de faire un état des lieux de ce que l'on connaît de l'épidémiologie et du traitement de ces infections. Elle s'appuie sur un travail collaboratif réalisé à l'initiative du Professeur Christian Chidiac de Lyon grâce à la création du Groupe de Réflexions sur les Infections de Prothèses vasculaires (GRIP), groupe pluridisciplinaire dont les membres sont présentés en annexe 1. Nous présenterons ici une partie des conclusions retenues par ce groupe en insistant sur les parties traitées spécifiquement par l'auteur de ces lignes. Les aspects chirurgicaux, relevant d'une autre discipline, ne seront que très brièvement évoqués, le cœur du travail s'intéressant à l'antibiothérapie des IPV. Des propositions de traitement seront d'ailleurs exposées.

La deuxième partie de ce mémoire est directement liée à ce travail bibliographique. Celui-ci a en effet mis en lumière l'absence criante de données expérimentales fiables et utilisables pour connaître le meilleur traitement antibiotique des IPV. Nous avons donc souhaité mettre au point un modèle expérimental spécifique d'IPV permettant l'évaluation de différentes antibiothérapies pour ces infections. Ce modèle nous a permis d'obtenir des données intéressantes sur l'efficacité de différentes molécules et peut constituer une première étape vers la détermination du meilleur traitement anti-infectieux à administrer aux patients souffrant d'IPV et vers la réalisation d'études prospectives multicentriques pour le valider en médecine humaine.

Afin d'éviter au maximum les répétitions, les aspects développés dans les articles publiés ou soumis à publication ne seront abordés que très brièvement dans le texte.

# **Revue bibliographique**

## 1. Généralités sur les prothèses vasculaires

C'est en 1952 que sont rapportées les premières tentatives d'implantation de prothèse vasculaire textile chez l'animal avec des résultats très encourageants puisque considérés comme des succès chez 12 des 15 chiens implantés<sup>1</sup>. Ces données préliminaires ont ouvert la voie à l'utilisation large des substituts vasculaires prothétiques pour le traitement des pathologies athéromateuses occlusives et anévrismales et le nombre d'implants vasculaires posés chaque année n'a cessé d'augmenter. Un peu plus de 30 000 prothèses vasculaires ont ainsi été posées en France en 2010<sup>2</sup> et plus de 450 000 le sont annuellement aux Etats-Unis<sup>3</sup>.

Plusieurs types de substituts synthétiques ont été développés. Ils ont tous eu pour ambition de répondre à trois exigences : autoriser une bonne cicatrisation, entraîner une faible thrombogénicité et présenter une bonne stabilité à long terme<sup>4</sup>. Même si de nombreux progrès restent à faire, deux types de biomatériaux ont jusqu'alors répondu le plus favorablement à ces impératifs : le polyéthylène téréphtalate (PET) ou polyester Dacron<sup>®</sup> et le polytétrafluoroéthylène (PTFE) microporeux.

Le premier de ces deux substituts, le Dacron<sup>®</sup>, est celui préféré pour les artères de gros ou moyen calibre du fait de sa bonne compliance et de sa très grande stabilité mécanique<sup>4</sup>.<sup>5</sup> Pour permettre une meilleure cicatrisation, les prothèses réalisées dans ce biomatériau sont faites de fibres texturées qui permettent d'obtenir un effet velours. Ces fibres sont tricotées ou tissées afin d'en augmenter la résistance mécanique (figure 1). Les prothèses en PTFE, quant à elles, sont faites à partir de poudre de PTFE mélangée à un solvant, le naphthalène, compactée sous très haute pression puis passée à travers une filière pour

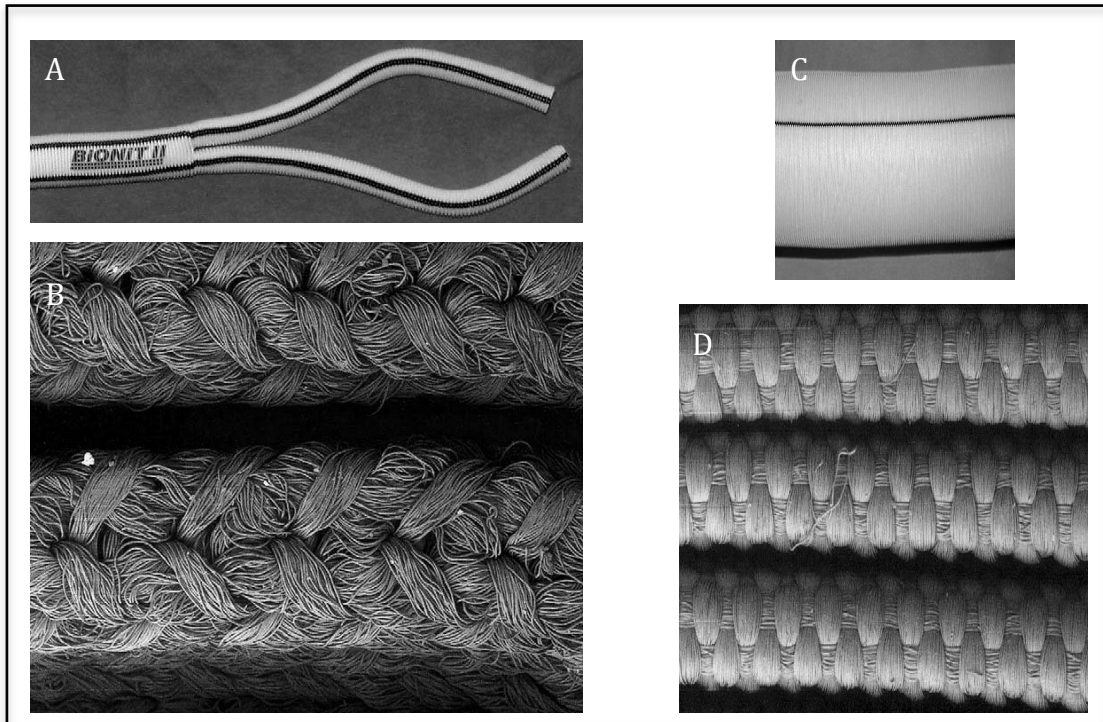
obtenir des tubes (d'où l'acronyme ePTFE pour PTFE expansé). Ce tube est alors chauffé à une température légèrement supérieure au point de fusion du matériau pour obtenir la nature microporeuse de la prothèse (figure 2). On obtient ainsi des substituts vasculaires de très grande résistance mais qui présentent l'inconvénient d'une mauvaise capacité à s'intégrer aux tissus de l'hôte. L'infiltration cicatricielle n'intéresse en effet que la partie la plus externe de la prothèse et la surface endoluminale n'est recouverte que d'une fine couche de tissu fibrineux, même plusieurs années après leur implantation. Malgré cela et en l'absence de greffons veineux autologues de qualité, les prothèses en ePTFE sont celles utilisées préférentiellement pour la prise en charge des pathologies des artères de petit calibre<sup>5</sup>. Cet usage privilégié est plus justifié par leur plus faible thrombogénicité théorique que par des preuves scientifiques de haut niveau : certaines études ont en effet montré soit une tendance<sup>6</sup>, soit une réelle supériorité<sup>7</sup> du ePTFE sur le Dacron<sup>®</sup> pour la prise en charge des pathologies vasculaires périphériques mais une méta-analyse plus récente n'a pas retrouvé de différence significative entre ces deux biomatériaux<sup>8</sup>.

Même si l'utilisation de ces deux types de prothèses a transformé le pronostic de la pathologie athéromateuse non coronaire, plusieurs problèmes restent d'actualité. L'un d'entre eux est celui de la fonctionnalité à long terme des implants du fait notamment de leur thrombogénicité intrinsèque par impossibilité pour les cellules endothéliales de recouvrir la paroi interne de ces prothèses. Certains travaux ont montré que recouvrir ces parois internes par des produits biologiques comme le collagène par exemple pouvait favoriser cette colonisation<sup>9</sup>. Plusieurs prothèses, que ce soit en Dacron<sup>®</sup> ou en ePTFE, recouvertes par divers produits biologiques (collagène, protéines, carbone, voire cellules endothéliales) ont été développées en ce sens avec des résultats variables. Ces différentes techniques ne rentrent pas dans la problématique traitée ici puisqu'elles ne paraissent pas modifier le comportement des prothèses face à l'infection en pratique clinique. Nous n'irons donc pas plus loin dans leur évocation mais le lecteur intéressé par le sujet pourra se reporter à deux revues, l'une publiée en 2008<sup>5</sup>, l'autre en 2012<sup>10</sup>, détaillant les mécanismes conduisant à la thrombose de ces prothèses et les avantages et inconvénients des différentes techniques permettant de diminuer ces phénomènes.

L'autre complication particulièrement redoutée est la survenue d'une infection de la prothèse et c'est ici le sujet de nos travaux. Il semble exister une plus faible infectiosité au moins initiale du ePTFE par rapport au Dacron<sup>®</sup>. D'anciennes études expérimentales ont en effet montré un risque accru d'infection de prothèse en Dacron<sup>®</sup> par rapport aux prothèses en ePTFE<sup>11-13</sup>, notamment du fait du développement beaucoup plus important d'une matrice endoluminale riche en fibrine propice à l'adhésion bactérienne pour les premières<sup>14, 15</sup>. Ces travaux ont surtout étudié des modèles d'infections survenant précocement après l'implantation. A distance de la chirurgie et notamment au-delà de 6 mois, les différences entre Dacron<sup>®</sup> et ePTFE semblent s'estomper voire s'inverser. Le Dacron<sup>®</sup> semble en effet devenir plus résistant à l'infection du fait d'une incorporation efficace aux tissus de l'hôte le protégeant des colonisations bactériennes alors que le ePTFE ne s'intégrera lui jamais réellement<sup>16</sup>. Pour autant, ces différences semblent relativement marginales et n'impactent pas réellement l'épidémiologie des infections de prothèse vasculaire (IPV) : ces deux biomatériaux ne sont pas utilisés pour les mêmes indications et donc pas pour les mêmes sites anatomiques (Dacron<sup>®</sup> plutôt pour les artères de gros et moyen calibre et ePTFE pour les artères de petits calibres et donc plutôt périphériques) et, comme on le verra dans le chapitre suivant, cette épidémiologie est clairement plus impactée par le site d'implantation que par le biomatériau lui-même.

La question de l'intérêt de l'imprégnation des prothèses par des substances antiseptiques ou par des antibiotiques pour la prévention des infections, peut par contre se poser. Plusieurs travaux expérimentaux ont en effet montré que l'imprégnation aux sels d'argent<sup>17, 18</sup> ou par des antibiotiques<sup>19-22</sup> entraînait une diminution du risque d'infection des prothèses quel que soit le biomatériau utilisé. Malheureusement, ces résultats n'ont jamais été confirmés chez l'homme<sup>23-25</sup> et bien qu'encore très fréquemment utilisées en pratique clinique, ces prothèses imprégnées d'agents antibactériens n'ont pas permis de faire diminuer le risque ni la gravité des IPV.



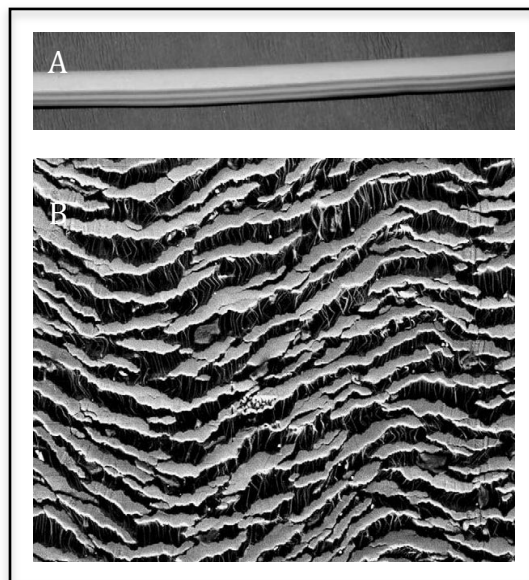


**Figure 1.** Prothèse en polyester Dacron<sup>®</sup>

A. Prothèse en Dacron<sup>®</sup> tricoté ; B. Imagerie en microscopie électronique à balayage de la surface interne de la prothèse (grossissement original x 250).

C. Prothèse en Dacron<sup>®</sup> tissé ; D. Imagerie en microscopie électronique à balayage de la surface interne de la prothèse (grossissement original x 250).

Adapté de Chakfe et al., Annales de Chirurgie, 2004<sup>4</sup>



**Figure 2.** Prothèse en polyester polytétrafluoroéthylène expansé (ePTFE) microporeux

A. Prothèse ePTFE microporeux;

B. Imagerie en microscopie électronique à balayage de la surface interne de la prothèse (grossissement original x 250).

Adapté de Chakfe et al., Annales de Chirurgie, 2004<sup>4</sup>

## **2. Epidémiologie des infections de prothèses vasculaires**

### **2.1. Probabilité de survenue d'infection des prothèses vasculaires**

#### **2.1.1. Avant-propos**

Nous préférons utiliser ici le terme de probabilité, terme peu classique en épidémiologie, mais qui nous semble plus adapté. Il est en effet difficile de parler d'incidence car, comme nous le verrons plus tard, le moment de survenue de l'IPV est très variable d'une prothèse à l'autre. Il est donc difficile de définir une période d'observation autre que l'intégralité de la durée de vie des patients implantés (malheureusement elle aussi très variable d'un malade à l'autre). Il est également difficile de parler de prévalence car il est impossible de connaître le moment de survenue de l'infection. Nous parlerons donc de probabilité de survenue d'IPV, évaluée dès l'implantation de la prothèse jusqu'à son retrait ou au décès du patient.

Avant de rentrer dans les détails des chiffres, il est nécessaire de définir plus avant ce que l'on entend par IPV. Nous ne parlerons ici que des infections de prothèses proprement dites. Seront exclues de nos propos, les infections de substituts biologiques, de matériels de stimulation endocavitaire, de stents, de fistule artério-veineuses (FAV) prothétiques et bien entendu, de cathéters périphériques ou profonds. Ce choix, notamment d'exclure de ce mémoire les infections de stents et de FAV prothétiques, vient du modèle expérimental qui sera présenté plus tard et dont les résultats ne peuvent avoir un éventuel intérêt que pour la prise en charge des prothèses vasculaires au sens strict mais pas pour les autres types d'implants ou matériels.

#### **2.1.2. Classifications des infections de prothèses vasculaires**

Plus de 10 classifications ont été décrites dans la littérature et aucune ne donne entière satisfaction<sup>26-36</sup>. Un travail de synthèse a été réalisé par Patrick Feugier, membre du GRIP.

Les critères utilisés sont très variables : présentation clinique, localisation anatomique, délai de survenue par rapport à la chirurgie, microorganisme responsable... Celle la plus souvent utilisée est la classification de Bunt<sup>26</sup> modifiée en 1994<sup>36</sup> et c'est également celle

recommandée récemment par la société européenne de chirurgie vasculaire<sup>37</sup>. Elle distingue quatre types d'IPV :

- P0 : IPV profondes (intra-cavitaires) aortiques abdominales et thoraciques (y compris les infections de stents endovasculaires intra-cavitaires aortiques et coronariens)
- P1 : IPV superficielles exclusivement extra-cavitaires (y compris les infections de stents endovasculaires extra-cavitaires et les infections de fistules artério-veineuses prothétiques)
- P2 : IPV superficielles (portions extra-cavitaires) des prothèses intra-cavitaires aortiques abdominales et thoraciques, principalement au niveau du triangle de Scarpa pour les pontages aorto-bifémoraux
- P3 : IPV de patches d'angioplastie

Nous ne parlerons pas ici des IPV P3.

S'ajoute fréquemment à cette classification la notion de délai de survenue de l'infection par rapport à la date d'implantation. Sont alors distinguées les IPV précoces des IPV tardives. Mais ce délai est très variable d'un malade à l'autre et peut aller de quelques jours à plus de 20 ans<sup>38-40</sup>. Les définitions pour parler d'IPV précoces ou tardives varient donc selon les auteurs : certains parlent d'IPV tardives à partir de 3 mois, d'autres à partir de 4 et quelques-uns à partir de 6<sup>38, 41-46</sup>. La limite de 4 mois est la plus fréquemment utilisée, mais elle est arbitraire et ne repose sur aucune considération clairement établie<sup>41</sup>. De plus, les différences en termes de physiopathologie, de microorganisme responsable et de pronostic entre IPV précoces et tardives<sup>41, 45</sup>, sont en réalité très discutables et controversées. Nous en reparlerons dans le chapitre épidémiologie microbiologique. Cette distinction entre IPV précoces et tardives selon qu'elles surviennent avant ou après 4 mois post-opératoires ne semble donc pas d'une utilité clinique importante même si elle continue à être fréquemment utilisée.

### **2.1.3. Probabilité d'IPV et données démographiques**

Une étude exhaustive s'intéressant aux données épidémiologiques des IPV entre 1962 et 2012 a été réalisée par Fabrice Camou, membre du GRIP. Les résultats de ce travail ont

été présentés aux JNI en 2013<sup>47</sup>. Ils ont été ensuite synthétisés lors d'une présentation personnelle en novembre 2014 à Paris en y ajoutant les données démographiques des patients concernés<sup>48</sup>. On peut résumer les résultats comme suit :

- La fréquence des IPV est très stable depuis 50 ans, avec globalement 1,5% des prothèses vasculaires qui s'infectent ;
- La probabilité d'infection dépend au premier chef de la localisation de la prothèse :
  - 1% pour l'aorte abdominale P0 ;
  - 1,3% pour l'aorte thoracique P0 ;
  - 4,8% pour les artères périphériques P1 et P2.

Comme annoncé plus haut, le délai de survenue par rapport à la date d'intervention est lui aussi très variable. Ainsi, pour les prothèses aortiques, les IPV surviennent avec un délai moyen de 51 mois (4,4 ; 97). Ce délai est plus court pour les prothèses périphériques : 12 mois en moyenne (1 ; 27).

De façon non surprenante étant donné le profil de patients nécessitant la mise en place de prothèses vasculaires, il existe une majorité d'hommes chez les patients atteints d'IPV, et ce, quelle que soit la localisation anatomique concernée. Enfin, l'âge moyen des patients est de 65 ans. Toutes ces données sont présentées dans le tableau 1.

**Tableau 1.** Données épidémiologiques des IPV en fonction du site anatomique

	Probabilité d'IPV	Délai moyen de survenue (mois)	Age moyen (années)	Sexe ratio H/F
Aorte thoracique	1,3%	51	65	2
Aorte abdominale	1%	51	66	4
Artères périphériques	4,8%	12	64,2	1,8

## 2.2. Fréquence relative des infections de prothèses vasculaires par rapport aux autres infections de matériel implanté

On voit que la probabilité d'infection pour chaque mise en place d'une prothèse vasculaire est assez faible. Pour autant, rapporté au nombre de prothèses posées chaque année, le nombre d'IPV devient relativement important. Ainsi, Darrouiche estimait qu'on pouvait s'attendre aux Etats-Unis, à 16 000 infections de prothèse vasculaire chaque année, soit 4 000 de plus que le nombre d'infections de prothèse articulaire ou de pacemaker (12 000 pour chacun de ces deux dispositifs). Ce nombre dépassait également largement le nombre d'infections de prothèse valvulaire, estimé lui à 3400<sup>3</sup> (tableau 2).

**Tableau 2.** Fréquences relatives des infections sur matériel aux Etats-Unis. Adapté de Darrouiche, NEJM, 2004

Type d'implant	Nombre d'implants posés par an	Nombre d'infections par an attendu
Cardiovasculaire		
Valve cardiaque mécanique	85 000	3 400
Prothèses vasculaires	450 000	16 000
Pace-maker et défibrillateurs	300 000	12 000
Assistance ventriculaire mécanique	700	280
Orthopédique		
Prothèse articulaire	600 000	12 000
Ostéosynthèse	2 000 000	100 000

Il est donc très étonnant que les IPV manquent encore de reconnaissance en tant que cadre nosologique spécifique et, de ce fait, ne bénéficient pas de recommandations

officielles quant à leur diagnostic ou leur prise en charge comme c'est le cas pour les infections des autres types de matériels implantés cités<sup>49, 50</sup>, alors même qu'elles sont au moins aussi voire plus fréquentes que ces dernières.

### 2.3. Epidémiologie microbiologique

Cette partie présente les résultats d'un travail collaboratif réalisé au sein du GRIP par Jocelyne Caillon, Frédéric Laurent et le rédacteur de ces lignes.

Du fait d'une inhomogénéité importante concernant les informations disponibles dans la littérature et de l'absence de grandes séries multicentriques s'intéressant à cette question, il est difficile d'obtenir une vision très précise de l'épidémiologie microbiologique des IPV. Le caractère monocentrique de la majorité des travaux réalisés est notamment un frein à l'analyse fine de ces données puisque les informations fournies peuvent renseigner sur une écologie particulière non extrapolable à un autre centre. Ainsi, les résultats des deux principales études cliniques s'intéressant spécifiquement aux données microbiologiques retrouvent des résultats assez discordants : à titre d'exemple, l'une retrouve une probabilité d'infection de prothèses aortiques (essentiellement abdominales) à *Candida* de 3%<sup>42</sup> quand l'autre<sup>51</sup> donne le chiffre de 37% des prothèses aortiques abdominales infectées par cette levure...

Nous pouvons tout de même tirer des conclusions intéressantes de l'analyse de douze études dans lesquelles les données microbiologiques sont renseignées<sup>42, 43, 46, 51-59</sup>. On en retient que :

- 5 à 10% des IPV ne sont pas documentées ;
- *Staphylococcus aureus* est le microorganisme le plus fréquemment rencontré, responsable de 20 à 53% des cas (moyenne : 38,3%) ;
- Les entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa* sont souvent regroupés en un ensemble commun: 14 à 41% des cas. Dans les études dans lesquelles l'information est disponible, les entérobactéries représentent un peu plus des 3/4 de ce groupe ;
- Les staphylocoques à coagulase négative occupent 15 à 20% des IPV ;

- Viennent ensuite les entérocoques et streptocoques, eux aussi regroupés (13%) ;
- Les bactéries anaérobies strictes, jamais isolées, retrouvées dans 4,5% des cas ;
- Et enfin *Candida* sp., très marginal, rendant compte de seulement 3% des cas.

Notons que chez 20% des patients, les IPV sont plurimicrobiennes. Un résumé schématique de cette épidémiologie microbienne est fourni dans la figure 3. On y voit que plus de 50% des IPV sont dues à des staphylocoques, *S. aureus* étant majoritaire.

La question de la méticillino-résistance des staphylocoques concernés est donc importante car pouvant impacter sur l'antibiothérapie administrée. Une revue récente a montré que les IPV étaient le type d'infection de site opératoire (ISO) aux Etats-Unis pour lequel la part liée à *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) était la plus importante puisque représentant 47,5% des ISO à *S. aureus*. Elle était évaluée, pour les infections ostéo-articulaires par exemple, à « seulement » 39%<sup>60</sup>. Ces chiffres semblent très importants et reflètent l'épidémiologie très particulière des infections à *S. aureus* en Amérique du Nord et ne sont pas forcément vrais en France<sup>61</sup>. Cette probabilité d'infection à staphylocoques résistant à la méticilline (SMR) a d'ailleurs été étudiée par une étude française réalisée par Laurence Legout. Cette étude s'intéressait à la fois au SARM mais également aux staphylocoques à coagulase négative (SCN) résistants à la méticilline. On y voit que les IPV à SMR représentaient 16% de l'ensemble des IPV et que parmi les IPV à staphylocoques, 34% étaient dues à des SMR (12 soit 24% des IPV à *S. aureus* et 11 soit 61% des IPV à SCN)<sup>62</sup>. Dans ce travail, le seul facteur de risque de méticillino-résistance était l'hypertension artérielle, sans que cette association ne puisse être comprise. Ceci souligne l'importance de poursuivre les travaux s'intéressant aux IPV afin d'obtenir une vision plus précise des déterminants épidémiologiques, cliniques et pronostiques de ces infections.

Nous venons de décrire les données de l'épidémiologie microbiologique de l'ensemble des IPV et il serait intéressant de savoir s'il existe des différences en termes d'épidémiologie microbiologique selon le type d'IPV. Malheureusement, les données issues de la littérature sont assez pauvres en la matière. Il semble ceci dit qu'il n'existe pas de réelle divergence en termes de microorganismes responsables d'IPV aortiques et d'IPV périphériques<sup>42, 51</sup>. De même, et comme annoncé plus haut, il n'existe pas de réelle différence entre IPV précoces

et IPV tardives. Certes, certains auteurs plaident pour une plus grande responsabilité de *S. aureus* dans les infections précoces et des staphylocoques à coagulase négative pour les infections tardives<sup>41</sup>. Mais d'autres, au contraire, impliquent plus les staphylocoques à coagulase négative lors des infections précoces, définies ici comme des infections survenant dans les trois mois suivant la chirurgie initiale, et des bactéries très virulentes comme *S. aureus* et *Escherichia coli* dans les infections tardives, sans qu'aucun test statistique n'ait été réalisé pour juger de la significativité de ces résultats<sup>44</sup>. Enfin, certains travaux ne retrouvent aucune différence en ce qui concerne les pathogènes responsables entre IPV précoces ou des IPV tardives<sup>62, 63</sup>.

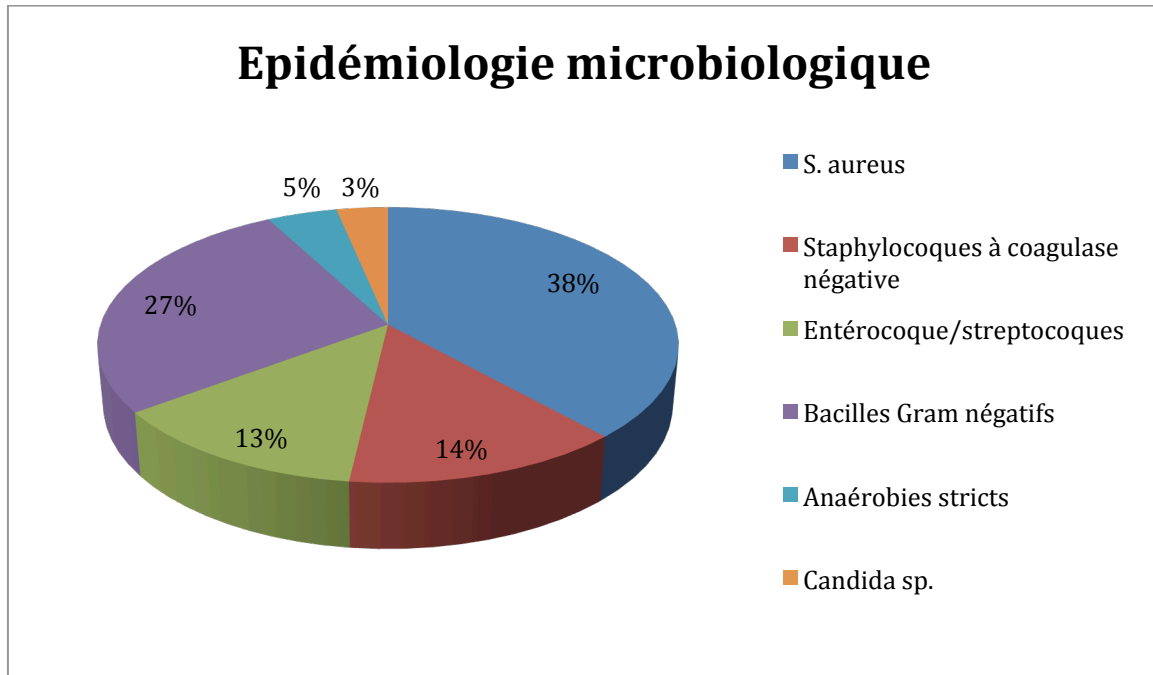
#### **2.4. Fardeau de la maladie**

Ces infections sont particulièrement graves. Les complications secondaires à ces infections les plus fréquentes sont :

- Les hémorragies digestives : ne concernent que les prothèses aortiques. Elles sont retrouvées dans 2 à 61% des cas et aggravent considérablement le pronostic<sup>39, 40, 42, 58, 64-75</sup> ;
- Les embols et ischémie des membres inférieurs : surviennent dans 0 à 29% des cas et peuvent être secondairement responsables d'amputation des membres inférieurs chez 13% des patients<sup>39, 42, 44, 58, 65, 67-69, 76</sup> ;
- Les thromboses de prothèse rencontrées dans 2 à 24% des cas<sup>39, 40, 42, 67, 72</sup>.

D'autres complications sont possibles mais de fréquence moindre. La mortalité est importante. Elle est de 15% 30 jours suivant le diagnostic et de 20% un an après. En cas de fistule prothéto-digestive, elle atteint 20% à J30 et 40% à un an<sup>41</sup>.





**Figure 3.** Epidémiologie microbiologique des IPV

### 3. Physiopathologie

#### 3.1. Voies de contamination

Deux voies de contamination principales sont admises pour les infections de prothèse vasculaire : la contamination par voie hématogène avec ensemencement de la prothèse à l'occasion d'une bactériémie et la contamination par contiguïté avec deux possibilités : contamination directe peropératoire ou péri-opératoire au travers de la peau non encore totalement cicatrisée et contamination secondaire par fistule prothéto-digestive<sup>77</sup>.

La contamination par contiguïté est aisément comprise. Malgré les meilleures mesures possibles d'asepsie, toute chirurgie peut se compliquer d'infection du site opératoire. En outre, les problèmes de cicatrisation, notamment au niveau du triangle de Scarpa, peuvent être importants et exposer la prothèse à un risque de contamination de proche en proche, ce d'autant qu'elle n'est pas encore intégrée aux tissus de l'hôte<sup>78, 79</sup>. Ce type de contamination peut également se rencontrer en cas de fistule prothéto-digestive. Cette fistule est classiquement considérée comme étant de nature mécanique, par érosion du duodénum par la prothèse devenue adhérente<sup>77</sup>. A l'inverse, l'ensemencement bactériémique d'une prothèse vasculaire semble également, du moins à première vue, pouvoir représenter une source importante d'IPV, tout matériel étranger, *a fortiori* endovasculaire, étant plus susceptible de greffe bactérienne qu'un tissu biologique autologue<sup>80</sup>.

La question est de savoir laquelle de ces différentes voies de contamination est la plus importante dans le contexte des IPV. Il est classiquement admis que la plupart des prothèses vasculaires s'infectent par contiguïté et que la voie hématogène est la plus rare<sup>41, 81</sup>, sans que cela soit sous-tendu par des preuves irréfutables car peu de travaux expérimentaux ou épidémiologiques se sont intéressés à l'histoire naturelle des IPV.

Plusieurs arguments plaident cependant pour cette hypothèse. Le premier repose sur la faible fréquence de positivité des hémocultures en cas d'IPV. Ce taux de positivité n'est renseigné que dans 11 études et varie de 0 à 65%<sup>6, 42, 51, 66, 67, 71, 73, 76, 82-84</sup>. Il se situe pour la majorité d'entre elles aux alentours des 30% et la principale étude prospective s'étant spécifiquement intéressée aux données cliniques et biologiques des IPV retrouvait 34%

d'hémocultures positives même en l'absence d'antibiothérapie préalable<sup>42</sup>. Or, on peut penser que l'immense majorité si ce n'est l'intégralité des hémocultures serait positive en cas de contamination hématogène d'une prothèse vasculaire puisque l'infection se situerait alors en position endoluminale. La négativité des hémocultures pour environ 2/3 des IPV plaide pour l'absence d'infection endoluminale et donc pour un autre mode de contamination.

D'autres arguments vont également dans le sens du rôle majeur de la contamination de proche en proche des prothèses. Certains auteurs ont ainsi montré grâce à un modèle canin, que le risque de greffe bactérienne au niveau de la face endoluminale d'une prothèse vasculaire en Dacron<sup>®</sup> au cours d'une bactériémie à *S. aureus* diminuait avec l'éloignement du jour de l'implantation : ce risque était majeur dans le premier mois et devenait très faible par la suite du fait de l'apparition d'un pseudoendothélium qui diminue la sensibilité de la prothèse à l'infection<sup>14</sup>. Dans un autre modèle canin d'infection de prothèse aortique sous-rénale en Dacron<sup>®</sup>, White *et al.* ont étudié l'effet d'une bactériémie à *S. aureus* sur le risque de greffe bactérienne. Les chiens étaient divisés en trois groupes : groupe 1 : l'aorte des chiens était retirée et remplacée par la prothèse ; groupe 2 : la prothèse était posée autour de l'aorte intacte; groupe 3 : l'aorte était disséquée pour être libérée des tissus avoisinants mais laissée intacte. Ils ont pu montrer que pour les trois groupes, les bactéries ne se fixaient finalement pas sur la paroi endoluminale de la prothèse mais allaient, par voie lymphatique, se loger dans les tissus périaortiques lésés par la chirurgie devenus inflammatoires en postopératoire ou au contraire dévitalisés à distance. C'était à partir de ces tissus infectés que la prothèse était infectée de l'extérieur vers l'intérieur. Pour preuve, les tissus périaortiques lésés par la chirurgie dans le groupe 3, c'est à dire sans implantation de matériel, étaient également infectés au contact de l'adventice artérielle<sup>85</sup>. Ce rôle des vaisseaux lymphatiques dans l'infection des prothèses avait d'ailleurs été évoqué deux ans plus tôt : Rubin *et al.*, également grâce à un modèle canin, avaient montré que des prothèses ilio-fémorales, cette fois-ci en PTFE, étaient infectées par voie lymphatique chez les animaux présentant des lésions cutanées sur les membres sous-jacents. Les animaux chez lesquels les vaisseaux lymphatiques étaient ligaturés ne s'infectaient pas<sup>86</sup>.

Enfin, il a été montré par une étude rétrospective s'intéressant à 41 patients présentant une IPV plus de 30 jours après l'implantation, que pour la très grande majorité d'entre eux

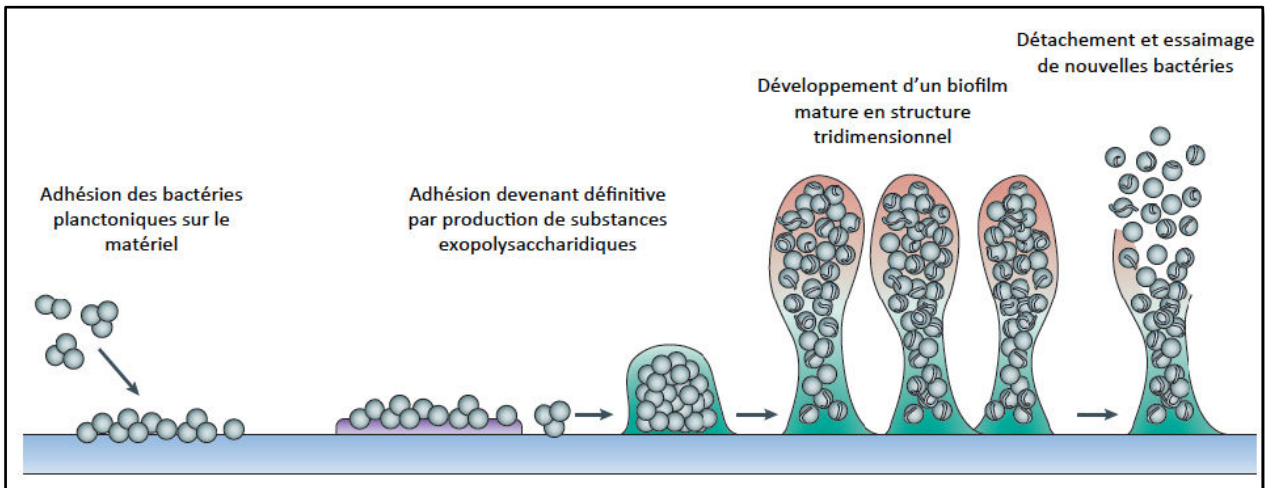
(37), l'infection était secondaire à une contamination per ou péri-opératoire même pour ceux dont l'infection survenait très tardivement (délai moyen de survenue de 10 mois)<sup>87</sup>.

On voit donc que le mode de contamination le plus fréquent des prothèses vasculaires est finalement l'infection par contiguïté, les premières parties de la prothèse touchées étant ses parties externes, en dehors du flux sanguin, par contact avec un foyer infectieux adjacent.

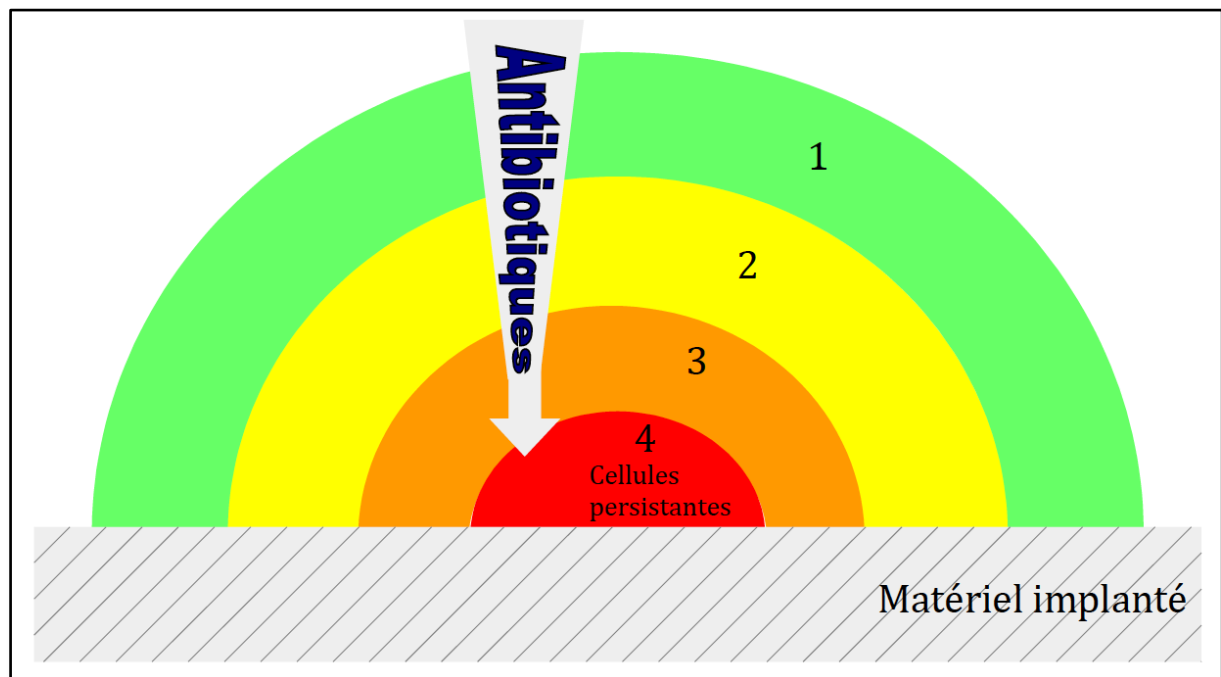
### 3.2. Problématique du biofilm

Comme pour toutes les infections sur matériel implanté, le biofilm joue un rôle important dans la persistance de l'infection et les difficultés thérapeutiques rencontrées. Les différentes étapes de formation du biofilm dans les IPV ne sont pas spécifiques. La première étape est représentée par l'adhésion des bactéries planctoniques sur la surface du matériau implanté. Des travaux anciens ont d'ailleurs tenté d'étudier cette phase d'attachement sur les biomatériaux des prothèses vasculaires. Il a ainsi été montré que certaines souches de *Staphylococcus epidermidis* auraient des capacités d'adhésion 10 à 100 fois plus importantes sur le Dacron<sup>®</sup> tricoté que sur le ePTFE<sup>88</sup>. Mais si le Dacron<sup>®</sup> est imprégné d'albumine ou s'il est précoagulé, cette adhérence serait diminuée par rapport au Dacron<sup>®</sup> nu<sup>89</sup>. Ces études, si elles apportent des informations intéressantes, ne peuvent malheureusement pas être généralisées et ne permettent pas de dégager de différence cliniquement significative entre ces différents types de biomatériau.

Ces bactéries vont ensuite s'entourer d'une substance exopolysaccharidique, composée à la fois de diverses molécules produites par les bactéries elles-mêmes et de produits issus de l'environnement avoisinant. Ce serait à ce moment là que l'adhésion des bactéries sur leur support deviendrait définitive. La maturation du biofilm va alors pouvoir débuter. Celui-ci va se développer en une structure tridimensionnelle qui va croître et à l'intérieur de laquelle vont apparaître des cavités et des canaux permettant la circulation de fluides, les échanges entre les différentes bactéries et l'apport de nutriments à ces cellules. C'est à partir de ces structures tridimensionnelles que des bactéries vont pouvoir être libérées pour aller essaimer à distance (figure 4)<sup>90, 91</sup>.



**Figure 4.** Création et développement d'un biofilm bactérien sur matériel  
Adapté de M. Otto, Nat Rev Microbiol, 2009<sup>91</sup>



**Figure 5.** Représentation schématique de l'impact du biofilm sur l'efficacité des antibiotiques

1. Substance exopolysaccharidique
2. Zone d'échange de matériel génétique et bactéries hypermutatrices
3. Zone à métabolisme ralenti et croissance lente
4. Cellules persistantes

➔ Efficacité décroissante des antibiotiques

Adapté de Richards et al., ChemBioChem, 2009<sup>90</sup>

La constitution d'un biofilm bactérien explique en très grande partie les difficultés rencontrées dans le traitement antibiotique des infections sur matériel implanté. Plusieurs éléments contribuent à ces difficultés (figure 5):

- Résistance aux antibiotiques par modifications génétiques :
  - Il existe une grande variabilité génétique parmi les bactéries d'une même espèce retrouvées dans un biofilm<sup>92</sup> ;
  - Les échanges de matériel génétique entre bactéries sont 1000 fois plus élevés au sein d'un biofilm que pour des bactéries planctoniques<sup>93</sup> ;
  - De même, la probabilité de rencontrer des bactéries hypermutatrices, c'est à dire qui ont la capacité de muter très rapidement en réponse à un stress, est plus fréquente dans un biofilm<sup>94</sup> ;
  - Ces deux mécanismes concourent à voir apparaître des microorganismes présentant des résistances spécifiques pouvant rapidement diffuser au sein de la population<sup>90</sup>.
  
- Effet barrière par la structure même du biofilm :
  - La structure tridimensionnelle réticulaire du biofilm peut « séquestrer » certains agents antibactériens avant qu'ils n'aient pu être actifs sur les bactéries causales ;
  - Ceci a été montré par la mise en évidence de capacités de pénétration variables d'un antibiotique à l'autre, certains pouvant être totalement piégés dans la structure exopolysaccharidique<sup>90, 91</sup> ;
  - S'y associe l'impossibilité pour les cellules immunitaires de pénétrer ces structures rendant les bactéries les plus profondément incluses au sein du biofilm, invisibles aux moyens naturels de défense<sup>93, 95, 96</sup>.
  
- Etat physiologique impropre à l'action des antibiotiques :
  - Selon leur situation au sein du biofilm, les bactéries peuvent présenter des états physiologiques très variables<sup>92</sup> ;
  - Les bactéries retrouvées le plus profondément vont présenter des vitesses de croissance et de multiplication très ralenties du fait d'une carence en oxygène et nutriments. Les antibiotiques, n'étant pour la

plupart d'entre eux, actifs que sur des bactéries se divisant, vont donc voir leur efficacité diminuer<sup>92, 93, 97</sup>;

- A l'extrême, les antibiotiques peuvent n'avoir aucune efficacité sur certaines bactéries, parfois dénommées « cellules persistantes ». Ces microorganismes, alors même qu'elles n'ont aucune mutation conférant une résistance génétique à l'agent utilisé, présenteront un métabolisme tel, que l'antibiotique n'aura aucune activité. Elles seront alors la cause de récurrence de l'infection du matériel une fois le traitement interrompu<sup>98</sup>.

Tous ces aspects ont été décrits sur des infections de matériels autres que les IPV. Encore une fois, celles-ci apparaissent comme le parent pauvre de ce type d'infection. Elles ne sont, en effet, pas même citées ni dans une des plus grande revue consacrée aux infections à biofilm<sup>93</sup> (alors qu'on y parle des infections sur digue dentaire...), ni dans les recommandations européennes toutes récentes traitant de ce sujet<sup>99</sup>. Pour autant, il est plus que probable que ces considérations s'appliquent également aux IPV et qu'elles expliquent, au moins en très grande partie, l'impossibilité de traiter ces infections par un traitement médical seul et d'en espérer la guérison.

## **4. Modalités thérapeutiques actuelles des IPV**

### **4.1. Aspects chirurgicaux**

La prise en charge chirurgicale des IPV est donc primordiale pour espérer guérir les patients. Nous ne détaillerons pas précisément ces aspects mais nous tenterons néanmoins de résumer le travail très important réalisé par Michel Batt et Patrick Feugier, membres du GRIP, qui ont synthétisé l'ensemble des données de la littérature traitant des aspects chirurgicaux des IPV afin de faire des propositions de prise en charge harmonisée. Ne seront citées dans cette partie, que les références principales.

Commençons par rappeler la règle principale concernant la prise en charge chirurgicale des IPV : l'exérèse de l'intégralité de l'implant infecté associée à une excision large des tissus

avoisnants, infectés et nécrosés<sup>3, 41</sup>. Ensuite, deux questions se posent. La première concerne le type de revascularisation à proposer aux patients. Faut-il préférer une revascularisation *in situ*, c'est à dire placer un nouveau substitut vasculaire à l'endroit exact où se situait l'ancienne prothèse infectée, avec les risques théoriques de réinfections immédiates de ce nouvel implant, ou au contraire proposer une revascularisation extra-anatomique de type pontage axillo-bifémoral dans le cadre des IPV de l'aorte abdominale par exemple ? Cette dernière solution peut sembler au premier abord plus « sûre » en termes de risque de réinfection mais pose plus de problèmes, thrombotiques notamment (figure 6).

La deuxième question concerne le type de substitut vasculaire devant être utilisé. Faut-il utiliser des substituts biologiques (veine autologue ? allogreffe veineuse ? allogreffe artérielle ?) ou peut-on réimplanter du matériel prothétique suspecté d'être plus à risque de réinfection mais peut-être plus aisément disponible ? Les réponses ne sont pas forcément les mêmes selon que l'on considère les IPV intra-cavitaires ou les IPV extra-cavitaires.

Pour les premières, IPV intra-cavitaires P0 et P2, on peut résumer les choses ainsi :

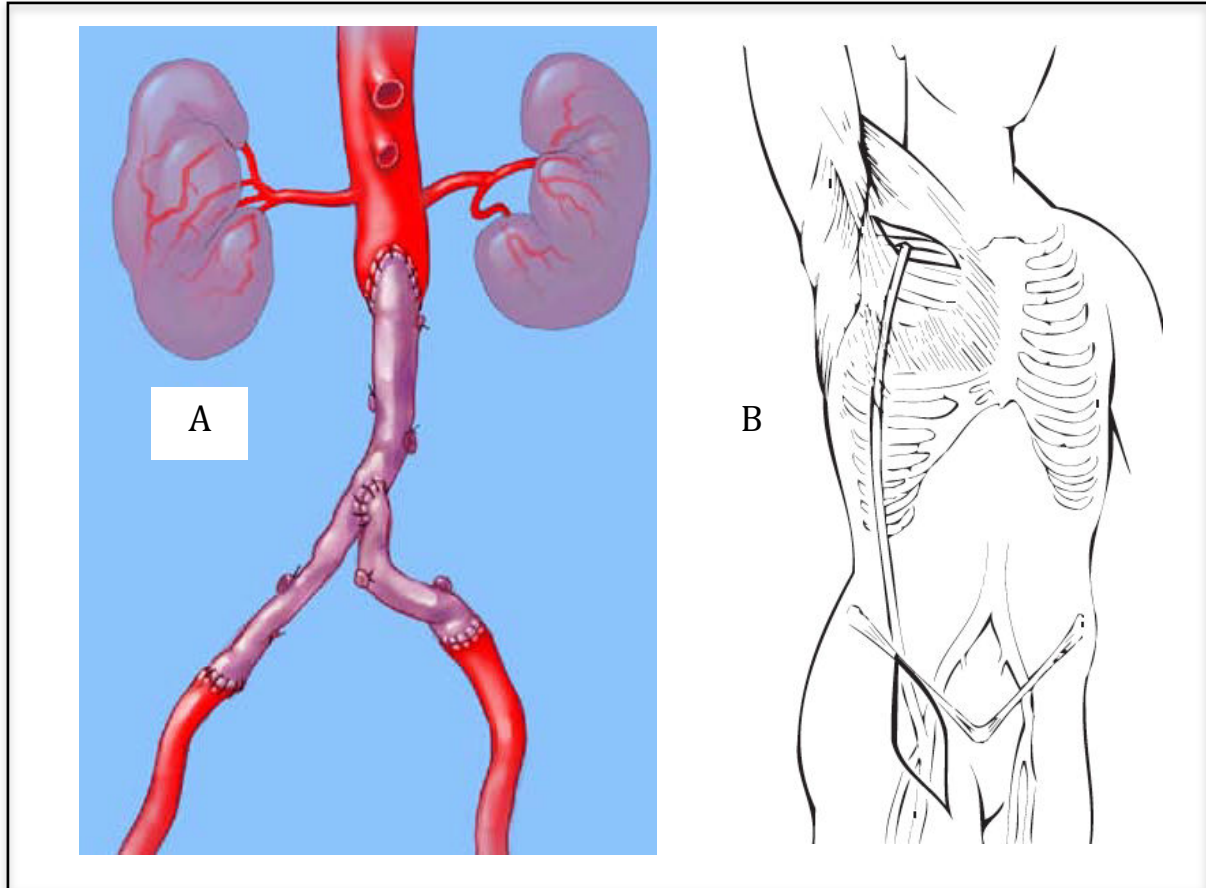
- La revascularisation *in situ* est généralement préférée. Elle n'est finalement pas plus associée à des récurrences infectieuses sur le substitut vasculaire implanté en remplacement de la prothèse infectée et est associée à beaucoup moins de complications (rupture de moignons aortiques, thromboses de pontages et amputations des membres inférieurs)<sup>100</sup>. Cette revascularisation *in situ* est préférée même en cas d'existence de fistule prothéto-digestive, la réparation de cette fistule devant être faite avant la mise en place du nouveau substitut vasculaire<sup>68</sup> ;
- Seule l'existence d'un abcès rétropéritonéal pour les IPV de l'aorte abdominale impose de réaliser un pontage extra-anatomique du fait d'un risque de réinfection immédiate trop important en cas de reconstruction *in situ*<sup>68, 101, 102</sup> ;
- Il n'existe pas d'argument fort pour préférer l'utilisation d'un biomatériau par rapport à un autre et le choix se fera au cas par cas parmi la reconstruction



par greffon veineux autologue, une allogreffe artérielle ou l'utilisation d'une prothèse imprégnée d'antibiotiques ou non.

Pour les infections de prothèses périphériques (P1) :

- Une fois la prothèse infectée retirée, la revascularisation n'est pas indiquée en l'absence de signe d'ischémie critique résiduelle. Cela signifie qu'il s'est développé une collatéralité qu'il faudra préserver lors du geste d'exérèse des tissus infectés ;
- Si une revascularisation est indiquée (ischémie du membre par absence de collatéralité), elle sera extra-anatomique en cas d'abcès notamment au niveau des zones anastomotiques, d'infection patente des tissus mous avoisinants ou de nécrose tissulaire. Dans le cas contraire, elle peut être réalisée *in situ* ;
- L'utilisation d'un pontage veineux autologue doit être privilégiée par utilisation de veines périphériques du patient ;
- En l'absence de greffon veineux autologue de qualité, le choix se portera vers un allogreffe veineuse ou artérielle voire une prothèse.



**Figure 6.** Types de revascularisation pour une IPV de l'aorte abdominale

- A. Reconstruction *in situ*, ici par utilisation de veines fémorales superficielles ; adapté d'Oderich et al.<sup>68</sup>
- B. Reconstruction extra-anatomique par pontage axillo-fémoral. La revascularisation du membre inférieur gauche se ferait ici par pontage croisé fémoro-fémoral droite-gauche ; Instruction d'utilisation du fabricant Gore propaten® .

## 4.2. Aspects médicaux

Les données concernant l'antibiothérapie spécifique des IPV sont malheureusement excessivement pauvres. Il existe une littérature assez riche traitant des aspects chirurgicaux de la prise en charge des IPV mais très peu d'études s'intéressant spécifiquement aux modalités de leur antibiothérapie. Des informations peuvent être obtenues grâce à la lecture de 48 études<sup>38-40, 42-46, 51, 54, 55, 58, 59, 62-71, 73-76, 83, 84, 103-121</sup> mais ces informations sont souvent très parcellaires puisque l'objectif de ces travaux était, pour la plupart, la description de la prise en charge chirurgicale des IPV et non pas leur antibiothérapie. Les effectifs de ces travaux sont de plus très variables avec 47 études de cohorte regroupant de 11<sup>54, 64, 76</sup> à 187 patients<sup>65</sup> et une étude cas-témoin ayant inclus 51 patients pour 102 contrôles<sup>45</sup>.

Il est donc très difficile d'en tirer des conclusions très affirmées. La plupart des études utilisent des traitements « classiques » : pénicillines du groupe M pour les infections à staphylocoques sensibles à la méticilline et vancomycine pour les SMR, amoxicilline ou ampicilline pour les IPV à streptocoques, céphalosporines de troisième génération pour les entérobactéries... Mais il n'existe aucune harmonisation dans les méthodes d'utilisation de ces molécules, que ce soit en termes de posologies utilisées que de voie d'administration.

De même, les durées d'antibiothérapie sont variées, allant de 2 semaines<sup>107, 112</sup> à 6 mois<sup>75</sup> après la chirurgie, voire à vie<sup>59</sup>. Une grande proportion de ces travaux<sup>38-40, 45, 69, 72, 103-106, 109, 110</sup> rapporte cependant une durée de 6 semaines après la chirurgie avec des résultats plutôt favorables.

Trois études apportent tout de même des informations intéressantes sur la gestion médicale des IPV. La première est une étude prospective française de cohorte réalisée à Lille-Tourcoing, qui a inclus 85 patients traités pour IPV entre 2005 et 2009: 54 IPV aortiques et 31 IPV périphériques<sup>42</sup>. Soixante-quinze patients ont été opérés, avec seulement 41 d'entre eux qui ont bénéficié d'une prise en charge optimale, à savoir une exérèse de l'implant infecté avec revascularisation immédiate. La mortalité hospitalière était de 16,5%. Plusieurs informations sur la prise en charge médicale ressortent de cette étude. La première est que malgré la caractère prospectif de ce travail avec notamment une prise en charge multidisciplinaire systématique dans le même centre des patients, la prise en charge

était très variable (la prise en charge chirurgicale aussi d'ailleurs). La deuxième, fait suite à cette première observation : il n'y a pas eu de protocole d'antibiothérapie privilégié, avec un grand nombre d'associations différentes utilisées. La troisième est que les durées ont été très diverses : 156 jours en moyenne +/- 94. Enfin, on y apprend que 23 patients ont été traités avec une combinaison comportant de la rifampicine sans que cela ne ressorte comme facteur pronostic. Les seuls facteurs de mortalité retrouvés étaient d'avoir un âge supérieur à 70 ans et d'avoir une IPV aortique.

La même équipe a poursuivi son travail et s'est spécifiquement intéressée aux IPV à staphylocoques. Ils ont inclus 84 patients (65 *S. aureus* et 22 staphylocoques à coagulase négative, certains patients ayant une infection plurimicrobienne)<sup>63</sup>. Les prises en charge étaient encore une fois assez variables mais 50 patients reçurent une combinaison d'antibiothérapie contenant de la rifampicine. Les 34 autres furent traités par des associations très variables mais sans rifampicine. Les traitements ont été très prolongés, souvent de 6 mois. Même si la « dispersion » des différents traitements rend les conclusions difficiles et qu'il ne s'agissait pas d'une étude comparative, les auteurs ont retrouvé qu'en termes de mortalité, le fait de recevoir de la rifampicine était un facteur protecteur : OR=0,32 (intervalle de confiance (IC) 95% :0,10-0,95, P=0,04).

Cette même conclusion a été retrouvée par une équipe suisse grâce à une étude rétrospective monocentrique incluant 61 patients<sup>51</sup>. Là-encore, les prises en charge thérapeutiques ont été très diverses. Pour les IPV à staphylocoques, 46% des patients ont reçu un traitement comprenant de la rifampicine et ceci constituait un facteur de bon pronostic en analyse multivariée (Hazard ratio : 6,88, IC95% : 1,33-35,4, P=0,02). Ce résultat, similaire à celui retrouvé par l'équipe de Tourcoing, doit cependant être interprété avec précaution. Les définitions d'IPV étaient assez « larges » et il n'est pas impossible que certains patients aient été inclus alors qu'ils ne présentaient pas réellement d'IPV.

En résumé, très peu d'informations peuvent être retirées de l'analyse de la littérature quant au traitement antibiotique à administrer en cas d'IPV et ces informations ne sont malheureusement pas suffisantes pour en tirer des conclusions définitives. Pour autant, et même s'il n'existe pour l'instant aucune preuve irréfutable, l'utilisation de rifampicine semble être facteur de bon pronostic.

Malgré ce manque de certitude, nous avons rédigé des propositions de traitement antibiotique pour l'ensemble des IPV, publiées dans l'International Journal of Antimicrobial Agents en 2015. Cet article est présenté ci-dessous. Une partie de ces propositions ont également été présentées aux JNI en 2013<sup>122</sup>.



Contents lists available at ScienceDirect

## International Journal of Antimicrobial Agents

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijantimicag>

## Review

## Medical treatment of prosthetic vascular graft infections: Review of the literature and proposals of a Working Group



M. Revest<sup>a,b</sup>, F. Camou<sup>c</sup>, E. Senneville<sup>d</sup>, J. Caillon<sup>e</sup>, F. Laurent<sup>f</sup>, B. Calvet<sup>g</sup>, P. Feugier<sup>h</sup>, M. Batt<sup>i</sup>, C. Chidiac<sup>j,\*</sup>, Groupe de Réflexion sur les Infections de Prothèses vasculaires (GRIP)<sup>1</sup>

<sup>a</sup> Infectious Diseases and Intensive Care Unit, Pontchaillou University Hospital, Rennes, France

<sup>b</sup> CIC Inserm 1414, Rennes 1 University, Rennes, France

<sup>c</sup> Intensive Care Unit, Saint-André University Hospital, Bordeaux, France

<sup>d</sup> Infectious Diseases Department, Gustave Dron Hospital, Tourcoing, Lille 2 University, France

<sup>e</sup> Bacteriology Department, EA 3826 Nantes University, Hôtel Dieu University Hospital, Nantes, France

<sup>f</sup> Bacteriology Department, International Center for Infectiology Research (CIRI) – INSERM U1111, CNRS UMR5308, Lyon 1 University, ENS de Lyon, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

<sup>g</sup> Anesthesiology Department, Beziers, France

<sup>h</sup> Department of Vascular Surgery, University Claude Bernard Lyon 1, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

<sup>i</sup> Department of Vascular Surgery, University of Nice-Sophia Antipolis, Nice, France

<sup>j</sup> Infectious Diseases Department, University Claude Bernard Lyon 1, Hospices Civils de Lyon, Inserm U1111, Lyon 1 University, Lyon, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 19 January 2015

Accepted 21 April 2015

## Keywords:

Vascular prosthesis infection

Antibiotic therapy

*Staphylococcus*

Rifampicin

## ABSTRACT

More than 400 000 vascular grafts are inserted annually in the USA. Graft insertion is complicated by infection in 0.5–4% of cases. Vascular graft infections (VGIs) are becoming one of the most frequent prosthesis-related infections and are associated with considerable mortality, ranging from 10 to 25% within 30 days following the diagnosis. Treatment of VGI is based on urgent surgical removal of the infected graft followed by prolonged antibiotherapy. Data regarding the best antibiotherapy to use are lacking since no well designed trial to study antimicrobial treatment of VGI exists. Moreover, since VGIs demonstrate very specific pathophysiology, guidelines on other material-related infections or infective endocarditis treatment cannot be entirely applied to VGI. A French multidisciplinary group gathering infectious diseases specialists, anaesthesiologists, intensivists, microbiologists, radiologists and vascular surgeons was created to review the literature dealing with VGI and to make some proposals regarding empirical and documented antibiotic therapy for these infections. This article reveals these proposals.

© 2015 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

## 1. Introduction

Due to advances in surgical techniques and increased possibilities for interventional radiology, the number of patients with vascular implants is constantly on the rise [1]. Prosthetic vascular graft infections (PVGIs) are among the most serious complications associated with these procedures. Their frequency, ranging from 1

to 5% of patients, varies depending on the anatomical implantation site, the biomaterial used and the patient's co-morbidities. The mortality rate is estimated to be 10–25% within 30 days after the diagnosis and almost 50% after 1 year, and the risk of amputation is estimated at 4–14% [2]. However, there are very few validated data on the best medical treatments for these infections. A focus group composed of French vascular surgeons, anaesthesiologists, microbiologists, intensivists, radiologists and infectious diseases specialists was conducted to review the literature on the subject and to formulate proposals for anti-infective therapies for PVGIs.

## 2. Methodology

This study relates to aortic (chest and abdominal) and peripheral PVGIs, including prosthetic arteriovenous fistula infections and axillofemoral bypass graft infections. Venous or arterial catheter

\* Corresponding author. Present address: Infectious Diseases Department, University Hospital of Lyon, Inserm U1111, University of Lyon 1, Hôpital de la Croix Rousse, 103 Grande rue de la Croix Rousse, 69004 Lyon, France. Tel.: +33 4 72 07 11 07; fax: +33 4 72 07 17 50.

E-mail address: [christian.chidiac@chu-lyon.fr](mailto:christian.chidiac@chu-lyon.fr) (C. Chidiac).

<sup>1</sup> A.L. Rivière (Bordeaux, France), M. Papillard (Lyon, France) also participated in the research as part of the Groupe de Réflexion sur les Infections de Prothèses vasculaires (GRIP).

**Table 1**  
Levels of evidence and grades of recommendations used.

Level of evidence provided by the literature	Grade of recommendations
<b>Level I</b> High-quality randomised controlled trials Meta-analysis of randomised controlled trials Decision analysis based on well conducted studies	<b>A</b> Established scientific evidence
<b>Level II</b> Low-quality randomised controlled trials Non-randomised, well conducted comparative studies Cohort studies	<b>B</b> Scientific presumption
<b>Level III</b> Case-control studies	<b>C</b> Low level of evidence
<b>Level IV</b> Comparative studies with significant biases Retrospective studies Case series	

infections, endovascular stimulation material infections and autologous graft infections were excluded.

A French and English literature search was conducted through PubMed for the period 1 January 1991 to 1 March 2013 using a selection of keywords from the Medical Subject Heading (MeSH) database as well as other unreferenced keywords. From the 9188 references thus selected, the following were excluded: series with less than 10 cases; in vitro studies; and incomplete or insufficiently documented series. Some animal studies were retained for the analysis when they were considered to be sufficiently informative. Series on arteriovenous fistula infections carried out on bovine carotid grafts were also excluded. The bibliographic references for all publications selected were reviewed. All of the studies that were retained were reviewed using the grid proposed by the Society for Vascular Surgery [3]. The recommendations are graded in accordance with the Haute Autorité de Santé (French Health Authority) methodology sheet from December 2010 (Table 1) [4]. In the absence of data, they correspond to recommendations based on a professional consensus (expert opinion) within the Working Group. Forty-six clinical studies were thus selected for analysis [5–50]. There were 43 cohort studies, with the number of patients ranging from 11 [8,19,21] to 187 [32] (mean, 49; median, 32) and a case-control study involving 51 cases, for a total of 102 controls [34]. Four animal studies were also retained for analysis [51–54].

### 3. Empirical antibiotic therapy

#### 3.1. Rationale

##### 3.1.1. Microbiological information

The microbiological epidemiology of PVGIs is broken down as follows: *Staphylococcus aureus*, 20–53%; Enterobacteriaceae, 14–41%; coagulase-negative staphylococci (CoNS), 15%; *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* sp. and *Enterococcus* sp., 10–15%; polymicrobial infection, 20%; obligate anaerobic bacteria (always associated with other bacteria), 5%; and yeast, 1–2%.

##### 3.1.2. Indication

In the study by Legout et al. [33], the proportion of intra-operative samples with positive culture did not differ between patients who did or did not receive antibiotics before revision surgery, i.e. 38/43 vs. 40/42, respectively ( $P=0.4$ ). However, patients who received antibiotherapy prior to surgery were

operated within the first 48 h of treatment, and these results do not rule out the possible loss of microbiological information for patients treated >48 h prior to surgery, nor do they allow for the recommendation of empirical antibiotic therapy for all PVGI situations.

The issue of non-prescriptive empirical antibiotic therapy arises only when the patient has not received antibiotics prior to admission and when the expected time between diagnosis or suspicion and the revision surgery is short. No data are available to define the acceptable length of the expected timeframe for revision surgery beyond which empirical antibiotic therapy should be initiated. Ideally, this should be decided on a case-by-case basis as part of a multidisciplinary consultation.

##### 3.1.3. Choice of antibiotics

**3.1.3.1. Impact of the biofilm.** Biofilm developed on the vascular prosthesis plays a particular role in the difficulties encountered in treating PVGIs. Biofilm is formed by surface-associated communities of micro-organisms embedded in an extracellular matrix that acts as both a barrier against antibiotic penetration and protection against host defences [55]. Moreover, bacteria express a distinct metabolic pathway within the biofilm [56]. Whilst planktonic bacteria found outside the biofilm or in the very top layers of it display active metabolism and are therefore fully sensitive to antibiotics that mainly impair bacterial mechanisms of replication, bacteria embedded deeply in a mature biofilm demonstrate very slowed-down metabolic pathways and a decreased efficacy of antibiotics [56,57]. In this context, curing PVGIs with antibiotics alone without removal of the infected device therefore seems elusive.

There are very few data, if any, regarding the efficacy of antibiotics on infected vascular graft biofilm. An in vitro study evaluated the impact of various antimicrobial agents on staphylococcal adherence on Dacron® or polytetrafluoroethylene (PTFE). In this model, daptomycin and rifampicin were the two best agents to eradicate staphylococcal biofilm, whereas vancomycin and ceftriaxone failed to sterilise it [58]. Other authors investigated the capabilities of various antibiotics to penetrate biofilm formed on other medical devices. Rifampicin is probably the antimicrobial agent that demonstrated the best activity on staphylococcal biofilm [54,59–63]. When in combination, fosfomicin has been found to enhance the antimicrobial activities of many antibiotics in methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) biofilm [64]. Daptomycin has also demonstrated interesting capacities in biofilm penetration [65], and some studies revealed a higher activity against stationary phase staphylococci than vancomycin [66]. However, the clinical relevance of all these in vitro data is still lacking and the therapeutic choice of the antimicrobial chemotherapy to use to treat PVGIs cannot be only based on such biofilm penetration criteria, highlighting that clinical studies and data are required.

**3.1.3.2. Gram-positive cocci.** The prevalence of MRSA has steadily declined in Europe since 2001 but remains >20%. The situation is different for CoNS, with resistance to  $\beta$ -lactams [67], glycopeptides (including teicoplanin) [68] and, more recently, linezolid [69] steadily on the rise.

The risk factors associated with methicillin-resistant staphylococci (MRS) (*S. aureus* or CoNS) in PVGI were examined in a retrospective study [41], which determined that the proportion of PVGIs caused by MRSA was 16%. The only factor identified was the existence of hypertension, but this relationship could not be explained. Given the important role of staphylococci in PVGIs, the significant proportion of MRSA and the absence of clinical risk factors validated by the methicillin resistance, it is recommended that the spectrum of empirical antibiotic therapy for PVGIs should systematically cover MRSA.

**Table 2**  
Empirical antibiotic therapy for prosthetic vascular graft infections (PVGIs) depending on the clinical situation (C-III).

Clinical situation	In the absence of allergy to β-lactams	In the case of allergy to penicillin
PVGI with sepsis without signs of severity or known colonisation, no history of MDR bacterial infection	Piperacillin/tazobactam + vancomycin or daptomycin <sup>a</sup> ± gentamicin	Cefotaxime or ceftriaxone or cefepime or aztreonam + metronidazole + vancomycin or daptomycin <sup>a</sup> ± gentamicin
PVGI with sepsis, signs of severe sepsis and/or known colonisation or previous infection with ESBL-GNB <sup>b</sup>	Imipenem or meropenem or doripenem + vancomycin or daptomycin <sup>a</sup> ± gentamicin	Fosfomycin + metronidazole + vancomycin or daptomycin <sup>a</sup> ± gentamicin

MDR, multidrug-resistant; ESBL-GNB, extended-spectrum β-lactamase-producing Gram-negative bacillus.

<sup>a</sup> No approval for this indication.

<sup>b</sup> Resistant to third- or fourth-generation cephalosporins on antibiotic susceptibility testing.

Anti-Gram-positive antibiotics used in empirical antibiotic therapy for PVGIs should ideally be bactericidal against bacteria both in the stationary growth phase and when growing exponentially, and they should have a spectrum that covers MRS [including strains whose glycopeptide minimum inhibitory concentrations (MICs) are ≥1.5 mg/L], good tissue distribution (including biofilm), an anti-adhesion effect and a good safety profile (including a kidney safety profile) that is compatible with the characteristics of patients with PVGIs. Considering these elements, linezolid and tigecycline are less than ideal due to their solely bacteriostatic action and their failure to demonstrate their benefits in bacteraemic patients and/or in patients with severe infection; the same applies for teicoplanin [67], the anti-CoNS spectrum of which no longer appears to be currently adapted to the empirical treatment of prosthetic infection [67]. Vancomycin poses the problem of its nephrotoxic potential [70]. Daptomycin has a profile that is adapted to all of these prerequisites, but it does not have an approval for this type of use [71].

**3.1.3.3. Gram-negative bacilli.** Bacterial ecology is highly variable from one health facility to another, and as such it is difficult to recommend a standardised anti-Gram-negative bacilli empirical antibiotic therapy. The empirical prescription of amoxicillin/clavulanic acid appears inadequate because of the increasing prevalence of resistant *Escherichia coli*, exceeding one-third of strains [72]. The combinations piperacillin/tazobactam and ticarcillin/clavulanic acid have an advantage over cephalosporins because they cover obligate anaerobes, including *Bacteroides fragilis*.

The increase in carbapenemase-producing bacteria in human pathology restricts the use of carbapenems to severe infections and/or when the patient has multidrug-resistant bacteria [73].

Aminoglycosides may be useful to intensify bactericidal activity and to rapidly reduce the bacterial inoculum, but they expose patients to the risk of nephrotoxicity, particularly patients with chronic renal failure or cirrhosis. The impact of their use on mortality varies: one study found no benefit of aminoglycosides on mortality rates [41], whereas a separate study found that aminoglycosides might reduce mortality when used for patients in intensive care (59% vs. 27%;  $P = 0.07$  in multivariate analysis) [42].

**3.2. Recommendations**

It is recommended that the use of empirical antibiotic therapy should be limited to suspected or known cases of PVGI for which it does not seem reasonable to wait for surgical microbiological sample results. Such situations include severe sepsis, septic shock, and instances in which the clinical and/or radiological signs indicate a mechanical complication of infectious origin, such as an aneurysmal rupture or anastomotic disunion (C-III). Two different sets of

blood cultures should systematically be performed prior to empirical antibiotherapy.

Adaptation is necessary after receiving the microbiological results from blood cultures or surgical samples. Such 'de-escalation' should be performed as quickly as possible to limit the selection pressure for resistant strains that is induced by this broad-spectrum antibiotic therapy (B-III).

Table 2 presents proposals for empirical antibiotic therapy depending on the clinical situation (C-III).

The potential severity of PVGIs, their frequent association with bacteraemia, and the need for sufficient concentrations at the site of the infected material interface/periprosthetic tissue are good arguments for parenteral administration and the use of high dosages (C-III).

**4. Documented antibiotic therapy**

The following proposals reflect the prerequisites outlined above (good diffusion in the biofilm, activity against slowly metabolising strains, high tolerance, need for bactericidal treatment) and result from an analysis of the PVGI literature and the most recent recommendations for the treatment of prosthetic valve endocarditis [34,74–76]. Although PVGIs cannot be entirely likened to infective endocarditis (IE), these two types of infection have many points in common, including infection of endovascular material with production of biofilm, patients with multiple co-morbidities, frequently impaired renal function, and similarity of causative micro-organisms, with the exception of Enterobacteriaceae and obligate anaerobic bacteria that are often encountered in cases of PVGI but are rare in IE.

Blood cultures and/or periprosthetic collection punctures can serve to document the infection prior to surgery. The following recommendations therefore distinguish two situations: pre-operative and post-operative antibiotic therapy. For the post-operative part, two situations are distinguished: optimal management (excision of the entire infected prosthesis and the surrounding infected tissue); and suboptimal surgery (all or part of the prosthesis left in place). In the absence of pre-operative documentation, the antibiotic therapy recommendations are outlined in Section 3.

There are no data regarding the impact of the surgical procedure performed on the antibiotherapy. It is not known whether the type of biomaterial used for the vascular reconstruction after infected graft removal (autogenous venous graft, cryopreserved arterial allograft, prosthetic graft) or the surgical procedure performed (extra-anatomical or in situ reconstruction) influence the choice or duration of antibiotic treatment. It is therefore recommended to apply the same medical treatment for all of the different surgical techniques (C-III).

It is also not known whether the anatomical site or the type of infected material impact the choice of antibiotherapy. In the literature, peripheral lower limb VGI and aortic VGI are often



individualised but only for the surgical procedure and not for the medical treatment. Prosthetic dialysis arteriovenous graft infections have also been specifically studied but only in three studies [77–79], and data dealing with antibiotics are too scarce to propose specific medical treatment for these infections. Thus, it is recommended to adopt the same medical treatment for all the different types of PVGIs (C-III).

The dosages and modes of administration of the various compounds mentioned are provided in Table 3. Generally (B-III):

- In the event of reliable pre-operative documentation (deep sampling performed through healthy dermal route or positive blood culture), antibiotic therapy should target only the pathogen or pathogens found.
- Post-operative re-evaluation of this antibiotic therapy should be carried out in light of the intra-operative sampling results.
- Surgical treatment should be performed as quickly as possible because of the extreme severity of PVGIs in order to facilitate the efficacy of the anti-infective therapy. This is particularly important in cases of micro-organisms that are difficult to treat, such as multiresistant bacteria, enterococci, *P. aeruginosa* and yeasts.

#### 4.1. Staphylococcal infections

##### 4.1.1. Rationale

Although not new [80], data regarding the efficacy of meticillin derivatives are still valid [81] and the use of these derivatives remains highly recommended as the first-line treatment for severe meticillin-sensitive *S. aureus* infections [34,75,76,82]. In the case of penicillin allergy without allergy to cephalosporins, the choice will be between cefazolin, vancomycin and daptomycin. In the case of allergy to all  $\beta$ -lactams, the choice will be between vancomycin and daptomycin [34,81,83–90].

Treatment of MRSA infections is difficult. Vancomycin is established by usage as the compound of choice, although failures are reported, particularly in cases of high vancomycin MICs ( $\geq 1.5$  mg/L) [91,92].

Given that PVGIs are severe infections on foreign materials, addition of an aminoglycoside, preferably gentamicin, is justified [59,93–95].

Addition of rifampicin is attractive because of its large diffusion capacity, anti-adhesion potency and preserved bactericidal activity despite the presence of a biofilm [59,60,96]. Its use is also correlated with a better prognosis in osteoarticular staphylococcal infections [97]. Its prescription as monotherapy is strongly discouraged, as is its use in bacteraemic patients [98], owing to the rapid emergence of a resistant strain of bacteria. There are no data regarding the use of rifampicin in PVGIs, but the pharmacological, clinical and experimental data argue in favour of its use. Therefore, in the treatment of staphylococcal PVGIs, it is advisable to add rifampicin to the treatment after vascular surgery and certainty of negative blood cultures.

Daptomycin exhibits interesting bactericidal activity within the biofilm [58,99]. It is approved for bacteraemia and right-sided endocarditis caused by *S. aureus* at a dose of 6 mg/kg/day in a single injection [100]. However, there appears to be a possibility of decreased staphylococci susceptibility during treatment [101] and a greater number of microbiological failures compared with comparators [100], suggesting that the dose of 6 mg/kg/day may be insufficient. Some authors have also shown that higher doses (8–12 mg/kg/day) do not pose any particular tolerance problems [102,103], although it is not known whether this increase in dosage changes the prognosis of infections. However, no data are available regarding the use of daptomycin in the treatment of PVGIs, and the use of this compound as first-line therapy should be subject to a multidisciplinary approach when the staphylococcal

strain is sensitive to meticillin and vancomycin (MICs  $< 1.5$  mg/L). In staphylococcal infections caused by strains with vancomycin MICs  $\geq 1.5$  mg/L, the use of daptomycin is advised, at high doses, in combination with gentamicin for the first 3 days of treatment, followed by rifampicin. Daptomycin MICs for the isolated strain should be documented. It has indeed been shown that sensitivity to daptomycin may decrease when the vancomycin MIC is elevated [104,105].

No scientifically valid data provide a basis for preferring one compound to another for PVGIs caused by glycopeptide-resistant staphylococci. However, daptomycin is the compound for which data related to use on foreign material [106] and IE [100] are the most documented. To improve efficacy and reduce the risk of emergence of strains with reduced susceptibility to daptomycin during treatment, it should be combined with another antibiotic, preferably gentamicin [107] or rifampicin [108].

For other antistaphylococcal agents, no data are available for this type of infection and their use should be considered only on a case-by-case basis, in combination, in the absence of an alternative and following a multidisciplinary opinion.

##### 4.1.2. Recommendations

Therapeutic proposals for PVGIs caused by staphylococci (*S. aureus* or CoNS) are presented in Tables 4 and 5.

#### 4.2. Streptococcal infections

##### 4.2.1. Rationale

There is no study specific to the treatment of streptococcal PVGIs. Therefore, the following recommendations stem from extrapolations from comparable clinical situations for which reliable data are available. Amoxicillin remains the antibiotic of choice for streptococcal infections [34,75,82,109–111].

The use of aminoglycosides for treating severe streptococcal infections is currently under debate because of their potential toxicity [112]. Analysis of the literature does not support any conclusion regarding their usefulness [113–116]. Their use in the first days of treatment to reduce bacterial inocula appears to be justified.

Post-operatively, this benefit is more questionable: the bacterial inoculum is reduced by surgery, and the remaining bacteria are located in the periphery of the prosthesis, in an extravascular position, an area in which the diffusion of aminoglycosides is very limited. If vancomycin is used, co-administration of gentamicin is not recommended because of the low level of evidence regarding its use in this context and the risk of renal toxicity associated with this combination. When used, gentamicin is given in a single daily dose [93].

The effectiveness of other antibiotics with antistreptococcal activity in PVGI treatment has not yet been established.

##### 4.2.2. Recommendations

4.2.2.1. Pre-operative treatment. Determination of MICs of amoxicillin, cefotaxime and/or ceftriaxone, or even vancomycin, should be obtained, particularly in cases of *viridans* streptococci infection (B-III). Amoxicillin is the recommended treatment for streptococcal PVGIs that are sensitive to this compound, with dosages ranging from 100 mg/kg/day (streptococci for which the amoxicillin MIC is  $< 0.125$  mg/L) to 200 mg/kg/day (MIC  $\geq 0.125$  mg/L) divided into four to six injections (B-III). Gentamicin can be added, for a maximum period of 3 days, at a dose of 3–8 mg/kg/day (C-III).

Vancomycin is the antibiotic of choice (B-III) when susceptibility to all  $\beta$ -lactam antibiotics is decreased or in the case of allergy to all members of this therapeutic class. Determination of the vancomycin MIC is therefore imperative. Combination with gentamicin

**Table 3**  
Dosage, route and rate of administration of anti-infectives in prosthetic vascular graft infections.

Compound	Dosage	Route and rate of administration
Amikacin	15–30 mg/kg/day	One i.v. infusion over 30 min
Amoxicillin	100–200 mg/kg/day	Six i.v. infusions over 30 min or i.v. via infusion pump
Amoxicillin/clavulanic acid	100–200 mg/kg/day of amoxicillin	Six i.v. infusions over 30 min (2 g vials)
Caspofungin	70 mg the first day and then 50 mg/day (weight <80 kg) or 70 mg/day (weight ≥80 kg)	One i.v. infusion over 1 h
Cefazolin	60–80 mg/kg/day	Six i.v. infusions over 30 min or i.v. via infusion pump <sup>a</sup>
Cefotaxime	150 mg/kg/day	Six i.v. infusions over 30 min or i.v. via infusion pump <sup>a</sup>
Ceftazidime	100 mg/kg/day	Four i.v. infusions over 30 min or i.v. via infusion pump <sup>a</sup>
Ceftriaxone	50 mg/kg/day	One to two i.v. infusions over 30 min
Ciprofloxacin	1500–2000 mg/day (orally) or 800–1200 mg/day (i.v.)	Two to three oral doses <sup>b</sup> or two to three i.v. infusions over 30 min <sup>b</sup>
Cloxacillin or oxacillin	200 mg/kg/day	Six i.v. infusions over 30 min or i.v. via infusion pump on three syringes over 8 h <sup>a</sup>
Daptomycin	8–10 mg/kg/day	One i.v. infusion over 2–30 min
Doripenem	3 g/day	Three i.v. infusions over 4 h or i.v. via infusion pump (500 mg in 50 mL to 12 mL/h)
Fluconazole	800 mg on the first day and 400–800 mg/day	One oral dose or one i.v. infusion over 2 h <sup>c</sup>
Fosfomycin	150–200 mg/kg/day	Three to four i.v. infusions over 3–4 h
Gentamicin	3–8 mg/kg/day	One i.v. infusion over 30 min
Imipenem	3 g/day	Three i.v. injections over 30 min
Levofloxacin	500–1000 mg/day	One oral dose or one i.v. infusion over 30 min <sup>b</sup>
Meropenem	3–6 g/day	Three i.v. infusions over 30 min
Metronidazole	1500 mg/day	Three oral doses or three i.v. infusions over 30 min <sup>c</sup>
Micafungin	100 mg/day	One i.v. infusion over 1 h
Ofloxacin	400–600 mg/day	Two oral doses or two i.v. infusions over 30 min <sup>b</sup>
Piperacillin/tazobactam	150–200 mg/kg/day of piperacillin	Three infusions over 4 h
Rifampicin	10–20 mg/kg/day	Two oral doses (fasting) or two i.v. infusions over 30 min <sup>c</sup>
Teicoplanin <sup>d</sup>	8–12 mg/kg/12 h for 3 days and then 8–12 mg/kg/day	Slow i.v., i.m. or subcutaneous
Ticarcillin	250 mg/kg/day	Three i.v. infusions over 30 min or i.v. via infusion pump <sup>a</sup>
Vancomycin <sup>d</sup>	40–60 mg/kg/day	i.v. via infusion pump <sup>a</sup>

i.v., intravenous; i.m., intramuscular.

<sup>a</sup> Begin with a loading dose equal to one-quarter of the total daily dose, to be administered over 30 min via i.v. infusion, except for vancomycin for which the duration of administration of the loading dose is longer: 15 mg/kg loading dose to be infused over 1 h (1 g) or 1 h 30 min (1.5 g).

<sup>b</sup> The highest dosages of fluoroquinolones are to be considered when combined with rifampicin owing to the enzyme induction properties of the latter.

<sup>c</sup> Preference should be given to oral administration.

<sup>d</sup> Glycopeptide dosage: this will be done after 72 h for vancomycin and after the sixth infusion for teicoplanin (just before the infusion) and then once a week for the entire duration of the treatment.

is not systematic; it is only considered in the event of signs of severe sepsis or septic shock, and its use is then restricted to ≤3 days (C-III).

#### 4.2.2.2. Post-operative treatment.

4.2.2.2.1. For optimal surgical treatment. Post-operative treatment is the same as that recommended for pre-operative treatment (B-III). The duration of treatment is 6 weeks post-operatively, parenterally (C-III).

4.2.2.2.2. For suboptimal surgical treatment. Antibiotic treatment is the same as in the previous situation for 6 weeks

post-operatively (B-III). Subsequently, switching to oral amoxicillin can be considered (C-III).

#### 4.3. Enterococcal infections

##### 4.3.1. Rationale

In the absence of high-level resistance to gentamicin, the combination of amoxicillin + gentamicin is synergistic and bactericidal [117,118]. Extrapolation of data regarding endocarditis would serve to restrict the duration of use of gentamicin [119].

**Table 4**  
Antibiotic therapy for prosthetic vascular graft infections caused by methicillin-sensitive *Staphylococcus* sp.

		In the absence of allergy to β-lactams	In the case of allergy to penicillin	In the case of contraindication to β-lactams
Pre-operative treatment		Cloxacillin or oxacillin (B-III) + gentamicin <sup>a</sup> 3 days (B-III)	Cefazolin or vancomycin or daptomycin (B-III) + gentamicin <sup>a</sup> 3 days (B-III)	Vancomycin or daptomycin (B-III) + gentamicin <sup>a</sup> 3 days (B-III)
Post-operative treatment	Optimal	Cloxacillin or oxacillin (B-III) + gentamicin <sup>a</sup> 3 days (C-III)  and then addition of rifampicin <sup>b</sup> in place of gentamicin (B-III)  relay with oral rifampicin + fluoroquinolone at Day 15 post-operatively <sup>c</sup> (C-III)  Duration of treatment, 6 weeks post-operatively (C-III)	Cefazolin or vancomycin or daptomycin (B-III) + gentamicin <sup>a</sup> 3 days (C-III)  and then addition of rifampicin <sup>b</sup> in place of gentamicin (B-III)  relay with oral rifampicin + fluoroquinolone at Day 15 post-operatively <sup>c</sup> (C-III)  Duration of treatment, 6 weeks post-operatively (C-III)	Vancomycin or daptomycin (B-III) + gentamicin <sup>a</sup> 3 days (C-III)  and then addition of rifampicin <sup>b</sup> in place of gentamicin (B-III)  relay with oral rifampicin + fluoroquinolone at Day 15 post-operatively <sup>c</sup> (C-III)  Duration of treatment, 6 weeks post-operatively (C-III)
	Suboptimal	Cloxacillin or oxacillin (B-III) + gentamicin 3 days (C-III)  and then addition of rifampicin <sup>b</sup> in place of gentamicin (B-III) for 6 weeks post-operatively (C-III)  and then suppressive treatment <sup>d</sup> (C-III)	Cefazolin or vancomycin or daptomycin (B-III) + gentamicin 3 days (C-III)  and then addition of rifampicin <sup>b</sup> in place of gentamicin (B-III) for 6 weeks post-operatively (C-III)  and then suppressive treatment <sup>d</sup> (C-III)	Vancomycin or daptomycin + gentamicin 3 days  and then addition of rifampicin <sup>b</sup> in place of gentamicin (B-III) for 6 weeks post-operatively (C-III)  and then suppressive treatment <sup>d</sup> (C-III)

<sup>a</sup> Dosage of 3–8 mg/kg/day in a single daily dose. In patients with severe infection with the risk of increased volume of distribution (severe sepsis or even septic shock, mechanical ventilation, presence of oedema, etc.), preference should be given to higher doses (5–8 mg/kg/day). The rate of administration and dosages are to be adapted to residual concentrations.

<sup>b</sup> After ascertaining that blood cultures are negative.

<sup>c</sup> Only in the case of good clinical evolution, if susceptible to fluoroquinolones and in the absence of post-operative bacteraemia. No other oral relay is recommended (C-III).

<sup>d</sup> To be determined based on susceptibility testing and following a multidisciplinary opinion.

**Table 5**  
Antibiotic therapy for prosthetic vascular graft infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus* sp.

		Vancomycin MIC < 1.5 mg/L	Vancomycin MIC ≥ 1.5 mg/L
Pre-operative treatment		Vancomycin <sup>a</sup> (B-III) or daptomycin (C-III) + gentamicin 3 days (B-III)	Daptomycin (B-III) + gentamicin 3 days (C-III)
Post-operative treatment	Optimal	Vancomycin <sup>a</sup> (B-III) or daptomycin (C-III) + gentamicin 3 days (C-III)  and then addition of rifampicin <sup>b</sup> in place of gentamicin (B-III)  relay with oral rifampicin + fluoroquinolone at Day 15 post-operatively <sup>c</sup> (C-III)  Duration of treatment, 6 weeks post-operatively (C-III)	Daptomycin (B-III) + gentamicin 3 days (C-III)  and then addition of rifampicin <sup>b</sup> in place of gentamicin (B-III)  relay with oral rifampicin + fluoroquinolone at Day 15 post-operatively <sup>c</sup> (C-III)  Duration of treatment, 6 weeks post-operatively (C-III)
	Suboptimal	Vancomycin (B-III) or daptomycin (C-III) + gentamicin 3 days (C-III)  and then addition of rifampicin in place of gentamicin (B-III) for 6 weeks post-operatively (C-III)  and then suppressive treatment <sup>d</sup> (C-III)	Daptomycin (B-III) + gentamicin 3 days (C-III)  and then addition of rifampicin in place of gentamicin (B-III) for 6 weeks post-operatively (C-III)  and then suppressive treatment <sup>d</sup> (C-III)

MIC, minimum inhibitory concentration.

<sup>a</sup> Equilibrium concentrations of vancomycin, 20–30 mg/L. Teicoplanin can be considered, as a relay, after ascertaining the susceptibility of the bacterial strain and if the clinical condition has stabilised (C-III).

<sup>b</sup> After ascertaining that blood cultures are negative.

<sup>c</sup> Only in the case of good clinical evolution, if susceptible to fluoroquinolones and in the absence of post-operative bacteraemia.

<sup>d</sup> To be determined based on susceptibility testing and after multidisciplinary opinion.

Post-operatively, due to the decrease of inoculum, treatment with aminoglycoside is temporally shortened.

Experimental data have shown that the ampicillin + ceftriaxone combination may act synergistically when used in the treatment of experimental endocarditis caused by *Enterococcus faecalis* [120,121]. Human clinical data also appear to confirm this [122,123]. This combination could be an option in the case of significant toxicity of aminoglycosides or pre-existing renal insufficiency.

For PVGIs caused by vancomycin-resistant enterococci, there is not yet enough solid evidence to recommend one compound over another [124]. Linezolid has sometimes been used [125,126], most often in combination with other compounds, but its prolonged use is difficult because of its neurological and haematological toxicity and potential risk of relapse [127,128]. Some experimental studies [129] or clinical cases [130] also reported the efficacy of daptomycin in this indication, but the emergence of resistant strains [131,132] makes its use problematic. However, some in vitro data appear to indicate a real synergy between daptomycin and rifampicin or ampicillin against enterococci [133,134]. Monitoring of a cohort of 159 patients (90% bacteraemic) treated with daptomycin for enterococcal infection, 115 of whom were resistant to vancomycin, showed a cure rate of 44% [135]. It is not possible to be categorical regarding the choice of the compound to be used in glycopeptide-resistant PVGIs caused by enterococci [136]. This choice must be made after multidisciplinary discussion.

4.3.2. Recommendations

4.3.2.1. Pre-operative treatment. Amoxicillin is the recommended treatment for PVGIs caused by susceptible enterococci. The dose is 200 mg/kg/day divided into four to six injections (B-III). Gentamicin is used, in a single daily dose, for 7 days at a dose of 3–8 mg/kg/day if surgery is not performed before treatment (B-III).

In the case of allergy or resistance to amoxicillin, teicoplanin or vancomycin alone is recommended (B-III). In the case of resistance to glycopeptides, the susceptibility of enterococcus to daptomycin and linezolid must be studied. The choice will be made following a multidisciplinary opinion (C-III).

4.3.2.2. Post-operative treatment.

4.3.2.2.1. For optimal surgical treatment. Post-operative treatment is the same as that recommended for pre-operative treatment

regarding amoxicillin or glycopeptides (B-III). Gentamicin is continued only for a maximum of 3 days (C-III). The duration of treatment is 6 weeks post-operatively, parenterally, at the same dosage (C-III).

4.3.2.2.2. For suboptimal surgical treatment. Antibiotic treatment is the same as in the previous situation for 6 weeks post-operatively (C-III). Subsequently, oral amoxicillin relay, for an extended period, can be considered (C-III).

4.4. Enterobacteriaceae infections

4.4.1. Rationale

The benefit of combination therapy in infections caused by enterobacteria is controversial [137]. The synergistic effect and prevention of resistance has not been demonstrated by clinical studies [137–144]. However, the severity of PVGIs and the risk of severe systemic impact justify the initial combination of an aminoglycoside with a  $\beta$ -lactam for a short period of time [93].

4.4.2. Recommendations

Therapeutic proposals for PVGIs caused by Enterobacteriaceae are presented in Table 6.

4.5. Pseudomonas infections

4.5.1. Rationale

On a compromised terrain and high inoculum, the slightest susceptibility to antibiotics and resistance make the treatment of PVGIs caused by *Pseudomonas* difficult. The benefit of combination therapy that has not been shown by discordant and heterogeneous clinical studies [145–148] remains established by usage prior to surgery and post-operatively.

4.5.2. Recommendations

4.5.2.1. Pre-operative treatment. Treatment is based on a  $\beta$ -lactam, and the choice is made according to the results of antibiotic susceptibility testing among ticarcillin, ceftazidime, piperacillin/tazobactam and a carbapenem (excluding ertapenem) (B-III). An aminoglycoside (amikacin or tobramycin) is combined with it for 3 days (C-III). The aminoglycoside is replaced by fosfomycin beyond these 3 days if the surgery has not yet been performed (C-III). Fluoroquinolones should be reserved for post-operative oral relay (B-III).

**Table 6**  
Antibiotic treatment of prosthetic vascular graft infections caused by Enterobacteriaceae.

		In the absence of allergy to $\beta$ -lactams	In the case of allergy to penicillin
Pre-operative treatment		Ceftriaxone or cefotaxime <sup>a</sup> (B-III) + gentamicin 3 days <sup>b</sup> (C-III)	Aztreonam (C-III) + gentamicin 3 days (C-III)
Post-operative treatment	Optimal	Ceftriaxone or cefotaxime <sup>a</sup> (B-III)  and then relay with fluoroquinolones <sup>c</sup> (C-III)	Aztreonam (C-III)  and then relay with fluoroquinolones <sup>c</sup> (C-III)
	Suboptimal	Duration of treatment, 6 weeks post-operatively (C-III) Ceftriaxone or cefotaxime <sup>a</sup> (B-III)	Duration of treatment, 6 weeks post-operatively (C-III) Aztreonam (C-III)
		and then relay with fluoroquinolones <sup>c</sup> (C-III) for 6 weeks post-operatively (C-III)	and then relay with fluoroquinolones <sup>c</sup> for 6 weeks post-operatively (C-III)
		and then suppressive treatment <sup>d</sup> (C-III)	and then suppressive treatment <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Use of another narrower-spectrum  $\beta$ -lactam is possible based on the susceptibility testing data and following a specialist opinion.

<sup>b</sup> The dose of gentamicin is between 5 mg/kg/day and 8 mg/kg/day. Higher doses are preferable in the case of septic shock (B-III).

<sup>c</sup> The relay is done 15 days post-operatively in the case of good evolution. It can also be done earlier in the case of good evolution when aztreonam is used. If bacteria are resistant to fluoroquinolones and nalidixic acid, continue with  $\beta$ -lactam antibiotics for 6 weeks post-operatively (B-III).

<sup>d</sup> To be determined based on susceptibility testing and following a multidisciplinary opinion.

#### 4.5.2.2. Post-operative treatment.

4.5.2.2.1. *For optimal surgical treatment.* Combination therapy is continued, with the  $\beta$ -lactam selected pre-operatively being used in conjunction with ciprofloxacin or fosfomycin, depending on antibiotic susceptibility testing (C-III). This combination therapy is continued for  $\geq 3$  weeks, for a total of 6 weeks post-operatively (C-III).

4.5.2.2.2. *For suboptimal surgical treatment.* Multidisciplinary opinion (C-III).

### 4.6. Obligate anaerobic bacterial infections

#### 4.6.1. Rationale

Metronidazole, which is consistently active against obligate anaerobes, particularly *B. fragilis*, is the compound of choice. Its absorption and exceptional diffusion allow its use as oral monotherapy [149]. *Propionibacterium acnes*, which is naturally resistant to imidazole, is susceptible to amoxicillin. Surgery is essential because relapse when the prosthetic material is left in place is virtually systematic [150]. Clindamycin, in addition to the risk of *Clostridium difficile* colitis, does not have a satisfactory anti-anaerobic spectrum, particularly against *B. fragilis*, which limits its empirical prescription in cases of PVGI [149].

#### 4.6.2. Recommendations

4.6.2.1. *Pre-operative treatment.* Metronidazole is the first-line treatment for obligate anaerobic infections apart from *P. acnes*. It may be administered orally or intravenously (B-III). PVGIs caused by *P. acnes* are treated with intravenous amoxicillin (B-III). Monotherapy is sufficient (B-III).

#### 4.6.2.2. Post-operative treatment.

4.6.2.2.1. *For optimal surgical treatment.* The treatment is the same as pre-operative management (B-III). The total duration of treatment is 6 weeks (C-III).

4.6.2.2.2. *For suboptimal surgical treatment.* Suppressive oral amoxicillin treatment may be proposed for PVGIs caused by *P. acnes* and following a multidisciplinary opinion (C-III). For other obligate anaerobes such as *B. fragilis*, the possibility of suppressive treatment should be evaluated after multidisciplinary consultation (C-III).

### 4.7. Polymicrobial infections

Susceptibility testing should be performed for each of the isolated bacteria. Several compounds may sometimes be necessary to cover all of the bacteria considered pathogenic. A multidisciplinary opinion is necessary (B-III). The presence of obligate anaerobes does not require metronidazole if one of the combination antibiotics is already active on these bacteria (B-III).

## 5. Duration of treatment of bacterial prosthetic vascular graft infections and methods of administration

### 5.1. Rationale

Analysis of treatment duration from different studies is difficult to interpret because of: (i) the non-comparative nature of these studies; (ii) studies that do not include standardised durations or feature highly variable durations; and (iii) the use of a wide variety of compounds. In all of these studies, patients underwent surgery. The durations of antibiotic therapy are variable, ranging from 2 weeks after surgery [15,31] to 6 months [30], or even lifelong [22]. Many studies report durations of 6 weeks post-operatively [5,7,9,11–14,25,27,28,35,37] without the risk of relapse appearing greater than that encountered when the treatment period is longer.

This 6-week duration is the same as that proposed in the treatment of prosthetic valve endocarditis [34,82].

### 5.2. Recommendations

The total duration of post-operative antibiotic therapy proposed for PVGIs is 6 weeks for optimal surgical treatment (C-III). It should be administered parenterally. When using compounds with good bioavailability (rifampicin, fluoroquinolones), oral administration is possible.

## 6. Methods of administration of anti-infective agents

These methods are presented for normal renal and hepatic function in Table 3. In patients with renal or hepatic impairment, an adjustment may be required.

## 7. Suppressive antibiotic therapy

### 7.1. Rationale

In the absence of surgery, or in cases of suboptimal surgery, suppressive antibiotic therapy is administered. Its aim is to inhibit bacterial growth around the prosthesis, or what is left of it. By analogy with infections on osteoarticular material [151], it is assumed that in the stationary growth phase, bacteria remain on the material that cannot be eliminated by intensive antibiotic therapy. Even with very high dosage and very long duration, antibiotherapy alone is not supposed to cure PVGIs [152]. For instance, a recent study dealing with aortic endograft infection demonstrated that all of the patients who did not undergo endograft removal died during follow-up [49].

Suppressive treatment is only conceivable in the case of documented infection. In cases of periprosthetic abscess, radiological drainage should be performed if possible to reduce the bacterial inoculum as much as possible. No formal studies currently serve to validate this approach.

### 7.2. Recommendations

Suppressive antibiotic therapy is administered in the absence of surgery or in the case of suboptimal surgery (C-III). This antibiotic therapy will follow a 6-week period of intensive antibiotic therapy (B-III). It should therefore be easy to administer (orally), well tolerated and feasible as monotherapy. The choice of compound used should result from a multidisciplinary approach (B-III).

## 8. Specific case of fungal infection

### 8.1. Rationale

This essentially relates to yeast infections, such as *Candida*, in the context of bacterial co-infections. The therapeutic choice is made between amphotericin B derivatives (liposomal or lipid complex), azoles (mainly fluconazole) and echinocandins. The theoretical prerequisites are fungicidal treatment with activity preserved in the biofilm, anti-adhesion effect, proper dissemination to the infectious site and good tolerance. For this last reason, amphotericin B, which is nephrotoxic, is not recommended because of the frail nature of the patients.

Echinocandins have a good safety profile (including renal), in vitro fungicidal activity against yeasts, and good action in the case of existence of biofilm [153]. Their use is recommended by several scientific societies as a first-line treatment of moderate-to-severe infections [154]. One key disadvantage of using echinocandins is that they are available only for parenteral administration. There is a

restriction on the use of micafungin (risk of liver tumours observed in a mouse model).

## 8.2. Recommendations

Isolation of the fungus and antifungal susceptibility testing are essential. An echinocandin (caspofungin, micafungin or anidulafungin, if available) is used as a first-line treatment for 10 days post-operatively and/or 10 days after the last positive blood culture for *Candida* (C-III). If the strain is susceptible, if blood cultures are negative for  $\geq 10$  days and if the clinical situation has stabilised, an oral relay treatment with fluconazole may be taken on Day 10: loading dose of 800 mg on the first day followed by a one-time dose of 400–800 mg/day (B-III). The duration of treatment is  $\geq 6$  weeks post-operatively and 3 months in cases involving a periprosthetic abscess (C-III).

## 9. Conclusions

PVGIs are infections burdened with heavy rates of morbidity and mortality, the frequency of which are rising because of surgical advances and endovascular techniques that make it possible to implant an increasing number of prostheses. No data currently provide solid evidence regarding the antimicrobial therapy to be administered to patients suffering from PGVIs. A comprehensive literature review was therefore conducted. We hope that the proposals resulting from this analysis will help practitioners with regard to the care of these patients. It is increasingly vital to validate these proposals by means of further research investigating this issue, and we hope that the results of such studies will soon be available.

## Funding

This work was partly supported by a research grant from Novartis. Novartis had no role in the choice of the authors and had no access to the conclusions of the authors until the work was ended.

## Competing interests

MR received research grant from Novartis, payment for lectures from MSD and Pfizer, and support for travel to international meetings from MSD; FC received research grant from Novartis, research investigator honoraria from Cubist, MSD, Sanofi and Trius Therapeutics, payment for lectures from Novartis, Pfizer and Sanofi, and support for travel to international meetings from Astellas, Janssen, MSD, Novartis, Pfizer and Sanofi. All other authors declare no competing interests.

## Ethical approval

Not required.

## References

- [1] Darouiche RO. Treatment of infections associated with surgical implants. *N Engl J Med* 2004;350:1422–9.
- [2] FitzGerald SF, Kelly C, Humphreys H. Diagnosis and treatment of prosthetic aortic graft infections: confusion and inconsistency in the absence of evidence or consensus. *J Antimicrob Chemother* 2005;56:996–9.
- [3] Clagett GP. Clinical research and vascular surgery. The Society for Vascular Surgery Ad Hoc Committee on Clinical Research. *J Vasc Surg* 1992;15:867–8.
- [4] Haute Autorité de Santé (HAS). Elaboration de recommandations de bonne pratique. Méthode Recommandations par consensus formalisé. HAS; 2010.
- [5] Ehsan O, Gibbons CP. A 10-year experience of using femoro-popliteal vein for re-vascularisation in graft and arterial infections. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2009;38:172–9.
- [6] Batt M, Jean-Baptiste E, O'Connor S, Bouillanne PJ, Haudebourg P, Hassen-Khodja R, et al. In-situ revascularisation for patients with aortic graft infection: a single centre experience with silver coated polyester grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2008;36:182–8.
- [7] Armstrong PA, Back MR, Bandyk DF, Johnson BL, Shames ML. Selective application of sartorius muscle flaps and aggressive staged surgical debridement can influence long-term outcomes of complex prosthetic graft infections. *J Vasc Surg* 2007;46:71–8.
- [8] Mirzaie M, Schmitto JD, Tirilomis T, Fatehpur S, Liakopoulos OJ, Teucher N, et al. Surgical management of vascular graft infection in severely ill patients by partial resection of the infected prosthesis. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2007;33:610–3.
- [9] Illuminati G, Calio FG, D'Urso A, Giacobbi D, Papaspyropoulos V, Ceccane G. Infrascrotal, perineal, femorofemoral bypass for arterial graft infection at the groin. *Arch Surg* 2004;139:1314–9.
- [10] Gabriel M, Pukacki F, Dzieciuchowicz L, Oszkis G, Checinski P. Cryopreserved arterial allografts in the treatment of prosthetic graft infections. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004;27:590–6.
- [11] Kieffer E, Gomes D, Chiche L, Fléron MH, Koskas F, Bahni A. Allograft replacement for infrarenal aortic graft infection: early and late results in 179 patients. *J Vasc Surg* 2004;39:1009–17.
- [12] Batt M, Magne JL, Alric P, Muzj A, Ruotolo C, Ljungstrom KG, et al. In situ revascularization with silver-coated polyester grafts to treat aortic infection: early and midterm results. *J Vasc Surg* 2003;38:983–9.
- [13] Arbatli H, DeGeest R, Demirsoy E, Wellens F, Degrieck I, VanPraet F, et al. Management of infected grafts and mycotic aneurysms of the aorta using cryopreserved homografts. *Cardiovasc Surg* 2003;11:257–63.
- [14] Daenens K, Fourneau I, Nevelsteen A. Ten-year experience in autogenous reconstruction with the femoral vein in the treatment of aortofemoral prosthetic infection. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2003;25:240–5.
- [15] Matsuura JH, Rosenthal D, Wellons ED, Castronovo CS, Fronk D. Hemodialysis graft infections treated with cryopreserved femoral vein. *Cardiovasc Surg* 2002;10:561–5.
- [16] Vogt PR, Brunner-LaRocca HP, Lachat M, Ruef C, Turina MI. Technical details with the use of cryopreserved arterial allografts for aortic infection: influence on early and midterm mortality. *J Vasc Surg* 2002;35:80–6.
- [17] Leseche G, Castier Y, Petit MD, Bertrand P, Kitzis M, Mussot S, et al. Long-term results of cryopreserved arterial allograft reconstruction in infected prosthetic grafts and mycotic aneurysms of the abdominal aorta. *J Vasc Surg* 2001;34:616–22.
- [18] Bandyk DF, Novotney ML, Back MR, Johnson BL, Schmacht DC. Expanded application of in situ replacement for prosthetic graft infection. *J Vasc Surg* 2001;34:411–9, discussion 419–20.
- [19] Kieffer E, Sabatier J, Plissonnier D, Knosalla C. Prosthetic graft infection after descending thoracic/thoracoabdominal aortic aneurysmectomy: management with in situ arterial allografts. *J Vasc Surg* 2001;33:671–8.
- [20] Seeger JM, Pretus HA, Welborn MB, Ozaki CK, Flynn TC, Huber TS. Long-term outcome after treatment of aortic graft infection with staged extra-anatomic bypass grafting and aortic graft removal. *J Vasc Surg* 2000;32:451–9, discussion 460–1.
- [21] Hayes PD, Nasim A, London NJ, Sayers RD, Barrie WW, Bell PR, et al. In situ replacement of infected aortic grafts with rifampicin-bonded prostheses: the Leicester experience (1992 to 1998). *J Vasc Surg* 1999;30:92–8.
- [22] Coselli JS, Koksoy C, LeMaire SA. Management of thoracic aortic graft infections. *Ann Thorac Surg* 1999;67:1990–3, discussion 1997–8.
- [23] Vogt PR, Turina MI. Management of infected aortic grafts: development of less invasive surgery using cryopreserved homografts. *Ann Thorac Surg* 1999;67:1986–9, discussion 1997–8.
- [24] Vogt PR, Brunner-LaRocca HP, Carrel T, von Segesser LK, Ruef C, Debatin J, et al. Cryopreserved arterial allografts in the treatment of major vascular infection: a comparison with conventional surgical techniques. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;116:965–72.
- [25] Nevelsteen A, Feryn T, Lacroix H, Suy R, Goffin Y. Experience with cryopreserved arterial allografts in the treatment of prosthetic graft infections. *Cardiovasc Surg* 1998;6:378–83.
- [26] Fiorani P, Speziale F, Rizzo L, Taurino M, Giannoni MF, Lauri D. Long-term follow-up after in situ graft replacement in patients with aortofemoral graft infections. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997;14(Suppl A):111–4.
- [27] Sicard GA, Reilly JM, Doblaz M, Orgaz A, Rubin BG, Flye MW, et al. Autologous vein reconstruction in prosthetic graft infections. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997;14(Suppl A):93–8.
- [28] Nevelsteen A, Lacroix H, Suy R. Infrarenal aortic graft infection: in situ aortoiliac reconstruction with the lower extremity deep veins. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997;14(Suppl A):88–92.
- [29] Speziale F, Rizzo L, Sbarigia E, Giannoni MF, Massucci M, Maraglino C, et al. Bacterial and clinical criteria relating to the outcome of patients undergoing in situ replacement of infected abdominal aortic grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997;13:127–33.
- [30] Darling 3rd RC, Resnikoff M, Kreienberg PB, Chang BB, Paty PS, Leather RP, et al. Alternative approach for management of infected aortic grafts. *J Vasc Surg* 1997;25:106–12.
- [31] DiMuzio PJ, Reilly LM, Stoney RJ. Redo aortic grafting after treatment of aortic graft infection. *J Vasc Surg* 1996;24:328–35, discussion 336–7.
- [32] Ali AT, Modrall JG, Hocking J, Valentine RJ, Spencer H, Eid JF, et al. Long-term results of the treatment of aortic graft infection by in situ replacement with femoral popliteal vein grafts. *J Vasc Surg* 2009;50:30–9.

- [33] Legout L, Sarraz-Bournet B, D'Elia PV, Devos P, Pasquet A, Caillaux M, et al. Characteristics and prognosis in patients with prosthetic vascular graft infection: a prospective observational cohort study. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:352–8.
- [34] Antonios VS, Noel AA, Steckelberg JM, Wilson WR, Mandrekar JN, Harmsen WS, et al. Prosthetic vascular graft infection: a risk factor analysis using a case-control study. *J Infect* 2006;53:49–55.
- [35] Stone PA, Armstrong PA, Bandyk DF, Brumberg RS, Flaherty SK, Back MR, et al. Use of antibiotic-loaded polymethylmethacrylate beads for the treatment of extracavitary prosthetic vascular graft infections. *J Vasc Surg* 2006;44:757–61.
- [36] Pinocoy J, Albes JM, Wicke C, Ruck P, Ziemer G. Treatment of periprosthetic soft tissue infection of the groin following vascular surgical procedures by means of a polyvinyl alcohol-vacuum sponge system. *Wound Repair Regen* 2003;11:104–9.
- [37] Jensen LP, Nielsen OM, Jorgensen L, Lorentzen JE. Conservative treatment of vascular graft infections in the groin. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997;14(Suppl A):43–6.
- [38] Oderich GS, Bower TC, Hofer J, Kalra M, Duncan AA, Wilson JW, et al. In situ rifampin-soaked grafts with omental coverage and antibiotic suppression are durable with low reinfection rates in patients with aortic graft enteric erosion or fistula. *J Vasc Surg* 2011;53:99–106. 107.e1–7. discussion 106–7.
- [39] Roy D, Grove DI. Efficacy of long-term antibiotic suppressive therapy in proven or suspected infected abdominal aortic grafts. *J Infect* 2000;40:184–7.
- [40] Young RM, Cherry Jr KJ, Davis PM, Gloviczki P, Bower TC, Panneton JM, et al. The results of in situ prosthetic replacement for infected aortic grafts. *Am J Surg* 1999;178:136–40.
- [41] Legout L, D'Elia P, Devos P, Ettahar N, Sarraz-Bournet B, Haulon S, et al. Risk factors for methicillin-resistant staphylococcal vascular graft infection in an 11-year cohort study. *J Infect* 2012;64:441–4.
- [42] Szczoł M, Meybeck A, Legout L, Pasquet A, Van Grunderbeeck N, Langlois J, et al. Vascular graft infections in the intensive care unit: clinical spectrum and prognostic factors. *J Infect* 2011;62:204–11.
- [43] Töpel I, Audebert F, Betz T, Steinbauer MG. Microbial spectrum and primary resistance to rifampicin in infectious complications in vascular surgery: limits to the use of rifampicin-bonded prosthetic grafts. *Angiology* 2010;61:423–6.
- [44] Saleem BR, Meerwaldt R, Tielliu IF, Verhoeven EL, van den Dungen JJ, Zeebregts CJ. Conservative treatment of vascular prosthetic graft infection is associated with high mortality. *Am J Surg* 2010;200:47–52.
- [45] Torsello G, Sandmann W. Use of antibiotic-bonded grafts in vascular graft infection. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997;14(Suppl A):84–7.
- [46] Holdsworth J. Treatment of infective and potentially infective complications of vascular bypass grafting using gentamicin with collagen sponge. *Ann R Coll Surg Engl* 1999;81:166–70.
- [47] Gordon A, Conlon C, Collin J, Peto T, Gray D, Hands L, et al. An eight year experience of conservative management for aortic graft sepsis. *Eur J Vasc Surg* 1994;8:611–6.
- [48] Fatima J, Duncan AA, de Grandis E, Oderich GS, Kalra M, Gloviczki P, et al. Treatment strategies and outcomes in patients with infected aortic endografts. *J Vasc Surg* 2013;58:371–9.
- [49] Lyons OT, Patel AS, Saha P, Clough RE, Price N, Taylor PR. A 14-year experience with aortic endograft infection: management and results. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2013;46:306–13.
- [50] Maze MJ, Laws P, Buckenham T, Pithie A, Gallagher K, Metcalf S, et al. Outcomes of infected abdominal aortic grafts managed with antimicrobial therapy and graft retention in an unselected cohort. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2013;45:373–80.
- [51] Blaser J, Vergeres P, Widmer AF, Zimmerli W. In vivo verification of in vitro model of antibiotic treatment of device-related infection. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1134–9.
- [52] Cirioni O, Mocchegiani F, Ghiselli R, Silvestri C, Gabrielli E, Marchionni E, et al. Daptomycin and rifampin alone and in combination prevent vascular graft biofilm formation and emergence of antibiotic resistance in a subcutaneous rat pouch model of staphylococcal infection. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2010;40:817–22.
- [53] Gao H, Sandermann J, Prag J, Lund L, Lindholt JS. Rifampicin-soaked silver polyester versus expanded polytetrafluoro-ethylene grafts for in situ replacement of infected grafts in a porcine randomised controlled trial. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2012;43:582–7.
- [54] Baldoni D, Haschke M, Rajacic Z, Zimmerli W, Trampuz A. Linezolid alone or combined with rifampin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in experimental foreign-body infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:1142–8.
- [55] Richards JJ, Melander C. Controlling bacterial biofilms. *ChemBiochem* 2009;10:2287–94.
- [56] Stewart PS, Franklin MJ. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* 2008;6:199–210.
- [57] Otto M. *Staphylococcus epidermidis*—the 'accidental' pathogen. *Nat Rev Microbiol* 2009;7:555–67.
- [58] Edmiston Jr CE, Goheen MP, Seabrook GR, Johnson CP, Lewis BD, Brown KR, et al. Impact of selective antimicrobial agents on staphylococcal adherence to biomedical devices. *Am J Surg* 2006;192:344–54.
- [59] Chuard C, Herrmann M, Vaudaux P, Waldvogel FA, Lew DP. Successful therapy of experimental chronic foreign-body infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by antimicrobial combinations. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:2611–6.
- [60] Saginur R, Stdenis M, Ferris W, Aaron SD, Chan F, Lee C, et al. Multiple combination bactericidal testing of staphylococcal biofilms from implant-associated infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:55–61.
- [61] Zimmerli W, Frei R, Widmer AF, Rajacic Z. Microbiological tests to predict treatment outcome in experimental device-related infections due to *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 1994;33:959–67.
- [62] Schwank S, Rajacic Z, Zimmerli W, Blaser J. Impact of bacterial biofilm formation on in vitro and in vivo activities of antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:895–8.
- [63] Tang HJ, Chen CC, Cheng KC, Wu KY, Lin YC, Zhang CC, et al. In vitro efficacies and resistance profiles of rifampin-based combination regimens for biofilm-embedded methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:5717–20.
- [64] Tang HJ, Chen CC, Cheng KC, Toh HS, Su BA, Chiang SR, et al. In vitro efficacy of fosfomycin-containing regimens against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in biofilms. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:944–50.
- [65] Stewart PS, Davison WM, Steenbergen JN. Daptomycin rapidly penetrates a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:3505–7.
- [66] Murillo O, Garrigos C, Pachon ME, Euba G, Verdaguier R, Cabellos C, et al. Efficacy of high doses of daptomycin versus alternative therapies against experimental foreign-body infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:4252–7.
- [67] Barbier F, Ruppe E, Hernandez D, Lebeaux D, Francois P, Felix B, et al. Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in the community: high homology of SCCmec IVa between *Staphylococcus epidermidis* and major clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 2010;202:270–81.
- [68] Cremonter J, Slassi A, Quincampoix JC, Sivadon-Tardy V, Bauer T, Porcher R, et al. Decreased susceptibility to teicoplanin and vancomycin in coagulase-negative staphylococci isolated from orthopedic-device-associated infections. *J Clin Microbiol* 2010;48:1428–31.
- [69] Liakopoulos A, Neocleous C, Klapsa D, Kanellopoulou M, Spiliopoulou I, Mathiopoulos KD, et al. A T2504A mutation in the 23S rRNA gene responsible for high-level resistance to linezolid of *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother* 2009;64:206–7.
- [70] Lodise TP, Patel N, Lomaestro BM, Rodvold KA, Drusano GL. Relationship between initial vancomycin concentration-time profile and nephrotoxicity among hospitalized patients. *Clin Infect Dis* 2009;49:507–14.
- [71] Gould IM, Cauda R, Esposito S, Gudiol F, Mazzei T, Garau J. Management of serious methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: what are the limits? *Int J Antimicrob Agents* 2011;37:202–9.
- [72] ONERBA. Annual report 2009–2010. Vivactis Plus; 2011.
- [73] Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 2011;17:1791–8.
- [74] Habib G, Hoen B, Tornos P, Thuny F, Prendergast B, Vilacosta I, et al. Guidelines on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis (new version 2009): the Task Force on the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) and the International Society of Chemotherapy (ISC) for Infection and Cancer. *Eur Heart J* 2009;30:2369–413.
- [75] Gould FK, Denning DW, Elliott TS, Foweraker J, Perry JD, Prendergast BD, et al. Guidelines for the diagnosis and antibiotic treatment of endocarditis in adults: a report of the Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:269–89.
- [76] Baddour LM, Epstein AE, Erickson CC, Knight BP, Levison ME, Lockhart PB, et al. Update on cardiovascular implantable electronic device infections and their management: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 2010;121:458–77.
- [77] Ryan SV, Calligaro KD, Scharff J, Dougherty MJ. Management of infected prosthetic dialysis arteriovenous grafts. *J Vasc Surg* 2004;39:73–8.
- [78] Tokars JJ, Miller ER, Stein G. New national surveillance system for hemodialysis-associated infections: initial results. *Am J Infect Control* 2002;30:288–95.
- [79] Schutte WP, Helmer SD, Salazar L, Smith JL. Surgical treatment of infected prosthetic dialysis arteriovenous grafts: total versus partial graft excision. *Am J Surg* 2007;193:385–8, discussion 388.
- [80] Korzeniowski O, Sande MA. Combination antimicrobial therapy for *Staphylococcus aureus* endocarditis in patients addicted to parenteral drugs and in nonaddicts: a prospective study. *Ann Intern Med* 1982;97:496–503.
- [81] Chang FY, MacDonald BB, Peacock Jr JE, Musher DM, Triplett P, Mylotte JM, et al. A prospective multicenter study of *Staphylococcus aureus* bacteremia: incidence of endocarditis, risk factors for mortality, and clinical impact of methicillin resistance. *Medicine (Baltimore)* 2003;82:322–32.
- [82] Chu VH, Miro JM, Hoen B, Cabell CH, Pappas PA, Jones P, et al. International Collaboration on Endocarditis—Prospective Cohort Study Group. Coagulase-negative staphylococcal prosthetic valve endocarditis—a contemporary update based on the International Collaboration on Endocarditis: prospective cohort study. *Heart* 2009;95:570–6.
- [83] Afssaps. Recommandations pour l'antibiothérapie par voie générale en pratique courante dans les infections respiratoires hautes de l'adulte et de l'enfant; 2005.

- [84] Pichichero ME. A review of evidence supporting the American Academy of Pediatrics recommendation for prescribing cephalosporin antibiotics for penicillin-allergic patients. *Pediatrics* 2005;115:1048–57.
- [85] Robinson JL, Hameed T, Carr S. Practical aspects of choosing an antibiotic for patients with a reported allergy to an antibiotic. *Clin Infect Dis* 2002;35:26–31.
- [86] Fowler Jr VG, Kong LK, Corey GR, Gottlieb GS, McClelland RS, Sexton DJ, et al. Recurrent *Staphylococcus aureus* bacteremia: pulsed-field gel electrophoresis findings in 29 patients. *J Infect Dis* 1999;179:1157–61.
- [87] Levine DP, Fromm BS, Reddy BR. Slow response to vancomycin or vancomycin plus rifampin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Ann Intern Med* 1991;115:674–80.
- [88] Stryjewski ME, Szczech LA, Benjamin Jr DK, Inrig JK, Kanafani ZA, Engemann JJ, et al. Use of vancomycin or first-generation cephalosporins for the treatment of hemodialysis-dependent patients with methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis* 2007;44:190–6.
- [89] Nannini EC, Singh KV, Murray BE. Relapse of type A  $\beta$ -lactamase-producing *Staphylococcus aureus* native valve endocarditis during cefazolin therapy: revisiting the issue. *Clin Infect Dis* 2003;37:1194–8.
- [90] Steckelberg JM, Rouse MS, Tallan BM, Osmon DR, Henry NK, Wilson WR. Relative efficacies of broad-spectrum cephalosporins for treatment of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* experimental infective endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:554–8.
- [91] Fridkin SK, Hageman J, McDougal LK, Mohammed J, Jarvis WR, Perl TM, et al. Epidemiological and microbiological characterization of infections caused by *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin, United States, 1997–2001. *Clin Infect Dis* 2003;36:429–39.
- [92] Moore MR, Perdreau-Remington F, Chambers HF. Vancomycin treatment failure associated with heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a patient with endocarditis and in the rabbit model of endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:1262–6.
- [93] Afssaps. Mise au point sur le bon usage des aminosides administrés par voie injectable: gentamicine, tobramycine, netilmicine, amikacine; 2011.
- [94] Cosgrove SE, Vigiiani GA, Fowler Jr VG, Abrutyn E, Corey GR, Levine DP, et al. Initial low-dose gentamicin for *Staphylococcus aureus* bacteremia and endocarditis is nephrotoxic. *Clin Infect Dis* 2009;48:713–21.
- [95] John MD, Hibberd PL, Karchmer AW, Sleeper LA, Calderwood SB. *Staphylococcus aureus* prosthetic valve endocarditis: optimal management and risk factors for death. *Clin Infect Dis* 1998;26:1302–9.
- [96] Whitener C, Caputo GM, Weitekamp MR, Karchmer AW. Endocarditis due to coagulase-negative staphylococci. Microbiologic, epidemiologic, and clinical considerations. *Infect Dis Clin North Am* 1993;7:81–96.
- [97] Senneville E, Joulie D, Legout L, Valette M, Dezeque H, Beltrand E, et al. Outcome and predictors of treatment failure in total hip/knee prosthetic joint infections due to *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 2011;53:334–40.
- [98] Riedel DJ, Weekes E, Forrest GN. Addition of rifampin to standard therapy for treatment of native valve infective endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:2463–7.
- [99] Mascio CT, Alder JD, Silverman JA. Bactericidal action of daptomycin against stationary-phase and nondividing *Staphylococcus aureus* cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:4255–60.
- [100] Fowler Jr VG, Boucher HW, Corey GR, Abrutyn E, Karchmer AW, Rupp ME, et al. Daptomycin versus standard therapy for bacteremia and endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med* 2006;355:653–65.
- [101] Marty FM, Yeh WW, Wennersten CB, Venkataraman L, Albano E, Alyea EP, et al. Emergence of a clinical daptomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate during treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia and osteomyelitis. *J Clin Microbiol* 2006;44:595–7.
- [102] Benvenuto M, Benziger DP, Yankelev S, Vigiiani G. Pharmacokinetics and tolerability of daptomycin at doses up to 12 milligrams per kilogram of body weight once daily in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:3245–9.
- [103] Figueroa DA, Mangini E, Amodio-Groton M, Vardianos B, Melchert A, Fana C, et al. Safety of high-dose intravenous daptomycin treatment: three-year cumulative experience in a clinical program. *Clin Infect Dis* 2009;49:177–80.
- [104] Patel JB, Jevitt LA, Hageman J, McDonald LC, Tenover FC. An association between reduced susceptibility to daptomycin and reduced susceptibility to vancomycin in *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 2006;42:1652–3.
- [105] Moise PA, Smyth DS, El-Fawal N, Robinson DA, Holden PN, Forrest A, et al. Microbiological effects of prior vancomycin use in patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:85–90.
- [106] Durante-Mangoni E, Casillo R, Bernardo M, Caianiello C, Mattucci I, Pinto D, et al. High-dose daptomycin for cardiac implantable electronic device-related infective endocarditis. *Clin Infect Dis* 2012;54:347–54.
- [107] Furustrand Täfni U, Majic I, Zalila Belkhdja C, Betrisey B, Corvec S, Zimmerli W, et al. Gentamicin improves the activities of daptomycin and vancomycin against *Enterococcus faecalis* in vitro and in an experimental foreign-body infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:4821–7.
- [108] Saleh-Mghir A, Muller-Serieys C, Dinh A, Massias L, Cremieux AC. Adjunctive rifampin is crucial to optimizing daptomycin efficacy against rabbit prosthetic joint infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:4589–93.
- [109] Baddour LM. Infective endocarditis caused by  $\beta$ -hemolytic streptococci. The Infectious Diseases Society of America's Emerging Infections Network. *Clin Infect Dis* 1998;26:66–71.
- [110] Lefort A, Lortholary O, Casassus P, Selton-Suty C, Guillemin L, Mainardi JL, et al. Comparison between adult endocarditis due to  $\beta$ -hemolytic streptococci (serogroups A, B, C, and G) and *Streptococcus milleri*: a multicenter study in France. *Arch Intern Med* 2002;162:2450–6.
- [111] Sambola A, Miro JM, Tornos MP, Almirante B, Moreno-Torrico A, Gurgui M, et al. *Streptococcus agalactiae* infective endocarditis: analysis of 30 cases and review of the literature, 1962–1998. *Clin Infect Dis* 2002;34:1576–84.
- [112] Buchholtz K, Larsen CT, Hassager C, Bruun NE. Severity of gentamicin's nephrotoxic effect on patients with infective endocarditis: a prospective observational cohort study of 373 patients. *Clin Infect Dis* 2009;48:65–71.
- [113] Falagas ME, Matthaiou DK, Bliziotis IA. The role of aminoglycosides in combination with a  $\beta$ -lactam for the treatment of bacterial endocarditis: a meta-analysis of comparative trials. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:639–47.
- [114] Francioli P, Etienne J, Hoigne R, Thys JP, Gerber A. Treatment of streptococcal endocarditis with a single daily dose of ceftriaxone sodium for 4 weeks. Efficacy and outpatient treatment feasibility. *JAMA* 1992;267:264–7.
- [115] Darras-Joly C, Bedos JP, Sauve C, Moine P, Vallee E, Carbon C, et al. Synergy between amoxicillin and gentamicin in combination against a highly penicillin-resistant and -tolerant strain of *Streptococcus pneumoniae* in a mouse pneumonia model. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:2147–51.
- [116] Swingle HM, Bucciarelli RL, Ayoub EM. Synergy between penicillins and low concentrations of gentamicin in the killing of group B streptococci. *J Infect Dis* 1985;152:515–20.
- [117] Dressel DC, Tornatore-Reuscher MA, Boschman CR, Stosor V, Zembower T, Pospelnick MJ, et al. Synergistic effect of gentamicin plus ampicillin on enterococci with differing sensitivity to gentamicin: a phenotypic assessment of NCCLS guidelines. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999;35:219–25.
- [118] Winstanley TG, Hastings JG. Synergy between penicillin and gentamicin against enterococci. *J Antimicrob Chemother* 1990;25:551–60.
- [119] Olaison L, Schadewitz K; Swedish Society of Infectious Diseases Quality Assurance Study Group for Endocarditis. Enterococcal endocarditis in Sweden, 1995–1999: can shorter therapy with aminoglycosides be used? *Clin Infect Dis* 2002;34:159–66.
- [120] Gavalda J, Torres C, Tenorio C, López P, Zaragoza M, Capdevila JA, et al. Efficacy of ampicillin plus ceftriaxone in treatment of experimental endocarditis due to *Enterococcus faecalis* strains highly resistant to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:639–46.
- [121] Gavalda J, Onrubia PL, Gómez MT, Gomis X, Ramírez JL, Len O, et al. Efficacy of ampicillin combined with ceftriaxone and gentamicin in the treatment of experimental endocarditis due to *Enterococcus faecalis* with no high-level resistance to aminoglycosides. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:514–7.
- [122] Gavalda J, Len O, Miró JM, Muñoz P, Montejo M, Alarcón A, et al. Brief communication: treatment of *Enterococcus faecalis* endocarditis with ampicillin plus ceftriaxone. *Ann Intern Med* 2007;146:574–9.
- [123] Fernández-Hidalgo N, Almirante B, Gavalda J, Gurgui M, Peña C, de Alarcón A, et al. Ampicillin plus ceftriaxone is as effective as ampicillin plus gentamicin for treating *Enterococcus faecalis* infective endocarditis. *Clin Infect Dis* 2013;56:1261–8.
- [124] Arias CA, Mendes RE, Stilwell MG, Jones RN, Murray BE. Unmet needs and prospects for oritavancin in the management of vancomycin-resistant enterococcal infections. *Clin Infect Dis* 2012;54(Suppl 3):S233–8.
- [125] Wareham DW, Abbas H, Karcher AM, Das SS. Treatment of prosthetic valve infective endocarditis due to multi-resistant Gram-positive bacteria with linezolid. *J Infect* 2006;52:300–4.
- [126] Archuleta S, Murphy B, Keller MJ. Successful treatment of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* endocarditis with linezolid in a renal transplant recipient with human immunodeficiency virus infection. *Transpl Infect Dis* 2004;6:117–9.
- [127] Berdal JE, Eskesen A. Short-term success, but long-term treatment failure with linezolid for enterococcal endocarditis. *Scand J Infect Dis* 2008;40:765–6.
- [128] Tsigrelis C, Singh KV, Coutinho TD, Murray BE, Baddour LM. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* endocarditis: linezolid failure and strain characterization of virulence factors. *J Clin Microbiol* 2007;45:631–5.
- [129] Vouillamoz J, Moreillon P, Giddey M, Entenza JM. Efficacy of daptomycin in the treatment of experimental endocarditis due to susceptible and multidrug-resistant enterococci. *J Antimicrob Chemother* 2006;58:1208–14.
- [130] Cunha BA, Mickail N, Eisenstein L. *E. faecalis* vancomycin-sensitive enterococcal bacteremia unresponsive to a vancomycin tolerant strain successfully treated with high-dose daptomycin. *Heart Lung* 2007;36:456–61.
- [131] Schwartz BS, Ngo PD, Guglielmo BJ. Daptomycin treatment failure for vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infective endocarditis: impact of protein binding? *Ann Pharmacother* 2008;42:289–90.
- [132] Hidron AI, Schuetz AN, Nolte FS, Gould CV, Osborn MK. Daptomycin resistance in *Enterococcus faecalis* prosthetic valve endocarditis. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:1394–6.
- [133] Rand KH, Houck H. Daptomycin synergy with rifampicin and ampicillin against vancomycin-resistant enterococci. *J Antimicrob Chemother* 2004;53:530–2.
- [134] Rand KH, Houck HJ, Silverman JA. Daptomycin-reversible rifampicin resistance in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:1017–20.



- [135] Gallagher JC, Perez ME, Marino EA, LoCastro LG, Abrardo LA, MacDougall C. Daptomycin therapy for vancomycin-resistant enterococcal bacteremia: a retrospective case series of 30 patients. *Pharmacotherapy* 2009;29:792–9.
- [136] Balli EP, Venetis CA, Miyakis S. Systematic review and meta-analysis of linezolid versus daptomycin for treatment of vancomycin-resistant enterococcal bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:734–9.
- [137] Tamma PD, Cosgrove SE, Maragakis LL. Combination therapy for treatment of infections with Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev* 2012;25:450–70.
- [138] Bliziotis IA, Michalopoulos A, Kasiakou SK, Samonis G, Christodoulou C, Chrysanthopoulou S, et al. Ciprofloxacin vs an aminoglycoside in combination with a  $\beta$ -lactam for the treatment of febrile neutropenia: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Mayo Clin Proc* 2005;80:1146–56.
- [139] Bliziotis IA, Samonis G, Vardakas KZ, Chrysanthopoulou S, Falagas ME. Effect of aminoglycoside and  $\beta$ -lactam combination therapy versus  $\beta$ -lactam monotherapy on the emergence of antimicrobial resistance: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Clin Infect Dis* 2005;41:149–58.
- [140] Al-Hasan MN, Wilson JW, Lahr BD, Thomsen KM, Eckel-Passow JE, Vetter EA, et al.  $\beta$ -Lactam and fluoroquinolone combination antibiotic therapy for bacteremia caused by Gram-negative bacilli. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:1386–94.
- [141] Marcus R, Paul M, Elphick H, Leibovici L. Clinical implications of  $\beta$ -lactam-aminoglycoside synergism: systematic review of randomised trials. *Int J Antimicrob Agents* 2011;37:491–503.
- [142] Paul M, Silbiger I, Grozinsky S, Soares-Weiser K, Leibovici L.  $\beta$  Lactam antibiotic monotherapy versus  $\beta$  lactam-aminoglycoside antibiotic combination therapy for sepsis. *Cochrane Database Syst Rev* 2006:CD003344.
- [143] Korvick JA, Bryan CS, Farber B, Beam Jr TR, Schenfeld L, Muder RR, et al. Prospective observational study of *Klebsiella* bacteremia in 230 patients: outcome for antibiotic combinations versus monotherapy. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:2639–44.
- [144] Chow JW, Fine MJ, Shlaes DM, Quinn JP, Hooper DC, Johnson MP, et al. *Enterobacter* bacteremia: clinical features and emergence of antibiotic resistance during therapy. *Ann Intern Med* 1991;115:585–90.
- [145] Bodey GP, Jadeja L, Elting L. *Pseudomonas* bacteremia. Retrospective analysis of 410 episodes. *Arch Intern Med* 1985;145:1621–9.
- [146] Hilf M, Yu VL, Sharp J, Zuravleff JJ, Korvick JA, Muder RR. Antibiotic therapy for *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: outcome correlations in a prospective study of 200 patients. *Am J Med* 1989;87:540–6.
- [147] Vidal F, Mensa J, Almela M, Martinez JA, Marco F, Casals C, et al. Epidemiology and outcome of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia, with special emphasis on the influence of antibiotic treatment. Analysis of 189 episodes. *Arch Intern Med* 1996;156:2121–6.
- [148] Siegman-Igra Y, Ravona R, Primerman H, Giladi M. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: an analysis of 123 episodes, with particular emphasis on the effect of antibiotic therapy. *Int J Infect Dis* 1998;2:211–5.
- [149] Nagy E, Urbaán E, Nord CE; ESCMID Study Group on Antimicrobial Resistance in Anaerobic Bacteria. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe: 20 years of experience. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:371–9.
- [150] Sohail MR, Gray AL, Baddour LM, Tleyjeh IM, Virk A. Infective endocarditis due to *Propionibacterium* species. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:387–94.
- [151] Segreti J, Nelson JA, Trenholme GM. Prolonged suppressive antibiotic therapy for infected orthopedic prostheses. *Clin Infect Dis* 1998;27:711–3.
- [152] Moulakakis KG, Mylonas SN, Antonopoulos CN, Kakis JD, Sfyroeras GS, Mantas G, et al. Comparison of treatment strategies for thoracic endograft infection. *J Vasc Surg* 2014;60:1061–71.
- [153] Uppuluri P, Srinivasan A, Ramasubramanian A, Lopez-Ribot JL. Effects of fluconazole, amphotericin B, and caspofungin on *Candida albicans* biofilms under conditions of flow and on biofilm dispersion. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:3591–3.
- [154] Cornely OA, Bassetti M, Calandra T, Garbino J, Kullberg BJ, Lortholary O, et al., ESCMID Fungal Infection Study Group. ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clin Microbiol Infect* 2012;18(Suppl 7):19–37.

## 5. Conclusion de cette revue de la littérature

On peut résumer la première partie de ce mémoire de cette façon:

- Les IPV sont des infections grevées d'une lourde morbi-mortalité et non exceptionnelles ;
- Leur prise en charge n'est pour l'instant pas standardisée et ne fait l'objet d'aucune recommandation consensuelle;
- L'analyse de la littérature existante, si elle nous apporte quelques informations, ne permet pas de tirer de conclusions définitives en ce qui concerne l'antibiothérapie des IPV ;
- L'obtention de nouvelles informations concernant la prise en charge de ces infections est donc particulièrement importante ;
- L'utilisation de modèles expérimentaux s'intéressant spécifiquement aux IPV peut être la première étape vers une meilleure connaissance et donc une prise en charge des IPV améliorée.

## **Données expérimentales**

## 1. Objectifs

Nous nous intéresserons dorénavant aux infections à *S. aureus*, puisque, comme nous l'avons vu plus haut, il s'agit de l'espèce bactérienne la plus fréquemment rencontrée en cas d'IPV.

Les objectifs de ce travail sont :

- De mettre au point un modèle expérimental d'infection de matériel vasculaire (IMV) en Dacron® à *S. aureus* chez la souris permettant l'évaluation de différents protocoles antibiotiques thérapeutiques ;
- De comparer différents protocoles thérapeutiques dans ce modèle d'infection à *S. aureus* ;
- De comprendre, par visualisation directe des effets au sein du biofilm des différents antibiotiques utilisés, les différences constatées ;

## 2. Infection de matériel vasculaire à *S. aureus*

### 2.1. Mise au point du modèle

#### 2.1.1. Matériels et méthodes

La procédure générale est schématisée par la figure 7, page 47.

## **Animaux utilisés**

Souris Swiss femelles âgées de 4 semaines, pesant 20 à 24 g à leur arrivée dans le laboratoire et obtenues auprès du laboratoire Janvier à St Berthevin, France (RjOrl/SWISS). Les souris sont acclimatées une semaine au laboratoire avant que ne débutent les expérimentations. Elles ont libre accès à l'eau et à leur nourriture et sont maintenues dans un cycle de 12 heures lumière/obscurité. Leur bien être est vérifié une fois par jour au minimum tout au long de leur séjour au laboratoire.

Toutes les procédures et expérimentations ont été réalisées selon la directive 2010/63/UE<sup>a</sup> de l'union européenne retranscrite en droit national par le décret n° 2013-118<sup>b</sup> publié le 1<sup>er</sup> février 2013. Ces procédures, comme toutes celles qui suivront, ont été validées par le comité d'éthique animale de la région Pays de Loire et ont été adressées au ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche selon la réglementation en vigueur.

## **Souches bactériennes utilisées**

Les différentes étapes de mise au point du modèle ont été réalisées à l'aide d'une souche clinique de SARM, appelée BCB8, issue d'un patient présentant une bactériémie. Cette souche est bien connue du laboratoire et avait déjà été utilisée à de multiples reprises dans des modèles murins.

Une fois le modèle mis au point pour cette souche, d'autres souches bactériennes ont été testées pour démontrer sa bonne reproductibilité.

Au final, ont donc été utilisées pour ce modèle:

- 3 souches de SARM :
  - BCB8 : souche clinique issue d'une bactériémie
  - 117 : souche clinique issue également d'une bactériémie
  - 33 591 : souche de collection ATCC pour American Type Culture Collection
- 3 souches de SAMS :
  - 171 : souche clinique issue d'une bactériémie

---

<sup>a</sup><http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010L0063&from=FR>

<sup>b</sup><http://www.legifrance.gouv.fr/eli/decret/2013/2/1/AGR1231951D/jo>

- 176 : de même, une souche clinique issue d'une bactériémie
- 27 217 : souche de collection ATCC

Ces souches sont conservées au laboratoire à l'aide de cryotubes conservés à -80°C. Avant chaque utilisation expérimentale, les souches sont décongelées et repiquées 3 fois avec 24 heures d'intervalle entre chaque repiquage, sur milieu gélosé Trypticase-Soja (TS ; Difco<sup>®</sup>, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France).

### Matériel vasculaire

Des prothèses vasculaires en Dacron<sup>®</sup> utilisées en pratique clinique quotidienne (Cardial<sup>™</sup>, Bard, Saint-Etienne, France), sont découpées en patch de forme carrée mesurant 1 x 1 cm. Ces patches sont ensuite stérilisés à l'autoclave.

Trois étapes successives ont été nécessaires à la mise au point du modèle :

- Implantation d'un patch de Dacron<sup>®</sup> stérilisé, « nu »
- Implantation d'un patch de Dacron<sup>®</sup> stérilisé incubé avec du sérum de souris Swiss :
  - Le sang des souris est prélevé de manière stérile à l'aide d'une seringue à insuline par ponction intracardiaque dans un microtube contenant 0,4 µL d'héparine à 25 000 UI/5mL (Héparine Choay<sup>®</sup>, Sanofi-Aventis, Paris, France) pour 1 mL de sang ;
  - Les souris utilisées pour ces prélèvements sont des souris Swiss femelles, réformées, n'ayant pas subies d'expérimentation. Elles sont anesthésiées par isoflurane (0.8 L/min, 3%) puis euthanasiées encore endormies par dislocation cervicale selon la recommandation européenne 2010/63/UE ;
  - Le sang est ensuite centrifugé à 5000 tr/min pendant 10 minutes à 4°C ;
  - Le sérum est alors prélevé puis filtré à 0,2 µm ;
  - Il est conservé à -20°C jusqu'à utilisation ;
  - Les patches de Dacron<sup>®</sup> stériles sont incubés 24 heures dans ce sérum (1mL pour 10 patches), sous agitation, à 37°C ;

- La stérilité du sérum utilisé est vérifiée par mise en culture de 50 µL sur gélose TS, 48 heures à 37°C. Une première lecture de cette gélose est réalisée à 24 heures, délai correspondant à la fin de l'incubation du Dacron® dans le sérum.
- Implantation d'un Dacron® incubé avec une solution de staphylocoques :
  - Un inoculum bactérien calibré à 10<sup>8</sup> UFC/mL de *S. aureus* est préparé (UFC : Unité Formant Colonie) dans du bouillon de Mueller-Hinton (BMH);
  - La souche utilisée pour cet inoculum est la même que celle utilisée ensuite pour l'infection ;
  - Le Dacron® stérile est alors plongé dans ce bouillon (10 mL pour 20 patches) et incubé 24 heures sous agitation à 37°C.

### Procédures chirurgicales

Les animaux sont anesthésiés avec de la kétamine (70 mg/kg, Imalgène™ 100 mg/mL, Merial SAS, Villeurbanne, France) et xylazine (10 mg/kg, Rompun™, Bayer DVM, Puteaux, France) injectées par voie intra-péritonéale.

Après désinfection soigneuse de la peau de l'animale, une incision longitudinale de 1 cm est réalisée de manière stérile au niveau de la partie médiane du dos de la souris. Une poche sous-cutanée est ainsi réalisée. Un patch de Dacron® (« nu » pour les premières expériences puis incubé avec du sérum de souris ou avec la solution de *S. aureus*) est alors implanté. La peau est suturée de manière stérile (Vicryl 5/0). Au moins 4 animaux sont utilisés par condition. Les expérimentations ont été réalisées en duplicate.

### Infection du matériel

Deux jours après cette implantation, une solution de sérum physiologique NaCl 0,9% (0,2 mL) contenant 10<sup>7</sup> UFC de *S. aureus* est inoculée sur la surface du Dacron® à l'aide d'une seringue tuberculique. Ce délai de 48 heures est nécessaire pour obtenir une cicatrisation

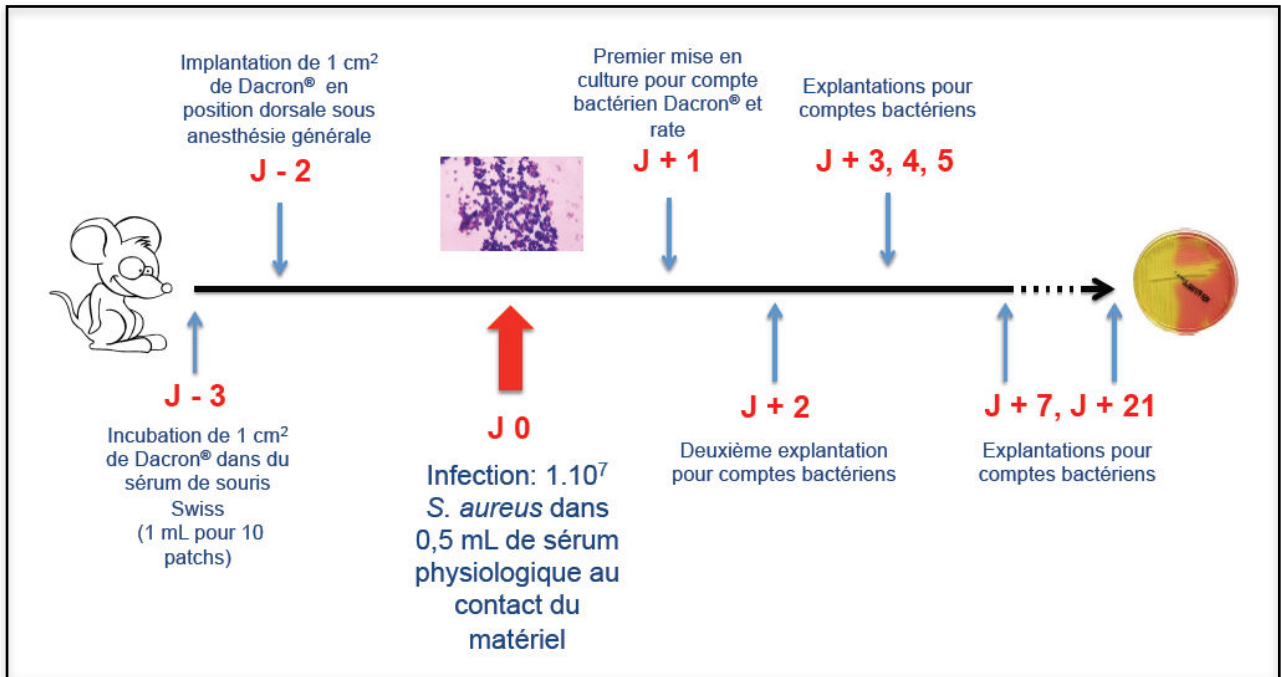
suffisante de l'incision d'implantation et éviter la fuite de l'inoculum au travers de la peau. Durant cette inoculation, les souris sont anesthésiées par de l'isoflurane (0.8 L/min, 3%).

### Comptes bactériens

Pour cette partie, des comptes bactériens ont été réalisés 24 et 48 heures, puis à 3, 4, 5, 7 et 21 jours après inoculation. Pour ce faire, les souris sont euthanasiées par inhalation d'isoflurane complétée par une dislocation cervicale. Le Dacron<sup>®</sup> est alors retiré de manière stérile après désinfection soigneuse de la peau de l'animal et mis en suspension dans 0,5 mL de sérum physiologique vortexé pendant 30 secondes. Cinquante µL de la solution obtenue sont mis en culture sur gélose TS et gélose Chapman (BD Mannitol Salt Agar<sup>®</sup>, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) à 37°C avec lecture réalisée à 48 heures et 5 jours. Une sonication des patches toujours en suspension est ensuite réalisée (35 kHz pendant 5 minutes, Aquasonic sonicator<sup>®</sup>). On reprend de nouveau 50 µL pour mise en culture selon les mêmes procédures. Les résultats sont exprimés en UFC/cm<sup>2</sup> de Dacron<sup>®</sup> (moyenne +/- écarts-types)

La rate de chaque souris est également prélevée de manière stérile et homogénéisée dans 1 mL de sérum physiologique. Après broyage, une mise en culture est réalisée selon la même procédure. Les souris pour lesquelles la culture de rate revient positive à *S. aureus* sont considérées comme étant bactériémiques. Les résultats sont exprimés pour cette partie en UFC/mL.





**Figure 7.** Mise au point du modèle d'infection de matériel vasculaire à *S. aureus*  
Cette figure représente le modèle avec Dacron® incubé avec du sérum de souris

### 2.1.2. Résultats

Quelles que soient les conditions, il n'y a pas de différence entre les comptes bactériens réalisés avant ou après sonication. De même, ces comptes bactériens sont identiques après 48 heures ou après 5 jours de culture. Les résultats après 5 jours de culture n'ont notamment jamais montré « d'apparition » de colonies d'autres espèces bactériennes que celles inoculées initialement, témoins de l'absence de surinfection du matériel.

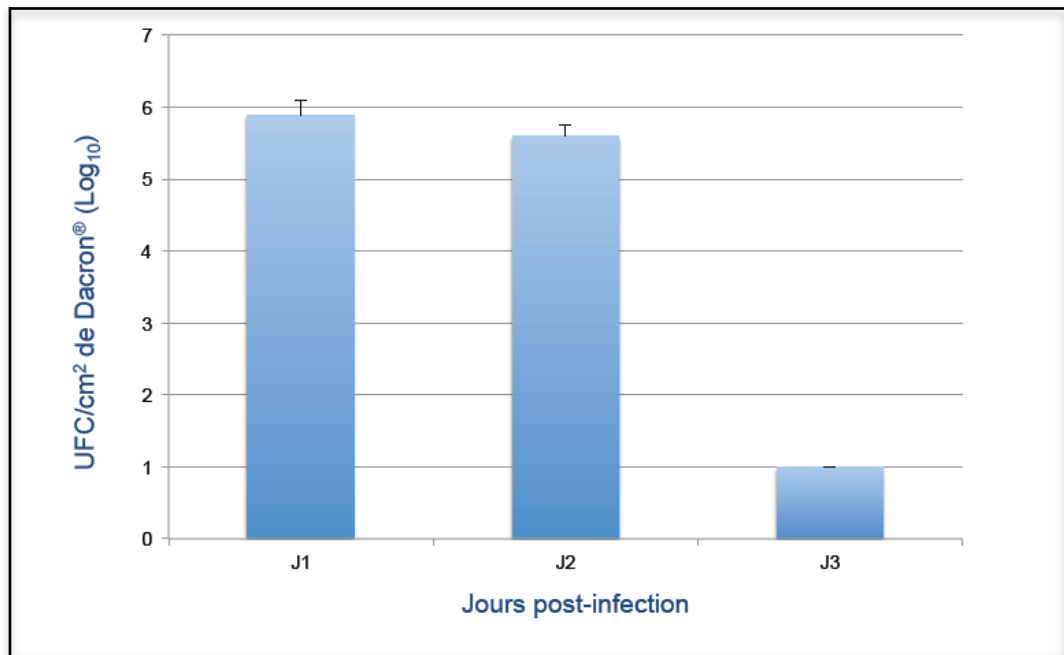
Par soucis de simplification, ne seront exposés que les résultats sans sonication et après 48 heures de culture. De même, on ne parlera ici que des résultats obtenus avec la souche SARM BCB8, les résultats des expérimentations réalisées avec les autres souches étant superposables.

### Infection de Dacron<sup>®</sup> nu

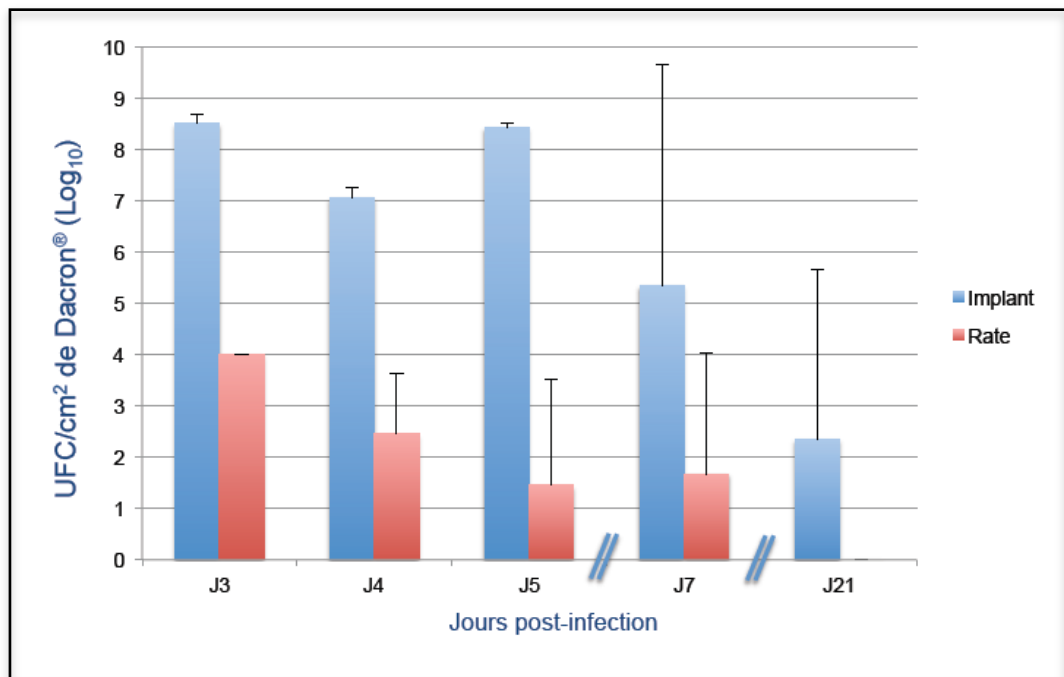
Les résultats de ces expérimentations sont fournis par la figure 8a. On y voit que malgré un compte bactérien satisfaisant à J2 et J3 post-infection, le Dacron<sup>®</sup> se « décontamine » dès J3 (les résultats sont similaires au delà et n'ont pas été représentés). L'hypothèse privilégiée était celle de l'absence de greffe au niveau du matériel par défaut d'adhésion bactérienne sur le biomatériau. Les bactéries retrouvées à J1 et J2, en nombre d'ailleurs inférieur à l'inoculum de départ ( $-1,2 \log_{10} \text{UFC/cm}^2$ ), étaient vraisemblablement le témoin d'une infection très brève au niveau des tissus mous de la souris, celle-ci éliminant de façon spontanée cette infection.

Ces résultats nous ont donc amené à essayer de sensibiliser le modèle en favorisant l'adhésion bactérienne par :

- Incubation du Dacron<sup>®</sup> dans du sérum de souris afin de « tapisser » le biomatériau de produits biologiques murins ;
- Incubation préalable du Dacron<sup>®</sup> avec la souche d'intérêt.



**Figure 8a.** Résultats des comptes bactériens sur Dacron® « nu » explanté  
Souche SARM BC88



**Figure 8b.** Résultats des comptes bactériens sur Dacron® incubé 24 heures avant implantation dans du sérum de souris Swiss  
Souche SARM BC88

### **Infection de Dacron<sup>®</sup> incubé avec du sérum de souris ou avec *S. aureus***

Les résultats obtenus sont similaires selon les deux modalités d'incubation du Dacron<sup>®</sup> avant l'implantation chez la souris. Nous ne présenterons ici que les résultats obtenus avec l'incubation dans du sérum de souris. Cette modalité sera d'ailleurs celle choisie pour le reste des expérimentations puisqu'elle nous paraît beaucoup plus physiologique.

On obtient une infection stable au moins 5 jours avec des comptes bactériens au moins équivalents à l'inoculum de départ voire plus important d' $1 \log_{10}$ UFC/cm<sup>2</sup>. Au delà de J7, certaines souris se décontaminent spontanément avec 50% des souris « guéries » à J21. Pour celles pour lesquelles des bactéries sont retrouvées, les comptes bactériens sont relativement faibles ( $4 \log_{10}$ UFC/cm<sup>2</sup>). Aucune mortalité n'est constatée.

Les cultures de rates ne sont pas systématiquement positives et, lorsqu'elles le sont, présentent une charge bactérienne assez faible.

En conclusion, on voit que pour peu que le Dacron<sup>®</sup> soit incubé 24 heures avant l'implantation chez l'animal dans du sérum de souris, une infection stable au moins 5 jours est obtenue avec des charges bactériennes suffisantes pour évaluer l'efficacité de différents protocoles d'antibiothérapie. Nous avons donc poursuivi nos expérimentations en utilisant cette procédure.

## 2.2. Essai de sensibilisation pharmacologique

### 2.2.1. Justifications

Nous souhaitons évaluer l'efficacité de différents protocoles d'antibiothérapie dans un modèle murin d'infection de matériel vasculaire. La question des modalités d'administration des différents antibiotiques choisis se posait donc, notamment pour la cloxacilline. Il s'agit en effet du traitement de référence des infections graves à staphylocoques sensibles à la méticilline<sup>50, 123-125</sup>. Son activité antibactérienne est dite « temps-dépendante » : elle est corrélée à la durée d'exposition à la molécule. Sa demi-vie d'élimination chez l'homme est courte, de l'ordre de 45 minutes à 1 heure chez des patients à la fonction rénale normale. Tout ceci concourt à la nécessité d'administrations pluriquotidiennes voire de perfusions continues en pratique clinique humaine.

L'administration parentérale d'antibiotique pluriquotidienne n'est pas sans poser de problèmes chez la souris, d'autant que les demi-vies d'élimination des molécules administrées chez cet animal sont souvent plus brèves que chez l'homme. Plusieurs protocoles d'administration des pénicillines du groupe M sont retrouvés dans la littérature. Domenech *et al.*, dans un modèle de péritonite chez la souris (C57BL/6) traitée seulement 24 heures, considèrent que la cloxacilline doit être administrée toutes les 2 heures<sup>126</sup>. D'autres auteurs, à l'inverse, ne préconisent qu'une injection journalière d'oxacilline (souris Balb/c, modèle d'infection de cuisse)<sup>127</sup>, de cloxacilline (souris Swissneutropénique, modèle d'infection de cuisse)<sup>128</sup>, ou de dicloxacilline (souris NMRI, modèle de péritonite)<sup>129</sup>. Enfin, une équipe préconise d'utiliser de la dicloxacilline (même si « oxacilline » apparaît dans le titre de l'article) en deux injections par jour (infection de cuisse chez la souris Balb/c neutropénique)<sup>130</sup>.

Pour des raisons techniques évidentes, il est impossible de réaliser des perfusions continues dans les modèles murins. L'administration itérative (toutes les 2 heures !) pose des soucis dans un modèle comme le nôtre dans lequel, comme on le verra plus loin, le traitement antibiotique est poursuivi 48 heures. Cela reviendrait à 24 injections d'antibiotique par souris, ce qui pour des raisons éthiques et de réussite de l'expérimentation, serait impossible à réaliser. Une possibilité, aurait pu être l'utilisation de la céftriaxone, bêta-lactamine à demi-vie longue. Nous avons vite éliminé cette possibilité,

cette molécule n'étant pas le traitement choix des infections sévères à staphylocoque<sup>131</sup>. Notre idée a donc été d'augmenter la durée d'exposition à la cloxacilline après une injection, soit en créant une insuffisance rénale chez la souris, soit en interférant avec l'excrétion tubulaire de la cloxacilline par utilisation du probénecide. Ces deux possibilités ont été évaluées en mesurant les résultats pharmacologiques obtenus après une injection de cloxacilline.

### **2.2.2. Matériels et méthodes**

#### **Modèle d'insuffisance rénale chez la souris**

Les animaux utilisés sont de nouveau des souris Swiss femelles âgées de 4 semaines, pesant 20-24g. L'insuffisance rénale est induite par une injection intra-péritonéale d'acide folique à la posologie de 250 mg/kg dilué dans une solution de bicarbonate de sodium à 0,3M dans un volume total de 0,5 mL par souris. Cette injection est connue pour provoquer une insuffisance rénale tubulaire chez la souris, débutant dès la 24<sup>ème</sup> heure après l'injection, étant maximale à 24 heures et persistant environ 7 jours avant qu'une récupération ne commence à survenir<sup>132-134</sup>. Vingt-huit souris ont été utilisées pour les expériences réalisées en duplicate. La réalité de l'insuffisance rénale est vérifiée par dosage de la créatinine plasmatique chez la souris à la fois chez une souris témoin (n'ayant pas reçu d'acide folique) et chez une souris traitée (méthode enzymatique Cobas/Roche®).

Soixante douze heures après l'injection d'acide folique, un traitement par cloxacilline est administré à la posologie de 80 mg/kg par injection sous-cutanée. Des prélèvements sanguins par ponction intracardiaque sont réalisés à 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 3 et 4 heures après cette injection. Deux souris sont utilisées à chaque prélèvement, réalisé sous anesthésie (Isoflurane). Les souris prélevées sont ensuite euthanasiées encore endormies par dislocation cervicale. Le sang, placé dans un microtube contenant 0,4 µL d'héparine à 25 000 UI/5mL pour 1 mL de sang, est centrifugé à 5000 tours/min pendant 10 minutes à 4°C. Le plasma est alors prélevé.

Les dosages plasmatiques sont effectués grâce à la méthode de diffusion des antibiotiques en milieu gélosé : une gamme de concentration de cloxacilline, en progression

géométrique de raison 2, entre 0,5 et 256 mg/L, est distribuée dans les puits d'une gélose AM2 (Antibiotique Medium), ensemencée avec la bactérie indicatrice *Bacillus subtilis*. Les échantillons à doser sont déposés parallèlement à cette gamme étalon. Après incubation de 24 heures à 37°C, la droite de régression entre le logarithme des concentrations de la gamme et les diamètres d'inhibition correspondants est construite. Les diamètres obtenus avec les échantillons à doser sont ensuite reportés sur la droite permettant de calculer la concentration correspondante. Le seuil de détection est de 0,5 mg/L. Les coefficients de variation intra et inter-expérimentation sont inférieurs à 5%<sup>135</sup>. Un exemple de droite de corrélation obtenue pour la mesure de concentration de cloxacilline est fourni dans la figure 9.

### **Modèle utilisant le probénecide**

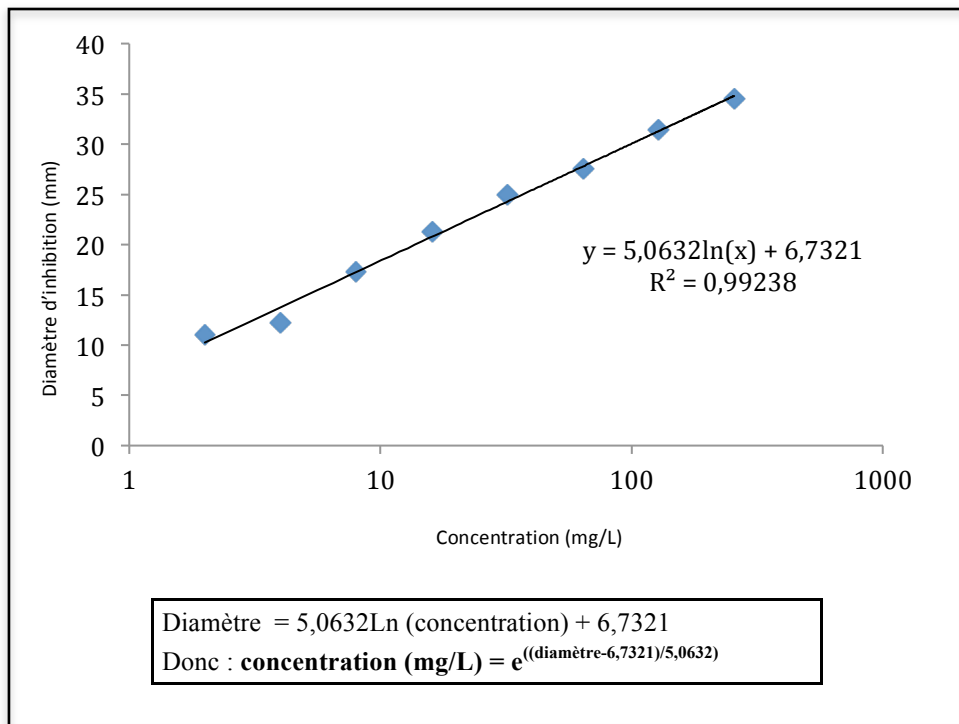
On utilise de nouveau 28 souris de même type. Le probénecide (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Saint-Quentin Fallavier, France) est administré à la souris à la posologie de 70 mg/kg (dilué pour obtenir une solution de 0,5 mL dans du bicarbonate de sodium) en intrapéritonéal<sup>136</sup>, une heure avant l'administration de cloxacilline (80 mg/kg). Des prélèvements sanguins et les dosages pharmacologiques sont réalisés de manière parfaitement identique à ce qui a été fait pour l'acide folique.

Trente souris seront ensuite utilisées dans cette partie pour comparer l'efficacité de la cloxacilline seule à celle de la cloxacilline associée au probénecide dans notre modèle d'infection de matériel vasculaire selon les mêmes modalités du modèle final qui sera détaillé dans la partie suivante. Brièvement et spécifiquement pour cette comparaison, le Dacron<sup>®</sup> implanté chez les souris est infecté par un inoculum de SAMS 27 217 (0,2 mL de solution de sérum physiologique contenant  $10^7$  *S. aureus*) selon les mêmes modalités que celles décrites précédemment. Deux jours plus tard, le traitement par cloxacilline est débuté à la posologie de 200 mg/kg/12 heures en injection sous-cutanée, associée ou non au probénecide. Les souris sont réparties comme suit : 5 souris témoins (non traitées), 5 souris traitées par cloxacilline seule, 5 souris traitées par cloxacilline et probénecide. Cette expérience est réalisée deux fois. Après 48 heures de ce traitement, le Dacron<sup>®</sup> est explanté,

ainsi que la rate pour mise en culture et compte bactérien (même procédure que précédemment). Le plan d'expérimentation est fourni dans la figure 13, page 86.

Les résultats sont comparés par le logiciel GraphPadprism (version 6.0; GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Une analyse de variance ANOVA est réalisée pour comparer les effets entre les différents groupes, suivie par un test de Bonferroni pour comparer les groupes deux à deux. Une valeur de  $P < 0,05$  est considérée comme significative.





**Figure 9.** Exemple de gamme obtenue pour le dosage pharmacologique de cloxacilline chez la souris ayant été traitée par acide folique

### 2.2.3. Résultats

#### Modèle d'insuffisance rénale

Ce modèle est pourvoyeur de mortalité importante de 30%. La dégradation de la fonction rénale des souris est finalement assez modérée puisque la créatinine plasmatique passe de 17  $\mu\text{mol/L}$  (+/- 2) avant injection d'acide folique à 31  $\mu\text{mol/L}$  (+/- 4) après.

Pour autant, cette injection entraîne une augmentation très importante du pic de cloxacilline passant, en moyenne, de 28,27 mg/l pour la cloxacilline seule à 250 mg/L chez les souris ayant reçu de l'acide folique (figure 10a). L'aire sous la courbe est en conséquence largement plus importante après injection d'acide folique : 286,9 vs 22. La demi-vie n'est par contre pas réellement allongée.

#### Modèle utilisant le probénecide

Aucune mortalité n'est constatée dans ce modèle. Là-aussi, le pic est largement augmenté, passant en moyenne, de 28,27 mg/L à 112,84 mg/L, même si cette augmentation est moins marquée qu'avec l'acide folique. L'aire sous la courbe est plus importante : 167,7 vs 21,08. Là encore la demi-vie n'est pas le paramètre pharmacocinétique le plus impacté (figure 10b).

Les résultats d'analyse comparée de l'efficacité de la cloxacilline seule et de la cloxacilline associée au probénecide sont décevants. Ces efficacités sont, en effet, très similaires voire moins bonnes avec le probénecide puisqu'on retrouve une diminution de  $-1,17 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> pour la cloxacilline seule et  $-0,7 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> lorsqu'elle est associée au probénecide ( $P > 0,05$ ) en sachant que les comptes bactériens retrouvés pour les souris contrôles étaient de  $6,65 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>.

En conclusion, le modèle comportant de l'acide folique est abandonné du fait d'une mortalité trop importante et de résultats peu convaincants. Le modèle avec injection de probénecide est lui aussi arrêté du fait de résultats très décevants. La cloxacilline sera donc injectée seule dans les expérimentations suivantes.

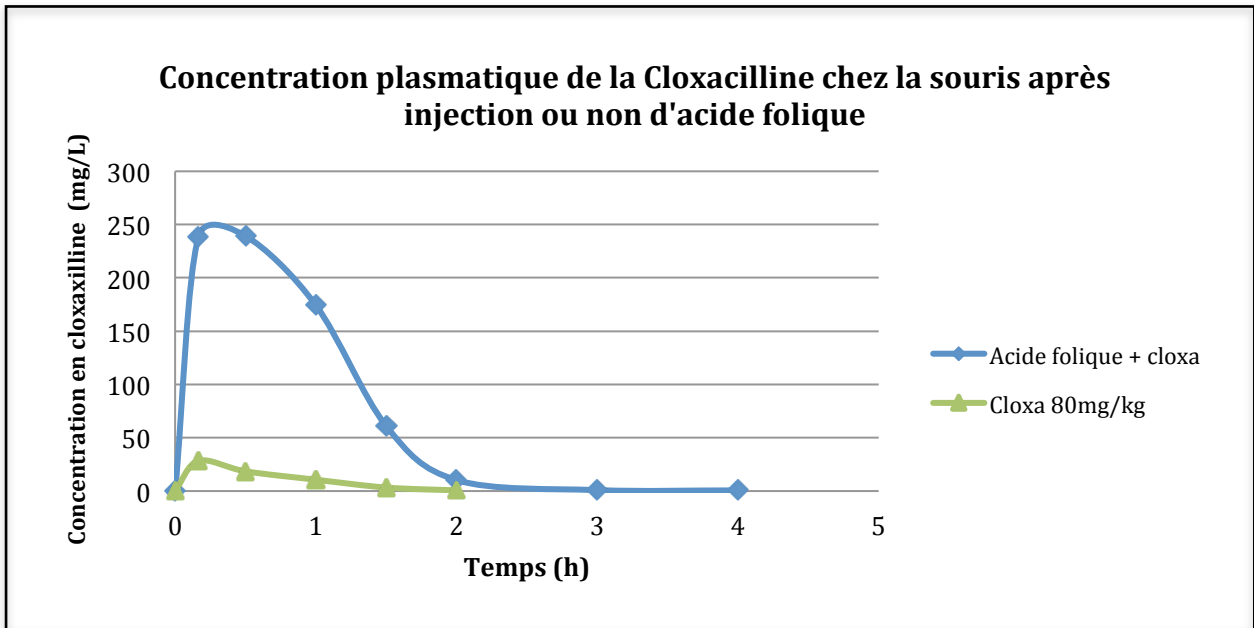


Figure 10a. Concentration plasmatique de cloxacilline avec ou sans acide folique

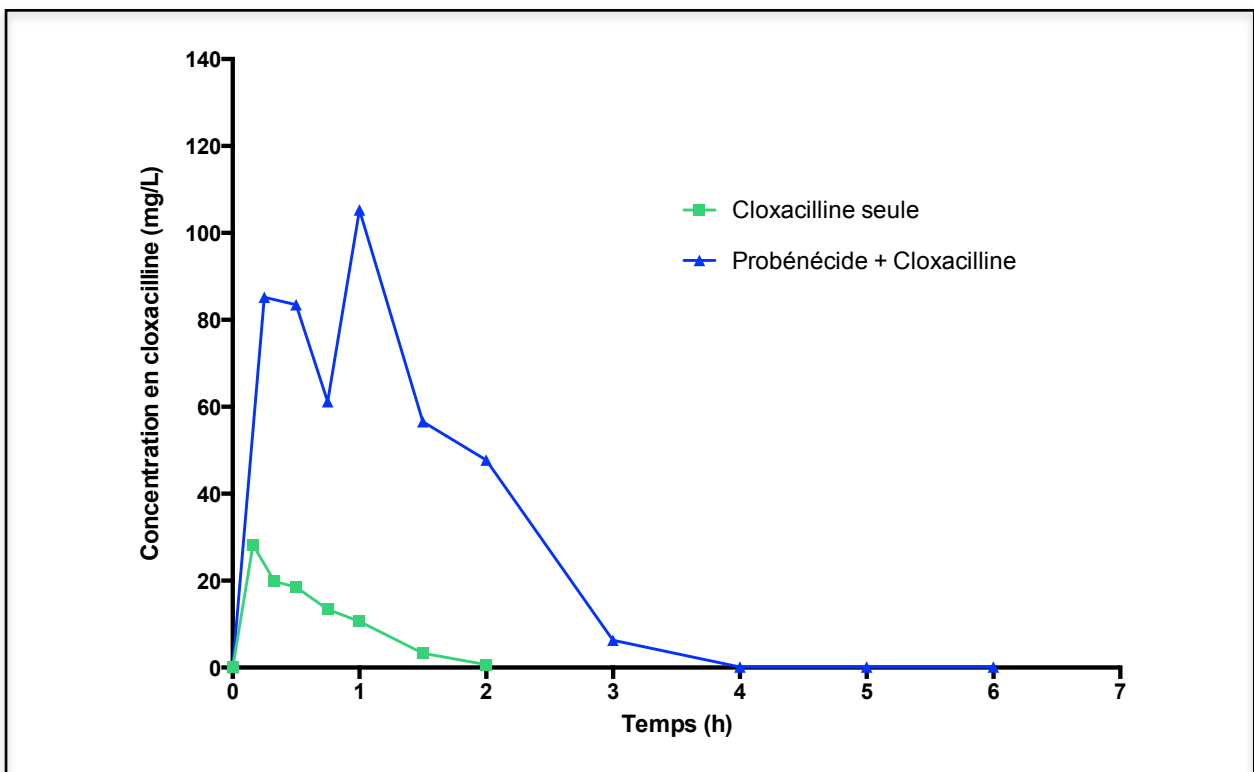


Figure 10b. Concentration plasmatique de cloxacilline avec ou sans probénécide

1

2       **2.3. Efficacité comparée de différents antibiotiques dans le modèle**  
3       **d'infection de matériel vasculaire à *Staphylococcus aureus***

4       Cette partie a été l'objet de la rédaction d'article soumis au **Journal of Antimicrobial**  
5 **Chemotherapy** (JAC) et actuellement en cours de révision. Pour éviter les répétitions, cet  
6 article tel qu'il a été soumis pour publication sera présenté dans les pages suivantes (pages  
7 60 à 83) et seuls les éléments n'apparaissant pas dans l'article seront rajoutés.

8       La bibliographie de l'article soumis a été actualisée lors de l'intégration du texte au reste  
9 de ce mémoire. Elle a été intégrée à la bibliographie générale de la thèse. Les appels dans le  
10 texte n'ont donc plus les mêmes valeurs que celles de la soumission.

11

**Title page**

**New *in vitro* and *in vivo* Models to evaluate Antibiotic Efficacy in *Staphylococcus aureus* Prosthetic Vascular Graft Infection**

**M. Revest**<sup>1,2,3</sup>, C. Jacqueline<sup>1</sup>, R. Boudjemaa<sup>4</sup>, J. Caillon<sup>1</sup>, V. Le Mabecque<sup>1</sup>, A. Breteche<sup>1</sup>, K. Steenkeste<sup>4</sup>, P. Tattevin<sup>2,3</sup>, G. Potel<sup>1</sup>, C. Michelet<sup>2,3</sup>, MP. Fontaine-Aupart<sup>4</sup>, D. Boutoille<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Université Nantes, Faculté de Médecine EA3826 Nantes, France

<sup>2</sup>CHU Rennes Infectious Diseases and Intensive Care Unit, Pontchaillou Hospital, 35033 Rennes Cedex, France

<sup>3</sup>CIC Inserm 1414, Rennes 1 University, Pontchaillou Hospital, 35033 Rennes Cedex, France

<sup>4</sup>Institut des Sciences Moléculaires Orsay, CNRS, Université Paris-Sud France

<sup>5</sup> CHU Nantes, Infectious Diseases Unit, Hôtel Dieu, Nantes, France

Corresponding author:

Dr Matthieu Revest,

CHU Rennes Infectious Diseases and Intensive Care Unit, Pontchaillou Hospital, 35033 Rennes Cedex, France

Phone: +33 2 99 28 37 98

Fax: +33 2 99 28 94 64

[matthieu.revest@chu-rennes.fr](mailto:matthieu.revest@chu-rennes.fr)

Running title: evaluation of different antibiotics for vascular prosthesis infections treatment

Key words: *Staphylococcus aureus*, animal models, biofilm, surgical infection, vascular prosthesis infections

40 **New *in vitro* and *in vivo* Models to evaluate Antibiotic Efficacy in *Staphylococcus aureus***  
41 **Prosthetic Vascular Graft Infection**

42  
43 **M. Revest**<sup>1,2,3</sup>, C. Jacqueline<sup>1</sup>, R. Boudjemaa<sup>4</sup>, J. Caillon<sup>1</sup>, V. Le Mabecque<sup>1</sup>, A. Breteche<sup>1</sup>, K.  
44 Steenkeste<sup>4</sup>, P. Tattevin<sup>2,3</sup>, G. Potel<sup>1</sup>, C. Michelet<sup>2,3</sup>, MP. Fontaine-Aupart<sup>4</sup>, D. Boutoille<sup>1,5</sup>

45  
46 <sup>1</sup>Université Nantes, Faculté de Médecine EA3826 Nantes, France

47 <sup>2</sup>CHU Rennes Infectious Diseases and Intensive Care Unit, Pontchaillou Hospital, 35033  
48 Rennes Cedex, France

49 <sup>3</sup>CIC Inserm 1414, Rennes 1 University, Pontchaillou Hospital, 35033 Rennes Cedex, France

50 <sup>4</sup>Institut des Sciences Moléculaires Orsay, CNRS, Université Paris-Sud France

51 <sup>5</sup>CHU Nantes, Infectious Diseases Unit, Hôtel Dieu, Nantes, France

52

53 **Introduction**

54 More than 400 000 vascular grafts are inserted annually in the United States<sup>3</sup> and  
55 approximately 50 000 in France.<sup>2</sup> Prosthetic vascular graft infections (PVGIs) are among the  
56 most serious complications associated with these procedures.<sup>3</sup> Their frequency is estimated to  
57 be 1-5%, depending on the anatomical implantation site, the biomaterial used and the  
58 patient's co-morbidities. PVGIs are associated with poor outcome with a 30 days- and one  
59 year-mortality rates of, respectively, 10–25%, and 50%. In addition, 4 to 14% of survivors  
60 undergo leg amputation.<sup>41</sup> *Staphylococcus aureus* is the most commonly causative organism  
61 and methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) account for almost 50% of *S. aureus* PVGIs in  
62 North America.<sup>60</sup> Clinical data regarding the optimal antibiotic therapy for these infections are  
63 scarce, in the absence of any comparative clinical trial dealing with PVGIs treatment and  
64 current recommendations for treatment of PVGIs are only based on expert opinion.<sup>137</sup> Hence,  
65 experimental data are needed to better identify the optimal antibiotic regimens for PVGIs.

66 Like any other indwelling material infections, biofilm developed onto the vascular prosthesis  
67 plays a significant role in the difficulties encountered for treating PVGIs. Firstly, biofilm acts  
68 as a mechanical barrier against antibiotic penetration. Secondly, bacteria embedded in a  
69 mature biofilm enter in an altered metabolic state associated with a dramatic decrease of  
70 susceptibility to most antibiotics.<sup>90, 92</sup> Many studies showed that minimal biofilm inhibitory

71 concentrations (MBIC) and minimal biofilm eradicating concentrations (MBEC) of  
72 antibiotics are much higher than minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum  
73 bactericidal concentration (MBC) measured on planktonic bacteria.<sup>138-140</sup> However, most  
74 studies evaluated antibiotics efficacy on artificial materials not used in clinical practice,  
75 although the nature of the material may influence these results. In addition, although helpful,  
76 *in vitro* data may fail to capture what happens *in vivo*. Specific animal models of PVGIs exist  
77 but have mainly been used to evaluate techniques to prevent PVGIs,<sup>141-144</sup> and an animal  
78 model assessing the efficacy of different antibiotics regimen on infection of a Dacron<sup>®</sup>  
79 vascular prosthesis used in clinical daily practice has not been described so far.

80 In this study, we investigated the activities of cloxacillin, vancomycin, daptomycin and  
81 rifampicin against different strains of methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) and MRSA *in*  
82 *vitro*. Those activities were determined against planktonic bacteria (MIC and MBC), and  
83 against adherent bacteria (MBIC and MBEC). To evaluate whether the nature of the support  
84 influence results for MBIC and MBEC, two different techniques were used: a largely used  
85 modified version of the Calgary Biofilm Pin Lid Device (CBPD) and an original model of  
86 Dacron<sup>®</sup>-related biofilm. Then, cloxacillin, vancomycin, daptomycin whether or not  
87 combined with rifampicin, were evaluated in a new mouse vascular-material infection model,  
88 using the same strains of *S. aureus*.

89

## 90 **Materials and methods**

### 91 **Bacterial strains**

92 Six different strains of *S. aureus* were used for all experiments. For MSSA: two different  
93 clinical strains, thereafter named 171 and 176, isolated from patients with *S. aureus*  
94 bloodstream infections, and one strain from the American Type Culture Collection: ATCC  
95 27217. For MRSA: two different strains, thereafter named BCB8 and 117, also isolated from

96 blood cultures, and one ATCC strain: ATCC 33591. Bacteria were stored in a cryovial bead  
97 preservation system at -80°C.

98

### 99 **Antimicrobial agents**

100 Clinical forms of the following antibiotics were used: cloxacillin (Astellas Pharma, Levallois-  
101 Perret, France) stored in a 100 mg/mL stock-solution, vancomycin (Sandoz, Levallois-Perret,  
102 France) stored in a 50 mg/mL stock-solution, daptomycin (Novartis Pharma SAS, Rueil-  
103 Malmaison, France) stored in a 50 mg/mL stock-solution and rifampicin (Sanofi-Aventis,  
104 Paris, France) stored in a 60 mg/mL stock-solution. All the stock-solutions were prepared in  
105 sterile and pyrogen-free 0.9% saline except for rifampicin prepared in sterile water, and stored  
106 at -80°C before utilization.

107

### 108 ***In vitro* experiments**

109 All the following experiments were performed at least in duplicate, with all the  
110 staphylococcal strains evaluated. For each strain, we measured the MICs and the MBCs, the  
111 MBICs and the MBECs, and the Dacron<sup>®</sup>-related minimal biofilm inhibitory concentrations  
112 (dMBICs) and the Dacron<sup>®</sup>-related minimal biofilm eradicating concentrations (dMBECs).  
113 Biofilm formation was compared between polystyrene (CPBD) and Dacron<sup>®</sup> using confocal  
114 microscopy.

### 115 **MICs and MBCs**

116 The MICs and the MBCs values for cloxacillin, vancomycin, daptomycin and rifampicin were  
117 determined by the broth macrodilution method in cation-adjusted Mueller-Hinton broth  
118 (CAMHB), according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing  
119 (EUCAST). Media were supplemented with 50 mg/L Ca<sup>2+</sup> for daptomycin.

### 120 **MBICs and MBECs**



121 A modified Calgary device was used as previously described.<sup>138, 145</sup> Briefly, biofilm was  
122 formed by immersing pegs of a modified microtiter lid into wells of a flat-bottom 96-well  
123 microtiter plate. Each well was filled with 150  $\mu$ L of a 3 McFarland *S. aureus* broth medium  
124 solution. After a 24-h incubation at 37°C, pegs lids were rinsed 3 times in sterile water, placed  
125 onto flat-bottom microtiter plates containing antibiotic twofold dilutions in 150  $\mu$ L of  
126 CAMHB per well, and incubated for 24 h at 37°C. The MBIC were defined as the minimal  
127 concentration of antibiotic required inhibiting bacterial growth, as determined by reading  
128 turbidity of media at 650 nm. Pegs where no bacterial growth was documented were again  
129 rinsed 3 times with sterile water and sonicated (Aquasonic sonicator, 35 kHz during 5  
130 minutes) followed by vortexing for 30 seconds to remove biofilm from the support. A new  
131 cover plate was added and this new device was cultured for 24 h at 37°C in CAMHB. The  
132 MBEC was defined as the minimal concentration of antibiotic where no bacterial growth was  
133 documented.

#### 134 **dMBICs and dMBECs**

135 Commercially available woven Dacron<sup>®</sup> grafts (Cardial<sup>™</sup>, Bard, Saint-Etienne, France) were  
136 cut into 1 cm x 1 cm squares and sterilized. To cover the biomaterial with proteins and thus to  
137 facilitate the bacterial graft, these Dacron<sup>®</sup> sheets were incubated at 37°C under sterile  
138 conditions with horse serum during 24 h. They were rinsed 3 times with sterile water to  
139 remove the horse serum and then incubated during 24 h at 37°C with 1 mL per patch of  
140 Mueller-Hinton broth (MHB) containing 10<sup>8</sup> colony forming units (CFU)/mL of *S. aureus*.  
141 Again, they were rinsed 3 times in sterile water to eliminate the planktonic bacteria, dried  
142 with a sterile gauze compress, and plunged into tubes filled with CAMHB containing none  
143 (control groups) or serial antibiotic dilutions, and incubated during 24 h at 37°C. dMBIC for  
144 each antibiotic and strain couple was defined as the antibiotic concentration of the first tube  
145 with no visible bacterial growth. Then, Dacron<sup>®</sup> patches for which no bacterial growth was

146 documented, were removed from their tubes, rinsed 3 times in sterile water, dried with a  
147 sterile gauze compress and plunged again in MHB. A sonication (35kHz during 5 minutes)  
148 was performed followed by vortexing for 30 seconds and these MHB containing the Dacron<sup>®</sup>  
149 sheets were incubated 24 h at 37°C. dMBECs were defined as the antibiotic concentration of  
150 the first tube with no bacterial growth.

### 151 **Confocal microscopy evaluating biofilm formation depending on the support**

152 Twenty-four h-biofilms prepared as previously described were observed using a Leica TCS  
153 SP5 confocal laser scanning microscope (Leica Microsystems, France) implemented at the  
154 *Centre de Photonique Biomédicale*(CPBM, Orsay, France). Bacteria were stained with 2.5  
155  $\mu$ M Syto9<sup>®</sup> (Invitrogen) able to penetrate all bacteria, and 5  $\mu$ L of 1-mg/mL propidium  
156 iodide (PI, Invitrogen), which can only penetrate dead cells. Syto9<sup>®</sup> and PI were excited at  
157 488 nm and 543 nm, respectively, and their fluorescence emissions were collected between  
158 500 and 600 nm for Syto9<sup>®</sup> and between 640 and 750 nm for PI. Images were acquired using  
159 a 63x with a 1.4 numerical aperture oil immersion objective. The size of the confocal images  
160 was 512 x 512 pixels (82x82  $\mu$ m<sup>2</sup>), recorded with a z-step of 1  $\mu$ m and a 3x zoom. For each  
161 biofilm, at least four different regions were analysed. Images of the biofilm prepared on the  
162 Dacron<sup>®</sup> were compared to those of biofilm formed on the polystyrene used to measure  
163 MBICs and MBECs.

164

### 165 ***In vivo* experiments**

166 All experiments were approved by the French ministry of research and the committee of  
167 animal ethics of the Pays de la Loire administrative region.

### 168 **Animals**

169 Four-weeks old female Swiss mice (RjOrl/SWISS, Janvier laboratory St Berthevin, France)  
170 weighing approximately 20 g were maintained on a 12-h light/dark cycle with free access to

171 food and water. Their well-being was checked daily. Eight to 15 animals per group were used  
172 for analysis.

### 173 **Biomaterial**

174 Sterile 1 cm<sup>2</sup> squares of commercially used Dacron<sup>®</sup> were incubated with sterile serum of  
175 healthy female Swiss mice during 24 h at 37°C. Then, they were implanted into mice.

### 176 **Surgical procedures**

177 Mice were anesthetized with ketamine (70 mg/kg) and Xylazine (10 mg/kg) through  
178 intraperitoneal (IP) injection. Under sterile conditions, a 10-mm horizontal incision in the  
179 center of the back, with the mouse in the prone position, was made to create a subcutaneous  
180 pocket. For each mouse, a sterile Dacron<sup>®</sup> patch was implanted into this pocket. Skin was  
181 closed with sutures (Vicryl 5/0). Two days after Dacron<sup>®</sup> implantation, a saline solution (0.2  
182 mL) containing 10<sup>7</sup> CFU of *S. aureus* was transcutaneously inoculated onto the graft surface  
183 with a tuberculin syringe. During inoculation, mice were anesthetized with isoflurane  
184 (0.8L/min, 3%).

### 185 **Antimicrobial treatment regimens**

186 All the antibiotics used were administered at appropriate dose regimens resulting in serum  
187 concentrations similar to those in humans. Mice were randomized into 14 groups. For MRSA:  
188 no treatment (controls); vancomycin group (subcutaneous injection (SC), 110 mg/kg/12h);<sup>146</sup>  
189 daptomycin group (50 mg/kg/24h, SC);<sup>147</sup> Rifampicin group (30 mg/kg/12h, IP);<sup>148</sup>  
190 vancomycin-rifampicin group; daptomycin-rifampicin group; for MSSA: same groups +  
191 cloxacillin group (200 mg/kg/12h, SC)<sup>126</sup> and cloxacillin-rifampicin group. Vancomycin and  
192 cloxacillin solutions were prepared in sterile 0.9% saline, daptomycin in sterile Ringer-  
193 Lactate and rifampicin in sterile 5% glucose serum. Mice were treated during 48 h and then  
194 euthanized following international guidelines.

### 195 **Bacterial counts**

196 Dacron<sup>®</sup> patches were removed under aseptic conditions, homogenized in 0.5 mL of saline  
197 buffer and vortexed during 30 seconds. Fifty microliter of this solution were used for  
198 quantitative bacterial cultures. Then, the Dacron<sup>®</sup> patches were sonicated (35kHz during 5  
199 minutes) and 50  $\mu$ L of the supernatant was inoculated for cultures on Tryptic Soy (TS) and  
200 Chapman agar plates, incubated at 37°C. The bacterial count was performed after 48 h of  
201 incubation. Spleens were also homogenized in 1 mL of saline buffer for bacterial cultures.  
202 Animals with positive bacterial culture of spleen were considered to be bacteriemic. In case of  
203 positive bacterial culture, *in vitro* drug susceptibility testing were performed using the Vitek 2  
204 automated identification and susceptibility testing system with the Advanced Expert System  
205 (bioMerieux, Lyon, France), and interpreted according to the EUCAST criteria.

## 206 **Statistical analysis**

207 GraphPad prism software (version 6.0; GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used.  
208 Normally distributed data were analyzed using analysis of variance to compare the effects  
209 between the different groups, followed by a Bonferroni's test to compare the groups two by  
210 two.  $P < 0.05$  was considered to be statistically significant.

211

## 212 **Results**

### 213 ***In vitro* efficacy of antibiotics in biofilm are influenced by the nature of the support**

214 Confocal microscopy confirmed a biofilm formation for all the strains on polystyrene (Figure  
215 1a), or Dacron<sup>®</sup> (Figure 1b). However, biofilms formed on Dacron<sup>®</sup> sheets were less dense  
216 and thick as compared to those found with the modified CPBD.

217 MBICs and MBECs measures demonstrated a dramatic reduction of bacterial susceptibilities  
218 to all antibiotics tested, for all strains. dMBICs and dMBECs were also higher than MICs and  
219 MBCs for all strains tested. However, decreases of susceptibilities were less pronounced on

220 Dacron<sup>®</sup> than on polystyrene, with the modified Calgary device (Table): for all the conditions  
221 evaluated, MBECs were much more higher than dMBECs.

222

223 **Daptomycin efficacy on MRSA vascular material infection is superior to comparators**  
224 **for one strain but not for the others**

225 There was no difference between bacterial cultures before and after Dacron<sup>®</sup> sonication. For  
226 MRSA BCB8, vancomycin demonstrated efficacy with significant decrease of bacterial count  
227 as compared to the control group ( $- 2.38 \log_{10} \text{ CFU/cm}^2$ ,  $P < 0.05$ ), but daptomycin was  
228 significantly more bactericidal with a dramatic reduction of bacterial load after a 48 h  
229 treatment ( $- 5.85 \log_{10} \text{ CFU/cm}^2$  as compared to the control group,  $P < 0.001$ , and  $- 3.47 \log_{10}$   
230  $\text{CFU/cm}^2$  as compared to vancomycin,  $P < 0.001$ ) whether or not combined with rifampicin.  
231 The bactericidal activity of vancomycin was significantly improved when combined with  
232 rifampicin, although this combination remained less bactericidal than daptomycin alone ( $P <$   
233  $0.001$ ). Rifampicin monotherapy demonstrated good efficacy ( $- 4.5 \log_{10} \text{ CFU/cm}^2$  vs control  
234 group,  $P < 0.001$ )(Figure 2). No emergence of antibiotic resistance was observed on bacteria  
235 recovered from positive cultures.

236 For MRSA 117 and 33591, results were clearly different. For both strains, all therapeutic  
237 regimens demonstrated significant efficacy. There were no significant differences between  
238 daptomycin, vancomycin and rifampicin monotherapies. Combined therapies demonstrated no  
239 significant benefit as compared to monotherapies (Figure 2). Although not statistically  
240 significant, there was a trend towards higher efficacy of vancomycin-rifampicin combined  
241 therapy as compared to daptomycin-rifampicin regimen. Once again, no antibiotic resistance  
242 was documented after treatment for both strains.

243 Spleen cultures were more frequently positive for controls than for therapeutic groups. There  
244 was no significant difference documented when therapeutic groups were compared.

245

**246 Daptomycin efficacy on MSSA vascular material infection depends also on bacterial  
247 strains**

248 As for MRSA, bacterial cultures after sonication did not differ from those without sonication.  
249 Cloxacillin, vancomycin, daptomycin, and rifampicin demonstrated efficacy for all the  
250 conditions tested (Figure 3). Daptomycin was significantly more bactericidal than cloxacillin  
251 for MSSA 176 ( $- 1.27 \log_{10} \text{CFU/cm}^2$  (CI 95%: 0.32 to 2.22),  $P < 0.05$ ) but not for MSSA  
252 27217 and MSSA 171. A trend towards better efficacy for daptomycin vs vancomycin on  
253 MSSA 176 ( $- 1.1 \log_{10} \text{CFU/cm}^2$ ; CI 95%: -0.16 to 2.37) is noticed and daptomycin but also  
254 cloxacillin demonstrated significant higher efficacy than vancomycin for MSSA 171  
255 (respectively  $- 2.72 \log_{10} \text{CFU/cm}^2$  (CI 95%: 0.75 to 3.79) and  $- 2.1 \log_{10} \text{CFU/cm}^2$  (CI 95%:  
256 0.55 to 3.65);  $P < 0.001$  for both). Combination of cloxacillin, vancomycin, or daptomycin,  
257 with rifampicin was clearly more efficient than monotherapies for the 27217 strain. This  
258 effect was less pronounced for 171 and 176. Surprisingly, the association of daptomycin and  
259 rifampin was significantly less efficient than cloxacillin-rifampicin ( $- 1.76 \log_{10} \text{CFU/cm}^2$  (CI  
260 95%: 0.61 to 2.9),  $P < 0.01$ ) or vancomycin-rifampicin ( $- 2.17 \log_{10} \text{CFU/cm}^2$  (CI 95%: 1.1 to  
261 3.25),  $P < 0.001$ ) for MSSA 27217. No emergence of antibiotic resistance was documented for  
262 any of the conditions tested.

263 Spleen cultures were less often positive for MSSA than for MRSA and no significant  
264 difference between the different conditions were noticed.

265

**266 Discussion**

267 The main findings of these experimental studies are: i) the results of the *in vitro* biofilm  
268 antibiotic susceptibility assays may vary according to the nature of the support used; ii) our  
269 mouse model of *S. aureus* vascular graft infection allowed us to test a large number of

270 bacterial strains and antibiotic regimens and could be a good model to pave the way toward a  
271 better understanding of antibiotic efficacy in PVGIs; iii) although more efficient than  
272 comparators for some bacterial strains, daptomycin was most of the time not superior to  
273 vancomycin or cloxacillin; and iv) combination of rifampicin and daptomycin did not enhance  
274 the bactericidal effect of daptomycin in our model.

275

276 Decrease of antibiotic efficacy in material related infections has been highlighted by many  
277 studies using biofilm susceptibility tests, including the Calgary device.<sup>138, 145, 149, 150</sup> Although  
278 not recommended in routine,<sup>99</sup> those techniques are able to prove that MBICs and MBECs are  
279 much higher than classical MIC and MBC and incompatible with clinical cure since they are  
280 impossible to reach with antibiotic dosing used in clinical practice.<sup>139, 150</sup> We also found very  
281 high MBICs and MBECs for all the antibiotics tested and for all the bacterial strains.  
282 However, some authors have described patients who were cured from their PVGIs with  
283 antibiotics alone when they were unable to undergo surgery.<sup>42, 51, 121</sup> Thus, we hypothesized  
284 that MBICs and MBECs could overestimate the decrease of antibiotic susceptibility in clinical  
285 PVGIs and that the nature of the support used to measure biofilm susceptibility might  
286 influence the results. We compared results of MBICs and MBECs obtained with a CBPD to  
287 those yielded by an original Dacron<sup>®</sup>-related minimal inhibitory and eradicating  
288 concentrations measure model. We found that dMBECs were certainly higher than MBCs, but  
289 lower than MBECs. Rifampicin remained in our model the most powerful antibiotic for most  
290 of the strains tested, with dMBICs and dMBECs in the range of those achievable in clinical  
291 practice in humans. This was also the case for daptomycin with the MRSA strain BCB8.

292 One reason explaining why results are different between Dacron<sup>®</sup> and the modified CPBD  
293 could be the difference of biofilm structure. We demonstrated with confocal microscopy that  
294 biofilms formed on Dacron<sup>®</sup> were thinner and less dense than biofilms on plastic. Our *in vitro*

295 results do not question the recommendations of removing all infected material whenever  
296 possible for PVGI.<sup>120, 151</sup> However, our data suggest that antibiotics alone may be a reasonable  
297 therapeutic option in selected cases when surgery would be associated with a very high  
298 probability of severe adverse outcomes.

299 Only two clinical studies evaluated the antibiotic protocols in PVGIs and found that the use of  
300 rifampicin was associated with good prognosis in patients admitted for staphylococcal  
301 PVGIs,<sup>51, 63</sup> but these data have to be confirmed. Animal models can constitute one of the first  
302 steps of therapeutic evaluation but no specific model evaluating the antibiotic therapy of  
303 constituted vascular material infection existed so far. Some authors described a rat model of  
304 infection of a Dacron<sup>®</sup> patch implanted in a dorsal subcutaneous pouch but these models were  
305 used to evaluate the efficacy of different prophylactic procedures.<sup>79, 143, 152, 153</sup> A model  
306 mimicking a foreign-body infection using a Teflon<sup>®</sup>-cage implanted in a dorsal subcutaneous  
307 pouch in Guinea-pig<sup>154-157</sup> or rat<sup>140</sup> has widely been used and has provided very informative  
308 data for prosthetic-joint infection treatment, demonstrating that rifampicin was of paramount  
309 importance to treat these infections.<sup>158</sup> We adapted these two kinds of model to evaluate  
310 different antibiotic regimens in a vascular material infection mouse model. For evident  
311 technical reasons, it was impossible to implant our Dacron<sup>®</sup> along the vascular system and  
312 this represents one weakness of our work. Some authors described rabbit,<sup>159</sup> pig<sup>144</sup> or dog<sup>141</sup>  
313 models of aortic graft infections but those models do not allow the use of a large number of  
314 animals and consequently, to screen various combination of antibiotics on different bacterial  
315 strains. Moreover, in clinical setting, most PVGIs occur from the wound or from an adjacent  
316 infectious focus and not through hematogenous route.<sup>87</sup> Therefore, infection process usually  
317 starts along the external part of the vascular prosthesis, not the endoluminal layer. Our model  
318 reproduces this natural history of infection and may be used to evaluate different antibiotic  
319 regimens for PVGIs treatment.



320 Although all evaluated antibiotics demonstrated efficacy when compared to controls, we  
321 found that antibiotic efficacy varied according to the bacterial strains. For instance,  
322 daptomycin showed a dramatic efficacy for MRSA BCB8 and was significantly more  
323 efficient than vancomycin in our model. It also demonstrated a significant higher efficacy  
324 than cloxacillin for MSSA 176 and a higher efficacy than vancomycin for MSSA 171. For the  
325 3 other strains, daptomycin was as efficient as vancomycin or cloxacillin. For MRSA BCB8,  
326 dMBIC and dMBEC were lower for daptomycin than for vancomycin and this could partially  
327 explain the differences noticed. This was not true for the 5 other strains. One other  
328 explanation could be the different capabilities of antibiotics to penetrate the biofilm formed *in*  
329 *vivo*. This biofilm penetration could be different from one bacterial strain to another and we  
330 just began experiments evaluating the different effects of antibiotics on *in vivo* biofilm  
331 according to bacterial strains.<sup>160</sup> Daptomycin has already demonstrated better efficacy against  
332 MRSA than vancomycin *in vitro*<sup>161, 162</sup> and in animal models.<sup>162, 163</sup> This higher efficacy is  
333 thought to be linked to a better biofilm penetration for daptomycin than for vancomycin<sup>164</sup>  
334 and a better bactericidal activity against bacteria in stationary phase.<sup>162</sup> However, some  
335 authors did not find any difference between daptomycin and vancomycin efficacy.<sup>165, 166</sup>  
336 Our results highlight a possible differential activity of daptomycin according to the bacterial  
337 strain. This antibiotic is at least as efficient as vancomycin and sometimes more bactericidal,  
338 but its better efficacy seems to be strain-dependent.

339 Rifampicin has demonstrated its efficacy for the treatment of material related staphylococcal  
340 infection<sup>167</sup> and its use in combination with another agent is largely recommended. In the  
341 present study, we did not find any improvement of therapeutic efficacy when rifampicin was  
342 added to daptomycin for MRSA, but rifampicin enhanced the antibacterial activity of  
343 vancomycin. The combination of daptomycin and rifampicin increased only moderately the  
344 bactericidal activity of daptomycin for MSSA 27217, while the addition of rifampicin to

345 vancomycin or cloxacillin strongly enhanced their bactericidal effect for this strain. These  
346 results are in contrast with those of Sakoulas *et al.*,<sup>168</sup> who demonstrated in a rat model of  
347 MRSA endocarditis a synergistic effect of the combination daptomycin plus rifampicin.  
348 Saleh-Mghir *et al.* found the same results in a rabbit model of prosthetic joint infection.<sup>169</sup>  
349 However, an *in vitro* pharmacodynamic model evaluating daptomycin and rifampicin against  
350 different MRSA strains found variable activity of this association, with increased bactericidal  
351 activity with the combined therapy in some but not all of the strains tested.<sup>170</sup> Likewise, the  
352 addition of rifampicin to daptomycin did not enhance the bactericidal activity of daptomycin  
353 in a rabbit model of MRSA native valve endocarditis.<sup>171</sup> Hence, other associations have to be  
354 considered and some studies found that daptomycin-fosfomicin or daptomycin-cloxacillin  
355 may be more synergistic.<sup>140, 172</sup>

356 Our model could not capture the utility of combined therapy to avoid bacterial resistance  
357 emergence. Indeed, even in conditions with high bacterial load after treatment, we did not  
358 document any bacterial resistance. This was unexpected, since emergence of resistance under  
359 treatment is one of the main caveat with rifampicin,<sup>163</sup> and daptomycin.<sup>163, 169</sup> In an  
360 experimental study evaluating the *in vivo* fitness of rifampicin-resistant *S. aureus* mutants in a  
361 mouse biofilm infection model, Yu *et al.*, found that rifampicin-resistant strains appeared  
362 after 3 to 9 days of treatment.<sup>148</sup> This delay may explain why our 48 h-treatment regimens  
363 were not associated with emergence of resistance. Thus, although no resistance was  
364 documented in our model, clinical data indicate that rifampicin should necessarily be used in  
365 combination for PVGI, as for any other infection.

366 In conclusion, we proved that the nature of the material used to measure the *in vitro* efficacy  
367 of antibiotics on biofilm-associated *S. aureus* influences the results and that measures realized  
368 on polystyrene may overestimated the antibiotic susceptibility decrease of bacteria involved  
369 in material-related infections. We also implemented an innovative mouse model of PVGI

370 allowing the evaluation of a large number of antibiotic regimens. In this model, we  
371 demonstrated that daptomycin was more efficient than comparators for some strains, and was  
372 most of the time as efficient as vancomycin or cloxacillin. The addition of rifampicin to  
373 daptomycin did not enhance daptomycin efficacy. Further studies are needed to better assess  
374 the optimal antibiotic regimens for PVGIs.

375

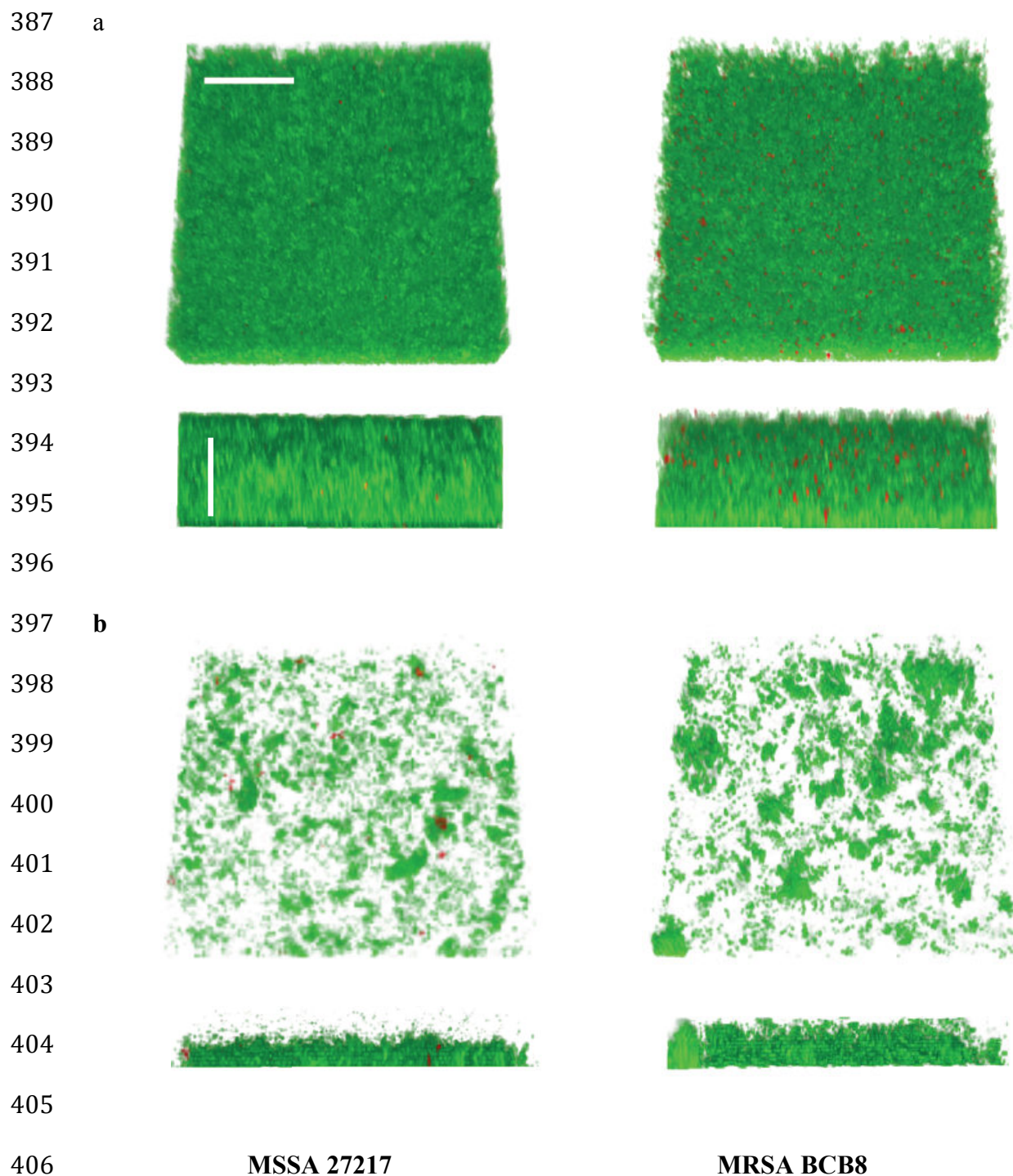
376 Acknowledgements: The authors want to acknowledge the Collège des enseignants des  
377 Maladies Infectieuses et Tropicales (CMIT) and the Société Française de Pathologie Infectieuse  
378 de Langue Française (SPILF) for their support.

379

380 Funding: This work was supported by a grant from Novartis and a grant from the Collège des  
381 enseignants des Maladies Infectieuses et Tropicales. Sponsors had no role in the design and  
382 the realization of this work. They had no access to results until this work was ended and  
383 submitted.

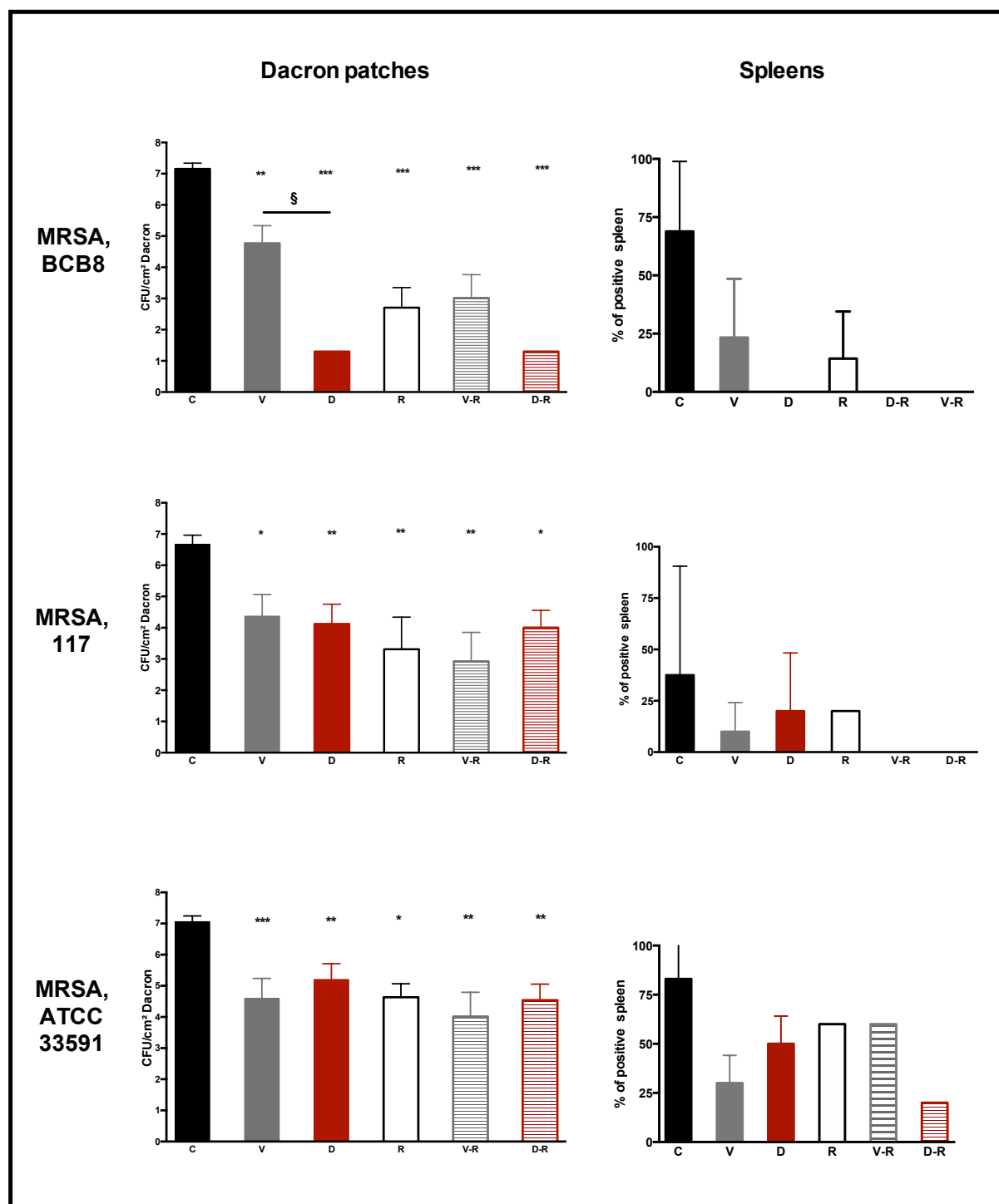
384

385 Disclosure: Matthieu Revest declares to have been supported by MSD and Pfizer laboratories  
386 to attend international conferences



407 **Figure 1.** Visualization of MSSA and MRSA 24h-biofilms on polystyrene (a) and on Dacron  
 408 (b) using section views to observe biofilm thickness. All bacteria were stained green with  
 409 Syto9®. The acquisition was performed on the whole biofilm thickness with an axial  
 410 displacement of 1  $\mu\text{m}$ . Images dimension is  $82 \times 82 \mu\text{m}^2$ . The scale bars correspond to 20  $\mu\text{m}$ .  
 411 Only biofilm for MSSA 27217 and MRSA BCB8 are represented since they were  
 412 representative of all the biofilms visualized for other strains.

413

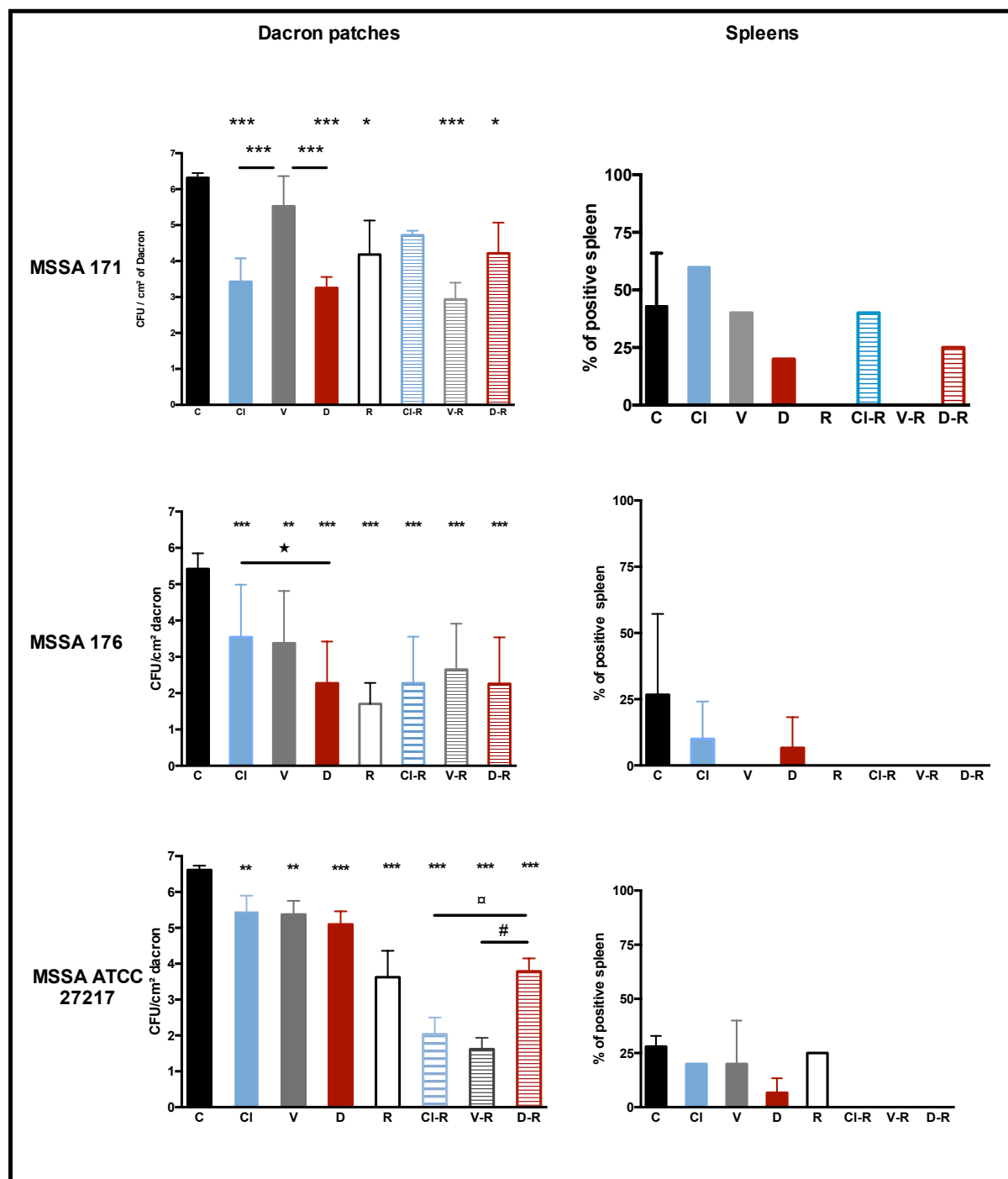


**Figure 2.** Results of bacterial count on Dacron patches and spleens after 48 h of treatment for MRSA infection.

C: controls; V: vancomycin; D: daptomycin; R: rifampicin; V-R: vancomycin-rifampicin; D-R: daptomycin-rifampicin. CFU: Colony Forming Unit

Stars represent results of comparison between control groups and each therapeutic group.

\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ . §  $P < 0.001$ , comparison between vancomycin and daptomycin for MRSA BCB8.



**Figure 3.** Results of bacterial count on Dacron sheets and spleen after 48 h of treatment for MSSA infection.

C: controls; V: vancomycin; D: daptomycin; R: rifampicin; V-R: vancomycin-rifampicin; D-R: daptomycin-rifampicin. CFU: Colony Forming Unit

Stars represent results of comparison between control groups and each therapeutic group.

\*  $P < 0.05$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ . ★  $P < 0.05$ , comparison between controls and daptomycin for MSSA

176. ☐  $P < 0.01$ , comparison between cloxacillin-rifampicin and daptomycin-rifampicin for

MSSA 27217. #  $P < 0.001$ , comparison between vancomycin-rifampicin and daptomycin-

rifampicin for MSSA 27217

94 **Table.** *In vitro* drug-susceptibility testing for the bacterial strains used in this study

95

Bacterial strains	Antibiotic	Classical methods		Biofilm on Dacron		Biofilm on polystyrene	
		MIC	MBC	dMBIC	dMBEC	MBIC	MBEC
BCB8	Vancomycin	1	1	1	> 32	1	> 256
	Daptomycin	0.125	0.125	0.5	8	1	> 256
	Rifampicin	< 0.06	< 0.06	< 0.125	> 1	0,015	> 8
MRSA 117	Vancomycin	1	4	4	16	1	> 256
	Daptomycin	1	2	2	64	1	> 256
	Rifampicin	0.015	0.03	0.015	> 0.5	0,015	> 8
33591	Vancomycin	1	2	4	16	2	> 256
	Daptomycin	0.25	0.5	2	> 16	1	> 256
	Rifampicin	0.0075	0.015	0.015	0.5	0,0075	> 8
171	Cloxacillin	0.25	0.5	2	> 32	0,25	> 256
	Vancomycin	1	1	8	32	4	> 256
	Daptomycin	0.5	0.5	4	> 32	4	> 256
	Rifampicin	0.015	0.03	0.125	> 0.25	0,015	> 8
MSSA 176	Cloxacillin	0.5	0.5	2	> 32	0,5	> 256
	Vancomycin	1	1	2	16	1	> 256
	Daptomycin	0.5	0.5	2	> 64	0,5	> 256
	Rifampicin	0.015	0.03	0.125	> 0.5	0,015	> 8
27217	Cloxacillin	0.5	0.5	1	16	0,25	> 256
	Vancomycin	1	1	8	> 32	8	> 256
	Daptomycin	0.25	0.25	1	> 8	2	> 256
	Rifampicin	< 0.06	0.125	2	2	0,03	> 8

96

97 MIC: Minimum inhibitory concentration; MBC: minimum bactericidal concentration; dMBIC: Dacron-related minimal biofilm inhibitory concentration; dMBEC: Dacron-  
98 related minimal biofilm eradicating concentration; MBIC: minimal biofilm inhibitory concentration; MBEC: minimal biofilm eradicating concentration

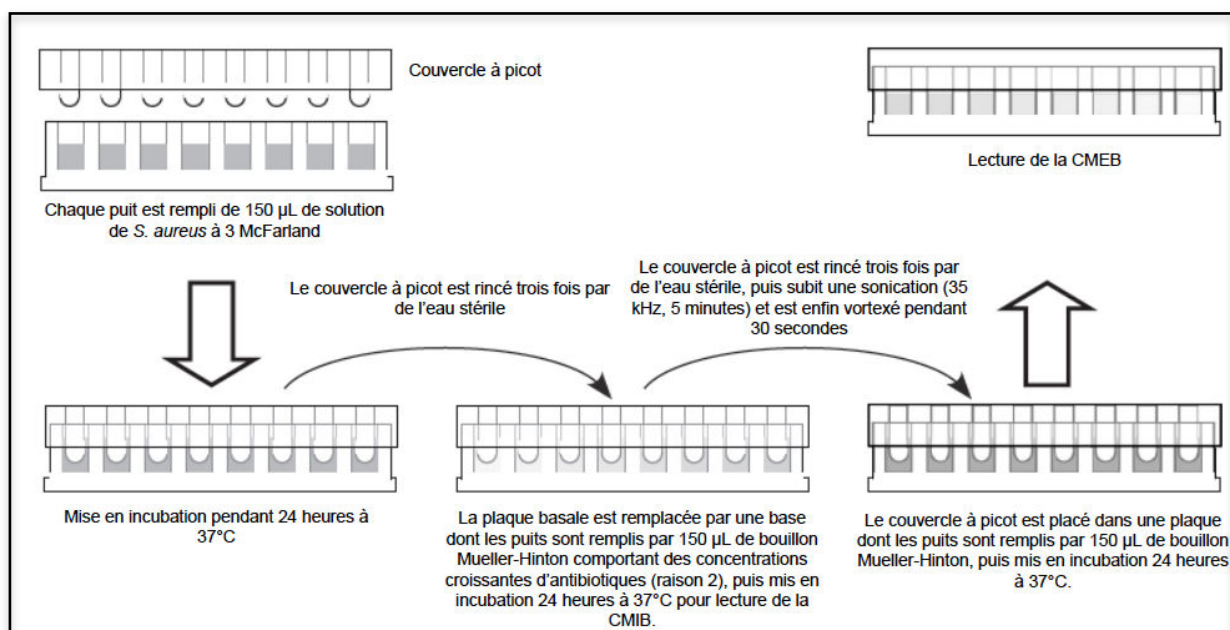
### **2.3.1. Matériels et méthodes**

Ces aspects ayant été exposés dans l'article, nous nous contenterons d'illustrer les expérimentations réalisées.

Une illustration du modèle modifié de Calgary est exposée dans la figure 11. La méthode de mesure des concentrations minimales inhibitrices et éradicatrices au sein du biofilm associé au Dacron® est exposée dans la figure 12.

La figure 13 schématise l'ensemble du programme expérimental du modèle animal d'évaluation de protocoles d'antibiothérapie dans les infections de matériel vasculaire.



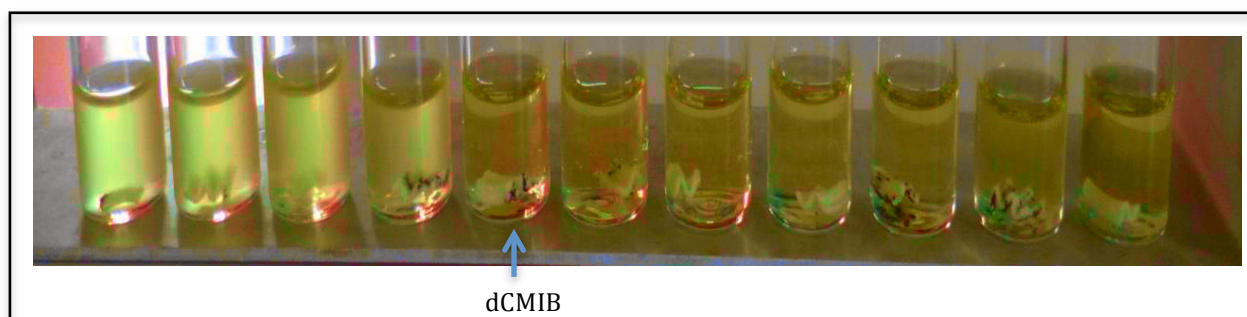


**Figure 11.** Méthode de Calgary modifiée

Permet d'évaluer les concentrations minimales inhibitrices au sein du biofilm (CMIB ou MBICs dans l'article). Cette CMIB correspond à la concentration minimale d'antibiotique se trouvant dans le premier tube dans lequel aucune croissance n'est constatée par lecture optique.

La CMEB est obtenue secondairement : on ne s'intéresse alors qu'aux picots plongés dans les puits dans lesquels aucune pousse bactérienne n'est constatée en CMIB. Après traitement (rinçage, sonication et vortexage), ces picots sont remis en culture. La CMEB correspond à la concentration d'antibiotique présente dans le premier tube dans lequel aucune pousse n'est repérée en lecture optique.

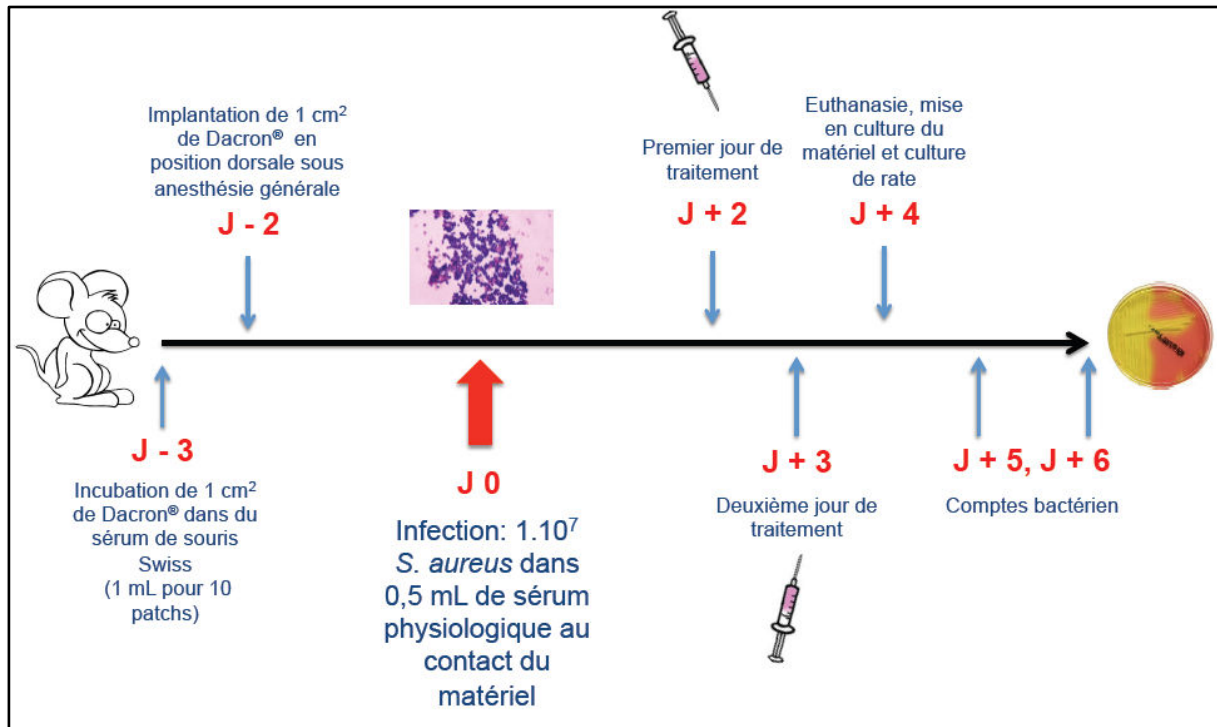
Adapté de Moskowitz *et al.*, J Clin Microbiol, 2004<sup>145</sup>



**Figure 12.** Mesure des concentrations minimales inhibitrices au sein du biofilm associé au Dacron® (dCMIB ou dMBIC dans l'article)

Les patches de Dacron® sont préalablement infectés par *S. aureus* puis plongés dans du milieu de Mueller-Hinton (MH) contenant des doses croissantes d'antibiotique. La concentration premier tube dans lequel aucune pousse n'est constatée par lecture optique correspond à la dCMIB.

Pour les concentrations minimales éradicatrices au sein du biofilm (dCMEB ou dMBEC dans l'article), on reprend les Dacron® des tubes sans pousse constatée en dCMIB. Ils sont rincés trois fois dans de l'eau stérile, soniqués (35 kHz, 5 minutes) puis vortexés pendant 30 secondes. Ils sont ensuite remis en culture 24h à 37°C dans du MH. Le premier tube dans lequel aucune pousse n'est constatée donne la dCMEB.



**Figure 13.** Plan expérimental des infections de matériel vasculaire chez la souris avec évaluation de l'efficacité thérapeutique de différents protocoles d'antibiothérapie

### **2.3.2. Résultats**

L'ensemble des résultats est exposé dans l'article. Nous ne rajoutons ici que les résultats de décroissance bactérienne comparée en fonction des souches et des protocoles thérapeutiques utilisés sous forme de tableau, ces résultats étant exposés sous forme de figure dans l'article.

**Tableau 3.** Diminution de la charge bactérienne sur Dacron® selon la souche bactérienne et les protocoles thérapeutiques.

NA : non applicable

Protocoles thérapeutiques	Diminution de la charge bactérienne par rapport aux contrôles (moyenne (IC 95%) $\Delta\log_{10}$ UFC/cm <sup>2</sup> )					
	SAMS			SARM		
	171	176	27217	BCB8	117	33591
Cloxacilline	- 2,44 (1,06; 3,82)***	-1,88 (0,87; 2,88)***	- 1,12 (0,42; 1,92)**	NA	NA	NA
Vancomycine	- 0,79 (-0,73; 2,31)	- 2,04 (0,74; 3,35)**	- 1,24 (0,30; 2,20)**	- 2,38 (1,00; 3,73)**	- 2,30 (0,42; 4,19)*	- 2,46 (1,1; 3,84)***
Daptomycine	- 2,72 (1,61; 3,83)***	- 3,15 (2,25; 4,05)***	- 1,52 (0,68; 2,36)***	- 5,85 (4,34; 7,36)***	- 2,55 (0,67; 4,34)**	- 1,85 (0,5; 3,24)**
Rifampicine	- 2,13 (0,5; 3,77)*	- 3,72 (2,52; 4,92)***	- 2,99 (2,01; 3,97)***	- 4,45 (3,04; 5,85)***	- 3,36 (1,11; 5,61)**	-2,43 (0,67; 4,25)*
Cloxacilline-Rifampicine	- 1,6 (-0,22; 3,41)	- 3,15 (1,85; 4,45)***	- 4,58 (3,49; 5,67)***	NA	NA	NA
Vancomycine-Rifampicine	- 3,38 (1,56; 5,19)***	- 2,77 (1,48; 4,07)***	- 5,00 (4,05; 5,94)***	- 4,14 (2,67; 5,61)***	- 3,75 (1,63; 5,86)**	- 3,05 (1,22; 4,9)**
Daptomycine-Rifampicine	- 2,1 (0,46; 3,73)*	- 3,16 (1,86; 4,47)***	- 2,82 (1,91; 3,74)***	- 5,85 (4,34; 7,36)***	- 2,67 (0,55; 4,78)*	- 2,52 (0,7; 4,34)**

Les comparaisons sont faites par rapport aux groupes contrôles par un test de Bonferroni après une analyse de variance Anova.

\*  $P < 0,05$  ; \*\*  $P < 0,01$  ; \*\*\*  $P < 0,001$ . Pas de différence significative si absence d'étoile.

## 2.4. Visualisation du biofilm

Les différences constatées lors des expérimentations précédentes sont parfois surprenantes. L'une des explications pourrait être un effet différentiel des divers protocoles d'antibiothérapie sur la structure même du biofilm. Nous avons donc cherché à visualiser le Dacron® *in vivo* exposé à ces différents traitements. Ceci a été réalisé par microscopie confocale à fluorescence, en collaboration avec l'équipe de l'institut des sciences moléculaires d'Orsay du CNRS, université de Paris Sud. Rym Boudjemaa notamment, qui y effectue sa thèse d'université sous la direction du Dr Karine Steenkeste et du Pr Marie-Pierre Fontaine-Aupart, a participé autant à cette partie que l'auteur de ce mémoire.

### 2.4.1. Matériels et méthodes

#### Procédures chez l'animal

Des souris Swiss pesant de 20 à 24 g sont implantées avec des patchs de Dacron®, matériel qui sera secondairement infecté par *S. aureus* selon exactement les mêmes modalités que celles décrites dans la partie 2.3. de cet exposé. Pour limiter le nombre d'animaux utilisés, seules les souches BCB8 (SARM) et 27217 (SAMS) ont été évaluées.

Quarante-huit heures après l'infection du Dacron®, les souris sont traitées avec les mêmes protocoles thérapeutiques que ceux décrits plus haut. Les groupes thérapeutiques sont pour BCB8 : pas d'antibiothérapie (groupe contrôle), vancomycine, daptomycine, rifampicine, vancomycine – rifampicine et daptomycine – rifampicine. Pour 27217 : mêmes groupes + cloxacilline et cloxacilline – rifampicine. Le traitement dure 48 heures puis les souris sont euthanasiées selon les mêmes modalités que celles utilisées auparavant.

Pour chaque condition, 4 souris sont utilisées : 2 pour compte bactérien et 2 pour imagerie confocale.

#### Microscopie confocale

Après euthanasie, les souris sont explantées et chaque patch de Dacron® est déposé dans une chambre de culture Lab-Tek® contenant 500 µL d'eau physiologique. Avant chaque observation, les bactéries sont marquées à l'aide de 2.5 µM de Syto9® (Invitrogen) et de 5 µL

d'une solution à 1 mg/mL de iodure de propidium (IP, Invitrogen). Ces deux fluorophores sont des intercalants des acides nucléiques des cellules eucaryotes ou procaryotes. Le Syto9<sup>®</sup> pénètre l'ensemble des cellules, mortes et vivantes, tandis que l'IP ne peut franchir la paroi cellulaire des cellules mortes uniquement.

Les bactéries sont alors observées à l'aide d'un microscope confocal commercial Leica TCS SP5, équipé d'un objectif à immersion à huile de grossissement x63 et d'ouverture numérique 1,4. Le Syto9<sup>®</sup> et l'IP sont excités à 488 nm et 543 nm respectivement et leurs émissions de fluorescence sont collectées entre 500 et 600 nm pour le Syto9<sup>®</sup>, et entre 640 et 750 nm pour l'IP. L'acquisition est effectuée sur toute l'épaisseur du biofilm avec un déplacement axial de 1 µm. Les images obtenues ont une dimension de 246x246 µm<sup>2</sup> à 41x41 µm<sup>2</sup> selon le zoom numérique utilisé (x1 à x6). Pour chaque condition, au moins 4 zones différentes sont analysées. Les images sont ensuite reconstruites en 3D en utilisant le logiciel ICY<sup>®</sup>. Pour des raisons de difficultés techniques (les images pouvaient parfois devenir floues...), il n'a malheureusement pas été toujours possible de réaliser des acquisitions d'image au même zoom numérique selon les conditions évaluées. Nous avons essayé, dans la mesure des possibles d'obtenir des images à des grossissements très proches d'une condition à l'autre, tout en gardant une bonne résolution.

#### **2.4.2. Résultats**

Pour tous les patchs analysés, on visualise des cellules eucaryotes sur la surface du Dacron<sup>®</sup> en nombre plus ou moins important selon les conditions. La densité en cellules eucaryotes apparaît comme directement corrélée à la densité bactérienne et au volume du biofilm présent. Les bactéries, pour la plupart, sont enchâssées dans une structure réticulaire fluoresçant en vert (donc marquée au Syto9<sup>®</sup>) que les cellules eucaryotes peuvent parfois pénétrer (figures 14 à 20). Cette structure extracellulaire correspond probablement au biofilm.

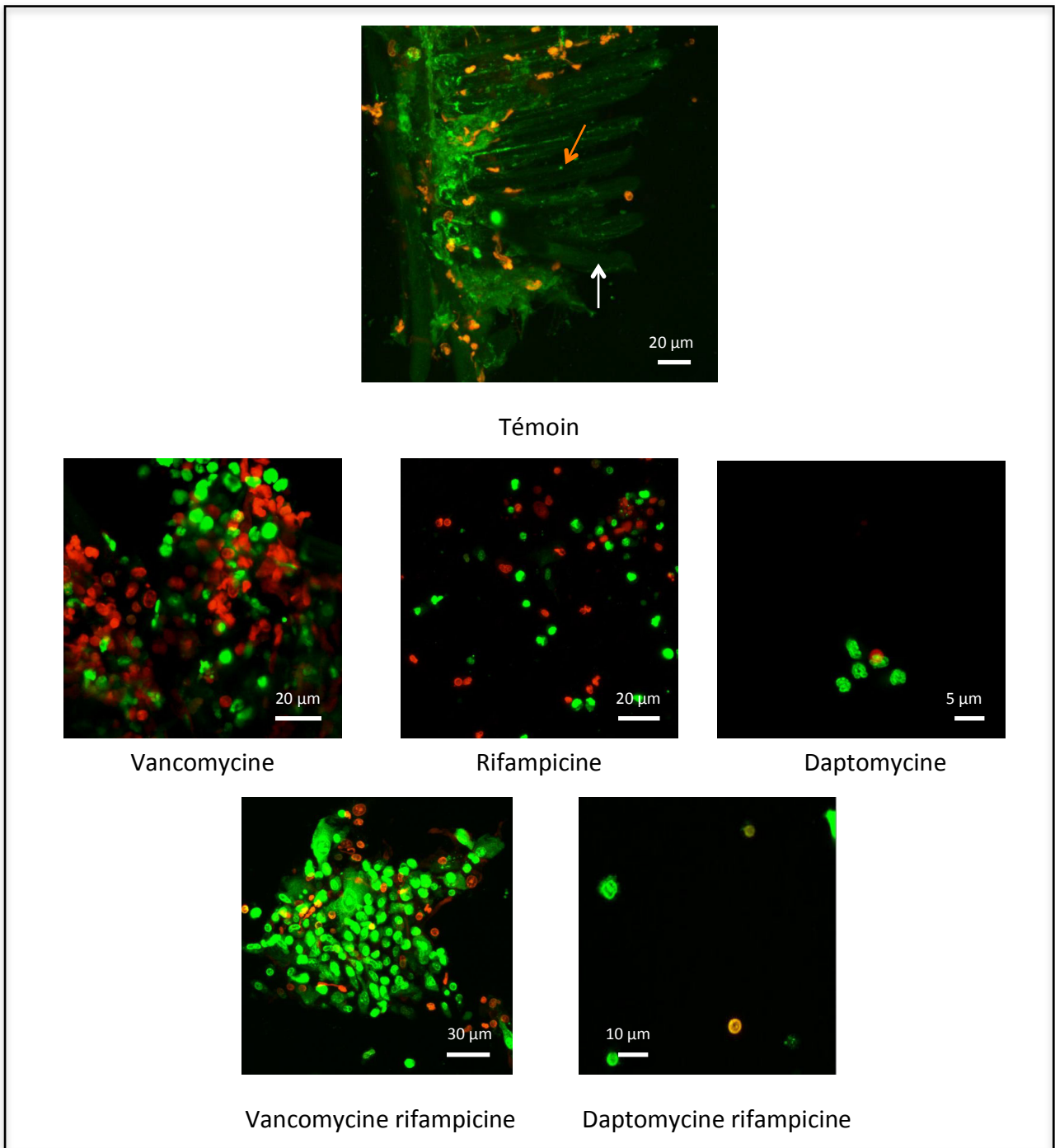
#### **SARM BCB8**

L'aspect des biofilms est totalement différent d'une condition à l'autre. Le biofilm est épais et dense pour les souris témoins n'ayant pas reçu d'antibiotique sur l'ensemble du

patch. A l'inverse, il est quasi inexistant avec des patches pratiquement vierges de la moindre structure autre que le Dacron® pour les souris traitées par daptomycine ou daptomycine + rifampicine (figure 14). Les images fournies dans les figures 14 et 15 correspondent d'ailleurs pour ces conditions aux seules zones sur lesquelles des structures cellulaires ont été visualisées pour l'ensemble des patches analysés. Pour la vancomycine, le biofilm est moins épais que pour les souris et surtout moins dense. Il existe des structures comme celle visualisée dans la figure 14, mais qui n'intéressent pas l'ensemble du patch. Les résultats sont similaires pour l'association vancomycine-rifampicine. Les biofilms visualisés pour la monothérapie rifampicine sont d'ailleurs moins importants que cette bithérapie et la monothérapie vancomycine.

Beaucoup de cellules eucaryotes situées au sein ou à côté du biofilm sont mortes (apparaissant en rouge), sans qu'il ne semble exister de différences sur ce point entre les conditions pour lesquelles un biofilm est présent (les groupes daptomycine et daptomycine-rifampicine ne sont pas concernés).

Certaines précisions sont apportées par les figures 15 à 17 grâce à des grossissements plus importants. On y voit notamment que des bactéries sont parfois présentes en position intracellulaire. D'ailleurs, pour la daptomycine, nous n'avons retrouvé que des bactéries en position intracellulaire et seulement à deux reprises après l'analyse de l'ensemble de la surface des patches de Dacron®.

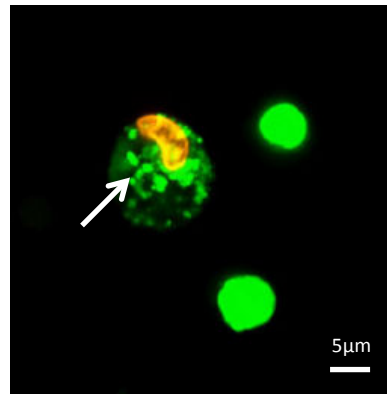


**Figure 14.** Visualisation globale du biofilm *in vivo* sur Dacron® infecté par SARM BCB8

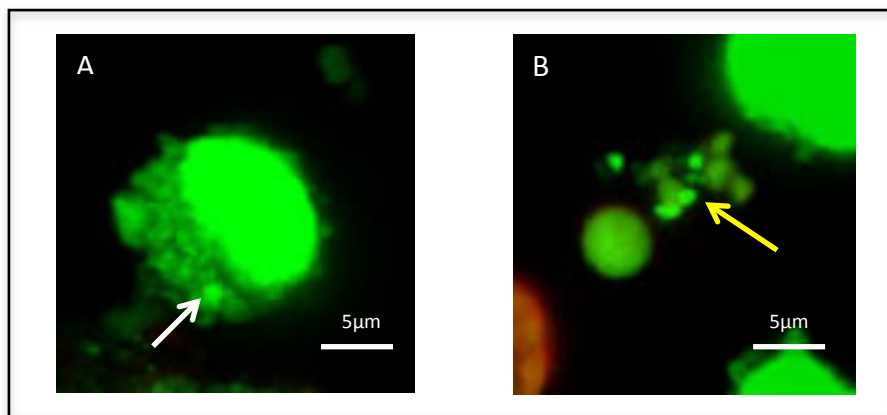
Visualisation pour double marquage Syto9® (cellules vivantes en vert) et Iodure de Propidium (cellules mortes en rouge) selon le protocole thérapeutique utilisé. Les échelles sont spécifiques à chaque imagerie.

La flèche blanche désigne les structures réticulaires extracellulaires correspondant probablement à la structure extracellulaire du biofilm. La flèche rouge signale un corps bactérien vivant (vert) enchâssé dans cette structure.

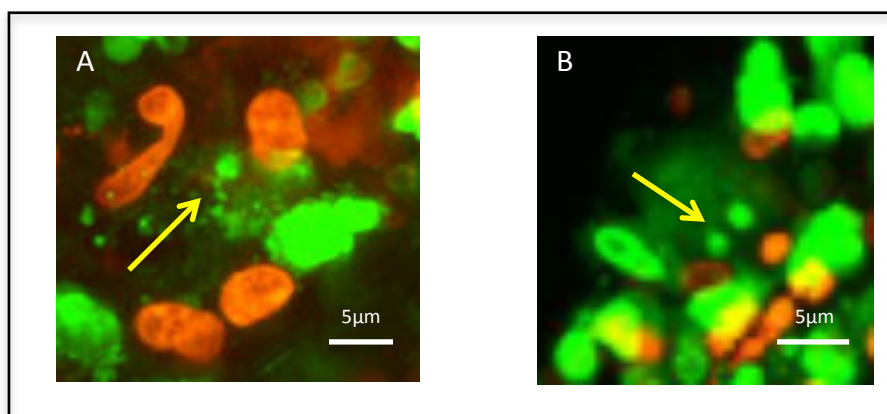




**Figure 15.** Imagerie du Dacron®, SARM BCB8, groupe témoin  
Visualisation de bactéries en position intracellulaire (flèche blanche) dans une cellule eucaryote en voie de mort cellulaire (noyau marqué à l'IP)



**Figure 16.** Imagerie du Dacron®, SARM BCB8, groupes daptomycine (A) et daptomycine-rifampicine (B)  
Visualisation de bactéries en position intracellulaire (flèche blanche figure 16A) dans une cellule eucaryote vivante (noyau marqué au Syto9®) et bactéries enchâssées dans du biofilm (flèche jaune figure 16B)

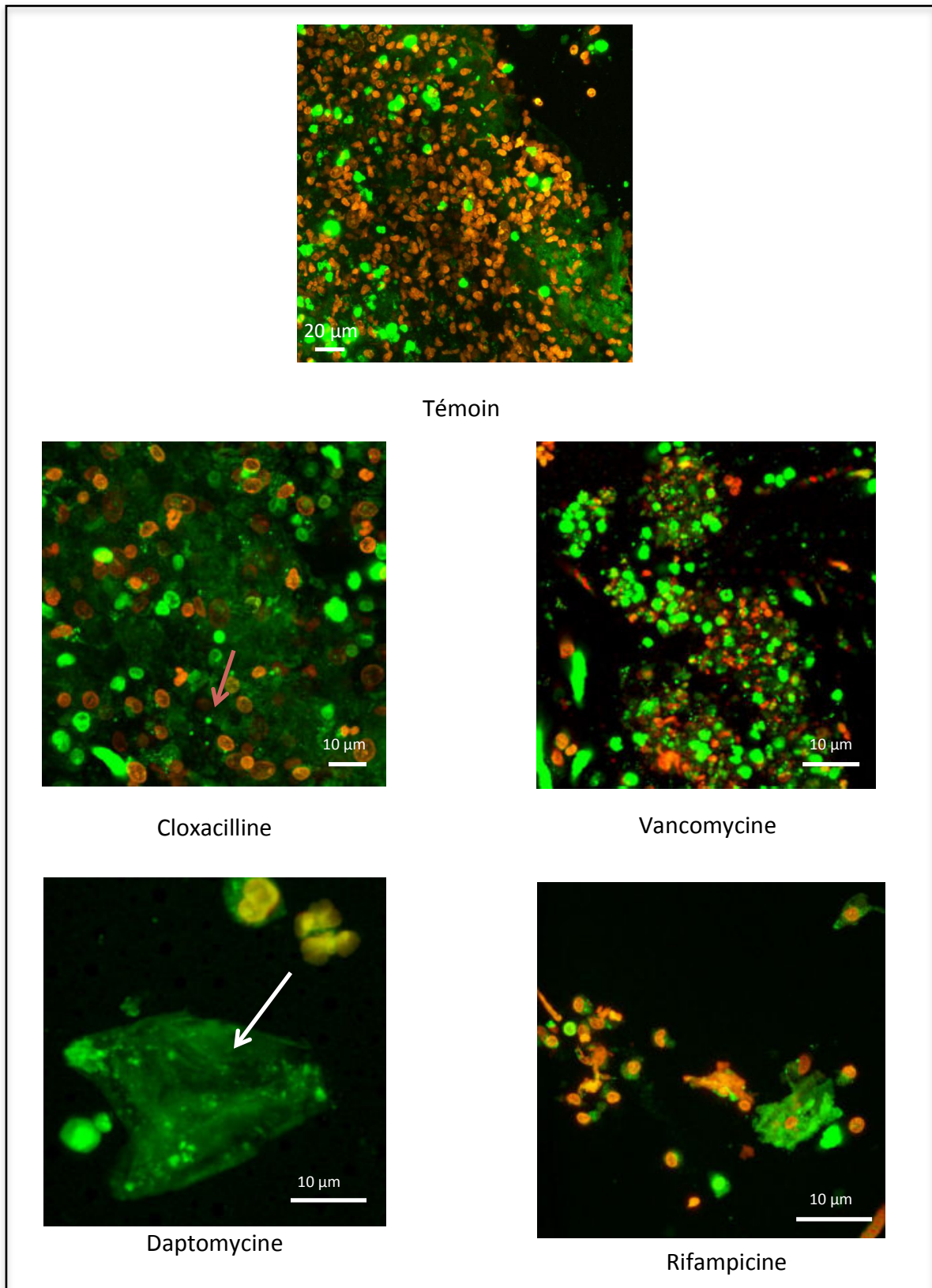


**Figure 17.** Imagerie du Dacron®, SARM BCB8, groupes vancomycine (A) et vancomycine-rifampicine (B)  
Visualisation de bactéries enchâssées dans du biofilm (flèches jaunes)

### **SAMS 27217**

Là-aussi, l'aspect des biofilms est différent selon les conditions avec un biofilm très épais et dense dans le groupe témoin mais également dans les groupes cloxacilline et vancomycine. Pour les monothérapies, ce sont les Dacron® traités par rifampicine pour lesquels le biofilm semble le moins important alors que la daptomycine se trouve en position intermédiaire (figure 18).

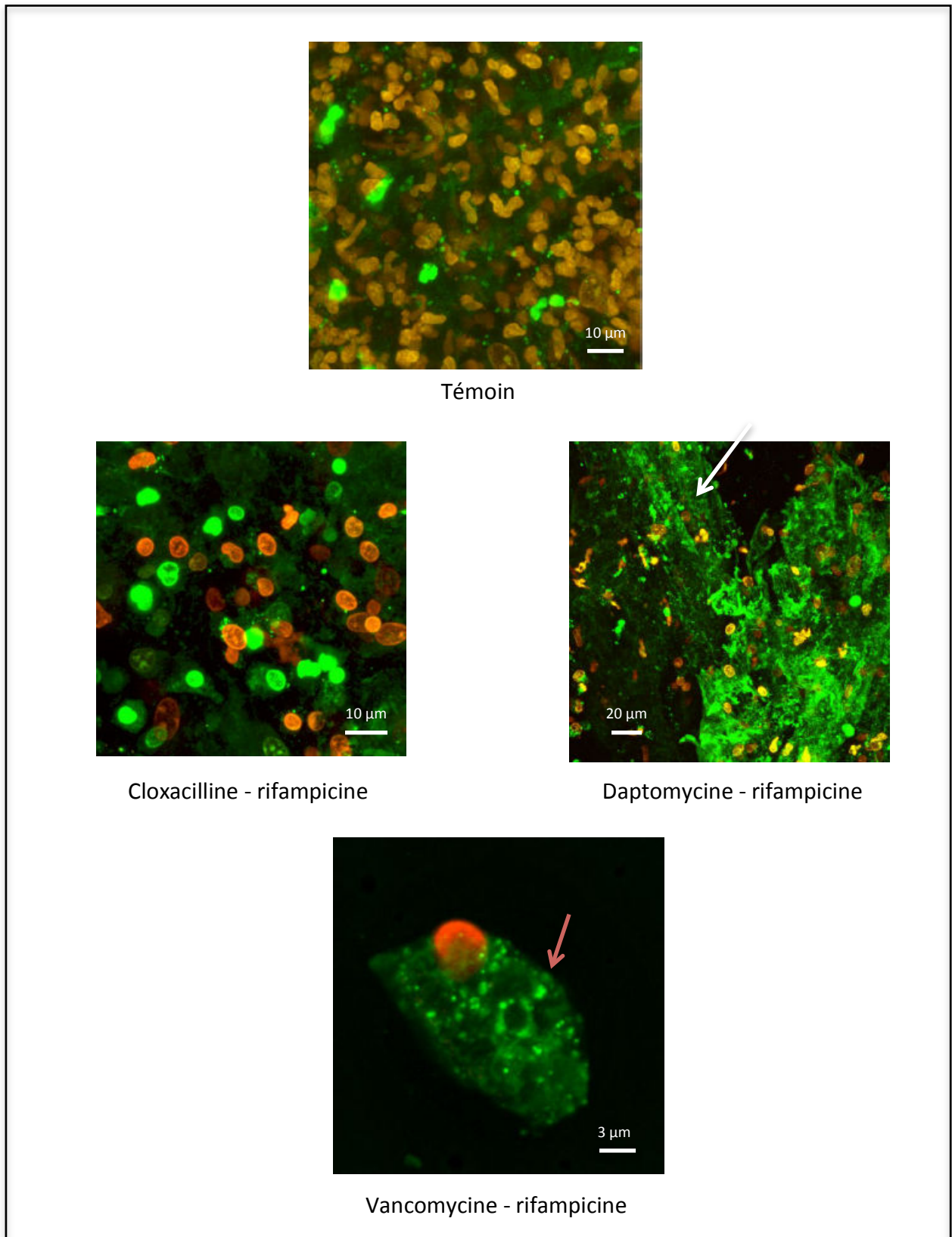
Pour les bithérapies, le biofilm visualisé pour le groupe daptomycine – rifampicine est très dense et épais (figures 19 et 20). Ceci n'est pas le cas pour le groupe cloxacilline – rifampicine et surtout pour le groupe vancomycine – rifampicine pour lequel le Dacron® était presque entièrement « nu » avec seulement quelques structures visualisées (figure 19).



**Figure 18.** Visualisation globale du biofilm *in vivo* sur Dacron® infecté par SAMS 27217 : monothérapies

Visualisation pour double marquage Syto9® (cellules vivantes en vert) et Iodure de Propidium (cellules mortes en rouge) selon le protocole thérapeutique utilisé. Les échelles sont spécifiques à chaque imagerie.

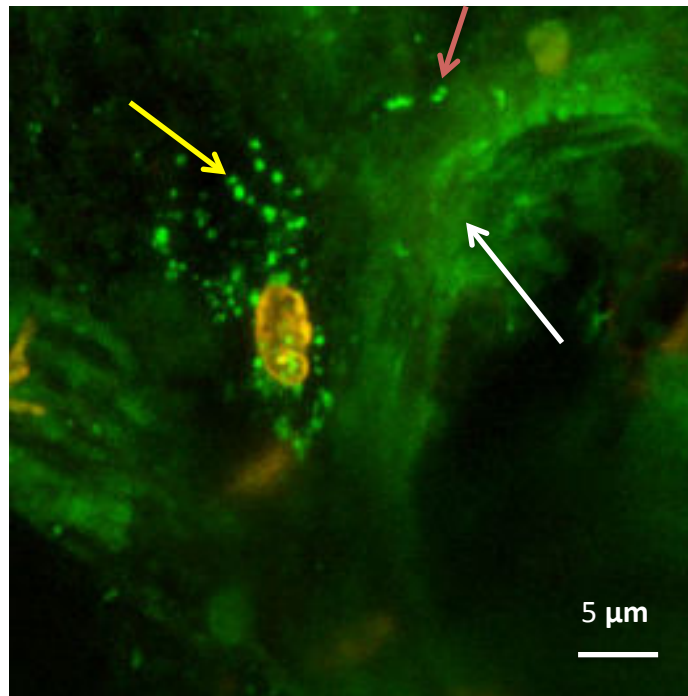
La flèche blanche désigne les structures extracellulaires du biofilm. La flèche rouge signale un corps bactérien vivant (vert) enchâssé dans cette structure.



**Figure 19.** Visualisation globale du biofilm *in vivo* sur Dacron® infecté par SAMS 27217 : bithérapies

Visualisation pour double marquage Syto9® (cellules vivantes en vert) et Iodure de Propidium (cellules mortes en rouge) selon le protocole thérapeutique utilisé. Les échelles sont spécifiques à chaque imagerie.

La flèche blanche désigne les structures extracellulaires du biofilm. La flèche rouge signale un corps bactérien vivant (vert) enchâssé dans cette structure.



**Figure 20.** Visualisation du biofilm sur Dacron® traité par daptomycine – rifampicine  
Visualisation pour double marquage Syto9® (cellules vivantes en vert) et Iodure de Propidium (cellules mortes en rouge).  
La flèche blanche désigne les structures extracellulaires du biofilm. La flèche rouge signale un corps bactérien vivant (vert) enchâssé dans cette structure et la flèche jaune des bactéries en position intracellulaire (cellule en voie de mort cellulaire car noyau marqué à l'IP)

## **Discussion**

Notre travail pourrait être synthétisé ainsi :

- La prise en charge médicale des infections de prothèses vasculaires ne repose sur aucune donnée scientifiquement validée et ne peut être guidée que par des avis d'experts ;
- Nous avons mis au point un modèle animal très reproductible d'infection de matériel vasculaire à *S. aureus*, dans l'optique d'évaluer plusieurs protocoles d'antibiothérapie ;
- Nous y avons associé un modèle *in vitro* permettant de mesurer l'impact du biofilm à *S. aureus* en termes de diminution de susceptibilité aux antibiotiques, non pas sur plastique comme il est classiquement décrit dans la littérature, mais directement sur Dacron®, biomatériau utilisé en pratique clinique ;
- Dans ces modèles, nous avons montré que :
  - La susceptibilité de *S. aureus* est effectivement impactée par le biofilm *in vitro* sur Dacron® mais de façon moins importante que sur plastique, laissant à penser que les techniques classiquement utilisées jusque là, pourraient avoir tendance à surestimer l'impact du biofilm en termes de baisse d'efficacité des antibiotiques ;
  - L'efficacité des antibiotiques *in vivo* est variable d'une molécule à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre ;
  - La daptomycine en monothérapie semble la plupart du temps aussi efficace que les comparateurs, mais est parfois plus efficace ;
  - L'ajout de rifampicine, si elle semble intéressante pour la cloxacilline et la vancomycine, ne semble pas utile voire délétère pour la daptomycine ;

- La visualisation du biofilm dans notre modèle en microscopie confocale apporte un éclaircissement supplémentaire puisqu'elle montre une structure du biofilm complètement différente selon les différentes conditions, celles démontrant l'effet antibactérien *in vivo* le plus important étant celles pour lesquelles le biofilm est le moins développé.

Il ne s'agit pas ici de revenir sur l'ensemble du travail et de commenter une nouvelle fois ce qui a été déjà discuté dans les deux articles exposés plus haut. Il s'agit d'insister sur les points particulièrement importants et de discuter les éléments nouveaux apportés notamment par la troisième partie du travail expérimental.

L'évaluation *in vitro* de l'efficacité des antibiotiques testés sur des bactéries adhérentes au Dacron<sup>®</sup> nous semblait intéressante. La diminution de cette efficacité sur les bactéries incluses dans un biofilm est bien connue<sup>99</sup>, en particulier pour *S. aureus*<sup>150, 173</sup>. Pour autant, la plupart des travaux s'intéressant à cette problématique, utilise des techniques *in vitro* sur polystyrène, structure finalement assez éloignée des matériaux utilisés pour les prothèses vasculaires. Notre hypothèse était donc que la diminution d'efficacité des antibiotiques pouvait être variable selon la nature du support utilisé. Nous avons donc comparé les résultats obtenus avec la méthode la plus largement utilisée, à savoir la technique de Calgary modifiée<sup>138, 145</sup>, à ceux retrouvés à l'aide d'un modèle original de biofilm sur Dacron<sup>®</sup>.

Nous avons pu montrer que le biofilm créé sur le Dacron<sup>®</sup> était beaucoup moins dense et épais que celui formé sur le polystyrène (figure 1 de l'article soumis au JAC) ce qui pouvait présager de résultats différents en termes d'efficacité des antibiotiques. Ceci a été confirmé : les MBEC (obtenues sur polystyrène) étaient en effet beaucoup plus élevées que les dMBEC (obtenues sur Dacron<sup>®</sup>). Les dMBIC et MBIC différaient peu mais notons que dans toutes les publications s'intéressant à cette problématique et notamment dans celle qui a initié ces évaluations<sup>145</sup>, seules les concentrations minimales éradicatrices sont indiquées, les concentrations minimales inhibitrices semblant pour les auteurs de ces travaux moins pertinentes. Nos résultats illustrent donc la nécessité d'utiliser des conditions expérimentales aussi proches que possible des situations cliniques d'intérêt et confirment que, même s'ils sont informatifs, les résultats obtenus sur un matériau particulier ne



peuvent pas systématiquement être appliqués à un autre. Nos résultats sont d'ailleurs en accord avec ceux de certains auteurs qui avaient montré que les résultats obtenus sur polystyrène n'étaient pas corrélés à une réponse *in vivo* expérimentale<sup>174</sup> ou clinique<sup>175</sup> et qui plaidaient pour une interprétation précautionneuse des informations issues de ces évaluations.

Nous avons ensuite mis au point un modèle original d'infection de modèle vasculaire chez la souris. Ce modèle a démontré une grande reproductibilité et nous a permis d'évaluer un nombre important de combinaisons d'antibiotiques sur différentes souches bactériennes. Pour autant, l'une des principales faiblesses de notre travail vient de la nature « extra-anatomique » de notre modèle. Nous aurions en effet préféré pouvoir implanter nos prothèses directement sur le réseau vasculaire de l'animal mais ceci s'est révélé impossible du fait de difficultés chirurgicales évidentes. Nous avons donc opté pour l'implantation de nos patches en sous-cutané, en position dorsale. Nous ne répéterons pas ce qui a été développé dans la discussion de l'article soumis au JAC mais nous rappellerons les trois éléments qui, de notre point de vue, justifient cette approche :

- Comme décrit dans la partie bibliographique, la contamination des infections de prothèse vasculaire se fait majoritairement à partir des tissus périphériques de la prothèse et pas par voie hématogène<sup>41, 78, 79, 81, 85-87</sup>. Notre modèle s'apparente à cette physiopathologie ;
- D'autres auteurs ont déjà utilisé ce type de modèle extra-anatomique pour valider des procédures de prévention des infections de matériels vasculaires<sup>79, 143, 152, 153</sup> ou pour évaluer certains traitements curatifs d'infection de matériel représentant des infections de prothèses ostéo-articulaires<sup>140, 154-158</sup> ;
- Enfin, la simplicité de notre modèle permettait l'implantation de nombreux animaux en respectant l'éthique puisque la mortalité induite et les souffrances provoquées par les procédures étaient minimales voire nulles.

Une autre faiblesse de notre travail est d'ordre pharmacologique. L'utilisation de la cloxacilline posait notamment problème puisque présentant un profil pharmacocinétique/pharmacodynamie (PK/PD) probablement sous optimal. Nous avons

tenté de sensibiliser le modèle en ralentissant l'excrétion rénale de la cloxacilline chez la souris, soit en créant une insuffisance rénale, soit en l'associant au probénecide qui ralentit l'excrétion tubulaire des pénicillines. Ces tentatives ont malheureusement été décevantes et donc interrompues. L'insuffisance rénale créée par l'injection d'acide folique était notamment très modérée, et possiblement non suffisante pour entraîner une modification satisfaisante des paramètres PK/PD. D'autres modèles d'insuffisance rénale existent chez la souris. Des modèles « chirurgicaux » par clampage du pédicule rénal<sup>176</sup> ou néphrectomie partielle<sup>177</sup> ont été développés avec une certaine efficacité. Mais il s'agit là de modèles particulièrement lourds, associés à une mortalité importante et à de possibles souffrances, rendant leur utilisation impossible pour nos travaux. Les régimes à base d'adénine peuvent également induire des tubulopathies chez la souris, mais nécessitent pour ce faire, un traitement préalable de 8 semaines rendant leur utilisation difficile<sup>178</sup>. L'utilisation de cisplatine<sup>179</sup> a été rapidement éliminée car induisant un biais dans les expérimentations du fait de l'immunodépression induite dans le groupe qui aurait été traité.

Ce sont finalement les modèles à base d'uranyl-nitrate qui semblaient les plus séduisants. Ils ont en effet été développés spécifiquement pour induire une insuffisance rénale chez la souris et permettre une utilisation pharmacologiquement humanisée des bêta-lactamines<sup>180, 181</sup>. Il s'agit d'un produit radioactif et si la commande ne posait guère de problème (quelques clics sur un site internet et un numéro de carte bleue valide...), la livraison et l'utilisation étaient plus complexes puisque nécessitant des combinaisons de protection radiologique de très haut niveau... Le site internet nous indiquait également que cet achat était tracé et communiqué aux autorités compétentes. L'obtention hors circuit officiel de produits radioactifs pouvant poser quelques soucis en ces temps de vigilance accrue des autorités, nous avons préféré, peut-être lâchement, renoncer à ce projet...

Toujours est-il, que nos essais d'optimisation pharmacologique de l'utilisation des bêta-lactamines dans notre modèle se sont révélés infructueux et que ceci constitue une faiblesse indéniable de notre travail.

Malgré cela, l'évaluation de différents protocoles d'antibiothérapie dans notre modèle a donné des résultats intéressants. Les résultats des efficacités comparatives de ces différents protocoles sur les cultures de Dacron® ont déjà été largement discutés dans l'article soumis

au JAC et nous n'y reviendrons pas ici. Par contre, il convient de discuter les résultats de culture de rate qui ont été surprenants et, il faut l'avouer, décevants. Une culture de rate positive est souvent considérée dans les modèles murins, comme le témoin de la dissémination de l'infection par voie hématogène<sup>182</sup>. Les premières expérimentations, s'intéressant aux SARM BCB8 et 117, étaient plutôt encourageants, avec des résultats de culture de rate en accord avec ceux du Dacron<sup>®</sup> : les conditions retrouvant des cultures très faiblement positives voire négatives du matériau, étaient négatives en culture splénique. Malheureusement, ceci n'a pas été confirmé par la suite avec l'absence de corrélation nette entre culture de Dacron<sup>®</sup> et culture splénique pour les autres conditions même si les cultures étaient plus fréquemment positives dans les groupes témoins que dans les groupes thérapeutiques. Ceci rend difficile l'interprétation de ces résultats et pose la question de l'intérêt de cette analyse dans notre modèle. Nous avons comparé les charges bactériennes au niveau splénique selon les conditions en supposant que cette donnée pouvait être plus discriminante que la mesure bactérienne qualitative de la rate. Malheureusement, ces charges bactériennes étaient systématiquement très faibles (moins de 5 UFC par rate pour toutes les situations positives) et cette donnée n'était donc pas plus pertinente. Finalement, la seule conclusion à laquelle nous sommes arrivés, était que la culture de rate n'était pas, dans notre modèle, une donnée pertinente.

Plus intéressant, a été par contre, l'analyse comparative en microscopie confocale des biofilms sur Dacron<sup>®</sup> *in vivo*. Plusieurs auteurs ont déjà démontré des différences d'activité importantes entre antibiotiques au sein du biofilm. La rifampicine a montré qu'elle était souvent la molécule qui conservait la meilleure activité sur des biofilms de *S. aureus*<sup>161, 183-185</sup>. La daptomycine a, elle aussi, démontré une bonne activité dans ce contexte<sup>161, 186, 187</sup>. Plusieurs études se sont intéressées à la pénétration de ces différentes molécules au sein du biofilm<sup>164, 188-190</sup>. Mais ces travaux ont surtout été réalisés dans des modèles *in vitro* et les analyses *in vivo* sont beaucoup plus rares<sup>191</sup>. Nous avons donc cherché à visualiser par microscopie l'effet direct des antibiotiques sur le biofilm développé sur matériel vasculaire *in vivo*. Nous avons utilisé des marqueurs fluorescents orientés vers les acides nucléiques. Ces marqueurs et notamment le Syto9 ont déjà montré leur capacité à colorer les acides nucléiques extracellulaires que l'on peut trouver dans les biofilms à *S. aureus*<sup>192, 193</sup>.

Les résultats sont intéressants puisqu'ils montrent de très grandes variations dans l'épaisseur et la densité des biofilms selon les protocoles thérapeutiques. Par contre, et de façon très surprenante, les résultats pour une même molécule sont variables d'une souche bactérienne à l'autre. Ainsi, le biofilm développé lors de l'infection à BCB8 traitée par daptomycine est quasi inexistant alors qu'il est plus important pour SAMS 27217. Plus surprenante, est la constatation d'un biofilm beaucoup plus épais et dense lors de l'association de la rifampicine à la daptomycine pour cette même souche. Les expérimentations ont été répétées et ont montré les mêmes résultats. De plus, ces résultats sont en accord, et ce quelque soit les conditions de souche ou de traitement, avec ceux obtenus par les cultures du matériel explanté dans notre modèle animal. La combinaison de ces deux méthodes donnant des résultats concordants, incite à penser que l'impact sur le biofilm des différentes molécules utilisées semble primordial dans leur activité antibactérienne mais qu'elle peut être variable d'une souche à l'autre au sein d'une même espèce bactérienne. Nous n'avons pas encore d'explication à cette efficacité différentielle selon la souche. Des travaux, toujours réalisés en collaboration avec l'équipe de l'institut des sciences moléculaires sont actuellement en cours. Une étude *in vitro* cherche à analyser les interactions entre les antibiotiques (vancomycine et daptomycine) et les bactéries d'intérêt au sein du biofilm et est en voie de finalisation. Un travail prochain est envisagé, étudiant la diffusion en temps réel de la vancomycine et de la daptomycine marquées au sein du biofilm *in vivo*, pour essayer de mieux comprendre la dynamique d'action de ces molécules dans notre modèle. Nous espérons que ces futurs travaux permettront de mieux connaître les déterminants de ces actions différentes selon la molécule et la bactérie étudiée.

Une autre information intéressante apportée par la microscopie confocale, a été la visualisation de bactéries en position intracellulaire (figures 15, 16 et 20). Ceci avait déjà été rapporté pour les infections ostéo-articulaires<sup>194</sup>. A notre connaissance, ceci n'avait jamais été décrit dans le contexte des infections de prothèses vasculaires. Ces bactéries intracellulaires sont connues pour être des facteurs de récurrence d'infections sur matériel<sup>195, 196</sup>. Nous n'avons pas de certitude sur la nature des cellules dans lesquelles les bactéries se trouvent dans notre modèle, mais leur aspect évoque avant tout des macrophages ou des polynucléaires. Certaines de ces cellules sont mortes ou en voie de l'être (figures 15 et 20). Il peut paraître étonnant que cette position intracellulaire dans des

cellules phagocytaires, faites justement pour détruire les bactéries, puisse expliquer d'éventuels échecs thérapeutiques. Mais, dans notre modèle, les protocoles thérapeutiques les moins performants sont associés au plus grand nombre de cellules comportant des bactéries en intra-cytoplasmiques et de cellules mortes. Ceci irait dans le sens de travaux de certains auteurs qui ont décrits des mécanismes de persistances en intra-phagolysosomal de *S. aureus*, ces bactéries gardant leur capacité répliquative et pouvant, à un certain moment, accélérer leur multiplication et de ce fait, tuer leur cellule hôte<sup>197</sup>. Une des explications des différences d'efficacité constatées dans notre modèle pourrait venir de cette capacité plus ou moins importante des souches bactériennes à survivre en intracellulaire et d'une éventuelle efficacité différente selon les molécules sur ces formes particulières de bactéries.

Nous envisageons de poursuivre nos investigations, en identifiant les cellules visualisées par marquage phénotypique spécifique des monocytes murins. L'utilisation, comme précisé plus haut, d'antibiotiques marqués (vancomycine et daptomycine) pourrait également nous permettre de vérifier si ces antibiotiques peuvent accéder à ces bactéries intracellulaires et les détruire.

Il faut bien sûr rester vigilant quant à l'interprétation de ces résultats expérimentaux : ce qui est vrai in vitro ou chez l'animal ne l'est pas forcément en pratique clinique humaine ! Pour autant, il est rassurant de voir que les propositions thérapeutiques faites dans l'article publié dans l'IJAA ne sont pas en contradiction avec ces résultats. La cloxacilline et la vancomycine montrent une efficacité dans notre modèle et restent donc les traitements de référence en pratique clinique. Pour autant, la daptomycine représente une alternative crédible. Enfin, la rifampicine confirme son intérêt dans ce type d'infection de matériel. Son association avec des fluoroquinolones, comme proposée en tant que relai par voie orale, semble particulièrement séduisante, notamment pour la probable efficacité de cette association sur les bactéries intracellulaires<sup>198</sup>.

# Conclusion

Malgré une fréquence non négligeable et une gravité certaine, les infections de prothèses vasculaires ne bénéficient pour l'instant d'aucun cadre nosologique clairement défini. La conséquence en est une prise en charge médicale non standardisée, basée sur des analogies avec ce que l'on connaît pour d'autres infections. L'antibiothérapie de ces maladies n'a, pour l'instant, fait l'objet que de trop peu de recherches.

L'objectif de notre travail était donc d'évaluer certains protocoles d'antibiothérapie. L'utilisation d'un modèle animal d'infection de matériel vasculaire à *S. aureus* nous a permis d'obtenir des informations intéressantes sur l'efficacité comparée de plusieurs antibiotiques. Nous avons pu constater le rôle probablement majeur que joue le biofilm dans la résistance au traitement et la vraisemblable importance des bactéries en position intracellulaire dans la persistance de l'infection. Ces deux éléments, biofilm et bactéries intracellulaires, doivent certainement constituer une cible privilégiée dans le choix des traitements à utiliser et nous poursuivons les expérimentations en ce sens.

Mais nous n'avons étudié ici que le traitement des infections à *S. aureus*, bactérie, certes la plus fréquemment en cause, mais qui ne rend pas compte de l'intégralité de ces infections. D'autres travaux consacrés à d'autres pathogènes doivent donc être envisagés et nous venons de finir la mise au point d'un modèle équivalent à *Staphylococcus epidermidis*. Nous espérons que ce modèle pourra également nous donner des renseignements intéressants et que ces futurs travaux, associés à ceux présentés ici, permettront d'aider les cliniciens dans la prise en charge des patients victimes de ces infections.

## Références



1. Voorhees AB, Jr., Jaretzki A, 3rd, Blakemore AH. The use of tubes constructed from vinyon "N" cloth in bridging arterial defects. *Annals of surgery* 1952; **135**(3): 332-6.
2. HAS. Implants vasculaires. Révision de catégories homogènes de dispositifs médicaux. . Saint Denis, La Plaine; 2013.
3. Darouiche RO. Treatment of infections associated with surgical implants. *N Engl J Med* 2004; **350**(14): 1422-9.
4. Chakfe N, Dieval F, Thaveau F, et al. Substituts vasculaires. *Annales de chirurgie* 2004; **129**(5): 301-9.
5. Kapadia MR, Popowich DA, Kibbe MR. Modified prosthetic vascular conduits. *Circulation* 2008; **117**(14): 1873-82.
6. Post S, Kraus T, Muller-Reinartz U, et al. Dacron vs. polytetrafluoroethylene grafts for femoropopliteal bypass: a prospective randomised multicentre trial. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 2001; **22**(3): 226-31.
7. Hobson RW, 2nd, O'Donnell JA, Jamil Z, Mehta K. Below-knee bypass for limb salvage. Comparison of autogenous saphenous vein, polytetrafluoroethylene, and composite dacron-autogenous vein grafts. *Archives of surgery* 1980; **115**(7): 833-7.
8. Roll S, Muller-Nordhorn J, Keil T, et al. Dacron vs. PTFE as bypass materials in peripheral vascular surgery--systematic review and meta-analysis. *BMC surgery* 2008; **8**: 22.
9. Feugier P, Black RA, Hunt JA, How TV. Attachment, morphology and adherence of human endothelial cells to vascular prosthesis materials under the action of shear stress. *Biomaterials* 2005; **26**(13): 1457-66.
10. Scharn DM, Daamen WF, van Kuppevelt TH, van der Vliet JA. Biological mechanisms influencing prosthetic bypass graft patency: possible targets for modern graft design. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 2012; **43**(1): 66-72.
11. Roon AJ, Malone JM, Moore WS, Bean B, Campagna G. Bacteremic infectability: a function of vascular graft material and design. *The Journal of surgical research* 1977; **22**(5): 489-98.
12. Schmitt DD, Bandyk DF, Pequet AJ, Malangoni MA, Towne JB. Mucin production by *Staphylococcus epidermidis*. A virulence factor promoting adherence to vascular grafts. *Archives of surgery* 1986; **121**(1): 89-95.
13. Bergamini TM, Bandyk DF, Govostis D, Kaebnick HW, Towne JB. Infection of vascular prostheses caused by bacterial biofilms. *Journal of vascular surgery* 1988; **7**(1): 21-30.
14. Leport C, Goeau-Brissonniere O, Lebrault C, et al. Experimental colonization of a polyester vascular graft with *Staphylococcus aureus*: a quantitative and morphologic study. *Journal of vascular surgery* 1988; **8**(1): 1-9.
15. Leport C, Goeau-Brissonniere O, Lebrault C, Pechere JC. Les infections expérimentales de prothèses vasculaires: rôle du matériau dans la sensibilité à la colonisation et prophylaxie de l'infection tardive. *Medecine et maladies infectieuses* 1989; **19**(11 bis): 645-51.
16. Moore WS, Malone JM, Keown K. Prosthetic arterial graft material. Influence on neointimal healing and bacteremic infectibility. *Archives of surgery* 1980; **115**(11): 1379-83.
17. Gao H, Sandermann J, Prag J, Lund L, Lindholt JS. Prevention of primary vascular graft infection with silver-coated polyester graft in a porcine model. *European journal of*

- vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 2010; **39**(4): 472-7.
18. Hardman S, Cope A, Swann A, Bell PR, Naylor AR, Hayes PD. An *in vitro* model to compare the antimicrobial activity of silver-coated versus rifampicin-soaked vascular grafts. *Annals of vascular surgery* 2004; **18**(3): 308-13.
  19. Baldoni D, Haschke M, Rajacic Z, Zimmerli W, Trampuz A. Linezolid alone or combined with rifampin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in experimental foreign-body infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2009; **53**(3): 1142-8.
  20. Fischer PE, Schroepel TJ, Fabian TC, et al. Antibiotic-coated ePTFE decreases graft colonization and neointimal hyperplasia. *The Journal of surgical research* 2009; **156**(2): 199-204.
  21. Chervu A, Moore WS, Gelabert HA, Colburn MD, Chvapil M. Prevention of graft infection by use of prostheses bonded with a rifampin/collagen release system. *Journal of vascular surgery* 1991; **14**(4): 521-4; discussion 4-5.
  22. Chervu A, Moore WS, Chvapil M, Henderson T. Efficacy and duration of antistaphylococcal activity comparing three antibiotics bonded to Dacron vascular grafts with a collagen release system. *Journal of vascular surgery* 1991; **13**(6): 897-901.
  23. Stewart AH, Eyers PS, Earnshaw JJ. Prevention of infection in peripheral arterial reconstruction: a systematic review and meta-analysis. *Journal of vascular surgery* 2007; **46**(1): 148-55.
  24. Braithwaite BD, Davies B, Heather BP, Earnshaw JJ. Early results of a randomized trial of rifampicin-bonded Dacron grafts for extra-anatomic vascular reconstruction. Joint Vascular Research Group. *Br J Surg* 1998; **85**(10): 1378-81.
  25. D'Addato M, Curti T, Freyrie A. Prophylaxis of graft infection with rifampicin-bonded Gelseal graft: 2-year follow-up of a prospective clinical trial. Italian Investigators Group. *Cardiovasc Surg* 1996; **4**(2): 200-4.
  26. Bunt TJ. Synthetic vascular graft infections. I. Graft infections. *Surgery* 1983; **93**(6): 733-46.
  27. Clagett GP. Clinical research and vascular surgery. The Society for Vascular Surgery Ad Hoc Committee on Clinical Research. *Journal of vascular surgery* 1992; **15**(5): 867-8.
  28. Szilagyi DE, Smith RF, Elliott JP, Vrandecic MP. Infection in arterial reconstruction with synthetic grafts. *Annals of surgery* 1972; **176**(3): 321-33.
  29. Johnson JA, Cogbill TH, Strutt PJ, Gundersen AL. Wound complications after infrainguinal bypass. Classification, predisposing factors, and management. *Archives of surgery* 1988; **123**(7): 859-62.
  30. Samson RH, Veith FJ, Janko GS, Gupta SK, Scher LA. A modified classification and approach to the management of infections involving peripheral arterial prosthetic grafts. *Journal of vascular surgery* 1988; **8**(2): 147-53.
  31. Seabrook GR, Schmitt DD, Bandyk DF, Edmiston CE, Krepel CJ, Towne JB. Anastomotic femoral pseudoaneurysm: an investigation of occult infection as an etiologic factor. *Journal of vascular surgery* 1990; **11**(5): 629-34.
  32. Bandyk DF, Bergamini TM, Kinney EV, Seabrook GR, Towne JB. *In situ* replacement of vascular prostheses infected by bacterial biofilms. *Journal of vascular surgery* 1991; **13**(5): 575-83.
  33. Goeau-Brissonniere O. Les infections de prothèses artérielles. *Presse Med* 1995; **24**(9): 454-8.

34. Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control* 2008; **36**(5): 309-32.
35. Bandyk DF. Diagnosis and treatment of biomaterial-associated vascular infections. *Infect Dis Clin North Am* 1992; **6**(3): 719-29.
36. Bunt TJ, editor. *Vascular Graft Infections*. Armonk, NY: Futura Publishing Co., Inc.; 1994.
37. Teebken OE, Bisdas T, Assadian O, Ricco JB. Recommendations for reporting treatment of aortic graft infections. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 2012; **43**(2): 174-81.
38. Jensen LP, Nielsen OM, Jorgensen L, Lorentzen JE. Conservative treatment of vascular graft infections in the groin. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 1997; **14 Suppl A**: 43-6.
39. Ehsan O, Gibbons CP. A 10-year experience of using femoro-popliteal vein for re-vascularisation in graft and arterial infections. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 2009; **38**(2): 172-9.
40. Kieffer E, Gomes D, Chiche L, Fléron MH, Koskas F, Bahnini A. Allograft replacement for infrarenal aortic graft infection: early and late results in 179 patients. *Journal of vascular surgery* 2004; **39**(5): 1009-17.
41. FitzGerald SF, Kelly C, Humphreys H. Diagnosis and treatment of prosthetic aortic graft infections: confusion and inconsistency in the absence of evidence or consensus. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2005; **56**(6): 996-9.
42. Legout L, Sarraz-Bournet B, D'Elia PV, et al. Characteristics and prognosis in patients with prosthetic vascular graft infection: a prospective observational cohort study. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2012; **18**(4): 352-8.
43. Szczot M, Meybeck A, Legout L, et al. Vascular graft infections in the intensive care unit: clinical spectrum and prognostic factors. *J Infect* 2011; **62**(3): 204-11.
44. Saleem BR, Meerwaldt R, Tielliu IF, Verhoeven EL, van den Dungen JJ, Zeebregts CJ. Conservative treatment of vascular prosthetic graft infection is associated with high mortality. *American journal of surgery* 2010; **200**(1): 47-52.
45. Stone PA, Armstrong PA, Bandyk DF, et al. Use of antibiotic-loaded polymethylmethacrylate beads for the treatment of extracavitary prosthetic vascular graft infections. *Journal of vascular surgery* 2006; **44**(4): 757-61.
46. Antonios VS, Noel AA, Steckelberg JM, et al. Prosthetic vascular graft infection: a risk factor analysis using a case-control study. *J Infect* 2006; **53**(1): 49-55.
47. Camou F. Prise en charge des infections sur prothèse vasculaire: épidémiologie et fardeau de la maladie. 13ème Journées Nationales d'Infectiologie; 2013; Clermont Ferrand; 2013.
48. Revest M. Infections sur prothèse vasculaire: épidémiologie et fardeau de la maladie. Rencontres en Infectiologie; 2014; Paris; 2014.
49. la Societe de Pathologie Infectieuse de Langue F, College des Universitaires de Maladies Infectieuses et T, Groupe de Pathologie Infectieuse P, et al. Recommandations de pratique clinique: infections ostéo-articulaires sur matériel (prothèse, implant, ostéosynthèse). *Medecine et maladies infectieuses* 2009; **39**(11): 815-63.

50. Baddour LM, Epstein AE, Erickson CC, et al. Update on cardiovascular implantable electronic device infections and their management: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 2010; **121**(3): 458-77.
51. Erb S, Sidler JA, Elzi L, et al. Surgical and antimicrobial treatment of prosthetic vascular graft infections at different surgical sites: a retrospective study of treatment outcomes. *PloS one* 2014; **9**(11): e112947.
52. Heyer KS, Modi P, Morasch MD, et al. Secondary infections of thoracic and abdominal aortic endografts. *J Vasc Interv Radiol* 2009; **20**(2): 173-9.
53. Scerba M, Podlaha J, Kriz Z, Krejci Z. Infection of vascular prosthesis in aortofemoral area. *Bratisl Lek Listy* 2007; **108**(7): 312-5.
54. Mirzaie M, Schmitto JD, Tirilomis T, et al. Surgical management of vascular graft infection in severely ill patients by partial resection of the infected prosthesis. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 2007; **33**(5): 610-3.
55. Gabriel M, Pukacki F, Dzieciuchowicz L, Oszkinis G, Checinski P. Cryopreserved arterial allografts in the treatment of prosthetic graft infections. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 2004; **27**(6): 590-6.
56. Chiesa R, Astore D, Frigerio S, et al. Vascular prosthetic graft infection: epidemiology, bacteriology, pathogenesis and treatment. *Acta Chir Belg* 2002; **102**(4): 238-47.
57. Naylor AR, Hayes PD, Darke S. A prospective audit of complex wound and graft infections in Great Britain and Ireland: the emergence of MRSA. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 2001; **21**(4): 289-94.
58. Leseche G, Castier Y, Petit MD, et al. Long-term results of cryopreserved arterial allograft reconstruction in infected prosthetic grafts and mycotic aneurysms of the abdominal aorta. *Journal of vascular surgery* 2001; **34**(4): 616-22.
59. Coselli JS, Koksoy C, LeMaire SA. Management of thoracic aortic graft infections. *Ann Thorac Surg* 1999; **67**(6): 1990-3; discussion 7-8.
60. Jansen KU, Girgenti DQ, Scully IL, Anderson AS. Vaccine review: "Staphylococcus aureus vaccines: problems and prospects". *Vaccine* 2013; **31**(25): 2723-30.
61. Le Moing V, Alla F, Doco-Lecompte T, et al. *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infection and Endocarditis--A Prospective Cohort Study. *PloS one* 2015; **10**(5): e0127385.
62. Legout L, D'Elia P, Devos P, et al. Risk factors for methicillin-resistant staphylococcal vascular graft infection in an 11-year cohort study. *J Infect* 2012; **64**(4): 441-4.
63. Legout L, Delia P, Sarraz-Bournet B, et al. Factors predictive of treatment failure in staphylococcal prosthetic vascular graft infections: a prospective observational cohort study: impact of rifampin. *BMC infectious diseases* 2014; **14**: 228.
64. Hayes PD, Nasim A, London NJ, et al. *In situ* replacement of infected aortic grafts with rifampicin-bonded prostheses: the Leicester experience (1992 to 1998). *Journal of vascular surgery* 1999; **30**(1): 92-8.
65. Ali AT, Modrall JG, Hocking J, et al. Long-term results of the treatment of aortic graft infection by *in situ* replacement with femoral popliteal vein grafts. *Journal of vascular surgery* 2009; **50**(1): 30-9.
66. Batt M, Jean-Baptiste E, O'Connor S, et al. *In situ* revascularisation for patients with aortic graft infection: a single centre experience with silver coated polyester grafts.

*European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 2008; **36**(2): 182-8.

67. Bandyk DF, Novotney ML, Back MR, Johnson BL, Schmacht DC. Expanded application of *in situ* replacement for prosthetic graft infection. *Journal of vascular surgery* 2001; **34**(3): 411-9; discussion 9-20.

68. Oderich GS, Bower TC, Hofer J, et al. *In situ* rifampin-soaked grafts with omental coverage and antibiotic suppression are durable with low reinfection rates in patients with aortic graft enteric erosion or fistula. *Journal of vascular surgery* 2011; **53**(1): 99-106, 7 e1-7; discussion -7.

69. Batt M, Magne JL, Alric P, et al. *In situ* revascularization with silver-coated polyester grafts to treat aortic infection: early and midterm results. *Journal of vascular surgery* 2003; **38**(5): 983-9.

70. Vogt PR, Turina MI. Management of infected aortic grafts: development of less invasive surgery using cryopreserved homografts. *Ann Thorac Surg* 1999; **67**(6): 1986-9; discussion 97-8.

71. Vogt PR, Brunner-La Rocca HP, Carrel T, et al. Cryopreserved arterial allografts in the treatment of major vascular infection: a comparison with conventional surgical techniques. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998; **116**(6): 965-72.

72. Nevelsteen A, Lacroix H, Suy R. Infra-renal aortic graft infection: *in situ* aortoiliofemoral reconstruction with the lower extremity deep veins. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 1997; **14 Suppl A**: 88-92.

73. Fiorani P, Speziale F, Rizzo L, Taurino M, Giannoni MF, Lauri D. Long-term follow-up after *in situ* graft replacement in patients with aortofemoral graft infections. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 1997; **14 Suppl A**: 111-4.

74. Speziale F, Rizzo L, Sbarigia E, et al. Bacterial and clinical criteria relating to the outcome of patients undergoing *in situ* replacement of infected abdominal aortic grafts. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 1997; **13**(2): 127-33.

75. Darling RC, 3rd, Resnikoff M, Kreienberg PB, et al. Alternative approach for management of infected aortic grafts. *Journal of vascular surgery* 1997; **25**(1): 106-12.

76. Kieffer E, Sabatier J, Plissonnier D, Knosalla C. Prosthetic graft infection after descending thoracic/ thoracoabdominal aortic aneurysmectomy: management with *in situ* arterial allografts. *Journal of vascular surgery* 2001; **33**(4): 671-8.

77. Parola P, Alimi Y, Juhan C, Brouqui P. Les infections de prothèses vasculaires de l'aorte sous-rénale. *J Mal Vasc* 1999; **24**(3): 194-201.

78. Goeau-Brissoniere O, Pechere JC, Guidoin R, Noel HP, Couture J. Experimental colonization of vascular grafts with *Staphylococcus aureus*. *Canadian journal of surgery Journal canadien de chirurgie* 1983; **26**(6): 540-5.

79. Turgut H, Sacar S, Kaleli I, et al. Systemic and local antibiotic prophylaxis in the prevention of *Staphylococcus epidermidis* graft infection. *BMC infectious diseases* 2005; **5**: 91.

80. Goeau-Brissoniere O, Leport C, Guidoin R, Lebrault C, Pechere JC, Bacourt F. Experimental colonization of an expanded polytetrafluoroethylene vascular graft with *Staphylococcus aureus*: a quantitative and morphologic study. *Journal of vascular surgery* 1987; **5**(5): 743-8.

81. Hicks RC, Greenhalgh RM. The pathogenesis of vascular graft infection. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 1997; **14 Suppl A**: 5-9.
82. Kitamura T, Morota T, Motomura N, et al. Management of infected grafts and aneurysms of the aorta. *Annals of vascular surgery* 2005; **19**(3): 335-42.
83. Roy D, Grove DI. Efficacy of long-term antibiotic suppressive therapy in proven or suspected infected abdominal aortic grafts. *J Infect* 2000; **40**(2): 184-7.
84. Vogt PR, Brunner-LaRocca HP, Lachat M, Ruef C, Turina MI. Technical details with the use of cryopreserved arterial allografts for aortic infection: influence on early and midterm mortality. *Journal of vascular surgery* 2002; **35**(1): 80-6.
85. White JV, Freda J, Kozar R, et al. Does bacteremia pose a direct threat to synthetic vascular grafts? *Surgery* 1987; **102**(2): 402-8.
86. Rubin JR, Malone JM, Goldstone J. The role of the lymphatic system in acute arterial prosthetic graft infections. *Journal of vascular surgery* 1985; **2**(1): 92-8.
87. Jones L, Braithwaite BD, Davies B, Heather BP, Earnshaw JJ. Mechanism of late prosthetic vascular graft infection. *Cardiovasc Surg* 1997; **5**(5): 486-9.
88. Schmitt DD, Bandyk DF, Pequet AJ, Towne JB. Bacterial adherence to vascular prostheses. A determinant of graft infectivity. *Journal of vascular surgery* 1986; **3**(5): 732-40.
89. Siverhus DJ, Schmitt DD, Edmiston CE, et al. Adherence of mucin and non-mucin-producing staphylococci to preclotted and albumin-coated velour knitted vascular grafts. *Surgery* 1990; **107**(6): 613-9.
90. Richards JJ, Melander C. Controlling bacterial biofilms. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 2009; **10**(14): 2287-94.
91. Otto M. *Staphylococcus epidermidis*--the 'accidental' pathogen. *Nature reviews Microbiology* 2009; **7**(8): 555-67.
92. Stewart PS, Franklin MJ. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature reviews Microbiology* 2008; **6**(3): 199-210.
93. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews* 2002; **15**(2): 167-93.
94. Blazquez J. Hypermutation as a factor contributing to the acquisition of antimicrobial resistance. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2003; **37**(9): 1201-9.
95. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; **284**(5418): 1318-22.
96. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cellular microbiology* 2009; **11**(7): 1034-43.
97. Mah TF, Pitts B, Pellock B, Walker GC, Stewart PS, O'Toole GA. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* 2003; **426**(6964): 306-10.
98. Keren I, Kaldalu N, Spoering A, Wang Y, Lewis K. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS microbiology letters* 2004; **230**(1): 13-8.
99. Hoiby N, Bjarnsholt T, Moser C, et al. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2015; **21 Suppl 1**: S1-S25.
100. O'Connor S, Andrew P, Batt M, Becquemin JP. A systematic review and meta-analysis of treatments for aortic graft infection. *Journal of vascular surgery* 2006; **44**(1): 38-45.

101. Oderich GS, Bower TC, Cherry KJ, Jr., et al. Evolution from axillofemoral to in situ prosthetic reconstruction for the treatment of aortic graft infections at a single center. *Journal of vascular surgery* 2006; **43**(6): 1166-74.
102. Menawat SS, Gloviczki P, Serry RD, Cherry KJ, Jr., Bower TC, Hallett JW, Jr. Management of aortic graft-enteric fistulae. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 1997; **14 Suppl A**: 74-81.
103. Armstrong PA, Back MR, Bandyk DF, Johnson BL, Shames ML. Selective application of sartorius muscle flaps and aggressive staged surgical debridement can influence long-term outcomes of complex prosthetic graft infections. *Journal of vascular surgery* 2007; **46**(1): 71-8.
104. Illuminati G, Calio FG, D'Urso A, Giacobbi D, Papaspyropoulos V, Ceccanei G. Infrascrotal, perineal, femorofemoral bypass for arterial graft infection at the groin. *Archives of surgery* 2004; **139**(12): 1314-9.
105. Arbatli H, DeGeest R, Demirsoy E, et al. Management of infected grafts and mycotic aneurysms of the aorta using cryopreserved homografts. *Cardiovasc Surg* 2003; **11**(4): 257-63.
106. Daenens K, Fourneau I, Nevelsteen A. Ten-year experience in autogenous reconstruction with the femoral vein in the treatment of aortofemoral prosthetic infection. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 2003; **25**(3): 240-5.
107. Matsuura JH, Rosenthal D, Wellons ED, Castronovo CS, Fronk D. Hemodialysis graft infections treated with cryopreserved femoral vein. *Cardiovasc Surg* 2002; **10**(6): 561-5.
108. Seeger JM, Pretus HA, Welborn MB, Ozaki CK, Flynn TC, Huber TS. Long-term outcome after treatment of aortic graft infection with staged extra-anatomic bypass grafting and aortic graft removal. *Journal of vascular surgery* 2000; **32**(3): 451-9; discussion 60-1.
109. Nevelsteen A, Feryn T, Lacroix H, Suy R, Goffin Y. Experience with cryopreserved arterial allografts in the treatment of prosthetic graft infections. *Cardiovasc Surg* 1998; **6**(4): 378-83.
110. Sicard GA, Reilly JM, Doblaz M, et al. Autologous vein reconstruction in prosthetic graft infections. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 1997; **14 Suppl A**: 93-8.
111. Nevelsteen A, Lacroix H, Suy R. Infections de prothèses de l'aorte sous-rénale: traitement par remplacement *in situ* à l'aide de greffons veineux autologues. In: Kieffer E, Goeau-Brissonière O, Péchère JC, eds. Infections artérielles. Paris: AERCV; 1997: 177-96.
112. DiMuzio PJ, Reilly LM, Stoney RJ. Redo aortic grafting after treatment of aortic graft infection. *Journal of vascular surgery* 1996; **24**(3): 328-35; discussion 36-7.
113. Pinocy J, Albes JM, Wicke C, Ruck P, Ziemer G. Treatment of periprosthetic soft tissue infection of the groin following vascular surgical procedures by means of a polyvinyl alcohol-vacuum sponge system. *Wound Repair Regen* 2003; **11**(2): 104-9.
114. Young RM, Cherry KJ, Jr., Davis PM, et al. The results of in situ prosthetic replacement for infected aortic grafts. *American journal of surgery* 1999; **178**(2): 136-40.
115. Topel I, Audebert F, Betz T, Steinbauer MG. Microbial spectrum and primary resistance to rifampicin in infectious complications in vascular surgery: limits to the use of rifampicin-bonded prosthetic grafts. *Angiology* 2010; **61**(5): 423-6.

116. Torsello G, Sandmann W. Use of antibiotic-bonded grafts in vascular graft infection. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 1997; **14 Suppl A**: 84-7.
117. Holdsworth J. Treatment of infective and potentially infective complications of vascular bypass grafting using gentamicin with collagen sponge. *Annals of the Royal College of Surgeons of England* 1999; **81**(3): 166-70.
118. Gordon A, Conlon C, Collin J, et al. An eight year experience of conservative management for aortic graft sepsis. *European journal of vascular surgery* 1994; **8**(5): 611-6.
119. Fatima J, Duncan AA, de Grandis E, et al. Treatment strategies and outcomes in patients with infected aortic endografts. *Journal of vascular surgery* 2013; **58**(2): 371-9.
120. Lyons OT, Patel AS, Saha P, Clough RE, Price N, Taylor PR. A 14-year experience with aortic endograft infection: management and results. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 2013; **46**(3): 306-13.
121. Maze MJ, Laws P, Buckenham T, et al. Outcomes of infected abdominal aortic grafts managed with antimicrobial therapy and graft retention in an unselected cohort. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 2013; **45**(4): 373-80.
122. Revest M. Traitement médical des infections de prothèses vasculaires. 13ème Journées Nationales d'Infectiologie; 2013; Clermont-Ferrand; 2013.
123. Gould FK, Denning DW, Elliott TS, et al. Guidelines for the diagnosis and antibiotic treatment of endocarditis in adults: a report of the Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2012; **67**(2): 269-89.
124. Chang FY, MacDonald BB, Peacock JE, Jr., et al. A prospective multicenter study of *Staphylococcus aureus* bacteremia: incidence of endocarditis, risk factors for mortality, and clinical impact of methicillin resistance. *Medicine (Baltimore)* 2003; **82**(5): 322-32.
125. Chu VH, Miro JM, Hoen B, et al. Coagulase-negative staphylococcal prosthetic valve endocarditis--a contemporary update based on the International Collaboration on Endocarditis: prospective cohort study. *Heart* 2009; **95**(7): 570-6.
126. Domenech A, Ribes S, Cabellos C, et al. Experimental study on the efficacy of combinations of glycopeptides and beta-lactams against *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to glycopeptides. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2005; **56**(4): 709-16.
127. Hertlein T, Sturm V, Lorenz U, Sumathy K, Jakob P, Ohlsen K. Bioluminescence and 19F magnetic resonance imaging visualize the efficacy of lysostaphin alone and in combination with oxacillin against *Staphylococcus aureus* in murine thigh and catheter-associated infection models. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2014; **58**(3): 1630-8.
128. Mattie H, Zhang LC, van Strijen E, Sekh BR, Douwes-Idema AE. Pharmacokinetic and pharmacodynamic models of the antistaphylococcal effects of meropenem and cloxacillin *in vitro* and in experimental infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1997; **41**(10): 2083-8.
129. Sandberg A, Lemaire S, Van Bambeke F, et al. Intra- and extracellular activities of dicloxacillin and linezolid against a clinical *Staphylococcus aureus* strain with a small-colony-variant phenotype in an *in vitro* model of THP-1 macrophages and an *in vivo* mouse peritonitis model. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2011; **55**(4): 1443-52.



130. Labrou M, Michail G, Ntokou E, Pittaras TE, Pournaras S, Tsakris A. Activity of oxacillin versus that of vancomycin against oxacillin-susceptible mecA-positive *Staphylococcus aureus* clinical isolates evaluated by population analyses, time-kill assays, and a murine thigh infection model. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2012; **56**(6): 3388-91.
131. Paul M, Zemer-Wassercug N, Talker O, et al. Are all beta-lactams similarly effective in the treatment of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* bacteraemia? *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2011; **17**(10): 1581-6.
132. Wang HZ, Peng ZY, Wen XY, Rimmel T, Bishop JV, Kellum JA. N-acetylcysteine is effective for prevention but not for treatment of folic acid-induced acute kidney injury in mice. *Critical care medicine* 2011; **39**(11): 2487-94.
133. He S, Liu N, Bayliss G, Zhuang S. EGFR activity is required for renal tubular cell dedifferentiation and proliferation in a murine model of folic acid-induced acute kidney injury. *American journal of physiology Renal physiology* 2013; **304**(4): F356-66.
134. Wen X, Peng Z, Li Y, et al. One dose of cyclosporine A is protective at initiation of folic acid-induced acute kidney injury in mice. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2012; **27**(8): 3100-9.
135. Kitzis M. Dosage des antibiotiques. In: Courvalin P, Leclercq R, Bingen E, eds. *Antibiogramme*. Paris: ESKA; 2006: 653-66.
136. Huh Y, Keep RF, Smith DE. Impact of lipopolysaccharide-induced inflammation on the disposition of the aminocephalosporin cefadroxil. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2013; **57**(12): 6171-8.
137. Revest M, Camou F, Senneville E, et al. Medical treatment of prosthetic vascular graft infections: Review of the literature and proposals of a Working Group. *International journal of antimicrobial agents* 2015.
138. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *Journal of clinical microbiology* 1999; **37**(6): 1771-6.
139. LaPlante KL, Mermel LA. *In vitro* activities of telavancin and vancomycin against biofilm-producing *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, and *Enterococcus faecalis* strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2009; **53**(7): 3166-9.
140. Garrigos C, Murillo O, Lora-Tamayo J, et al. Fosfomicin-daptomycin and other fosfomicin combinations as alternative therapies in experimental foreign-body infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2013; **57**(1): 606-10.
141. Javerliat I, Goeau-Brissonniere O, Sivadon-Tardy V, Coggia M, Gaillard JL. Prevention of *Staphylococcus aureus* graft infection by a new gelatin-sealed vascular graft prebonded with antibiotics. *Journal of vascular surgery* 2007; **46**(5): 1026-31.
142. Hirose K, Marui A, Arai Y, et al. Sustained-release vancomycin sheet may help to prevent prosthetic graft methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Journal of vascular surgery* 2006; **44**(2): 377-82.
143. Cirioni O, Mocchegiani F, Ghiselli R, et al. Daptomycin and rifampin alone and in combination prevent vascular graft biofilm formation and emergence of antibiotic resistance in a subcutaneous rat pouch model of staphylococcal infection. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 2010; **40**(6): 817-22.

144. Gao H, Sandermann J, Prag J, Lund L, Lindholt JS. Rifampicin-soaked silver polyester versus expanded polytetrafluoro-ethylene grafts for *in situ* replacement of infected grafts in a porcine randomised controlled trial. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 2012; **43**(5): 582-7.
145. Moskowitz SM, Foster JM, Emerson J, Burns JL. Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. *Journal of clinical microbiology* 2004; **42**(5): 1915-22.
146. Crandon JL, Kuti JL, Nicolau DP. Comparative efficacies of human simulated exposures of telavancin and vancomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a range of vancomycin MICs in a murine pneumonia model. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2010; **54**(12): 5115-9.
147. Dandekar PK, Tessier PR, Williams P, Nightingale CH, Nicolau DP. Pharmacodynamic profile of daptomycin against Enterococcus species and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a murine thigh infection model. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2003; **52**(3): 405-11.
148. Yu J, Wu J, Francis KP, Purchio TF, Kadurugamuwa JL. Monitoring *in vivo* fitness of rifampicin-resistant *Staphylococcus aureus* mutants in a mouse biofilm infection model. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2005; **55**(4): 528-34.
149. Hengzhuang W, Wu H, Ciofu O, Song Z, Hoiby N. *In vivo* pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and imipenem in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2012; **56**(5): 2683-90.
150. Abbanat D, Shang W, Amsler K, et al. Evaluation of the *in vitro* activities of ceftobiprole and comparators in staphylococcal colony or microtitre plate biofilm assays. *International journal of antimicrobial agents* 2014; **43**(1): 32-9.
151. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG, Jr. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical microbiology reviews* 2015; **28**(3): 603-61.
152. Giacometti A, Cirioni O, Ghiselli R, et al. Temporin A soaking in combination with intraperitoneal linezolid prevents vascular graft infection in a subcutaneous rat pouch model of infection with *Staphylococcus epidermidis* with intermediate resistance to glycopeptides. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2004; **48**(8): 3162-4.
153. Atahan E, Gul M, Ergun Y, Eroglu E. Vascular graft infection by *Staphylococcus aureus*: efficacy of cefazolin, teicoplanin and vancomycin prophylaxis protocols in a rat model. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 2007; **34**(2): 182-7.
154. Oliva A, Furustrand Tabin U, Maiolo EM, Jeddari S, Betrisey B, Trampuz A. Activities of fosfomicin and rifampin on planktonic and adherent *Enterococcus faecalis* strains in an experimental foreign-body infection model. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2014; **58**(3): 1284-93.
155. Furustrand Tabin U, Majic I, Zalila Belkhodja C, et al. Gentamicin improves the activities of daptomycin and vancomycin against *Enterococcus faecalis* *in vitro* and in an experimental foreign-body infection model. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2011; **55**(10): 4821-7.
156. Furustrand Tabin U, Corvec S, Betrisey B, Zimmerli W, Trampuz A. Role of rifampin against *Propionibacterium acnes* biofilm *in vitro* and in an experimental foreign-body infection model. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2012; **56**(4): 1885-91.

157. Zimmerli W, Waldvogel FA, Vaudaux P, Nydegger UE. Pathogenesis of foreign body infection: description and characteristics of an animal model. *The Journal of infectious diseases* 1982; **146**(4): 487-97.
158. Schwank S, Rajacic Z, Zimmerli W, Blaser J. Impact of bacterial biofilm formation on *in vitro* and *in vivo* activities of antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1998; **42**(4): 895-8.
159. Shimabukuro K, Hirose H, Mori Y, Takagi H, Iwata H, Kawamura Y. Local treatment of Dacron patch graft infected with biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* using antibiotic-releasing porous apatite ceramic: an experimental study in the rabbit. *Journal of vascular surgery* 2004; **39**(6): 1361.
160. Boudjemaa R, Briandet R, Fontaine-Aupart M, et al. Diffusion, Bioavailability and Reactivity of Antibiotics against *Staphylococcus aureus* Biofilms: a New Approach by Dynamic Fluorescence Imaging. International Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington, DC; 2014. p. Abstract C-1415.
161. Edmiston CE, Jr., Goheen MP, Seabrook GR, et al. Impact of selective antimicrobial agents on staphylococcal adherence to biomedical devices. *American journal of surgery* 2006; **192**(3): 344-54.
162. Murillo O, Garrigos C, Pachon ME, et al. Efficacy of high doses of daptomycin versus alternative therapies against experimental foreign-body infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2009; **53**(10): 4252-7.
163. Garrigos C, Murillo O, Euba G, et al. Efficacy of usual and high doses of daptomycin in combination with rifampin versus alternative therapies in experimental foreign-body infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2010; **54**(12): 5251-6.
164. Stewart PS, Davison WM, Steenbergen JN. Daptomycin rapidly penetrates a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2009; **53**(8): 3505-7.
165. Smith K, Perez A, Ramage G, Gemmell CG, Lang S. Comparison of biofilm-associated cell survival following *in vitro* exposure of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms to the antibiotics clindamycin, daptomycin, linezolid, tigecycline and vancomycin. *International journal of antimicrobial agents* 2009; **33**(4): 374-8.
166. Lefebvre M, Jacqueline C, Amador G, et al. Efficacy of daptomycin combined with rifampicin for the treatment of experimental methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) acute osteomyelitis. *International journal of antimicrobial agents* 2010; **36**(6): 542-4.
167. Senneville E, Joulie D, Legout L, et al. Outcome and predictors of treatment failure in total hip/knee prosthetic joint infections due to *Staphylococcus aureus*. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2011; **53**(4): 334-40.
168. Sakoulas G, Eliopoulos GM, Alder J, Eliopoulos CT. Efficacy of daptomycin in experimental endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2003; **47**(5): 1714-8.
169. Saleh-Mghir A, Muller-Serieys C, Dinh A, Massias L, Cremieux AC. Adjunctive rifampin is crucial to optimizing daptomycin efficacy against rabbit prosthetic joint infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2011; **55**(10): 4589-93.
170. Rose WE, Leonard SN, Rybak MJ. Evaluation of daptomycin pharmacodynamics and resistance at various dosage regimens against *Staphylococcus aureus* isolates with

- reduced susceptibilities to daptomycin in an *in vitro* pharmacodynamic model with simulated endocardial vegetations. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2008; **52**(9): 3061-7.
171. Miro JM, Garcia-de-la-Maria C, Armero Y, et al. Addition of gentamicin or rifampin does not enhance the effectiveness of daptomycin in treatment of experimental endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2009; **53**(10): 4172-7.
172. Garrigos C, Murillo O, Lora-Tamayo J, et al. Efficacy of daptomycin-cloxacillin combination in experimental foreign-body infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2012; **56**(7): 3806-11.
173. Marques C, Tasse J, Pracros A, et al. Effects of antibiotics on biofilm and unattached cells of a clinical *Staphylococcus aureus* isolate from bone and joint infection. *Journal of medical microbiology* 2015; **64**(9): 1021-6.
174. Leuck AM, Johnson JR, Dunny GM. A widely used *in vitro* biofilm assay has questionable clinical significance for enterococcal endocarditis. *PloS one* 2014; **9**(9): e107282.
175. Moskowitz SM, Emerson JC, McNamara S, et al. Randomized trial of biofilm testing to select antibiotics for cystic fibrosis airway infection. *Pediatric pulmonology* 2011; **46**(2): 184-92.
176. Hu H, Zou C, Xi X, Shi Z, Wang G, Huang X. Protective effects of pioglitazone on renal ischemia-reperfusion injury in mice. *The Journal of surgical research* 2012; **178**(1): 460-5.
177. Lau WL, Leaf EM, Hu MC, et al. Vitamin D receptor agonists increase klotho and osteopontin while decreasing aortic calcification in mice with chronic kidney disease fed a high phosphate diet. *Kidney international* 2012; **82**(12): 1261-70.
178. Jia T, Olauson H, Lindberg K, et al. A novel model of adenine-induced tubulointerstitial nephropathy in mice. *BMC nephrology* 2013; **14**: 116.
179. Faubel S, Ljubanovic D, Reznikov L, Somerset H, Dinarello CA, Edelstein CL. Caspase-1-deficient mice are protected against cisplatin-induced apoptosis and acute tubular necrosis. *Kidney international* 2004; **66**(6): 2202-13.
180. Andes D, Craig WA. *In vivo* activities of amoxicillin and amoxicillin-clavulanate against *Streptococcus pneumoniae*: application to breakpoint determinations. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1998; **42**(9): 2375-9.
181. Crandon JL, Schuck VJ, Banevicius MA, et al. Comparative *in vitro* and *in vivo* efficacies of human simulated doses of ceftazidime and ceftazidime-avibactam against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2012; **56**(12): 6137-46.
182. Kim HK, Missiakas D, Schneewind O. Mouse models for infectious diseases caused by *Staphylococcus aureus*. *Journal of immunological methods* 2014; **410**: 88-99.
183. Chuard C, Herrmann M, Vaudaux P, Waldvogel FA, Lew DP. Successful therapy of experimental chronic foreign-body infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by antimicrobial combinations. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1991; **35**(12): 2611-6.
184. Saginur R, Stdenis M, Ferris W, et al. Multiple combination bactericidal testing of staphylococcal biofilms from implant-associated infections. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2006; **50**(1): 55-61.
185. Whitener C, Caputo GM, Weitekamp MR, Karchmer AW. Endocarditis due to coagulase-negative staphylococci. Microbiologic, epidemiologic, and clinical considerations. *Infect Dis Clin North Am* 1993; **7**(1): 81-96.

186. Mascio CT, Alder JD, Silverman JA. Bactericidal action of daptomycin against stationary-phase and nondividing *Staphylococcus aureus* cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2007; **51**(12): 4255-60.
187. Durante-Mangoni E, Casillo R, Bernardo M, et al. High-dose daptomycin for cardiac implantable electronic device-related infective endocarditis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2012; **54**(3): 347-54.
188. Dunne WM, Jr., Mason EO, Jr., Kaplan SL. Diffusion of rifampin and vancomycin through a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1993; **37**(12): 2522-6.
189. Darouiche RO, Dhir A, Miller AJ, Landon GC, Raad, II, Musher DM. Vancomycin penetration into biofilm covering infected prostheses and effect on bacteria. *The Journal of infectious diseases* 1994; **170**(3): 720-3.
190. Zheng Z, Stewart PS. Penetration of rifampin through *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2002; **46**(3): 900-3.
191. Nishitani K, Sutipornpalangkul W, de Mesy Bentley KL, et al. Quantifying the natural history of biofilm formation *in vivo* during the establishment of chronic implant-associated *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in mice to identify critical pathogen and host factors. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 2015; **33**(9): 1311-9.
192. Mann EE, Rice KC, Boles BR, et al. Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PloS one* 2009; **4**(6): e5822.
193. de la Fuente-Nunez C, Korolik V, Bains M, et al. Inhibition of bacterial biofilm formation and swarming motility by a small synthetic cationic peptide. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2012; **56**(5): 2696-704.
194. Valour F, Rasigade JP, Trouillet-Assant S, et al. Delta-toxin production deficiency in *Staphylococcus aureus*: a diagnostic marker of bone and joint infection chronicity linked with osteoblast invasion and biofilm formation. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2015; **21**(6): 568 e1- e11.
195. Ko YP, Kuipers A, Freitag CM, et al. Phagocytosis escape by a *Staphylococcus aureus* protein that connects complement and coagulation proteins at the bacterial surface. *PLoS pathogens* 2013; **9**(12): e1003816.
196. Ellington JK, Harris M, Webb L, et al. Intracellular *Staphylococcus aureus*. A mechanism for the indolence of osteomyelitis. *The Journal of bone and joint surgery British volume* 2003; **85**(6): 918-21.
197. Flannagan RS, Heit B, Heinrichs DE. Intracellular replication of *Staphylococcus aureus* in mature phagolysosomes in macrophages precedes host cell death, and bacterial escape and dissemination. *Cellular microbiology* 2015.
198. Valour F, Trouillet-Assant S, Riffard N, et al. Antimicrobial activity against intraosteoblastic *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2015; **59**(4): 2029-36.

# Annexes

**Annexe 1.** Membres du Groupe de Réflexions sur les Infections de Prothèses vasculaires (GRIP)

Coordination : Professeur Christian Chidiac, infectiologue, CHU Lyon

Professeur Michel Batt, chirurgien vasculaire, CHU Nice

Professeur Patrick Feugier, chirurgien vasculaire, CHU Lyon

Docteur Jocelyne Caillon, bactériologiste, CHU Nantes

Professeur Frédéric Laurent, bactériologiste, CHU Lyon

Docteur Brigitte Calvet, anesthésiste, CH Béziers

Docteur Fabrice Camou, réanimateur médical et interniste, CHU Bordeaux

Docteur Anna-Lisa Rivière, imageur nucléaire, CHU Bordeaux

Docteur Mathieu Papillard, radiologue vasculaire, CHU Lyon

Professeur Eric Senneville, infectiologue, CH Tourcoing

Docteur Matthieu Revest, infectiologue, CHU Rennes

## Résumé

Les infections de prothèses vasculaires (IPV) sont des maladies particulièrement graves. Malgré une fréquence finalement assez importante, elles demeurent mal connues. *Staphylococcus aureus* en est l'agent responsable principal. Les données concernant le traitement antibiotique à administrer pour ces infections sont excessivement pauvres. L'objectif de notre travail était donc de comparer l'efficacité de différents protocoles d'antibiothérapie à l'aide de divers modèles expérimentaux d'IPV

Six souches différentes de *S. aureus* ont été évaluées : 3 sensibles (SAMS) et 3 résistants à la méticilline (SARM). Nous avons comparé les concentrations minimales inhibitrices et éradicatrices (CMIB et CMEB) au sein du biofilm obtenues avec des techniques classiques sur polystyrène à ceux obtenus à l'aide d'un modèle original *in vitro* sur Dacron® (dCMIB et dCMEB)®. Nous avons ensuite utilisé un modèle original d'infection de Dacron chez la souris pour comparer l'efficacité de différents protocoles thérapeutiques. Enfin nous avons visualisé l'effet de ces antibiotiques *in vivo* par microscopie confocale.

Nous avons montré que les mesures classiques de CMIB et CMEB obtenues sur polystyrène pouvaient surestimer la baisse d'efficacité des antibiotiques dans le biofilm et que des mesures sur le matériel d'intérêt pouvaient être plus pertinentes. Dans notre modèle *in vivo*, la daptomycine pouvait être supérieure que les comparateurs pour certaines souches de SARM et de SAMS mais pas pour toutes. Par contre, si l'ajout de rifampicine était bénéfique pour la cloxacilline et la vancomycine, cela n'était pas le cas pour la daptomycine. Enfin, nous avons visualisés des effets totalement différents sur le biofilm selon les antibiotiques utilisés mais également selon les souches testées.

Nos modèles ont permis d'obtenir des informations nouvelles concernant l'antibiothérapie des IPV qui, nous l'espérons, permettront d'aider à la prise en charge des patients.

## Summary

Prosthetic vascular graft infection (PVGI) is an emerging disease, mostly due to staphylococci, with limited data regarding efficacy of current antistaphylococcal agents. We aimed to assess the efficacy of different antibiotic regimens.

Six different strains of methicillin-susceptible (MSSA) and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) were used. We compared results of minimal biofilm inhibitory and eradicating concentrations (MBICs and MBECs) obtained with a Calgary Biofilm Pin lid Device (CBPD) to those yielded by an original Dacron®-related minimal inhibitory and eradicating concentrations measure model. We then used an original murine model of *Staphylococcus aureus* vascular material infection to evaluate efficacy of different antibiotic regimens. We finally visualized the effect of antibiotics on biofilm by confocal microscopy.

We demonstrated that classical measures of MBICs and MBECs with CPBD could overestimate the decrease of antibiotic susceptibility in material related infections and that the nature of the support used to measure biofilm susceptibility might be influent since results yielded by our Dacron®-related minimal eradicating assay were lower than those found on a plastic device. In our *in vivo* model, we shown that daptomycin was significantly more bactericidal than comparators for some strains of MRSA or MSSA but not for all. For the majority of strains, it was as efficient as comparators. The addition of rifampicin to daptomycin did not enhance daptomycin efficacy in our model. Finally, we highlighted an *in vivo* differential effect on biofilm depending on the antibiotic used but also on the bacterial strain evaluated.

Our models represent an option to better define the best antibiotic options for PVGIs.