



**HAL**  
open science

# Impact de la taille de l'inoculum bactérien sur l'efficacité d'un traitement antibiotique : développement d'un modèle in vitro associant bactéries, antibiotiques et cellules du système immunitaire inné

Elodie Lallemand

## ► To cite this version:

Elodie Lallemand. Impact de la taille de l'inoculum bactérien sur l'efficacité d'un traitement antibiotique : développement d'un modèle in vitro associant bactéries, antibiotiques et cellules du système immunitaire inné. Médecine humaine et pathologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2017. Français. NNT : 2017TOU30076 . tel-01831644

**HAL Id: tel-01831644**

**<https://theses.hal.science/tel-01831644>**

Submitted on 6 Jul 2018

**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

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

---

**Présentée et soutenue par :**

**Elodie A. Lallemand**

**le** mercredi 14 juin 2017

**Titre :**

Impact de la taille de l'inoculum bactérien sur l'efficacité d'un traitement antibiotique : développement d'un modèle in vitro associant bactéries, antibiotiques et cellules du système immunitaire inné.

---

**École doctorale et discipline ou spécialité :**

ED BSB : Pharmacologie

**Unité de recherche :**

UMR 1331 Toxalim INRA, ENVT

**Directeur/trice(s) de Thèse :**

Monsieur le Professeur Alain Bousquet-Mélou

Madame le Docteur Séverine Boullier

**Jury :**

Madame le Docteur Séverine Boullier

Monsieur le Professeur Alain Bousquet-Mélou

Monsieur le Professeur Michel Fougereau

Monsieur le Docteur Jean-Yves Madec

Madame le Professeur Christine Roques

Madame le Docteur Claudine Zemirline

Examineur

Examineur

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur



A Monsieur le Professeur Michel Fougereau, et Monsieur le Docteur Jean-Yves Madec, qui ont accepté de consacrer de leur temps à la lecture et à l'appréciation de ce manuscrit.

Qu'ils trouvent ici le témoignage de notre respectueuse gratitude.

A Madame le Professeur Christine Roques, qui nous a fait l'honneur d'accepter de faire partie de notre comité et de notre jury de thèse.

Qu'elle soit assurée de nos plus sincères remerciements.

A Madame le Docteur Claudine Zemirline, qui a eu la gentillesse de nous accueillir au sein de son entreprise CEVA/Sogeval, sans qui ce travail de thèse n'aurait pas pu voir le jour. Qu'elle soit assurée de tout notre respect et de toute notre reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Alain Bousquet-Mélou et Madame le Docteur Séverine Boullier, qui nous ont accueillie comme doctorante, nous ont aidée et guidée tout au long de ces années de thèse. Alain, spécialiste ès sciences pharmacologiques, merci pour ta bienveillance, vive les plongées et le syndrome « deadline ». Séverine, spécialiste en immunologie, merci pour tes conseils et pour les bulles d'air au centre équestre.

Qu'ils soient assurés de notre sincère reconnaissance.

A Madame le Docteur Aude Ferran, que je considère comme ma troisième directrice de thèse, qui nous a prodigué son savoir en microbiologie et guidée patiemment tout au long de ce travail de thèse. Sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Pierre-Louis Toutain, sans qui rien de tout cela n'aurait été possible, qui nous a accueillie au sein du centre équestre, puis au sein de son laboratoire. Pour votre énergie à toute épreuve, vos corrections plus rapides que la lumière, nos discussions scientifiques passionnantes, votre aide dans tous les domaines. Sincères remerciements.

A toute l'équipe Toxalim du bon côté du Touch : à Catherine Viguié pour son microscope à fluorescence, pour nos chirurgies de contrebande et pour l'intronisation dans un club de plongée qui a ensoleillé mes week-ends, à Valérie Defforge et Simone Baures, les superwomen collègues

de bureau, pour leur bonne humeur et leur soutien sans faille, à Diane Broussou, pour nos papotages à cheval et ailleurs qui remontent le moral, à Marlène Lacroix, pour sa machine de compétition et sa touche magique pour publication scientifique, à Emmanuelle Totain, pour sa transmission de savoir en culture cellulaire, ELISA et cytométrie de flux toujours avec le sourire, à Béatrice Roques, toujours prête à dépanner même et surtout en statistiques, à Nathalie Arpaillange, pour son aide en microbiologie, à Etienne Giraud, pour son expertise « persistante », à Jean-Pierre Gau, Cédric Lacassagne et Noémie Deschamps, pour vous être si bien occupé de mes petites souris noires, à Didier Concordet, pour nos discussions philosophiques tard le soir, et à tous les autres : merci de faire de ce service un endroit où il fait bon travailler. A la cafet' toujours remplie de discussions et de bonnes choses, à nos apéros, à nos soirées bowling et à la calinothérapie de chiots Beagle.

Merci aussi à Guillaume Tabouret et à Romain Volmer pour les dépannages et à Cécile et Christian pour leur aide avec MACS.

A toutes les personnes formidables qui font ou ont fait partie de l'aventure de la Clinique Equine. A Christophe Thinet, pour Lulu la Nantaise, le décryptage de la psychosociologie complexe de l'ENVT et les truffes, à Cécile Desfontaines, ASV et secrétaire de choc toujours souriante, à Sophie Pradier, pour ton aide, à Alessandro Vischi, Pascale Dussaud, Mathilde Bachelet, Emma Morand et Suzy Loigerot, chargés de consultation résistants à toute épreuve, merci d'avoir été là à chaque fois que j'avais besoin de vous et aussi quand je ne pouvais pas être là, et avec le sourire, c'est grâce à vous qu'on remonte la Clinique petit à petit, à tous les étudiants et internes avec qui c'est toujours un plaisir de travailler et qui remotivent une enseignante parfois surchargée. A tous ceux qui participent de près ou de loin à l'essor de la Clinique, merci infiniment pour votre soutien et d'y croire.

A tous ceux qui me sont proches et chers, qui sont là dans les bons et les mauvais moments, même quand je vous ai fait très peur...

A ceux qui m'ont guidé dans ma vie professionnelle, à Olivier Geffroy, tu es et resteras mon modèle de chirurgien équin qui opère avec classe, à Olivier Gauthier, je t'admire comme professionnel et comme Homme.

Aux amis sans qui la vie serait moins belle, à Clairon, corésidente forever, à Carine, cointerne forever, Vive le FC Nantes et Michel R !, à Céline et Lolo, pour les ballades le long du canal, les Mojitos et les weekends prolongés, à Céline G, pour nos fêtes à l'ECVS, à Fred, master de plongée sans égal, à Romu et nos diners philosophiques, à Marc et tes talents de photographe bricolo, à Aurélie, à Carole, à Lydia, à Alex, Juju, Riette, Audrey et Emma : les meilleures de la promo 2002, à Simon Boubsy, FR, Léa, Nico, Pierrot et Michmich : BBhouse forever, à Marianne, à Cassou, à Mickael, à Tanguychou, à Adeline, Poppy et Erin vive les JO, à Doudou Poney, à Coline, à Philippe cocavalier du Fixou, à Jantine, à tous les amis de Maitairoa, à nos plongée dans les mers et dans le rhum.

Et aussi à toutes les boules de poils, petites et grandes : Mogwai, Elvis, Mablué, Freddy dans la catégorie félins ; la Gaioutte, Akira, Loupi dans les canins et bien sûr Idefix, Kador, Oscar, et tous les équidés qui ont bien voulu me porter sur leur dos.

A ma famille, à David, Sabine et Eliot, mon neveu adoré, à Sandra et Dany, à Chantal et Annie, mes tantes chéries, à la famille australienne.

A ma Maman et mon Papa, pour votre amour et votre soutien sans faille. Oui je sais Bac plus 14 ça commence à faire long mais après promis j'arrête ☺

Je vous aime.

A toi, Olivier, mon amoureux... A nos plongées, à nos photos, à nos moments passés à deux, à nos vacances et surtout à nos projets communs. Merci pour ta patience et ton soutien. Merci aussi à ta famille qui m'a accueillie avec tant de naturel et de gentillesse.

Je t'aime.

"Il nous fallut bien du talent pour être vieux sans être adultes." Jacques Brel

## Avant-propos

Les travaux de recherche de cette thèse ont, jusqu'à présent, fait l'objet des publications et communications suivantes :

### Articles

1. Lallemand EA, Lacroix MZ, Toutain P-L, Boullier S, Ferran AA & Bousquet-Mélou A (2016)  
**In vitro degradation of antimicrobials during use of broth microdilution method can increase the measured Minimal Inhibitory and Minimal Bactericidal Concentrations.**  
*Front. Microbiol.* 7 :2051.
2. Lallemand EA, Ferran AA, Zemirline C, Toutain P-L, Bousquet-Mélou A & Boullier S (soumis)  
**A new *in vitro* model demonstrates that a cephalosporin regulates IL-1 $\beta$  synthesis and macrophage cell death induced by *Staphylococcus aureus* (soumis dans *Frontiers in cellular and infection microbiology*).**

### Communications orales

1. Lallemand EA, Ferran AA, Zemirline C, Toutain P-L, Boullier S & Bousquet-Mélou A  
**Pharmacodynamic/pharmacokinetic analysis of cephalexin activity on *Staphylococcus aureus* in a new *in vitro* model with and without macrophages**  
13th EAVPT Congress, Nantes, 2015. *J Vet Pharmacol Ther* 2015, 38 suppl 1, p4.

### Posters

1. Lallemand EA, Ferran AA, Zemirline C, Toutain P-L, Boullier S & Bousquet-Mélou A  
**Développement d'un modèle *in vitro* pour la quantification des interactions entre *Staphylococcus aureus*, des macrophages murins et une céphalosporine**  
Journées du département Santé animale INRA, Poitiers, France, Juin 2016.
2. Lallemand EA, Ferran AA, Zemirline C, Toutain P-L, Boullier S & Bousquet-Mélou A  
**Development of an *in vitro* model for the multiparametric quantification of interactions between *Staphylococcus aureus*, murine macrophages and a cephalosporin antibiotic**  
50<sup>th</sup> ESCI Annual Scientific Meeting, Paris, France, Avril 2016. *European J Clinical Investigation* 2016, 46 suppl 1, p83-84.  
et  
BacTouBac, Bacteria One Health Day, Toulouse, France, Décembre 2016.



## Table des matières

Table des illustrations.....	11
Liste des abréviations.....	15
Introduction .....	17
1 Etude bibliographique.....	21
1.1 Méthodes d'étude de l'activité des antibiotiques .....	23
1.1.1 Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice.....	23
1.1.2 Courbes de bactéricidie avec des concentrations en antibiotique constantes .....	24
1.1.3 Courbes de bactéricidie avec des concentrations en antibiotique variables .....	26
1.1.4 Modèles d'études des antibiotiques sur animaux.....	29
1.1.5 Modèles d'études des antibiotiques <i>in vitro</i> avec une composante immunitaire .....	30
1.2 Les céphalosporines.....	32
1.2.1 Mécanisme d'action .....	32
1.2.2 Paramètres prédictifs de l'efficacité des céphalosporines .....	33
1.2.3 Résistances aux céphalosporines.....	34
1.2.4 La céphalexine.....	35
1.2.5 Le cefprozil .....	36
1.3 Rôle de l'immunité innée dans la lutte contre les bactéries .....	37
1.3.1 Organisation de la réponse immunitaire innée .....	39
1.3.2 Mécanisme de phagocytose des macrophages .....	42
1.3.3 Sécrétion de cytokines et organisation de la réponse inflammatoire .....	43
1.3.4 Spécificités d'interaction entre <i>S. aureus</i> et macrophages .....	45
1.4 Influence de la taille de l'inoculum bactérien.....	48
1.4.1 Influence de la taille de l'inoculum sur l'activité bactéricide des antibiotiques.....	48
1.4.2 Influence de la taille de l'inoculum sur l'activité antibactérienne du système immunitaire.....	50
1.5 Conclusion et Projet de thèse .....	53
2 Etude expérimentale.....	55
2.1 Stabilité <i>in vitro</i> des antibiotiques et influence sur la détermination de la sensibilité des bactéries.....	57
2.1.1 Problématique.....	57
2.1.2 Objectifs.....	57
2.1.3 Matériel et méthodes .....	57
2.1.4 Résultats.....	60
2.1.5 Discussion .....	64
2.1.6 Article.....	66

---

2.2 Influence de la taille de l'inoculum sur l'activité bactéricide <i>in vitro</i> .....	73
2.2.1 Problématique.....	73
2.2.2 Objectifs.....	73
2.2.3 Matériels et méthodes.....	74
2.2.4 Résultats.....	77
2.2.5 Discussion .....	84
2.3 Développement d'un modèle <i>in vitro</i> tripartite afin d'étudier les interactions entre des macrophages murins, <i>Staphylococcus aureus</i> et une céphalosporine.....	87
2.3.1 Problématique.....	87
2.3.2 Objectifs.....	87
2.3.3 Matériel et méthodes .....	88
2.3.4 Résultats.....	93
2.3.5 Discussion .....	109
2.3.6 Article.....	113
Discussion générale .....	135
Références bibliographiques .....	143

## Table des illustrations

### Figures

Figure 1 : Méthode de détermination de la CMI. ....	24
Figure 2 : Représentation schématique de courbes de bactéricidie. ....	25
Figure 3 : Schéma d'une relation concentration-effet de type $E_{max}$ . ....	25
Figure 4 : Système in vitro dynamique.....	27
Figure 5 : Schéma des entrées et des sorties du compartiment central. ....	28
Figure 6 : Représentation schématique des concentrations plasmatiques en antibiotique au cours du temps après une administration extravasculaire. ....	33
Figure 7 : Formule développée de la céphalexine. ....	35
Figure 8 : Formule développée du céfprozil.....	36
Figure 9 : Représentation schématique de la réaction immunitaire lors d'une infection bactérienne. ....	37
Figure 10 : Présentation schématique des mécanismes lors de la phagocytose des bactéries par les neutrophiles. ....	41
Figure 11 : Phagocytose du macrophage : maturation du phagosome et présentation antigénique.....	43
Figure 12 : Reconnaissance de <i>S. aureus</i> par un macrophage. ....	46
Figure 13 : Schéma de la structure du système in vitro dynamique. ....	75
Figure 14 : Courbes de bactéricidie obtenues à partir d'un inoculum initial de <i>E. coli</i> de $10^5$ UFC/mL en présence de céphalexine.....	78
Figure 15 : Courbes de bactéricidie obtenues à partir d'un inoculum initial de <i>E. coli</i> de $10^8$ UFC/mL en présence de céphalexine.....	78
Figure 16 : Courbes de bactéricidie obtenues à partir d'un inoculum initial de <i>E. coli</i> de $10^6$ UFC/mL en présence de céphalexine.....	78
Figure 17 : Courbes de bactéricidie obtenues à partir d'un inoculum initial de <i>E. coli</i> de $10^5$ UFC/mL en présence de céfprozil. ....	79
Figure 18 : Courbes de bactéricidie obtenues à partir d'un inoculum initial de <i>E. coli</i> de $10^8$ UFC/mL en présence de céfprozil. ....	79
Figure 19 : Courbes de bactéricidie obtenues à partir d'un inoculum initial de <i>E. coli</i> de $10^6$ UFC/mL en présence de céfprozil. ....	79
Figure 20 : Courbes de bactéricidie obtenues à partir d'un inoculum initial de <i>S. aureus</i> de $10^5$ UFC/mL en présence de céphalexine.....	80
Figure 21 : Courbes de bactéricidie obtenues à partir d'un inoculum initial de <i>S. aureus</i> de $10^6$ UFC/mL en présence de céphalexine.....	80
Figure 22 : Courbes de bactéricidie obtenues à partir d'un inoculum initial de <i>S. aureus</i> de $10^8$ UFC/mL en présence de céphalexine.....	80
Figure 23 : Courbes de bactéricidie obtenues à partir d'un inoculum initial de <i>S. aureus</i> de $10^5$ UFC/mL en présence de céfprozil. ....	81
Figure 24 : Courbes de bactéricidie obtenues à partir d'un inoculum initial de <i>S. aureus</i> de $10^8$ UFC/mL en présence de céfprozil. ....	81
Figure 25 : Courbes de bactéricidie obtenues à partir d'un inoculum initial de <i>S. aureus</i> de $10^6$ UFC/mL en présence de céfprozil. ....	81
Figure 26 : Représentation du Delta-I <sub>no</sub> à 24h en fonction de la céphalosporine et de la souche bactérienne utilisée sur un petit inoculum. ....	82
Figure 27 : Profils de concentration en céphalexine mesurée par UPLC (Cobs) et souhaitée (Cthéo).....	83

Figure 28 : Courbes de bactéricidie obtenues en exposant <i>E. coli</i> et <i>S. aureus</i> à des concentrations variables en céphalexine au cours du temps. ....	84
Figure 29 : Colonie de <i>S. aureus</i> HG001 GFP sur gélose charbon vue au microscope à épifluorescence en FITC objectif x4.....	88
Figure 30 : Colonies de <i>S. aureus</i> HG001 GFP après 3h de culture en milieu RPM1c.....	94
Figure 31 : Images de cytométrie de flux représentatives de l'expression de protéines transmembranaires par les cellules adhérentes caractérisées comme macrophages.....	95
Figure 32 : Croissance des <i>S. aureus</i> GFP extracellulaires à différents temps après incubation de différent inocula avec ou sans macrophages. ....	96
Figure 33 : Valeurs de EF6h avec différents inocula bactériens avec et sans macrophages. ....	97
Figure 34 : Représentation de la phagocytose des <i>S. aureus</i> GFP par les macrophages au cours du temps. ....	98
Figure 35 : Représentation de la mortalité des macrophages infectés par <i>S. aureus</i> GFP au cours du temps.....	100
Figure 36 : Courbes de bactéricidie des <i>S. aureus</i> GFP extracellulaires en fonction de la concentration en macrophages et en céphalexine.....	102
Figure 37 : EF6h en fonction de la concentration en macrophages, en bactéries et en céphalexine.....	103
Figure 38 : Représentation de la phagocytose des <i>S. aureus</i> GFP par les macrophages avec des concentrations variables en bactéries et en céphalexine. ....	104
Figure 39 : Evolution de la mortalité des bactéries phagocytées au cours du temps en fonction de l'inoculum initial et de la concentration en céphalexine.....	105
Figure 40 : Evolution de la mortalité des macrophages au cours du temps en fonction de l'inoculum bactérien initial et de la concentration en céphalexine. ....	106
Figure 41 : Profil de sécrétion d'IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ et IL-6 dans le surnageant après 3h (a) ou 6h (b) de co-incubation de BMDM et de 5 différents inocula de <i>S. aureus</i> .....	107
Figure 42 : Profil de sécrétion d'IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ et IL-6 dans le surnageant après 3h (a) ou 6h (b) de co-incubation de BMDM et 10 <sup>6</sup> UFC/mL de <i>S. aureus</i> avec des concentrations différentes en céphalexine. ....	108

## Tableaux

Tableau 1 : Temps de rétention, transitions MRM et paramètres en spectrométrie de masse de 7 antibiotiques. ....	59
Tableau 2 : Résultats de validation de 7 antibiotiques en milieu MH.....	61
Tableau 3 : Temps de demi-vie et pourcentage de dégradation après 24h d'incubation abiotique de différents antibiotiques.....	62
Tableau 4 : Valeurs de CMI et de CMB pour 4 antibiotiques instables en présence d' <i>Escherichia coli</i> ou de <i>Staphylococcus aureus</i> à 24h.....	63
Tableau 5 : Détermination des CMI de la céphalexine et du cefprozil pour 2 souches bactériennes et comparaison aux données bibliographiques.....	77

**Equations**

Equation 1.....	25
Equation 2.....	28
Equation 3.....	29
Equation 4.....	29
Equation 5.....	77
Equation 6.....	89
Equation 7.....	90
Equation 8.....	91
Equation 9.....	91
Equation 10.....	92
Equation 11.....	93



## Liste des abréviations

ATCC	American Type Cell Culture
AUC	Aire sous la courbe des concentrations (Area Under the Curve)
BMDM	Macrophages issus de la moelle osseuse (Bone Marrow Derived Macrophage)
$C_{max}$	Concentration maximale en antibiotique
Cl	Clairance
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute
CMB	Concentration Minimale Bactéricide
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	EthyleneDiamineTetraAcetic acid
ENVT	Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
IL	InterLeukine
INRA	Institut National de Recherche Agronomique
M-CSF	Facteur stimulant les colonies de macrophages (Macrophages-Colony Stimulating Factor)
MH	Mueller-Hinton
MOI	Multiplicity Of Infection
NaCl	Chlorure de sodium
PD	Pharmacodynamie
PK	Pharmacocinétique
PI	Iodure de Propidium
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
$fT_{>CMI}$	Pourcentage du temps pendant lequel les concentrations libres en antibiotique sont au-dessus de la CMI
TLR	Toll Like Receptor
TNF $\alpha$	Tumor Necrosis Factor $\alpha$
UFC	Unité Formant une Colonie
UMR	Unité Mixte de Recherche
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography



---

## **Introduction**

---



Les travaux de recherche présentés dans ce document ont été menés dans l'équipe « **Pharmacocinétique, Pharmacodynamie & Modélisation** » de l'UMR1331 Toxalim, INRA, ENVT. L'équipe « Pharmacocinétique Pharmacodynamie & Modélisation » a pour objectif de répondre à des questions relatives à la toxicologie des xénobiotiques et à l'usage prudent des médicaments vétérinaires et humains. L'équipe s'intéresse notamment aux effets de l'antibiothérapie sur les bactéries pathogènes ainsi que sur les bactéries de la flore commensale en se focalisant principalement sur l'identification de stratégies thérapeutiques (choix de l'antibiotique, doses, voies d'administration,...) capables d'éradiquer l'agent pathogène tout en limitant la sélection de bactéries résistantes au niveau du site infectieux et de la flore commensale. Mon travail de thèse, sous la direction du Docteur Séverine Boullier et du Professeur Alain Bousquet-Mélou, s'est intégré dans la thématique de recherche relative à la détermination de schémas posologiques capables de prévenir l'émergence de résistances bactériennes au niveau du site infectieux.

L'objectif d'une antibiothérapie est d'aider un organisme infecté et dont le système immunitaire est dépassé à éradiquer des bactéries pathogènes afin d'obtenir une guérison clinique et bactériologique définitive. Actuellement lors d'un traitement exigeant des administrations répétées sur plusieurs jours, le paradigme, jamais vérifié, est que la même dose d'antibiotique doit être utilisée quotidiennement sur toute la durée du traitement. En fait, il a été démontré *in vitro* que la puissance de certains antibiotiques est fonction de la taille des inocula à éradiquer c'est-à-dire que les concentrations minimales requises pour qu'un antibiotique soit efficace peuvent être d'autant plus faibles que la taille de l'inoculum à éradiquer est réduite. Notre hypothèse est que ce qui est vrai *in vitro* l'est également *in vivo*. De plus, *in vivo*, intervient une composante supplémentaire qui n'existe pas *in vitro* et qui pourrait amplifier le phénomène, à savoir des mécanismes de défense immunitaire (spécifiques ou non spécifiques) dont certains d'entre eux sont également influencés par la taille des inocula à éradiquer. La validation expérimentale de cette hypothèse pourrait conduire à la révision de certains schémas posologiques avec par exemple la proposition d'initier des traitements avec une ou plusieurs doses de charge sur des bases pharmacodynamiques et pas seulement pharmacocinétiques suivies de doses d'entretien plus faibles.

C'est dans ce contexte que nous avons décidé d'évaluer l'interaction entre la charge bactérienne et l'exposition à des céphalosporines commercialisées pour des usages humain et

vétérinaire puis l'interaction entre la charge bactérienne et l'exposition à des cellules du système immunitaire, les macrophages.

Une première partie bibliographique présentera les différentes méthodes d'étude de l'activité des antibiotiques utilisées dans notre travail de thèse (chapitre 1.1). Les céphalosporines, et plus spécifiquement leur mécanisme d'action, les paramètres prédictifs de l'efficacité ainsi que les mécanismes de résistance des bactéries à ces antibiotiques seront également décrits (chapitre 1.2). Ensuite, le rôle de l'immunité innée lors d'une infection sera détaillé (chapitre 1.3) et enfin l'influence de la taille de l'inoculum bactérien sur l'activité des antibiotiques et du système immunitaire sera abordé (chapitre 1.4).

Les travaux de recherche pour cette thèse ont débuté par une étude destinée à évaluer la stabilité *in vitro* de plusieurs antibiotiques utilisés en médecine humaine et vétérinaire, en particulier lors de la détermination des CMI (chapitre 2.1). Une étude a ensuite été menée afin d'évaluer l'interaction entre la taille de l'inoculum bactérien avec une souche d'*Escherichia coli* et une souche de *Staphylococcus aureus* et des céphalosporines de première et de deuxième génération, la céphalexine et le cefprozil, sur la bactéricidie (chapitre 2.2). Enfin, un modèle tripartite a été développé afin d'étudier l'interaction entre la taille de l'inoculum bactérien de *Staphylococcus aureus* et des macrophages, puis les conséquences de l'ajout d'un antibiotique, la céphalexine (chapitre 2.3).

---

# **1 Etude bibliographique**

---



## 1.1 Méthodes d'étude de l'activité des antibiotiques

Il existe actuellement deux méthodes principales pour étudier l'activité des antibiotiques *in vitro*, des méthodes statiques et des méthodes dynamiques.

**La détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)** est la plus simple. Il s'agit d'une méthode statique qui donne des informations sur la sensibilité *in vitro* des bactéries à un antibiotique après exposition à une concentration constante pendant une durée fixée dans un ensemble de conditions expérimentales données par des « standards ».

**Les courbes de bactéricidie**, qui sont une méthode dynamique, permettent de connaître les effets *in vitro* des antibiotiques au cours du temps sur des bactéries exposées :

- à des concentrations constantes d'antibiotique ou
- à des concentrations variables en antibiotique par le développement de systèmes *in vitro* dynamiques.

L'utilisation de **cellules du système immunitaire *in vitro*** permet de prendre en compte une partie de l'action du système immunitaire sur des bactéries en présence ou non d'antibiotiques.

Les **modèles animaux** permettent eux de prendre en compte l'accessibilité de l'antibiotique au site infectieux *in vivo* et l'influence du système immunitaire.

Enfin, les essais cliniques sur les espèces cibles permettent de porter un jugement thérapeutique.

### 1.1.1 Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice

La CMI permet d'évaluer la sensibilité des bactéries aux antibiotiques, c'est la plus petite concentration en antibiotique nécessaire pour prévenir la croissance bactérienne. La CMI peut être déterminée de plusieurs façons, dont la méthode de dilution sériée par microdilution qui est la méthode de référence standardisée par le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [1]. Un inoculum de  $5 \cdot 10^5$  bactéries/mL est exposé à une gamme de concentrations d'antibiotique obtenue par une série de dilutions de progression géométrique au demi. La croissance des bactéries est observée à l'œil nu après 16 à 20 heures d'exposition à l'antibiotique à  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . La CMI est alors la concentration la plus faible pour laquelle aucune croissance n'est visible à l'œil nu (figure 1).

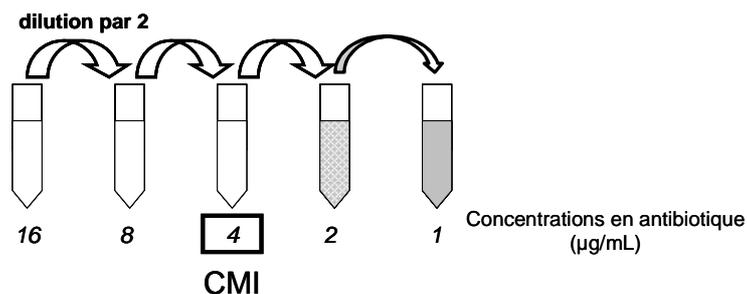


Figure 1 : Méthode de détermination de la CMI.

Les zones grisées correspondent à une croissance bactérienne visible à l'œil nu. La CMI est la concentration en antibiotique pour laquelle aucune croissance n'est visible après 20 heures d'incubation à  $35\pm 2^\circ\text{C}$ .

Il est également possible de déterminer la concentration minimale bactéricide (CMB), la plus petite concentration d'un antibiotique permettant de tuer le pathogène, à partir de cette méthode [2]. Les puits dans lesquels aucune croissance n'est visible sontensemencés sur des géloses afin de déterminer quelle est la concentration d'antibiotique qui a permis de tuer 99.9% des bactéries. Un antibiotique sera ensuite estimé bactéricide si sa CMB est inférieure à 4 fois sa CMI, sinon il sera considéré comme bactériostatique.

Cette méthode est simple et standardisée ce qui permet les comparaisons entre laboratoires qui adhèrent aux mêmes « standards ».

Cependant, cette méthode suppose la stabilité de la concentration en antibiotiques dans le temps, or de nombreux facteurs comme la composition du milieu, les conditions de culture ou le métabolisme bactérien [3-5] peuvent potentiellement être responsables d'une dégradation de l'antibiotique, il paraît donc important de s'y intéresser.

De plus, la détermination de la CMI ne permet d'évaluer l'effet de l'antibiotique qu'après **un temps d'incubation fixé**. Pour connaître l'activité de l'antibiotique au cours du temps, il faut dénombrer les bactéries à intervalles réguliers afin d'obtenir des courbes de bactéricidie.

### 1.1.2 Courbes de bactéricidie avec des concentrations en antibiotique constantes

Les courbes de bactéricidie sont le plus souvent obtenues par des dénombrements de bactéries exposées à des concentrations constantes en antibiotiques. Ces courbes réalisées pour plusieurs classes d'antibiotiques ont permis de mettre en évidence deux modalités d'action (figure 2) : un mode concentration-dépendant et un mode temps-dépendant.

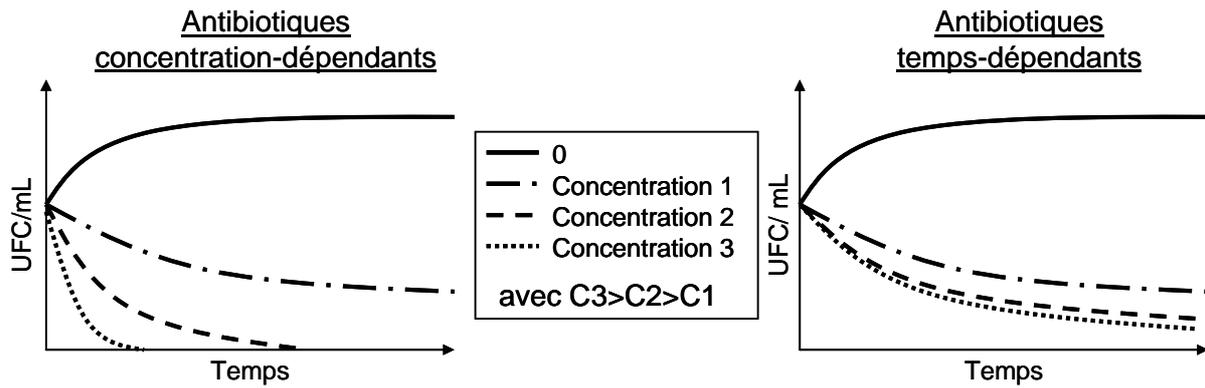


Figure 2 : Représentation schématique de courbes de bactéricidie.

La figure de gauche représente le cas d'un antibiotique concentration-dépendant ; l'activité bactéricide augmente avec la concentration. La figure de droite représente le cas d'un antibiotique temps-dépendant ; l'activité bactéricide n'augmente pas avec la concentration mais avec le temps.

Les antibiotiques agissent sur des cibles bactériennes et leur activité peut être facilement décrite par un modèle de type  $E_{\max}$  (équation 1) qui décrit la relation concentration – effet lors d'une interaction entre une molécule et sa cible [6].

$$E = E_{\max} \times \frac{C^\gamma}{C^\gamma + EC_{50}^\gamma} \quad \text{Équation 1}$$

où E est l'effet observé pour la concentration C,  $E_{\max}$  l'effet maximal,  $EC_{50}$  la concentration nécessaire pour obtenir un effet égal à 50 % de l'effet maximal et  $\gamma$  le coefficient de sigmoïdité qui traduit la pente de la relation concentration-effet.

La relation concentration-effet décrite par ce modèle est typiquement une relation sigmoïde (figure 3).

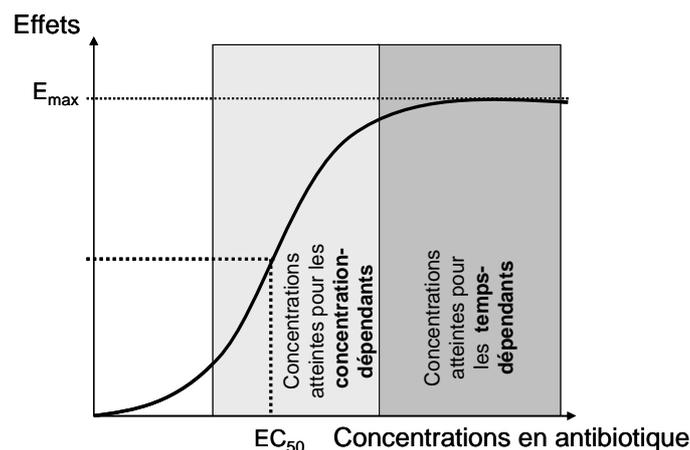


Figure 3 : Schéma d'une relation concentration-effet de type  $E_{\max}$ . L'effet augmente avec la concentration en antibiotique.

Pour des concentrations en antibiotique faibles, l'effet est quasiment nul puis quand les concentrations augmentent, l'effet augmente proportionnellement aux concentrations (plus ou moins vite selon la pente de la courbe) et enfin, pour de fortes concentrations, un effet maximal est atteint, on parle alors de « plateau ».

Selon la toxicité des molécules, les concentrations plasmatiques permettent ou non d'atteindre un effet maximal. Pour des antibiotiques tels que les bêta-lactamines pour lesquels les doses administrées peuvent être élevées (la marge thérapeutique étant grande), les concentrations permettent d'obtenir un effet maximal situé au niveau du plateau et un changement de concentrations n'a alors que peu d'influence sur l'intensité de l'effet qui reste maximal. L'activité de l'antibiotique dépend donc principalement du temps passé au niveau du plateau. Ces antibiotiques sont dits **temps-dépendants**. A l'opposé, pour certains antibiotiques aux marges thérapeutiques plus étroites tels que les aminoglycosides ou les fluoroquinolones, les concentrations pour des raisons de toxicité ne permettent pas d'atteindre l'effet maximal et la décroissance des concentrations est alors associée à une diminution de l'effet. Ces antibiotiques dont l'effet dépend des concentrations sont dits **concentration-dépendants**.

La classification des antibiotiques en concentration ou temps-dépendants a conduit à une meilleure utilisation des antibiothérapies en termes d'efficacité par une adaptation des schémas posologiques. Ainsi, des administrations fréquentes ont été préconisées pour les antibiotiques temps-dépendants afin de maintenir les concentrations au-dessus de la CMI pendant un temps minimal alors que des administrations uniques sont recommandées pour les antibiotiques concentration-dépendants afin d'atteindre des concentrations élevées sans pour autant couvrir tout l'intervalle d'administration. Cependant, des antibiotiques peuvent avoir une action concentration ou temps dépendante en fonction du pathogène rencontré et de sa CMI. Il existe aussi des antibiotiques codépendants comme les macrolides et les tétracyclines pour lesquels la durée et le niveau d'exposition influencent l'activité.

Les courbes de bactéricidie, obtenues en exposant les bactéries à des concentrations en antibiotique constantes, sont faciles à réaliser et permettent de connaître rapidement la modalité d'action d'un antibiotique sur une souche bactérienne. Cependant, cette méthode ne prend pas en compte la dynamique temporelle des concentrations en antibiotiques telle qu'elle est observée *in vivo*.

### 1.1.3 Courbes de bactéricidie avec des concentrations en antibiotique variables

Des systèmes appelés *in vitro* dynamiques ont été développés pour permettre d'exposer les bactéries à des concentrations en antibiotique variables au cours du temps. L'intérêt de ces systèmes est de **mimer la disposition des antibiotiques** par l'organisme *in vivo*.

### 1.1.3.1 Structures de systèmes *in vitro* dynamiques

La **structure générale** des systèmes dynamiques consiste en plusieurs compartiments matérialisés par des béchers immergés dans un bain-marie à 37°C ou placés dans une chambre thermostatée à 37 °C (figure 4).

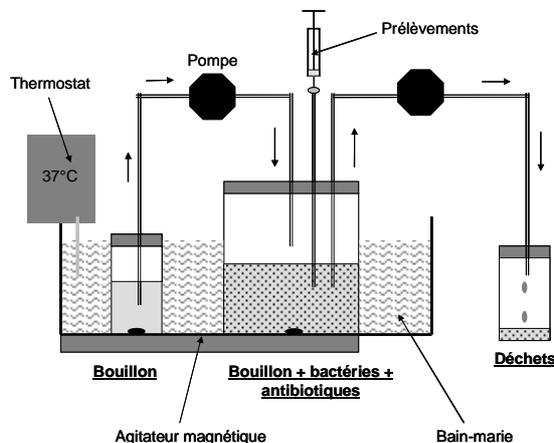


Figure 4 : Système *in vitro* dynamique

*Les bactéries sont mises en contact avec l'antibiotique dans le compartiment central immergé dans un bain-marie thermostaté à 37°C. La pompe d'entrée assure la dilution des antibiotiques et celle de sortie maintient le volume constant. Un agitateur magnétique homogénéise la suspension bactérienne en permanence.*

Le compartiment central contenant du bouillon de culture représente le système vasculaire et l'objectif est d'y retrouver l'équivalent des concentrations plasmatiques d'antibiotique observées *in vivo*. Pour mimer une administration intravasculaire, les antibiotiques sont injectés directement dans le compartiment central. Pour simuler une administration extravasculaire, une pompe prélève les antibiotiques dans un compartiment périphérique et les amène progressivement au compartiment central. Pour les deux types d'administration, suite à l'arrivée des antibiotiques dans ce compartiment, leur élimination débute. Une pompe apporte du bouillon de culture sans antibiotique au compartiment central afin de diluer les antibiotiques selon le débit choisi (voir paragraphe 1.1.3.2). Une autre pompe permet de maintenir le volume du compartiment central constant par une élimination de bouillon vers un compartiment déchet. Dans la plupart des systèmes, l'homogénéisation des bactéries est assurée par une agitation magnétique. Cependant, dans certains systèmes avec des structures en dérivation, des pompes assurent l'homogénéisation à l'intérieur des structures contenant les bactéries [7].

La **culture bactérienne** est réalisée dans différents compartiments selon le degré de complexité du système. Dans les systèmes les plus simples, les bactéries sont en suspension dans le compartiment central et sont donc éliminées vers le compartiment déchet en même temps que les antibiotiques (figure 4) [8-10]. Dans les systèmes plus sophistiqués, les bactéries sont isolées du compartiment central pour prévenir leur

élimination au cours de l'expérience. La séparation entre la suspension bactérienne et le compartiment central peut être matérialisée par un filtre dont les pores, qui ont un diamètre de 0.4  $\mu\text{m}$ , permettent le passage des antibiotiques mais pas celui des bactéries qui ont des tailles de 1 à 10  $\mu\text{m}$  [11, 12].

Enfin, dans les systèmes les plus complexes [7, 13], les bactéries sont placées dans des structures isolées en dérivation. Le contenu du compartiment central contenant les antibiotiques circule à travers ces structures grâce à une pompe, les bactéries étant maintenues par des filtres de pores de 0.4  $\mu\text{m}$ .

### 1.1.3.2 Débit d'élimination des antibiotiques

Dans les systèmes *in vitro* dynamiques, les antibiotiques sont éliminés progressivement du compartiment central selon un débit d'élimination choisi. Afin de garder un volume constant, le débit d'apport en bouillon sans antibiotique est identique au débit d'élimination des antibiotiques (figure 5).

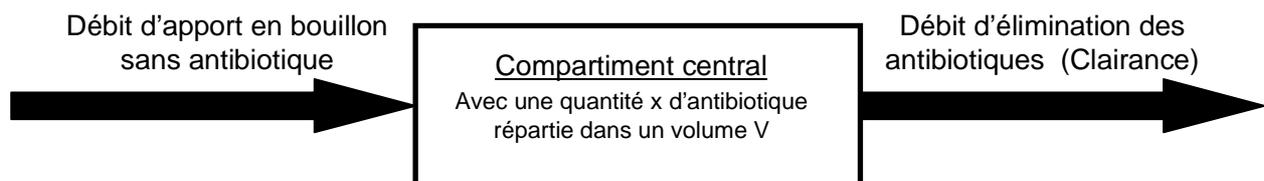


Figure 5 : Schéma des entrées et des sorties du compartiment central.

Le débit d'élimination choisi pour faire décroître les concentrations en antibiotique à la même vitesse qu'*in vivo* est aussi appliqué à l'entrée du système.

On peut affecter aux systèmes *in vitro* dynamiques la notion de clairance (Cl) qui est le coefficient de proportionnalité entre la vitesse d'élimination de l'antibiotique et la concentration d'antibiotique au temps  $t$  dans le système (équation 2).

$$Cl = \frac{\text{vitesse d'élimination}_{(t)} (\mu\text{g} / \text{h})}{\text{concentration}_{(t)} (\mu\text{g} / \text{mL})} \quad \text{Équation 2}$$

La clairance du système s'exprime en mL/h et correspond au volume du système complètement épuré de l'antibiotique par unité de temps. Par définition, le rapport entre la clairance et le volume total du système correspond à la fraction du volume complètement épurée par unité de temps ( $k_{10}$ ) (équation 3).

$$K_{10} = \frac{Cl}{V}$$

Équation 3

où Cl est la clairance et V le volume du système.

Pour reproduire une élimination similaire à celle observée *in vivo*, il faut connaître le temps de demi-vie ( $T_{1/2}$ ) de l'antibiotique. Il est alors possible de calculer, avec l'équation 4, la fraction à épurer par unité de temps ( $k_{10}$ ) pour obtenir ce temps de demi-vie.

$$K_{10} = \frac{\ln 2}{T_{1/2}}$$

Équation 4

Connaissant la fraction à épurer par unité de temps et le volume du système *in vitro*, il est alors possible de calculer la clairance qui est le débit à appliquer aux pompes situées en amont et en aval du compartiment central afin d'obtenir une décroissance des concentrations en antibiotique similaire à celle observée *in vivo* et de maintenir le volume du compartiment central constant.

Cependant, même les systèmes d'études *in vitro* les plus perfectionnés capables de mimer l'élimination progressive des antibiotiques au contact des bactéries ne permettent pas de prendre en compte toutes les paramètres qui peuvent influencer sur l'efficacité d'un traitement antibiotique *in vivo* tels que l'accessibilité au site infectieux.

#### 1.1.4 Modèles d'études des antibiotiques sur animaux

Les études de l'activité des antibiotiques sur modèles animaux sont très utilisées dans le développement d'antibiotiques en parallèle des études *in vitro* pour évaluer rapidement la capacité des antibiotiques à atteindre et à tuer les bactéries *in vivo*. Le modèle de septicémie chez la souris est, par exemple, un modèle de choix dans le criblage des substances antibiotiques qui a été utilisé pour étudier les effets du premier sulfamide en 1935 [14].

Dans les premières étapes du développement d'un antibiotique, les études sont souvent limitées à des évaluations de la survie des animaux alors que dans les étapes ultérieures, le nombre de bactéries après traitement est directement évalué dans le tissu infecté.

Les modèles animaux sont actuellement le **meilleur moyen de tester l'activité et la sécurité de nouveaux antibiotiques** avant l'administration à des patients et sont aussi un excellent moyen de trouver de nouvelles approches thérapeutiques (dose, intervalle d'administration,...).

Il a par exemple été montré que les données de valeurs seuils d'indice PK/PD pour prédire une guérison microbiologique ou clinique obtenues dans des modèles animaux depuis plus de 20 ans avaient une bonne concordance avec les valeurs retrouvées dans des études cliniques [15].

L'intérêt de ces modèles est également de prendre en compte l'action du système immunitaire, qui joue un rôle prépondérant au côté de l'antibiotique lors d'une infection. Un de leurs désavantages est l'utilisation d'un grand nombre d'animaux et la douleur potentiellement engendrée lors du développement d'une infection. C'est pourquoi certaines études se sont attachées à développer des systèmes *in vitro* comprenant aussi des éléments du système immunitaire.

### 1.1.5 Modèles d'études des antibiotiques *in vitro* avec une composante immunitaire

Les modèles d'étude *in vitro* intégrant une composante immunitaire sont de plus en plus développés et utilisés. Ces modèles sont très variés et ne seront pas tous décrits ici. Certains modèles n'utilisent pas d'antibiotiques et étudient spécifiquement l'action des cellules immunitaires sur les bactéries et réciproquement afin de déterminer les interactions existantes au niveau moléculaire [16, 17]. Quelques études se sont intéressées à l'effet immunomodulateur des antibiotiques sur les cellules du système immunitaire [18].

Les modèles tripartites incluant bactéries, antibiotiques et effecteurs du système immunitaire sont eux de plus en plus développés afin, par exemple, d'étudier les phénomènes de résistances observés *in vivo* lors d'infection complexes comme la tuberculose ou d'échec de traitement contre *S. aureus* [19, 20]. Ces modèles sont pertinents car ils permettent de se rapprocher des conditions observées *in vivo* tout en éliminant la souffrance animale.

Une de leur limite est cependant de ne pas pouvoir étudier le système immunitaire dans son ensemble étant donné sa complexité. En effet, le système immunitaire est un système complexe, dans lequel interagissent de nombreuses cellules, macrophages, neutrophiles, monocytes et lymphocytes, présentes sur site ou recrutées et/ou fabriquées au cours du temps, tout en étant coordonné par l'action des cytokines et du système du complément [21].

En conclusion, **les modèles d'études *in vitro* et *in vivo***, qui sont complémentaires, ont permis de mieux connaître **l'activité antibactérienne de nombreux antibiotiques**. Ces modèles sont

de plus en plus utilisés pour la détermination de schémas posologiques et les résultats expérimentaux de cette thèse ont tous été obtenus à partir de modèles *in vitro*.

## 1.2 Les céphalosporines

Les céphalosporines sont une classe d'antibiotique appartenant à la famille des bêtalactamines, caractérisées par la présence d'un noyau bêta-lactame qui est attaché à un noyau dihydrothiazine hexagonal. Cela leur confère une résistance augmentée aux bêtalactamases par rapport aux pénicillines.

Les céphalosporines ont un spectre antibactérien variable et sont communément classées selon leur génération de découverte, chaque nouvelle génération ayant un ou plusieurs avantages par rapport aux anciennes.

### 1.2.1 Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action des céphalosporines est celui des bêtalactamines.

Les bêtalactamines ont une action bactéricide par inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne. C'est au stade final de la synthèse du peptidoglycane que les bêtalactamines interviennent, en se fixant par inhibition compétitive à la place du substrat sur les protéines de liaison à la pénicilline (PLPs) que sont la transpeptidase et les carboxypeptidases, empêchant donc une synthèse finale correcte du peptidoglycane et entraînant une élévation, des lésions, une perte de la perméabilité sélective de la paroi bactérienne et par conséquent une mortalité bactérienne.

Les bêtalactamines sont donc des antibiotiques bactéricides mais leur action lytique n'est possible que sur des bactéries en croissance, car seules ces cellules bactériennes ont une production de paroi active [22].

Les différences d'activité au sein de la famille résultent, en partie, de la différence d'affinité des antibiotiques pour les PLPs et des bêtalactamases produites par les bactéries qui peuvent être de différents types.

Les bactéries Gram+ sont plus sensibles aux céphalosporines que les bactéries Gram- et cela pour plusieurs raisons : les PLPs sont différentes, les bactéries Gram+ possèdent beaucoup plus de peptidoglycane et les antibiotiques doivent réussir à pénétrer la membrane externe des bactéries Gram- via les aquaporines avant de pouvoir agir sur les PLPs situées entre la membrane cytoplasmique et la membrane externe.

### 1.2.2 Paramètres prédictifs de l'efficacité des céphalosporines

L'efficacité d'un antibiotique sur une bactérie dépend de la sensibilité de la souche et de son niveau d'exposition à l'antibiotique. C'est pourquoi les **indices pharmacocinétique/pharmacodynamique (PK/PD) ont été construits** ; afin de tenir compte à la fois de la sensibilité par la composante pharmacodynamique et de l'exposition de la souche à l'antibiotique par la composante pharmacocinétique.

Plusieurs paramètres pharmacodynamiques mesurent la sensibilité des bactéries et les index PK/PD les plus courants utilisent la CMI. Il faut cependant remarquer que la CMI est toujours déterminée après une exposition des bactéries à des concentrations constantes en antibiotiques ce qui diffère des expositions *in vivo*.

Trois paramètres pharmacocinétiques sont généralement utilisés pour décrire l'exposition d'un organisme à un antibiotique (figure 6):

- **$T_{>Concentration}$**  : le pourcentage de temps au-dessus d'une concentration sur l'intervalle de dosage (24h),
- **AUC** : l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques à l'état d'équilibre,
- **$C_{max}$**  : la concentration plasmatique maximale.

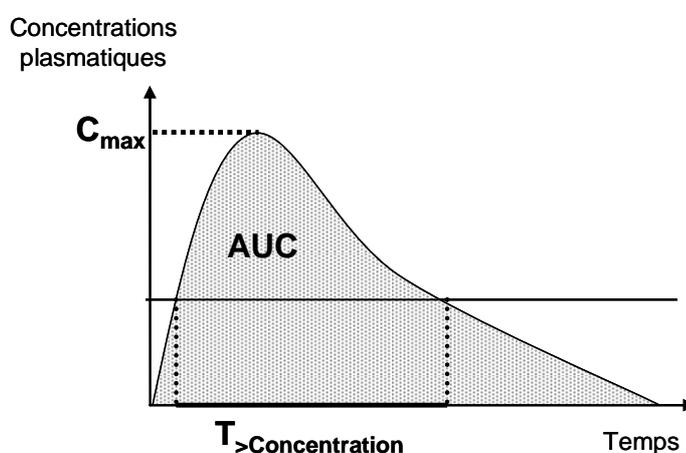


Figure 6 : Représentation schématique des concentrations plasmatiques en antibiotique au cours du temps après une administration extravasculaire.

Les paramètres pharmacocinétiques qui décrivent l'exposition sont notés en gras.

Les valeurs des paramètres PK utilisées dans le calcul de ces indices sont les valeurs correspondant aux concentrations plasmatiques libres qui sont les seules à pouvoir atteindre les bactéries. Par ailleurs, les concentrations plasmatiques sont représentatives des concentrations dans les liquides extracellulaires des différents tissus au contact des bactéries n'ayant pas de barrières spécifiques, comme la prostate ou l'encéphale. En effet, les bactéries pathogènes en médecine vétérinaire ont pour la plupart une localisation extracellulaire et l'équilibre qui s'établit

entre les concentrations libres dans le plasma et les liquides extracellulaires des tissus conduit à des concentrations extracellulaires libres identiques.

Les indices PK/PD sont obtenus en couplant les trois paramètres PK à la CMI de l'antibiotique :

- $fT_{>CMI}$  : le pourcentage de temps entre 0 et 24 heures à l'équilibre pendant lequel les concentrations plasmatiques libres sont au-dessus de la CMI. Cet indice ne tient pas compte de l'intensité de l'exposition (concentrations) mais seulement de la durée de l'exposition à une concentration critique qui est la CMI.
- $fC_{max}/CMI$  : la concentration plasmatique libre maximale divisée par la CMI. Cet indice est un rapport entre 2 concentrations et n'a pas d'unité. A l'opposé du  $fT_{>CMI}$ , il tient compte de l'intensité de l'exposition mais pas de la durée.
- $fAUC/CMI$  : l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques libres entre 0 et 24 heures à l'équilibre divisée par la CMI. Cette AUC correspond à l'AUC de 0 à l'infini après l'administration d'une dose unique. Cet indice est exprimé en heures et il tient compte de la durée et de l'intensité de l'exposition.

Les céphalosporines ont un effet bactéricide mixte concentration et temps-dépendant.

Cependant, leur action temps-dépendante est souvent estimée plus importante car l'effet concentration-dépendant plafonne autour de 4 à 5 fois la CMI [23] et un effet post-antibiotique est peu souvent observé [24]. C'est donc le facteur  $fT_{>CMI}$  qui est considéré comme paramètre prédictif pour les bêtalactamines. Les valeurs souhaitées sont  $fT_{>CMI}$  de 30% pour les bactéries Gram-, 40-50% pour les Streptocoques, et 30% pour les Staphylocoques [23]. Des publications plus récentes, utilisant des méthodes de modélisation plus poussées, indiquent des valeurs à 40-50% [24] ou de 60 à 70% [25] pour des bacilles Gram- et des streptocoques. Bien que le paramètre  $fAUC_{0-24}/CMI$  ne soit pas optimal lors de l'utilisation des céphalosporines, une étude rapporte une valeur de 137h pour une infection intra mammaire murine à *S. aureus* avec la cefquinome [26], c'est-à-dire une concentration moyenne sur 24h égale à 5,7 fois la CMI.

### 1.2.3 Résistances aux céphalosporines

Les céphalosporines sont souvent actives sur les Streptocoques bêta hémolytiques et les Staphylocoques produisant des bêtalactamases, mais pas contre les Staphylocoques méthicilline-résistants. La plupart des entérocoques sont résistants. Seules quelques céphalosporines de dernière génération sont efficaces contre *P. aeruginosa*. Les mycobactéries sont résistantes et l'activité sur les bactéries anaérobies est variable [22].

Plusieurs mécanismes sont impliqués dans ces phénomènes de résistance. Les PLPs peuvent être modifiées par recombinaison de l'ADN bactérien. Une perméabilité réduite des antibiotiques par diminution de la production des porines ou un efflux augmenté peuvent être en cause chez les bactéries Gram-. Une dernière possibilité est l'inactivation enzymatique des céphalosporines via l'action de bêtalactamases. Ce mécanisme est prédominant du fait de la transmissibilité entre bactéries des gènes codant pour les bêtalactamases [27]. Les 2 classes de bêtalactamases les plus fréquentes conférant une résistance aux céphalosporines sont les bêtalactamases à spectre élargi (BLSE, plus de 320 décrites dans le monde [28]) et les céphalosporinases AmpC qui hydrolysent préférentiellement la liaison CO-NH du noyau lactame des céphalosporines de première et seconde générations.

### 1.2.4 La céphalexine

La céphalexine est un agent antibactérien de synthèse, à usage vétérinaire et humain, appartenant à la famille des **céphalosporines**. Cette céphalosporine a des indications thérapeutiques larges et a été utilisée pour la majorité des études expérimentales de ce travail de thèse.

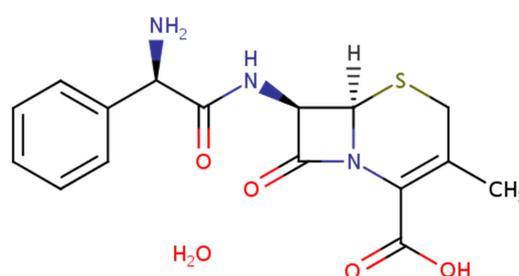


Figure 7 : Formule développée de la céphalexine.  
D'après [29]

La céphalexine monohydrate (figure 7, numéro CAS 15686-71-2) est une céphalosporine de première génération qui appartient au groupe 2 : elle peut être administrée par voie injectable et par voie orale. Sa formule moléculaire est  $C_{16}H_{17}N_3O_4S$ .

La céphalexine a une bonne activité contre les bactéries Gram+ y compris contre les Staphylocoques produisant des bêtalactamases ( $CMI \leq 8 \mu\text{g/mL}$ ), elle est modérément résistante aux bêtalactamases des entérobactéries et est modérément active contre les autres bactéries Gram- ( $CMI = 16 \mu\text{g/mL}$ ). Elle est inactive contre *Enterobacter* spp., *P. aeruginosa* and *Serratia* spp. ( $CMI \geq 32 \mu\text{g/mL}$ ).

En médecine vétérinaire, elle est indiquée dans le traitement des pyodermites superficielles et des infections urinaires basses dues à *E. coli* et *Proteus mirabilis* chez les chiens et les chats et

contre les plaies infectées et abcès dus à *Pasteurella spp.* chez le chat. Plus largement, la céphalexine est indiquée dans le traitement des infections des tissus mous et cutanés, des infections respiratoires, gastro-intestinales et génito-urinaires dont les bactéries sont sensibles à cet antibiotique chez le chien et le chat. Chez les bovins, elle est indiquée dans le traitement par voie locale des mammites sub-cliniques et cliniques à *S. aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* et *E. coli*.

La biodisponibilité par voie orale de la céphalexine est élevée (F=80-90% chez le chien). Elle a une bonne absorption qui n'est pas influencée par la prise de nourriture de l'individu [30]. La biodisponibilité est moindre chez le chat avec une valeur autour de 56%. Le temps nécessaire pour atteindre le pic de concentration plasmatique est court (inférieur à 2 heures chez le chien, le chat et l'homme). La distribution dans l'organisme de la céphalexine est modérée et la liaison aux protéines plasmatiques est faible (inférieure à 15%). La demi-vie d'élimination est assez courte ( $t_{1/2}$ =1.8 à 4.7h chez le chien, 0.5 à 2h chez l'homme et de 0.6 à 2h chez les ruminants) et l'élimination se fait majoritairement (85%) sous forme inchangée dans l'urine.

### 1.2.5 Le cefprozil

Dans cette thèse, nous avons également étudié le cefprozil, une céphalosporine de deuxième génération utilisée en médecine humaine.

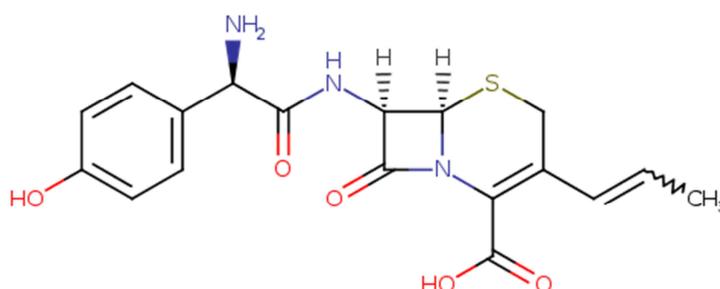


Figure 8 : Formule développée du cefprozil.

Le cefprozil, (figure 8, numéro CAS 92665-29-7) a pour formule moléculaire  $C_{18}H_{19}N_3O_5S$ .

Le cefprozil est plus puissant que la céphalexine. En effet, la céphalexine a une  $CMI_{90}$  de 8  $\mu\text{g/mL}$  contre *E. coli* alors que celle du cefprozil est de 5  $\mu\text{g/mL}$ . Pour *S. aureus*, les valeurs de  $CMI_{90}$  sont respectivement de 64 et de 2  $\mu\text{g/mL}$  [31, 32]. Cependant, les valeurs critiques en termes de sensibilité lors des tests de dilution (sensible, intermédiaire, résistant) sont identiques à celles de la céphalexine [31].

Le cefprozil possède une bonne élimination rénale chez l'homme (60-70%) mais pas chez le chien chez lequel seulement 40% sont éliminés dans les urines [33].

### 1.3 Rôle de l'immunité innée dans la lutte contre les bactéries

L'immunité est l'ensemble des mécanismes développés par l'organisme pour se protéger des agressions microbiennes et des proliférations malignes. On appelle système immunitaire l'ensemble des cellules et tissus assurant l'immunité de l'organisme.

Ce système participe au maintien de l'intégrité de nos organismes en évoluant constamment face aux multiples micro-organismes présents dans l'environnement et aux stratégies qu'ils ont développées pour contrecarrer les nôtres. Dans le cadre d'une infection par une bactérie pathogène, la réponse immunitaire débute par la reconnaissance de cet agent infectieux pour ensuite développer une réaction destinée à l'éliminer.

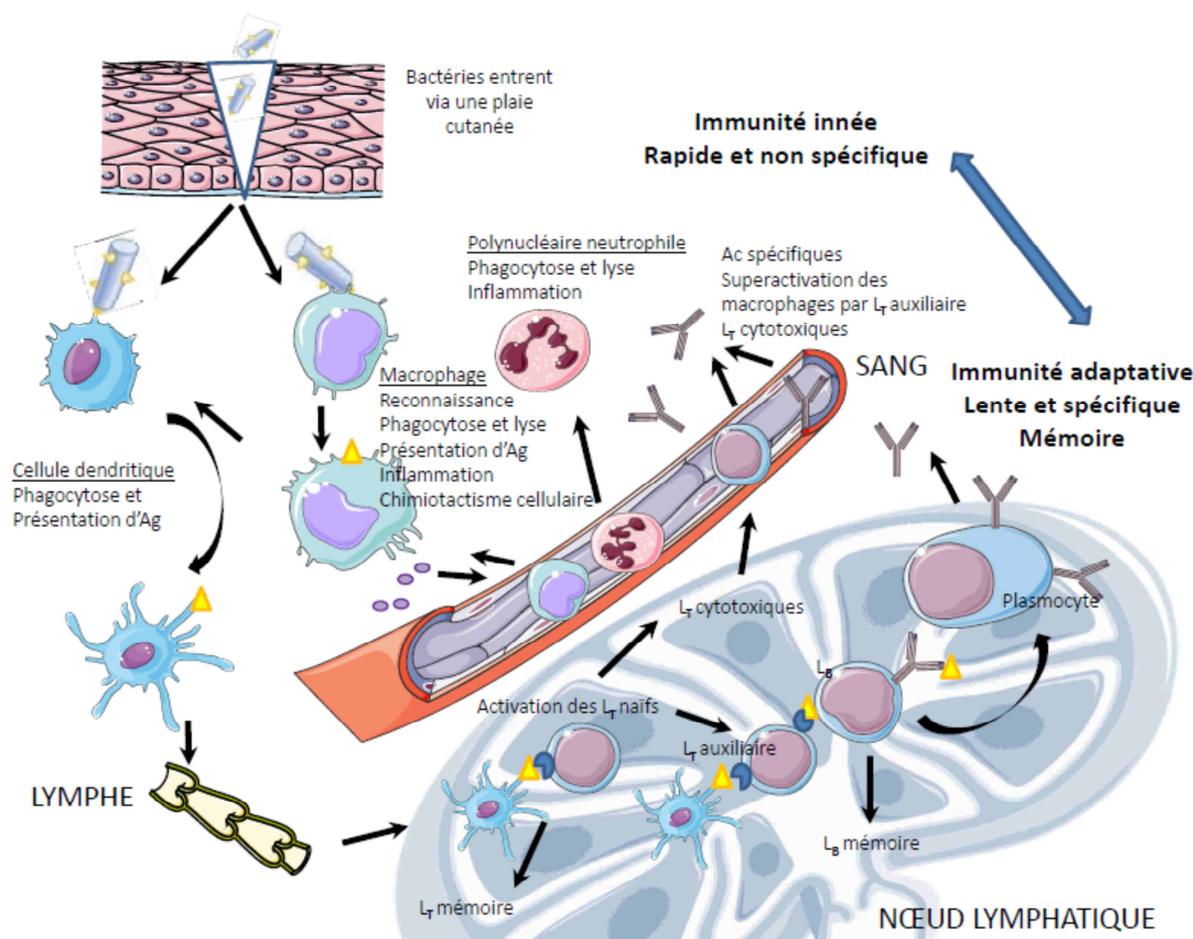


Figure 9 : Représentation schématique de la réaction immunitaire lors d'une infection bactérienne.

Les premières barrières de défense de l'organisme sont la peau et les muqueuses. Elles permettent la protection du milieu intérieur vis-à-vis de l'extérieur. La pénétration des microorganismes au travers de ces barrières déclenche la première ligne de défense du

système immunitaire : l'immunité innée (figure 9). Celle-ci, constituée principalement du système du complément et de cellules phagocytaires, permet à l'organisme de se défendre de manière non spécifique et immédiate.

Des cellules sentinelles, les macrophages tissulaires résidents, reconnaissent les micro-organismes et vont les phagocyter. Cette phagocytose va permettre de digérer une partie des bactéries, de présenter les antigènes bactériens à d'autres cellules, et par la sécrétion de différents éléments comme les cytokines et les chémokines de créer une réaction inflammatoire et d'attirer d'autres cellules sur le site [34]. Cela se déroule dans les 4 premières heures qui suivent l'infection et permet d'éliminer 99% des micro-organismes [21].

Les polynucléaires neutrophiles, qui proviennent du sang, sont attirés sur le site grâce aux chémokines, en particulier IL-8, et leur migration est favorisée par l'inflammation. Ils vont phagocyter et tuer les pathogènes localement, et contribuer à la réaction inflammatoire. Ils interviennent entre 0 et 12h après le début de l'infection et permettent de tuer 99.9% des micro-organismes [21].

Ensuite, une seconde vague de macrophages va agir, suite au recrutement de monocytes circulants par l'intermédiaire de CCL2 entre 12h et 48h après le début de l'infection.

En parallèle, des cellules dendritiques sur site, activées par les macrophages, vont également phagocyter des bactéries pathogènes, et vont ensuite signaler la présence de non-soi à distance du site. C'est le début de l'immunité adaptative.

Ces cellules, activées, circulent via la lymphe et se rendent dans les nœuds lymphatiques. Elles vont sur place activer les lymphocytes T ( $L_T$ ) correspondants aux antigènes présentés. Ces lymphocytes peuvent ensuite se transformer en  $L_T$  cytotoxiques, utiles dans la lutte contre les bactéries intracellulaires, en  $L_T$  mémoire ou bien en  $L_T$  auxiliaires. Les lymphocytes B, activés par différents signaux et aidés par les  $L_T$  auxiliaires, vont se différencier en  $L_B$  mémoire et en plasmocytes, qui produiront des immunoglobulines spécifiques du pathogène [34, 35]. C'est le système immunitaire adaptatif, qui est spécifique et qui a une mémoire mais qui est plus tardif à se mettre en place car pour une première exposition, il est opérationnel environ 96h après le début de l'infection [21].

$L_T$  auxiliaires,  $L_T$  cytotoxiques et immunoglobulines peuvent alors retourner sur le site infectieux et collaborer avec les cellules du système immunitaire inné afin de recruter, faciliter la phagocytose via la reconnaissance des pathogènes et la superactivation des cellules phagocytaires, révélant ainsi un dialogue permanent en système immunitaire inné et adaptatif [34, 35].

L'immunité innée est ainsi qualifiée de naturelle mais aussi de non spécifique car ses modes d'action sont invariants et ne s'adaptent généralement pas aux micro-organismes rencontrés. Elle se mobilise rapidement en tout point de l'organisme, et assure la première défense de l'hôte en combattant directement le pathogène ou en informant l'organisme de sa présence [36]. Nous allons donc la présenter plus en détails.

### 1.3.1 Organisation de la réponse immunitaire innée

Les surfaces épithéliales exposées à l'extérieur de l'organisme, telles que la peau et les muqueuses, sont les premières à être en contact avec le pathogène. Elles représentent ainsi la première ligne de défense physique, chimique et microbiologique de l'organisme [37]. Une brèche de ces barrières facilite l'entrée du germe dans l'organisme et les micro-organismes ont aussi développés de nombreux mécanismes pour contourner ou détruire les défenses épithéliales [38]. Ces epithelia communiquent étroitement avec les cellules de l'immunité. La production de médiateurs inflammatoires est une fonction essentielle de ces barrières qui permet le recrutement précoce de cellules immunitaires effectrices sur le site infectieux.

Le système du complément est l'un des premiers mécanismes à se mettre en place suite à l'entrée d'un pathogène dans l'organisme. Il représente un ensemble de plus de trente protéines plasmatiques et membranaires jouant un rôle essentiel dans l'élimination des microorganismes. En effet, la cascade du complément génère des molécules qui enrobent les micro-organismes, les marquent et recrutent des cellules phagocytaires.

La majorité des protéines du complément sont plasmatiques et s'activent selon différents modes de reconnaissance des pathogènes. Parmi ces protéines, le complexe enzymatique C3b a un rôle d'opsonine : il se fixe à la bactérie afin de permettre sa reconnaissance par les phagocytes. Le C5b induit le recrutement des composants du complexe d'attaque des membranes (CAM) formant un pore dans la membrane plasmique de la bactérie et conduisant à sa mort par choc osmotique. Cependant, le CAM n'est pas efficace sur les bactéries Gram positives comme *S. aureus* en raison de leur paroi épaisse, riche en peptidoglycanes, et de la sécrétion de protéines bactériennes inhibitrices de l'activité du complément comme SCIN (Staphylococcus complement inhibitor), Efb (extracellular fibrinogen-binding protein), l'auréolysine et la staphylokinase [39]. Le système du complément participe à l'opsonisation, à la réponse inflammatoire, à l'élimination des complexes antigènes-anticorps et à la destruction des pathogènes [40, 41].

Les premières cellules de l'immunité à rencontrer le pathogène sont les macrophages tissulaires résidents. Ils sont un composant essentiel de l'immunité innée et jouent un rôle central de sentinelles dans l'inflammation et les défenses de l'hôte. Les macrophages dérivent des monocytes qui représentent 4 à 10% des leucocytes sanguins. Les monocytes et macrophages appartiennent au système des phagocytes mononucléés originaires de la lignée myéloïde dont la genèse a lieu dans la moelle osseuse à partir d'un progéniteur myéloïde commun avec les granulocytes [42]. Les étapes de différenciation du monocyte sont essentiellement dépendantes du facteur de croissance M-CSF (Macrophage-colony stimulating factor ou CSF-1). Lorsque la maturation cellulaire est atteinte, les monocytes quittent la moelle osseuse pour aller dans la circulation sanguine. Les monocytes circulant transitent plusieurs jours dans le sang avant de sortir des capillaires par diapédèse active pour se localiser dans différents tissus de l'organisme où ils se transforment en macrophages résidents ; les monocytes inflammatoires ne restent eux que quelques heures dans le sang avant d'être transformés en macrophages pour répondre aux stimuli microbiens.

Les phagocytes mononucléés sont des éléments essentiels de l'orchestration des réponses immunitaires innées et adaptatives lors d'une infection et ils interviennent à la fois au départ puis au cours la réponse immunitaire innée. Lors d'une infection bactérienne, l'initiation de la réponse débute toujours par la reconnaissance du pathogène, sa phagocytose par les macrophages résidents afin de limiter la prolifération bactérienne et d'émettre des signaux de danger. La reconnaissance de la bactérie par le macrophage est permise par un ensemble de récepteurs, les PRR (pattern recognition receptors), qui sont membranaires ou cytoplasmiques. Ces récepteurs reconnaissent des motifs moléculaires conservés exprimés par les micro-organismes, appelés les PAMPs. (pathogen associated molecular pattern) [36, 43]. Les PAMPs sont produits uniquement par les micro-organismes, sont exprimés constitutivement et sont invariants entre microorganismes du même groupe. Ces caractéristiques permettent une reconnaissance efficace par un petit nombre de PRR. Par exemple, de nombreux PAMP font partie de la paroi bactérienne, tels que le lipide A du lipopolysaccharide (LPS) des bactéries Gram - ou l'acide lipotéichoïque (LTA) des bactéries Gram +, permettant la reconnaissance de l'ensemble des bactéries Gram - et + et leur phagocytose par les granulocytes et les macrophages. Un message d'alerte est ensuite transmis par les macrophages au système immunitaire via la sécrétion de cytokines inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) et de chimiokines qui vont aider au recrutement des granulocytes neutrophiles (IL-8) ou des monocytes (CCL2).

Un recrutement leucocytaire a ensuite lieu : les leucocytes adhèrent à l'endothélium grâce aux molécules d'adhésion exprimées par les cellules endothéliales, s'extravasent [44] puis migrent dans les tissus vers le site infectieux en suivant les gradients de concentration de chimiokines fixées. Ce sont les granulocytes neutrophiles qui sont recrutés en premier, puis les monocytes. Une fois au site infectieux, les neutrophiles activés phagocytent et éliminent les bactéries par la libération de facteurs antimicrobiens contenus dans les 3 types de granules ou générés par activation métabolique, comme la NADPH oxydase [45]. L'activité bactéricide des granules, comme pour les macrophages, permet la destruction des pathogènes phagocytés (figure 10). Les neutrophiles sont ainsi des cellules clés de la lutte antibactérienne à travers leur forte capacité de phagocytose et d'élimination intracellulaire des pathogènes.

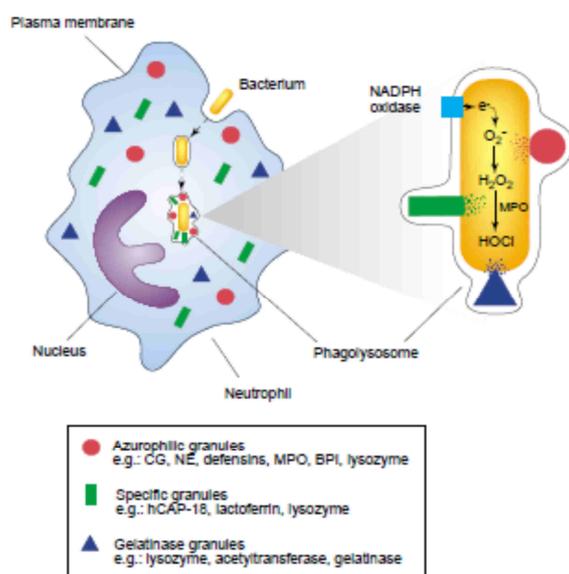


Figure 10 : Présentation schématique des mécanismes lors de la phagocytose des bactéries par les neutrophiles. D'après [46].

Les granules azurophiles spécifiques et gélatinases contiennent des protéases, des protéines antimicrobiennes, des peptides caractéristiques et des enzymes. Les mécanismes dépendants de l'oxygène reposent sur le complexe de la NADPH oxydase qui s'assemble à la membrane phagosomale et produit du  $O_2^-$ , qui est rapidement converti en peroxyde d'hydrogène. A son tour, la myéloperoxydase, un composant des granules azurophiles, génère du HOCl à partir du peroxyde d'hydrogène.

Les monocytes inflammatoires sont recrutés dans un second temps. Ils se différencient en macrophages qui complètent l'activité phagocytaire des neutrophiles, c'est la 3<sup>ème</sup> phase d'action des phagocytes mononucléés dans l'immunité innée. Ces macrophages sont également capables de phagocyter les neutrophiles sénescents et ont la capacité de présenter les antigènes aux  $L_T$  [47]. Les monocytes peuvent aussi se différencier en cellules dendritiques qui captent les antigènes et migrent dans les organes lymphoïdes secondaires pour les présenter aux  $L_T$  et mettre en route la réponse immunitaire adaptative. Les macrophages ont donc des rôles multiples au cours de la réponse immunitaire : ils sont capables reconnaître des bactéries, de les phagocyter, ils organisent la réaction inflammatoire précoce en sécrétant des cytokines comme IL-1, IL-6 et TNF $\alpha$ , ils recrutent d'autres cellules phagocytaires via la sécrétion de chimiokines IL-8 et CCL2 et présentent les antigènes aux  $L_T$  auxiliaires. Ils participent ainsi aux 4

phases de la réponse immunitaire qui sont la reconnaissance des pathogènes, l'activation du système immunitaire, la phase effectrice et le retour au silence.

### 1.3.2 Mécanisme de phagocytose des macrophages

La phagocytose est une fonction clé des macrophages. En plus de son rôle dans l'homéostasie par l'élimination des cellules sénescentes et des débris cellulaires, elle est cruciale pour les défenses anti-infectieuses. Elle permet la dégradation des micro-organismes mais aussi le recrutement et l'activation d'autres cellules de l'immunité [48, 49].

La phagocytose correspond à l'internalisation de grosses particules dans des vacuoles appelées phagosomes. Pour aboutir à cette internalisation, la bactérie est reconnue par voie directe ou indirecte, le signal de reconnaissance est transmis et la bactérie se retrouve entourée de pseudopodes du macrophage. La phagocytose conduit à l'internalisation d'une partie de la membrane du phagocyte pour former une vacuole intracellulaire, le phagosome, qui contient le micro-organisme reconnu (figure 11). Le phagosome subit ensuite plusieurs étapes de maturation qui vont permettre la production de nombreux facteurs antimicrobiens. Le phagosome va d'abord fusionner avec des endosomes, ce qui va permettre une modification de la composition de sa paroi et de son contenu. On observe ainsi l'activation d'une pompe à proton (ATPase) qui permet l'acidification de son contenu [50]. Le phagosome acquiert également de nombreuses enzymes responsables de la digestion du micro-organisme comme des protéases acides (cathepsines), des lipases et des glycosidases [51, 52]. Lors de cette maturation on observe aussi une forte augmentation de la concentration en peptides antimicrobiens, dont les défensines, dans le phagosome [46].

Un orage oxydatif se produit ensuite lors de la fusion du phagosome avec le lysosome. On observe l'activation de 2 complexes enzymatique, la NADPH oxydase et la NO-synthase inductible (iNOS). Ces 2 complexes produisent de nombreux composés dont le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [53], le peroxy-nitrite et les nitrites [54] qui possèdent de puissantes activités antimicrobiennes et qui participent activement à la dégradation des micro-organismes phagocytés.

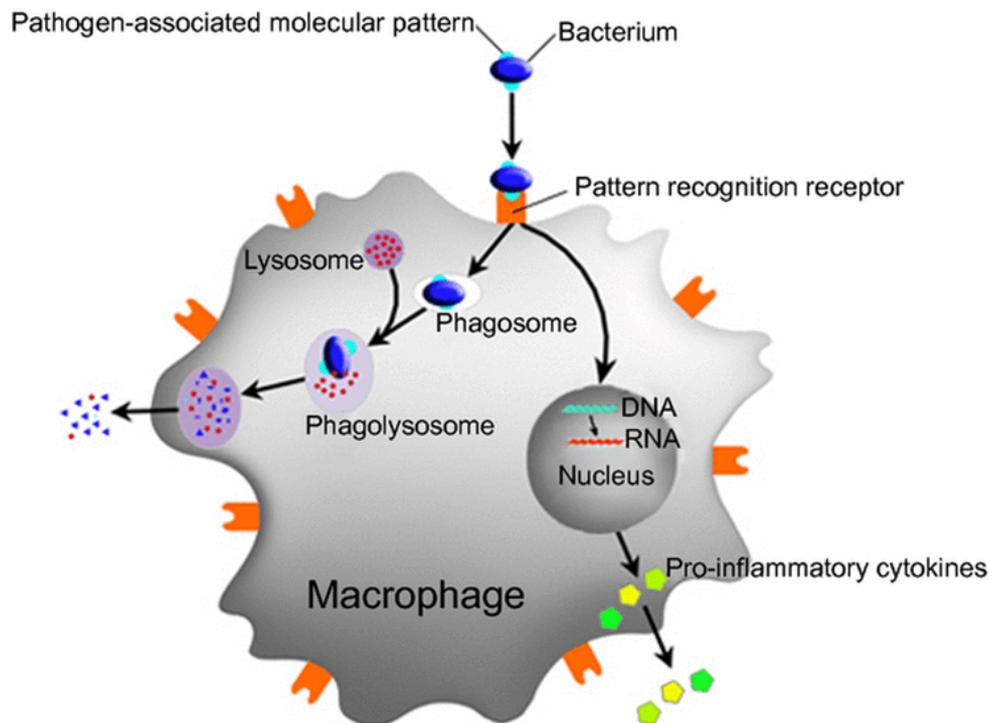


Figure 11 : Phagocytose du macrophage : maturation du phagosome et présentation antigénique. D'après [55].

Suite à la reconnaissance des PAMP par le PRR, le signal est transmis et la formation des pseudopodes commence. Cela aboutit à la formation d'un phagosome entourant la bactérie et dont le contenu va progressivement être modifié, pour devenir un phagolysosome et aboutir à la lyse bactérienne. Les peptides générés par la dégradation de la bactérie sont ensuite chargés sur les molécules de CMH et les complexes peptide/MHCI-II sont alors exportés à la surface cellulaire. En parallèle, la phagocytose entraîne la production de cytokines pro-inflammatoires par le macrophage.

Par ailleurs, la dégradation du pathogène permet l'apprêtement des peptides antimicrobiens pour la présentation antigénique à la surface des phagocytes par le CMH-II, étape indispensable à l'activation des lymphocytes T spécifiques du micro-organisme [48, 49].

### 1.3.3 Sécrétion de cytokines et organisation de la réponse inflammatoire

La reconnaissance de ligands bactériens mène à la production d'une cascade de cytokines et de chimiokines par les macrophages permettant l'activation, la mobilisation et le recrutement d'autres cellules du système immunitaire. C'est l'initiation de l'inflammation. Des cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  et IL-6 sont sécrétées, ainsi que des chimiokines telles que CXCL8 (IL-8) qui va promouvoir le recrutement et l'activation des granulocytes neutrophiles et CCL2 qui attire les monocytes sanguins afin qu'ils se différencient en macrophages dans les tissus [21].

L'inflammation a 3 rôles majeurs dans la lutte contre une infection bactérienne. Elle augmente le nombre de molécules et de cellules effectrices provenant du sang sur le site infectieux afin de détruire plus de pathogènes, elle induit une coagulation locale, afin de confiner l'infection et

éviter une dissémination hématogène, et enfin elle favorise la réparation des tissus. C'est un phénomène utile localement, mais qui doit rester contrôlé afin d'éviter des conséquences systémiques néfastes [56].

Les cytokines pro-inflammatoires ont des effets variables en fonction de leur concentration dans le milieu et de leur diffusion systémique. La cytokine TNF- $\alpha$  a un effet bénéfique local dans la lutte contre des bactéries pathogènes en améliorant le recrutement des cellules immunitaires via une augmentation de l'adhérence des cellules sur l'endothélium, une augmentation de la perméabilité tissulaire et une augmentation des protéines plasmatiques au site infecté. Par la suite, elle entraîne également une coagulation intravasculaire locale, ayant donc une action majeure dans la prévention de la dissémination bactérienne. De manière systémique, TNF- $\alpha$  entraîne une augmentation du fibrinogène et du sérum amyloïde A (SAA), caractérisant une réaction inflammatoire systémique et provoque une hyperthermie. Une forte concentration systémique en TNF- $\alpha$  est délétère pour l'organisme en participant au développement d'un choc septique qui se manifeste par une défaillance circulatoire aigue avec entre autres hypotension artérielle et hypoprotéïnémie ; une coagulation intravasculaire disséminée peut également être présente. Le développement d'un choc septique est associé à une mortalité importante de l'organisme hôte [21].

L'IL-1 $\beta$  fait partie des IL-1 mais elle est spécifiquement produite par les macrophages. La pro-IL-1 $\beta$  est produite via la voie d'activation des TLR. Sa forme active, IL-1 $\beta$ , résulte de son clivage par les caspases, par exemple la caspase 1, qui est elle-même activée via l'activation de l'inflammasome [57]. Le clivage de la caspase 1 induit également la mort cellulaire des macrophages par pyroptose [58]. D'autres formes de clivage de la pro-IL-1 $\beta$  que l'inflammasome comme la caspase 8 sont également rapportées [59]. Localement, comme TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  a un effet bénéfique dans la lutte contre des bactéries pathogènes en améliorant le recrutement des cellules immunitaires via une augmentation de l'adhérence des cellules sur l'endothélium, une augmentation de la perméabilité tissulaire et l'activation des neutrophiles et des lymphocytes. Elle génère aussi une destruction tissulaire locale. De manière systémique, elle entraîne une hyperthermie et la production d'IL-6 et d'IL-8 [21].

L'IL6 fait partie de la grande famille des hématopoiétines et elle est produite par un grand nombre de types cellulaires. Sa sécrétion peut être augmentée par la présence de TNF- $\alpha$  ou d'IL-1 $\beta$ . IL-6 possède notamment des effets pléiotropes sur la réponse inflammatoire avec une activation des lymphocytes et une modulation de l'hématopoïèse. Ses effets systémiques sont

l'hyperthermie et l'augmentation de la production des protéines de la phase aiguë par les hépatocytes comme la protéine C réactive, le fibrinogène et la SAA [56].

Des quantités élevées de cytokines, y compris les 3 cytokines pro-inflammatoires que nous venons d'évoquer (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6) ont été retrouvées dans le sang de patients atteints de sepsis, et une quantité importante d'IL-6 circulante est associée à un pronostic vital négatif [60]. Ces 3 cytokines ont donc des propriétés variées, qui sont nécessaires à l'hôte dans le cadre de la lutte contre une infection bactérienne quand la réaction inflammatoire est contrôlée, mais qui peuvent également être à l'origine de graves complications systémiques en cas de surproduction et d'emballement de la réaction inflammatoire.

#### 1.3.4 Spécificités d'interaction entre *S. aureus* et macrophages

*S. aureus* est une espèce bactérienne de forme sphérique, Gram positive, qui forme des colonies opaques jaune-dorées et qui est la plus pathogène de son genre [61]. Les macrophages ont un rôle majeur dans la lutte contre ce pathogène. Il a été montré que la déplétion des neutrophiles et des macrophages augmente la sensibilité des souris à une infection systémique par *S. aureus*, mettant en évidence le rôle fondamental de ces cellules dans le contrôle de ces infections. L'injection de macrophages dans des souris dépourvues de neutrophiles et macrophages restaure la survie de ces souris à un taux proche de 100% [62].

La reconnaissance de *S. aureus* par les macrophages est permise par plusieurs PAMPs produits par cette bactérie (figure 12). Les lipopeptides et l'acide lipotéichoïque extracellulaires de la paroi bactérienne des Gram + sont reconnus par le TLR2 qui forme un dimère avec TLR1 ou TLR6 dans la membrane plasmique [63]. Le muramyl dipeptide peut lui être reconnu dans le cytosol du macrophage par la protéine NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain 2) qui fait partie des NOD-like receptors (NLR) [63]. Cette reconnaissance initie l'activation des voies de signalisation comme NF- $\kappa$  B dans le noyau qui conduisent à la production de cytokines et chémokines dont les cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ , IL-6 et la pro IL-1 $\beta$  [35].

TNF- $\alpha$  et IL-6 peuvent être sécrétées telles quelles, mais la pro IL-1 $\beta$  nécessite elle d'être clivée. La réunion de 3 composantes que sont la procaspase1, la protéine adaptatrice ASC et la protéine réceptrice NLRP3, activée par la reconnaissance de signaux de danger cytosoliques, conduit à la formation d'un inflammasome qui va activer la caspase1 [35]. C'est la voie canonique de l'activation de la caspase1 qui est mise en jeu face à un Gram+. Cette enzyme, une fois active, va avoir 2 rôles : d'une part cliver des cytokines de la famille des IL-1 comme IL-

IL-1 $\beta$  et IL-18 et réguler leur sécrétion extracellulaire, et d'autre part activer la pyroptose qui est une mort cellulaire programmée résultant en la libération de grandes quantités de substances inflammatoires [64].

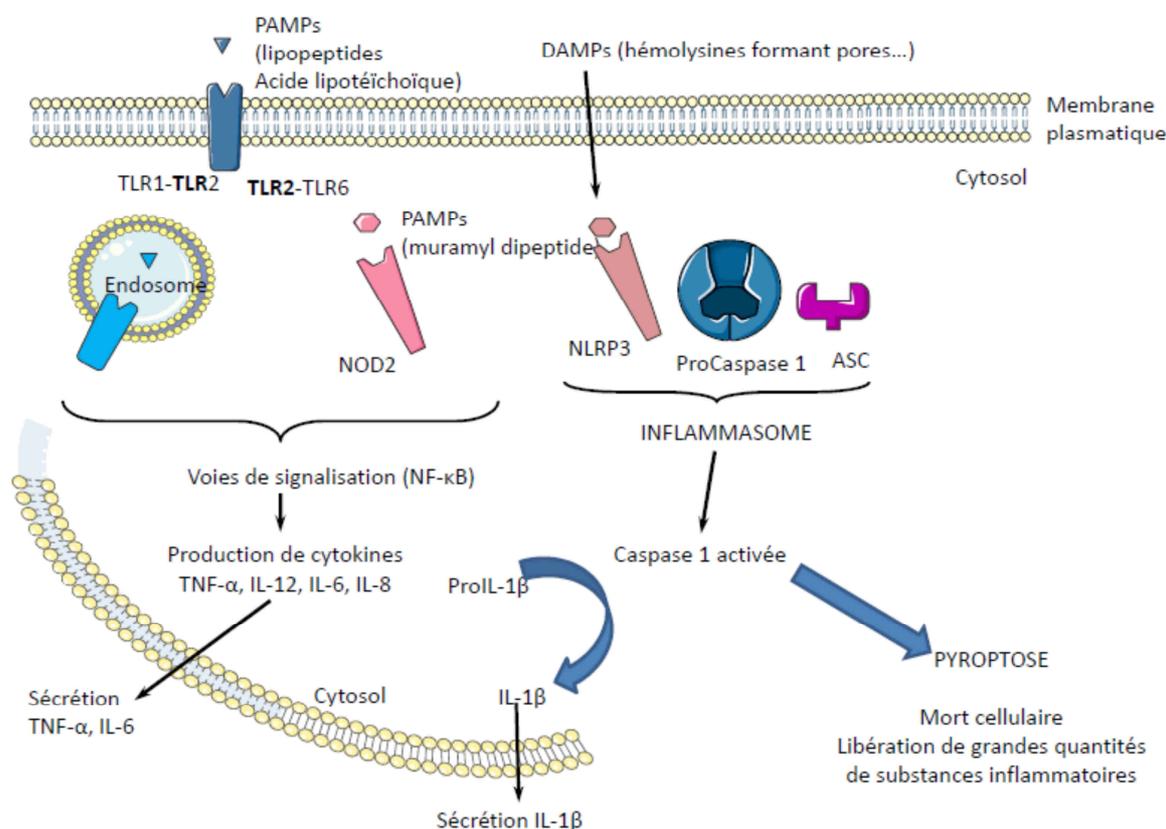


Figure 12 : Reconnaissance de *S. aureus* par un macrophage.

Selon le microenvironnement dans lequel les macrophages évoluent (facteurs génétiques de l'hôte, cytokines sécrétées et composés microbiens), ils peuvent acquérir différents phénotypes, classiquement divisés en deux groupes M1 et M2 [65]. Ceux-ci diffèrent en termes de récepteurs, de sécrétion de cytokines, et de fonctions effectrices. Les macrophages M1 sont pro-inflammatoires et microbicides alors que les M2 sont immunomodulateurs et peu microbicides.

Il existe une sensibilité différentielle de l'hôte vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*. Les pathogènes, en perpétuelle coévolution avec leurs hôtes, ont développé des mécanismes pour détourner l'étape de différenciation M1/M2 des macrophages à leur avantage [16].

*S. aureus* est capable de détourner l'immunité innée par un arsenal de protéines et de toxines. D'une part, cette bactérie sécrète plusieurs protéines comme Efb et SCIN qui sont capables d'inhiber les différentes voies d'activation du complément et donc la phagocytose. De plus, *S. aureus* sécrète de nombreux facteurs permettant d'échapper aux phagocytes. Les toxines formant des pores, la  $\beta$ -hémolysine et la moduline phénol soluble sont des exotoxines qui ciblent les macrophages résidents [66-68]. L' $\alpha$ -hémolysine, qui joue un rôle majeur dans les infections à *S. aureus*, a été bien décrite. Elle induit la lyse d'une variété de cellules de l'hôte incluant les cellules endothéliales, les monocytes/macrophages, les neutrophiles, les kératinocytes, les érythrocytes et les lymphocytes T [69]. D'autres toxines staphylococciques sont également capables de lyser les macrophages/monocytes. *S. aureus* a donc développé des stratégies qui lui permettent d'échapper à la phagocytose voire de détruire les cellules phagocytaires.

Lorsqu'il est phagocyté, plusieurs études ont montré que *S. aureus* était capable de survivre dans la cellule hôte et d'empêcher la lyse cellulaire [70]. *S. aureus* survit non seulement à la phagocytose des macrophages et des neutrophiles, mais est aussi capable de persister à l'intérieur de ces cellules [71-73] en s'échappant du phagosome et en se répliquant dans le cytoplasme [73, 74]. Cette bactérie a ainsi la capacité d'envahir les cellules normalement responsables de sa destruction. *S. aureus* préserve l'intégrité du macrophage en l'utilisant comme une niche intracellulaire : il manipule les processus de signalisation et de transcription cellulaire du macrophage pour favoriser la survie des phagocytes infectés sans destruction de la bactérie [75, 76]. Ces études ont ainsi montré que la phagocytose de *S. aureus* par les macrophages exerce un effet cytoprotecteur, qui se manifeste par la régulation positive de facteurs anti-apoptotiques, tels que Bcl-2 et Mcl-1. La lyse du macrophage survient alors seulement 5 jours après infection, suite à la réplication de la bactérie dans le cytoplasme [73]. Ces études suggèrent que le détournement de l'apoptose par *S. aureus* empêche l'élimination des cellules infectées, permettant ainsi une persistance intracellulaire du pathogène, sa dissémination par les cellules infectées et la progression de l'infection.

*S. aureus* a donc la capacité d'induire la mort des cellules hôtes précocement [70, 77], mais aussi, à l'inverse, de favoriser l'expression de facteurs anti-apoptotiques permettant la survie des cellules afin de les utiliser comme niche intracellulaire.

## 1.4 Influence de la taille de l'inoculum bactérien

Lors de l'apparition des symptômes cliniques d'une infection, la taille de l'inoculum bactérien est élevée avec une concentration moyenne de  $2 \times 10^8$  UFC/mL au site infectieux [78]. Cette taille d'inocula bactériens n'est pas stationnaire au cours du temps mais elle augmente spontanément ou diminue avec un traitement antibactérien efficace. Cette variation de taille d'inoculum au cours du temps peut avoir une influence sur l'activité des antibiotiques et du système immunitaire.

### 1.4.1 Influence de la taille de l'inoculum sur l'activité bactéricide des antibiotiques

Certaines études ont montré que, pour obtenir un même effet (bactéricidie ou bactériostase par exemple) **sur un inoculum bactérien de grande taille, les concentrations en antibiotique devaient être augmentées** par rapport à un inoculum de petite taille.

Un rapport a été calculé entre les CMI mesurées avec  $10^8$  UFC/mL et les CMI déterminées de manière standard avec  $10^5$  UFC/mL [78] sur une souche d'*E. coli* et de *S. aureus*. Il est apparu que ce rapport était toujours supérieur ou égal à 2 et atteignait une valeur de 128 pour la pipéracilline. Lorsque ce rapport de CMI est supérieur ou égal à 4, on parle d'**effet inoculum**. Les CMB ont aussi été comparées pour les deux tailles d'inoculum. Les CMB pour le grand inoculum étaient au minimum quatre fois plus élevées que pour le petit inoculum. Mizunaga *et al* [79] ont fait des observations similaires puisqu'ils ont montré qu'avec un inoculum standard ( $10^6$  UFC/mL), des carbapénèmes et des quinolones avaient tous une activité bactéricide sur une souche de *S. aureus* alors que face à un gros inoculum ( $>10^8$  UFC/mL) l'activité bactéricide de tous les antibiotiques testés était réduite, mais de façon plus marquée pour les carbapénèmes (de même pour l'effet post-antibiotique).

Les études précédentes réalisées pour une durée d'exposition fixée (CMI) ont été complétées par des études de cinétiques de bactéricidie comparant l'activité de 6 classes d'antibiotiques (daptomycine, linézolide, gentamicine, oxacilline, ciprofloxacine et vancomycine) sur un inoculum de  $5 \cdot 10^5$  et de  $5 \cdot 10^8$  UFC/mL de *S. aureus* [80]. Les vitesses de bactéricidie ont été réduites pour tous les antibiotiques avec le grand inoculum excepté pour le linézolide, mais en proportion variable. Une étude de cinétique de bactéricidie de la marbofloxacine sur *E. coli* a par ailleurs démontré que la probabilité de sélectionner des bactéries mutantes est plus importante lors de traitement d'un gros inoculum, car la fréquence de mutation est fixe et donc la probabilité de présence de bactéries mutantes au départ du traitement est augmentée avec un gros

inoculum [81]. Rio-Marques *et al* ont également montré que le développement de *S. aureus* résistants augmentait avec la taille de l'inoculum [82].

*In vivo*, l'effet inoculum est également observé et peut avoir une implication clinique importante. Par exemple, lors du traitement d'infections à MSSA (*Staphylococcus aureus* sensible à la méthicilline) avec de la céfazoline, un fort taux d'échec est rapporté et a été relié avec des souches de *S. aureus* présentant un fort effet inoculum *in vitro* [83]. Par ailleurs, Soriano *et al.* [84] ont réalisé des études *in vivo* qui ont montré l'intérêt de déterminer la CMI sur un inoculum bactérien plus important ( $10^8$  UFC/mL) que celui proposé par le CLSI. Dans un modèle d'infection intrapéritonéale avec *Escherichia coli* ATCC 25922, les auteurs ont montré que les indices PK/PD de bêtalactamines étaient plus prédictifs de l'efficacité du traitement lorsque le calcul de ces indices était fait avec la CMI déterminée à partir d'un grand inoculum.

On peut se demander ce qui est responsable de cette diminution d'action des antibiotiques en présence de grandes quantités de bactéries. *In vitro*, cette observation peut être en partie causée par le système, car le fait d'être dans un volume confiné peut augmenter la concentration des hydrolases produites par les bactéries. Cela est particulièrement vrai pour certaines bêtalactamines en présence de bactéries produisant des bêtalactamases [85]. Lors d'une étude de cinétique de bactéricidie [80], une évaluation de la dégradation des antibiotiques en présence d'un grand nombre de bactéries a permis de mettre en évidence que seuls certaines classes d'antibiotiques étaient dégradées de manière importante après quelques heures d'incubation en présence d'un gros inoculum bactérien. Pour les autres antibiotiques testés, la réduction de la concentration en antibiotique n'était pas à l'origine de la réduction de la vitesse de bactéricidie. Il a été suggéré que la réduction de l'activité des antibiotiques sur les grands inocula soit due à un rapport du nombre de molécules sur nombre de bactéries réduit. Cependant, ce rapport même divisé par un facteur 1000 reste énorme et cette explication est difficilement envisageable. Les autres hypothèses suggèrent que le grand nombre de bactéries induirait la production de déchets ou métabolites néfastes à l'action de l'antibiotique ou la mise en place de mécanismes de persistance bactérienne avec des bactéries en dormance provisoirement insensibles aux antibiotiques. Une autre explication avancée est que la population bactérienne est telle que les sous-populations résistantes sont également plus importantes en nombre et que leur sélection est favorisée par une exposition normale à un antibiotique [81]. Elles sont capables de survivre et leur destruction nécessite alors une exposition plus importante aux antibiotiques [86].

En résumé, les publications s'accordent sur le fait que la présence ou non d'un **effet inoculum** et son amplitude et ses conséquences, tant *in vivo* qu'*in vitro*, **dépendent de l'antibiotique et de la souche considérée**. La plupart des céphalosporines présentent un effet inoculum dont l'amplitude est variable [85]. Différentes études [80, 84] s'accordent à dire qu'il serait utile de **prendre en compte, non pas la CMI** telle que réalisée de manière standard, **mais la relation entre la densité bactérienne et la CMI dans le calcul des indices PK/PD**. Ces considérations ont par exemple permis de remettre en cause l'utilisation clinique de ceftazidime et de céfépidime lors du traitement d'*E. coli* produisant certaines bêtalactamases, et ce même si les antibiogrammes standards indiquent une sensibilité à ces antibiotiques [87]. Afin de tenir compte de l'effet inoculum lors de l'utilisation des bêtalactamines, une autre proposition serait de continuer l'utilisation des CMI telles qu'on les détermine actuellement mais d'augmenter les valeurs seuils des indices PK/PD face à un gros inoculum [88].

#### 1.4.2 Influence de la taille de l'inoculum sur l'activité antibactérienne du système immunitaire

La quantité de bactéries présentes dans un milieu par rapport aux cellules phagocytaires est couramment exprimée en Multiplicity Of Infection (MOI) qui est le rapport entre le nombre de bactéries et le nombre de cellules phagocytaires. Quelques études ont démontré que la taille de l'inoculum bactérien, et donc la MOI, pouvait avoir une influence sur l'activité du système immunitaire.

Dementhon *et al.* ont développé un modèle *in vitro* afin d'étudier les interactions cellulaires entre des cellules phagocytaires et plusieurs espèces de **levures Candida** [89]. Ils ont démontré que l'utilisation d'une quantité excessive de Candida (MOI 5 par rapport à MOI 1) augmente la phagocytose des levures et, en parallèle, la mortalité des **macrophages murins J774**. Cette mortalité permet la libération de levures dans le milieu qui sont ensuite de nouveau capables de se multiplier. A l'inverse, l'utilisation d'une quantité importante de macrophages par rapport aux levures (MOI 0,2 par rapport à MOI 1) diminue la phagocytose des levures et la mortalité des macrophages. Des résultats similaires, à savoir une **augmentation de la phagocytose et de la mortalité phagocytaire avec une augmentation de la MOI**, ont également été démontrés entre levures et **neutrophiles humains**.

Ces résultats ont également été observés lors d'une interaction entre cellules phagocytaires et bactéries. Schwartz *et al.* ont par exemple montré que la **phagocytose de *S. aureus*** par des **neutrophiles humains augmentait avec la MOI** avec des MOI de 1 à 5. En parallèle, la **viabilité des bactéries phagocytées augmente également en fonction de la MOI** [90]. La

phase de croissance dans laquelle se trouvent les bactéries exposées aux neutrophiles est également un facteur déterminant pour la viabilité des bactéries phagocytées. En effet, les **bactéries en faible croissance ou en latence sont plus résistantes à la cytotoxicité des neutrophiles** que les bactéries en multiplication rapide. Cette étude a également permis d'identifier une des causes de la viabilité augmentée des bactéries dans le phagosome des neutrophiles, à savoir une production insuffisante d'oxydants par les neutrophiles. Par la suite, Pang *et al.* ont confirmé que **la résistance des *S. aureus* phagocytés par des neutrophiles humains augmente en fonction de la MOI et du temps**, notamment parce que les bactéries phagocytées augmentent leur transcription d'ARNIII et par conséquent la lyse des neutrophiles [91]. En effet, la transcription de l'ARNIII est le principal effecteur du système *agr* et coordonne l'augmentation de la sécrétion de facteurs de virulence et la diminution des protéines cellulaires de surface, permettant ainsi la survie bactérienne et la destruction des neutrophiles. Cependant, en présence d'une MOI très élevée (MOI 10), la lyse importante des neutrophiles est probablement plus due à la quantité très élevée de bactéries plus qu'à une lyse due aux toxines bactériennes car il n'est pas possible de différencier la lyse des neutrophiles observée avec une souche de *S. aureus* native par rapport à une souche *agr* KO [91].

Lors d'exposition de **macrophages** à différentes MOI bactériennes, une augmentation de la phagocytose en fonction de la MOI est observée. Par exemple, Murphy *et al.* rapportent une **phagocytose croissante de *Brucella abortus*** par différents types de macrophages murins pour des **MOI variant de 25 à 1000** [92]. Jubrail *et al.* rapportent que les macrophages THP-1 contiennent mieux la croissance extracellulaire de *S. aureus* avec une MOI faible [93]. Le nombre de bactéries extracellulaires peut être maintenu pendant 9h à MOI 0,05 et pendant 4h à une MOI de 0,5. A l'inverse, il n'y a pas de contrôle pour une MOI 5. Une **augmentation de la phagocytose des macrophages THP-1** est observée **avec l'augmentation de l'inoculum bactérien initial** (MOI de 0,05 à 5). L'**activité bactéricide intracellulaire, forte dans un premier temps**, présente ensuite un **seuil** à partir duquel les **capacités** bactéricides des macrophages sont **altérées** (MOI 5, 20% de bactéries intracellulaires viables à 5h) [93]. En effet, en présence d'un inoculum bactérien important, le phagolysosome du macrophage présente une réduction de son acidification, un défaut de maturation et une activation réduite de la cathepsine D, permettant la survie intracellulaire de quelques bactéries. Ces bactéries viables peuvent alors être libérées dans le milieu lors de la lyse des macrophages puis être phagocytées de nouveau par d'autres macrophages. Ces **cycles de lyse et de phagocytose**, observés lorsque les macrophages sont surchargés par la quantité de bactéries, maintiennent un pool de bactéries intracellulaires viables, qui peut expliquer la **persistance de certaines infections à *S. aureus***.

De façon plus générale, en dehors des cellules phagocytaires, Kahl et al. ont démontré que l'internalisation de *S. aureus* par des **cellules épithéliales respiratoires**, cellules impliquées dans les infections au long cours de patients atteints de mucoviscidose, est dépendante de la taille de l'inoculum bactérien et du temps pour des MOI de 5 à 50 [94]. Pour ces cellules, les bactéries sont phagocytées mais sans fusion avec le lysosome ; ensuite une **division bactérienne intracellulaire commence et se termine par l'apoptose des cellules infectées et la libération des *S. aureus***. Finkensieper *et al.* ont montré que des cellules phagocytaires différenciées à partir de cellules souches embryonnaires ont également des capacités de phagocytose bactérienne, et que lors d'une infection *in vitro* à *E. coli*, la phagocytose résultante augmente avec le temps et permet de diminuer la quantité de bactéries présentes dans le milieu [17]. En parallèle, une augmentation de production de cytokines inflammatoires comme TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  a été observée en présence des bactéries. Cette production de cytokines varie en fonction de la cytokine et de la taille de l'inoculum bactérien.

L'influence de la charge bactérienne sur la réponse du système immunitaire a été modélisée par Drusano *et al.* avec un **modèle *in vivo*** d'infection dans le muscle de la **cuisse de souris** par *P. aeruginosa* ou *S. aureus* [95]. Ils ont démontré que **l'activité bactéricide du système immunitaire était saturable** et suivait un modèle de Michaelis-Menten et qu'elle variait en fonction du pathogène. Jubrail *et al.* ont quant à eux confirmé leurs résultats *in vitro* par un **modèle murin *in vivo* d'infection pulmonaire** [93]. En présence d'un **faible inoculum** bactérien ( $10^5$  UFC *S. aureus*), et avec une présence prédominante de macrophages dans le liquide broncho-alvéolaire (>95%), toutes les **souris guérissent** et aucune bactérie intracellulaire n'est présente après 72h. En présence de cette charge bactérienne, les bactéries intracellulaires survivent de 24 à 48h mais les macrophages finissent par tuer tous les pathogènes. Avec un **gros inoculum** ( $10^7$  UFC *S. aureus*), des neutrophiles sont recrutés dans le liquide broncho-alvéolaire, 78% des souris présentent une **infection persistante à 72h** et des bactéries intracellulaires sont retrouvées dans les macrophages et dans les neutrophiles. Ceci corrobore l'hypothèse selon laquelle les cellules phagocytaires peuvent devenir un réservoir pour les pathogènes lors d'infections sévères.

## 1.5 Conclusion et Projet de thèse

La résistance aux antibiotiques est maintenant reconnue comme un problème majeur de santé publique et un usage prudent et raisonné de cette classe thérapeutique est nécessaire. Actuellement, lors d'un traitement exigeant des administrations répétées sur plusieurs jours, le paradigme, jamais vérifié, est que la même dose d'antibiotique doit être utilisée quotidiennement sur toute la durée du traitement. Cependant, la synthèse bibliographique a clairement mis en évidence que la puissance des antibiotiques *in vitro* et *in vivo* est fonction de la taille des inocula à éradiquer c'est-à-dire que les concentrations requises pour qu'un antibiotique soit efficace sont d'autant plus faibles que la taille de l'inoculum à éradiquer est réduite. Elle a également souligné que les valeurs de la CMI peuvent augmenter avec la taille de l'inoculum bactérien et il y a donc une modification possible des valeurs des indices PK/PD utilisés lors de la détermination des schémas posologiques en fonction de la charge bactérienne.

Nous avons vu que la CMI est actuellement déterminée par le biais de méthodes standardisées comme celles de la microdilution sériée décrite par le CLSI. Ces méthodes utilisées en routine sont reproductibles mais leurs résultats peuvent être influencés par de nombreuses variables dont la concentration en antibiotiques dans le milieu.

Dans le cadre de calculs à visée plus mécanistique et notamment lors de la détermination de schémas posologiques via les indices PK/PD, la justesse de la détermination de la CMI est nécessaire et nous avons donc choisi de nous intéresser dans une première partie à un des facteurs de variabilité, à savoir à la stabilité des antibiotiques lors de la détermination de la CMI. Ensuite, nous avons choisi d'étudier l'influence de l'exposition des bactéries à des céphalosporines, la céphalexine et le cefprozil, en relation avec des tailles d'inocula bactériens variables, afin de pouvoir adapter les schémas posologiques.

De plus, *in vivo*, intervient une composante supplémentaire qui n'existe pas *in vitro* et qui pourrait amplifier l'influence de la taille de l'inoculum bactérien sur l'efficacité des antibiotiques, à savoir les mécanismes de défense immunitaire chez des individus non immunodéprimés. Ces mécanismes, qu'ils soient spécifiques ou non spécifiques, peuvent également être influencés par la taille des inocula à éradiquer, notamment les cellules phagocytaires. De ce fait, il était pertinent d'étudier l'interaction entre la taille de la population bactérienne et les premières cellules en contact avec les pathogènes, les macrophages, et plus largement entre ces 2 éléments et des concentrations variables en céphalexine.

Les objectifs de cette thèse ont été :

- d'évaluer **la stabilité ou la dégradation** éventuelle de plusieurs antibiotiques dans les **conditions exactes du test de microdilution sériée**
- de déterminer si cette dégradation était à même de **modifier** les résultats des tests de sensibilité, notamment les **valeurs de CMI et de CMB dans une étude préliminaire**
- d'évaluer dans un système *in vitro* simple l'influence de la **taille de l'inoculum bactérien** sur l'**activité bactéricide** de deux céphalosporines : la céphalexine et le cefprozil
- d'étudier **l'interaction entre S. aureus, macrophages et céphalexine** par le **développement** d'un **système tripartite**, cette étude étant facilitée par les études précédentes permettant d'éviter l'interférence avec d'autres facteurs de confusion tel que la dégradation des antibiotiques.

Ce travail de thèse a débuté par une étude *in vitro* de stabilité des antibiotiques afin d'étudier l'effet d'une instabilité lors de la détermination des valeurs de CMB et de CMI et son incidence clinique.

Une seconde étude *in vitro* a été réalisée en exposant *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* à des concentrations constantes puis variables d'antibiotiques, afin de déterminer l'influence de la taille de l'inoculum bactérien sur l'activité bactéricide de 2 céphalosporines.

Enfin, un système tripartite *in vitro* a été développé afin d'étudier les interactions entre *Staphylococcus aureus*, des macrophages murins issus de la moelle osseuse et la céphalexine. Ce système a permis de vérifier les résultats obtenus précédemment entre *Staphylococcus aureus* et céphalexine. Il a également permis d'étudier avec précision l'influence de la taille de l'inoculum bactérien sur les macrophages, et de déterminer le rôle, positif ou négatif, d'un antibiotique extracellulaire dans ce système.

---

## **2 Etude expérimentale**

---



## 2.1 Stabilité *in vitro* des antibiotiques et influence sur la détermination de la sensibilité des bactéries

### 2.1.1 Problématique

Comme il a été évoqué dans la partie 1.1.1, une des méthodes de référence pour mesurer la CMI et donc pour déterminer la sensibilité d'une bactérie à un antibiotique est la microdilution sériée. La concentration *in vitro* de l'antibiotique est supposée rester constante pendant l'incubation de ce test mais en réalité, de nombreux facteurs physiques peuvent affecter la stabilité des antibiotiques dont la lumière, la composition du milieu, le pH et la température [3]. Une telle instabilité lors de la réalisation de tests de sensibilité peut entraîner une sous-estimation de l'activité antibactérienne de la molécule [4] et par conséquent modifier la décision clinique comme augmenter les doses administrées, ajouter un autre antibiotique ou même abandonner l'utilisation d'un antibiotique. Des études se sont intéressées à la stabilité des antibiotiques lors du stockage de plaques préparées à l'avance [96-98] mais peu d'études se sont intéressées à une possible dégradation pendant l'incubation elle-même [4, 5].

### 2.1.2 Objectifs

Les objectifs de cette étude préliminaire ont été :

- d'évaluer **la stabilité ou la dégradation** éventuelle de plusieurs antibiotiques dans les **conditions exactes du test de microdilution sériée**
- de déterminer si cette dégradation était à même de **modifier** les résultats des tests de sensibilité, notamment les **valeurs de CMI et de CMB**.

### 2.1.3 Matériel et méthodes

#### 2.1.3.1 Préparation des antibiotiques pour l'analyse quantitative

Des antibiotiques ont été sélectionnés en raison de leur fréquence d'utilisation en médecine humaine et vétérinaire et afin de représenter plusieurs classes d'antibiotiques, sans tenir compte des données relatives à leur stabilité. Les différentes substances et les dilutions réalisées en plaques de microdilution ont été comme suit : céphalexine monohydrate de 0,5 à 256µg/mL, amoxicilline de 0,25 à 128µg/mL, céfotaxime sel de sodium de 0,125 à 64µg/mL, ciprofloxacine de 0,031 à 16µg/mL, érythromycine hydrate et clarithromycine de 0,016 à 8µg/mL et doxycycline hyclate de 0,008 à 4µg/mL.

Les molécules ont été diluées selon les consignes des fabricants (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO pour l'amoxicilline, le céfotaxime, la ciprofloxacine, la doxycycline, l'érythromycine hydrate et

la clarithromycine; ACS Dobfar, Tribiano, Italie pour la céphalexine). Les plaques de microdilution ont été préparées extemporanément en dilution sériee comme décrit pour la détermination des CMI [97] excepté que 100µL de milieu de Mueller-Hinton ajusté en cations ont été ajoutés aux puits sans microorganisme afin d'éviter toute dégradation d'antibiotique qui aurait pu être causé par une bactérie. Les plaques ont été placées dans un incubateur à l'obscurité et à 37°C.

A chaque temps de prélèvement (i.e. 0, 3, 6, 10 et 24h), 100µL ont été prélevés des 3 puits adjacents en moins de 2 minutes, dilués avec 900µL d'eau distillée et stockés à 4°C pendant moins de 4h avant analyse.

### ***2.1.3.2 Dosage quantitatif des antibiotiques***

Les différentes conditions ont toutes été mesurées en triplicata grâce à une méthode d'UPLC associée à une spectrométrie de masse (Acquity UPLC couplé avec un spectromètre de masse Xevo triple quadrupole (Waters, Milford, MA, USA)).

Cinq µL de chaque échantillon dilué ont été injectés dans une colonne Cortecs C18 (2.1\*50 mm; 1.6µm, Waters) et élués à l'aide d'un mélange d'eau, 0,1% d'acide formique et un gradient d'acétonitrile. La température de la colonne et de l'autoéchantillonneur ont été fixées à 40 et 10°C respectivement. Les échantillons ont été ionisés en ionisation positive à électrospray. Le voltage capillaire et la température source ont été réglés à 2,5kV et 150°C. La température de désolvatation et le flux d'azote ont été réglés à 650°C et 800L/h. L'argon a été utilisé comme gaz de collision à un flux de 0,12mL/min. La quantification a été effectuée en utilisant le suivi des réactions multiples (multiple reaction monitoring MRM).

Les transitions MRM, la tension du cône et les énergies de collision utilisées pour les différents antibiotiques sont rapportées dans le tableau 1. La méthode a été validée pour chaque molécule en termes de linéarité, de répétabilité intrajour et inter-jour, de sélectivité et de sensibilité [99, 100].

Tableau 1 : Temps de rétention, transitions MRM et paramètres en spectrométrie de masse de 7 antibiotiques.

Antibiotique	Temps de rétention (min)	Ion Parent (m/z)	Ion fille (m/z)	Tension de cône (V)	Energie de collision (eV)
Amoxicilline	0.81	366.0	349.1	14	8
			113.9		22
Céfotaxime	1.49	456.0	396.1	18	12
			166.9		20
Ciprofloxacine	1.49	332.1	288.1	32	18
			245.1		24
Doxycycline	2.27	445.1	428.2	24	18
			154.0		30
Erythromycine	2.94	734.4	158.1	26	30
			576.4		20
Clarithromycine	3.50	748.5	158.1	30	30
			82.9		46
Céphalexine	3.43	348.0	158.0	14	8
			174.0		14

### 2.1.3.3 Effet de la dégradation des antibiotiques sur la CMI et le CMB

Les effets possibles de la dégradation des antibiotiques lors de la détermination des CMI et CMB ont été étudiés à l'aide de tests utilisant la méthode standard de microdilution sériée [1] avec ou sans addition d'antibiotiques à 6, 12 et 18h afin de compenser la dégradation. Quatre antibiotiques (la céphalexine, le céfotaxime, la clarithromycine et la doxycycline) ont été utilisés lors de ce test en raison de leur dégradation supérieure aux autres antibiotiques testés. La quantité d'antibiotique dégradée en 6h a été calculée pour chaque antibiotique et chaque puits. Les quantités dégradées ont été ajoutées toutes les 6h en un volume de 5µL dans chaque puits de 200µL.

Deux souches bactériennes, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* HG001 ont été utilisées. La CMB [2, 4] de chaque organisme a été évaluée en comptant le nombre de bactéries viables dans chaque puits sans croissance bactérienne visible à 24h. Les comptages bactériens ont été effectués en triplicata sur des géloses trypticase soja enrichies en sulfate de magnésium et charbon actif afin de prévenir une action résiduelle des antibiotiques. Les colonies ont été comptées le lendemain après une incubation à 37°C. La CMB a été définie comme la plus petite concentration en antibiotique qui a tué plus de 99,9% de l'inoculum initial.

La CMI et la CMB ont été déterminées à 24h en triplicata et les valeurs obtenues selon la méthode standard et la méthode compensée ont été comparées en utilisant un test de Wilcoxon, avec un seuil de significativité statistique fixé à  $p \leq 0.05$ .

## 2.1.4 Résultats

### 2.1.4.1 Dosages analytiques

Les conditions UPLC ont été optimisées afin d'éluer les 7 antibiotiques en un minimum de temps tout en ayant des temps de rétention fiables afin d'éviter un stockage trop long avant dosage. La transition MRM avec la plus grande intensité a été sélectionnée pour la quantification et l'autre transition pour la confirmation de molécule. Ces 2 temps de transition, le temps de rétention précis ainsi que l'absence d'interférence avec le milieu MH seul garantissent la grande sélectivité de cette méthode.

Les intervalles de calibration ont été choisis afin d'inclure les valeurs de CMI les plus fréquemment rapportées dans EUCAST pour *Staphylococcus aureus* et incluent ses ECOFF (epidemiological cut-off value) excepté pour l'amoxicilline pour laquelle l'ECOFF choisie est celle d'*Escherichia coli* étant donné l'absence de données pour *Staphylococcus aureus* [32]. La limite de quantification a été établie afin de pouvoir estimer une dégradation d'au moins 90% (excepté pour la doxycycline). Les résultats de validation sont rapportés dans le tableau 2.

Antibiotique	Linéarité (n=3)		Sensibilité (n=6)			Répétabilité (n=6, 3 jours)			
	Intervalle de calibration (µg/mL)	Modèle Pondération	LOQ (µg/mL)	Précision %	CV %	QC (µg/mL)	Précision %	CV intra-jour %	CV inter-jour %
Amoxicilline	0.05 - 10	Linéaire	0.05	90	17	0.075	102	14	17
		1/X				0.25	94	9	11
						2.5	98	4	7
Céfotaxime	0.01 - 10	Linéaire	0.01	115	12	0.025	96	18	16
		1/X <sup>2</sup>				0.25	92	9	9
						2.5	104	5	9
Ciprofloxacine	0.01 - 10	Linéaire	0.01	120	18	0.025	102	17	15
		1/X				0.25	95	4	10
						2.5	100	7	8
Doxycycline	0.05 - 10	Linéaire	0.05	80	9	0.075	97	8	14
		1/X				0.25	97	4	7
						2.5	104	8	8
Erythromycine	0.01 - 10	Quadratique	0.01	111	9	0.025	111	3	7
		1/X				0.25	97	2	4
						2.5	98	8	10
Clarithromycine	0.01 - 10	Quadratique	0.01	116	8	0.025	106	4	18
		1/X				0.25	101	4	14
						2.5	103	10	17
Céphalexine*	0.1-50	Linéaire	0.1	109	9	0.3	98	8	8
		1/X <sup>2</sup>				2	100	9	10
						15	104	9	9

Tableau 2 : Résultats de validation de 7 antibiotiques en milieu MH.

\*La céphalexine a été évaluée à l'aide d'une méthode préexistante et la répétabilité a été évaluée sur 2 jours.

### 2.1.4.2 Dégradation des antibiotiques durant la microdilution sériée

Les concentrations testées ont été de 2, 4 et 8 µg/mL pour l'amoxicilline et la céphalexine, 1, 2 et 4 µg/mL pour le céfotaxime, 0,25, 0,5 et 1 µg/mL pour la ciprofloxacine, 0,125, 0,25 et 0,5 µg/mL pour l'érythromycine et la clarithromycine et 0,063, 0,125 et 0,25 pour la doxycycline. Les temps de demi-vie et les pourcentages de dégradation des 7 antibiotiques après 24h d'incubation selon la méthode standard de microdilution sériée sont rapportés dans le tableau 3. Toutes les molécules ont été instables (dégradation >20%) dans ces conditions et à ces concentrations. La clarithromycine et la doxycycline hyclate ont présenté une dégradation importante (supérieure à 60%). D'autres antibiotiques, comme l'amoxicilline, la céphalexine monohydrate, le céfotaxime sel de sodium et l'érythromycine hydrate ont montré une dégradation intermédiaire entre 40 et 60% ; alors que la ciprofloxacine a été la moins sujette à dégradation (moins de 40%).

Tableau 3 : Temps de demi-vie et pourcentage de dégradation après 24h d'incubation abiotique de différents antibiotiques. Expérience réalisée dans des conditions de détermination de la CMI par microdilution sériée en l'absence de bactérie. Les moyennes de 3 valeurs sont rapportées.

Antibiotique	Temps de demi-vie de dégradation (h)*	Pourcentage de dégradation à 24h (%)
Amoxicilline	27.4	45.5
Céfotaxime	28.1	44.7
Ciprofloxacine	42.0	32.7
Doxycycline	16.9	62.6
Erythromycine	31.5	41.0
Clarithromycine	14.2	69.0
Céphalexine	20.2	56.1

\*Le temps de demi-vie a été estimé en utilisant une équation mono-exponentielle pour décrire la diminution observée.

### 2.1.4.3 Influence de la dégradation des antibiotiques sur la détermination des CMI et CMB

Les valeurs des CMI et CMB des 2 souches bactériennes testées et chaque antibiotique sont rapportées dans le tableau 4. Les valeurs de CMI et de CMB obtenues dans les puits compensés ont été égales ou inférieures à celles obtenues dans les conditions standards (pas

de compensation pour la dégradation en antibiotique). Pour chaque organisme, au moins une valeur obtenue avec un antibiotique sur les 4 testés a été significativement différente. Cependant, ces différences n'ont jamais dépassé une dilution.

Tableau 4 : Valeurs de CMI et de CMB pour 4 antibiotiques instables en présence d'*Escherichia coli* ou de *Staphylococcus aureus* à 24h. Valeurs obtenues avec la méthode standard de microdilution sériée ou avec l'ajout d'antibiotique toute les 6h afin de compenser la dégradation observée. Les groupes sont statistiquement différents ( $p \leq 0.05$ ) ou non (NS).

Bactérie et antibiotique	CMI moyenne ( $\mu\text{g/mL}$ )			CMB moyenne ( $\mu\text{g/mL}$ )			No. de répliques
	[Intervalle]			[Intervalle]			
	Microdilution standard	Avec compensation en antibiotique		Microdilution standard	Avec compensation en antibiotique		
<i>E. coli</i>							
Céphalexine	10.67	8	NS	12	8	NS	6
	[8-16]	[8]		[8-16]	[8]		
Céfotaxime	0.058	0.045	NS	0.071*	0.049*	P $\leq$ 0.05	7
	[0.031-0.063]	[0.031-0.063]		[0.063-0.125]	[0.031-0.063]		
Clarithromycine	32	32	NS	128	128	NS	4
	[32]	[32]		[128]	[128]		
Doxycycline	1.125*	0.625*	P $\leq$ 0.05	>16	>16	NS	8
	[0.5-2]	[0.5-1]		[>16]	[>16]		
<i>S. aureus</i>							
Céphalexine	5.5	4.5	NS	12*	7*	P $\leq$ 0.05	4
	[2-8]	[2-8]		[8-16]	[4-8]		
Céfotaxime	2*	1.5*	P $\leq$ 0.05	3.66*	2.33*	P $\leq$ 0.05	6
	[2]	[1-2]		[2-4]	[2-4]		
Clarithromycine	0.125	0.125	NS	0.25	0.25	NS	2
	[0.125]	[0.125]		[0.25]	[0.25]		
Doxycycline	0.031	0.031	NS	0.088	0.063	NS	5
	[0.031]	[0.031]		[0.063-0.125]	[0.063]		

### 2.1.5 Discussion

La stabilité ou l'instabilité des différents antibiotiques testés dans cette étude a déjà été décrite dans de nombreux milieux solides ou liquides [3, 4, 96, 101]. Erah et al. ont par exemple démontré que l'amoxicilline et la clarithromycine sont stables en solution aqueuse à pH7 à 37°C avec respectivement des temps de demi-vie de dégradation de 153,1h et une dégradation non détectable [101]. Cependant, dans notre étude, les temps de demi-vie de dégradation de l'amoxicilline et de la clarithromycine en milieu Mueller-Hinton à 37°C étaient de 27,4h et 14,2h respectivement. Cette grande disparité confirme que la stabilité d'une molécule dans une condition ne peut pas être extrapolée à d'autres conditions. La stabilité du céfotaxime en solution à 24h est de 92% et 72% à 25 et 45°C respectivement [102]. La dégradation en milieu MH est plus importante car dans notre étude, 44,7% de la molécule est dégradée à 24h à 37°C. A ce sujet, Wick déclara en 1964 qu'une étude complète de la stabilité de chaque antibiotique dans les conditions des tests microbiologiques devrait être réalisée [5].

Des études ont montré que la dégradation des antibiotiques pendant le stockage des plaques de microdilution préparées en avance n'est pas négligeable et qu'un stockage à -70°C est généralement le mieux adapté afin de réduire au maximum cette dégradation [96, 103]. L'instabilité des antibiotiques peut entraîner une baisse erronée de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques étant donné que les valeurs de CMI augmentent avec la dégradation et le temps de stockage [98]. Nos résultats ont confirmé que la dégradation des antibiotiques, pendant le stockage ou lors de l'incubation, peut entraîner une augmentation des valeurs de CMI et de CMB observées et constitue donc un biais lors de la détermination de la sensibilité, avec une résistance augmentée en apparence.

Les indices PK/PD sont déterminants afin de prédire si un antibiotique sera potentiellement efficace contre un pathogène donné [23]. Etant donné que notre étude a permis de démontrer que certains antibiotiques couramment utilisés sont instables lors de l'incubation des tests de microdilution sériée, nous avons exploré les conséquences possibles de cette instabilité sur la détermination des paramètres de sensibilité aux antibiotiques. La CMI permet de classer un pathogène donné dans une de ces trois catégories : sensible (S), intermédiaire (I) et résistante (R) sur la base de 2 valeurs de CMI critiques inférieure et supérieure. Il est courant que la distinction entre chaque classe ne varie que d'une dilution [104], les valeurs de CMI critiques qui délimitent les catégories S et R étant souvent séparées de une à deux dilution [105]. Etant

donné cet écart réduit, on peut aisément comprendre qu'une variation dans la détermination de la CMI, même faible, puisse nuire à la catégorisation du niveau de sensibilité d'un pathogène [106]. De plus, des indices combinés PK/PD comme  $fAUC/CMI$  sont calculés à partir de la CMI et sont utilisés afin d'établir des schémas thérapeutiques optimaux [23]. On comprend alors l'implication d'une CMI erronée lors de la détermination d'un traitement antibiotique.

Les différences de CMI ou de CMB observées lors de notre étude n'ont jamais dépassé, en moyenne, une dilution au demi. Les temps de doublement des 2 souches bactériennes utilisées lors de cette étude étaient de 25 et 29 minutes en milieu MH pour *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* respectivement (données personnelles). Les temps de demi-vie de dégradation des antibiotiques sont plus lents comparés à ces temps de doublement. De plus, une CMI n'est pas une concentration unique et simple comme une concentration mesurée par HPLC mais elle mesure en fait l'effet obtenu pendant toute la période d'incubation. Un écart d'une dilution peut être considérée comme acceptable si l'on considère que des mesures répétées d'une même combinaison pathogène/antibiotique montrent souvent un intervalle de 3 dilutions [104, 107]. Cela a d'ailleurs été confirmé par les intervalles de mesures constatés dans notre étude.

Dans certaines situations critiques nécessitant une détermination précise des valeurs de CMI ou de CMB ou quand le temps de doublement bactérien est plus lent que le temps de demi-vie de dégradation d'un antibiotique, comme pour *Mycobacterium tuberculosis* [108], des valeurs plus précises peuvent être obtenues en contrôlant la concentration en antibiotique afin de tenir compte de l'instabilité de la molécule. Srivastava et al. ont récemment décrit une méthode destinée à déterminer la CMI de l'ertapénème contre *Mycobacterium tuberculosis* [108]. Les bactéries ont été placées dans des tubes avec différentes concentrations d'antibiotiques avec un ajout quotidien d'antibiotique afin de compenser la dégradation de l'ertapénème. La valeur de CMI corrigée a été bien inférieure à la valeur obtenue dans des tubes sans ajout d'antibiotiques (respectivement 0,6 et 64 mg/L) et confirme la nécessité d'une correction dans ce cas. Une autre possibilité est de réaliser des courbes de bactéricidie statique en utilisant un inoculum initial de  $5 \cdot 10^5$  UFC/mL et différentes concentrations en antibiotiques. L'interaction entre la bactérie et l'antibiotique peut ensuite être modélisée et la dégradation de la molécule peut être incluse dans cette modélisation [109]. La CMI obtenue avec cette méthode serait la concentration d'antibiotique pour laquelle un inoculum de  $5 \cdot 10^5$  UFC/mL, donc identique à l'inoculum initial (effet bactériostatique) serait obtenu après 20 à 24h d'incubation. Ces

méthodes sont utiles pour des cas spécifiques mais sont aussi chronophages et elles ne peuvent pas être appliquées lors d'une détermination de CMI standard. De plus, ces résultats seraient à manier avec précaution et ne devraient pas être utilisés lors de la détermination des indices combinés PK/PD sans évaluer pleinement les conséquences éventuelles.

Dans cette étude, seule l'action du milieu MH abiotique dans les conditions strictes du test de microdilution sériée a été évaluée à l'aide des dosages UPLC. Une dégradation des antibiotiques peut être observée dans d'autres cas, notamment à cause d'un métabolisme spécifique comme pour le céfotaxime et la présence de sérum estérases [4] ou bien lorsque les bactéries sont capables de dégrader l'antibiotique du système [5]. Une autre source de variation lors de la détermination des CMI peut être la teneur en cations du milieu de culture [2], cette source ayant été évitée dans notre étude en utilisant le même milieu Mueller-Hinton enrichi en cations.

#### 2.1.6 Article

**In vitro degradation of antimicrobials during use of broth microdilution method can increase the measured Minimal Inhibitory and Minimal Bactericidal Concentrations. (2016)**

Lallemant EA, Lacroix MZ, Toutain P-L, Boullier S, Ferran AA & Bousquet-Mélou A

*Front. Microbiol.* 7 :2051.



# *In vitro* Degradation of Antimicrobials during Use of Broth Microdilution Method Can Increase the Measured Minimal Inhibitory and Minimal Bactericidal Concentrations

Elodie A. Lallemand<sup>1\*</sup>, Marlène Z. Lacroix<sup>1</sup>, Pierre-Louis Toutain<sup>1</sup>, Séverine Boullier<sup>2</sup>, Aude A. Ferran<sup>1</sup> and Alain Bousquet-Melou<sup>1</sup>

<sup>1</sup> TOXALIM, Université de Toulouse, Institut National de la Recherche Agronomique, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France, <sup>2</sup> Université de Toulouse, ENVT, Toulouse, France

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Octavio Luiz Franco,  
Universidade Católica de Brasília,  
Brazil

### Reviewed by:

Patrícia Poeta,  
University of Trás-os-Montes and Alto  
Douro, Portugal  
Chetan Sharma,  
Guru Angad Dev Veterinary and  
Animal Sciences University, India

### \*Correspondence:

Elodie A. Lallemand  
e.lallemand@envt.fr

### Specialty section:

This article was submitted to  
Antimicrobials, Resistance and  
Chemotherapy,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

**Received:** 28 October 2016

**Accepted:** 07 December 2016

**Published:** 21 December 2016

### Citation:

Lallemand EA, Lacroix MZ,  
Toutain P-L, Boullier S, Ferran AA and  
Bousquet-Melou A (2016) *In vitro*  
Degradation of Antimicrobials during  
Use of Broth Microdilution Method  
Can Increase the Measured Minimal  
Inhibitory and Minimal Bactericidal  
Concentrations.  
Front. Microbiol. 7:2051.  
doi: 10.3389/fmicb.2016.02051

The antibacterial activity of some antimicrobials may be under-estimated during *in vitro* microbiological susceptibility tests, due to their instability under such conditions. The *in vitro* degradation of seven widely used antimicrobials (amoxicillin, cephalexin monohydrate, cefotaxime sodium salt, ciprofloxacin, erythromycin hydrate, clarithromycin, and doxycycline hyclate) and its effect on MIC and MBC determinations was studied using the broth microdilution method, considered as the gold standard for MIC determinations. *In vitro* concentrations of antimicrobials, over a 24 h incubation period in the medium tested without bacteria, decreased from 33% for ciprofloxacin to 69% for clarithromycin. For cephalexin, cefotaxime, clarithromycin, and doxycycline which were the most degraded drugs, MIC and MBC values for one strain of *E. coli* and one strain of *S. aureus* were compared using the standard method or after *ad-hoc* drug complementation aiming at maintaining constant drug concentration. Abiotic degradation during the standard method was associated with a significant increase of the MIC (2 antibiotics) and MBC (3 antibiotics). However, the observed discrepancy (less than one twofold dilution), even for the most degraded drug for which the concentration at 24 h was reduced by two thirds, suggests that this would only be clinically significant in special cases such as slow-growing bacteria.

**Keywords:** antimicrobial, stability, degradation, MIC, MBC

## INTRODUCTION

The minimal inhibitory concentration (MIC) is the lowest concentration of an antimicrobial that inhibits visible growth of a bacterial culture under a defined set of experimental conditions (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012). One reference method for measuring MIC is broth microdilution under standardized *in vitro* conditions, using a microdilution tray with twofold drug-dilution steps, and subsequent visual evaluation of bacterial growth or non-growth after 16–20 h of culture at 35 ± 2°C (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012). It is assumed that the *in vitro* concentration of the tested antimicrobial remains unchanged throughout the incubation period. However, the *in vitro* stability of antimicrobials is known to be affected by

physical factors such as light, composition of the medium, pH, and temperature (Paesen et al., 1994). Such instability may lead to underestimation of the antibacterial activity of the compound in Antimicrobial Susceptibility Tests (AST) (Marchbanks et al., 1987) and thus alter the clinical decision to increase the dose, add another antimicrobial agent, or even abandon therapy with the compound. It has already been shown that the storage conditions of prepared MIC trays can reduce the biological activity of antimicrobials, depending on the drug, storage duration and temperature (Barry et al., 1976; Nickolai et al., 1985; Hwang et al., 1986; White et al., 1991). Few studies have focused on the degradation of antimicrobials during the actual incubation period (Wick, 1964; Marchbanks et al., 1987) and we are not aware of any study of the subsequent effect on minimal bactericidal concentration (MBC) determinations.

The aim of this study was to see if the incubation conditions used during the microdilution test could lead to the substantial degradation of some antimicrobials and if such degradation could affect the AST results.

## MATERIALS AND METHODS

### Antimicrobial Degradation Experiment

The tested drugs were selected among antimicrobials frequently used in human and veterinary medicine, without regard to their reported stability status. The drugs and dilutions in the microplates were as follows: Cephalexin monohydrate 0.5–256  $\mu\text{g/mL}$ , amoxicillin 0.25–128  $\mu\text{g/mL}$ , cefotaxime sodium salt 0.125–64  $\mu\text{g/mL}$ , ciprofloxacin 0.031–16  $\mu\text{g/mL}$ , erythromycin hydrate and clarithromycin 0.016–8  $\mu\text{g/mL}$  and doxycycline hyclate 0.008–4  $\mu\text{g/mL}$ . All drugs were tested at twofold serial dilutions. The antimicrobial agents were dissolved according to the specifications of the manufacturers (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO for amoxicillin, cefotaxime sodium salt, ciprofloxacin, doxycycline hyclate, erythromycin hydrate and clarithromycin; ACS Dobfar, Tribiano, Italy for cephalexin monohydrate). Microdilution trays were prepared extemporaneously as previously described for MIC determination (Nickolai et al., 1985), except that 100  $\mu\text{L}$  of cation-adjusted, organism-free Mueller-Hinton broth (MHB) was added to prevent any drug degradation that might be caused by bacteria. The trays were placed in a dark incubator at 37°C. At each sampling time (i.e., 0, 3, 6, 10, and 24 h), 100  $\mu\text{L}$  were collected from 3 adjacent wells within less than 2 min, diluted with 900  $\mu\text{L}$  of H<sub>2</sub>O and stored at 4°C for less than 4 h before analysis.

### Antimicrobials Quantitative Analysis

All antimicrobials were assayed in triplicate by LC/MS with an Acquity UPLC coupled to a Xevo triple quadrupole mass spectrometer (Waters, Milford, MA, USA). Five microliters of diluted sample were injected into a Cortecs C18 column (2.1\*50 mm; 1.6  $\mu\text{m}$ , Waters) and eluted with an H<sub>2</sub>O, 0.1% formic acid and acetonitrile gradient (except for cephalexin which was assayed with an H<sub>2</sub>O, 0.1% formic acid/acetonitrile isocratic elution). The column and autosampler temperatures were set at 40 and 10°C respectively. Samples were ionized in positive electrospray ionization mode (ESI+). The capillary

voltage and source temperature were set at 2.5 kV and 150°C respectively. The desolvation temperature and nitrogen flow rate were set at 650°C and 800 L/h respectively. Argon was used as the collision gas at a flow rate of 0.12 mL/min. Quantification was by multiple reactions monitoring (MRM). The MRM transitions, cone voltage and collision energies used for the different antimicrobials are reported in **Table 1**. The method was validated in terms of linearity, inter-day and intra-day repeatability, selectivity and sensitivity, for each molecule (ICH, 1994). The calibration curve was obtained by injecting 3 replicates of seven calibration standards prepared in MHB and ranging from 0.01 to 50  $\mu\text{g/mL}$ . Three different approaches were used to determine the linearity of the calibration curve: (1) calculation of the relative concentration residuals between the nominal concentration and the concentration obtained with the model (RCR%), (2) visual inspection of the residual distribution, and (3) application of a lack of fit test to check the goodness-of-fit of the model (Almeida et al., 2002). The selectivity of the method was characterized by injecting 6 replicates of MHB blank samples and comparing the obtained signal with those obtained at the limit of quantification (LOQ). The LOQ of each antimicrobial was the lowest concentration on the calibration curve that could be quantified with a precision lower than 20% and within an accuracy range of 80–120%. Calculations of intra-day and inter-day precisions and accuracies for each antimicrobial were based on three different days (except for cephalexin: 2 days) and with six replicates of QC samples at three concentration levels (low, middle, and high) covering the range of standard curve concentrations.

### Effect of Antimicrobial Degradation on AST

The effects of antimicrobial degradation on AST were further investigated by using the standard microdilution technique (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012) with or without an *ad-hoc* compensatory addition of antimicrobials

**TABLE 1 | Retention times, MRM transitions, and MS parameters of seven different antimicrobials.**

Antimicrobials	Retention time (min)	Ion parent (m/z)	Ion daughter (m/z)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Amoxicillin	0.81	366.0	349.1	14	8
			113.9		22
Cefotaxime	1.49	456.0	396.1	18	12
			166.9		20
Ciprofloxacin	1.49	332.1	288.1	32	18
			245.1		24
Doxycycline	2.27	445.1	428.2	24	18
			154.0		30
Erythromycin	2.94	734.4	158.1	26	30
			576.4		20
Clarithromycin	3.5	748.5	158.1	30	30
			82.9		46
Cephalexin	3.43	348.0	158.0	14	8
			174.0		14

at 6, 12, and 18 h. Cephalixin, cefotaxime, clarithromycin, and doxycycline were selected for this purpose as they were more extensively degraded than the other drugs tested. The amount of antimicrobial degraded during each 6 h step was calculated for each antimicrobial and each well. The computed lost amounts were added in 5  $\mu\text{L}$  to each 200  $\mu\text{L}$  well, designated “fortified well,” at each corresponding time in an attempt to compensate for this degradation. *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* HG001 strains were used as test organisms. The MBC (Marchbanks et al., 1987; Clinical and Laboratory Standards Institute, 1999) for each organism was assessed by counting the viable bacteria in the broth from all wells that inhibited visible growth at 24 h. Bacteria were counted in triplicate on tryptic soy agar supplemented with magnesium sulfate and activated charcoal to prevent antibiotic carry-over effects. Colonies were counted after overnight incubation at 37°C. The lowest concentration of the antimicrobial that killed  $\geq 99.9\%$  of the initial inoculum was defined as the MBC end point. MBC and MIC were determined in triplicate at 24 h and the values for the control and fortified wells were compared by Wilcoxon test, with statistical significance set at  $p \leq 0.05$ .

## RESULTS

### Analytical Results

The UPLC conditions were optimized to ensure the rapid elution of all 7 antimicrobials with reliable retention times and MS ionizations to avoid storage in the autosampler. The elution was performed on a C18 column within 5 min and detection was by MRM in positive electrospray ionization (ESI+). All 7 antimicrobials gave the protonated parent  $[\text{M}+\text{H}]^+$  with two MRM transitions. The MRM transition with the highest intensity was selected for quantification and the second MRM transition was used for antimicrobial confirmation. These two MRM transitions, the precise time of retention, in addition to the absence of interference in the MHB blank samples corroborated the high selectivity of the method.

Calibration ranges were chosen to include the MIC most frequently reported by EUCAST for *Staphylococcus aureus* strains. They also included the reported ECOFF values for *S. aureus* strains, except for amoxicillin for which the *E. coli* ECOFF value was chosen as no data for *S. aureus* were available (EUCAST, 2016). The LOQ was established in order to be able to quantify at least 90% of antimicrobial degradation (except for doxycycline). The validation results are reported in Table 2. The accuracy for all 7 antimicrobials ranged from 92 to 111% with a precision of less than 18%. LOQ were validated at 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for cefotaxime, ciprofloxacin and the two macrolides clarithromycin and erythromycin, at 0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for amoxicillin and doxycycline and at 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for cephalixin. The accuracy at the LOQ ranged from 80 to 120% with a precision lower than 18%.

### Degradation of Different Antibiotics during the Broth Microdilution Test

The concentrations tested were 2, 4, and 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for amoxicillin (Figure S1) and cephalixin, 1, 2, and 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for cefotaxime, 0.25, 0.5, and 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for ciprofloxacin, 0.125, 0.25, and

0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for erythromycin and clarithromycin and 0.0625, 0.125, and 0.25 for doxycycline. The degradation half-lives and percentages of degradation of the seven antimicrobials, measured after incubation for 24 h using the standard broth microdilution test conditions, are given in Table 3. All these drugs were unstable (degradation > 20%) at the above concentrations and conditions. Some drugs, such as clarithromycin and doxycycline hyclate, were highly degraded (more than 60%). Others, such as amoxicillin, cephalixin monohydrate, cefotaxime sodium salt and erythromycin hydrate were moderately degraded (from 40 to 60%) while ciprofloxacin showed the least degradation (less than 40%).

### Consequences of Antibiotic Degradation on MIC and MBC Determinations

The MBC and MIC values for each test organism and each drug are given in Table 4. The MIC and MBC values obtained in the fortified wells were either equal to or lower than those obtained under standard conditions (no compensation for drug lost). The AST values were significantly different for one drug out of 4 for each investigated organism. However, the differences, unrelated to the presence of microorganisms, never exceeded more than one dilution.

## DISCUSSION

The stability or instability of the different antimicrobials used in our study has already been reported in various liquid and solid media (Hwang et al., 1986; Marchbanks et al., 1987; Paesen et al., 1994; Erah et al., 1997). Erah et al. showed that amoxicillin and clarithromycin are stable at pH 7 in aqueous solution with a degradation half-life of respectively 153.1 h and undetectable degradation (Erah et al., 1997). However, the stability of a given drug in one set of conditions cannot be univocally extrapolated to other conditions. Indeed, in our experiment, the degradation half-lives of amoxicillin and clarithromycin in MHB at 37°C were 27.4 and 14.2 h respectively. Cefotaxime stability in solution at 24 h is reported to be 92% at 25°C and 72% at 45°C (Behin et al., 2012). The extent of degradation in MHB is greater as 44.7% of the drug was degraded at 24 h and 37°C. While it is clear that light, temperature, and pH are important factors to consider, the test medium can also influence stability of a compound (Paesen et al., 1994). Cielecka-Piontek et al. did study the effect of different injection media on stability of meropenem and clavulanate potassium in order to allow clinical administration of both compound together while maximizing stability and compatibility (Cielecka-Piontek et al., 2015). There were clear differences between media, indicating the use of one media more than others in a clinical setting even if all of them were aqueous. Differences between media can be explained by their nature (aqueous or lipophilic) or differences in the catalytic effects of degradation products (Cielecka-Piontek et al., 2015). Wick stated in 1964 that every new antibiotic should be subjected to a complete study of stability under test conditions (Wick, 1964).

**TABLE 2 | Validation results for seven different antimicrobials in MHB.**

Antimicrobials	Linearity ( <i>n</i> = 3)		Sensitivity ( <i>n</i> = 6)			Repeatability ( <i>n</i> = 6, 3 days)			
	Calibration range (μg/mL)	Model weighting	LOQ (μg/mL)	Accuracy %	CV %	QC (μg/mL)	Accuracy %	CV intra-day %	CV inter-day %
Amoxicillin	0.05–10	Linear 1/X	0.05	90	17	0.075	102	14	17
						0.25	94	9	11
						2.5	98	4	7
Cefotaxime	0.01–10	Linear 1/X <sup>2</sup>	0.01	115	12	0.025	96	18	16
						0.25	92	9	9
						2.5	104	5	9
Ciprofloxacin	0.01–10	Linear 1/X	0.01	120	18	0.025	102	17	15
						0.25	95	4	10
						2.5	100	7	8
Doxycycline	0.05–10	Linear 1/X	0.05	80	9	0.075	97	8	14
						0.25	97	4	7
						2.5	104	8	8
Erythromycin	0.01–10	Quadratic 1/X	0.01	111	9	0.025	111	3	7
						0.25	97	2	4
						2.5	98	8	10
Clarithromycin	0.01–10	Quadratic 1/X	0.01	116	8	0.025	106	4	18
						0.25	101	4	14
						2.5	103	10	17
Cephalexin*	0.1–50	Linear 1/X <sup>2</sup>	0.1	109	9	0.3	98	8	8
						2	100	9	10
						15	104	9	9

\*Cephalexin was assayed with a previous existing method and repeatability was evaluated on 2 days.

**TABLE 3 | Half-lives and percentages of degradation after 24 h for different antimicrobials under the same conditions as in the MIC determination, apart from the absence of bacteria.**

Antimicrobial	Degradation half-life (h)*	Percentage of degradation after 24 h (%)
Amoxicillin	27.4	45.5
Cefotaxime	28.1	44.7
Ciprofloxacin	42.0	32.7
Doxycycline	16.9	62.6
Erythromycin	31.5	41.0
Clarithromycin	14.2	69.0
Cephalexin	20.2	56.1

\*Half-life was estimated using a monoexponential model to describe the observed decay. The means of 3 experiments are reported.

Previous studies have shown that antimicrobials can be degraded during the storage of MIC trays depending on the selected drug and storage time and that a low temperature (−70°C) is usually best for storage (Barry et al., 1976; Hwang et al., 1986; Marshall et al., 2000).

Problems with imipenem stability have been reported during storage of MIC trays (Nickolai et al., 1985), but it did not occur with meropenem in the same conditions (Dowzicky et al., 1994) despite also being a carbapenem, attesting the need to study each compound in a given condition. It also highlighted that every precaution should be taken to minimize the loss of moisture from the frozen trays (Barry et al., 1976). White et al. demonstrated that antimicrobial degradation during storage can also result in a decline of susceptibility as the MIC values increase with degradation and storage time (White et al., 1991). Our results confirmed that antimicrobial degradation during incubation can lead to a significant increase in the observed MIC or MBC values and hence to a bias when reporting AST results.

AST plays a major role in predicting the efficacy of an antibiotic against clinical pathogens and thus in its subsequent selection (Craig, 1998). As our study with the standard microdilution method showed that some widely-used antibiotics were degraded during incubation, we explored the possible consequences of a biased MIC estimate on AST interpretation. AST results are assigned to one of three categories (susceptible,

**TABLE 4 | MIC and MBC data for 4 unstable antimicrobials against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* at 24 h with the standard microdilution method or with *ad-hoc* addition of antimicrobial every 6 h to compensate for degradation.**

Organism tested and drug	Mean MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) [Interval]			Mean MBC ( $\mu\text{g/mL}$ ) [Interval]			No. of replicates
	Standard microdilution	With addition of drug		Standard microdilution	With addition of drug		
<b><i>E. coli</i></b>							
Cephalexin	10.67 [8-16]	8 [8]	NS	12 [8-16]	8 [8]	NS	6
Cefotaxime	0.058 [0.031-0.063]	0.045 [0.031-0.063]	NS	0.071 [0.063-0.125]	0.049 [0.031-0.063]	$P \leq 0.05$	7
Clarithromycin	32 [32]	32 [32]	NS	128 [128]	128 [128]	NS	4
Doxycycline	1.125 [0.5-2]	0.625 [0.5-1]	$P \leq 0.05$	>16 [>16]	>16 [>16]	NS	8
<b><i>S. aureus</i></b>							
Cephalexin	5.5 [2-8]	4.5 [2-8]	NS	12 [8-16]	7 [4-8]	$P \leq 0.05$	4
Cefotaxime	2 [2]	1.5 [1-2]	$P \leq 0.05$	3.66 [2-4]	2.33 [2-4]	$P \leq 0.05$	6
Clarithromycin	0.125 [0.125]	0.125 [0.125]	NS	0.25 [0.25]	0.25 [0.25]	NS	2
Doxycycline	0.031 [0.031]	0.031 [0.031]	NS	0.088 [0.063-0.125]	0.063 [0.063]	NS	5

Groups significantly different ( $p \leq 0.05$ ) or not (NS).

intermediate, or resistant) based on two critical lower and upper MIC breakpoints. The susceptible and resistant classes are commonly separated by an intermediate class corresponding to just one twofold dilution (Annis and Craig, 2005). Given the narrowness of this intermediate range, such a factor of variability can seriously impact the correct classification of a pathogen if its MIC is near the breakpoints (Craig, 2000). PK/PD indices such as AUC/MIC are used to establish optimal dosing regimens and are calculated from the MIC reported for the pathogen (Craig, 1998). The impact of an incorrect MIC on the dosage regimen calculation can thus be very real.

Nevertheless, it has to be kept in mind that, in our study, the differences in MIC or MBC values due to antimicrobial degradation was never higher than one twofold dilution even if 69% degradation of clarithromycin could have suggested a higher impact on MIC and MBC values. This small effect on AST values could be related to the short bacterial generation times, which are 25 and 29 min, respectively, for our strains of *E. coli* and *S. aureus* in MHB (personal data), compared to antimicrobial degradation half-lives that are quite long in comparison to those doubling times in our study. Furthermore, a MIC value is not a simple concentration, unlike the value measured by HPLC, and actually represents the overall effect obtained over the entire incubation time. Repeated measurements of MIC using the same pathogen/drug combination commonly show a 3-fold dilution range, meaning that the standard microdilution method has an accuracy of not less than one dilution interval and that a one dilution difference can be considered as acceptable (Wexler et al., 1990; Annis and Craig, 2005).

In some specific situations requiring accurate MIC and MBC values, or when the bacterial doubling time is higher than the drug half-life, as with *Mycobacterium tuberculosis*

(Srivastava et al., 2016), accurate data may be obtained by controlling the antimicrobial concentration to balance antibiotic degradation. Srivastava et al. recently described a method for measuring the MIC of ertapenem against *M. tuberculosis* (Srivastava et al., 2016). They used tubes with bacteria and different concentrations of antimicrobial and added a daily supplement to compensate for ertapenem degradation. The resulting MIC was far lower than the MIC obtained with non-compensated tubes (0.6 and mg/L respectively). Another option is to plot bactericidal time-kill curves by using an initial bacterial inoculum of  $5 \times 10^5$  UFC/mL and varying the concentrations of antimicrobial. The interaction between the antimicrobial and the bacteria can be modeled (Nielsen and Friberg, 2013) and drug degradation could be considered in the modeling process (Nielsen and Friberg, 2013). The MIC obtained with this method would correspond to the concentration of antimicrobial for which a final inoculum of  $5 \times 10^5$  UFC/mL is obtained at 20 or 24 h. Such methods are interesting for specific cases but are time-consuming and cannot be applied to standard MIC determinations. In this study, we only considered the possible action of an abiotic MHB culture medium on antimicrobial degradation, as measured by UPLC, using the strict conditions applied during microdilution testing. Antibiotic degradation during such testing can also be due to metabolism, as with serum esterases and cefotaxime, for example, (Marchbanks et al., 1987), or to the effect of microorganisms in the system (Wick, 1964). Another potential source of variation for MIC determination can be the cation concentration variability in Mueller-Hinton broth (Clinical and Laboratory Standards Institute, 1999). This problem was overcome in our study by using the same cation-adjusted Mueller-Hinton broth for all experiments.

On the basis of our results, we conclude that the microdilution method remains suitable for testing the antimicrobial

susceptibility of most common pathogens, despite the concomitant degradation of some antimicrobials.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

EL, PT, SB, AF, and AB conceived and designed the experiments. EL and ML performed the experiments. EL, ML, AF, and AB analyzed the data. EL, ML, PT, SB, AF, and AB wrote the paper.

## FUNDING

The experimental assays were supported by CEVA-Sogeval (France). The funders had no role in study design, data collection

or interpretation, or in the decision to submit the work for publication.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Nathalie Arpaillange for technical assistance in bacteriology.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.02051/full#supplementary-material>

## REFERENCES

- Almeida, A. M., Castel-Branco, M. M., and Falcão, A. C. (2002). Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 774, 215–222. doi: 10.1016/S1570-0232(02)00244-1
- Annis, D. H., and Craig, B. A. (2005). The effect of interlaboratory variability on antimicrobial susceptibility determination. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 53, 61–64. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2005.03.012
- Barry, A. L., Effinger, L. J., and Badal, R. E. (1976). Short-term storage of six penicillins and cephalothin in microdilution trays for antimicrobial susceptibility tests. *Antimicrob. Agents Chemother.* 10, 83–88. doi: 10.1128/AAC.10.1.83
- Behin, S., Punitha, I. S. R., and Krishnan, S. (2012). Physical and chemical stability studies on cefotaxime and its dosage forms by stability indicating HPTLC method. *Int. J. Pharma. Chem. Biol. Sci.* 2, 517–523. Available online at: <http://www.ijpcbs.com/files/volume2-4-2012/15.pdf>
- Cielecka-Piontek, J., Szymanowska-Powalowska, D., Paczkowska, M., Lysakowski, P., Zalewski, P., and Garbacki, P. (2015). Stability, compatibility and microbiological activity studies of meropenem-clavulanate potassium. *J. Antibiot.* 68, 35–39. doi: 10.1038/ja.2014.92
- Clinical and Laboratory Standards Institute (1999). *M26-A Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline*. Wayne, PA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2012). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 68.
- Craig, B. A. (2000). Modeling approach to diameter breakpoint determination. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 36, 193–202. doi: 10.1016/S0732-8893(99)00130-3
- Craig, W. A. (1998). Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin. Infect. Dis.* 26, 1–10. doi: 10.1086/516284
- Dowzicky, M. J., Nadler, H. L., and Sheikh, W. (1994). Comparison of sensititre broth microdilution and agar dilution susceptibility testing techniques for meropenem to determine accuracy, reproducibility, and predictive values. *J. Clin. Microbiol.* 32, 2204–2207.
- Erah, P. O., Goddard, A. F., Barrett, D. A., Shaw, P. N., and Spiller, R. C. (1997). The stability of amoxicillin, clarithromycin and metronidazole in gastric juice: relevance to the treatment of *Helicobacter pylori* infection. *J. Antimicrob. Chemother.* 39, 5–12. doi: 10.1093/jac/39.1.5
- EUCAST (2016). *Antimicrobial Wild Type Distributions of Microorganisms: Staphylococcus aureus [cited 2016 09/21/2016]*. Available online at: <http://mic.eucast.org/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=performSearch&BeginIndex=0&Micdif=mic&NumberIndex=50&Antib=-1&Specium=14>
- Hwang, J. M., Piccinini, T. E., Lammel, C. J., Hadley, W. K., and Brooks, G. F. (1986). Effect of storage temperature and pH on the stability of antimicrobial agents in MIC trays. *J. Clin. Microbiol.* 23, 959–961.
- ICH (1994). *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1) [cited 2016 09/21/2016]. Step 4 Version*: Available online at: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf)
- Marchbanks, C. R., Yost, R. L., and White, R. L. (1987). Cefotaxime stability during *in vitro* microbiological testing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31, 1375–1378. doi: 10.1128/AAC.31.9.1375
- Marshall, S. A., Kugler, K. C., and Jones, R. N. (2000). Evaluation of quinupristin/dalfopristin (Synercid) and RPR 106972 stability in susceptibility testing media. *Int. J. Antimicrob. Agents* 15, 291–297. doi: 10.1016/S0924-8579(00)00180-1
- Nickolai, D. J., Lammel, C. J., Byford, B. A., Morris, J. H., Kaplan, E. B., Hadley, W. K., et al. (1985). Effects of storage temperature and pH on the stability of eleven beta-lactam antibiotics in MIC trays. *J. Clin. Microbiol.* 21, 366–370.
- Nielsen, E. I., and Friberg, L. E. (2013). Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of antibacterial drugs. *Pharmacol. Rev.* 65, 1053–1090. doi: 10.1124/pr.111.005769
- Paesen, J., Quintens, I., Thoithi, G., Roets, E., Reybrouck, G., and Hoogmartens, J. (1994). Quantitative analysis of quaternary ammonium antiseptics using thin-layer densitometry. *J. Chromatogr. A.* 677, 377–384. doi: 10.1016/0021-9673(94)80165-7
- Srivastava, S., van Rijn, S. P., Wessels, A. M. A., Alffenaar, J. W. C., and Gumbo, T. (2016). Susceptibility testing of antibiotics that degrade faster than the doubling time of slow-growing mycobacteria: ertapenem sterilizing effect versus *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 3193–3195. doi: 10.1128/AAC.02924-15
- Wexler, H. M., Lavin, P. T., Molitoris, E., and Finegold, S. M. (1990). Statistical analysis of the effects of trial, reader, and replicates on MIC determination for cefoxitin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 2246–2249. doi: 10.1128/AAC.34.11.2246
- White, R. L., Kays, M. B., Friedrich, L. V., Brown, E. W., and Koonce, J. R. (1991). Pseudoresistance of *Pseudomonas aeruginosa* resulting from degradation of imipenem in an automated susceptibility testing system with predried panels. *J. Clin. Microbiol.* 29, 398–400.
- Wick, W. E. (1964). Influence of antibiotic stability on the results of *in vitro* testing procedures. *J. Bacteriol.* 87, 1162–1170.

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Lallemand, Lacroix, Toutain, Boullier, Ferran and Bousquet-Melou. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## 2.2 Influence de la taille de l'inoculum sur l'activité bactéricide *in vitro*

### 2.2.1 Problématique

La plupart des expériences réalisées pour évaluer l'activité bactéricide d'un antibiotique sont menées en exposant une taille fixe d'inoculum bactérien à différentes concentrations fixes d'antibiotique. Or, en situation clinique, la taille de l'inoculum bactérien peut varier selon la précocité de la mise en place de l'antibiothérapie, de même que la concentration plasmatique en antibiotique varie au cours du temps. Par exemple, la charge bactérienne visée est plus faible lors de traitements métaphylactiques que lors de traitements curatifs d'infections installées, et la concentration en antibiotique, après avoir atteint une concentration maximale, diminue au cours du temps entre deux administrations (hors perfusion).

### 2.2.2 Objectifs

Les objectifs de cette étude ont été :

- d'évaluer dans un système *in vitro* statique l'influence de la **taille de l'inoculum bactérien** sur l'**activité bactéricide** de deux céphalosporines : la céphalexine et le cefprozil.
- **de développer un système *in vitro* dynamique** permettant d'exposer différents pathogènes à des concentrations décroissantes en céphalexine.

Cette étude a été réalisée en exposant trois tailles différentes d'inoculum d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus* ( $10^5$ ,  $10^6$  et  $10^8$  UFC/mL) à une gamme de concentrations constantes en céphalexine ou en cefprozil pendant 24 heures. Le nombre de bactéries vivantes a été suivi au cours du temps afin de comparer l'activité de ces céphalosporines dans différentes conditions et des paramètres tels que les vitesses de bactéricidie et l'effet bactéricide ont été mesurés.

Ensuite, une taille d'inoculum fixée ( $10^5$  UFC/mL) de ces pathogènes a été exposée à une concentration variable de céphalexine afin de reproduire les concentrations plasmatiques de cet antibiotique et d'étudier le nombre de bactéries vivantes au cours du temps en fonction du pathogène.

## 2.2.3 Matériels et méthodes

### 2.2.3.1 Souches bactériennes et antibiotiques

Les souches de référence *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* HG001 ont été conservées à -80°C et ont servi pour toute cette étude.

La céphalexine et le cefprozil ont été utilisés sous forme de poudre. La céphalexine monohydrate a été obtenue chez ACS Dobfar (Milan, Italie). Le cefprozil a été fourni par le laboratoire CEVA Sogeval (Laval, France).

### 2.2.3.2 Evaluation de la sensibilité

La détermination de la CMI de la céphalexine et du cefprozil a été réalisée dans du bouillon Mueller-Hinton (MH) selon la méthode de microdilution préconisée par le CLSI [1]. Un inoculum de  $5 \cdot 10^5$  UFC/mL a été mis en contact avec une gamme de concentrations d'antibiotiques obtenue par une série de dilutions au demi. La CMI était la concentration minimale en antibiotique qui a inhibé toute croissance visible après une incubation de 20 heures à 37°C.

### 2.2.3.3 Courbes de bactéricidie statique

La relation entre la concentration et l'activité de la céphalexine et du cefprozil sur les bactéries a été évaluée en réalisant des courbes de bactéricidie statique. Les concentrations en antibiotique au contact de la suspension bactérienne étaient présumées constantes pendant toute la durée de l'incubation.

Des colonies d'*Escherichia coli* ou de *Staphylococcus aureus* ensemencées sur une gélose MH ont été mises en suspension dans 80mL de bouillon MH. Après une incubation à 37°C pendant une nuit, les concentrations en bactéries ont été ajustées à la concentration désirée ( $10^5$ ,  $10^6$  et  $10^8$  UFC/mL) dans des tubes contenant 10mL de bouillon MH et ces tubes ont été incubés pendant 1 h avant supplémentation ou non (témoin) en antibiotique de façon à tester différentes concentrations finales d'antibiotique comprises entre 4 et 256 µg/mL pour la céphalexine et 0,5 et 32 µg/mL pour le cefprozil. Les suspensions ont ensuite été placées à l'étuve à 37°C et des prélèvements ont été effectués dans chaque tube 0, 0.5 ou 1, 2, 4, 6, 8 et 24 heures après l'ajout d'antibiotique pour dénombrer les bactéries vivantes.

### 2.2.3.4 Courbes de bactéricidie dynamique

#### 2.2.3.4.1 Système in vitro

Un système *in vitro* dynamique a été développé (figure 11) pour mimer l'exposition *in vivo* des bactéries aux antibiotiques. Il a été utilisé pour étudier la bactéricidie avec des concentrations variables en antibiotiques au contact des bactéries.

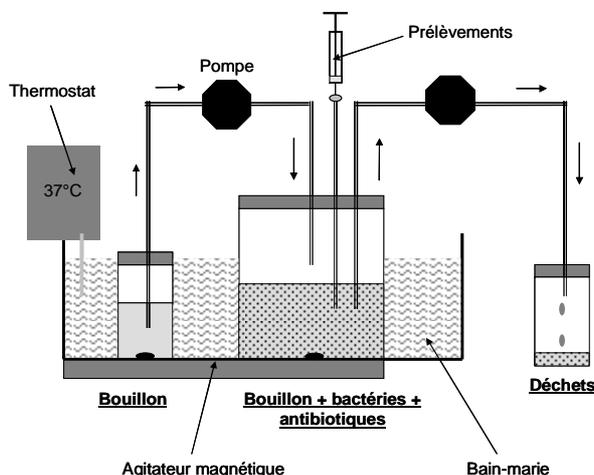


Figure 13 : Schéma de la structure du système *in vitro* dynamique.

Les bactéries sont mises en contact avec l'antibiotique dans le compartiment central immergé dans un bain-marie thermostaté à 37°C. Une pompe assure la dilution des antibiotiques et l'autre maintient le volume constant. Un agitateur magnétique homogénéise la suspension bactérienne.

La structure du système *in vitro* dynamique a consisté en 2 compartiments placés dans un bain-marie thermostaté à 37 °C. La suspension bactérienne contenue dans le compartiment central a été continuellement homogénéisée par une agitation magnétique et elle a été placée dans un flacon en verre ambré afin de prévenir une éventuelle action de la lumière. En début d'expérience, la céphalexine a été injectée dans le compartiment central contenant  $10^5$  UFC/mL d'*E. coli* ou de *S. aureus*. Deux concentrations en céphalexine au pic ( $C_{max}$ ) ont été choisies : une  $C_{max}=16\mu\text{g/mL}$  afin de reproduire les valeurs observables chez le chien et une  $C_{max}=128\mu\text{g/mL}$  afin de pouvoir étudier l'action d'une forte concentration en antibiotique. Afin de mimer l'élimination de la céphalexine, le compartiment central a été dilué grâce à une pompe péristaltique qui a apporté du bouillon MH sans antibiotique à partir du compartiment périphérique. Nous avons souhaité reproduire l'élimination de la céphalexine chez le chien où la demi-vie est de 1,5h. Nous avons également pris en compte la dégradation de la céphalexine en tube verre ambré pour ajuster le débit de la pompe ; dans ces conditions, le temps de demi-vie de dégradation de la céphalexine est de 34,7h.

Le calcul de la clairance effective a donc été fait comme suit avec  $V=100\text{mL}$  :

$$Cl(\text{mL} \cdot \text{h}^{-1}) = \left( \frac{\ln 2}{1.5} - \frac{\ln 2}{34.7} \right) \times V$$

Le volume de notre système étant de 100 mL, nous avons appliqué un débit de 44.2 mL/h aux pompes situées en amont et en aval du système pour maintenir le volume du compartiment central constant. Des administrations de céphalexine dans le compartiment central ont été effectuées à 0h, 10h, 22h et 32h après la première administration afin de reproduire une administration biquotidienne de céphalexine. Des prélèvements de 500 µL ont été effectués 0, 2, 4, 6, 8, 10, 22, 24, 26, 28, 30, 32 et 46 heures après la première administration de céphalexine dans le compartiment central pour dénombrer les bactéries avant réinjection d'antibiotique le cas échéant et pour mesurer les concentrations en céphalexine.

L'élimination des bactéries hors du compartiment central a été considérée comme négligeable par rapport à la croissance bactérienne, comme démontré lors d'une étude précédente [81].

#### *2.2.3.4.2 Dosage de la céphalexine*

Les concentrations de céphalexine dans le bouillon MH ont été déterminées par une méthode UPLC sensible associée à une spectrométrie de masse. Le mélange céphalexine et standard interne, la cefquinome, a été injecté à raison de 5µL et séparés sur une colonne C18 (Cortecs, 2,1\*50 mm; 1,6µm, Waters) avec une élution isocratique composée d'eau et de 0.1% d'acide formique/AcN. Les échantillons ont été ionisés par une ionisation en électro spray positive. La quantification a été réalisée en utilisant le monitoring des réactions multiples (3.43 min de temps de rétention), les transitions (ion parent 348,0m/z et ion fille 158,0, 174,0 m/z), le cône de voltage (14V) et les énergies de collision (8, 14eV).

Le modèle de calibration pour le dosage de la céphalexine a été un modèle de régression linéaire pondérée par  $1/x^2$  pour une gamme de concentration comprise entre 0.1 et 50 µg/mL. Le coefficient de variation pour la précision intrajour était de de 8 à 9 % et entre 8 et 10 % pour la précision inter-jour.

#### *2.2.3.4 Méthodes de dénombrements de bactéries*

Le dénombrement des bactéries vivantes dans une suspension à un instant donné s'est fait à partir d'un prélèvement de 100 µL qui a été dilué plusieurs fois au  $10^{\text{ème}}$ . Dix microlitres de chaque dilution ont ensuite été déposés sur une gélose trypticase soja supplémentée en sulfate de magnésium et en charbon actif utilisé pour piéger l'antibiotique (3 dépôts par dilution). Après une incubation de 18 à 24 h à 37°C, les colonies formées à l'emplacement de chaque dépôt ont été comptées si leur nombre était compris entre 0 et 20. La moyenne du nombre de colonies des 3 dépôts issus de la même dilution a ensuite été calculée et multipliée par le facteur de

dilution pour obtenir le nombre de bactéries par millilitre. La limite de détection a été fixée à 10 UFC/mL.

### 2.2.3.5 Analyses des courbes de bactéricidie statiques

Un indice décrivant l'effet bactéricide des différentes concentrations de céphalexine ou de cefprozil a été construit en utilisant l'équation 5 :

$$\Delta \text{ Ino}(\log \text{ UFC / mL}) = \text{Mean\_Ino}_{T24h} - \text{Mean\_Ino}_{T0h} \quad \text{Équation 5}$$

où Mean\_Ino correspond à la moyenne du nombre de bactéries vivantes (log UFC/mL) à T0h ou à T24h pour une condition donnée : taille d'inoculum de départ, pathogène, antibiotique et sa concentration (ATB).

## 2.2.4 Résultats

### 2.2.4.1 Sensibilité des souches *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* HG001 à différentes céphalosporines

La détermination des CMI de la céphalexine et du cefprozil pour les 2 souches étudiées a été réalisée lors de 3 expériences indépendantes. Le tableau 5 indique les résultats obtenus et les compare aux valeurs données par EUCAST.

Tableau 5 : Détermination des CMI de la céphalexine et du cefprozil pour 2 souches bactériennes et comparaison aux données bibliographiques. Les valeurs rapportées sont les moyennes de 3 répétitions et sont dans l'intervalle rapporté pour la souche (a) ou pour le genre (β), en fonction des données bibliographiques disponibles.

Souche bactérienne/	<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>S. aureus</i> HG001	
Antibiotique	CMI mesurée	CMI de référence	CMI mesurée	CMI de référence
Céphalexine	8 µg/mL	4/8 µg/mL <sup>β</sup> [0,5-256]	8 µg/mL	1/8 µg/mL <sup>β</sup> [0,5-256]
Cefprozil	2 µg/mL	1-4 µg/mL <sup>α</sup>	1 µg/mL	0,9/2,1 µg/mL <sup>β</sup> [0,064-8]

### 2.2.4.2 Influence de la taille de l'inoculum et de la souche bactérienne sur l'activité bactéricide des céphalosporines

L'étude de l'évolution des populations bactériennes pendant 24 h d'incubation en l'absence d'antibiotique a révélé que l'évolution de la population d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus* dans le bouillon MH suit les 3 phases de croissance caractéristiques des bactéries

(phase de latence relativement courte, de croissance exponentielle et phase stationnaire). La densité maximale est d'environ  $10^9$  UFC/mL pour *Escherichia coli* et  $5 \cdot 10^8$  UFC/mL pour *Staphylococcus aureus* quelle que soit la taille initiale de l'inoculum.

#### 2.2.4.2.1 Etude d'*E. coli* ATCC25922 en présence de céphalexine et de cefprozil

Les courbes de bactéricidie statiques obtenues après l'exposition de  $10^5$ ,  $10^6$  et  $10^8$  UFC/mL d'*Escherichia coli* à différentes concentrations de céphalexine sont représentées respectivement sur les figures 14 à 16.

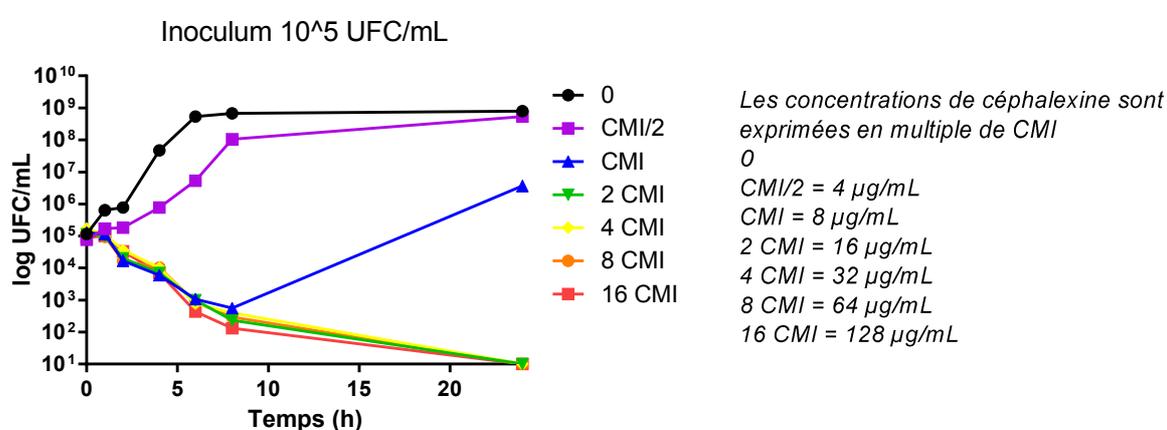


Figure 14 : Courbes de bactéricidie obtenues à partir d'un inoculum initial de *E. coli* de  $10^5$  UFC/mL en présence de céphalexine.

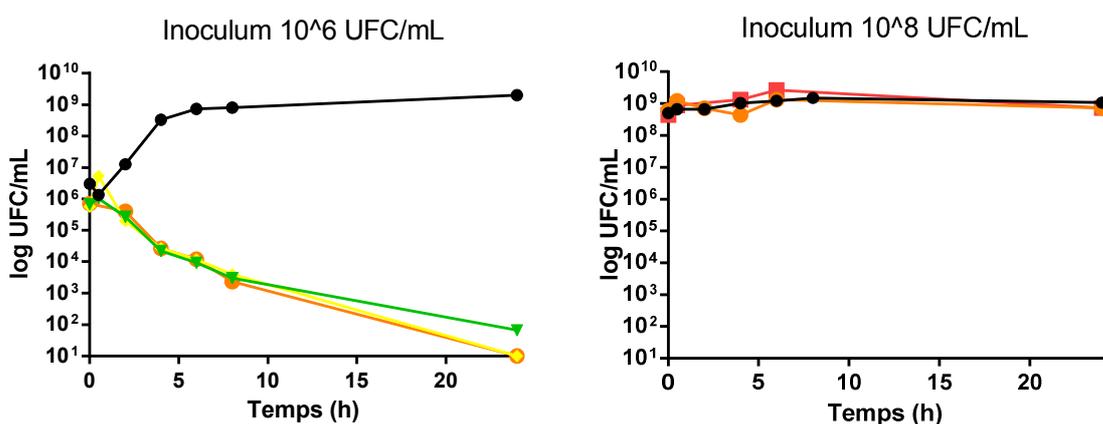


Figure 16 : Courbes de bactéricidie obtenues à partir d'un inoculum initial de *E. coli* de  $10^6$  UFC/mL en présence de céphalexine.

Figure 15 : Courbes de bactéricidie obtenues à partir d'un inoculum initial de *E. coli* de  $10^8$  UFC/mL en présence de céphalexine.

Les courbes de bactéricidie statiques obtenues après l'exposition de  $10^5$ ,  $10^6$  et  $10^8$  UFC/mL d'*Escherichia coli* à différentes concentrations de cefprozil sont représentées respectivement sur les figures 17 à 19.

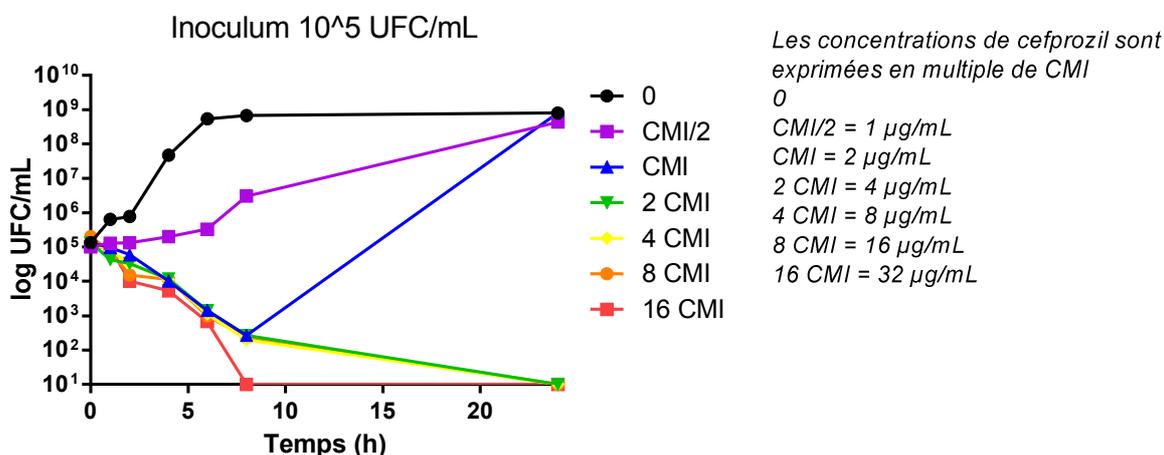


Figure 17 : Courbes de bactéricidie obtenues à partir d'un inoculum initial de *E. coli* de  $10^5$  UFC/mL en présence de cefprozil.

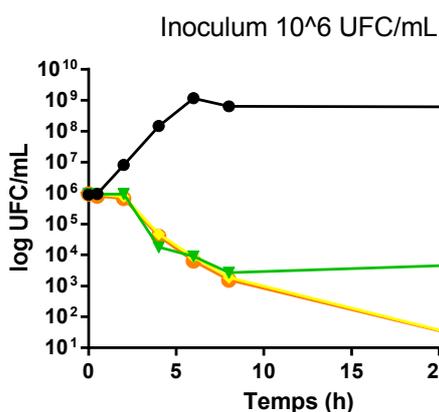


Figure 19 : Courbes de bactéricidie obtenues à partir d'un inoculum initial de *E. coli* de  $10^6$  UFC/mL en présence de cefprozil.

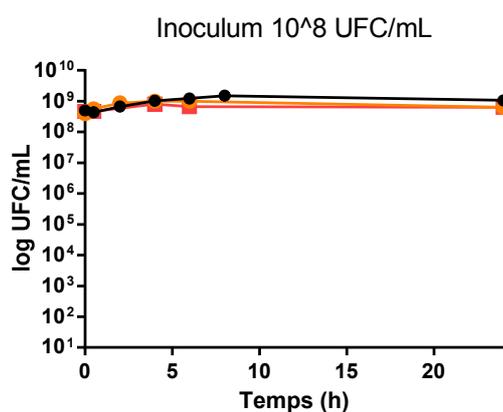


Figure 18 : Courbes de bactéricidie obtenues à partir d'un inoculum initial de *E. coli* de  $10^8$  UFC/mL en présence de cefprozil.

Les figures 14 à 19 montrent une variation de l'activité des céphalosporines en fonction de la taille de l'inoculum d'*Escherichia coli*. Ainsi, les concentrations capables d'éradiquer 99.9% de la population bactérienne (taille de l'inoculum divisée par 1000) ou CMB pour les inocula de départ  $10^5$ ,  $10^6$  et  $10^8$  UFC/mL sont de 2, 2 et  $>16$  fois la CMI et de 2, 4 et  $>16$  fois la CMI pour la céphalexine et le cefprozil respectivement. Cela révèle une diminution de l'activité bactéricide des céphalosporines testées en présence d'un gros inoculum d'*E. coli*.

2.2.4.2.2 Etude de *S. aureus* HG001 en présence de céphalexine et de cefprozil

Les courbes de bactéricidie statiques obtenues après l'exposition de  $10^5$ ,  $10^6$  et  $10^8$  UFC/mL de *Staphylococcus aureus* à différentes concentrations de céphalexine sont représentées respectivement sur les figures 20 à 22.

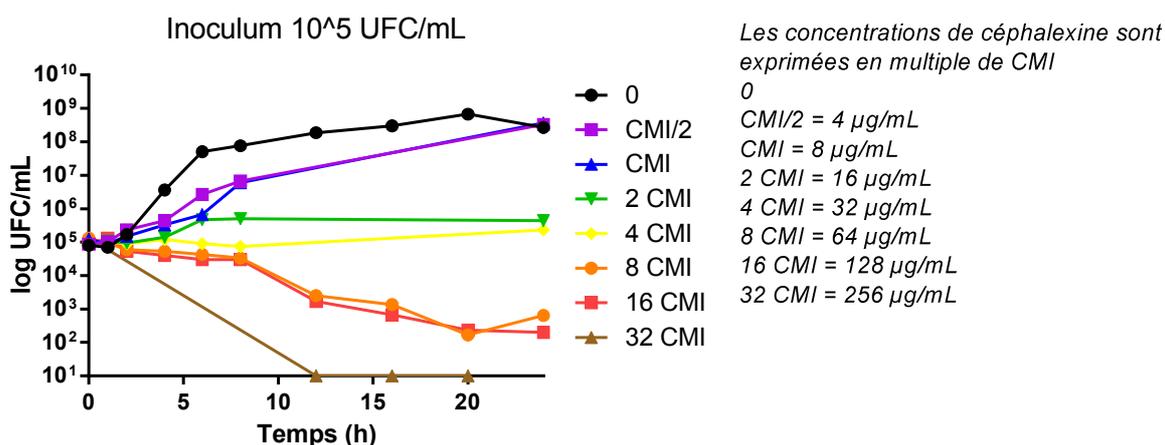


Figure 20 : Courbes de bactéricidie obtenues à partir d'un inoculum initial de *S. aureus* de  $10^5$  UFC/mL en présence de céphalexine.

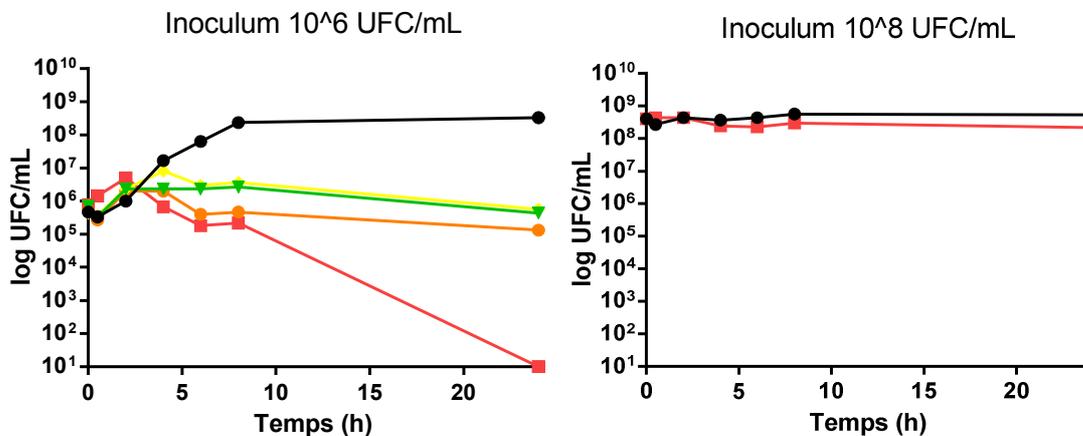


Figure 21 : Courbes de bactéricidie obtenues à partir d'un inoculum initial de *S. aureus* de  $10^6$  UFC/mL en présence de céphalexine.

Figure 22 : Courbes de bactéricidie obtenues à partir d'un inoculum initial de *S. aureus* de  $10^8$  UFC/mL en présence de céphalexine.

Les courbes de bactéricidie statiques obtenues après l'exposition de  $10^5$ ,  $10^6$  et  $10^8$  UFC/mL de *Staphylococcus aureus* à différentes concentrations de cefprozil sont représentées respectivement sur les figures 23 à 25.

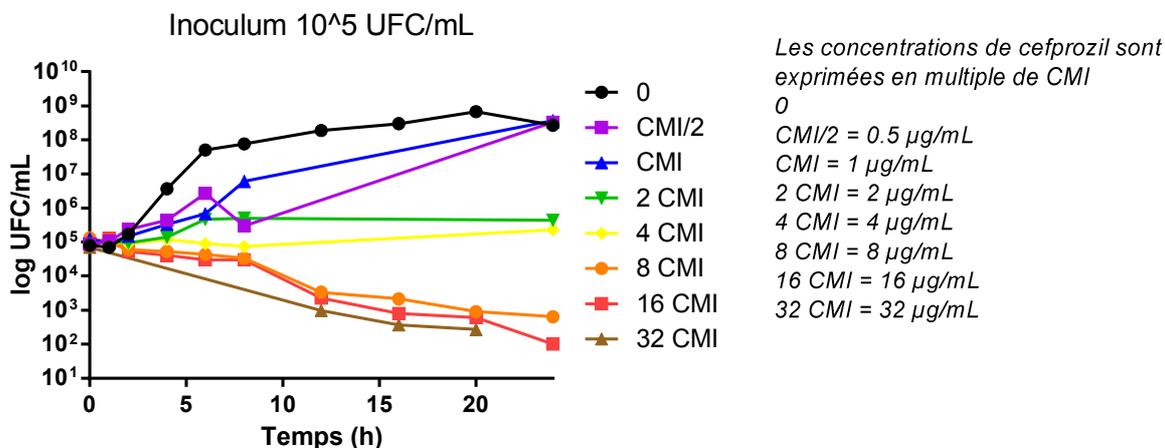


Figure 23 : Courbes de bactéricidie obtenues à partir d'un inoculum initial de *S. aureus* de  $10^5$  UFC/mL en présence de cefprozil.

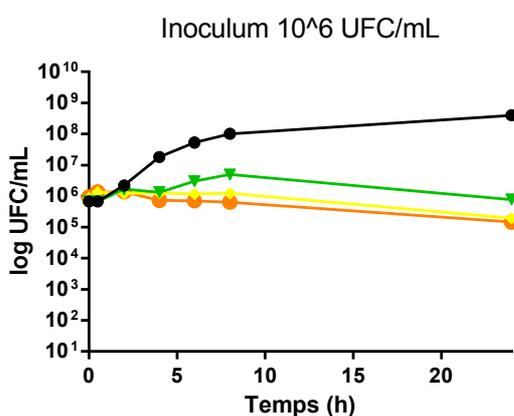


Figure 25 : Courbes de bactéricidie obtenues à partir d'un inoculum initial de *S. aureus* de  $10^6$  UFC/mL en présence de cefprozil.

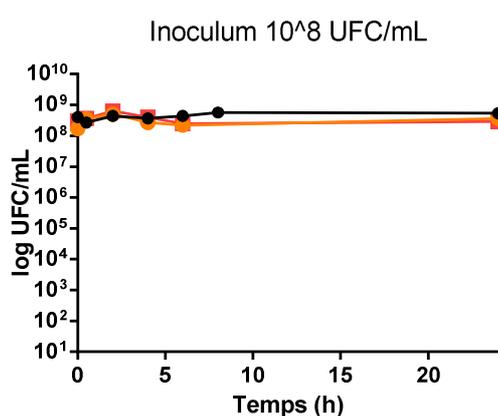


Figure 24 : Courbes de bactéricidie obtenues à partir d'un inoculum initial de *S. aureus* de  $10^8$  UFC/mL en présence de cefprozil.

Les figures 20 à 25 montrent une variation de l'activité des céphalosporines en fonction de la taille de l'inoculum de *Staphylococcus aureus*. Ainsi, comme pour *E. coli*, aucune action bactéricide n'est visible pour le gros inoculum ( $10^8$  UFC/mL) même avec de fortes concentrations (>16 fois la CMI). Pour des tailles d'inoculum plus faible, les concentrations nécessaires à l'obtention d'un effet bactéricide sont nettement plus élevées relativement à la CMI que celles observées avec *E. coli* et un effet bactériostatique est plus fréquemment observé à concentrations comparables.

### 2.2.4.2.3 Analyses des courbes de bactéricidie avec un inoculum de $10^5$ UFC/mL

La figure 26 représente les indices de bactéricidie Delta\_Ino à 24 h sur un faible inoculum ( $10^5$  UFC/mL) en fonction de la souche bactérienne et de l'antibiotique dont la concentration utilisée est exprimée en multiples de la CMI.

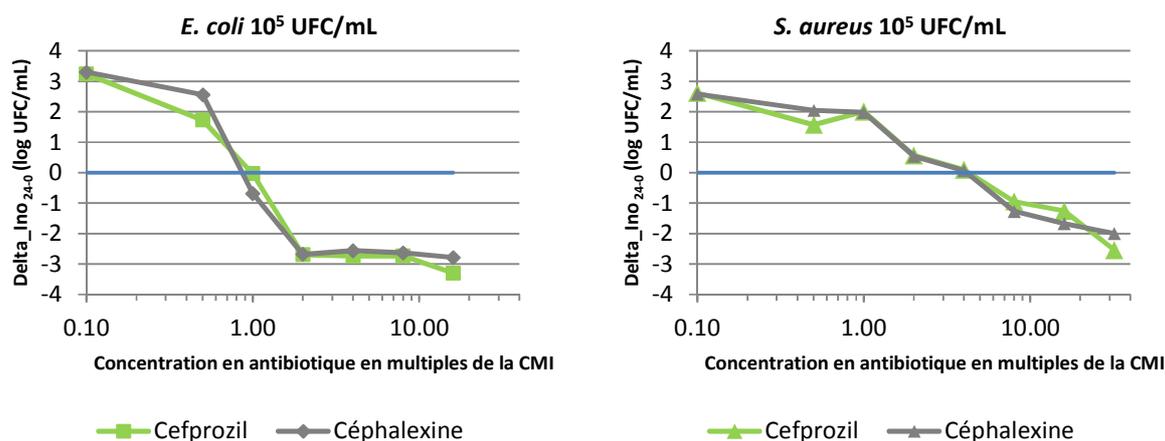


Figure 26 : Représentation du Delta-Ino à 24h en fonction de la céphalosporine et de la souche bactérienne utilisée sur un petit inoculum.

Les résultats de la céphalexine et du cefprozil sont très comparables lorsque l'on s'intéresse aux concentrations exprimées en multiples de la CMI. Le double de la CMI suffit à produire un effet bactéricide (valeur de Delta\_ino = -3) contre *E. coli* mais les concentrations nécessaires sont bien plus élevées, plus de 32 fois la CMI pour obtenir un effet bactéricide sur *S. aureus*.

Les CMI du cefprozil étant inférieures à celles de la céphalexine (1 et 2 µg/mL et 8 µg/mL respectivement, cf. tableau 5), une activité bactéricide du cefprozil est observée avec des concentrations moindres que celles de la céphalexine.

### 2.2.4.3 Système in vitro dynamique

#### 2.2.4.3.1 Profil des concentrations en céphalexine

La céphalexine a été injectée dans le compartiment central 2 fois par jour pendant 2 jours afin de se rapprocher d'une administration BID sur 2 jours. Elle a été diluée avec un débit de 44,2 mL/h pour reproduire un temps de demi-vie de 1,5 heure tout en tenant compte de la dégradation de la molécule *in situ*. Deux concentrations initiales ont été utilisées, une concentration au pic de 16 µg/mL qui permet d'obtenir un  $T_{>CMI}=13.6\%$  au plus près des valeurs observées *in vivo* chez le chien avec des comprimés administrés par voie orale selon la

posologie recommandée et une concentration au pic de 128 µg/mL qui permet d'obtenir un  $T_{>CMI}=54.5\%$ , ce qui est plus compatible avec la probabilité d'une efficacité clinique [23].

La figure 27 représente les profils de concentration souhaités dans le compartiment central et les profils de concentration réellement obtenus.

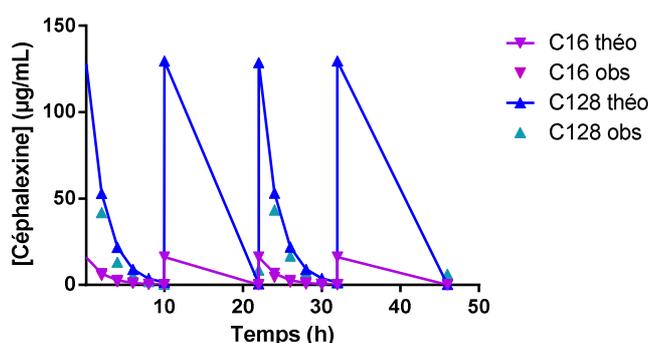


Figure 27 : Profils de concentration en céphalexine mesurée par UPLC (Cobs) et souhaitée (Cthéo).

Les concentrations ont été mesurées dans le compartiment central contenant *S. aureus* à 2 concentrations maximales en céphalexine de 16 ou 128 µg/mL.

La comparaison des profils de concentration souhaités et mesurés permet de confirmer que le système dynamique mis en place a permis d'obtenir les concentrations désirées en antibiotique dans le compartiment central tout au long de l'expérimentation.

#### 2.2.4.3.2 Courbe de bactéricidie en système dynamique

Les courbes de bactéricidie obtenues à partir de 2 souches bactériennes différentes et exposées à 2 profils de concentrations sont représentées sur la figure 28.

Un effet bactéricide (99.9 % de réduction de l'inoculum initial) marqué est observé pour la forte concentration de céphalexine sur *E. coli* quelques heures après la première administration dans le compartiment central. Dans les autres cas, une diminution de la taille d'inoculum est observée dans les premières heures sans cependant éliminer 99.9% des pathogènes.

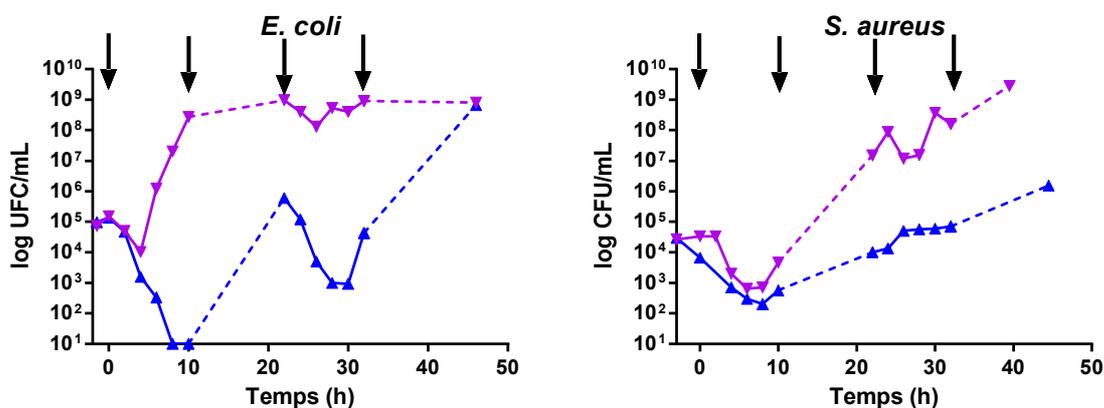


Figure 28 : Courbes de bactéricidie obtenues en exposant *E. coli* et *S. aureus* à des concentrations variables en céphalexine au cours du temps. Quatre administrations d'antibiotique, symbolisées par les flèches, ont été réalisées avec des concentrations maximales en céphalexine de 16 (courbe violette) ou 128 (courbe bleue) µg/mL.

Nous avons observé un effet de la céphalexine plus marqué à forte concentration et une activité augmentée de la céphalexine contre *E. coli* comparé à *S. aureus*.

Dans tous les cas, les vitesses de bactéricidie ont progressivement diminué jusqu'à ce qu'une recroissance apparaisse, en dépit des administrations répétées d'antibiotique. Cela est étonnant pour *S. aureus* car, à la seconde administration, les tailles d'inocula bactériens étaient de  $6 \times 10^2$  et  $5 \times 10^3$  UFC/mL, et on aurait pu s'attendre à observer une éradication bactérienne. Ce phénomène est plus inattendu pour *E. coli* avec la forte concentration car le nombre de bactéries était passé sous la LOQ avant la seconde administration de céphalexine. Afin d'explorer une éventuelle résistance, les CMI des *E. coli* prélevées aux temps 10h, 22h, 32h et 46h ont été mesurées. Une CMI identique à la CMI originelle de 8µg/mL a été retrouvée dans tous les cas.

### 2.2.5 Discussion

Afin d'étudier l'influence de la taille de la population bactérienne sur la bactéricidie, 2 céphalosporines ont été ajoutées sur 3 tailles d'inoculum et 2 souches de 2 espèces bactériennes différentes.

L'effet inoculum est bien décrit lors de l'utilisation de bêta-lactamines et il peut être très marqué lors d'étude de la concentration inhibant la croissance. Par exemple, Soriano et al décrivent un rapport de CMI de 8 et 16 pour la céfazoline et le céfotaxime respectivement en comparant les CMI avec un inoculum standard de  $10^5$  UFC/mL et avec un gros inoculum de  $10^8$  UFC/mL [84]. Cet effet inoculum se retrouve également lors de la réalisation de courbes de bactéricidie, par

une réduction de l'activité bactéricide des antibiotiques comme nous avons pu l'observer lors de nos expériences.

L'absence d'effet sur un gros inoculum de départ même en utilisant de fortes concentrations en antibiotique s'explique très bien par les modalités d'actions des céphalosporines. En effet, les céphalosporines agissant lors de la synthèse de la paroi bactérienne, elles ne peuvent avoir qu'une action très réduite sur des bactéries en phase stationnaire [22]. Ainsi, en clinique, face à une infection avec des concentrations bactériennes élevées, une céphalosporine ne pourra probablement pas être le seul moyen thérapeutique mis en place.

En revanche, sur des bactéries en multiplication comme c'est le cas des inocula de départ à  $10^5$  et  $10^6$  UFC/mL, l'action des céphalosporines étudiées (céphalexine et cefprozil) augmente avec leur concentration jusqu'à un certain seuil ; c'est plus marqué pour *S. aureus* pour lequel on observe un profil concentration puis temps dépendant, que pour *E. coli*, pour lequel un profil temps-dépendant est observé. Cette dualité d'action est une propriété des céphalosporines [23] mais il est intéressant de noter la disparité entre les 2 espèces bactériennes étudiées.

L'activité des 2 céphalosporines étudiées n'est pas clairement modifiée lorsqu'on compare les inocula de  $10^5$  et  $10^6$  UFC/mL. La faible différence entre ces 2 tailles d'inoculum (seulement 1 log d'écart) explique probablement l'absence d'effet inoculum observable sur les concentrations bactéricides.

Si l'on considère les concentrations en antibiotiques en multiple de la CMI, l'activité de la céphalexine et du cefprozil sont comparables. Cependant, si on considère les concentrations en  $\mu\text{g/mL}$ , étant donné que les CMI du cefprozil sont plus faibles que celles de la céphalexine, on se rend compte que le cefprozil est plus puissant que la céphalexine.

Cette étude démontre également une différence d'efficacité et de puissance entre les 2 pathogènes sélectionnés. Si on compare l'action sur *S. aureus* à celle sur *E. coli*, les concentrations en antibiotique nécessaires à un effet bactéricide sont beaucoup plus élevées (antibiotiques moins puissants) et l'effet obtenu est moindre (antibiotiques moins efficaces) en présence de *S. aureus*. Le système dynamique a confirmé ces résultats.

La repousse bactérienne observée dans toutes les conditions du système dynamique est un phénomène fréquemment observé lors de ce type d'expérimentation [110]. Une détermination de la CMI des bactéries présentes lors des repousses a été réalisée, afin de déterminer quel phénomène était à l'origine de cette reprise de croissance malgré la présence d'antibiotiques. Deux phénomènes peuvent être à l'origine d'une repousse. Soit les bactéries sont devenues,

suite à une mutation génétique aléatoire, résistantes à l'antibiotique utilisé ; soit elles entrent physiologiquement en dormance, sous l'effet de signaux de stress, ce qui leur permet de persister dans le milieu sans pour autant présenter de modification génétique, elles sont alors transitoirement tolérantes aux antibiotiques [111]. Etant donné que les bactéries cultivées à partir des repousses avaient la même CMI que les souches initiales, on peut conclure que ce sont des bactéries persistantes et non des bactéries résistantes qui sont à l'origine de la repousse observée lors de nos expérimentations [112]. La fréquence de formation de « persisters » dans une population bactérienne non stressée va de  $10^{-7}$  à  $10^{-2}$  en fonction de la souche bactérienne étudiée [113]. Elle augmente en condition de stress bactérien, notamment lors de présence d'antibiotiques [111]. Ce phénomène de persistance phénotypique, qui entraîne une tolérance transitoire des bactéries aux antibiotiques, est estimé responsable d'une part des infections chroniques et récidivantes.

Les concentrations en céphalosporine nécessaires à l'obtention d'un effet bactéricide contre *S. aureus* sont très élevées par rapport à la concentration sérique attendue avec un traitement aux doses actuellement recommandées chez le chien ( $C_{max}=16\mu\text{g/mL}$ ). Cela a été confirmé par les courbes de bactéricidie en système *in vitro* dynamique qui permet de s'approcher du profil plasmatique observé chez un animal. Or la céphalexine possède une AMM pour le traitement des infections à *S. aureus*, et son utilisation n'a pas été remise en cause après des années d'utilisation en clinique. Cela pose la question de la différence d'activité observée *in vitro* et *in vivo*. Le système immunitaire est très probablement un des éléments qui permet d'expliquer cette différence. C'est pourquoi nous avons choisi de poursuivre nos études *in vitro* en intégrant une cellule immunitaire ayant un rôle majeur dans la lutte contre les pathogènes : le macrophage.

## 2.3 Développement d'un modèle *in vitro* tripartite afin d'étudier les interactions entre des macrophages murins, *Staphylococcus aureus* et une céphalosporine

### 2.3.1 Problématique

Les indices PK/PD, qui prennent en compte les valeurs de CMI, sont utilisés régulièrement afin de déterminer des protocoles de traitement pour les antibiotiques [114]. Cependant, ces indices pharmacodynamiques ne prennent pas explicitement en compte les effets antibactériens du système immunitaire de l'hôte alors que l'immunité innée est capable de tuer 99.9% des micro-organismes chez les individus immunocompétents [115]. Etant donné qu'une des premières étapes du contrôle d'une infection est la phagocytose des cellules bactériennes, l'utilisation d'un modèle *in vitro* qui permettrait d'étudier les interactions entre phagocytes, bactéries et antibiotiques constituerait un progrès considérable par rapport aux systèmes *in vitro* traditionnels, qui ignorent la plupart du temps la contribution du système immunitaire.

Très peu d'études *in vitro* se sont intéressées à un système tripartite avec des macrophages comme cellule phagocytaire, certains ont utilisé des macrophages dérivés de lignées cellulaires [116, 117] ou des macrophages primaires [118]. Dans notre étude, nous avons décidé d'utiliser des macrophages issus de la moelle osseuse.

### 2.3.2 Objectifs

Les objectifs de cette étude ont été :

- de développer un système *in vitro* tripartite *Staphylococcus aureus* / macrophages murins / céphalexine
- d'étudier l'action des macrophages sur différentes tailles d'inocula de *S. aureus* par la réalisation de courbes de bactéricidie, l'utilisation de la cytométrie de flux et la quantification des cytokines.
- d'étudier l'action antibactérienne conjointe des macrophages et de la céphalexine contre différentes tailles d'inocula de *S. aureus*.

La validation de ce modèle exigeait que soit connu l'aspect bipartite céphalexine/*S. aureus* décrit dans le chapitre précédent de ce travail.

### 2.3.3 Matériel et méthodes

#### 2.3.3.1 Souche bactérienne et conditions de culture

Une souche de *Staphylococcus aureus* HG001 [119],  $\beta$ -lactamase négative, sensible à la méthicilline et exprimant une protéine fluorescente verte (GFP pour Green Fluorescent Protein, figure 29) a été utilisée lors de cette étude afin de pouvoir détecter les bactéries vivantes en cytométrie de flux.

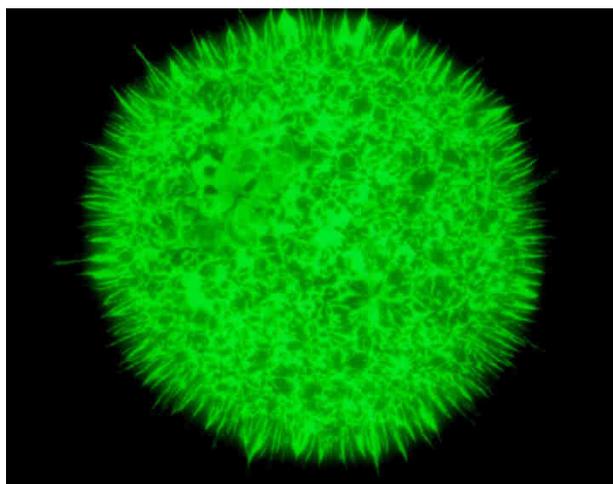


Figure 29 : Colonie de *S. aureus* HG001 GFP sur gélose charbon vue au microscope à épifluorescence en FITC objectif x4.

La CMI de cette souche a été déterminée en milieu MH selon la méthode de référence [1] et en milieu Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) additionné de 10% de sérum de veau fœtal (RPMIc), le milieu de culture des macrophages dans notre étude. Les bactéries utilisées ont été placées dans des conditions contrôlées afin qu'elles soient en phase de croissance exponentielle lors de la mise en culture du système tripartite.

#### 2.3.3.2 Isolement et différenciation des macrophages

Des souris femelles C57BL/6JRj ont été utilisées lors de cette étude (Janvier Labs, Saint Berthevin, France). Les expérimentations réalisées ont été agréées par le Ministère de l'Agriculture sous le numéro d'agrément pour l'expérimentation animale n°02560.01.

La moelle osseuse a été isolée à partir des fémurs et des tibias de souris fraîchement euthanasiées, puis filtrée sur un tamis cellulaire de 40 $\mu$ m. Les globules rouges ont été lysés à l'aide d'un tampon ACK. Les cellules ont ensuite été lavées puis mises en culture dans un milieu RPMIc<sub>1</sub> contenant 63% de RPMI1640, 27% de DMEM, 10% de sérum de veau fœtal inactivé à 56°C et la cytokine « colony stimulating factor 1 » aussi appelée « macrophage colony-

stimulating factor », qui dirige la différenciation des cellules hématopoïétiques en macrophages et cellules apparentées. Cette cytokine a été produite à partir de culture de cellules LADMAC.

Les cellules ont été mises en culture sur boîte de Pétri dans une étuve à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub> pendant 6 jours. Le sixième jour, les cellules adhérentes ont été prélevées, lavées et elles ont été remises en suspension dans du RPMIc à une concentration de 10<sup>6</sup> cellules/mL. Les macrophages murins ont ensuite été répartis dans des plaques P24 à raison de 500µL par puits et ont été placés dans l'incubateur toute la nuit afin de permettre leur adhérence au fond du puits.

### 2.3.3.3 Courbes de bactéricidie des bactéries extracellulaires

Des courbes de bactéricidie des bactéries présentes dans le surnageant ont été réalisées en l'absence ou avec la présence de macrophages (10<sup>6</sup> cellules/mL) dans 500µL de RPMIc. Les concentrations en *S. aureus* HG001 GFP ont été ajustées afin d'obtenir des « multiplicity of infection » (MOI) de 0,01, 0,1, 1 et 10 correspondant à des concentrations bactériennes de 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> et 10<sup>7</sup> UFC/mL. Lors des expérimentations avec antibiotique, 50µL d'une solution de céphalexine a été ajouté simultanément afin d'obtenir une concentration dans les puits correspondant à des multiples de la CMI. La céphalexine utilisée ici est de l'hydrate de céphalexine avec une pureté >90% (Sigma, St Louis, MO, USA) dont des solutions à 10mg/mL ont été filtrées et stockées à -20°C pendant moins de 3 mois avant leur utilisation. En l'absence d'antibiotique, 50µL de milieu a été ajouté.

Des triplicatas de chaque condition ont été réalisés sur chaque plaque, avec une plaque par temps de prélèvement. A chaque temps, les surnageants ont été prélevés et les triplicatas ont été réunis. Des aliquotes de 100 µL ont été utilisés afin de dénombrer le nombre de bactéries selon la méthode décrite au paragraphe 2.2.3.4. Chaque expérience a été répétée indépendamment au moins 3 fois.

### 2.3.3.4 Analyse de l'évolution des bactéries extracellulaires

La croissance des bactéries *S. aureus* HG001 GFP en fonction du temps, des MOI initiales et de la présence ou non de macrophages a été quantifiée grâce à un index de croissance appelé EC Sa. Cet index exprime la concentration de *S. aureus* dans le milieu aux temps 3, 6 ou 12h en pourcentage de l'inoculum initial.

Il est calculé comme défini dans l'équation 6 :

$$EC Sa_{(x,y,t)} = \frac{N_{Sa(Ix,My,Tt)}}{N_{Sa(Ix,My,T0)}} \times 100 \quad \text{Équation 6}$$

où  $EC Sa_{(x,z,t)}$  est l'index de croissance des bactéries dans le surnageant (%) obtenu après l'exposition d'un inoculum initial de *S. aureus* (x) avec ou sans macrophages (y) à (t) heures,  $N_{Sa(lx,My,To)}$  et  $N_{Sa(lx,My,Tt)}$  sont les comptages des bactéries du surnageant en log (log UFC.mL<sup>-1</sup>) d'un inoculum initial de *S. aureus* (x) cultivé avec une concentration en macrophages (y) à 0 et (t) heures respectivement.

Une valeur supérieure à 100 signifie une croissance bactérienne.

Un autre index, plus pharmacodynamique, a été utilisé afin d'étudier l'influence de la présence de céphalexine et des macrophages à 6h.

Pour chaque courbe de comptage bactérien en fonction du temps, l'aire sous la courbe de 0 à 6h ( $AUC_{obs}$ ) a été calculée.

Un index d'efficacité a ensuite été calculé comme suit dans l'équation 7 :

$$EF_{6h(x,y,z)} = \frac{(AUC_{obs(C_0,M_0,z)} - AUC_{obs(x,y,z)})}{AUC_{obs(C_0,M_0,z)}} \times 100 \quad \text{Équation 7}$$

où  $EF_{6h(x,y,z)}$  (de 0 à 100%) est le facteur d'efficacité à 6h post infection obtenu après l'exposition d'un inoculum bactérien initial (z) à une concentration en céphalexine (x) et une concentration en macrophages (y),  $AUC_{obs(C_0,M_0,z)}$  (log UFC.h.mL<sup>-1</sup>) est l'AUC de contrôle sans céphalexine ( $C_0$ ) ni macrophages ( $M_0$ ) et  $AUC_{obs(x,y,z)}$  (log UFC.h.mL<sup>-1</sup>) est l'AUC en présence d'une concentration (x) en céphalexine et d'une concentration (y) en macrophages de 0 à 6h.

### 2.3.3.5 Etude des macrophages et des *S. aureus* GFP intracellulaires à l'aide de la cytométrie de flux

Après le retrait des surnageants, les macrophages ont été lavés à l'aide de 500µL d'HBSS. Cinq cent µL d'HBSS contenant 5mM d'EDTA ont ensuite été ajoutés à chaque puits. Après une agitation orbitale à 100G, à 37°C pendant 10 minutes, les macrophages ont été prélevés puis relavés à l'aide de 600µL d'HBSS.

Les 2/3 de cette solution (i.e. 400µL) ont été utilisés afin d'étudier les macrophages. La viabilité des macrophages a été évaluée grâce à un agent intercalant, le propidium iodide, une molécule fluorescente permettant de détecter les cellules nécrotiques et de les différencier des cellules viables. La phagocytose des bactéries *S. aureus* GFP par les macrophages a elle été étudiée par l'expression GFP des macrophages.

Le tiers restant de la solution (200µL) a été utilisé pour l'étude des bactéries phagocytées. Les macrophages ont donc été lysés à l'aide d'eau ultrapure pendant 15minutes, les bactéries ont été lavées et colorées à l'aide de propidium iodide afin d'évaluer leur viabilité.

Les comptages cellulaires ont été réalisés à l'aide d'un cytomètre de flux (MACSQuant Analyzer, Miltenyi Biotec, Germany). Un volume constant de 100µL a été utilisé pour chaque analyse. Les données obtenues ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel FlowJo (Tree Star, USA).

### 2.3.3.6 Analyses de la cytométrie de flux

#### 2.3.3.6.1 Effet de la céphalexine sur les macrophages

Les macrophages ont été cultivés pendant 12h avec des concentrations en céphalexine variant de 0 à 256 µg/mL. Un possible effet cytotoxique de la céphalexine sur les macrophages a été étudié à l'aide d'un index  $I_{cef}$ . Cet index exprime la proportion de macrophages mourants en fonction du temps et de la concentration en céphalexine par rapport à la quantité de macrophages mourants au même temps mais sans antibiotique.

$I_{cef}$  se calcule comme défini dans l'équation 8 :

$$I_{Cef(z,t)} = \frac{\left( \frac{N \text{ BMDM } PI+ \text{ CzTt}}{N \text{ BMDM } total_{CzTt}} \right)}{\left( \frac{N \text{ BMDM } PI+ \text{ C0Tt}}{N \text{ BMDM } total_{C0Tt}} \right)} \quad \text{Équation 8}$$

où  $I_{Cef(z,t)}$  est l'index de céphalexine obtenu à (t) heures suite à l'exposition des macrophages à une concentration en céphalexine (z),  $N \text{ BMDM}_{PI+}$  est le nombre de macrophages PI+ (macrophages mourants) après une culture avec une concentration donnée de céphalexine (Cz) ou sans céphalexine (C0) pendant (t) heures et  $N \text{ BMDM}_{total}$  est le nombre total de macrophages après une culture avec une concentration donnée de céphalexine (Cz) ou sans céphalexine (C0) pendant (t) heures.

#### 2.3.3.6.2 Quantification de la phagocytose de *S. aureus* par les macrophages

La phagocytose des bactéries *S. aureus* GFP par les macrophages a été exprimée à l'aide d'un index  $I_{phag}$  comme défini dans l'équation 9 :

$$I_{phag}(x,z,t) = \frac{(N_{GFP+PI-} + N_{GFP+PI+} + N_{GFP-PI+} - 0.3 \times N_{GFP-PI-}) \text{ BMDM}(x,z,t)}{N \text{ BMDM } total_{(x,z,t)}} \quad \text{Équation 9}$$

où  $I_{phag(x,z,t)}$  est l'index de phagocytoses (de 0 à 1) obtenu après l'exposition des macrophages à un inoculum bactérien initial (x) et à une concentration donnée en céphalexine (z) à (t) heures, N

BMDM sont les nombres de macrophages PI+ ou PI- et GFP+ ou GFP- cultivés avec un inoculum bactérien initial (x) et une concentration donnée en céphalexine (z) pendant (t) heures et N BMDM total<sub>x,z,t</sub> est le nombre total de macrophages cultivés avec un inoculum bactérien initial (x) et une concentration donnée en céphalexine (z) pendant (t) heures. Le numérateur inclut tous les macrophages qui ont phagocyté des bactéries, donc il inclut les macrophages vivants et nécrotiques contenant des bactéries vivantes (N<sub>GFP+PI-</sub> et N<sub>GFP+PI+</sub>, respectivement), les macrophages contenant des bactéries mortes (n'exprimant plus GFP) (N<sub>GFP-PI+</sub> [90]) et prend en compte la mortalité basale des macrophages non infectés (une base de 0.3xN<sub>GFP-PI-</sub> a été soustraite, cf. 2.3.4.5).

### 2.3.3.6.3 Viabilité des bactéries phagocytées

La viabilité des bactéries après phagocytose par les macrophages a été quantifiée après lyse des macrophages et cytométrie de flux des bactéries phagocytées à l'aide de l'index de mortalité des bactéries intracellulaires IC Sa PI+. IC Sa PI+ exprime la proportion des bactéries phagocytées mourantes à différents temps post infection en pourcentage de la proportion des bactéries mourantes à 1h post infection dans les mêmes conditions expérimentales.

L'indice de mortalité des bactéries intracellulaires IC Sa PI+ est calculé comme défini par l'équation 10 :

$$IC Sa PI +_{(x,z,t)} = \frac{\left(\frac{N Sa_{PI+GFP+}}{N Sa_{GFP+}}\right)(IxCzTt)}{\left(\frac{N Sa_{PI+GFP+}}{N Sa_{GFP+}}\right)(IxCzT1)} \times 100 \quad \text{Équation 10}$$

où IC Sa PI+<sub>(x,z,t)</sub> est le pourcentage de *S. aureus* mourants obtenu après la phagocytose d'un inoculum bactérien initial (x) par des macrophages avec une concentration donnée en céphalexine (z) à (t) heures, N Sa<sub>PI+GFP+(IxCz,Tt)</sub> et N Sa<sub>GFP+(IxCz,Tt)</sub> sont les nombres de bactéries intracellulaires PI+GFP+ et GFP+ d'un inoculum bactérien initial (x) cultivé avec des macrophages et une concentration en céphalexine (z) pendant (t) heures, N Sa<sub>PI+GFP+(IxCz,T1)</sub> et N Sa<sub>GFP+(IxCz,T1)</sub> sont les nombres de bactéries intracellulaires PI+GFP+ et GFP+ d'un inoculum bactérien initial (x) cultivé avec des macrophages et une concentration en céphalexine (z) pendant 1 heure.

### 2.3.3.6.4 Mortalité des macrophages

La mortalité des macrophages en fonction du temps et des concentrations variables en bactéries et en céphalexine a été quantifiée par un index de mortalité I<sub>D</sub> qui exprime la

proportion de macrophages mourants sur le nombre total de macrophages dans les mêmes conditions expérimentales.

$I_D$  est calculé comme défini dans l'équation 11 :

$$I_{D(x,z,t)} = \frac{N \text{ BMDM}_{PI+(x,z,t)}}{N \text{ BMDM}_{total(x,z,t)}} \quad \text{Équation 11}$$

où  $I_{D(x,z,t)}$  est l'index de mortalité des macrophages (de 0 à 1) obtenu suite à l'exposition des macrophages à un inoculum bactérien initial (x) et une concentration donnée en céphalexine (z) pendant (t) heures,  $N \text{ BMDM}_{PI+(x,z,t)}$  et  $N \text{ BMDM}_{total(x,z,t)}$  sont les nombres de macrophages PI+ et totaux respectivement cultivés avec un inoculum bactérien initial (x) et une concentration en céphalexine (z) pendant (t) heures.

### 2.3.3.7 Sécrétion de cytokines inflammatoires par les macrophages

Les cytokines sécrétées par les macrophages ont été quantifiées à l'aide de kits ELISA (BioLegend Mouse ELISA, San Diego, CA) conformément aux instructions du fabricant. Trois cytokines pro-inflammatoires ont été dosées, IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  dans le surnageant des macrophages après 3h et 6h de contact avec différentes MOI de *S. aureus* et avec ou sans céphalexine. Les surnageants ont été stockés à -80°C jusqu'aux dosages.

### 2.3.3.8 Analyses statistiques

Toutes les données ont été exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type sauf si mentionné autrement et toutes les expérimentations ont été répétées au moins 3 fois. Une analyse de variance à mesures répétées et à 2 facteurs suivie par des tests de Tukey ont été utilisés pour les comparaisons statistiques des index de cytométrie de flux et d'Ec Sa. Une analyse de variance à 1 facteur suivie par des tests de Tukey a été utilisée pour les comparaisons statistiques des cytokines.

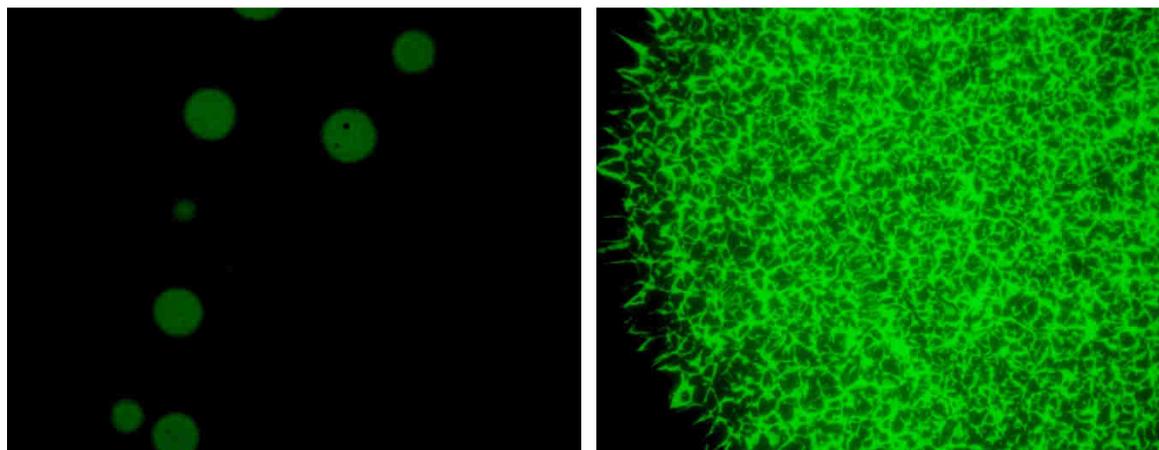
Une valeur de p inférieure à 0,05 a été considérée comme seuil de significativité. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R (version 3.1.2).

## 2.3.4 Résultats

### 2.3.4.1 Caractéristiques de la souche bactérienne

La CMI de la souche bactérienne utilisée dans cette étude, *S. aureus* HG001 GFP, était de 16 $\mu$ g/mL en milieu MH et de 8 $\mu$ g/mL en milieu RPMIc, le milieu de culture des macrophages. C'est donc cette dernière valeur de CMI qui a été considérée lors de nos expérimentations.

Les bactéries utilisées émettent une fluorescence verte qui permet de les reconnaître et de les compter à l'aide du cytomètre de flux. Il est important de prendre en compte le fait que cette fluorescence s'éteint après la mort de ces bactéries [90], ce que nous avons confirmé en comparant bactéries non traitées et bactéries exposées à une forte dose d'antibiotique (céphalexine à une concentration de 256µg/mL, figure 30).



*Figure 30 : Colonies de S. aureus HG001 GFP après 3h de culture en milieu RPMIc avec (à gauche) ou sans (à droite) ajout de 256µg/mL de céphalexine. Etalement réalisé sur gélose charbon vue au microscope à épifluorescence en FITC objectif x4.*

#### **2.3.4.2 Phénotypage des cellules adhérentes**

Le phénotype des cellules utilisées lors de nos expérimentations correspond clairement au phénotype exprimé par les macrophages. En effet, leur marquage CMHII+, F4-80+, CD115+ les classe dans les cellules présentatrices d'antigène et même dans la sous-division monocytes-macrophages. Leur marquage CD11c- exclut quant à lui le fait que ce soit des cellules dendritiques ; le CD11b+ confirme que l'on est en présence de cellules de la lignée phagocytaire (figure 31). De plus, la pureté des cellules était bonne avec plus de 95% des cellules présentes étant des macrophages, le reste des cellules étant constitué par des monocytes et des cellules dendritiques. Le marquage CMHII fortement exprimé confirme que les macrophages utilisés dans notre étude sont fonctionnels et matures, comme le marquage F4-80 plus marqué le jour de l'expérimentation que la veille, jour de préparation des plaques.

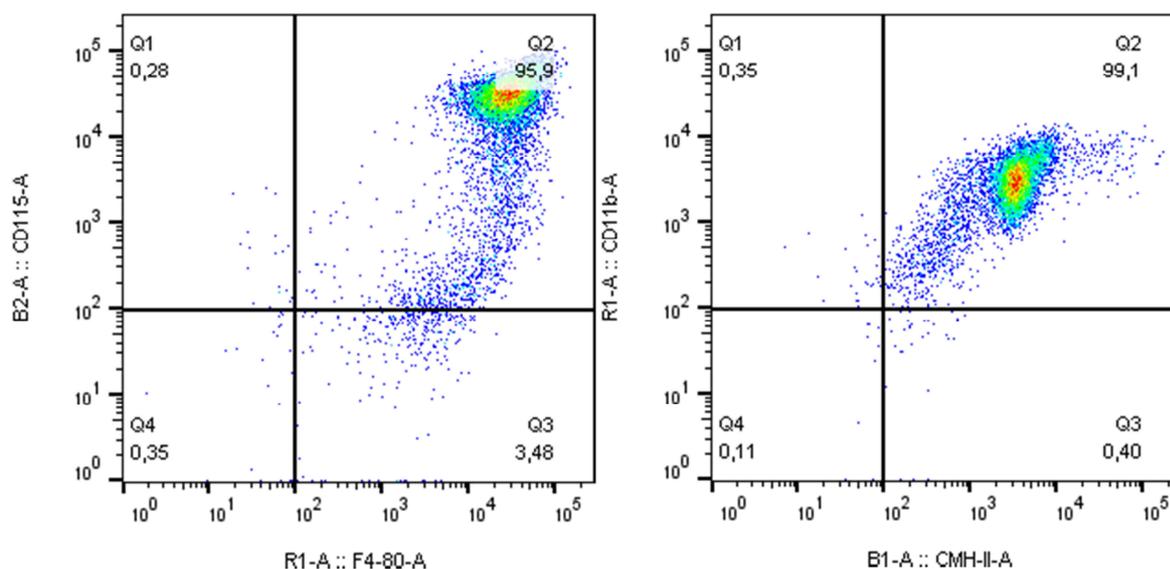


Figure 31 : Images de cytométrie de flux représentatives de l'expression de protéines transmembranaires par les cellules adhérentes caractérisées comme macrophages.

A gauche, on voit une nette expression de F4-80 (axe horizontal) et de CD115 (axe vertical), à droite on voit une nette expression de CMH II (axe horizontal) et de CD11b (axe vertical) par la majorité des cellules.

### 2.3.4.3 Les macrophages ont une capacité limitée de prévention de la croissance bactérienne extracellulaire

Nous avons tout d'abord examiné si les macrophages exposés à différentes tailles d'inoculum bactérien étaient capables de contrôler la croissance bactérienne dans le milieu de culture.

La culture de 4 tailles différentes d'inocula bactériens de *S. aureus* GFP (de 10<sup>4</sup> à 10<sup>7</sup> UFC/mL) exposés ou non à 10<sup>6</sup> macrophages/mL (donc des MOI de 0.01 à 10) a conduit à des croissances différentes dans le milieu de culture (figure 32).

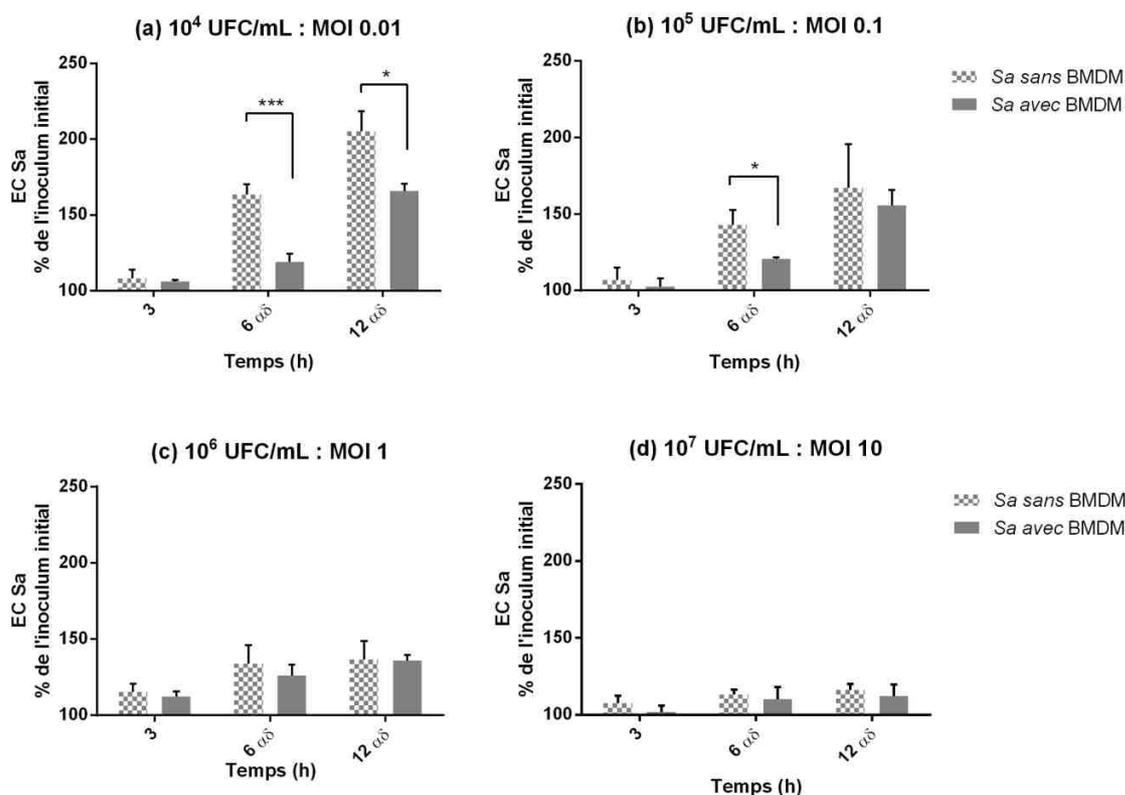


Figure 32 : Croissance des *S. aureus* GFP extracellulaires à différents temps après incubation de différents inocula avec ou sans macrophages. Inoculum bactérien initial de  $10^4$  (MOI 0.01, a),  $10^5$  (MOI 0.1, b),  $10^6$  (MOI 1, c) et  $10^7$  (MOI 10, d) UFC/mL avec  $10^6$  macrophages/mL (barres pleines) ou sans macrophages (barres hachurées). Chaque barre représente la moyenne  $\pm$  SD de 3 expériences, chacune réalisée en triplicata. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ .  $\alpha$  et  $\delta$  indiquent un effet significatif de la présence de macrophages et de la MOI respectivement avec une ANOVA.

La croissance des bactéries dans le milieu a été significativement diminuée en présence des macrophages aux faibles MOI de 0.01 et 0.1 à 6h post infection et à MOI 0.01 à 12h post infection. Cet effet bactériostatique des macrophages n'a plus été détectable aux plus fortes MOI de 1 et 10, suggérant une saturation des macrophages par les gros inocula bactériens. Avec la plus forte MOI, MOI10, la concentration bactérienne initiale dans le milieu est proche de celle observée à l'état stationnaire, c'est pourquoi peu de croissance a été observée à cette concentration.

La figure 33, qui montre les valeurs de l'EF 6h (cf. équation 7), confirme l'effet bactériostatique limité des macrophages avec des valeurs obtenues de 1 à 13 % mais cependant significatif (ANOVA à 2 facteurs,  $p=0.02$ ).

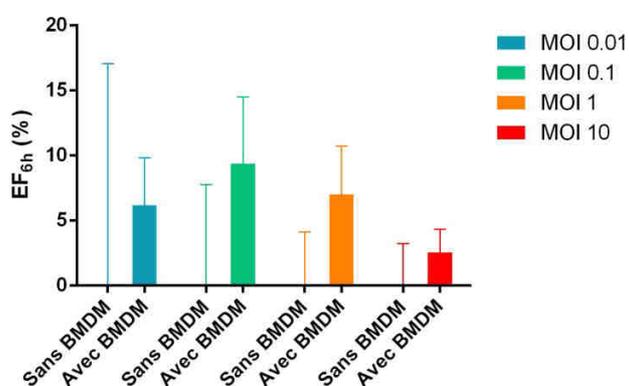


Figure 33 : Valeurs de EF6h avec différents inocula bactériens avec et sans macrophages. Valeurs obtenues après exposition d'un inoculum bactérien initial de  $10^4$  (MOI 0.01),  $10^5$  (MOI 0.1),  $10^6$  (MOI 1) et  $10^7$  (MOI 10) UFC/mL à  $10^5$  BMDM/mL (barres pleines) ou sans macrophage (barres hachurées). Chaque barre représente la moyenne  $\pm$  SD de 3 expériences, chacune réalisée en triplicata.

#### 2.3.4.4 La phagocytose et la mortalité de *S. aureus GFP* par les macrophages varie avec le temps et la MOI

Nous avons ensuite étudié si cette capacité limitée des macrophages à prévenir la croissance bactérienne dans le surnageant pouvait être associée à une altération des capacités de phagocytose des macrophages. La capacité de phagocytose des macrophages a été quantifiée à l'aide de l'index de phagocytose  $I_{\text{phag}}$  (Figure 34 c et d) après analyse par cytométrie de flux de l'expression de GFP par les macrophages infectés (Figure 34 a et b).

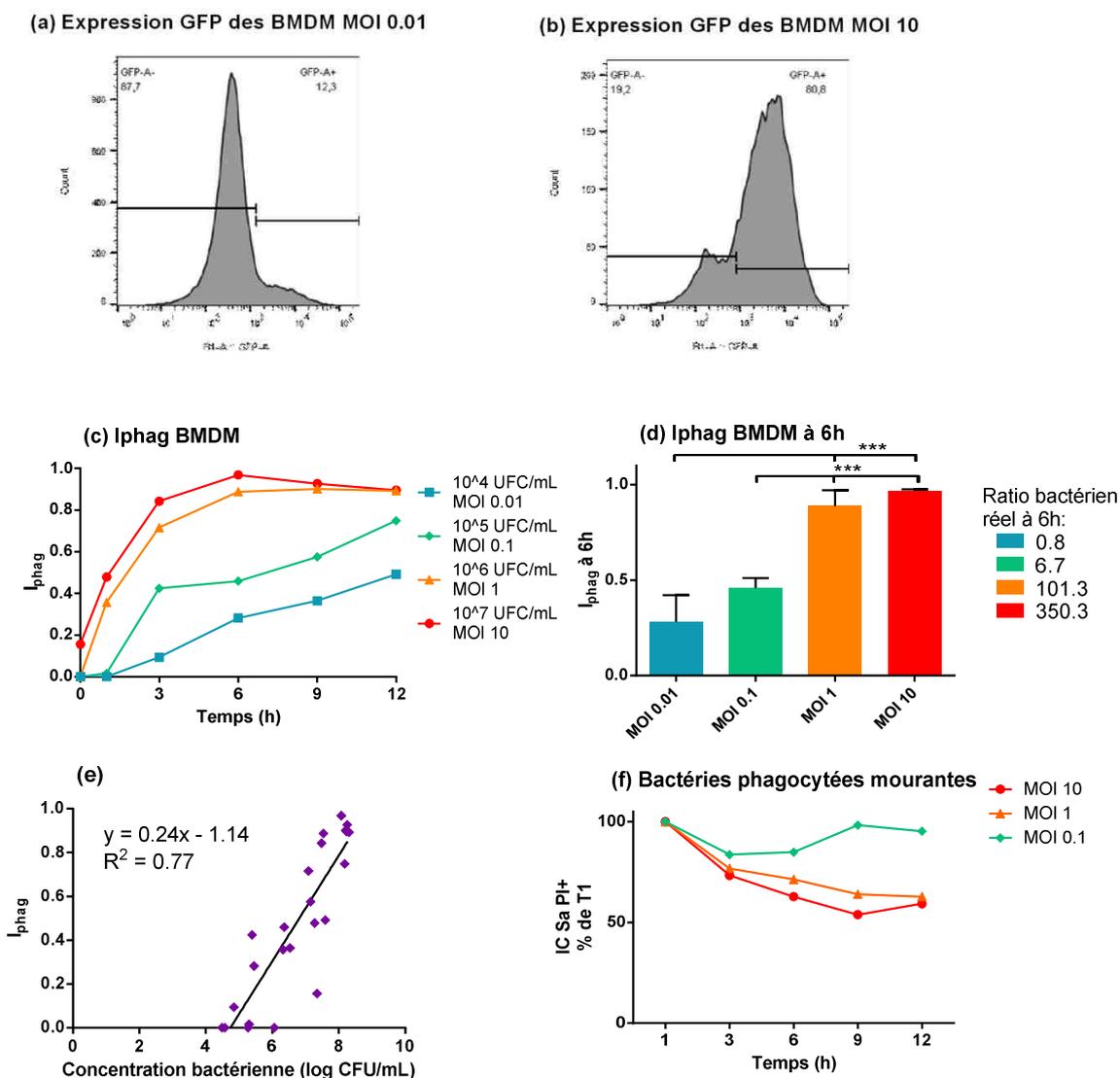


Figure 34 : Représentation de la phagocytose des *S. aureus* GFP par les macrophages au cours du temps. (a,b) Histogrammes de cytométrie de flux représentatifs de l'expression GFP par les macrophages à 6h post infection avec un faible (a) et un gros (b) inoculum bactérien. Les populations GFP- et GFP+ sont séparées. (c) Représentation de l'Iphag au cours du temps suite à une exposition à différents inocula bactériens de *S. aureus* GFP à  $10^6$  macrophages/mL. (d) Valeurs de l'Iphag à 6h post infection. Les MOI initiales sont indiquées sous l'axe et les ratios bactériens réels à 6h sont indiqués en légende. Moyenne $\pm$ SD, \*\*\* $p$ <0.001,  $n=3$ . (e) Corrélation entre Iphag et la concentration bactérienne dans le milieu pour toutes les valeurs sans antibiotique et droite de régression correspondante. (f) Evolution de la mortalité des bactéries intracellulaires avec le temps en fonction de la MOI.

Comme les bactéries vivantes expriment la GFP, les macrophages associés avec ces bactéries, qu'elles soient sur la membrane ou ingérées, étaient positifs en GFP (Figure 34 a et b). Comme l'expression bactérienne de GFP diminue après la mort bactérienne [90], les macrophages contenant des bactéries mortes sont devenus GFP- et PI+ et étaient alors mélangés avec les

macrophages mourants n'ayant pas phagocyté. Ce mélange a été pris en compte lors du calcul de l'index de phagocytose (cf. équation 9).

La phagocytose des *S. aureus* GFP par les macrophages a augmenté de manière significative avec le temps et avec la taille initiale de l'inoculum bactérien (Figure 34 c, d, ANOVA,  $p < 0.001$ ). Avec les plus gros inocula (MOI 1 et 10 respectivement), 72 à 84% des macrophages à 3h post infection et 89 à 97% des macrophages à 6h post infection contenaient des bactéries. Ces résultats démontrent que la capacité maximale de phagocytose des macrophages a rapidement été atteinte avec les charges bactériennes importantes. De plus, la concentration en macrophages dans notre système n'a cessé de diminuer au cours de temps, en raison de leur mortalité intrinsèque, alors qu'ils étaient confrontés à un nombre croissant de bactéries. Cela a naturellement fait augmenter le ratio bactérie/macrophages réel durant les expérimentations. Ainsi, le ratio calculé à 6h était de 101B :1M et 350B :1M pour les MOI 1 et 10, respectivement. Avec des inocula bactériens plus faibles, la proportion de macrophages ayant phagocyté a augmenté progressivement avec le temps, en accord avec l'augmentation progressive de la quantité de bactéries dans le milieu de culture. L'inspection de la figure 34e confirme que la phagocytose des *S. aureus* par les macrophages était directement corrélée avec les concentrations bactériennes dans le surnageant.

L'effet inoculum bactérien sur la capacité des macrophages à tuer les bactéries phagocytées a ensuite été étudié à l'aide de l'index de mortalité des bactéries intracellulaires IC Sa PI+ (figure 34f, équation 10). Cet index n'a pas été calculé pour la MOI 0.01 étant donné le faible nombre de bactéries phagocytées qui aurait pu entraîner un biais d'analyse.

Globalement, la mortalité des *S. aureus* phagocytés a varié significativement avec le temps et les concentrations bactériennes initiales (ANOVA,  $p < 0.01$  et  $p < 0.001$  respectivement). Les valeurs d'IC Sa PI+ sont restées relativement stables pour la plus petite MOI testée (MOI 0.1). Avec les gros inocula (MOI 1 et 10), l'index de mortalité des bactéries intracellulaires IC Sa PI+ a continuellement diminué au cours du temps. La mortalité des bactéries phagocytées à MOI 0.1 a toujours été supérieure à celle des plus fortes MOI, 1 et 10 (valeurs moyennes 90% contre 69 et 62% respectivement), mettant en évidence une meilleure efficacité des macrophages à tuer les bactéries phagocytées en présence de faibles charges bactériennes.

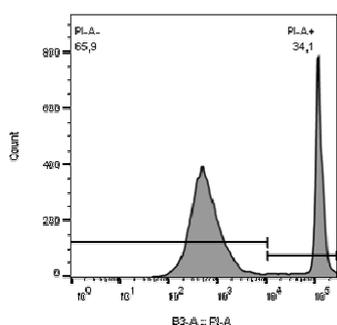
En résumé, nos résultats ont montré que l'effet limité des macrophages à contenir la croissance des bactéries extracellulaires avec des gros inocula bactériens n'est pas lié à une restriction de l'activité phagocytaire mais est probablement lié à une saturation des macrophages par les bactéries.

### 2.3.4.5 La mortalité des macrophages est reliée à la phagocytose bactérienne

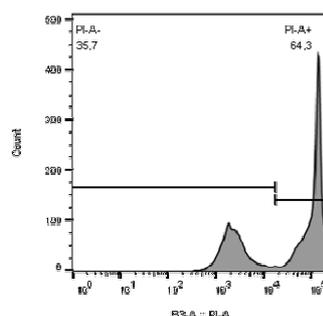
#### bactérienne

La mortalité basale des macrophages, en l'absence de bactérie et d'antibiotique, est restée autour de 30% à tous les temps testés ( $28.8\% \pm 3.7\%$ ).

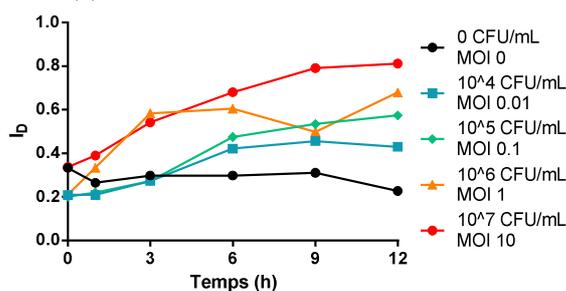
(a) Expression PI des BMDM MOI 0.01



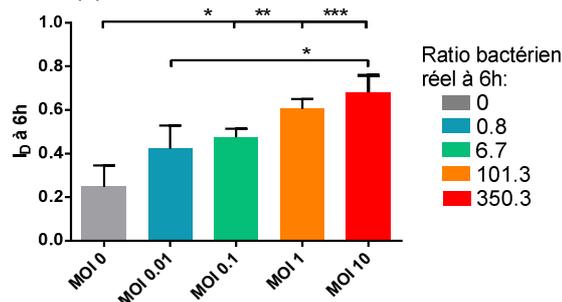
(b) Expression PI des BMDM MOI 10



(c) Id BMDM



(d) Id BMDM à 6h



(e)

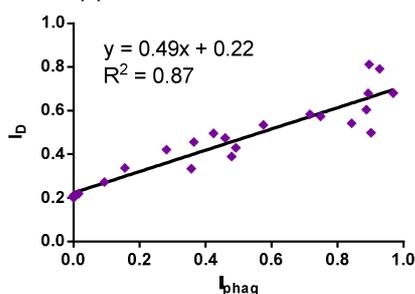


Figure 35 : Représentation de la mortalité des macrophages infectés par *S. aureus* GFP au cours du temps.

(a,b) Histogrammes de cytométrie de flux représentatifs de l'expression PI par les macrophages à 6h post infection avec un faible (a) et un gros (b) inoculum bactérien. Les populations PI- et PI+ sont séparées. (c) Représentation de l' $I_D$  au cours du temps suite à une exposition à différents inocula bactériens de *S. aureus* GFP à  $10^6$  macrophages/mL. (d) Valeurs de l' $I_D$  à 6h post infection. Les MOI initiales sont indiquées sous l'axe et les ratios bactériens réels à 6h sont indiqués en légende. Moyenne  $\pm$  SD, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ,  $n=3$ . (e) Corrélation entre  $I_D$  et  $I_{phag}$  dans le milieu pour toutes les valeurs sans antibiotique et droite de régression correspondante.

Nous nous sommes intéressés à la mortalité des macrophages exposés à *S. aureus* en étudiant l'index de mortalité  $I_D$  (cf. équation 11) grâce à l'analyse au cytomètre de flux de l'absorption de

PI par les macrophages (figure 35 a et b). La mortalité des macrophages a significativement augmenté avec la taille initiale d'inoculum bactérien et avec le temps (ANOVA,  $p < 0.001$ , figure 35 c, d). En présence d'un petit inoculum bactérien (MOI 0.01), le taux de mortalité des macrophages est resté limité et inférieur à 50% alors qu'en présence d'un gros inoculum bactérien (MOI10), la mortalité des macrophages était d'environ 70% dès 6h après début de l'infection avec un ratio bactérien réel de 350B :1M. Ceci confirme que notre système était rapidement saturé en présence d'une charge bactérienne importante.

Une corrélation significative a également été observée entre le degré de phagocytose bactérienne et la mortalité des macrophages (figure 35e).

#### ***2.3.4.6 La présence de céphalexine extracellulaire modifie l'activité des macrophages***

Nous avons ensuite étudié si l'ajout de céphalexine pouvait modifier l'activité des macrophages. La céphalexine a été choisie dans cette étude car elle ne pénètre pas dans les macrophages [120, 121] limitant son action sur les bactéries extracellulaires.

Un potentiel effet cytotoxique de la céphalexine sur les macrophages a cependant été étudié à l'aide de l'index  $I_{Cef}$ . Les valeurs de cet index pour des concentrations de 0 à 256  $\mu\text{g/mL}$  de céphalexine ont été de 1 à 2.6 et l'ANOVA n'a pas indiqué d'augmentation significative de la mortalité des macrophages en présence de céphalexine (ANOVA,  $p > 0.05$ ).

Les courbes de bactéricidie des bactéries du surnageant pour différentes tailles d'inoculum de *S. aureus* GFP exposées ou non aux macrophages et à différentes concentrations de céphalexine sont représentées en figure 36.

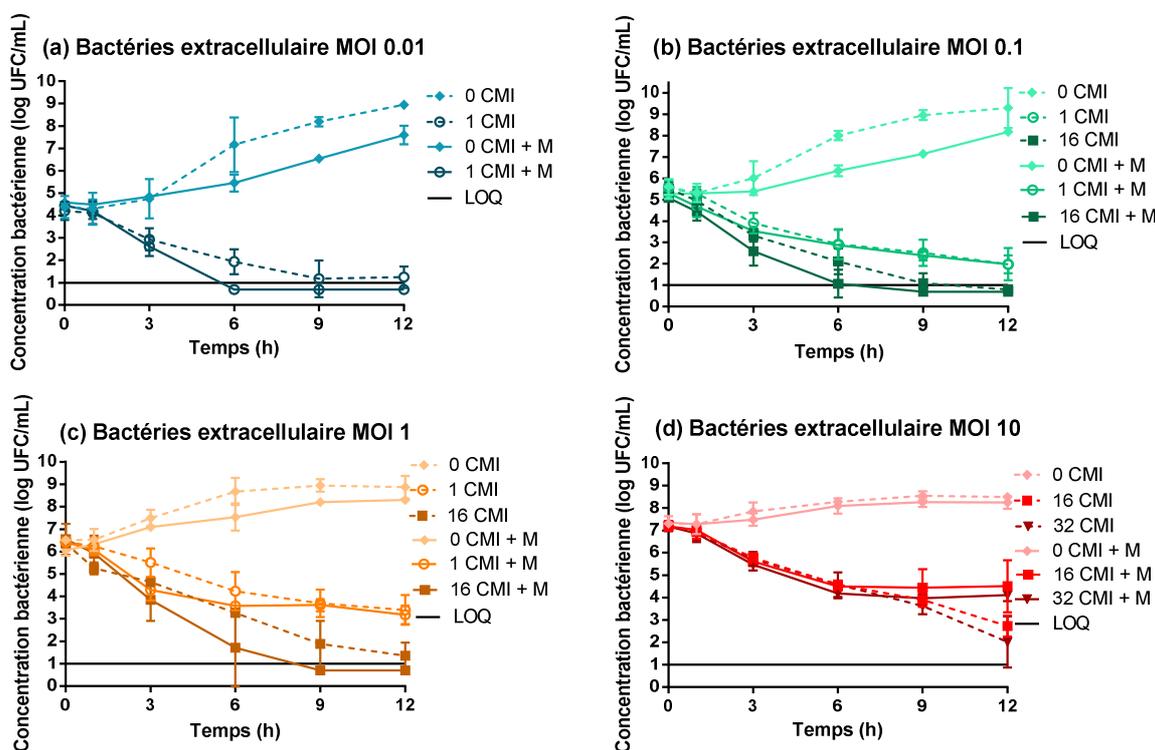


Figure 36 : Courbes de bactéricidie des *S. aureus* GFP extracellulaires en fonction de la concentration en macrophages et en céphalexine. Courbes de bactéricidie de  $10^4$  (a),  $10^5$  (b),  $10^6$  (c) et  $10^7$  (d) UFC/mL de *S. aureus* GFP à différentes concentrations de céphalexine sans macrophages (lignes hachurées) ou avec macrophages (M, lignes continues) à une concentration de  $10^6$  cellules/mL. Les concentrations en céphalexine sont exprimées en multiples de la CMI ( $8\mu\text{g/mL}$ ). Chaque symbole représente la moyenne  $\pm$  SD de 3 expériences, la limite de quantification était de 10 UFC/mL et est représentée par la ligne noire.

Indépendamment de la taille initiale de l'inoculum bactérien, l'activité bactéricide de la céphalexine a augmenté avec le temps et la concentration en antibiotique. Une éradication bactérienne plus rapide a été observée en présence de macrophages dans 2 circonstances : soit avec un petit inoculum bactérien (MOI 0.01) et des concentrations en antibiotique d'une fois la CMI, soit un plus gros inoculum bactérien (MOI 0.1 et 1) et une concentration en antibiotique beaucoup plus importante de 16 fois la CMI.

Ces observations ont été corroborées par l'étude de l'index d'efficacité 6h après le début de l'infection : EF6h (figure 37).

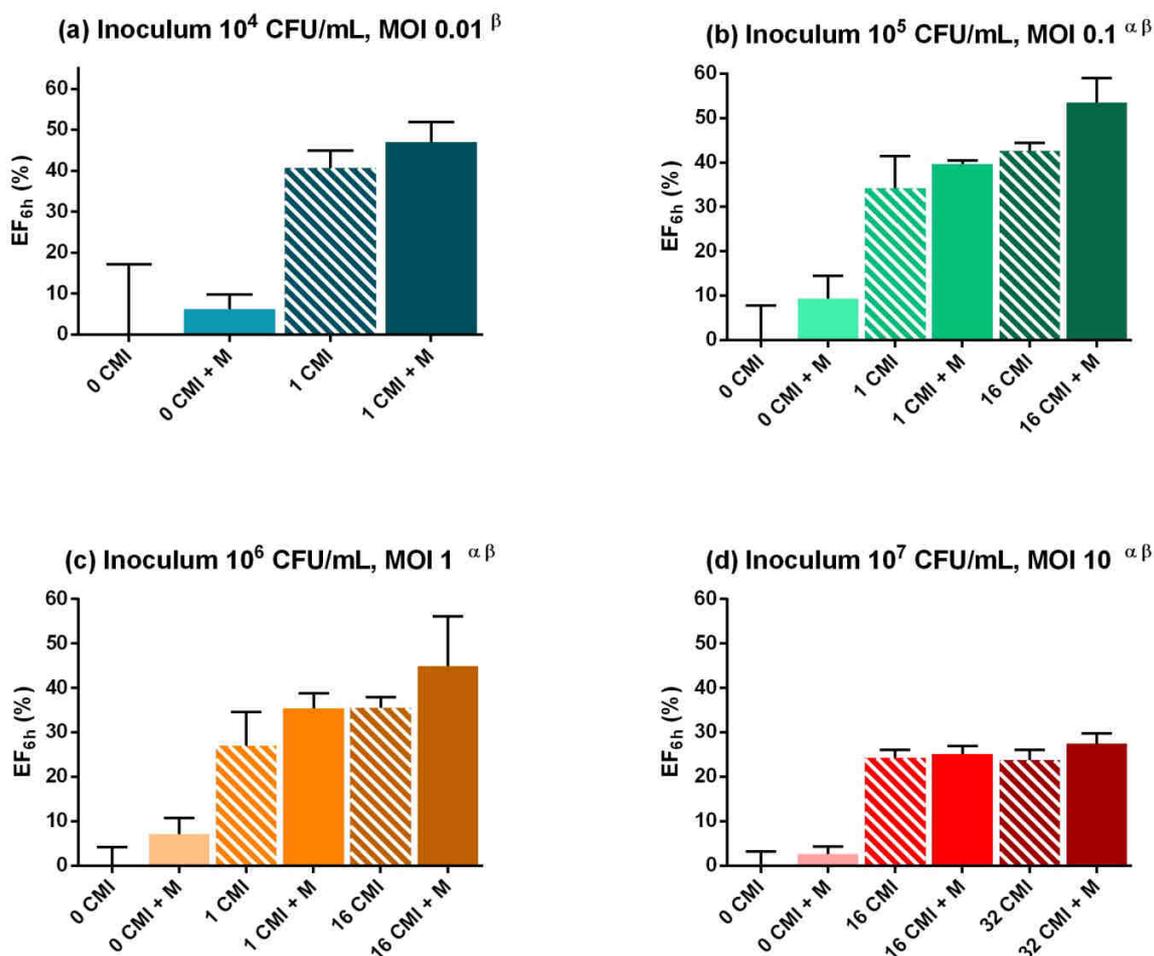


Figure 37 :  $EF_{6h}$  en fonction de la concentration en macrophages, en bactéries et en céphalexine. Index d'efficacité en fonction de la concentration en céphalexine (exprimée en multiples de la CMI) 6 heures après le début de culture d'inocula bactériens croissants de *S. aureus* GFP i.e.  $10^4$  (a),  $10^5$  (b),  $10^6$  (c) and  $10^7$  (d) UFC/mL sans macrophages (barres hachurées) ou avec  $10^6$  macrophages/mL (barres pleines). Moyenne  $\pm$  SD,  $n=3$ .  $\alpha$  indique un effet significatif des macrophages et  $\beta$  un effet significatif de la concentration en céphalexine avec une ANOVA.

L'index d'efficacité  $EF_{6h}$  a été construit afin de décrire l'effet antibactérien de la céphalexine et des macrophages sur les bactéries du surnageant, extracellulaires. Le choix d'une durée de 6h d'incubation pour le calcul de cet index s'explique par une mortalité importante des macrophages après ce délai. Globalement, les macrophages seuls ont plutôt montré un effet bactériostatique, avec un  $EF_{6h}$  sans céphalexine compris entre 6 et 9% pour le MOI de 0.01 à 1. A MOI 10, une faible valeur d' $EF_{6h}$  de 3% a été notée.

Un effet collaboratif a été noté lorsque les macrophages ont été associés à de la céphalexine dans le milieu, l'index d'efficacité augmentant de 2 à 31% ( $15 \pm 9\%$ ) par rapport à une même concentration sans macrophages. Un effet significatif de la céphalexine pour tous les inocula bactériens et un effet significatif de la présence de macrophages pour des MOI de 0.1 à 10 ont

été observés avec l'ANOVA. L'effet des macrophages a été, comme observé précédemment, limité avec la plus forte MOI de 10.

Avec le plus gros inoculum testé (MOI 10,  $10^7$  UFC/mL), des concentrations bactériennes plus importantes ont été observées en présence de macrophages à 9 et 12h post infection par rapport aux concentrations sans macrophages dans le milieu. Ce résultat peut être expliqué par la mort de macrophages infectés à partir de 6h post infection et à la libération de bactéries dans le milieu.

Les implications sur les macrophages de la diminution des concentrations bactériennes dans le milieu en présence de céphalexine ont été étudiées à l'aide des différents index développés précédemment.

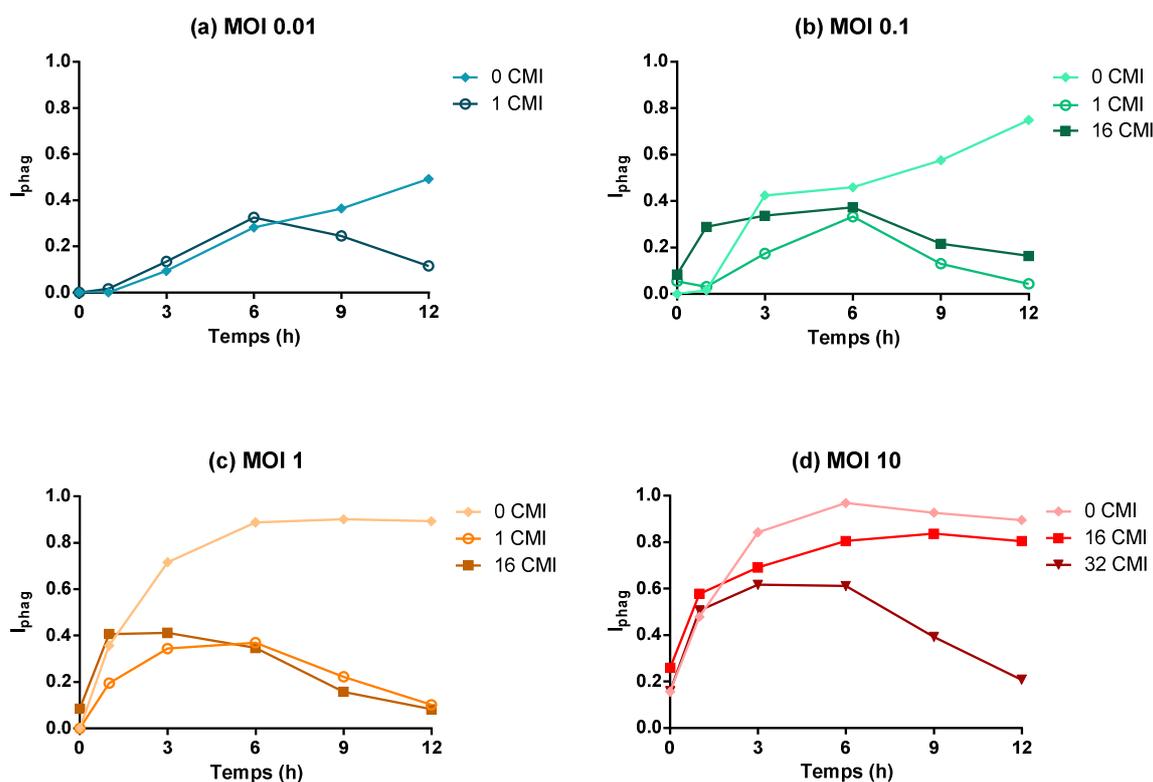


Figure 38 : Représentation de la phagocytose des *S. aureus* GFP par les macrophages avec des concentrations variables en bactéries et en céphalexine.

L'index de phagocytose de différents inocula de *S. aureus*  $10^4$  (a),  $10^5$  (b),  $10^6$  (c) et  $10^7$  (d) UFC/mL par les macrophages à une concentration de  $10^6$  cellules/mL est représenté avec différentes concentrations en céphalexine. Les concentrations en céphalexine sont exprimées en multiples de la CMI (8 $\mu$ g/mL). Chaque symbole représente la moyenne de 3 expériences.

Avec l'ajout de céphalexine, la phagocytose des bactéries par les macrophages caractérisée par l'index  $I_{\text{phag}}$  a augmenté progressivement au cours du temps, atteignant un maximum entre 3 et 6h, avec des valeurs comparables ou inférieures à celles obtenues sans antibiotique (figure 38). La phagocytose en présence d'antibiotique a ensuite diminué et toutes les valeurs d' $I_{\text{phag}}$  avec céphalexine ont été inférieures à celles sans antibiotique pour toutes les MOI. Ces résultats confirment l'action de la céphalexine et la corrélation entre concentration de bactéries dans le milieu et degré de phagocytose. Une exception a été observée avec le plus gros inoculum bactérien (MOI10,  $10^7$  UFC/mL, figure 38d) et une concentration en céphalexine de 16 fois la CMI. Dans cette condition, l'effet de la céphalexine n'est pas apparu clairement alors qu'il était bien visible avec une concentration de 32 fois la CMI.

L'effet de l'ajout de céphalexine dans le surnageant sur la capacité bactéricide des macrophages a été évalué à l'aide de l'index de mortalité des bactéries intracellulaires : IC Sa PI+ (figure 39).

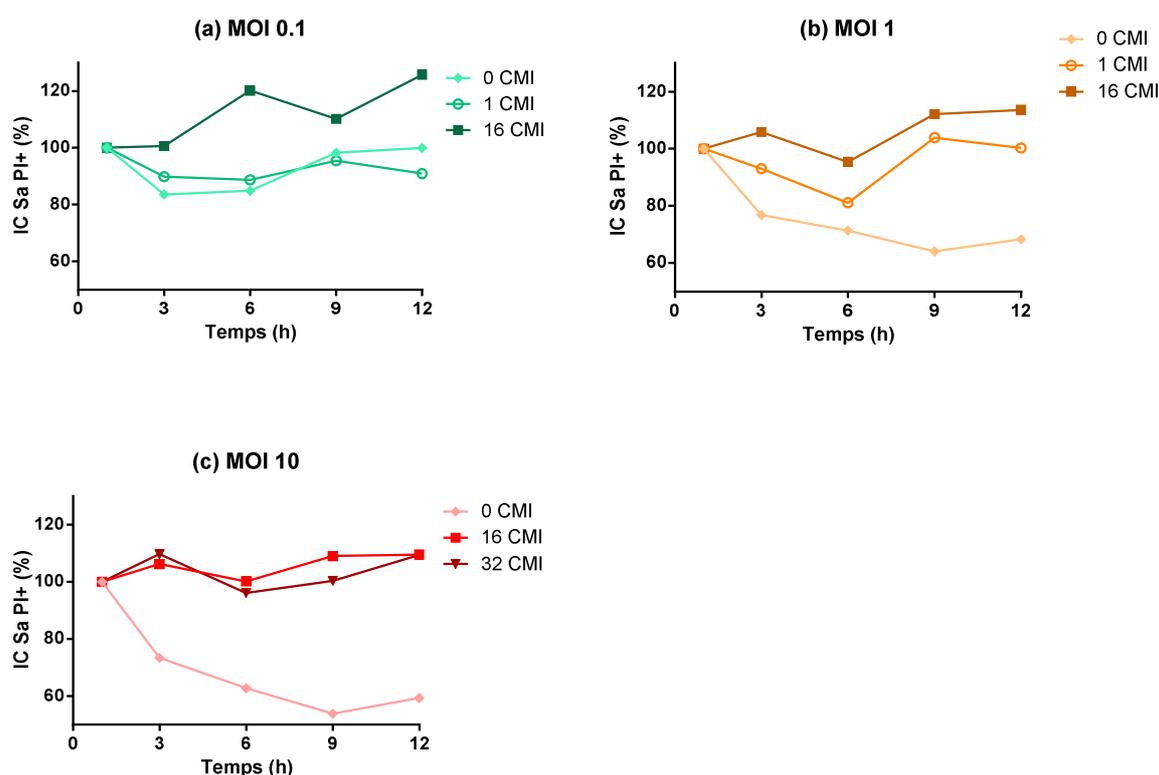


Figure 39 : Evolution de la mortalité des bactéries phagocytées au cours du temps en fonction de l'inoculum initial et de la concentration en céphalexine.

L'index de mortalité des bactéries intracellulaires de différents inocula de *S. aureus*  $10^5$  (a),  $10^6$  (b) et  $10^7$  (c) UFC/mL est représenté avec différentes concentrations en céphalexine. Les concentrations en céphalexine sont exprimées en multiples de la CMI (8 $\mu$ g/mL). Chaque symbole représente la moyenne de 3 expériences.

Les résultats précédents suggèrent un effet positif de la céphalexine sur la phagocytose des bactéries par les macrophages, et cela a été confirmé par l'index de mortalité des bactéries intracellulaires IC Sa PI+ (figure 39). En effet, en présence de céphalexine et quelle que soit la MOI, l'index IC Sa PI+ est resté dans des valeurs autour de 100% confirmant que les macrophages ont conservé leur capacité bactéricide contre les *S. aureus* GFP intracellulaires. La mortalité des bactéries phagocytée était significativement plus importante en présence de céphalexine que sans antibiotique. Cet effet est préservé avec la plus forte MOI de 10. La seule exception a été avec une faible MOI de 0.1 et une concentration en céphalexine d'une fois la CMI (figure 39a).

Nous avons enfin étudié si l'addition d'un antibiotique extracellulaire pouvait avoir une influence sur la mortalité des macrophages par l'étude de l'index de mortalité des macrophages  $I_D$  (figure 40).

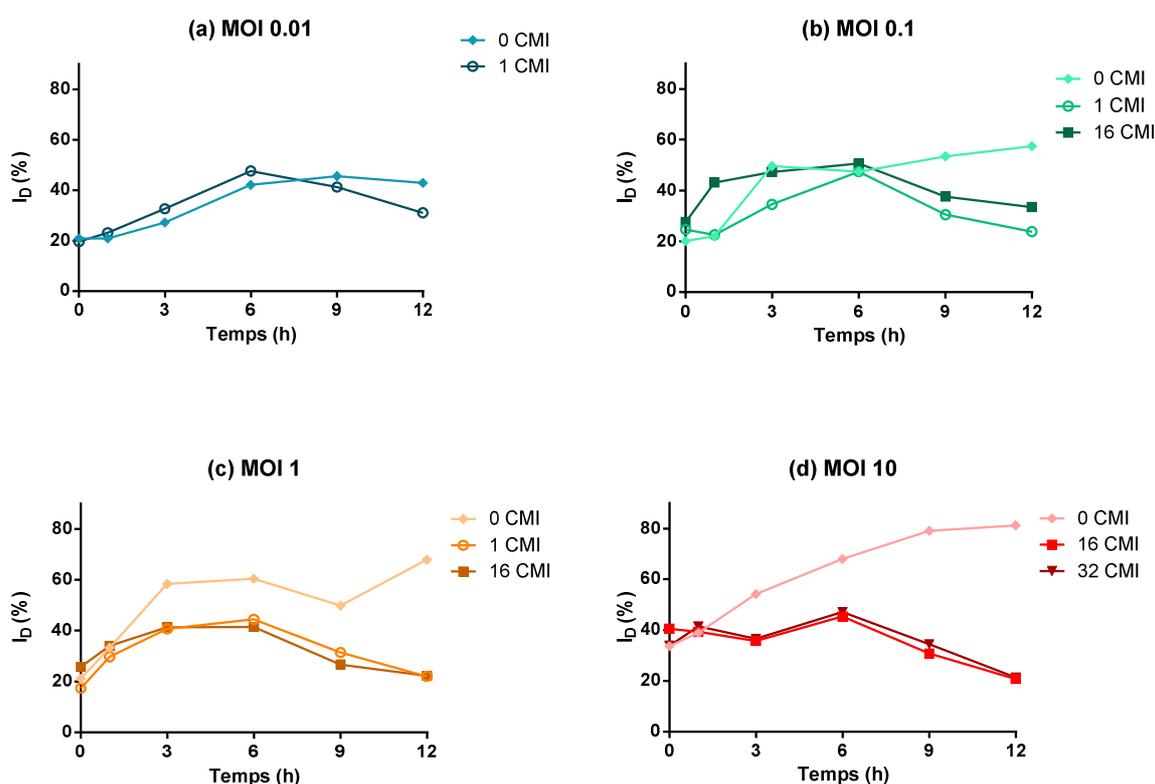


Figure 40 : Evolution de la mortalité des macrophages au cours du temps en fonction de l'inoculum bactérien initial et de la concentration en céphalexine.

L'index de mortalité des macrophages ( $10^6$  cellules/mL) en présence de différents inocula initiaux de *S. aureus*  $10^5$  (a),  $10^6$  (b) et  $10^7$  (c) UFC/mL est représenté avec différentes concentrations en céphalexine. Les concentrations en céphalexine sont exprimées en multiples de la CMI ( $8\mu\text{g/mL}$ ). Chaque symbole représente la moyenne de 3 expériences.

Avec l'ajout de céphalexine au milieu de culture, la mortalité des macrophages était comparable à la mortalité des macrophages sans antibiotique pour les petits inocula (MOI 0.01 et 0.1, figure 40 a, b) et elle était significativement inférieure à la mortalité des macrophages sans antibiotiques en présence de grosses charges bactériennes (MOI 1 et 10, figure 40 c, d). Quelles que soient les conditions d'expérimentation, la mortalité des macrophages en présence de céphalexine n'a jamais excédé 50%. Il est intéressant de noter que la mortalité des macrophages en présence de céphalexine a diminué à partir de 6h après le début de l'infection. Cela peut s'expliquer par le contrôle de la concentration bactérienne dans le milieu par la céphalexine combiné avec la mort des macrophages précédemment infectés qui n'étaient plus détectables après 6h.

### 2.3.4.7 La présence de céphalexine modifie la sécrétion de cytokines

#### inflammatoires par les macrophages

Une des caractéristiques de l'activation des macrophages en présence de bactéries est l'induction d'une forte réaction de la composante inflammatoire consécutive à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Nous avons donc étudié l'influence de la taille de l'inoculum bactérien sur cette sécrétion et si l'addition de céphalexine pouvait la modifier.

Nous avons dans un premier temps caractérisé le profil de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par dosage ELISA en fonction de différentes tailles d'inocula de *S. aureus*. Nous nous sommes focalisés sur 3 cytokines : IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$  à 3 et 6h après le début de l'infection (figure 41).

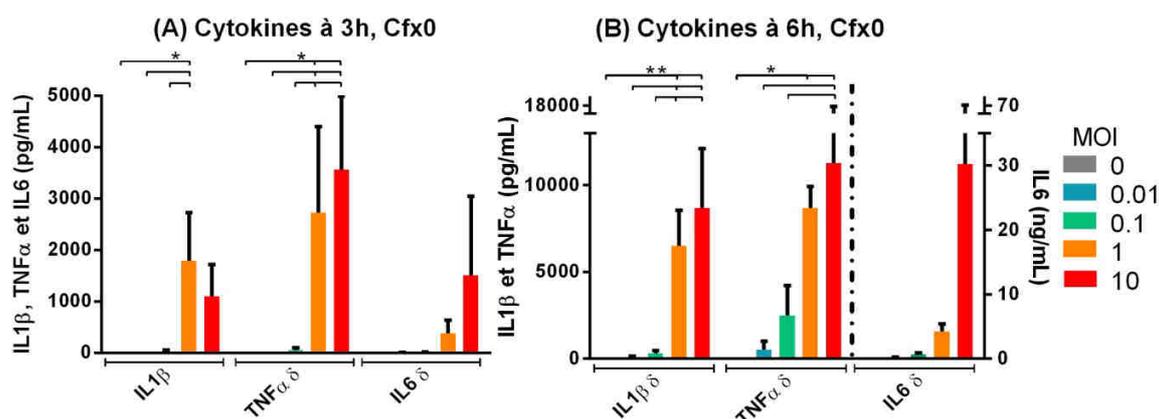


Figure 41 : Profil de sécrétion d'IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  et IL-6 dans le surnageant après 3h (a) ou 6h (b) de co-incubation de BMDM et de 5 différents inocula de *S. aureus*.

En (b), IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  sont représentées en utilisant l'axe de gauche et IL-6 est représentée avec l'axe de droite. Moyenne $\pm$ SD, \* $p$ <0.05,  $n$ =3.  $\delta$  indique un effet significatif de la MOI avec l'ANOVA.

Une augmentation significative des concentrations des 3 cytokines pro-inflammatoires avec l'augmentation des tailles d'inocula a été observée après 3h d'incubation pour IL-6 et TNF- $\alpha$  (ANOVA,  $p=0.003$ ) et après 6h d'incubation pour les 3 cytokines (ANOVA,  $p=0.001$ ,  $p=0.012$  et  $p=0.004$  pour IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$  respectivement). Les petits inocula (MOI 0.01 et 0.1) ont conduit à une production modérée de cytokines contrairement aux gros inocula pour lesquels de fortes concentrations ont été observées. Aucune sécrétion de cytokines n'a pu être détectée en l'absence de bactéries dans le milieu.

Nous avons ensuite vérifié si la présence de céphalexine dans le milieu pouvait entraîner une sécrétion de cytokines par les macrophages en l'absence de bactéries. Notre méthode de dosage ne nous a pas permis de détecter de cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$ ) dans le milieu à 3 et 6h avec des concentrations de 0 et 8 $\mu\text{g/mL}$  (1xCMI) de céphalexine. En présence de 128 $\mu\text{g/mL}$  de céphalexine (16xCMI), les macrophages ont sécrété des quantités d'IL-6 et TNF- $\alpha$  comparables aux valeurs sécrétées avec les faibles MOI à 3 et 6h (124 $\pm$ 59 et 627 $\pm$ 91 pg/mL pour IL6 ; 137 $\pm$ 17 et 257 $\pm$ 53 pg/mL pour TNF- $\alpha$  respectivement). En revanche, avec une concentration de 256 $\mu\text{g/mL}$ , les valeurs d'IL-6 et TNF- $\alpha$  ont été fortement augmentées à 3h et à 6h (2514 $\pm$ 2576 et 29925 $\pm$ 25211 pg/mL pour IL6 ; 1922 $\pm$ 2013 et 3926 $\pm$ 3248 pg/mL pour TNF- $\alpha$  respectivement), révélant un effet de la céphalexine sur les macrophages. Contrairement à IL-6 et TNF- $\alpha$ , aucune sécrétion d'IL-1 $\beta$  n'a pu être détectée dans le milieu quelle que soit la concentration en céphalexine (de 0 à 256  $\mu\text{g/mL}$ ).

L'effet de l'ajout de céphalexine dans le milieu de culture sur la réponse inflammatoire des macrophages a ensuite été étudié avec un gros inoculum (MOI 1) à 3 et 6h (figure 42).

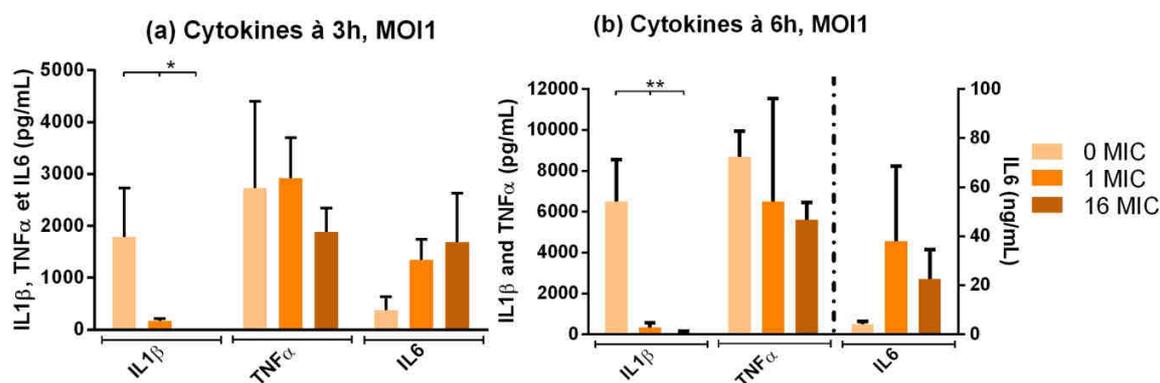


Figure 42 : Profil de sécrétion d'IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  et IL-6 dans le surnageant après 3h (a) ou 6h (b) de co-incubation de BMDM et  $10^6$  UFC/mL de *S. aureus* avec des concentrations différentes en céphalexine.

En (b), IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  sont représentées en utilisant l'axe de gauche et IL6 est représentée avec l'axe de droite. Les concentrations en céphalexine sont exprimées en multiples de la CMI (8 $\mu\text{g/mL}$ ). Moyenne $\pm$ SD, \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ ,  $n=3$ .

Des effets contradictoires ont été observés en fonction des cytokines. Aucun effet significatif n'a été observé pour IL6 et pour TNF- $\alpha$  3h et 6h après le début de l'incubation contrairement à IL-1 $\beta$ . En effet, la présence de céphalexine dans le milieu a significativement diminué voire supprimé la production d'IL-1 $\beta$  dans le milieu ( $p < 0.05$  à 3h et  $p < 0.01$  à 6h). Cela suggère que la céphalexine a un effet indirect sur les macrophages caractérisé par une limitation de leur mortalité (figure 40) et un contrôle spécifique de la synthèse d'IL-1 $\beta$  (figure 42).

### 2.3.5 Discussion

Les objectifs de cette dernière étude étaient de développer un modèle *in vitro* afin de mettre en évidence et de quantifier l'activité bactéricide de macrophages murins issus de la moelle osseuse sur différentes tailles d'inoculum de *S. aureus* ainsi que les effets combinés de la céphalexine. Ce modèle a fourni une preuve *in vitro* de la coopération entre un antibiotique et un composant du système immunitaire ; en effet, l'effet bactéricide de la céphalexine sur les bactéries extracellulaires a préservé les capacités de phagocytose et de bactéricidie des macrophages. Nous avons également démontré que l'effet bactéricide de la céphalexine a été associé avec un effet indirect sur les macrophages, améliorant la survie des macrophages et entraînant une baisse de la synthèse d'IL-1 $\beta$ .

L'utilisation de la cytométrie de flux a permis la mesure simultanée de 2 facteurs au niveau cellulaire au cours du temps, à savoir le pourcentage de macrophages phagocytant des bactéries (soit liées à la membrane soit internalisées) et le taux de survie des macrophages et des bactéries intracellulaires au cours du temps [122]. Nous avons montré que les macrophages étaient capables de limiter la croissance extracellulaire de petits inocula de *S. aureus*. Cependant, cette capacité est limitée, l'effet n'étant pas clairement visible en présence de gros inocula. L'effet bactériostatique des macrophages sur les *S. aureus* extracellulaires a été lié à la phagocytose des bactéries. Cette phagocytose a été directement corrélée avec les concentrations bactériennes dans le milieu de culture et avec le temps, comme déjà rapporté par d'autres auteurs pour *Brucella abortus* [92] et pour *S. aureus* avec d'autres cellules phagocytaires que des BMDM [90, 93]. La surcharge des BMDM par les bactéries a conduit à une diminution de leurs capacités de bactéricidie intracellulaire, conformément aux résultats publiés par Jubrail *et al* avec des macrophages de la lignée THP-1 [93]. Dans un gros inoculum bactérien, les bactéries se divisent peu et atteignent rapidement une phase stationnaire. Il a déjà été démontré un défaut d'efficacité des leucocytes polynucléaires sur des bactéries en phase stationnaire [90], et on peut donc spéculer un effet similaire sur les macrophages. Une

phagocytose augmentée par les macrophages a également été liée à une mortalité augmentée de ces cellules. Somme toute, la capacité limitée de phagocytose, la diminution de l'activité bactéricide sur les bactéries phagocytées et la mortalité augmentée des macrophages expliquent l'absence d'activité des macrophages sur des gros inocula et ont justifié l'association avec un antibiotique afin de contrôler la charge bactérienne.

Des études d'interaction entre bactéries, macrophages et antibiotique ont été rapportées avec des macrophages issus de lignées cellulaires comme J774A.1, RAW264.7, P388D1 and U937 [116, 117, 123, 124]. Cependant la culture continue de ces lignées cellulaires peut être à l'origine d'une perte génétique et de fonctions immunitaires altérées [118]. Des macrophages issus de la moelle osseuse, de la rate ou du péritoine sont donc de plus en plus utilisés. Dans notre étude, nous avons choisi d'utiliser des macrophages issus de la moelle osseuse car une étude a montré que leur capacité de phagocytose était bien plus élevée que celle de macrophages provenant de la rate ou du liquide péritonéal (98% contre 65 et 79% respectivement) [118]. L'utilisation de macrophages issus de la moelle osseuse présente d'autres avantages, notamment la possibilité de les différencier à partir de cellules dendritiques en nombre élevé ainsi que leur homogénéité et leur durée de vie élevée [125]. Cependant, les macrophages issus de la moelle osseuse ne sont pas entièrement caractérisés et ils sont aussi morphologiquement moins matures [118]. L'utilisation de la cytométrie de flux nous a permis de caractériser l'effet de la céphalexine dans ce système au cours du temps. Nous avons montré que la phagocytose des *S. aureus* par les macrophages en présence de cet antibiotique commençait par augmenter, atteignant des valeurs maximales entre 3 et 6h après le début de l'infection, puis diminuait en raison de la mort des bactéries phagocytées et de l'absence de nouvelles bactéries à phagocyter grâce à l'action de la céphalexine dans le milieu de culture. Nous avons ensuite démontré que la céphalexine préservait les capacités de bactéricidie des macrophages sur les bactéries phagocytées. Cet effet positif de la céphalexine peut être relié au fait que l'exposition de *S. aureus* à cet antibiotique conduit à des changements de morphologie bactérienne concentration-dépendants [126]. Des concentrations de l'ordre de 2 à 10 fois la CMI conduisent à la transformation de *S. aureus* en sphéroplaste qui pourrait faciliter la fusion du phagosome avec le lysosome et la lyse bactérienne dans le phagolysosome ainsi formé. A des concentrations de céphalexine de l'ordre de 100µg/mL, *S. aureus* prend une forme de protoplasme qui pourrait expliquer l'effet marquée de l'addition d'une concentration de 16 fois la CMI (i.e. 128µg/mL). Globalement, la présence de céphalexine dans le milieu de culture a permis de diminuer significativement les concentrations bactériennes dans le milieu, en fonction

de la charge bactérienne initiale et des concentrations en antibiotique utilisées. Cela a permis de préserver les capacités de phagocytose et de bactéricidie des macrophages, et cela a également protégé les macrophages d'une mort précoce.

Les interactions qui peuvent exister entre un antibiotique et le système immunitaire dépendent de la molécule utilisée et de sa concentration. Pour les céphalosporines, il a été démontré que des concentrations en céfodizime inférieures à la CMI permettaient d'augmenter l'activité bactéricide de macrophages murins sur *Klebsiella pneumoniae*, alors que des traitements comparables avec du céfotaxime ou de la céfopérazone, qui sont également des céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, n'ont pas eu d'effet positif voire ont conduit à un échec du traitement [117]. Une autre étude a montré une amélioration de la phagocytose de *S. aureus* par des macrophages en présence d'une concentration en ceftriaxone faible de l'ordre de la moitié de la CMI [127]. Une étude a montré que l'activité bactéricide de la céphalexine sur les *S. aureus* intracellulaires augmentait avec la concentration en antibiotiques [123], comme confirmé par nos résultats, bien que la céphalexine pénètre très peu dans le cytosol [120, 121]. En utilisant un modèle murin de péritonite, Sandberg *et al.* ont montré que le céfuroxime a une activité à la fois sur les *S. aureus* extracellulaires et sur ceux contenus dans les cellules issues du lavage péritonéal même si les bêtalactamines ne s'accumulent pas dans ces cellules [128]. Ces résultats confirment que l'accumulation ou non d'un antibiotique à l'intérieur d'une cellule ne peut pas être utilisée comme un indicateur univoque d'une activité intracellulaire, comme on le pensait précédemment [129]. Certains antibiotiques peuvent être toxiques pour les cellules et nous avons donc confirmé que la céphalexine n'avait pas d'effet délétère marqué sur la viabilité des macrophages utilisés dans notre étude, afin de faciliter l'interprétation de nos résultats. Les différences d'action observées sur les cellules immunitaires en fonction des antibiotiques au sein d'une même famille ne sont pas clairement expliquées mais elles impliquent que les interactions entre un antibiotique et un type de cellule du système immunitaire soient documentées au cas par cas et qu'aucune généralisation de classe n'est possible.

Avec le plus gros inoculum testé (MOI 10,  $10^7$  UFC/mL), des concentrations bactériennes plus importantes en *S. aureus* dans le milieu ont paradoxalement été observées en présence de macrophages à 9 et 12h post infection par rapport aux concentrations sans macrophages dans le milieu. Cela peut être expliqué par la mort des macrophages avant ces temps tardifs face à une infection massive et la libération subséquente de bactéries encore vivantes dans le milieu, comme décrit précédemment par Jubrail *et al.* [93]. En effet, les staphylocoques ont la capacité de survivre dans les cellules des mammifères [90, 91, 93, 94] y compris dans les macrophages dans lesquels ils peuvent se multiplier dans le phagosome ou dans le cytoplasme, protégés des

défenses immunitaires de l'hôte et de certains antibiotiques extracellulaires [70, 94]. Nos résultats corroborent le fait que les macrophages peuvent potentiellement représenter un refuge pour *S. aureus* au cours d'une infection staphylococcique.

La réponse inflammatoire induite par *S. aureus* a été caractérisée par une augmentation significative de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$  par les BMDM. Cette sécrétion a été directement liée à la charge bactérienne et a augmenté avec cette dernière. Cet effet de la taille d'inoculum sur la production de cytokines inflammatoires par les BMDM est lié à ce qui est observable *in vivo*. En effet, il est bien connu qu'un des risques principaux associés à une infection staphylococcique systémique est le choc septique, qui est consécutif à un « orage cytokinique » [60]. Il a été démontré que ces 3 cytokines pro-inflammatoires agissent en synergie et amplifient la boucle d'inflammation, provoquant au final un choc septique. TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  sont sécrétées par les macrophages peu de temps après l'élément déclencheur. Elles agissent en synergie et entraînent une hyperthermie et l'induction du choc septique via une perméabilité vasculaire augmentée, une hémorragie et le développement d'un œdème pulmonaire sévère [130]. Ensuite, la sécrétion en IL6 augmente et les concentrations plasmatiques restent élevées pendant la survenue des défaillances multiples d'organes et du choc septique [131]. De plus, il est reconnu qu'au-delà de l'orage cytokinique, si une inflammation n'est pas contrôlée, la réponse immunitaire prolongée en découlant peut provoquer de sérieux dommages chez l'organisme hôte. Le contrôle ou la limitation de l'inflammation est par conséquent un enjeu majeur lors de la réponse immunitaire.

Nous avons montré que la diminution de la charge bactérienne dans le milieu provoquée par la céphalexine ne modifiait pas significativement la synthèse d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  par les BMDM. *S. aureus* et ses peptidoglycanes sont reconnus par la molécule dimérique TLR2-TLR6 située à la surface de la cellule et par NOD2 dans le cytosol. Cette reconnaissance entraîne l'activation de voies de signalisation comme NF- $\kappa$  B et MAPKs, induisant alors la production de cytokines pro-inflammatoires comme IL-6 et TNF- $\alpha$  par les cellules du système immunitaire inné [132]. Nous pouvons par conséquent supposer que la diminution de la charge bactérienne dans le milieu provoquée par la céphalexine ne modifie pas significativement la signalisation via les TLR, des peptidoglycanes bactériens étant toujours présents dans le milieu et reconnus par les macrophages. A l'opposé, nous avons observé une abolition quasi complète de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par les BMDM en présence de concentrations en céphalexine dans le milieu comparable à des concentrations thérapeutiques (1xCMI). La sécrétion d'IL-1 $\beta$  requiert une protéase propre, la caspase-1, qui est activée par l'inflammasome. L'inflammasome est une multiprotéine

oligomérique contenant caspase-1, la protéine adaptatrice ASC et des protéines détectrices NLR. L'activation de cet inflammasome est nécessaire dans le cadre de plusieurs processus inflammatoires et cette activation nécessite généralement 2 signaux séparés. Le premier signal est l'activation de NF- $\kappa$  B, souvent via des signaux comme ceux transmis par les TLR, le second signal pouvant être un signal de danger ou une forme de stress cellulaire [59]. Une activation excessive de l'inflammasome conduit à une mort rapide des macrophages appelée la pyroptose [133]. Dans notre modèle, l'inhibition de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  parallèlement à la prévention de la mortalité des macrophages suggèrent que la céphalexine préviendrait l'activation de la voie de l'inflammasome et donc la pyroptose des BMDM liée à une infection par *S. aureus*. Il a déjà été montré que la mort par pyroptose de macrophages péritonéaux suite à une infection staphylococcique entraînait une mort rapide des souris [16]. De plus, plusieurs anti-inflammatoires ont démontré un rôle protecteur lors d'infection bactérienne par l'intermédiaire d'un blocage de la voie d'activation de l'inflammation et de la synthèse d'IL-1 $\beta$  [58, 134, 135]. Il est donc probable que la céphalexine, en plus de son activité bactéricide, ait un effet bénéfique indirect sur l'issue d'une infection en limitant l'activation de l'inflammasome.

Le modèle *in vitro* développé dans cette étude a permis une description quantitative des interactions entre des BMDM, *S. aureus* et la céphalexine au cours du temps. Ce modèle pourrait être utilisé afin d'étudier en détail les interactions entre les 3 parties en présence lors d'une infection bactérienne. Ce modèle a également démontré un effet inattendu : nous avons démontré pour la première fois que la céphalexine, un antibiotique bactéricide extracellulaire, exerce un effet bénéfique indirect sur les macrophages en les protégeant de la pyroptose. Des études complémentaires *in vivo* sont nécessaires afin de confirmer le rôle de cette observation sur l'issue clinique d'une infection.

### 2.3.6 Article

**A new *in vitro* model demonstrates that a cephalosporin regulates IL-1 $\beta$  synthesis and macrophage cell death induced by *Staphylococcus aureus*. (soumis)**

Lallemand EA, Ferran AA, Zemirline C, Toutain P-L, Bousquet-Mélou A & Boullier S

*Soumis dans Frontiers in cellular and infection microbiology.*

1 **A new *in vitro* model demonstrates that a cephalosporin regulates IL-1 $\beta$**   
2 **synthesis and macrophage cell death induced by *Staphylococcus aureus*.**

3 **Running title: *S.aureus* bactericidal model with macrophages**

4 **Elodie Anne LALLEMAND<sup>1\*</sup>, Aude Agnès FERRAN<sup>1</sup>, Claudine ZEMIRLINE<sup>2</sup>, Pierre-Louis**  
5 **TOUTAIN<sup>1</sup>, Alain BOUSQUET-MELOU<sup>1</sup>, Séverine BOULLIER<sup>3</sup>.**

6 <sup>1</sup>TOXALIM, Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

7 <sup>2</sup>Campus Ceva-Sogeval, Laval, France

8 200 Avenue de Mayenne, F-53 022 Laval, France

9 <sup>3</sup>Université de Toulouse, ENVT, Toulouse, France

10 23 chemin des Capelles, F-31076 Toulouse, France.

11

12

13 **\* Correspondence:**  
14 **Elodie Anne Lallemand**  
15 **[e.lallemand@envt.fr](mailto:e.lallemand@envt.fr)**

16

17

18 Number of words: 5032

19 Number of figures/tables: 6

20

21

22 **Keywords: macrophages, *Staphylococcus aureus*, cephalixin, cytokine, inflammasome,**  
23 **phagocyte, antimicrobial.**

24

25

26 **Abstract**

27 Concern over the emergence of multidrug-resistant *S. aureus* strains has renewed interest in  
28 elucidating host defense mechanisms and in studying its interaction with antimicrobial drugs. Given  
29 the evidences that one of the first steps in the control of infection is the activation of macrophages by  
30 bacteria, we chose to develop an *in vitro* model of C57Bl/6 murine bone marrow derived  
31 macrophages (BMDM) infection with GFP-*S. aureus*, with or without an extracellular bactericidal  
32 drug, cephalexin. We set up a method for the simultaneous monitoring of bacteria, macrophages and  
33 pro-inflammatory cytokines production. Variation of the initial bacterial inoculum size revealed that  
34 macrophages have a finite capacity to counteract extracellular bacterial growth and that increasing  
35 bacterial load led to BMDM overload and mortality. We showed that the inflammatory response of  
36 macrophages induced by *S. aureus* was characterized by a significantly increased secretion of the  
37 pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  directly related to the bacterial inoculum size.  
38 The presence of cephalexin in the culture medium led to a significant decline of extracellular  
39 bacterial concentrations, depending on initial bacterial and antibiotic concentrations. This reduction  
40 of bacterial load positively influenced GFP-*S. aureus* phagocytosis by macrophages: it preserved  
41 intracellular bacterial killing ability of macrophages and limited macrophages mortality. The  
42 reduction of bacterial load by cephalexin had no impact on IL-6 and TNF- $\alpha$  secretion by  
43 macrophages. On the opposite, we observed an almost complete abolition of IL-1 $\beta$  synthesis by  
44 BMDM in the presence of a therapeutic concentration of cephalexin. These results brought closer to  
45 the prevention of death mortality strongly suggest that cephalexin would prevent inflammasome  
46 activation pathway and thus pyroptosis induced by *S. aureus* infection. It is thus possible that  
47 cephalexin, in addition to bacterial killing, has an indirect beneficial effect on bacterial infection  
48 outcome, by controlling the activation of inflammasome. Altogether, our model offers relevant  
49 opportunities for the study of antimicrobial drug-macrophages interactions.

50

## ***S.aureus* bactericidal model with macrophages**

51

### 52 **1 Introduction**

53 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), a Gram-positive bacterium, is a major human and veterinary  
54 pathogen causing significant morbidity and mortality. It causes a diverse array of infections ranging  
55 from relatively minor skin and wound infections to more serious and life-threatening diseases such as  
56 pneumonia, endocarditis, osteomyelitis, arthritis, and sepsis (1). Concern over the emergence of  
57 multidrug-resistant *S. aureus* strains has renewed interest in understanding the virulence mechanisms  
58 of this pathogen and in elucidating host defense mechanisms that either provide protection from or  
59 limit infection (2). When bacteria infect a host, the innate immune system, especially macrophages  
60 and neutrophils, initiates a sequence of events that results in the activation of  
61 macrophages/monocytes, the production and secretion of a wide range of inflammatory cytokines and  
62 chemokines and the initiation of adaptive immunity. Among innate immunity actors, macrophages  
63 are now known to be the primary host defense cells in all animals. Resident macrophages are key  
64 sentinels and orchestrators of the inflammatory response against invading pathogens (3). Interaction  
65 occurring *in vitro* between *S. aureus* and macrophages has been increasingly studied, as macrophages  
66 represent both a way of control of infection and a possible source for reinfection (4). Most studies  
67 focused on the molecular mechanisms of this interaction (5, 6), while only few studies have focused  
68 on the quantitative assessment of the *S. aureus*/macrophages interaction and on the effect of the size  
69 of the bacterial inoculum on this interaction (2). Other major players in the battle against bacteria are  
70 antimicrobials drugs.

71 Given the evidences that one of the first steps in the control of infection is the activation of  
72 macrophages by bacteria, the development of an *in vitro* cellular model to investigate the overall  
73 interactions involving bacteria and phagocytes, with the possibility to add an antimicrobial drug,  
74 constitutes a considerable improvement. Very few studies have been focused on the tripartite  
75 interaction occurring between a bacterium, macrophages and an antimicrobial drug over time. Some  
76 previously published articles reported interactions with macrophages derived from cell lines (7, 8) or  
77 primary macrophages (9). Here we used macrophages derived from murine bone marrow.

78 The aim of the present study was to investigate the interactions between bone marrow derived murine  
79 macrophages (BMDM) and varying burden of *Staphylococcus aureus* together with the influence of a  
80 first-generation cephalosporin on these interactions. We developed an *in vitro* model to set-up a  
81 method for the simultaneous monitoring of the kinetics of extracellular bacteria, the time-  
82 development of the proportion of macrophages associated with bacteria and the quantification of  
83 bacterial and macrophages survival.

### 84 **2 Material and methods**

#### 85 **2.1 Bacterial strain and culture condition**

86 A  $\beta$ -lactamase negative, methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* HG001 strain expressing  
87 green fluorescent protein (GFP- *S. aureus*) was used to detect living bacteria. Minimal inhibitory  
88 concentration (MIC) was determined by standard broth microdilution method in Mueller Hinton  
89 broth (10) and in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 media +10% fetal calf serum  
90 (cRPMI). Bacteria were incubated aerobically overnight in Mueller Hinton broth at 37°C. This  
91 culture was further diluted 1:100 in RPMI1640+5% fetal calf serum and grown for 210min at 200g  
92 and 37°C. The bacterial cells were washed twice and suspended in NaCl 0.9% before concentration  
93 adjustment.

94 **2.2 Isolation and differentiation of murine bone-marrow-derived macrophages**

95 Female, 9-week-old, C57BL/6JRj mice were obtained from Janvier Labs (Saint Berthevin, France).  
96 Experiments were conducted in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory*  
97 *Animals* as adopted and promulgated by the US National Institutes of Health and under the  
98 agreement n° 02560.01 for animal experimentation from the French Ministry of Agriculture. Bone  
99 marrow cell suspensions were isolated by flushing femurs and tibias with RPMI1640 with HEPES and  
100 Glutamax I. Aggregates were dissociated by gentle pipetting, filtered and erythroid cells were lysed.  
101 Cell concentrations were adjusted to obtain a suspension of  $1.7 \times 10^5$  cells/mL in medium containing  
102 63% RPMI1640, 27% DMEM, 10% 56°C heat-inactivated fetal calf serum and colony stimulating  
103 factor 1 (CSF-1). Cells were seeded on Petri plates and cultured at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>, for 6 days. On  
104 day 6, they were washed twice with cold Hanks' Balanced Salt solution (HBSS) and then incubated  
105 with HBSS + EDTA 5mM for 10min at 37°C. Adherent cells were harvested and washed twice with  
106 RPMI. The concentration was adjusted to give a suspension of  $10^6$  cells/mL in cRPMI. Murine bone  
107 marrow derived macrophages (BMDM) were plated in culture-treated 24-well plates at a density of  
108  $5 \times 10^5$  cells in 500µL of cRPMI and incubated overnight at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> to allow adherence.  
109 Macrophage phenotype and purity was confirmed by flow cytometry but a negligible percentage  
110 (<5%) of cells other than macrophages, such as monocytes or dendritic cells, were also present in our  
111 experiments (data not shown).

112 **2.3 Antimicrobial drug**

113 Cephalexin hydrate with purity > 90% was purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). Stock  
114 solutions at 10mg/mL were filtered and stored at -20°C for less than 3 months.

115 **2.4 Extracellular bacteria time-kill experiments**

116 Time-kill experiments of bacteria in the culture media were conducted in the presence ( $10^6$  cells/mL)  
117 or absence of macrophages in 500µL of cRPMI. GFP-*S. aureus* was adjusted to obtain an initial  
118 multiplicity of infection (MOI) i.e. ratios of bacteria to macrophages of 0.01, 0.1, 1 and 10. The  
119 corresponding bacterial inoculum sizes were  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  and  $10^7$  colony-forming units (CFU)/mL.  
120 In experiments with antibiotic, 50 µL of cephalexin were added simultaneously to obtain various  
121 multiples of the MIC, as indicated in the figures. Otherwise 50µL of media without antibiotic were  
122 added.

123 Triplicates of each condition were made on each plate, with one plate corresponding to one sampling  
124 time. At each time point, the culture supernatants were harvested and the triplicates were pooled.  
125 Aliquots of 100µL were used to determine the bacterial counts by plating in triplicate on tryptic soy  
126 agar supplemented with magnesium sulphate and activated charcoal (to prevent antimicrobial drug  
127 carry-over effects). The limit of quantification (LOQ) was at 10 CFU/mL. The bacteria were  
128 considered eradicated below the LOQ. Each experiment was repeated independently at least 3 times.

129 **2.5 Extracellular bacteria monitoring computation**

130 The growth of GFP-*S. aureus* in the culture medium related to time and to different bacterial and  
131 macrophage initial concentrations without antibiotic was quantified by a growth index EC Sa. EC Sa  
132 expressed the actual bacterial inoculum size at 3, 6 or 12h as a percentage of the initial bacterial  
133 inoculum size. A value over 100 meant bacterial growth.

134 **2.6 Macrophages and GFP-*S. aureus* flow cytometry analysis**

## ***S.aureus* bactericidal model with macrophages**

135 After the removal of culture supernatant, the macrophages were washed with 500 $\mu$ L of HBSS. Five  
136 hundred microliters of HBSS containing EDTA 5mM were then added to each well and after orbital  
137 shaking at 37°C, 100g during 10 minutes, macrophages were harvested and washed again with  
138 HBSS. Two thirds of this BMDM solution was used to assess macrophages viability and  
139 phagocytosis. Macrophages viability was assessed by labelling them with propidium-iodide (PI,  
140 Biolegend, Ozyme, France) which is an intercalating agent and a fluorescent molecule used to detect  
141 necrotic cells and allows differentiation from viable cells. The phagocytosis of GFP-*S. aureus* by  
142 macrophages was assessed by quantifying GFP expression of macrophages by flow cytometry.

143 The remaining third of the BMDM solution was used to study viability of intracellular bacteria.  
144 Macrophages were lysed with ultrafiltrated water during 15min, bacteria were washed and stained  
145 with PI in order to assess their viability.

146 Cell numbers were determined by a flow cytometry absolute counting system (MACSQuant  
147 Analyzer, Miltenyi Biotec, Germany). A constant volume of 100 $\mu$ L was used for each analysis. Data  
148 were analyzed with FlowJo software (Tree Star, USA).

### **149 2.7 Flow cytometry computations**

#### **150 2.7.1 Effect of cephalexin on macrophages**

151 Macrophages were cultured for 12h with cephalexin concentrations ranging from 0 to 128 $\mu$ g/mL.  
152 The possible cytotoxic effect of cephalexin on macrophages was quantified by calculating the  $I_C$   
153 index.  $I_C$  expressed the actual proportion of dying macrophages at the different times post infection  
154 with a given cephalexin concentration as a fraction of the actual proportion of dying macrophages at  
155 the same time without cephalexin.

#### **156 2.7.2 Quantification of phagocytosis of *S. aureus* by macrophages**

157 The phagocytosis of GFP-*S. aureus* by macrophages at different times post infection was expressed  
158 by a phagocytosis index  $I_{phag}$ . This  $I_{phag}$  index expressed all macrophages that had engulfed bacteria  
159 as a fraction of all macrophages at the same time in similar experimental conditions. Macrophages  
160 that had engulfed bacteria included alive and dying macrophages containing alive bacteria and  
161 macrophages containing dead bacteria (no longer expressing GFP (11)).

#### **162 2.7.3 Bacterial viability after phagocytosis**

163 Bacterial mortality of intracellular (IC) *S. aureus* after phagocytosis by macrophages was quantified  
164 after macrophages lysis and flow cytometry of resulting bacteria by an IC Sa PI+ index. IC Sa PI+  
165 expressed the actual proportion of dying intracellular bacteria at the different time post infection as a  
166 percentage of the proportion of dying intracellular bacteria 1h after infection in the same  
167 experimental conditions. A value over 100 meant a better bactericidal effect of macrophages on  
168 intracellular *S. aureus* compared to 1h post infection.

#### **169 2.7.4 Mortality of macrophages**

170 The extent of macrophage mortality related to different bacteria and cephalexin concentrations was  
171 quantified by a mortality index  $I_D$ . It expressed the proportion of dying macrophages on the total  
172 number of macrophages at the same time and in similar experimental conditions.

### **173 2.8 Secretion of inflammatory cytokines by macrophages**

174 Quantification of cytokine production was achieved using individual cytokine detection kits  
175 (BioLegend Mouse ELISA, San Diego, CA) in accordance with supplier instructions. Three  
176 inflammatory cytokines, IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ , were assayed in the supernatant after 6h of contact  
177 between macrophages, different MOI of *S. aureus* and with or without cephalixin. Supernatants were  
178 stored at -80°C before dosages.

## 179 **2.9 Statistical analysis**

180 All data are expressed as mean  $\pm$  S.D. unless otherwise specified and all experiments were repeated  
181 independently at least 3 times. A repeated-measures 2-ways analysis of variance (ANOVA) followed  
182 by Tukey tests were employed for statistical comparisons of the EC Sa index, flow cytometry indexes  
183 and the cytokines measurements.

184 A P value less than 0.05 was considered significant. All statistical analyses were performed using R  
185 software (version 3.1.2).

## 186 **3 Results**

### 187 **3.1 Macrophages have a finite capacity to prevent extracellular bacterial growth**

188 We first checked whether macrophages exposed to different bacterial inoculum sizes could  
189 efficiently control extracellular bacterial growth. The culture of different inoculum sizes of GFP-*S.*  
190 *aureus* from 10<sup>4</sup> to 10<sup>7</sup> CFU/mL exposed or not to 10<sup>6</sup> macrophages/mL (*i.e.* MOI 0.01 to 10) led to  
191 differential growth of bacteria in the culture media (Figure 1). The growth of extracellular bacteria  
192 inoculum was significantly decreased by the presence of macrophages for the lowest MOIs of 0.01  
193 and 0.1 at 6 h post infection and for MOI 0.01 at 12h post infection. This bacteriostatic effect of  
194 macrophages was no longer detectable at the highest MOI (1 and 10), suggesting a saturation of  
195 macrophages with high inoculum sizes.

### 196 **3.2 GFP-*S. aureus* phagocytosis and killing by macrophages vary with MOI and time**

197 We then checked whether this saturable anti-bacterial effect of macrophages on extracellular bacteria  
198 was associated with an altered phagocytic capacity of macrophages (Figure 2). After flow cytometry  
199 analysis of GFP expression by infected macrophages (Figure 2a, b), the phagocytic capacity of  
200 macrophages was quantified by the phagocytosis index, I<sub>phag</sub> (Figure 2c, d, e).

201 Phagocytosis of GFP-expressing *S. aureus* by macrophages increased significantly with time and  
202 with bacterial inoculum size (Figure 2c, d) (ANOVA p<0.001). With the largest inocula (MOI 1 and  
203 10), 72 to 84% of macrophages at 3h post-infection and 89 to 97% of macrophages at 6h post-  
204 infection contained phagocytosed bacteria, respectively (Figure 2c). These results indicate that the  
205 phagocytosis capacity of macrophages was rapidly maximal with high MOI. In addition, BMDM,  
206 whose concentration is diminishing with time due to intrinsic mortality within our system, were  
207 gradually challenged with an increasing number of bacteria (due to natural bacterial growth observed  
208 in tested conditions), increasing the ratio of bacteria/macrophages during the experiment.  
209 Consequently, the estimated bacterial ratio at 6h were MOI=101 and MOI=350 for initial MOI 1 and  
210 10 respectively (Figure 2d). With smaller bacterial inoculum sizes (MOI 0.01 and 0.1), the proportion  
211 of phagocytosing macrophages increased slowly over time, in accordance with the growing bacterial  
212 population in the culture medium (Figure 2c, d). Figure 2e shows that phagocytosis of GFP-*S. aureus*  
213 by macrophages was directly correlated to bacterial concentration in the culture medium.

## ***S.aureus* bactericidal model with macrophages**

214 The effect of bacterial inoculum load on macrophages killing capacity was then assessed with the  
215 intracellular *S. aureus* dying index (IC Sa PI+, Figure 2f). Values obtained for MOI 0.01 were not  
216 used for calculation of IC Sa PI+ index because the number of phagocytised bacteria was too small  
217 and could not be accurately analyzed.

218 Overall, mortality of intracellular GFP-*S. aureus* significantly varied with time and with bacterial  
219 concentrations (ANOVA,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$  respectively). With the smallest tested MOI (0.1), we  
220 observed more or less constant values of IC Sa PI+ over time. On the opposite, for MOI 1 and 10, IC  
221 Sa PI+ values continually diminished with time, reflecting a saturation of the killing capacity of  
222 macrophages. Overall, bacterial killing was higher with MOI 0.1 (mean value over time 90%),  
223 compared to MOI 1 and 10 (mean value over time 69 and 62%), revealing a better efficiency of  
224 macrophages for bacterial killing with small MOI.

225 Altogether, results shown in Figure 2 indicated that the limited anti-bacterial effect of macrophages  
226 on extracellular bacteria with a high initial bacterial inoculum was not consecutive to a restricted  
227 phagocytic activity but was likely explained by a bacterial overload of the macrophages.

### **228 3.3 Macrophage mortality is related to bacterial phagocytosis**

229 We next studied the mortality rate of macrophages exposed to *S. aureus* and results are summarizes  
230 in Figure 3. We calculated a mortality index  $I_D$  after flow cytometry analysis of PI staining of  
231 macrophages (Figure 3a, b). Macrophage mortality increased significantly (ANOVA,  $p < 0.001$ ) with  
232 bacterial inoculum size and over time (Figure 3 c, d). With the smallest MOI (0.01), the mortality  
233 rate remained limited (below 50%) and close to the mortality observed in the absence of bacteria  
234 while, with the largest inoculum size (MOI 10), the mortality rate of BMDM was around 70% as  
235 early as 6h post-infection with an estimated MOI of 350 at this time point (Figure 3d). This mortality  
236 reached 80% at 12h. A similar profile of macrophage death was also observed with an initial MOI of  
237 1 (Figure 3c, d), confirming that macrophages were overwhelmed when the bacterial load was high.

238 Interestingly, we observed a significant correlation between the level of phagocytosis of bacteria  $I_{phag}$   
239 and macrophage mortality  $I_D$  (Figure 3e) suggesting that phagocytosis was linked to the induction of  
240 macrophage death.

### **241 3.4 Extracellular cephalixin modifies macrophage activity**

242 We studied whether addition of antibiotics could modify macrophage functions by mitigating the  
243 bacterial load. Cephalixin, a bactericidal antibiotic largely used in medicine, represented a molecule  
244 of choice since it does not penetrate into macrophages (12, 13) limiting its action on extracellular  
245 bacteria only. We first determined the potential direct cytotoxic effect of cephalixin on macrophages  
246 by calculating the cytotoxic index,  $I_C$ . This index ranged from 1 to 2.6 depending on cephalixin  
247 concentration and did not indicate a significant toxicity of cephalixin on macrophages (ANOVA,  
248  $p = 0.12$ ). In addition, we determined the cephalixin MICs of GFP-*S. aureus*. We obtained MIC  
249 values of  $8\mu\text{g/mL}$  in cRPMI, the macrophages culture media, while it was  $16\mu\text{g/mL}$  in MHB.

250 We then determined the impact of cephalixin on bacterial growth when cultured with macrophages.  
251 We kept two representative MOI, a small one preserving macrophage functions (MOI=0.01) and a  
252 large one significantly altering macrophage functions (MOI=1) for the rest of the study. The time-kill  
253 curves of extracellular bacteria for different inoculum sizes of GFP-*S. aureus* exposed or not to  
254 macrophages and to different concentrations of extracellular cephalixin are shown in Figure 4 a, b.  
255 Whatever the initial bacterial inoculum sizes, the bacterial killing activity of cephalixin increased

256 with time post-infection and antimicrobial concentration. When cephalixin was added to the culture,  
257 faster bacterial eradication was observed in the presence of macrophages in 2 conditions; either with  
258 a small initial bacterial inoculum (MOI 0.01) and therapeutic antimicrobial drug concentration of  
259 1xMIC (Figure 4a) or with a larger initial bacterial inoculum (MOI 1) and a much higher  
260 antimicrobial drug concentration of 16xMIC (Figure 4b). In these two cases, bacterial counts of  
261 extracellular *S. aureus* declined below the LOQ of our counting technique. On the opposite, we  
262 observed no combined effect of macrophages on bacterial killing with a high MOI and a therapeutic  
263 antibiotic concentration (MOI 1, 1xMIC).

264 The consequences of cephalixin killing of extracellular bacteria on macrophages were examined via  
265 the different macrophage indexes previously established. In the presence of cephalixin, the  
266 phagocytosis index  $I_{\text{phag}}$  gradually increased, reaching a maximum between 3h and 6h, with values  
267 similar to the ones obtained without antibiotic (Figure 4c, d).  $I_{\text{phag}}$  then decreased and all  $I_{\text{phag}}$  values  
268 with cephalixin were significantly lower than values without antibiotic for all tested MOI at later  
269 times (Figure 4c, d). These results clearly established a link between cephalixin, extracellular  
270 bacterial concentration and the level of phagocytosis.

271 We then determined whether the bacterial killing capacity of macrophages was modified by the  
272 addition of cephalixin. In the presence of cephalixin, macrophages retained their capacity to kill  
273 intracellular bacteria, as demonstrated by an IC Sa PI+ index around 100% in the presence of  
274 cephalixin (Fig 4e). Mortality of intracellular GFP-*S. aureus* was significantly higher with  
275 cephalixin compared to bacterial mortality without antibiotic. This effect was observed in all tested  
276 conditions, even with the highest MOI. Our results indicate that addition of extracellular cephalixin  
277 preserved intracellular bacterial killing by macrophages.

278 We thus verified whether the addition of cephalixin could also impact the macrophage mortality  
279 measured by the mortality index  $I_D$  (Figure 4f). When cephalixin was added to the cultures,  
280 macrophage  $I_D$  was reduced compared to the mortality observed without cephalixin and never  
281 exceeded 50% irrespective of cephalixin concentration. Interestingly, this mortality rate decreased  
282 after 6h (Figure 4f), probably because of the control of bacterial load in the culture medium by  
283 cephalixin.

### 284 **3.5 Addition of cephalixin modifies the inflammatory cytokine secretion pattern of** 285 **macrophages**

286 One of the main hallmarks of the activation of macrophages following bacterial infection is the  
287 induction of a strong inflammatory response consecutive to the synthesis of inflammatory cytokines.  
288 We thus wondered whether the addition of cephalixin could modify this inflammatory signaling.

289 We first characterized by ELISA the inflammatory cytokine secretion pattern induced by different  
290 initial inoculum sizes of *S. aureus*. We focused on the three representative inflammatory cytokines,  
291 IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  (Figure 5a) at 6h after infection. A significant increase of the three  
292 inflammatory cytokines was observed relative to the increase of initial bacterial inoculum size  
293 (ANOVA,  $p=0.001$ ,  $p=0.012$  and  $p=0.004$  for IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  respectively). More precisely,  
294 low inocula (MOI 0.01 and MOI 0.1) lead to a moderate production of cytokines and high inocula  
295 (MOI 1 and MOI 10) induced production of much larger amounts of cytokines. A similar synthesis  
296 profile was also observed at 3h post-infection for the three cytokines (data not shown). We could not  
297 detect spontaneous cytokine secretion in the absence of bacteria, whatever the time point.

## ***S.aureus* bactericidal model with macrophages**

304 We then checked whether cephalexin could stimulate cytokine production by macrophages in the  
305 absence of bacteria. No cytokines were detected in the culture supernatant with 0 or 8 µg/mL  
306 (1xMIC) of cephalexin. The presence of 128 µg/mL of cephalexin (16xMIC) in the culture medium  
307 lead to production of TNF-α and IL6 at comparable levels to values observed with the small MOIs  
308 (257±53 and 627±91pg/mL respectively). No IL-1β could be detected with cephalexin whatever its  
309 concentration (data not shown).

310 The effect of adding cephalexin in the culture medium on the inflammatory response was then  
311 evaluated for a high bacterial inoculum (MOI 1) at 6h (Figure 5b). We observed very contradictory  
312 effects depending on cytokines. No significant effect was observed for IL6 (ANOVA p=0.85) and for  
313 TNF-α (p=0.13). On the opposite, a significant effect of cephalexin was observed on IL-1β  
314 production. Indeed, the presence of cephalexin significantly decreased the synthesis of IL-1 β  
315 (p<0.01) which was almost totally abolished. These results suggest that cephalexin has an indirect  
316 effect on macrophages characterized by a limitation of their death and a specific control on IL-1 β  
317 synthesis.

## 312 **4 Discussion**

313 The present study aimed at developing an *in vitro* model to evidence and quantify the killing of  
314 varying inoculum sizes of a test pathogen (*S. aureus*) by murine bone-marrow-derived macrophages  
315 and the combined effects of an antibiotic (here cephalexin, a first generation cephalosporin). This  
316 model provided *in vitro* proof of cooperation between an antimicrobial drug and a component of the  
317 immune system, as the bactericidal effect of cephalexin on extracellular bacteria preserved  
318 phagocytosis and bactericidal capacities of macrophages. We also demonstrated for the first time to  
319 our knowledge that the bactericidal effect of cephalexin was associated with an indirect effect on  
320 macrophages, leading to an increased survival of macrophages and a decrease of IL1b synthesis.

321 As demonstrated by our results, flow cytometry, permitted simultaneous measurement of two factors  
322 at the cell level, namely the percentage of phagocytes engaged in phagocytosis of bacteria (either  
323 bound or internalized) and the survival rate of both infected phagocytes and intracellular bacteria  
324 over time (14). We showed that macrophages can limit extracellular growth of low inocula of GFP-*S.*  
325 *aureus* but this capacity was finite as the positive effect of macrophages against extracellular *S.*  
326 *aureus* was not visible for higher bacterial loads. This bacteriostatic effect of macrophages on  
327 extracellular *S. aureus* was related to phagocytosis of GFP-*S. aureus* by BMDM. Phagocytosis was  
328 directly correlated to bacterial concentration in the culture medium and time as already reported by  
329 others for *Brucella abortus* (15) and for *S. aureus* with other phagocytes than BMDM (2, 11).  
330 Bursting of BMDM by bacteria led to a decrease of intracellular bacterial killing ability, according to  
331 results published by Jubrail *et al* with THP-1 macrophages (2). Moreover, in large inocula, bacteria  
332 have low dividing rates and quickly reach the stationary phase of growth. Lack of efficacy on  
333 bacteria in the stationary phases has been shown for polymorphonuclear leukocytes (11), and can be  
334 speculated to be similar for macrophages. Increased phagocytosis by BMDM also led to increased  
335 mortality rate of these cells. Altogether, the finite phagocytosing activity, the decrease of intracellular  
336 bacterial killing activity and the increased mortality of BMDM explain the lack of activity of  
337 macrophages on large inocula and justified the association with an antibiotic to control bacterial  
338 loads.

339 Interactions between bacteria, macrophages and antimicrobial drug have been reported with  
340 macrophages from cell lines (7, 8, 16), with macrophages extracted from peripheral blood or  
341 peritoneal cavity (17, 18) and in a mouse peritonitis model (19). For the present experiment, we

342 favored the use of macrophages cultured from murine bone marrow, which have been validated to  
343 possess a stronger capacity for both proliferation and phagocytosis than peritoneal and splenic  
344 macrophages (9). Using flow cytometry, we were able to qualify the time-development of the joint  
345 effect with extracellular cephalixin. We showed that phagocytosis of *S. aureus* by macrophages in  
346 the presence of this antimicrobial drug first increased, then reached a maximum effect between 3h  
347 and 6h, then finally decreased due to the death of the phagocytised bacteria and the absence of new  
348 phagocytised bacteria related to the effect of cephalixin in the media. This enhancing/preserving  
349 effect of cephalixin on the bactericidal activity of macrophages could be explained by the decrease of  
350 extracellular bacterial load to be phagocytosed and by the fact that exposure of *S. aureus* to  
351 cephalixin leads to cephalixin concentration-dependent changes in the morphology of that bacteria  
352 (20). The spheroplast form, observed at concentrations about twice to 10xMIC, may facilitate fusion  
353 of the phagosome with the lysosome and bacterial lysis inside the resulting phagolysosome. The  
354 protoplast form of *S. aureus*, observed with a high cephalixin concentration of 100µg/mL, might  
355 explain the pronounced potentiation of the observed bactericidal effect with macrophages at  
356 cephalixin concentrations of 16 x MIC i.e., 128µg/mL. Overall, the presence of cephalixin in the  
357 culture medium led to a significant decline of extracellular bacterial concentrations, depending on  
358 initial bacterial and antibiotic concentrations. This positively influenced GFP-*S. aureus* phagocytosis  
359 by macrophages, it preserved intracellular bacterial killing ability of macrophages and protected  
360 macrophages from early death.

361 The interaction between antimicrobial drug and the immune system is dependent on the concentration  
362 and type of drug. For cephalosporins, it was shown that subMIC concentrations of cefodizime  
363 enhanced the bactericidal activity of murine macrophages on *Klebsiella pneumonia*, whereas  
364 comparable treatments with cefotaxime and cefoperazone, also third generation cephalosporins, led  
365 to significantly lower enhancement or to treatment failure (8). A study has shown that bactericidal  
366 activity of cephalixin on intracellular *Staphylococcus aureus* increased with antibiotic concentration,  
367 as confirmed by our study (16). In a mouse peritonitis model, Sandberg *et al.* have shown that  
368 cefuroxime had both an extracellular and an intracellular activity on *S. aureus* in cells from peritoneal  
369 lavage even though betalactams do not accumulate in cells (19). Those results confirm that the  
370 presence or not of an intracellular accumulation of antibiotics alone is not an univocal indicator of  
371 intracellular activity, as was previously assumed (21). Another study demonstrated an enhancement  
372 of phagocytosis of *S. aureus* by human macrophages with a small concentration of ceftriaxone (half  
373 the MIC) (22). As some antimicrobial drugs are toxic to cells, we confirmed that cephalixin had no  
374 significant deleterious effect on macrophage viability, thus facilitating interpretation of the  
375 interaction between cephalixin and macrophages. The origins of differences in the abilities of  
376 antimicrobial drugs to interact with immune cells are unclear but imply that the interaction between  
377 macrophages and an antimicrobial drug needs to be specifically documented for each substance and  
378 that no class generalization is possible.

379 An apparent paradoxical effect was observed when cephalixin was tested in the presence of the  
380 highest initial inoculum of  $10^7$  CFU/mL (MOI 10, supplementary figure 1). Indeed, higher counts of  
381 viable bacteria were obtained at 9h and 12h post infection in the presence of BMDM than without  
382 BMDM. This effect might be explained by the death of BMDM and the subsequent release of living  
383 bacteria, as already described by Jubrail *et al* (2). Indeed, staphylococci have the ability to survive in  
384 mammalian cells (2, 11, 23, 24) including macrophages where they can multiply within the  
385 phagosome or in the cytoplasm, protected from host defenses and also against some extracellular  
386 antimicrobials (24, 25), as cephalixin that poorly penetrates the cell cytosol (12, 13). This result  
387 supports the previously described potential role of macrophages as refuges for *S. aureus* during  
388 staphylococcal infections.

## ***S.aureus* bactericidal model with macrophages**

389 The inflammatory response induced by *S. aureus* was characterized by a significantly increased  
390 secretion of the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ . This synthesis was directly  
391 related to the bacterial inoculum size. This direct effect of the inoculum size on the inflammatory  
392 cytokine synthesis by BMDM can be related to what is observed *in vivo*. It is indeed well known that  
393 one of the main risks associated with *S. aureus* systemic infection is the septic shock, consecutive to  
394 a “cytokine storm” (26). It has been demonstrated that the three inflammatory cytokines act in  
395 synergy and amplify the inflammatory loop that results in the septic shock. Both TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$   
396 are released from macrophages quickly after the inciting event. They act synergistically for the  
397 development of fever and to induce septic shock by vascular permeability, hemorrhage and severe  
398 pulmonary edema (27). Subsequently, IL-6 concentrations are increased and plasma levels remain  
399 elevated during the occurrence of multiple organ failure and septic shock (28). Furthermore, it is  
400 largely admitted that, beyond the cytokine storm, if inflammation is not controlled, sustained immune  
401 responses can lead to serious host inflammatory injuries. Control or limitation of inflammation is  
402 thus a major challenge of the immune response.

403 We showed that the decrease of the viable bacterial load induced by cephalexin did not significantly  
404 modify the synthesis of IL-6 and TNF- $\alpha$  by BMDM. *S. aureus* and its derivative peptidoglycan are  
405 recognized by the dimeric molecule TLR2-TLR6 on the cell surface, and by NOD2 in the cytosol,  
406 leading to the activation of subsequent common signaling pathways (NF- $\kappa$  B and MAPKs),  
407 accounting for the induction of pro-inflammatory cytokines including IL-6 and TNF- $\alpha$  by innate  
408 immune cells (29). We can thus make the hypothesis that the killing of bacteria by cephalexin did  
409 not significantly impact the TLR signalization, dead bacterial body being still present in the media  
410 and recognized. On the opposite, we observed an almost complete abolition of IL-1 $\beta$  synthesis by  
411 BMDM in the presence of a cephalexin concentration observable during a clinical treatment (1 MIC).  
412 The secretion of IL-1 $\beta$  requires a unique protease, caspase 1, which is activated by the  
413 inflammasome. The inflammasome is a multiprotein oligomer consisting of caspase-1, ASC, and  
414 NLRs. Inflammasome activation is required for many inflammatory processes and its activation  
415 generally requires two separate signals. NF- $\kappa$  B activation (signal 1), results from signaling such as  
416 TLRs. The second signal is often a danger signal or a form of cellular stress (30). The excessive  
417 activation of inflammasome leads to a rapid death of macrophages called pyroptosis (31). In our  
418 model, the inhibition of IL-1 $\beta$  synthesis in parallel with the prevention of BMDM mortality strongly  
419 suggests that cephalexin would prevent inflammasome activation pathway and thus pyroptosis  
420 induced by *S. aureus* infection. It has been previously shown that death by pyroptosis of peritoneal  
421 macrophages after *S. aureus* infection leads to the rapid death of mice by sepsis (5). In addition  
422 several anti-inflammatory molecules have demonstrated protective role against bacterial infections by  
423 blocking inflammasome activation pathway and IL1 $\beta$  synthesis (32-34). It is thus possible that  
424 cephalexin, in addition to bacterial killing, has an indirect beneficial effect on bacterial infection  
425 outcome, by controlling the activation of inflammasome.

426

427 The *in vitro* model developed in this study allowed quantitative description of the interactions  
428 occurring between macrophages, *S. aureus* and cephalexin over time. This model can be used to  
429 study several consequences of the interactions between the three players of a bacterial infection.  
430 Interestingly, the use of this model showed an unexpected effect. Indeed, we have demonstrated for  
431 the first time that cephalexin, a bactericidal extracellular antibiotic, exerts an indirect beneficial effect  
432 on macrophages by protecting them from death by pyroptosis. This effect could improve the clinical  
433 outcome of infections. Further *in vivo* studies are required to confirm the role of this observation.

434

435 **5 Conflict of Interest**

436 C. Zemirline works for CEVA Sogeval. None of the other authors has a financial or personal  
437 relationship with other people or organizations that could inappropriately influence or bias the  
438 contents of this paper. This does not alter our adherence to Frontiers policies on sharing data and  
439 materials.

440 **6 Author Contributions**

441 EL, SB, PLT, CZ, AF and ABM conceived and designed the experiments. EL, AF and SB performed  
442 the experiments. EL, SB, AF, PLT and ABM analyzed the data. EL, AF, CZ, PLT, ABM and SB  
443 wrote the paper.

444 **7 Funding**

445 This work was supported by CEVA-Sogeval (France).

446 **8 Acknowledgments**

447 We thank Tarek Msadek for the supply of the bacterial strains, Béatrice Roques, Edwige Tapie and  
448 Emmanuelle Totain for experimental assistance.

449 **9 References**

- 450 1. Foster TJ. Immune evasion by staphylococci. Nature reviews Microbiology. 2005  
451 Dec;3(12):948-58. PubMed PMID: 16322743.
- 452 2. Jubrail J, Morris P, Bewley MA, Stoneham S, Johnston SA, Foster SJ, et al. Inability to  
453 sustain intraphagolysosomal killing of Staphylococcus aureus predisposes to bacterial persistence in  
454 macrophages. Cellular microbiology. 2016 Jan;18(1):80-96. PubMed PMID: 26248337. Pubmed  
455 Central PMCID: 4778410.
- 456 3. Haniffa M, Bigley V, Collin M. Human mononuclear phagocyte system reunited. Seminars in  
457 cell & developmental biology. 2015 May;41:59-69. PubMed PMID: 25986054.
- 458 4. Koziel J, Maciag-Gudowska A, Mikolajczyk T, Bzowska M, Sturdevant DE, Whitney AR, et  
459 al. Phagocytosis of Staphylococcus aureus by macrophages exerts cytoprotective effects manifested  
460 by the upregulation of antiapoptotic factors. PloS one. 2009;4(4):e5210. PubMed PMID: 19381294.  
461 Pubmed Central PMCID: 2668171.
- 462 5. Accarias S, Lugo-Villarino G, Foucras G, Neyrolles O, Boullier S, Tabouret G. Pyroptosis of  
463 resident macrophages differentially orchestrates inflammatory responses to Staphylococcus aureus in  
464 resistant and susceptible mice. European journal of immunology. 2015 Mar;45(3):794-806. PubMed  
465 PMID: 25472006.
- 466 6. Muller S, Faulhaber A, Sieber C, Pfeifer D, Hochberg T, Gansz M, et al. The endolysosomal  
467 cysteine cathepsins L and K are involved in macrophage-mediated clearance of Staphylococcus  
468 aureus and the concomitant cytokine induction. FASEB journal : official publication of the  
469 Federation of American Societies for Experimental Biology. 2014 Jan;28(1):162-75. PubMed PMID:  
470 24036885.

## ***S.aureus* bactericidal model with macrophages**

- 471 7. Judy BM, Whitlock GC, Torres AG, Estes DM. Comparison of the in vitro and in vivo  
472 susceptibilities of Burkholderia mallei to Ceftazidime and Levofloxacin. BMC microbiology.  
473 2009;9:88. PubMed PMID: 19426516. Pubmed Central PMCID: 2686712.
- 474 8. Nomura S, Nagayama A. In vitro and in vivo enhancement of bactericidal activity of  
475 phagocytes against Klebsiella pneumoniae treated with subminimal inhibitory concentrations of  
476 cefodizime. Chemotherapy. 1995 May-Jun;41(3):178-86. PubMed PMID: 7656663.
- 477 9. Wang C, Yu X, Cao Q, Wang Y, Zheng G, Tan TK, et al. Characterization of murine  
478 macrophages from bone marrow, spleen and peritoneum. BMC immunology. 2013;14:6. PubMed  
479 PMID: 23384230. Pubmed Central PMCID: 3574850.
- 480 10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial  
481 Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition.  
482 Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.; 2012. p. 68.
- 483 11. Schwartz J, Leidal KG, Femling JK, Weiss JP, Nauseef WM. Neutrophil bleaching of GFP-  
484 expressing staphylococci: probing the intraphagosomal fate of individual bacteria. Journal of  
485 immunology. 2009 Aug 15;183(4):2632-41. PubMed PMID: 19620311. Pubmed Central PMCID:  
486 2881311.
- 487 12. Brown KN, Percival A. Penetration of antimicrobials into tissue culture cells and leucocytes.  
488 Scandinavian journal of infectious diseases Supplementum. 1978 (14):251-60. PubMed PMID:  
489 360375.
- 490 13. Johnson JD, Hand WL, Francis JB, King-Thompson N, Corwin RW. Antibiotic uptake by  
491 alveolar macrophages. The Journal of laboratory and clinical medicine. 1980 Mar;95(3):429-39.  
492 PubMed PMID: 7354244.
- 493 14. Valdivia RH, Hromockyj AE, Monack D, Ramakrishnan L, Falkow S. Applications for green  
494 fluorescent protein (GFP) in the study of host-pathogen interactions. Gene. 1996;173(1 Spec No):47-  
495 52. PubMed PMID: 8707055.
- 496 15. Murphy E, Robertson GT, Parent M, Hagius SD, Roop RM, 2nd, Elzer PH, et al. Major  
497 histocompatibility complex class I and II expression on macrophages containing a virulent strain of  
498 Brucella abortus measured using green fluorescent protein-expressing brucellae and flow cytometry.  
499 FEMS immunology and medical microbiology. 2002 Jul 12;33(3):191-200. PubMed PMID:  
500 12110481.
- 501 16. Lemaire S, Glupczynski Y, Duval V, Joris B, Tulkens PM, Van Bambeke F. Activities of  
502 ceftobiprole and other cephalosporins against extracellular and intracellular (THP-1 macrophages and  
503 keratinocytes) forms of methicillin-susceptible and methicillin-resistant Staphylococcus aureus.  
504 Antimicrobial agents and chemotherapy. 2009 Jun;53(6):2289-97. PubMed PMID: 19289525.  
505 Pubmed Central PMCID: 2687181.
- 506 17. Houthuys E, Movahedi K, De Baetselier P, Van Ginderachter JA, Brouckaert P. A method for  
507 the isolation and purification of mouse peripheral blood monocytes. Journal of immunological  
508 methods. 2010 Jul 31;359(1-2):1-10. PubMed PMID: 20457160.
- 509 18. Davies JQ, Gordon S. Isolation and culture of human macrophages. Methods in molecular  
510 biology. 2005;290:105-16. PubMed PMID: 15361658.
- 511 19. Sandberg A, Hessler JH, Skov RL, Blom J, Frimodt-Moller N. Intracellular activity of  
512 antibiotics against Staphylococcus aureus in a mouse peritonitis model. Antimicrobial agents and

- 513 [chemotherapy. 2009 May;53\(5\):1874-83. PubMed PMID: 19223616. Pubmed Central PMCID:](#)  
514 [2681564.](#)
- 515 [20. Nishino T, Nakazawa S. Morphological changes in Staphylococcus aureus and Escherichia](#)  
516 [coli exposed to cephalixin. Japanese journal of microbiology. 1972 Mar;16\(2\):83-94. PubMed](#)  
517 [PMID: 4560585.](#)
- 518 [21. Van Bambeke F, Barcia-Macay M, Lemaire S, Tulkens PM. Cellular pharmacodynamics and](#)  
519 [pharmacokinetics of antibiotics: current views and perspectives. Current opinion in drug discovery &](#)  
520 [development. 2006 Mar;9\(2\):218-30. PubMed PMID: 16566292.](#)
- 521 [22. Tullio V, Cuffini AM, Cavallo R, Allocco A, Carlone NA. Effect of ceftriaxone on the](#)  
522 [phagocytosis and intracellular killing of Staphylococcus aureus by human macrophages. Journal of](#)  
523 [chemotherapy. 1994 Jun;6\(3\):177-83. PubMed PMID: 7983500.](#)
- 524 [23. Pang YY, Schwartz J, Thoendel M, Ackermann LW, Horswill AR, Nauseef WM. agr-](#)  
525 [Dependent interactions of Staphylococcus aureus USA300 with human polymorphonuclear](#)  
526 [neutrophils. Journal of innate immunity. 2010;2\(6\):546-59. PubMed PMID: 20829608. Pubmed](#)  
527 [Central PMCID: 2982852.](#)
- 528 [24. Kahl BC, Goulian M, van Wamel W, Herrmann M, Simon SM, Kaplan G, et al.](#)  
529 [Staphylococcus aureus RN6390 replicates and induces apoptosis in a pulmonary epithelial cell line.](#)  
530 [Infection and immunity. 2000 Sep;68\(9\):5385-92. PubMed PMID: 10948168. Pubmed Central](#)  
531 [PMCID: 101802.](#)
- 532 [25. Fraunholz M, Sinha B. Intracellular Staphylococcus aureus: live-in and let die. Frontiers in](#)  
533 [cellular and infection microbiology. 2012;2:43. PubMed PMID: 22919634. Pubmed Central PMCID:](#)  
534 [3417557.](#)
- 535 [26. Cavaiillon JM, Adib-Conquy M, Fitting C, Adrie C, Payen D. Cytokine cascade in sepsis.](#)  
536 [Scandinavian journal of infectious diseases. 2003;35\(9\):535-44. PubMed PMID: 14620132.](#)
- 537 [27. Okusawa S, Gelfand JA, Ikejima T, Connolly RJ, Dinarello CA. Interleukin 1 induces a](#)  
538 [shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase](#)  
539 [inhibition. J Clin Invest. 1988 Apr;81\(4\):1162-72. PubMed PMID: 3258319. Pubmed Central](#)  
540 [PMCID: 329645.](#)
- 541 [28. Hack CE, De Groot ER, Felt-Bersma RJ, Nuijens JH, Strack Van Schijndel RJ, Eerenberg-](#)  
542 [Belmer AJ, et al. Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis. Blood. 1989 Oct;74\(5\):1704-10.](#)  
543 [PubMed PMID: 2790194.](#)
- 544 [29. McDonald C, Inohara N, Nunez G. Peptidoglycan signaling in innate immunity and](#)  
545 [inflammatory disease. The Journal of biological chemistry. 2005 May 27;280\(21\):20177-80. PubMed](#)  
546 [PMID: 15802263.](#)
- 547 [30. Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. Nature reviews](#)  
548 [Immunology. 2013 Jun;13\(6\):397-411. PubMed PMID: 23702978. Pubmed Central PMCID:](#)  
549 [3807999.](#)
- 550 [31. Miao EA, Rajan JV, Aderem A. Caspase-1-induced pyroptotic cell death. Immunological](#)  
551 [reviews. 2011 Sep;243\(1\):206-14. PubMed PMID: 21884178. Pubmed Central PMCID: 3609431.](#)
- 552 [32. Liang YD, Bai WJ, Li CG, Xu LH, Wei HX, Pan H, et al. Piperine Suppresses Pyroptosis and](#)  
553 [Interleukin-1beta Release upon ATP Triggering and Bacterial Infection. Frontiers in pharmacology.](#)  
554 [2016;7:390. PubMed PMID: 27812336. Pubmed Central PMCID: 5071324.](#)

## ***S.aureus* bactericidal model with macrophages**

- 555 33. Hu Z, Murakami T, Suzuki K, Tamura H, Reich J, Kuwahara-Arai K, et al. Antimicrobial  
556 cathelicidin peptide LL-37 inhibits the pyroptosis of macrophages and improves the survival of  
557 polybacterial septic mice. International immunology. 2016 May;28(5):245-53. PubMed PMID:  
558 26746575. Pubmed Central PMCID: 4888352.
- 559 34. Jiang X, Wang Y, Qin Y, He W, Benlahrech A, Zhang Q, et al. Micheliolide provides  
560 protection of mice against Staphylococcus aureus and MRSA infection by down-regulating  
561 inflammatory response. Scientific reports. 2017 Feb 06;7:41964. PubMed PMID: 28165033. Pubmed  
562 Central PMCID: 5292736.

563

564

### 565 **10 Figure legends**

566 Figure 1: Growth of extracellular GFP-*S. aureus* at different times following exposure of initial  
567 bacterial inoculum of  $10^4$  (MOI 0.01, **A**),  $10^5$  (MOI 0.1, **B**),  $10^6$  (MOI 1, **C**) and  $10^7$  (MOI 10, **D**)  
568 CFU/mL to macrophages at a density of  $10^6$  cells/mL (plain boxes) or without macrophages (hatched  
569 boxes). For MOI 10, due to the high initial inoculum, the stationary phase was rapidly reached. Each  
570 bar represents the mean  $\pm$  SD from 3 experiments, each made in triplicate. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ .  $\alpha$   
571 and  $\delta$  indicate a significant effect of macrophages or MOI with ANOVA, respectively.

572 Figure 2: Representation of phagocytosis index ( $I_{\text{phag}}$ ) of infected macrophages by GFP-*S. aureus*  
573 over time. (**A,B**) Representative flow cytometry histograms of GFP expression by macrophages 6  
574 hours post infection with a low (A) and high (B) initial GFP-*S. aureus* inoculum. (**C**)  $I_{\text{phag}}$  over time  
575 representation following exposure of different initial inoculum sizes of GFP-*S.-aureus* to an initial  
576 macrophage concentration of  $10^6$  cells/mL. (**D**)  $I_{\text{phag}}$  from C at 6h. Initial MOI are indicated below the  
577 bars and calculated bacteria to macrophages ratio at 6h are in the legend. Data are presented as mean  
578 values  $\pm$  SD, \*\*\* $p < 0.001$ /  $n=3$ . (**E**)  $I_{\text{phag}}$  over supernatant bacterial counts representation for all the  
579  $I_{\text{phag}}$  values without antibiotic and corresponding regression line with parameters indicated on the  
580 figure. (**F**) Evolution of intracellular bacterial mortality over time following exposure and  
581 phagocytosis of different initial inoculum sizes of GFP-*S.-aureus* to an initial macrophage  
582 concentration of  $10^6$  cells/mL.  $\gamma$  and  $\delta$  indicate a significant effect of time or MOI with ANOVA,  
583 respectively.

584 Figure 3: Representation of mortality of infected macrophages over time. (**A,B**) Representative flow  
585 cytometry histograms of PI staining of the macrophages 6 hours post infection with a low (A) and  
586 high (B) initial GFP-*S. aureus* inoculum. (**C**)  $I_D$  over time representation following exposure of  
587 different initial inoculum sizes of GFP-*S. aureus* to an initial macrophage concentration of  
588  $10^6$  cells/mL. (**D**)  $I_D$  from C at 6h. Initial MOI are indicated below the bars and calculated bacteria to  
589 macrophages ratio at 6h are in the legend. Data are presented as mean values  $\pm$  SD, \* $p < 0.05$ ,  
590 \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ /  $n=3$ . (**E**)  $I_D$  over  $I_{\text{phag}}$  representation and corresponding regression line with  
591 parameters indicated on the figure.  $\gamma$  and  $\delta$  indicate a significant effect of time or MOI with ANOVA,  
592 respectively.

593 Figure 4: (**A,B**) Time-kill curves of GFP-*S. aureus* in the culture medium following exposure of a  
594 low (MOI 0.01, A) and high (MOI 1, B) initial inoculum to different concentrations of cephalexin  
595 without macrophages (hatched lines) or with macrophages (M, unbroken lines) at a density of  
596  $10^6$  cells/mL. LOQ=10 CFU/mL, shown by the black line. Error bars show SD. (**C,D**)  $I_{\text{phag}}$  over time

597 representation following exposure of a low (MOI 0.01, C) and high (MOI 1, D) initial bacterial  
598 inoculum to an initial macrophages concentration of  $10^6$  cells/mL and to different concentrations of  
599 cephalexin. (E) Evolution of intracellular bacterial mortality over time following exposure of an  
600 initial bacterial inoculum of  $10^6$  CFU/mL to an initial macrophage concentration of  $10^6$  cells/mL  
601 (MOI 1) and to different concentrations of cephalexin. (F)  $I_D$  over time representation following  
602 exposure of an initial bacterial inoculum of  $10^6$  CFU/mL to an initial macrophage concentration of  
603  $10^6$  cells/mL (MOI 1) and to different concentrations of cephalexin. Cephalexin concentrations are  
604 expressed as multiples of the MIC (cephalexin MIC =  $8\mu\text{g/mL}$ ). Each symbol represents the mean of  
605 results from three experiments.  $\gamma$  and  $\beta$  indicate a significant effect of time or cephalexin with  
606 ANOVA, respectively.

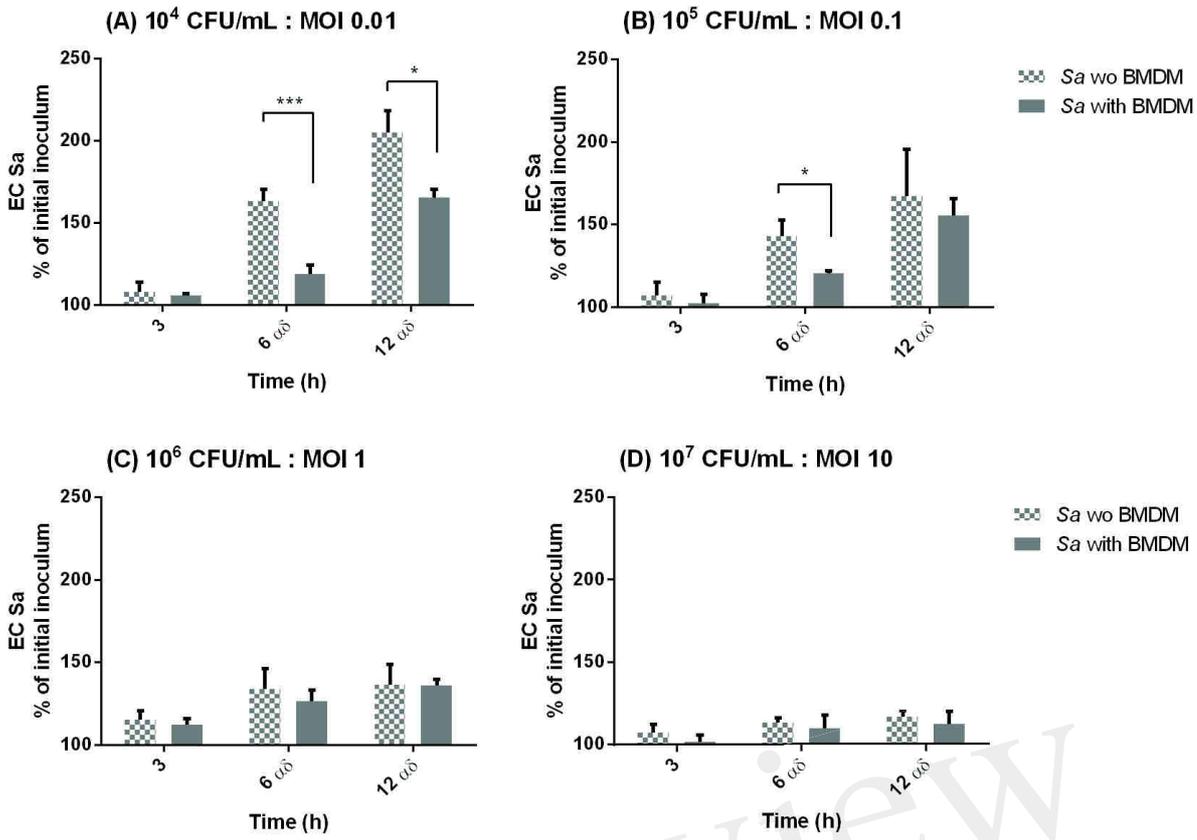
607 Figure 5: (A) Secretion profile of 3 inflammatory cytokines: IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  and IL6 by analyzing the  
608 medium supernatant during co incubation of bone derived murine macrophages with 5 different  
609 initial inoculum sizes of *S. aureus* at 6h post infection. (B) Secretion profile of IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  and IL6  
610 by analyzing the medium supernatant during co incubation of bone derived murine macrophages with  
611 an initial bacterial inoculum of  $10^6$  CFU/mL of *S. aureus* (MOI 1) with varying cephalexin  
612 concentrations at 6h post infection. IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  are represented using the left axis and IL6 is  
613 represented with the right axis. Cephalexin concentrations are expressed as multiples of the MIC  
614 (cephalexin MIC =  $8\mu\text{g/mL}$ ). Data are presented as mean values  $\pm$  SD, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ,  $n = 3$ .  $\delta$   
615 indicates a significant effect of MOI with ANOVA.

## 616 11 Supplementary Material

617 Supplementary figure 1

618 Supplementary text 1

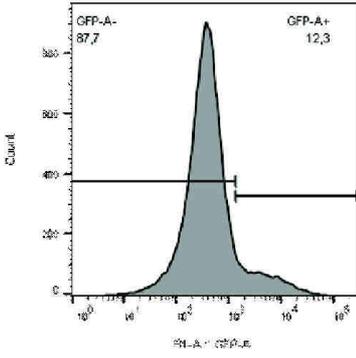
Figure 1.JPEG



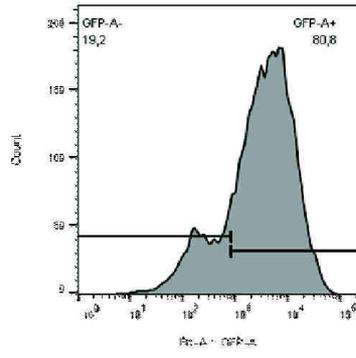
In review

Figure 2.JPEG

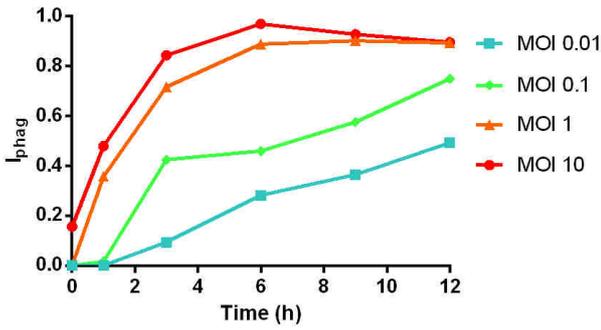
(A) GFP expression of infected BMDM MOI 0.01



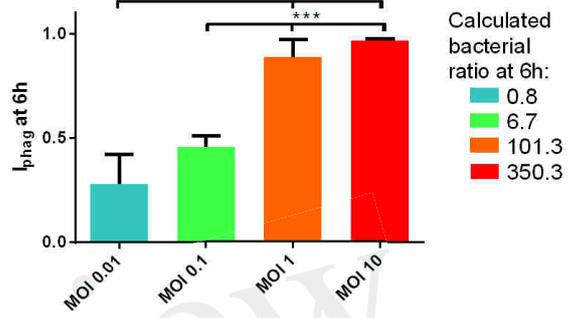
(B) GFP expression of infected BMDM MOI 10



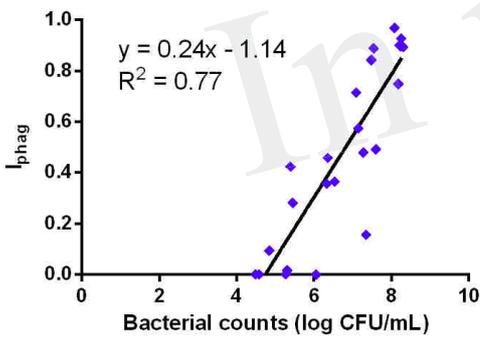
(C) Iphag BMDM  $\delta\gamma$



(D) Iphag BMDM at 6h



(E)



(F) IntraBMDM dying bacteria  $\delta\gamma$

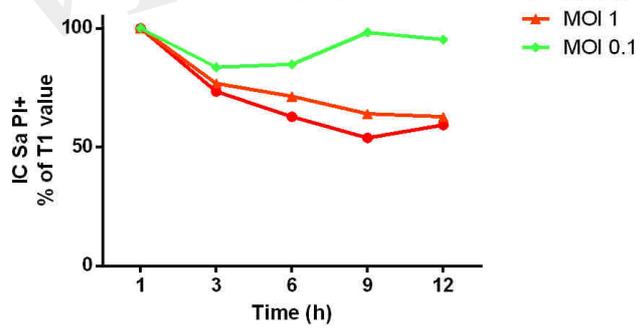
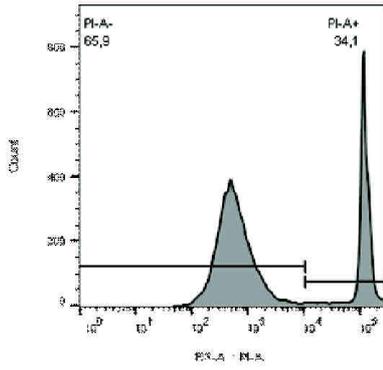
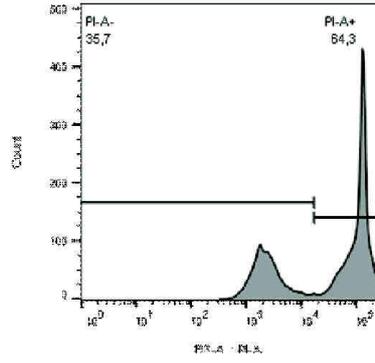


Figure 3.JPEG

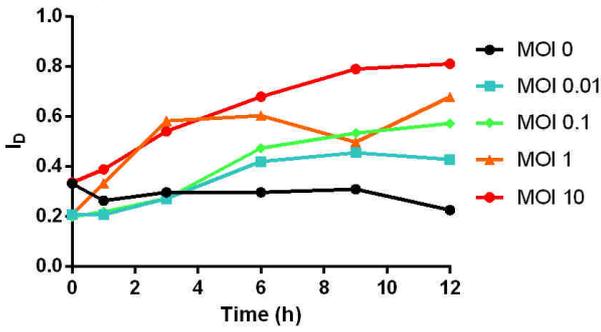
(A) PI expression of infected BMDM MOI 0.01



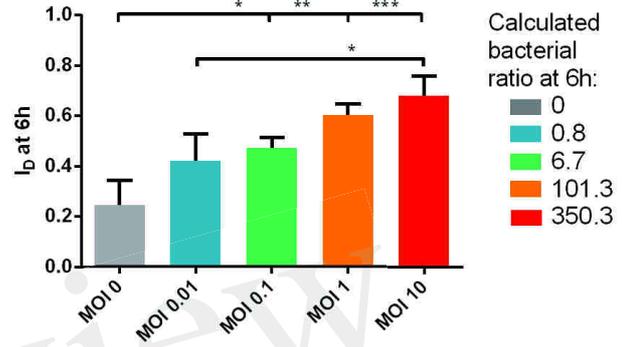
(B) PI expression of infected BMDM MOI 10



(C) Id BMDM  $\delta_7$



(D) Id BMDM at 6h



(E)

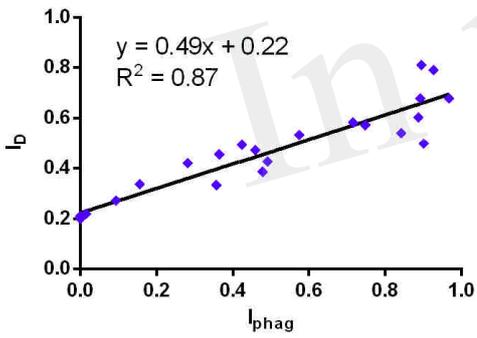


Figure 4.JPEG

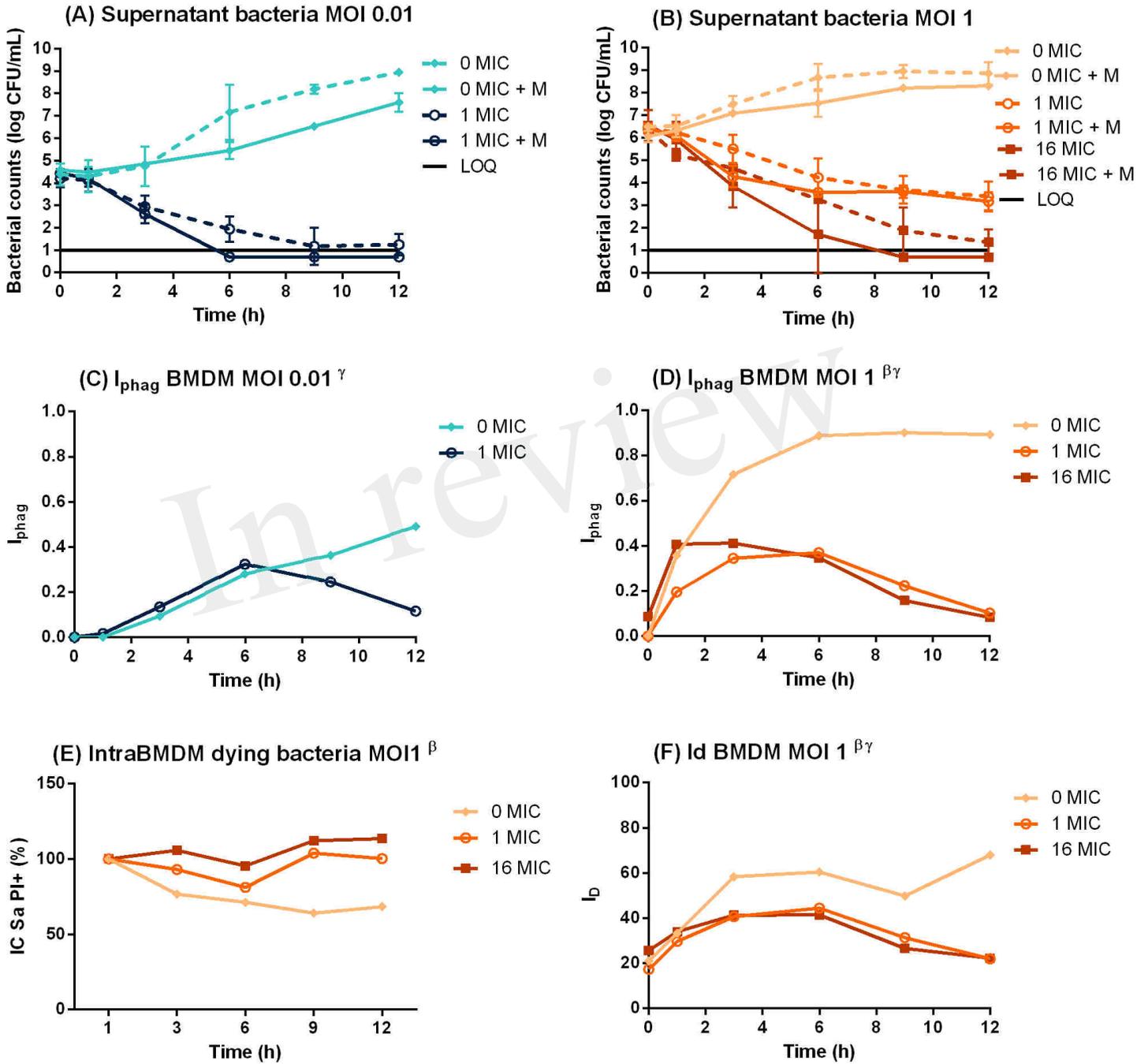
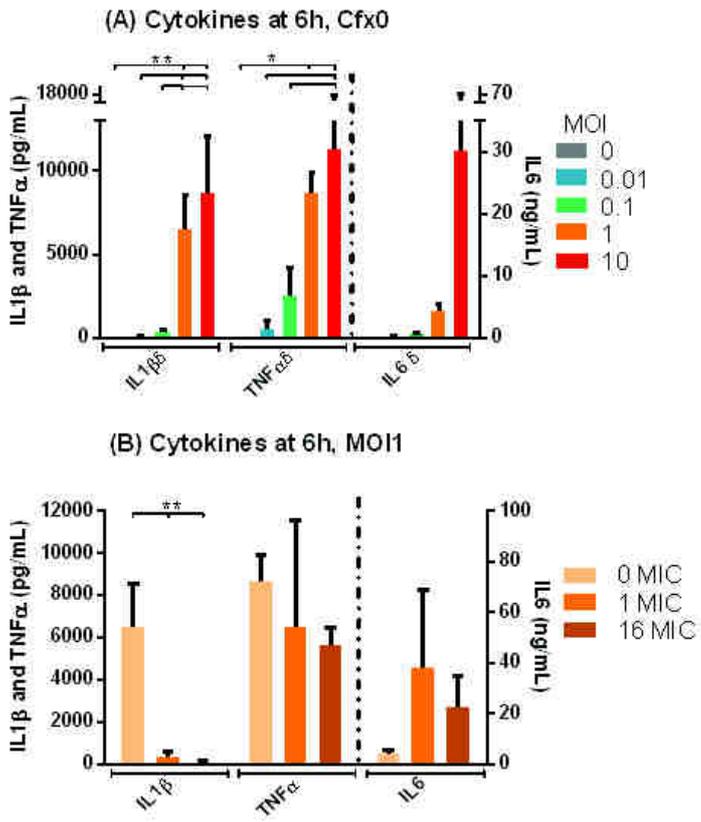


Figure 5.JPEG



---

## **Discussion générale**

---



Les antibiotiques sont l'une des classes médicamenteuses les plus importantes dans les arsenaux thérapeutiques des médecins et des vétérinaires. Toute utilisation d'antibiotiques entraîne une pression de sélection de résistances sur les bactéries. Ce risque est plus grand quand il y a une surexposition ou lors de mauvaises pratiques en médecine soit humaine soit vétérinaire. La résistance aux antibiotiques est maintenant reconnue comme un problème majeur de santé publique. La lutte contre l'antibiorésistance exige de réduire autant que faire se peut la consommation d'antibiotiques chez l'Homme et chez les animaux. Dans le domaine de l'antibiothérapie vétérinaire, la réduction de l'utilisation des antibiotiques passe entre autres par l'optimisation des posologies qui vise à déterminer les quantités d'antibiotiques requises pour atteindre l'objectif thérapeutique sans consommation excessive ou sur-consommation.

Actuellement, lors d'un traitement exigeant des administrations répétées d'un antibiotique sur plusieurs jours, le paradigme, jamais vérifié, est que la même dose d'antibiotique doit être utilisée quotidiennement sur toute la durée du traitement. En fait, il a été démontré *in vitro* que les concentrations requises pour qu'un antibiotique soit efficace sont corrélées à la taille de l'inoculum bactérien à éradiquer. De même, certains mécanismes de défenses immunitaires sont plus efficaces face à des inocula bactériens de plus petite taille. Ces éléments pourraient servir de base à une stratégie thérapeutique visant à une adaptation journalière des doses au cours du traitement, qui prendrait en compte la réduction progressive de la charge bactérienne et le relais de plus en plus efficace des défenses immunitaires.

Afin de contribuer à préserver l'efficacité des traitements antibiotiques, l'objectif de cette thèse a été d'identifier *in vitro* l'effet de la taille de l'inoculum bactérien sur deux acteurs chargés de lutter contre une infection bactérienne : les antibiotiques et le système immunitaire de l'hôte.

Une première étude *in vitro*, préliminaire, a étudié la stabilité de sept antibiotiques largement utilisés en médecine humaine (l'amoxicilline, la céphalexine, le céfotaxime, la ciprofloxacine, l'érythromycine, la clarithromycine et la doxycycline) dans les conditions de détermination de la CMI par la méthode de microdilution sériée de référence du CLSI. Les concentrations en antibiotiques dans un milieu abiotique sur 24h ont diminué de 33% pour la ciprofloxacine à 69% pour la clarithromycine. L'effet de cette instabilité sur la détermination de la CMI et de la CMB a alors été déterminé avec les 4 molécules les plus dégradées - la céphalexine, le céfotaxime, la clarithromycine et la doxycycline - pour deux pathogènes : *E. coli* et *S. aureus*. Pour cela, une complémentation du milieu en antibiotique a été effectuée toutes les 6h afin de compenser la

dégradation et les résultats ont été comparés aux conditions standards. La dégradation des antibiotiques avec la méthode standard de détermination de la CMI a été associée avec une augmentation significative de la CMI pour 2 antibiotiques et de la CMB pour trois antibiotiques. La différence observée est cependant restée faible car elle a représenté moins d'une dilution au demi.

Nos résultats ont donc confirmé que la dégradation des antibiotiques, pendant le stockage ou lors de l'incubation, peut entraîner une augmentation des valeurs de CMI et de CMB observées et constitue donc un biais lors de la détermination de la sensibilité d'une souche bactérienne avec un risque de mal classer un agent pathogène dans les catégories sensible/intermédiaire/résistant et donc une antibiorésistance artificiellement augmentée. Actuellement, l'approche classique de l'antibiothérapie raisonnée consiste à déterminer une dose en ayant recours aux concepts PK/PD. Ils ont conduit à proposer des « indices d'efficacité » ou « indices PK/PD », comme critères intermédiaires pour prédire l'efficacité des traitements. Ils combinent une information à caractère pharmacocinétique (un paramètre d'exposition interne) et une information à caractère pharmacodynamique, la concentration minimale inhibitrice (CMI). Les trois indices les plus utilisés sont  $T_{>CMI}$ ,  $C_{max}/CMI$  et  $AUC/CMI$ . Par conséquent, la détermination de la valeur de la CMI influe également sur la détermination de ces indices et la dégradation des antibiotiques pourrait donc modifier les schémas thérapeutiques.

La différence entre les valeurs avec et sans dégradation de l'antibiotique étant restée inférieure à une dilution lors de nos tests, nous avons conclu que nos résultats n'aurait d'importance clinique que dans des situations critiques ou quand le temps de doublement bactérien est plus important que le temps de demi-vie de dégradation d'un antibiotique, comme pour *Mycobacterium tuberculosis*. Dans ces cas précis, différentes méthodes pourraient alors être utilisées afin de connaître la CMI réelle.

La seconde partie de ce travail a consisté à étudier *in vitro* l'influence de la taille de l'inoculum bactérien de 2 pathogènes, *E. coli* et *S. aureus*, sur l'action bactéricide de 2 céphalosporines, la céphalexine et le cefprozil. Notre étude a confirmé un fort effet inoculum observé sur les bêta-lactamines, une réduction nette de l'activité bactéricide de la céphalexine et du cefprozil en présence d'un gros inoculum ayant été observée lors de nos expériences. Elle a également permis de confirmer une dualité d'action à la fois temps et concentration dépendant des céphalosporines en fonction du pathogène rencontré.

Dans la troisième partie de ce travail, un modèle tripartite *in vitro* a été développé afin d'étudier l'effet de la taille de l'inoculum bactérien et de la céphalexine, qui est un antibiotique bactéricide extracellulaire sur des cellules du système immunitaire inné. Nous avons choisi pour cette étude des macrophages murins issus de la moelle osseuse (BMDM) et avons développé une méthode permettant le suivi simultané des bactéries, des macrophages et de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. L'utilisation de plusieurs tailles d'inocula bactériens a permis de démontrer que les macrophages ont eu une capacité limitée d'action sur les bactéries extracellulaires et que l'augmentation de la charge bactérienne a entraîné une surcharge et une mortalité des BMDM. De plus, la réponse inflammatoire des macrophages induite par *S. aureus* a été caractérisée par une augmentation significative de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$  avec l'augmentation de la charge bactérienne. Nous avons donc montré qu'un effet inoculum bactérien significatif est présent avec les BMDM et ce sur plusieurs paramètres.

La céphalexine ajoutée au milieu de culture a montré une activité bactéricide plus marquée sur des petits inocula et une activité plus importante avec l'augmentation des concentrations en antibiotiques, conformément à l'étude précédente. La réduction de la charge bactérienne induite par la céphalexine a eu une influence positive sur la phagocytose de *S. aureus* par les macrophages. En effet, cela a permis de préserver la capacité de bactéricidie des macrophages sur les bactéries phagocytées et de diminuer la mortalité des macrophages. Concernant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les BMDM, la réduction de la charge bactérienne n'a pas eu de répercussion sur la sécrétion d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  mais nous avons observé une abolition quasiment complète de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  avec une concentration de céphalexine d'une fois la CMI, ce qui est de l'ordre de grandeur des concentrations sanguines obtenues *in vivo* aux doses recommandées. Ces résultats suggèrent que la céphalexine permettrait de prévenir la voie d'activation de l'inflammasome et donc la pyroptose induite par une infection des macrophages par *S. aureus*. La céphalexine présenterait donc des avantages multiples dans ce modèle, de par son effet bactéricide d'une part et de par le contrôle de l'inflammasome d'autre part.

Le système développé dans cette étude pourrait également servir de modèle afin de développer et d'étudier des substances aux propriétés immunostimulantes, et il est déjà connu que certains antibiotiques possèdent ces propriétés à des posologies inférieures à celles utilisées pour leurs propriétés antibiotiques.

La recroissance des bactéries après une phase de diminution observée dans toutes les conditions du système dynamique de la seconde étude est un phénomène fréquemment observé lors de ce type d'expérimentation [110]. Etant donné que les bactéries cultivées à partir des repousses avaient la même CMI que les souches initiales, on peut conclure que ce sont des bactéries persistantes et non des bactéries résistantes qui ont été à l'origine de ce phénomène. *S. aureus* est un pathogène pouvant prendre la forme de variants. Ces variants, ou small colony variants (SCV) sont des persisteurs et sont la conséquence de changements d'expression de gènes métaboliques, tels que *sigB* et *agr*, et présentent ainsi une diminution de la pigmentation, une perte de l'activité hémolytique et de dissémination [136]. Ils peuvent faire partie du cycle normal de croissance de la bactérie ou être induits par des conditions de stress, telles que les antibiotiques, l'inanition et les peptides cationiques de l'hôte [137, 138]. Ces SCVs formés par *S. aureus* ont été liés aux infections chroniques, récurrentes et résistantes aux antibiotiques [138]. Ils ont la capacité de survivre à l'intérieur des cellules hôtes, et notamment dans les cellules épithéliales et endothéliales [139]. En effet, ils peuvent résister à l'activité bactéricide des lysosomes. De plus, ils sont moins sensibles à l'activité bactéricide des peptides antimicrobiens [140]. Ainsi, les SCVs de *S. aureus* permettent d'échapper aux défenses de l'immunité innée et de favoriser l'établissement et la persistance de l'infection. On peut donc également relier ces formes de *S. aureus* aux résultats obtenus dans notre système tripartite (3<sup>ème</sup> étude) avec la plus grosse MOI, lorsque à 9 et 12h les quantités de *S. aureus* présentent dans le milieu avec macrophages et céphalexine ont excédé les quantités observées sans macrophages.

Le fait que la céphalexine ait une action positive sur l'efficacité des macrophages alors que cette molécule rentre très peu dans les cellules peut paraître paradoxal. Cependant, Van Bambeke *et al* ont étudié différents antibiotiques et ont conclu que l'activité intracellulaire d'un antibiotique dépend d'un grand nombre de facteurs autres que la présence de l'antibiotique à l'intérieur de ces cellules, ce qui explique notamment que certains antibiotiques à forte pénétration intracellulaire n'aient pas une bonne action sur des bactéries intracellulaires [129]. Cette réduction d'effet peut être due à une localisation de l'antibiotique et des bactéries dans des compartiments cellulaires différents, à une résistance augmentée des bactéries qui peuvent être sous des formes métaboliques résistantes comme les SCVs, ou bien encore à une CMI augmentée des bactéries intracellulaires en raison d'une diminution d'activité de l'antibiotique qui peut s'expliquer par une modification de l'antibiotique, un pH non optimal ou une liaison à des protéines. Dans notre étude, plusieurs éléments ont probablement concouru au fait que la céphalexine, antibiotique majoritairement extracellulaire, préserve les capacités de phagocytose,

de bactéricidie et de survie des macrophages. D'une part, la céphalexine a permis de diminuer la charge bactérienne dans le milieu, et elle peut entraîner des modifications morphologiques des bactéries qui les rendent plus sensibles à l'action du phagolysosome. D'autre part, en inhibant la production d'IL-1 $\beta$ , la présence de céphalexine a limité l'activation de l'inflammasome, et donc a préservé les macrophages de la pyroptose.

La prédiction d'un effet intracellulaire pour un antibiotique est donc rendue difficile, ce qui renforce la pertinence de l'utilisation de modèles expérimentaux afin de déterminer quel effet aura un antibiotique donné sur le système immunitaire.

A l'heure actuelle, lors de l'utilisation d'indices PK/PD afin de déterminer un schéma thérapeutique, une même valeur critique de l'indice PK/PD choisi est retenue, et par conséquent une seule et même dose est recommandée quel que soit l'état du patient ou le stade d'infection et notamment la taille des inocula à éradiquer. De plus, ces indices et leurs valeurs critiques ont été établis pour des administrations répétées et cela pose une difficulté majeure d'interprétation lors de l'administration d'une formulation longue-action (LA). Pour une bêtalactamine par exemple, un T>CMI de 40% doit se comprendre comme étant l'exigence d'avoir des concentrations plasmatiques au-dessus de la CMI pendant 40% du temps pour chaque intervalle de dosage de 24h. En cas d'administration d'une formulation LA dont la durée d'exposition revendiquée serait de 5 jours avec les deux premiers jours au-dessus de la CMI, le T>CMI calculé sur 5 jours est également de 40% mais sa signification pharmacologique est différente de celle d'une administration répétée. Cette difficulté d'utilisation des indices PK/PD pour toutes les formulations Longue Action (LA) a été discutée par Toutain *et al.* [141]. Actuellement les autorités exigent que si une nouvelle formulation LA revendique une durée d'action de 5 jours, elle assure des concentrations plasmatiques supérieures à la CMI pendant 5 jours. Compte tenu de nos résultats expérimentaux, qui ont mis en évidence certaines différences sur l'action des antibiotiques et du système immunitaire en fonction de la taille des inocula bactériens, maintenir des concentrations plasmatiques supérieures à la CMI pendant 5 jours est probablement, lors du traitement d'individus immunocompétents, inutile du point de vue de l'efficacité et sûrement indésirable en termes d'exposition des flores commensales.

Les résultats obtenus lors de cette thèse sont prometteurs ; cependant une confirmation *in vivo* semble nécessaire avant de pouvoir les exploiter afin d'améliorer des schémas posologiques. La validation expérimentale *in vivo* pourrait conduire à la révision de certains schémas posologiques par voie orale avec par exemple la proposition d'initier des traitements avec une

ou plusieurs doses de charge suivies de doses d'entretien plus faibles. Le développement rationnel des formulations injectables dites LA pourrait également être revu sous cette hypothèse. La transposition du paradigme actuel d'une dose constante aux formulations LA conduit à une impasse dans la mesure où la même exposition plasmatique ne peut pas être assurée en début et en fin de traitement et la question posée est de savoir si finalement, une exposition progressivement décroissante avec l'avancement du traitement ne serait pas tout à fait acceptable en terme d'efficacité sur les germes cibles avec pour mérite supplémentaire de moins exposer les flores commensales.

---

## **Références bibliographiques**

---



- [1] Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.; 2012. p. 68.
- [2] Clinical and Laboratory Standards Institute. *M26-A Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline*. Wayne, PA1999.
- [3] Paesen J, Quintens I, Thoithi G, Roets E, Reybrouck G, Hoogmartens J. *Quantitative analysis of quaternary ammonium antiseptics using thin-layer densitometry*. *Journal of chromatography A*. 1994;677:377-84.
- [4] Marchbanks CR, Yost RL, White RL. *Cefotaxime stability during in vitro microbiological testing*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1987;31:1375-8.
- [5] Wick WE. *Influence of antibiotic stability on the results of in vitro testing procedures*. *Journal of bacteriology*. 1964;87:1162-70.
- [6] Mattie H. *Antibiotic efficacy in vivo predicted by in vitro activity*. *International journal of antimicrobial agents*. 2000;14:91-8.
- [7] Blaser J, Stone BB, Zinner SH. *Efficacy of intermittent versus continuous administration of netilmicin in a two-compartment in vitro model*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1985;27:343-9.
- [8] Satta G, Cornaglia G, Foddìs G, Pompei R. *Evaluation of ceftriaxone and other antibiotics against Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, and Streptococcus pneumoniae under in vitro conditions simulating those of serious infections*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1988;32:552-60.
- [9] Akins RL, Rybak MJ. *In vitro activities of daptomycin, arbekacin, vancomycin, and gentamicin alone and/or in combination against glycopeptide intermediate-resistant Staphylococcus aureus in an infection model*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2000;44:1925-9.
- [10] Firsov AA, Vostrov SN, Shevchenko AA, Cornaglia G. *Parameters of bacterial killing and regrowth kinetics and antimicrobial effect examined in terms of area under the concentration-time curve relationships: action of ciprofloxacin against Escherichia coli in an in vitro dynamic model*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1997;41:1281-7.
- [11] Garrison MW, Vance-Bryan K, Larson TA, Toscano JP, Rotschafer JC. *Assessment of effects of protein binding on daptomycin and vancomycin killing of Staphylococcus aureus by using an in vitro pharmacodynamic model*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1990;34:1925-31.
- [12] Lowdin E, Cars O, Odenholt I. *Pharmacodynamics of amoxicillin/clavulanic acid against Haemophilus influenzae in an in vitro kinetic model: a comparison of different dosage regimens including a pharmacokinetically enhanced formulation*. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2002;8:646-53.
- [13] Ginsburg AS, Lee J, Woolwine SC, Grosset JH, Hamzeh FM, Bishai WR. *Modeling in vivo pharmacokinetics and pharmacodynamics of moxifloxacin therapy for Mycobacterium tuberculosis infection by using a novel cartridge system*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005;49:853-6.
- [14] Domagk G. *Ein Beitrag zur chemotherapie der bakteriellen infektionen*. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 1935;61:250-53.

- [15] Ambrose PG, Bhavnani SM, Rubino CM, Louie A, Gumbo T, Forrest A, et al. Pharmacokinetics-pharmacodynamics of antimicrobial therapy: it's not just for mice anymore. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2007;44:79-86.
- [16] Accarias S, Lugo-Villarino G, Foucras G, Neyrolles O, Boullier S, Tabouret G. Pyroptosis of resident macrophages differentially orchestrates inflammatory responses to *Staphylococcus aureus* in resistant and susceptible mice. *European journal of immunology*. 2015;45:794-806.
- [17] Finkensieper A, Bekhite MM, Fischer H, Nitza S, Figulla HR, Muller JP, et al. Antibacterial capacity of differentiated murine embryonic stem cells during defined in vitro inflammatory conditions. *Stem cells and development*. 2013;22:1977-90.
- [18] Hauser SP, Udupa KB, Lipschitz DA. Effects of ceftazidime, a betalactam antibiotic, on murine haemopoiesis in vitro. *British journal of haematology*. 1994;86:733-9.
- [19] Bamberger DM, Fields MT, Herndon BL. Efficacies of various antimicrobial agents in treatment of *Staphylococcus aureus* abscesses and correlation with in vitro tests of antimicrobial activity and neutrophil killing. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1991;35:2335-9.
- [20] Barcia-Macay M, Seral C, Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM, Van Bambeke F. Pharmacodynamic evaluation of the intracellular activities of antibiotics against *Staphylococcus aureus* in a model of THP-1 macrophages. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006;50:841-51.
- [21] Murphy KP. *Janeway's Immunobiology*. 8th ed. New York: Garland Science; 2012.
- [22] Prescott JF. Betalactam antibiotics: cephalosporins. In: Steeve Giguère JFP, Patricia M. Dowling, editor. *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. fifth ed. Ames, IO: John Wiley and Sons; 2013. p. 683.
- [23] Craig WA. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: Rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clinical Infectious Diseases*. 1998;26:1-10.
- [24] Papich MG. Pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) modeling and the rational selection of dosage regimes for the prudent use of antimicrobial drugs. *Veterinary microbiology*. 2014;171:480-6.
- [25] Sy SK, Zhuang L, Derendorf H. Pharmacokinetics and pharmacodynamics in antibiotic dose optimization. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2016;12:93-114.
- [26] Yu Y, Zhou YF, Chen MR, Li X, Qiao GL, Sun J, et al. In Vivo Pharmacokinetics/Pharmacodynamics of Cefquinome in an Experimental Mouse Model of *Staphylococcus Aureus* Mastitis following Intramammary Infusion. *PloS one*. 2016;11:e0156273.
- [27] Bush K, Macielag MJ. New beta-lactam antibiotics and beta-lactamase inhibitors. *Expert opinion on therapeutic patents*. 2010;20:1277-93.
- [28] <http://www.lahey.org/>.
- [29] <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00567>.
- [30] Campbell BG, Rosin E. Effect of food on absorption of cefadroxil and cephalexin in dogs. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*. 1998;21:418-20.
- [31] Canada B-MS. Cefzil (cefprozil) product monograph. Montreal Canada 2012. p. 32.
- [32] EUCAST. Antimicrobial wild type distributions of microorganisms: *Staphylococcus aureus*. 2016.
- [33] Barbhैया RH, Wang L, Shyu WC, Pittman KA. Absolute bioavailability of cefprozil after oral administration in beagles. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1992;36:687-9.
- [34] Krishna S, Miller LS. Innate and adaptive immune responses against *Staphylococcus aureus* skin infections. *Seminars in immunopathology*. 2012;34:261-80.

- [35] Broker BM, Holtfreter S, Bekeredjian-Ding I. Immune control of *Staphylococcus aureus* - regulation and counter-regulation of the adaptive immune response. *International journal of medical microbiology : IJMM*. 2014;304:204-14.
- [36] Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 2007;449:819-26.
- [37] Shaykhiev R, Bals R. Interactions between epithelial cells and leukocytes in immunity and tissue homeostasis. *Journal of leukocyte biology*. 2007;82:1-15.
- [38] Linden SK, Sutton P, Karlsson NG, Korolik V, McGuckin MA. Mucins in the mucosal barrier to infection. *Mucosal immunology*. 2008;1:183-97.
- [39] Owen JA, Punt J, Stranford, S.A. *Kuby Immunologie*. 7<sup>o</sup> edition ed. Paris: Dunod; 2014.
- [40] Markiewski MM, Lambris JD. The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. *The American journal of pathology*. 2007;171:715-27.
- [41] Sarma JV, Ward PA. The complement system. *Cell and tissue research*. 2011;343:227-35.
- [42] Pollard JW. Trophic macrophages in development and disease. *Nature reviews Immunology*. 2009;9:259-70.
- [43] Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical microbiology reviews*. 2009;22:240-73, Table of Contents.
- [44] Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews Immunology*. 2007;7:678-89.
- [45] Roos D, van Bruggen R, Meischl C. Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes and infection*. 2003;5:1307-15.
- [46] Mayer-Scholl A, Averhoff P, Zychlinsky A. How do neutrophils and pathogens interact? *Current opinion in microbiology*. 2004;7:62-6.
- [47] Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature reviews Immunology*. 2011;11:762-74.
- [48] Niedergang F, Chavrier P. Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phago(s)ome. *Current opinion in cell biology*. 2004;16:422-8.
- [49] Greenberg S, Grinstein S. Phagocytosis and innate immunity. *Current opinion in immunology*. 2002;14:136-45.
- [50] Sun-Wada GH, Tabata H, Kawamura N, Aoyama M, Wada Y. Direct recruitment of H<sup>+</sup>-ATPase from lysosomes for phagosomal acidification. *Journal of cell science*. 2009;122:2504-13.
- [51] Claus V, Jahraus A, Tjelle T, Berg T, Kirschke H, Faulstich H, et al. Lysosomal enzyme trafficking between phagosomes, endosomes, and lysosomes in J774 macrophages. Enrichment of cathepsin H in early endosomes. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273:9842-51.
- [52] Yates RM, Hermetter A, Russell DG. The kinetics of phagosome maturation as a function of phagosome/lysosome fusion and acquisition of hydrolytic activity. *Traffic*. 2005;6:413-20.
- [53] Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*. 2007;87:245-313.
- [54] Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *The Biochemical journal*. 1994;298 ( Pt 2):249-58.
- [55] Tran SL, Ramarao N. *Bacillus cereus* immune escape: a journey within macrophages. *FEMS microbiology letters*. 2013;347:1-6.
- [56] Schulte W, Bernhagen J, Bucala R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets--an updated view. *Mediators of inflammation*. 2013;2013:165974.
- [57] Domiciano TP, Wakita D, Jones HD, Crother TR, Verri WA, Jr., Arditi M, et al. Quercetin Inhibits Inflammasome Activation by Interfering with ASC Oligomerization and Prevents Interleukin-1 Mediated Mouse Vasculitis. *Scientific reports*. 2017;7:41539.

- [58] Hu Z, Murakami T, Suzuki K, Tamura H, Reich J, Kuwahara-Arai K, et al. Antimicrobial cathelicidin peptide LL-37 inhibits the pyroptosis of macrophages and improves the survival of polybacterial septic mice. *International immunology*. 2016;28:245-53.
- [59] Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nature reviews Immunology*. 2013;13:397-411.
- [60] Cavaillon JM, Adib-Conquy M, Fitting C, Adrie C, Payen D. Cytokine cascade in sepsis. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 2003;35:535-44.
- [61] Rosenstein R, Gotz F. What distinguishes highly pathogenic staphylococci from medium- and non-pathogenic? *Current topics in microbiology and immunology*. 2013;358:33-89.
- [62] Katakura T, Yoshida T, Kobayashi M, Herndon DN, Suzuki F. Immunological control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection in an immunodeficient murine model of thermal injuries. *Clinical and experimental immunology*. 2005;142:419-25.
- [63] Pietrocola G, Arciola CR, Rindi S, Di Poto A, Missineo A, Montanaro L, et al. Toll-like receptors (TLRs) in innate immune defense against *Staphylococcus aureus*. *The International journal of artificial organs*. 2011;34:799-810.
- [64] Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nature reviews Microbiology*. 2009;7:99-109.
- [65] Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*. 2012;122:787-95.
- [66] Yoong P, Torres VJ. The effects of *Staphylococcus aureus* leukotoxins on the host: cell lysis and beyond. *Current opinion in microbiology*. 2013;16:63-9.
- [67] Staali L, Monteil H, Colin DA. The staphylococcal pore-forming leukotoxins open Ca<sup>2+</sup> channels in the membrane of human polymorphonuclear neutrophils. *The Journal of membrane biology*. 1998;162:209-16.
- [68] Vandenesch F, Lina G, Henry T. *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2012;2:12.
- [69] Berube BJ, Bubeck-Wardenburg J. *Staphylococcus aureus* alpha-toxin: nearly a century of intrigue. *Toxins*. 2013;5:1140-66.
- [70] Fraunholz M, Sinha B. Intracellular *Staphylococcus aureus*: live-in and let die. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2012;2:43.
- [71] Gresham HD, Lowrance JH, Caver TE, Wilson BS, Cheung AL, Lindberg FP. Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. *Journal of immunology*. 2000;164:3713-22.
- [72] Voyich JM, Braughton KR, Sturdevant DE, Whitney AR, Said-Salim B, Porcella SF, et al. Insights into mechanisms used by *Staphylococcus aureus* to avoid destruction by human neutrophils. *Journal of immunology*. 2005;175:3907-19.
- [73] Kubica M, Guzik K, Koziel J, Zarebski M, Richter W, Gajkowska B, et al. A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: the silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. *PloS one*. 2008;3:e1409.
- [74] Qazi SN, Counil E, Morrissey J, Rees CE, Cockayne A, Winzer K, et al. *agr* expression precedes escape of internalized *Staphylococcus aureus* from the host endosome. *Infection and immunity*. 2001;69:7074-82.
- [75] Koziel J, Kmiecik K, Chmiest D, Maresz K, Mizgalska D, Maciag-Gudowska A, et al. The role of Mcl-1 in *S. aureus*-induced cytoprotection of infected macrophages. *Mediators of inflammation*. 2013;2013:427021.

- [76] Koziel J, Maciag-Gudowska A, Mikolajczyk T, Bzowska M, Sturdevant DE, Whitney AR, et al. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by macrophages exerts cytoprotective effects manifested by the upregulation of antiapoptotic factors. *PloS one*. 2009;4:e5210.
- [77] Lamkanfi M, Dixit VM. Manipulation of host cell death pathways during microbial infections. *Cell host & microbe*. 2010;8:44-54.
- [78] König C, Simmen HP, Blaser J. Bacterial concentrations in pus and infected peritoneal fluid--implications for bactericidal activity of antibiotics. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1998;42:227-32.
- [79] Mizunaga S, Kamiyama T, Fukuda Y, Takahata M, Mitsuyama J. Influence of inoculum size of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* on in vitro activities and in vivo efficacy of fluoroquinolones and carbapenems. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2005;56:91-6.
- [80] Udekwu KI, Parrish N, Ankomah P, Baquero F, Levin BR. Functional relationship between bacterial cell density and the efficacy of antibiotics. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2009;63:745-57.
- [81] Ferran A, Dupouy V, Toutain PL, Bousquet-Melou A. Influence of inoculum size on the selection of resistant mutants of *Escherichia coli* in relation to mutant prevention concentrations of marbofloxacin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51:4163-6.
- [82] Rio-Marques L, Hartke A, Bizzini A. The effect of inoculum size on selection of in vitro resistance to vancomycin, daptomycin, and linezolid in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbial drug resistance*. 2014;20:539-43.
- [83] Song KH, Jung SI, Lee S, Park S, Kiem SM, Lee SH, et al. Characteristics of cefazolin inoculum effect-positive methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* infection in a multicentre bacteraemia cohort. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2016.
- [84] Soriano F, Garcia-Corbeira P, Ponte C, Fernandez-Roblas R, Gadea I. Correlation of pharmacodynamic parameters of five beta-lactam antibiotics with therapeutic efficacies in an animal model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1996;40:2686-90.
- [85] Brook I. Inoculum effect. *Reviews of infectious diseases*. 1989;11:361-8.
- [86] Jumbe N, Louie A, Leary R, Liu W, Deziel MR, Tam VH, et al. Application of a mathematical model to prevent in vivo amplification of antibiotic-resistant bacterial populations during therapy. *J Clin Invest*. 2003;112:275-85.
- [87] Wu N, Chen BY, Tian SF, Chu YZ. The inoculum effect of antibiotics against CTX-M-extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 2014;13:45.
- [88] Soriano F. Optimal dosage of beta-lactam antibiotics: time above the MIC and inoculum effect. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1992;30:566-9.
- [89] Dementhon K, El-Kirat-Chatel S, Noel T. Development of an in vitro model for the multi-parametric quantification of the cellular interactions between *Candida* yeasts and phagocytes. *PloS one*. 2012;7:e32621.
- [90] Schwartz J, Leidal KG, Femling JK, Weiss JP, Nauseef WM. Neutrophil bleaching of GFP-expressing staphylococci: probing the intraphagosomal fate of individual bacteria. *Journal of immunology*. 2009;183:2632-41.
- [91] Pang YY, Schwartz J, Thoendel M, Ackermann LW, Horswill AR, Nauseef WM. agr-Dependent interactions of *Staphylococcus aureus* USA300 with human polymorphonuclear neutrophils. *Journal of innate immunity*. 2010;2:546-59.

- [92] Murphy E, Robertson GT, Parent M, Hagijs SD, Roop RM, 2nd, Elzer PH, et al. Major histocompatibility complex class I and II expression on macrophages containing a virulent strain of *Brucella abortus* measured using green fluorescent protein-expressing brucellae and flow cytometry. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2002;33:191-200.
- [93] Jubrail J, Morris P, Bewley MA, Stoneham S, Johnston SA, Foster SJ, et al. Inability to sustain intraphagosomal killing of *Staphylococcus aureus* predisposes to bacterial persistence in macrophages. *Cellular microbiology*. 2016;18:80-96.
- [94] Kahl BC, Goulian M, van Wamel W, Herrmann M, Simon SM, Kaplan G, et al. *Staphylococcus aureus* RN6390 replicates and induces apoptosis in a pulmonary epithelial cell line. *Infection and immunity*. 2000;68:5385-92.
- [95] Drusano GL, Fregeau C, Liu W, Brown DL, Louie A. Impact of burden on granulocyte clearance of bacteria in a mouse thigh infection model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54:4368-72.
- [96] Hwang JM, Piccinini TE, Lammel CJ, Hadley WK, Brooks GF. Effect of storage temperature and pH on the stability of antimicrobial agents in MIC trays. *Journal of clinical microbiology*. 1986;23:959-61.
- [97] Nickolai DJ, Lammel CJ, Byford BA, Morris JH, Kaplan EB, Hadley WK, et al. Effects of storage temperature and pH on the stability of eleven beta-lactam antibiotics in MIC trays. *Journal of clinical microbiology*. 1985;21:366-70.
- [98] White RL, Kays MB, Friedrich LV, Brown EW, Koonce JR. Pseudoresistance of *Pseudomonas aeruginosa* resulting from degradation of imipenem in an automated susceptibility testing system with predried panels. *Journal of clinical microbiology*. 1991;29:398-400.
- [99] International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. ICH harmonised tripartite guideline validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1) Step 4 version ed1994.
- [100] Almeida AM, Castel-Branco MM, Falcao AC. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2002;774:215-22.
- [101] Erah PO, Goddard AF, Barrett DA, Shaw PN, Spiller RC. The stability of amoxicillin, clarithromycin and metronidazole in gastric juice: Relevance to the treatment of *Helicobacter pylori* infection. *J Antimicrob Chemoth*. 1997;39:5-12.
- [102] Behin S, PIAKS. Physical and chemical stability studies on cefotaxime and its dosage forms by stability indicating HPTLC method. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*. 2012;2:517-23.
- [103] Marshall SA, Kugler KC, Jones RN. Evaluation of quinupristin/dalfopristin (Synercid) and RPR 106972 stability in susceptibility testing media. *International journal of antimicrobial agents*. 2000;15:291-7.
- [104] Annis DH, Craig BA. The effect of interlaboratory variability on antimicrobial susceptibility determination. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2005;53:61-4.
- [105] Société Française de Microbiologie. AntibioGramme vétérinaire du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. 2016. p. 13.
- [106] Craig BA. Modeling approach to diameter breakpoint determination. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2000;36:193-202.
- [107] Wexler HM, Lavin PT, Molitoris E, Finegold SM. Statistical analysis of the effects of trial, reader, and replicates on MIC determination for cefoxitin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1990;34:2246-9.

- [108] Srivastava S, van Rijn SP, Wessels AMA, Alffenaar JWC, Gumbo T. Susceptibility Testing of Antibiotics That Degrade Faster than the Doubling Time of Slow-Growing Mycobacteria: Ertapenem Sterilizing Effect versus Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016;60:3193-5.
- [109] Nielsen EI, Friberg LE. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of antibacterial drugs. *Pharmacological reviews*. 2013;65:1053-90.
- [110] Zhuang L, Sy SK, Xia H, Singh RP, Mulder MB, Liu C, et al. Evaluation of in vitro synergy between vertilmicin and ceftazidime against *Pseudomonas aeruginosa* using a semi-mechanistic pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *International journal of antimicrobial agents*. 2015;45:151-60.
- [111] Harms A, Maisonneuve E, Gerdes K. Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. *Science*. 2016;354.
- [112] Balaban NQ, Merrin J, Chait R, Kowalik L, Leibler S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science*. 2004;305:1622-5.
- [113] Patra P, Klumpp S. Population dynamics of bacterial persistence. *PloS one*. 2013;8:e62814.
- [114] Drusano GL. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antimicrobials. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2007;45 Suppl 1:S89-95.
- [115] Murphy KP. Innate immunity: the first lines of defenses. *Janeway's immunobiology*. 8th ed. New York: Garland science; 2012. p. 888.
- [116] Judy BM, Whitlock GC, Torres AG, Estes DM. Comparison of the in vitro and in vivo susceptibilities of *Burkholderia mallei* to Ceftazidime and Levofloxacin. *BMC microbiology*. 2009;9:88.
- [117] Nomura S, Nagayama A. In vitro and in vivo enhancement of bactericidal activity of phagocytes against *Klebsiella pneumoniae* treated with subminimal inhibitory concentrations of cefodizime. *Chemotherapy*. 1995;41:178-86.
- [118] Wang C, Yu X, Cao Q, Wang Y, Zheng G, Tan TK, et al. Characterization of murine macrophages from bone marrow, spleen and peritoneum. *BMC immunology*. 2013;14:6.
- [119] Herbert S, Ziebandt AK, Ohlsen K, Schafer T, Hecker M, Albrecht D, et al. Repair of global regulators in *Staphylococcus aureus* 8325 and comparative analysis with other clinical isolates. *Infection and immunity*. 2010;78:2877-89.
- [120] Johnson JD, Hand WL, Francis JB, King-Thompson N, Corwin RW. Antibiotic uptake by alveolar macrophages. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1980;95:429-39.
- [121] Brown KN, Percival A. Penetration of antimicrobials into tissue culture cells and leucocytes. *Scandinavian journal of infectious diseases Supplementum*. 1978:251-60.
- [122] Valdivia RH, Hromockyj AE, Monack D, Ramakrishnan L, Falkow S. Applications for green fluorescent protein (GFP) in the study of host-pathogen interactions. *Gene*. 1996;173:47-52.
- [123] Lemaire S, Glupczynski Y, Duval V, Joris B, Tulkens PM, Van Bambeke F. Activities of ceftobiprole and other cephalosporins against extracellular and intracellular (THP-1 macrophages and keratinocytes) forms of methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53:2289-97.
- [124] Baek YS, Haas S, Hackstein H, Bein G, Hernandez-Santana M, Lehrach H, et al. Identification of novel transcriptional regulators involved in macrophage differentiation and activation in U937 cells. *BMC immunology*. 2009;10:18.

- [125] Weischenfeldt J, Porse B. *Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM): Isolation and Applications*. CSH protocols. 2008;2008:pdb prot5080.
- [126] Nishino T, Nakazawa S. *Morphological changes in Staphylococcus aureus and Escherichia coli exposed to cephalixin*. Japanese journal of microbiology. 1972;16:83-94.
- [127] Tullio V, Cuffini AM, Cavallo R, Allocco A, Carlone NA. *Effect of ceftriaxone on the phagocytosis and intracellular killing of Staphylococcus aureus by human macrophages*. Journal of chemotherapy. 1994;6:177-83.
- [128] Sandberg A, Hessler JH, Skov RL, Blom J, Frimodt-Moller N. *Intracellular activity of antibiotics against Staphylococcus aureus in a mouse peritonitis model*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2009;53:1874-83.
- [129] Van Bambeke F, Barcia-Macay M, Lemaire S, Tulkens PM. *Cellular pharmacodynamics and pharmacokinetics of antibiotics: current views and perspectives*. Current opinion in drug discovery & development. 2006;9:218-30.
- [130] Okusawa S, Gelfand JA, Ikejima T, Connolly RJ, Dinarello CA. *Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition*. J Clin Invest. 1988;81:1162-72.
- [131] Hack CE, De Groot ER, Felt-Bersma RJ, Nuijens JH, Strack Van Schijndel RJ, Eerenberg-Belmer AJ, et al. *Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis*. Blood. 1989;74:1704-10.
- [132] McDonald C, Inohara N, Nunez G. *Peptidoglycan signaling in innate immunity and inflammatory disease*. The Journal of biological chemistry. 2005;280:20177-80.
- [133] Miao EA, Rajan JV, Aderem A. *Caspase-1-induced pyroptotic cell death*. Immunological reviews. 2011;243:206-14.
- [134] Liang YD, Bai WJ, Li CG, Xu LH, Wei HX, Pan H, et al. *Piperine Suppresses Pyroptosis and Interleukin-1beta Release upon ATP Triggering and Bacterial Infection*. Frontiers in pharmacology. 2016;7:390.
- [135] Jiang X, Wang Y, Qin Y, He W, Benlahrech A, Zhang Q, et al. *Micheliolide provides protection of mice against Staphylococcus aureus and MRSA infection by down-regulating inflammatory response*. Scientific reports. 2017;7:41964.
- [136] Savage VJ, Chopra I, O'Neill AJ. *Population diversification in Staphylococcus aureus biofilms may promote dissemination and persistence*. PloS one. 2013;8:e62513.
- [137] Mirani ZA, Aziz M, Khan SI. *Small colony variants have a major role in stability and persistence of Staphylococcus aureus biofilms*. The Journal of antibiotics. 2015;68:98-105.
- [138] Proctor RA, Kriegeskorte A, Kahl BC, Becker K, Löffler B, Peters G. *Staphylococcus aureus Small Colony Variants (SCVs): a road map for the metabolic pathways involved in persistent infections*. Frontiers in cellular and infection microbiology. 2014;4:99.
- [139] Schroder A, Kland R, Peschel A, von Eiff C, Aepfelbacher M. *Live cell imaging of phagosome maturation in Staphylococcus aureus infected human endothelial cells: small colony variants are able to survive in lysosomes*. Medical microbiology and immunology. 2006;195:185-94.
- [140] Glaser R, Becker K, von Eiff C, Meyer-Hoffert U, Harder J. *Decreased susceptibility of Staphylococcus aureus small-colony variants toward human antimicrobial peptides*. The Journal of investigative dermatology. 2014;134:2347-50.
- [141] Toutain PL, Bousquet-Melou A, Martinez M. *AUC/MIC: a PK/PD index for antibiotics with a time dimension or simply a dimensionless scoring factor?* The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2007;60:1185-8.

**TITLE:** Influence of bacterial inoculum size on antibiotic treatment activity: development of an in vitro model including bacteria, antibiotics and cells of the innate immune system.

---

**SUMMARY:** As one of the current pre-eminent public health concerns is to reasonably use antibiotics in order to limit antibacterial resistance development, it appears relevant to determine the plasmatic exposition profile that would lead to the best efficiency of the antibiotic on pathogenic bacteria. The bacterial load is not stationary during an infection but it increases or decreases with an effective antibiotic treatment. The aim of this thesis was to evaluate the influence of variation of the bacterial load on antibiotic and immune system activity.

First, we showed that during antibacterial sensibility tests, such as standard MIC determination, some antibiotics underwent abiotic degradation during incubation, with a magnitude depending on the drug tested. This degradation can increase MIC and MBC values. However, the observed discrepancy (less than one twofold dilution) suggests that this would only be clinically significant in special cases such as slow-growing bacteria.

Then, we studied, with *E. coli* and *S. aureus*, the in vitro effect of the bacterial inoculum size on bactericidal activity of 2 cephalosporins, cephalexin and cefprozil. We observed a decrease of bactericidal activity of both cephalosporins with an increase of the initial inocula of *E. coli* and *S. aureus*. A decreased efficacy and potency of the 2 cephalosporins against *S. aureus* compared to *E. coli* was also found.

Finally, we developed an in vitro 3-components model including a bacterium –*S. aureus*-, cells of the immune system -murine bone-marrow-derived macrophages- and an antibiotic –cephalexin-. Within this system, we tested several initial bacterial inoculum sizes and different antibiotic concentrations. Increased bacterial phagocytosis and macrophage mortality were observed with increasing bacterial inocula. Bactericidal activity of macrophages was saturable and faced to a large bacterial inoculum, some macrophages became a reservoir for living *S. aureus*. With cephalexin, which is an extracellular antibiotic, extracellular bacteria diminished over time implying a diminution of the bacteria to be phagocytosed by macrophages. Thus, macrophages bactericidal and survival abilities were preserved with cephalexin and small bacterial inocula. This effect of the antibiotic was no longer visible with highest bacterial inocula for which limited action of cephalexin did not allow to prevent macrophages bursting.

The tripartite model we developed is a first step toward innovative in vitro models combining elements of innate immunity with classical bacteria/antibiotics pharmacological models, with the objective of optimising preclinical evaluation of antibacterial drugs.

---

**KEY-WORDS :** antibiotics, immune system, bacterial inoculum, macrophages, *Staphylococcus aureus*, cephalexin, *Escherichia coli*, bactericidal activity

**AUTEUR** : Elodie LALLEMAND

**TITRE** : Impact de la taille de l'inoculum bactérien sur l'efficacité d'un traitement antibiotique : développement d'un modèle *in vitro* associant bactéries, antibiotiques et cellules du système immunitaire inné.

**DIRECTEURS DE THESE** : Pr Alain Bousquet-Mélou et Dr Séverine Boullier

**LIEU ET DATE DE SOUTENANCE** : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Le 14 juin 2017

---

**RESUME** : Dans un contexte d'usage raisonné des antibiotiques lié au développement des résistances bactériennes, il est pertinent de chercher à optimiser les profils d'exposition plasmatique qui conduiraient à la meilleure efficacité de l'antibiotique sur les bactéries pathogènes. La charge bactérienne n'est pas stationnaire tout au long du développement d'une infection, mais elle augmente spontanément ou diminue avec un traitement antibactérien efficace. L'objectif de cette thèse était d'évaluer l'influence de la variation de la charge bactérienne sur l'efficacité des antibiotiques et du système immunitaire.

Au cours d'un premier travail, nous avons montré que dans les conditions de réalisation de tests de sensibilité *in vitro* (détermination de CMI), une dégradation de certains antibiotiques se produisait, d'amplitude variable selon les molécules testées. Cette dégradation peut être responsable d'une augmentation des valeurs de CMI et de CMB. Les variations observées étaient cependant inférieures à une dilution au demi dans une gamme de concentrations. Cette dégradation ne devrait pas avoir d'impact significatif sur les résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques concernés, excepté dans des cas particuliers comme des pathogènes à croissance très lente.

Dans un deuxième travail, nous avons étudié *in vitro* chez *E. coli* et *S. aureus* l'effet de la taille de l'inoculum bactérien sur l'activité bactéricide de 2 céphalosporines, la céphalexine et le cefprozil. Nous avons observé une diminution de l'activité bactéricide des 2 céphalosporines avec l'augmentation de la taille de l'inoculum chez *E. coli* et *S. aureus*. Nous avons également montré une efficacité et une puissance moins importante des 2 céphalosporines sur *S. aureus* par rapport à *E. coli*.

Dans un troisième temps, nous avons développé un système incluant les trois composantes suivantes : une bactérie - *S. aureus* -, des cellules du système immunitaire - des macrophages murins issus de la moelle osseuse - et un antibiotique -la céphalexine-. Dans ce système, nous avons fait varier la taille de l'inoculum bactérien de départ ainsi les concentrations en antibiotique. Une augmentation de la phagocytose bactérienne et de la mortalité des macrophages ont été observées avec l'augmentation de la charge bactérienne. L'activité bactéricide des macrophages était saturable et en présence d'une charge bactérienne trop importante, une partie des macrophages sont devenus un réservoir de *S. aureus* phagocytés. En présence de la céphalexine, qui a une distribution exclusivement extracellulaire, les quantités de bactéries extracellulaires, « candidates » à la phagocytose, ont diminué. Ainsi, en présence de céphalexine et pour les charges bactériennes initiales les plus faibles, les capacités de survie et de bactéricidie des macrophages ont été préservées. Cette action n'a cependant plus été visible en présence de gros inocula bactériens pour lesquels l'action limitée de la céphalexine n'a pas permis de prévenir la saturation des macrophages et ses conséquences.

Le modèle à trois composantes que nous avons développé constitue une première étape dans le développement de modèles *in vitro* qui associent des éléments de l'immunité innée aux modèles pharmacologiques classiques bactéries/antibiotiques, avec l'objectif d'optimiser l'évaluation préclinique de molécules antibactériennes.

---

**MOTS-CLES** : antibiotiques, système immunitaire, inoculum bactérien, macrophages, *Staphylococcus aureus*, céphalexine, *Escherichia coli*, bactéricidie

---

**SPECIALITE** : Pharmacologie

---

**INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE** :

ENVY-INRA UMR 1331 TOXALIM  
23, Chemin des Capelles, BP 87614  
31076 Toulouse Cedex 3