



HAL
open science

Développement d'un modèle *in vitro* dynamique innovant pour l'optimisation des schémas thérapeutiques des antibiotiques

Diane Broussou

► **To cite this version:**

Diane Broussou. Développement d'un modèle *in vitro* dynamique innovant pour l'optimisation des schémas thérapeutiques des antibiotiques. Médecine humaine et pathologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2018. Français. NNT : 2018TOU30217 . tel-02316011

HAL Id: tel-02316011

<https://theses.hal.science/tel-02316011>

Submitted on 15 Oct 2019

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.

THESE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE TOULOUSE

Délivré par l'Université de Toulouse III – Paul Sabatier

Discipline ou spécialité : *Pharmacologie*

Présentée et soutenue par *Diane BROUSSOU*

Le 15 octobre 2018

Titre : *Développement d'un modèle in vitro dynamique innovant pour l'optimisation des schémas thérapeutiques des antibiotiques*

JURY

Monsieur le Professeur Alain BOUSQUET-MELOU

Monsieur le Professeur William COUET

Monsieur le Docteur Farid EL GARCH

Madame le Docteur Aude FERRAN

Monsieur le Professeur Jean-Yves MADEC

Madame le Professeur Christine ROQUES

Madame le Professeur Françoise VAN BAMBEKE

Madame le Docteur Frédérique WOHRLE

Examineur

Rapporteur

Membre invité

Examineur

Examineur

Examineur

Rapporteur

Membre invité

École Doctorale : *Biologie Santé Biotechnologie*

Unité de Recherche : *INTHERES UMR 1436 INRA ENVT*

Directeurs de thèse : *Madame le Docteur Aude FERRAN*

Monsieur le Professeur Alain BOUSQUET-MELOU

Rapporteurs : *Monsieur le Professeur William COUET*

Madame le Professeur Françoise VAN BAMBEKE

Remerciements

A Madame le Professeur Françoise VAN BAMBEKE et Monsieur le Professeur William COUET qui ont accepté de consacrer de leur temps de lecture et à l'appréciation de ce manuscrit. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma respectueuse gratitude.

A Madame le Professeur Christine ROQUES, qui m'a fait l'honneur d'accepter de faire partie de mon comité et de mon jury de thèse. Qu'elle soit assurée de mes plus sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur Jean-Yves MADEC, qui m'a fait l'honneur d'accepter de faire partie de mon jury de thèse. Qu'il soit assuré de mes plus sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur Farid EL GARCH et Madame le Docteur Frédérique WOEHRLE, qui ont eu la gentillesse de m'accueillir au sein de l'entreprise Vétoquinol, sans qui ce travail de thèse n'aurait pas pu voir le jour. Qu'ils soient assurés de tout mon respect et de toute ma reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Alain BOUSQUET-MELOU et Madame le Docteur Aude FERRAN, qui m'ont accueillie comme doctorante, m'ont aidée et guidée tout au long de ces années de thèse. Qu'ils soient assurés de ma plus sincère reconnaissance pour m'avoir permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions possibles.

Remerciements

A tous les membres de l'Unité INTHERES ainsi que tous les membres de l'unité TOXALIM qui m'ont soutenue et encadrée pendant ces 3 ans de thèse,
A toute l'équipe de VETOQUINOL, pour son accueil chaleureux,
A ma famille,
A mes amis,
A toute l'équipe du centre équestre,

Avant-propos

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

Publications :

1. Diane C Broussou, Marlene Z Lacroix, Pierre-Louis Toutain, Farid El Garch, Frédérique Woehrlé, Alain Bousquet-Mélou and Aude A Ferran

Differential activity of the combination of vancomycin and amikacin on planktonic versus biofilm-growing *Staphylococcus aureus* in a Hollow Fiber Infection Model

Frontiers in Microbiology, Section Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy, volume 9

2. Diane C Broussou, Marlene Z Lacroix, Pierre-Louis Toutain, Farid El Garch, Frédérique Woehrlé, Alain Bousquet-Mélou and Aude A Ferran

***In vitro* static and dynamic assays are complementary tools to evaluate the efficacy of antimicrobial drugs combination against *Staphylococcus aureus* infections.**

PIOs one, en review au moment de la rédaction

Communications orales :

1. Diane C Broussou

Chronic infections and *in vitro* optimization of current antibiotics treatments: focus on *Staphylococcus aureus*

Fourteenth International Congress of the EAVPT, 24-27 June 2018, Wroclaw, Poland

2. Diane C Broussou, Marlene Z Lacroix, Pierre-Louis Toutain, Farid El Garch, Frédérique Woehrlé, Alain Bousquet-Mélou and Aude A Ferran

Assessment of amikacin and vancomycin combination efficacy on two *Staphylococcus aureus* strains: a comparison between static and dynamic *in vitro* methods

Fourteenth International Congress of the EAVPT, 24-27 June 2018, Wroclaw, Poland

3. Diane C Broussou

Un modèle *in vitro* dynamique pour explorer l'efficacité des traitements antibiotiques

Rencontres scientifiques de l'ANSES, Antibiorésistance en Santé Animale et dans l'Environnement, 15 Novembre 2017, Paris, France

4. Diane C Broussou

***In vitro* optimization of current antibiotics treatments: antibiotics combination on a *Staphylococcus aureus* biofilm in a Hollow-Fiber Infection Model**

Infection Control Committee, 23 June 2017, Royal Veterinary College, London, United Kingdom

Posters :

1. DC Broussou, MZ Lacroix, PL Toutain, F. El Garch, F. Woehrlé, A. Bousquet-Mélou and AA Ferran

Original use of a Hollow-Fiber Infection Model to investigate a 5-days antibiotic combination against a *Staphylococcus aureus* biofilm

Fourteenth International Congress of the EAVPT, 24-27 June 2018, Wroclaw, Poland
Sélectionné pour une presentation orale

2. F. El Garch, DC Broussou, M. Schneider and F. Woehrlé

Marbofloxacin activity against *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis: *In vitro* Pharmacokinetic/Pharmacodynamic testing, using a hollow fiber system, of a single intramuscular administration of marbofloxacin at 2 different doses, 2 mg/kg and 10 mg/kg

Fourteenth International Congress of the EAVPT, 24-27 June 2018, Wroclaw, Poland

3. Broussou D., Toutain PL., El Garch F., Whoerlé F., Bousquet-Melou A., Ferran A.

PK/PD study of vancomycin and amikacin alone or in combination on a mature *Staphylococcus aureus* biofilm in an *in vitro* dynamic model

Twenty-seventh ECCMID Congress, 25-27 April 2017, Vienna, Austria

4. Broussou D., Toutain PL., El Garch F., Whoerlé F., Bousquet-Melou A., Ferran A.

The Hollow-Fiber Infection Model: an *in vitro* dynamic model for the optimization of current and new antibiotic treatments

Journée MicrobioToul, 25 avril 2017, Toulouse, France

5. Broussou D., Toutain PL., El Garch F., Whoerlé F., Bousquet-Melou A., Ferran A.

The Hollow-Fiber Infection Model: an *in vitro* dynamic model for the optimization of current and new antibiotic treatments

BacTouBac, L'innovation face au défi bactérien, décembre 2016, Toulouse, France

Sélectionné pour une présentation orale

Table des matières

Avant-propos	5
Table des illustrations	14
Liste des abréviations	17
Introduction	19
1 Étude bibliographique	23
1.1 Les biofilms bactériens	25
1.1.1 Structure d'un biofilm bactérien	25
1.1.1.1 La matrice	25
1.1.1.2 Étapes de formation d'un biofilm	26
1.1.1.3 Structure générale d'un biofilm et avantages conférés	27
1.1.2 Les différentes infections associées à des biofilms bactériens en médecine humaine et en médecine vétérinaire	28
1.2 Particularités conférées par le mode de survie en biofilm et méthodes de lutte	30
1.2.1 Le caractère récalcitrant des biofilms aux traitements est un phénomène multifactoriel	30
1.2.1.1 Résistance aux traitements antibiotiques : mutations et hétérogénéité métaboliques	30
1.2.1.2 Stress métabolique et tolérance aux traitements antibiotiques	31
1.2.1.3 Survie des bactéries lors d'un traitement antibiotique grâce à la structure du biofilm	32
1.2.1.3.1 Diminution et ralentissement de la diffusion des antibiotiques dans le biofilm	32
1.2.1.3.2 Échappement au système immunitaire	33
1.2.2 Méthodes de lutte contre les biofilms	34
1.2.2.1 Méthodes non spécifiques	34
1.2.2.2 Méthodes préventives	34
1.2.2.3 Méthodes curatives	35
1.3 Méthodes d'étude de l'activité des antibiotiques	37
1.3.1 Étude de l'efficacité sur les bactéries planctoniques	37
1.3.1.1 La concentration minimale inhibitrice et l'antibiogramme	37
1.3.1.2 Le checkerboard assay	38
1.3.1.3 Courbes de bactéricidies avec concentration constante d'antibiotique	40
1.3.1.4 Courbes de bactéricidies avec concentration variable d'antibiotique	41
1.3.1.4.1 Le système ouvert	41
1.3.1.4.2 Le modèle Hollow Fiber	42
1.3.1.4.3 Débit d'élimination des antibiotiques	44
1.3.1.5 Modèles d'études sur animaux	45
1.3.1.6 Paramètres prédictifs de l'efficacité	46
1.3.2 Étude de l'efficacité sur les biofilms bactériens	47
1.3.2.1 Bactéricidie avec concentration constante d'antibiotique	47
1.3.2.1.1 La concentration minimale d'éradication du biofilm	47
1.3.2.1.2 Modèles de croissance de biofilm en plaques	49
1.3.2.2 Bactéricidies avec concentration variable d'antibiotique	49
1.3.2.3 Modèles animaux	51
1.4 La vancomycine	53
1.4.1 Spectre d'activité	53
1.4.2 Propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques	53
1.4.3 Mécanisme d'action des glycopeptides	55
1.4.3.1 Cibles	55
1.4.3.2 Paramètres prédictifs de l'efficacité	55
1.4.4 Toxicité	56
1.4.5 Résistance	56
1.4.6 Associations	58

1.5	L'amikacine	59
1.5.1	Spectre d'activité	59
1.5.2	Propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques	59
1.5.3	Mécanisme d'action des aminosides.....	61
1.5.3.1	Cibles	61
1.5.3.2	Paramètres prédictifs de l'efficacité	61
1.5.4	Toxicité.....	61
1.5.5	Persistance des infections, le cas particulier des Small Colony Variants	62
1.5.6	Résistance	63
1.6	La marbofloxacin	64
1.6.1	Spectre d'activité	64
1.6.2	Usage des fluoroquinolones en France : réglementation	64
1.6.3	Propriétés PK/PD	66
1.6.4	Mécanisme d'action	67
1.6.4.1	Cibles intrabactériennes	67
1.6.4.2	Mécanisme de fixation des fluoroquinolones aux complexes enzymes/ADN.....	67
1.6.4.3	Paramètre prédictif de l'efficacité	68
1.6.5	Toxicité.....	68
1.6.6	Résistance	68
1.7	Conclusion et projet de thèse	70
2	Étude expérimentale	73
2.1	Contribution de l'utilisation de modèles <i>in vitro</i> dynamiques à l'évaluation de l'efficacité d'une combinaison d'antibiotiques sur des bactéries planctoniques	75
2.1.1	Problématique	75
2.1.2	Objectif	76
2.1.3	Matériel et Méthodes.....	76
2.1.3.1	Souches bactériennes et antibiotiques.....	76
2.1.3.2	Schéma expérimental	77
2.1.3.3	Évaluation de la sensibilité.....	77
2.1.3.4	Checkerboard assay	77
2.1.3.5	Courbes de bactéricidie avec concentrations statiques d'antibiotiques.....	78
2.1.3.6	Courbes de bactéricidie avec concentrations fluctuantes d'antibiotiques	78
2.1.3.7	Méthode de dénombrement des bactéries.....	79
2.1.4	Résultats	80
2.1.4.1	Sensibilité des souches	80
2.1.4.2	Évaluation de l'activité des antibiotiques seuls ou en combinaison par des méthodes statiques	80
2.1.4.2.1	Checkerboard assay	80
2.1.4.2.2	Bactéricidie avec concentration constante d'antibiotiques	81
2.1.4.3	Évaluation de l'activité des antibiotiques seuls ou en combinaison lors de bactéricidie avec concentrations dynamiques d'antibiotiques	82
2.1.5	Discussion	84
2.1.6	Article 1.....	88
2.2	Évaluation <i>in vitro</i> de modifications des posologies de deux antibiotiques utilisés en combinaison pour optimiser leur usage sur un biofilm bactérien.	115
2.2.1	Problématique	115
2.2.2	Objectif	116
2.2.3	Matériel et Méthodes.....	117
2.2.3.1	Étude PK/PD	117
2.2.3.1.1	Courbes de bactéricidie avec concentrations fluctuantes d'antibiotiques dans le HFIM	117
2.2.3.1.2	Méthode de dénombrement des bactéries planctoniques	118
2.2.3.1.3	Méthode de dénombrement des bactéries du biofilm.....	119
2.2.3.1.4	Dosage des antibiotiques	119

2.2.3.2	Statistiques.....	120
2.2.4	Résultats	120
2.2.4.1	Analyse pharmacocinétique.....	120
2.2.4.2	Analyse PK/PD.....	121
2.2.4.2.1	Efficacité du traitement sur les bactéries planctoniques	121
2.2.4.2.2	Efficacité du traitement sur les bactéries du biofilm	124
2.2.4.2.3	Prévention de la sélection de résistances	125
2.2.5	Discussion	127
2.2.6	Article 2.....	131
2.3	Optimisation du modèle et application à la médecine vétérinaire : développement d'un modèle adapté à l'étude des mammites bactériennes	143
2.3.1	Problématique	143
2.3.2	Objectifs.....	144
2.3.3	Matériel et méthodes.....	145
2.3.3.1	Bactérie et antibiotique	145
2.3.3.2	Préparation de l'inoculum bactérien	145
2.3.3.3	Hollow Fiber et bactéricidie dynamique	145
2.3.3.3.1	Préparation du système	145
2.3.3.3.2	Pharmacocinétique et choix des paramètres	146
2.3.3.3.2.1	Débit d'élimination	146
2.3.3.3.2.2	Choix des doses	147
2.3.3.4	Dosage.....	148
2.3.3.5	Analyse PK/PD.....	148
2.3.4	Résultats	149
2.3.4.1	Concentrations d'antibiotiques simulées dans le HF.....	149
2.3.4.2	Évaluation de l'efficacité du traitement	150
2.3.5	Discussion	151
2.4	Optimisation du modèle, vers l'ajout de composants du système immunitaire : toxicité des antibiotiques et phagocytose des bactéries, une étude préliminaire.	154
2.4.1	Problématique	154
2.4.2	Objectifs.....	155
2.4.3	Matériel et méthodes.....	155
2.4.3.1	Souches bactériennes	155
2.4.3.2	Les macrophages.....	156
2.4.3.2.1	La lignée cellulaire de monocytes	156
2.4.3.2.2	Différenciation des monocytes en macrophages	156
2.4.3.2.3	Récupération et comptage des macrophages	157
2.4.3.2.3.1	Décollement des macrophages	157
2.4.3.2.3.2	Comptage à la lame Thoma.....	157
2.4.3.3	Évaluation de la toxicité de la marbofloxacin sur les macrophages.....	157
2.4.3.3.1	Co-incubation antibiotique et macrophages	157
2.4.3.3.2	Évaluation de la toxicité de la marbofloxacin par comptage et cytométrie de flux	158
2.4.3.4	Diptyque macrophages – bactéries	158
2.4.3.4.1	Courbes de bactéricidie des bactéries extracellulaires à différentes MOI	158
2.4.3.4.2	Quantification de la phagocytose des bactéries par les macrophages	159
2.4.4	Résultats	160
2.4.4.1	Toxicité de la marbofloxacin	160
2.4.4.1.1	Évaluation par comptage direct.....	160
2.4.4.1.2	Évaluation par FACS de la taille et granulosité des macrophages après incubation en présence ou absence de marbofloxacin.....	161
2.4.4.2	Une action limitée des macrophages sur la prévention de la croissance bactérienne extracellulaire et une faible internalisation de bactéries	163
2.4.5	Discussion	165
2.5	Optimisation du modèle pour l'étude des mammites de la vache laitière, étude préliminaire à l'ajout de composants du système immunitaire.	168

2.5.1	Problématique	168
2.5.2	Objectifs	169
2.5.3	Matériel et méthodes	169
2.5.3.1	Récupération des PBMC à partir du sang de génisses.....	169
2.5.3.1.1	Prélèvement de sang périphérique.....	169
2.5.3.1.2	Isolement des cellules mononuclées du sang périphérique.....	169
2.5.3.2	Évaluation de la survie selon le milieu de culture utilisé.....	170
2.5.4	Résultats	170
2.5.4.1	Rendement de récupération de PBMC.....	170
2.5.4.2	Survie dans le lait par rapport au RPMI	171
2.5.5	Discussion	171
	<i>Discussion générale.....</i>	173
	<i>Références</i>	183

Table des illustrations

Figure 1 : Les différentes étapes de formation d'un biofilm, adapté de Lebeaux et al (2014).	27
Figure 2 : 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 l'incubation de 16 à 20h à 35°C.....	38
Figure 3 : Principe du checkerboard assay et de la détermination du FIC index. Ici, $FIC_i = 1/4 + 4/32 = 0.625$	39
Figure 4 : Représentation schématique des courbes de bactéricidie. La figure de gauche représente le cas d'un antibiotique concentration-dépendant ; l'activité bactéricide augmente avec la concentration utilisée. La figure de droite représente le cas d'un antibiotique temps-dépendant ; l'activité de l'antibiotique n'augmente pas avec la concentration, mais avec le temps.....	40
Figure 5 : Système in vitro dynamique ouvert. Les bactéries sont mises au contact de 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.....	42
Figure 6 : Système Hollow Fiber complet. La Duet Pump assure la circulation de milieu de culture dans tout le système. Deux pompes permettent la dilution de l'antibiotique et l'élimination de milieu pour rester à volume constant. La cartouche est directement mise dans une étuve. Adapté de Cadwell	43
Figure 7 : Schéma des entrées et 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	44
Figure 8 : Paramètres pharmacocinétiques utilisés pour décrire l'exposition d'un organisme à un antibiotique	46
Figure 9 : Le CBD et la détermination de la MBEC. A/ Formation du biofilm, B/ Schéma d'un biofilm sur un picot, C/ Transfert du couvercle avec les picots sur une plaque 96 puits. Adapté de Innovotech.ca	48
Figure 10 : Représentation d'un CDC bioréacteur, adapté de BioSurface Technologies Corp., Bozeman, MT, USA	51
Figure 11 : molécule de vancomycine	54
Figure 12 : modèle proposé pour expliquer la capture et immobilisation de la vancomycine par les bactéries VISA et VRSA. Adapté de Sieradzki, Pinho et Tomasz	58
Figure 13 : molécule d'amikacine, avec le noyau central, les deux sucres aminés et la chaîne associés.....	60
Figure 14 : Molécule de marbofloxacin avec les groupements d'intérêt pour l'activité antibactérienne entourés.....	66
Figure 15 : Courbes de bactéricidie (en \log_{10} UFC/mL) pour le MSSA (A et B) et le MRSA (C et D) exposées à 18 μ g/mL de vancomycine (en vert), 70 μ g/mL d'amikacine (en bleu) et leur combinaison (en rouge) ou sans antibiotique (en noir) dans du BMH (A et C) ou du RPMI (B et D) (concentration moyenne de bactéries \pm écart-type, n=2) pendant 24h.....	82

Figure 16 : Courbes de bactéricidie (en \log_{10} UFC/mL) des deux inocula du MSSA (croix pour l'inoculum standard et carrés pour le gros inoculum) exposés à 18 μ g/mL de vancomycine (en vert), 70 μ g/mL d'amikacine (en bleu) et leur combinaison (en rouge) dans du RPMI (concentration moyenne de bactéries \pm écart-type, n=2) pendant 24h.	83
Figure 17 : Profils de concentrations attendues (bleu) et obtenues (rouge) dans le HF lors des 5 jours d'essai.....	121
Figure 18 : Taille des populations bactériennes planctoniques (en orange) et du biofilm (en bleu) (en \log_{10} UFC/mL) pour les essais contrôles et en présence d'antibiotiques utilisés seuls ou en combinaison pendant 5 jours dans un HF.....	122
Figure 19 : Suivi des populations bactériennes planctoniques lors de traitements à la vancomycine seule (bleu) ou amikacine seule (orange) et suivi des bactéries planctoniques capables de pousser sur des géloses supplémentées avec 3 fois la CMI d'amikacine au cours d'un traitement à l'amikacine seule (moyenne \pm écart-type, n = 2 pour chaque traitement)	123
Figure 20 : Suivi des populations bactériennes planctoniques lors de 5 jours de traitements avec une combinaison de vancomycine et amikacine aux posologies recommandées en bolus (bleu), aux posologies recommandées mais en mimant une perfusion continue de vancomycine (noir) et avec C_{max} plus importants d'amikacine (rouge et vert) (moyenne \pm écart-type, n = 2 pour chaque traitement)	124
Figure 21 : Populations de bactéries planctoniques totales (orange foncé), capables de croître sur géloses supplémentées avec 3 fois (orange) et 6 fois la CMI d'amikacine (orange pâle) après 5 jours dans le HF sans traitement (contrôle), à l'amikacine seule (Amikacine 70) ou avec différents schémas thérapeutiques de la combinaison amikacine et vancomycine (A70 V18, 195 V18, A130 V18 et A70 CRIV9).	125
Figure 22 : Populations de bactéries du biofilm totales (bleu marine), capables de croître sur géloses supplémentées avec 3 fois (bleu roi) et 6 fois la CMI d'amikacine (bleu clair) après 5 jours dans le HF sans traitement (contrôle), à l'amikacine seule (Amikacine 70) ou avec différents schémas thérapeutiques de la combinaison amikacine et vancomycine (A70 V18, 195 V18, A130 V18 et A70 CRIV9).	126
Figure 23 : concentration moyennes dans le lait après une administration unique de marbofloxacin à 10mg/kg à 10 vaches laitières	146
Figure 24 : \log_{10} réduction à 24h de l'inoculum initial en fonction de l'AUC/CMI obtenue dans le modèle.....	150
Figure 25 : Profils taille-granulométrie au FACS après incubation des macrophages avec de la marbofloxacin à différentes concentrations (0, 1, 10, 100 ou 500 ug/mL) ou non (contrôle) pendant 12 heures pour les deux plaques.....	163
Figure 26 : Concentration bactérienne planctonique de <i>S. aureus</i> et <i>E. coli</i> en présence de macrophages à une MOI de 0.05 (M+) ou lors d'expériences contrôle sans macrophages (M-) et concentration de bactéries internalisées par les macrophages après 4 heures d'incubation (\log_{10} UFC/mL) à une MOI de 0.05 (moyenne \pm écart type, n=2 pour chaque condition).....	164

Tableau 1 : Schéma expérimental de l'étude et conditions de réalisation des différents essais	77
Tableau 2 : CMI pour la vancomycine et l'amikacine ($\mu\text{g}/\text{mL}$) pour la souche MRSA et la MSSA	80
Tableau 3 : Concentrations de marbofloxacin obtenues dans le lait (en $\mu\text{g}/\text{mL}$) après une administration unique intramusculaire à 10mg/kg et concentrations théoriques pour les autres doses à reproduire dans le modèle dynamique	147
Tableau 4 : Concentrations théoriques et obtenues dans le hollow fiber à 4h pour les différentes posologies testées ainsi que les déviations (en %) entre valeur attendue et obtenue.	149
Tableau 5 : AUC/CMI, AUC0-10h et AUC 0-24h attendues et obtenues dans le Hollow Fiber ainsi que les déviations (en %) entre valeur attendue et obtenue.	150
Tableau 6 : Comptages de macrophages dans les puits en présence ou non de marbofloxacin (\log_{10} cellules/puits)	160
Tableau 7 : Événements totaux et dans la fenêtre de taille – granulométrie correspondant à des macrophages vivants lors de passage au FACS après incubation pendant 24h ou non avec de la marbofloxacin et récupération des macrophages adhérents	161
Équation 1	39
Équation 2	44
Équation 3	44
Équation 4	45
Équation 5	120
Équation 6	148

Liste des abréviations

A	Amikacine
ATCC	American Type Cell Culture
AUC	Aire sous la courbe des concentrations (Area Under the Curve)
BMH	Bouillon Mueller Hinton
CBD	Calgary Biofilm Device
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CA	Checkerboard Assay
C _{max}	Concentration maximale en antibiotique
Cl	Clairance
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CMT	California Mastitis Test
CRI	Perfusion à concentrations constante (Constant Rate Infusion)
D-ala-D-ala	D-alanyl-D-alanine
dTKS	Bactéricidies en dynamique (dynamic Time-Kill Studies)
EEC	Espace Extra Capillaire
ENVT	Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
EPS	Extracellular Polymeric Substances
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FIC	Fractional Inhibitory Concentration
FS	Fenêtre de Sélection
HF	Hollow
HPLC	Chromatographie Liquide Ultra Haute Performance (High Performance Liquid Chromatography)
INRA	Institut National de Recherche Agronomique
LI	Inoculum de grande taille (Large Inoculum)
LOD	Limite de Détection (Limite of Detection)
MBEC	Concentration minimale Eradiquant le Biofilm (Minimal Biofilm Eradication Concentration)
MRSA	<i>S. aureus</i> Résistant à la Méthicilline Methicillin Resistant <i>S. aureus</i> (SARM)
MSSA	<i>S. aureus</i> sensible à la Méthicilline (Methicillin Sensitive <i>S. aureus</i>)
MH	Mueller-Hinton
MOI	Multiplicity of Infection
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBMC	Cellules Mononucléées du Sang Périphérique (Peripheral Blood Mononuclear Cells)
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetate
PD	Pharmacodynamie
PK	Pharmacocinétique
PV	Poids Vif
QS	Quorum Sensing
RC	Réservoir central

RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SCV	Small Colony Variants
SI	Inoculum standard (Standard Inoculum)
sTKS	Bactéricidies en conditions statiques (static Time-Kill Studies)
SVF	Serum de Veau Fœtal
T _{1/2}	Temps de demi-vie d'élimination plasmatique
UFC	Unité Formant une Colonie
UMR	Unité Mixte de Recherche
V	Vancomycine
VISA	<i>S. aureus</i> intermédiaire à la Vancomycine (Vancomycin Intermediate <i>S. aureus</i>)
VRSA	<i>S. aureus</i> résistant à la Vancomycine (Vancomycin Resistant <i>S. aureus</i>)

Introduction

Les travaux de recherche présentés dans ce document ont été menés dans l'UMR INTHERES (INnovations THERapeutiques et RESistances) 1436 INRA-ENVT. L'unité INTHERES s'intéresse à la dynamique des interactions antibiotiques/bactéries au sein des flores pathogènes et commensales ainsi qu'à l'antibiorésistance associée à l'usage des antibiotiques. Dans un contexte d'enjeux de santé animale et humaine, l'unité travaille à l'identification de stratégies thérapeutiques capables d'éradiquer l'agent pathogène tout en limitant la sélection de bactéries résistantes au niveau du site infectieux et des microbiotes commensaux. Une des stratégies explorées est l'utilisation de combinaisons d'antibiotiques et l'optimisation des schémas thérapeutiques (modification des doses et/ou voies d'administration). Une des thématiques explorées est celle des biofilms, mode de vie bactérien responsable d'infections chroniques puisqu'il confère aux bactéries une protection vis-à-vis des traitements et du système immunitaire de l'individu infecté.

Mon travail de thèse sous la direction du Docteur Aude Ferran et du Professeur Alain Bousquet-Melou s'est intégré dans la thématique de recherche relative à l'optimisation des posologies capables de prévenir l'émergence de résistances bactériennes au niveau du site infectieux.

L'utilisation de combinaisons d'antibiotiques existants permet d'augmenter l'efficacité bactéricide mais aussi de limiter l'émergence de résistances au cours d'un traitement. Lors de la phase de criblage de molécules pouvant présenter un intérêt en combinaison, de nombreux tests *in vitro* sont réalisés avant de vérifier dans une dernière étape l'efficacité clinique d'une combinaison candidate. La plupart des techniques disponibles *in vitro* sont peu coûteuses, faciles à réaliser, souvent standardisées ce qui permet la comparaison d'un laboratoire à un autre. Cependant, les conditions expérimentales sont parfois trop éloignées de la réalité, induisant un biais dans l'extrapolation des résultats. En effet, les expériences sont souvent réalisées avec un inoculum bactérien de taille fixée qui n'est pas forcément représentatif de la charge bactérienne responsable de signes cliniques, avec une concentration d'antibiotique constante au cours du temps alors que celui-ci est éliminé par l'organisme dès son administration, et sans renouvellement de milieu ce qui limite la durée des expérimentations et donc empêche d'étudier l'émergence de résistances au cours d'un traitement de plusieurs jours ou plusieurs semaines.

C'est dans ce contexte que nous avons décidé d'utiliser un modèle *in vitro* dit dynamique, *i.e.* reproduisant les fluctuations des concentrations d'antibiotiques au cours d'un traitement réalisé sur plusieurs jours, pour se rapprocher des conditions rencontrées *in vivo* et mieux prédire l'efficacité d'un traitement. Nous avons ensuite proposé des pistes pour l'optimisation de ce système, comme en essayant d'intégrer un composant du système immunitaire ou en utilisant un milieu de culture presque identique à celui dans lequel les antibiotiques diffuseraient *in vivo*.

Une première partie bibliographique présentera les biofilms bactériens, notamment leur structure et leur développement (chapitre 1.1) puis nous nous attacherons aux phénomènes et particularités rencontrés au sein d'un biofilm qui renforcent leur caractère récalcitrant aux traitements ainsi qu'aux principales méthodes de lutte actuellement disponibles (chapitre 1.2). Nous détaillerons ensuite les différentes méthodes d'étude de l'activité des antibiotiques utilisées dans notre travail de thèse, à la fois sur les bactéries planctoniques mais aussi sur les bactéries d'un biofilm (chapitre 1.3). En 2014, les travaux d'une étudiante en stage de Master 2 au laboratoire ont mis en évidence *in vitro* une efficacité de la combinaison d'amikacine et de vancomycine ainsi que de la combinaison de rifampicine et de vancomycine en conditions statiques sur un biofilm de *S. aureus* formé en plaque 6 puits. Nous avons repris ces travaux en nous focalisant sur la combinaison vancomycine et amikacine, l'activité d'inducteur enzymatique de la rifampicine étant pour nous un frein principal à son utilisation et à l'évaluation optimale de son efficacité *in vitro* et au transfert des résultats obtenus à son utilisation en clinique. Les principales propriétés de la vancomycine et de l'amikacine ainsi que leur mécanisme d'action, les paramètres prédictifs de leur efficacité, leur toxicité et les mécanismes de résistance des bactéries à ces antibiotiques seront également décrits (chapitre 1.4 et 1.5). En médecine vétérinaire, un antibiotique fréquemment utilisé pour traiter les infections complexes ou récalcitrantes à un premier traitement est la marbofloxacine. Ses principales propriétés ainsi que le mécanisme d'action, sa toxicité et les mécanismes de résistances des bactéries à cet antibiotiques sont décrits à la fin de la partie bibliographique (chapitre 1.6).

Les travaux de recherche de cette thèse ont débuté par une étude destinée à comparer les techniques de laboratoire utilisant des concentrations d'antibiotiques constantes au cours du temps avec un modèle *in vitro* dynamique (chapitre 2.1). Après avoir mis en évidence l'intérêt d'utiliser un modèle dynamique pour évaluer l'efficacité d'un traitement de plusieurs jours sur une forte charge bactérienne, nous avons décidé d'utiliser ce modèle pour une situation plus complexe, le biofilm. Une étude a donc été menée en utilisant ce modèle pour évaluer l'efficacité d'une combinaison d'antibiotiques sur un biofilm mature en conditions dynamiques, ainsi que pour tester des modifications du schéma thérapeutique permettant d'augmenter l'efficacité et de limiter l'émergence de résistances au cours du traitement, à la fois dans les populations de bactéries planctoniques et dans celles du biofilm (chapitre 2.2). Parallèlement à ces travaux, dans un souci d'optimisation du modèle et pour se rapprocher des conditions de certaines infections d'intérêt en médecine vétérinaire nous avons essayé d'adapter le modèle à l'étude des mammites bactériennes de la vache laitière (chapitre 2.3). Enfin, nous avons exploré des pistes pour l'ajout de composants du système immunitaire dans le modèle (chapitres 2.4 et 2.5).

1 Étude bibliographique

1.1 Les biofilms bactériens

Les bactéries existent sous deux modes de vie distincts. Un mode de vie libre, dit planctonique, où les bactéries sont mobiles et en suspension, et un mode de vie sédentaire sous forme de communauté adhérente appelée biofilm. Ces deux modes de vie sont complémentaires. Lorsque les bactéries planctoniques adhèrent à une surface, artificielle ou naturelle, elles la colonisent et s'y développent en biofilm. A l'inverse, certaines bactéries du biofilm peuvent se détacher, retourner à un état planctonique, et aller coloniser d'autres surfaces pour y former un autre biofilm. Ainsi, dans l'organisme, le phénomène de détachement de certaines bactéries du biofilm est à l'origine des rechutes aiguës.

1.1.1 Structure d'un biofilm bactérien

Un biofilm est défini comme un agrégat de bactéries attaché à une surface et enrobé d'une matrice polymérique [1] produite par les bactéries elles-mêmes [2,3]. La surface sur laquelle les bactéries adhèrent peut être une surface biotique (vessie, poumons, ...) ou abiotique (cathéter, prothèse, ...). Un biofilm est donc une structure hétérogène où les bactéries ne représentent que 10% de la composition totale du biofilm, l'essentiel étant représenté par la matrice [4].

1.1.1.1 La matrice

La matrice, riche en protéines, est composée d'eau et de substances polymériques extracellulaires (Extracellular Polymeric Substances ou EPS). Les EPS sont surtout des polysaccharides (hétéro- ou homopolysaccharides) et des acides nucléiques.

Concernant les polysaccharides, on retrouve des exopolysaccharides polyanioniques comme les alginates, la xanthane et l'acide colanique, mais aussi des exopolysaccharides polycationiques comme l'adhésine intercellulaire. Cette dernière est particulièrement présente chez *Staphylococcus (S.) aureus* et lui confère la possibilité de coloniser des surfaces comme les implants médicaux [5].

Les protéines de la matrice sont essentiellement des enzymes et des protéines de structure qui permettent de stabiliser la matrice et de renforcer la cohésion entre les bactéries et les EPS. Les protéines les plus connues sont les protéines Bap (pour Biofilm Associated Proteins)

et Bap-like, identifiées dans un isolat de mammite bovine à *S. aureus* [6]. Ces protéines présentent des caractéristiques communes, qui sont la localisation à la surface bactérienne, un poids moléculaire élevé et un domaine principal de répétitions en tandem ce qui confère aux bactéries la capacité de former des biofilms [7]. Plus spécifiquement, il a été montré que Bap empêche l'internalisation de *S. aureus* dans les cellules épithéliales de l'hôte, notamment les cellules de l'épithélium mammaire, et favorise donc la survie en biofilm [8].

Un composant non négligeable de la matrice est l'ADN extracellulaire. Sa concentration varie selon l'espèce bactérienne concernée. C'est un composant structural majeur dans la matrice des biofilms à *S. aureus* et *Pseudomonas (P.) aeruginosa* [9], alors qu'il ne représente qu'une part minoritaire de la matrice des biofilms de *S. epidermidis* [10].

Les EPS varient fortement d'un biofilm à l'autre, dépendant des micro-organismes concernés, des forces de cisaillement auxquelles le biofilm est soumis, de la température du milieu et des nutriments disponibles. Ces EPS assurent la stabilité mécanique du biofilm, permettent l'adhésion aux surfaces et forment une structure tridimensionnelle cohésive qui immobilise transitoirement les bactéries et les protège de la dessiccation et des attaques extérieures [4]. La stabilité de la matrice peut être renforcée par des structures bactériennes extracellulaires comme les flagelles, les pili ou les fimbriae [11].

1.1.1.2 Étapes de formation d'un biofilm

La formation d'un biofilm se déroule en cinq étapes [3,12] qui sont représentées sur la Figure 1 :

- Adhésion réversible des bactéries planctoniques à une surface,
- Attachement irréversible des bactéries à la surface et agrégation des bactéries en micro-colonies. Cette étape permet une cohésion entre les bactéries et offre de nouveaux sites d'adhésion. Cette phase d'attachement dépend non seulement de la bactérie mais aussi de la surface elle-même. Les bactéries adhèrent plus facilement sur des surfaces hydrophobiques et rugueuses que sur des surfaces lisses [13].
- Sécrétion des EPS par les bactéries et initiation de la matrice qui donne son cadre et sa structure au biofilm, et début de la maturation du biofilm.
- Maturation complète du biofilm : Du fait de leur proximité, une communication entre bactéries est initiée. Les bactéries synthétisent des molécules signal et y réagissent. Ce processus est connu sous le nom de Quorum Sensing (QS). Le QS régule de nombreux processus physiologiques comme la sécrétion de facteurs de virulence, l'attachement aux surfaces ou la production d'EPS [14].

- Détachement et dispersion de segments du biofilm, donc retour à une motilité de certaines bactéries et à un état planctonique pour aller coloniser une autre surface, parfois de façon active selon les espèces bactériennes [3]. C'est cette étape qui est responsable des rechutes cliniques. Ce détachement peut être dû à des perturbations externes, comme une augmentation des forces de cisaillements [15] ou à des phénomènes propres au biofilm, comme suite à l'action des enzymes de la matrice ou à la dégradation des EPS [16].

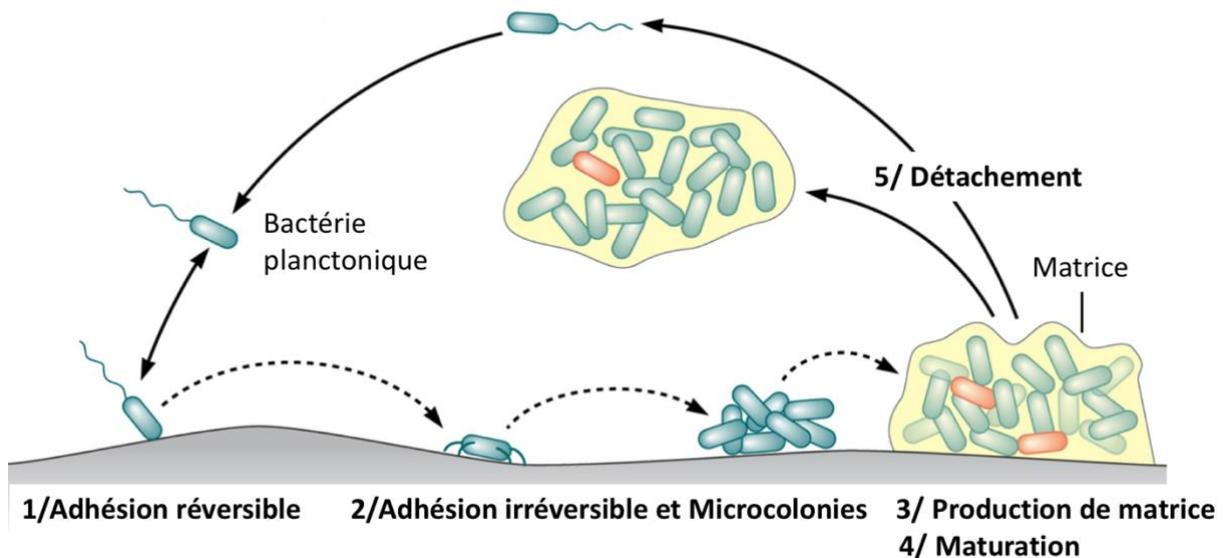


Figure 1 : Les différentes étapes de formation d'un biofilm, adapté de Lebeaux et al (2014).

1.1.1.3 Structure générale d'un biofilm et avantages conférés

Un biofilm n'est pas une structure figée. C'est une structure dynamique, qui évolue constamment. Il est soumis aux forces de cisaillement rencontrées dans l'environnement où il se situe, et des modifications phénotypiques peuvent être observées. La composition de la matrice confère une certaine élasticité au biofilm, décrite notamment chez *S. aureus*, qui permet aux micro-colonies de rester attachées et de rouler le long de la surface colonisée [17]. Cette structure hétérogène est composée de nombreux canaux aqueux qui permettent le transport de nutriments et d'oxygène aux bactéries des couches les plus profondes du biofilm [18].

Dans un biofilm, les bactéries présentent une hétérogénéité de fonctionnement. Du fait de l'épaisseur de la matrice et de l'accumulation de bactéries, la concentration d'oxygène n'est

pas la même dans toute la structure du biofilm. Les couches les plus profondes sont privées de nutriments et d'O₂, et les bactéries expriment plus souvent un phénotype dormant, stationnaire. Au contraire, les bactéries en surface du biofilm sont aérobies et ont une activité métabolique plus importante. Un biofilm est donc une structure stratifiée avec différents niveaux d'activité des bactéries, les plus actives métaboliquement étant en surface et les bactéries les moins actives, voire dormantes, sont plus en profondeur [14]. On retrouve aussi différents niveaux d'expression de protéines de surface et d'expression des facteurs de virulence ainsi que des variations de pH au sein d'un biofilm [3].

Ce mode de vie en biofilm semble conférer aux bactéries un environnement favorable à leur croissance et les protéger des agressions extérieures.

1.1.2 Les différentes infections associées à des biofilms bactériens en médecine humaine et en médecine vétérinaire

Les biofilms sont responsables d'infections chroniques et posent de nombreux problèmes dans le domaine médical, que ce soit en médecine humaine ou vétérinaire. Les infections liées à des biofilms touchent majoritairement des individus immunodéprimés ou avec des infections concomitantes, et impliquent souvent des bactéries commensales comme *S. epidermidis*, *S. aureus* ou *P. aeruginosa* [2] chez l'homme.

Au début des années 90, l'observation de dispositifs médicaux après leur retrait de patients a permis de mettre en évidence la formation de biofilm sur ces surfaces abiotiques [1]. C'est l'utilisation de la microscopie électronique qui a permis la visualisation de biofilms dans la lumière de cathéters veineux centraux [19]. Tous les systèmes médicaux comme les sondes urinaires, les cathéters veineux, les tubulures de ventilation artificielle et les sondes d'intubation ou encore les prothèses orthopédiques et matériels d'ostéosynthèse sont susceptibles de servir de support à des biofilms bactériens. Les bactéries peuvent aussi adhérer aux tissus. Le plus souvent il s'agit de tissus déjà endommagés, présentant une surface non lisse avec des agrégats plaquettaires ou de fibrine ainsi que des collagènes en surface, qui offrent un environnement favorable pour l'attachement des premières bactéries [3]. Les biofilms sur surfaces biologiques les plus fréquents sont la plaque dentaire, situés sur les plaies, sur les valves cardiaques, sur l'épithélium pulmonaire, vésical ou mammaire. Par exemple, les biofilms les plus fréquemment rencontrés dans les poumons sont les biofilms à *P. aeruginosa*, en particulier chez les patients atteints de mucoviscidose [3]. Ces patients présentent un épithélium pulmonaire endommagé qui offre un environnement favorable à

l'adhésion de bactéries, ainsi qu'une forte production et une faible élimination du mucus pulmonaire. On retrouve aussi chez ces patients des clusters de bactéries recouverts d'une matrice épaisse, parfois mucoïde, ce qui protège les bactéries du système immunitaire et des traitements [20].

En médecine vétérinaire on retrouve de nombreuses infections associées à des biofilms. En médecine des animaux de compagnie, les biofilms à *S. pseudintermedius* sont responsables d'infections cutanées chroniques et ceux à *E. coli* d'infections récidivantes du tractus urinaires [21]. En médecine des grands animaux, une des infections chroniques la plus fréquente est la mammite à *S. aureus* chez la vache laitière. A la dégradation du bien-être de l'animal s'ajoute le coût induit par le traitement, par la perte de lait, le temps passé à traiter l'animal, et la réforme souvent précoce de l'animal lorsque l'infection est récalcitrante aux traitements. Si l'agent pathogène est connu depuis longtemps, l'hypothèse de l'implication de biofilms dans la mammite bactérienne à *S. aureus* est, elle, beaucoup plus récente [22] mais est maintenant largement reconnue, étudiée et confirmée dans différentes régions du monde [23,24]. Ces biofilms seraient plutôt présents sous forme de clusters en suspension dans le lait [25] et l'implication de plusieurs gènes tels *icaA*, *icaD* et *Bap* dans la formation du biofilm a été confirmée [8,24].

1.2 Particularités conférées par le mode de survie en biofilm et méthodes de lutte

1.2.1 Le caractère récalcitrant des biofilms aux traitements est un phénomène multifactoriel

La formation d'un biofilm est un mécanisme de survie et de défense des bactéries dans un environnement hostile. Ce mode de protection leur permet de supporter les attaques du système immunitaire ainsi que des concentrations d'antibiotiques très élevées, jusqu'à 1000 fois la CMI pour la même souche dans un état planctonique [12,26]. Ce caractère récalcitrant est dû à plusieurs phénomènes, dont la résistance et la tolérance bactériennes aux antibiotiques. La résistance peut être naturelle ou acquise, soit par mutation spontanée, soit par transfert de matériel génétique entre bactéries. La résistance s'accompagne d'une augmentation de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et confère aux bactéries la capacité de croître en présence de fortes concentrations d'antibiotiques, alors que la tolérance est leur capacité à survivre sans division lors d'une exposition à un antibiotique sans modification de CMI [27].

La forte densité cellulaire au sein d'un biofilm ainsi que l'hétérogénéité de la structure semblent jouer un rôle important dans ce caractère récalcitrant aux traitements. Si une fois remises en suspension les bactéries du biofilm continuent de se multiplier en présence de concentrations particulièrement élevées d'antibiotiques on parle de résistance [28]. *A contrario*, si une fois remises en suspension les bactéries du biofilm présentent la même CMI que les bactéries planctoniques initiales, le caractère récalcitrant est conféré par la structure en biofilm ou l'expression d'un phénotype tolérant. Dans ce cas, il faut distinguer si les bactéries sont sensibles et protégées par la matrice et les composants du biofilm ou si les bactéries sont tolérantes à l'antibiotique [29,30].

1.2.1.1 *Résistance aux traitements antibiotiques : mutations et hétérogénéité métaboliques*

Du fait de la grande densité de bactéries dans un biofilm le nombre des mutations est plus important dans un biofilm que pour les mêmes bactéries dans un état planctonique [31] et la

proximité entre les bactéries dans un biofilm favorise les échanges horizontaux de matériel génétique [32]. Ces deux paramètres pourraient expliquer pourquoi les biofilms bactériens sont capables de résister à des concentrations élevées d'antibiotiques. La résistance aux traitements par les bactéries du biofilm est caractérisée par une augmentation de la production d'enzymes de dégradation de certains antibiotiques par les bactéries, d'une modification des cibles des antibiotiques ou par une surexpression de la production de pompes à efflux par les bactéries [14]. L'activité accrue des pompes à efflux maintient dans le cytoplasme des bactéries des concentrations en antibiotiques inférieures aux concentrations actives [33]. La présence de bactéries dites hypermutables dans les biofilms a aussi été mise en évidence dans des biofilms de *P. aeruginosa* [31,34], c'est-à-dire que la fréquence des mutations est augmentée. Ce phénotype hypermutable pourrait être expliqué par l'état de stress physiologique des bactéries dans le biofilm, lorsque les concentrations d'O₂ et de nutriments disponibles ne sont pas suffisantes [31]. Ceci promeut l'apparition et le transfert de résistances au sein du biofilm.

1.2.1.2 *Stress métabolique et tolérance aux traitements antibiotiques*

Outre la matrice et son rôle mécanique, l'hétérogénéité métabolique des bactéries au sein du biofilm peut expliquer la diminution d'efficacité des traitements antibiotiques sur ces structures. Les bactéries dans le biofilm ont un rythme de croissance plus lent que les bactéries planctoniques, une activité métabolique réduite sans pour autant être en dormance [35] et sont donc moins sensibles aux traitements antibiotiques. Dans un biofilm, la ressource en nutriments et notamment en O₂ est plus limitée que lorsque les bactéries sont dans un état planctonique, ce qui peut engendrer un état de stress des bactéries et une surexpression de gènes impliqués dans la réponse générale au stress, et donc une augmentation de la sécrétion de facteurs de stress et de métabolites toxiques [36]. Tresse *et al* [37] ont mis en évidence *in vitro* que des bactéries *E. coli* dans un biofilm et donc dans un état de stress physiologique, associé à une faible disponibilité en O₂, étaient moins sensibles à l'action de la tobramycine que les mêmes bactéries planctoniques.

Une population bactérienne au métabolisme particulièrement ralenti a été identifiée par Joseph Bigger dans les années 40 [38]. Cette population au phénotype non héritable [39,40] est présente dans toute population bactérienne planctonique dans une faible proportion [41] et jusqu'à 1% de la population totale en phase stationnaire. Ces bactéries sont appelées persisters, leur CMI est la même que celle des bactéries planctoniques mais pourtant elles sont capables de survivre transitoirement à de très fortes concentrations d'antibiotiques [39,42]. Les études les plus récentes émettent l'hypothèse que ce phénotype tolérant est réversible, très fortement représenté [43] voire majoritaire dans les biofilms bactériens [44],

qu'il permettrait au biofilm de se développer à nouveau après un traitement antibiotique [45] et pourrait être une des explications à la chronicité et récurrence de certaines infections [45,46]. Comprendre les étapes menant à ce phénotype tolérant pourrait être une des clefs des traitements des infections associées aux biofilms.

1.2.1.3 *Survie des bactéries lors d'un traitement antibiotique grâce à la structure du biofilm*

Il a été démontré pour les bactéries planctoniques que la taille de l'inoculum a un impact sur l'efficacité d'un traitement antibactérien [47] et sur la sélection de résistances [48]. Étant donné la forte densité bactérienne au sein d'un biofilm et la présence de la matrice, cette structure en biofilm pourrait diminuer l'efficacité d'un traitement antibiotique, favoriser l'apparition de résistance, et permettre aux bactéries d'échapper au système immunitaire.

1.2.1.3.1 *Diminution et ralentissement de la diffusion des antibiotiques dans le biofilm*

Une des hypothèses permettant d'expliquer le caractère récalcitrant des biofilms vis-à-vis des traitements antibiotiques est la difficulté des antibiotiques à diffuser à travers la matrice, qui agirait comme une barrière physico-chimique étanche [49]. La pénétration des antibiotiques serait retardée par les substances polymériques et l'ADN extracellulaire, limitant l'efficacité des traitements sur les couches les plus profondes du biofilm. Ce phénomène a déjà été décrit pour la vancomycine dans des biofilm de *S. aureus* et *S. epidermidis* [49,50] ou pour la ciprofloxacine dans des biofilms de *P. aeruginosa* [51]. Cette difficulté à diffuser dans le biofilm confère aussi un avantage aux bactéries résistantes productrices d'enzymes. Une bactérie produisant beaucoup de β -lactamases créera un gradient avec une forte concentration d'enzyme dans son environnement proche. Les β -lactamases extracellulaires concentrées pourront facilement inactiver les β -lactames qui auraient réussi à diffuser jusqu'aux bactéries, et donc renforcer le caractère récalcitrant au traitement [14,34]. En plus de s'opposer mécaniquement au passage des molécules, la matrice d'un biofilm possède de nombreux canaux aqueux qui pourraient être responsable d'un efflux des molécules antibiotiques en dehors du biofilm.

1.2.1.3.2 Échappement au système immunitaire

Si les bactéries planctoniques sont en général efficacement phagocytées et tuées par les phagocytes (neutrophiles et macrophages), les bactéries encapsulées dans la matrice sont protégées des phénomènes de phagocytose, de lyse par le complément et d'opsonisation [2]. Une réduction de la phagocytose de bactéries en biofilms en dépit d'une pénétration de leucocytes à travers les EPS a déjà été reportée pour *P. aeruginosa* [52] et pour *S. aureus* qui échappent ainsi aux macrophages [53]. Les capsules mucoïdes produites par certains *Pseudomonas* s'opposent mécaniquement à la phagocytose par les macrophages. Thurlow et al [53] ont utilisé un modèle murin d'infection à biofilm associée à un cathéter pour évaluer l'importance fonctionnelle de TLR2 et TLR9 dans la réponse immunitaire de l'hôte pendant la formation de biofilm, car les ligands pour les deux récepteurs sont présents dans le biofilm. Ni TLR2 ni TLR9 n'ont eu d'impact sur la densité bactérienne ou la sécrétion de médiateurs inflammatoires au cours de la croissance du biofilm *in vivo*, suggérant que les biofilms de *S. aureus* semblent contourner les voies de reconnaissance bactériennes traditionnelles.

Plusieurs mécanismes potentiels ont été identifiés pour expliquer l'évasion du biofilm de l'immunité innée, incluant des réductions significatives de l'expression d'IL-1 β et de TNF- α pendant l'infection avec un biofilm comparée à la réponse cicatricielle provoquée par les cathéters stériles [53]. D'autres cytokines voient aussi leur production diminuée dans un biofilm, ce qui aboutit à une diminution de l'efficacité du système immunitaire. L'interféron gamma est produit par les lymphocytes lorsqu'ils sont stimulés par des cytokines provenant de macrophages activés et est essentiel pour les actions bactéricides médiées par les macrophages. Dasgupta et al [54] ont mis en évidence *in vitro* une production diminuée d'interféron gamma par des macrophages et lymphocytes confrontés à des bactéries issues d'un biofilm de *S. epidermidis* alors que des quantités significatives d'interféron-gamma ont été mesurées lorsque les composants du système immunitaire étaient confrontés à la forme planctonique de la même bactérie. Enfin, il a été montré que les biofilms de *S. aureus* interféraient avec les réponses immunitaires microbicides, en partie en polarisant les macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire et que les bactéries encapsulées dans le biofilm sécrétaient des protéines comme l' α -toxine et LukAB qui sont capables d'induire des dysfonctionnements des macrophages [55]. Cette phagocytose limitée des bactéries en biofilm donne lieu à un phénomène de « phagocytose frustrée » au cours duquel la phagocytose est inefficace, y compris du fait de l'inaccessibilité des anticorps opsonisants. Les phagocytes sécrètent néanmoins leurs facteurs microbicides, y compris des enzymes qui sont délétères pour les tissus adjacents et en accélèrent la destruction [2]. La résistance des biofilms au système immunitaire de l'hôte est donc due à une pénétration limitée des effecteurs du système immunitaire dans le biofilm et à une diminution des capacités de phagocytose dans le biofilm.

1.2.2 Méthodes de lutte contre les biofilms

Du fait de l'importance des biofilms dans la chronicité des infections et de leur caractère récalcitrant aux traitements classiques, il est important de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour lutter contre les biofilms, soit pour limiter leur formation, soit pour essayer de les réduire, voire de les éradiquer. Les principales méthodes et perspectives de lutte contre les biofilms sont décrites ci-après.

1.2.2.1 Méthodes non spécifiques

Ces méthodes regroupent toutes les mesures hygiéniques et de bonne conduite visant à prévenir la formation d'un biofilm et à le retirer ou le détruire lorsque c'est possible. Une bonne hygiène ainsi que des procédures standardisées lors de la mise en place d'un corps étranger (i.e. type cathéter ou matériel d'ostéosynthèse) devraient limiter la formation d'un biofilm. Par ces procédures, on entend le nettoyage systématique de la peau avant la pose d'un cathéter et son retrait dès qu'il n'est plus indispensable, ou son renouvellement si une utilisation de longue durée est nécessaire ainsi qu'un entraînement de la part du personnel. En effet, plus le nombre et la durée de manipulation sont limités, plus la probabilité de contamination est faible [56]. Si une infection à biofilm est identifiée et que l'état du patient le permet, une des méthodes les plus simples pour traiter consiste à agir mécaniquement sur le site d'infection pour retirer le tissu contaminé. Cela signifie retirer le matériel sur lequel le biofilm s'est développé, agir mécaniquement sur l'os après retrait de matériel d'ostéosynthèse ou débrider une plaie qui ne cicatrise pas pour ne garder que des tissus sains [12,53–55].

1.2.2.2 Méthodes préventives

Ces méthodes visent à prévenir l'attachement des bactéries sur une surface, biotique ou non, et donc à prévenir la formation d'un biofilm, soit en inhibant l'adhésion de façon non spécifique, soit en ciblant cette adhésion. Ces méthodes s'appliquent surtout aux biofilms pouvant se développer sur les surfaces artificielles.

En ce qui concerne les surfaces artificielles propices à l'adhésion des bactéries, une des pistes de recherche consiste à développer de nouveaux matériaux ou optimiser les matériaux existants pour rendre difficile l'adhésion des bactéries, ou à minima la retarder [56,57]. Une autre stratégie originale consisterait au contraire à coloniser les surfaces par des bactéries non

pathogènes, et donc à former volontairement un biofilm avec ces bactéries, rendant la surface indisponible pour des bactéries potentiellement pathogènes [56].

Certaines méthodes peuvent spécifiquement cibler les adhésines et empêcher la formation du biofilm en développant des molécules bloquant l'interaction de ces adhésines avec leurs récepteurs [56].

1.2.2.3 Méthodes curatives

Ces méthodes s'intéressent à la réduction voire la destruction d'un biofilm en formation ou déjà formé.

Pour les cas où le retrait d'un cathéter est inenvisageable, une des solutions proposées est la « Lock therapy » ou « thérapie verrou », qui consiste à injecter dans la lumière du cathéter une concentration très élevée d'antibiotique, d'éthanol ou d'EDTA. On obtient donc localement une très forte concentration en substances, supposée toxique pour les bactéries qui seraient localisées dans la lumière du cathéter sous forme de biofilm. Bien qu'engageante et souvent utilisée, cette solution n'est pas systématiquement efficace [56,58].

Une des stratégies consiste à viser spécifiquement la matrice pour déstructurer le biofilm et bloquer sa maturation. L'accès aux bactéries est aussi facilité pour les antibiotiques. Souvent, dans l'hypothèse d'un relargage important de bactéries du biofilm, cette stratégie de lutte s'accompagne d'un traitement antibiotique pour protéger l'organisme [57,59]. L'utilisation de protéases et de peptides antimicrobiens constitue une piste de plus en plus explorée même si le principal inconvénient des peptides est leur courte demi-vie. Pour le cas particulier des biofilms pulmonaires à *P. aeruginosa*, des DNAses sont utilisées pour réduire la viscosité du sputum et faciliter ensuite l'action d'un traitement antibiotique [12,56,57].

La modulation des voies métaboliques [12] et de communication des bactéries du biofilm montre *in vitro* de bons résultats. Les inhibiteurs du QS sont de plus en plus étudiés et développés [12,59,60] mais leur effet se limite à l'inhibition de l'attachement entre bactéries ou entre bactérie et surface. Ils diminuent la cohésion de la matrice mais n'ont aucune activité bactéricide et ne peuvent pas être utilisés seuls.

L'utilisation de protéases semblerait cibler les persisters et donc avoir un effet positif lors de traitement d'un biofilm [58,61,62]. Des vaccins anti-biofilm à *S. aureus* sont actuellement en cours de développement mais bien qu'ayant montré des résultats *in vitro* encourageants, aucun n'a démontré d'efficacité clinique lors des essais de phase III [57]. Une des hypothèses avancées est que les bactéries du biofilm sont bien trop différentes des bactéries

planctoniques et qu'un seul vaccin ne suffit pas à cibler tous les profils métaboliques de bactéries que l'on peut rencontrer dans un biofilm.

De façon plus anecdotique, certaines pistes consistent à étudier l'action d'huiles essentielles ou de nanoparticules comme les nanoparticules d'argent pour déstructurer le biofilm mais une certaine toxicité pour les cellules eucaryotes est rapportée. L'utilisation de bactéries du genre *Bacterivorax* ou des bactériophages semble plus prometteuse mais est encore en phase d'essai [56,61].

L'utilisation d'antibiotiques est donc actuellement la méthode de lutte contre les biofilms la plus largement répandue. Cependant, l'utilisation massive d'antibiotiques et quotidienne pour les patients atteints de mucoviscidose [34] mène inexorablement au développement de résistances et d'échecs thérapeutiques [61].

Pour limiter l'apparition de résistance au cours du traitement, des combinaisons peuvent être proposées [63], soit avec uniquement des composés antibiotiques [64], soit en combinant un antibiotique et des molécules non antibiotiques [65].

L'optimisation des traitements existants est un point critique dans la lutte contre les biofilms. Actuellement il est difficile d'évaluer correctement l'efficacité *in vitro* d'un traitement et de l'extrapoler aux situations cliniques. Les méthodes d'évaluation sont encore trop éloignées de la réalité. Il est donc nécessaire de faire progresser les techniques actuelles et d'essayer de standardiser les procédures permettant d'évaluer l'efficacité d'un traitement.

1.3 Méthodes d'étude de l'activité des antibiotiques

Il existe actuellement plusieurs méthodes pour étudier *in vitro* l'activité des antibiotiques sur les bactéries sous forme planctonique. Ces techniques sont plus ou moins standardisées mais surtout plus ou moins proches de conditions rencontrées *in vivo*, ce qui peut rendre difficile l'extrapolation de certains résultats.

Chacune de ces techniques possède son pendant pour l'évaluation de l'efficacité d'un traitement sur des bactéries dans un biofilm, et certaines de ces techniques sont également utilisables pour tester l'efficacité *in vitro* d'une combinaison d'antibiotiques sur une souche bactérienne, sous forme libre ou adhérente.

1.3.1 Étude de l'efficacité sur les bactéries planctoniques

1.3.1.1 *La concentration minimale inhibitrice et l'antibiogramme*

La détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) est la plus simple de ces techniques. La CMI permet d'évaluer la sensibilité d'une souche bactérienne aux antibiotiques. Il s'agit de la plus petite concentration capable d'inhiber *in vitro* la croissance visible d'un inoculum bactérien de taille standardisée. Plusieurs méthodes de réalisation sont possibles, mais la plus répandue est la méthode de dilution sériée par microdilution, standardisée par le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [66]. Un inoculum de 5×10^5 UFC/mL est exposé à une gamme de concentrations d'antibiotiques obtenue par une série de dilutions de progression géométrique au demi. L'ensemble est mis à incuber 16 à 20h à 35°C, et la croissance bactérienne est observée le lendemain. La mesure est visuelle, par observation directe de la turbidité après une nuit d'incubation à l'étuve. La CMI correspond à la concentration la plus faible en antibiotique pour laquelle aucune croissance n'est visible à l'œil nu (Figure 2).

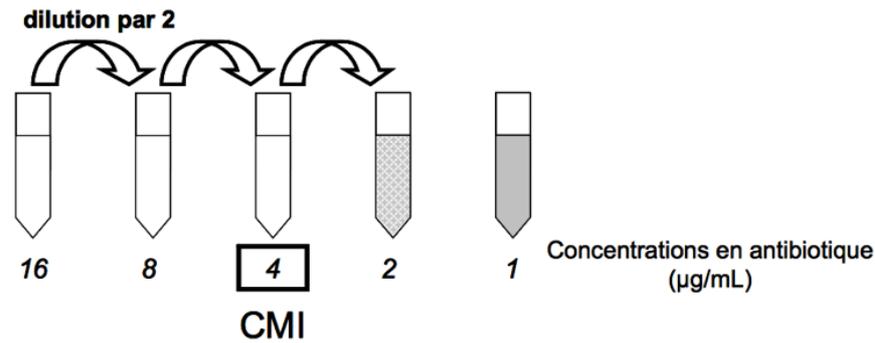


Figure 2 : Détermination de la CMI. Les zones grisées correspondent à une croissance bactérienne visible à l'œil nu. La CMI est la concentration en antibiotique pour laquelle aucune croissance n'est visible après l'incubation de 16 à 20h à 35°C

En pratique, l'évaluation de la sensibilité d'une souche pour le choix de l'antibiothérapie peut aussi s'effectuer avec un antibiogramme. La technique consiste à imbiber plusieurs antibiotiques sur des disques de papier et à les déposer sur une gélose ensemencée avec la souche à tester en culture pure. Après 24 à 48 heures d'incubation, le diamètre de la zone autour du disque où la croissance des bactéries a été inhibée (diamètre d'inhibition) est mesuré. Il permet alors de classer les bactéries comme sensibles, intermédiaires ou résistantes à l'antibiotique. Les valeurs de diamètres qui définissent les limites entre les trois classes sont déterminées par des organismes normatifs tels que le CLSI ou l'EUCAST Il existe une relation entre ce diamètre d'inhibition et la CMI décrite par des courbes de concordance et à ce titre, la CMI est indirectement utilisée pour évaluer la sensibilité d'une souche bactérienne.

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*. D'autres paramètres ont donc été choisis pour prendre en compte l'évolution des concentrations en antibiotique au niveau d'un site infectieux.

1.3.1.2 Le checkerboard assay

Le checkerboard assay permet d'évaluer la sensibilité d'une souche bactérienne à une combinaison de deux antibiotiques et donc l'intérêt potentiel de cette combinaison. Un inoculum de 5×10^5 UFC/mL est introduit dans les puits d'une plaque 96 puits et est exposé à une gamme de concentrations de chaque antibiotique obtenue par une série de dilutions de progression géométrique au demi le long de l'abscisse et le long de l'ordonnée (Figure 3). Après 16 à 20 heures d'incubation pendant à 35°C la croissance bactérienne est observée. La mesure est visuelle, par observation directe de la turbidité des solutions après une nuit

d'incubation à l'étuve et la CMI des deux antibiotiques est déterminée dans les puits contenant un seul antibiotique et dans les puits contenant les 2 antibiotiques. Le Fractionary Inhibitory Concentration (FIC) Index est calculé suivant l'équation 1.

$$FIC\ index = \frac{CMI\ antibiotique\ 1\ en\ combinaison}{CMI\ antibiotique\ 1\ seul} + \frac{CMI\ antibiotique\ 2\ en\ combinaison}{CMI\ antibiotique\ 2\ seul} \quad \text{Équation 1}$$

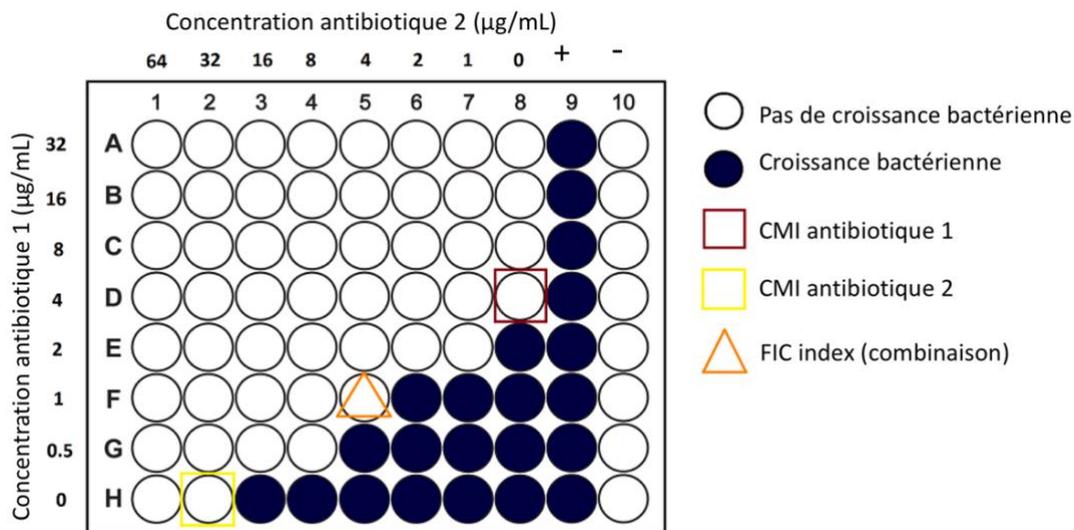


Figure 3 : Principe du checkerboard assay et de la détermination du FIC index. Ici, $FIC\ i = 1/4 + 4/32 = 0.625$

D'après Odds [67], si le FIC index est inférieur ou égal à 0.5 il y a synergie entre les deux antibiotiques, s'il est compris entre 0.5 et 4 il n'y a pas d'interaction entre les antibiotiques, et s'il est supérieur à 4 on estime qu'il y a antagonisme entre les deux antibiotiques.

Ces deux méthodes (CMI et CA) présentent l'avantage d'être simples, peu coûteuses et standardisées, ce qui permet des comparaisons entre laboratoires. Cependant, il est important de remarquer que l'observation directe de la turbidité des puits reste subjective et peut être source de biais [68]. 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 et si possible étudier l'effet des antibiotiques sur des inocula de tailles différentes.

1.3.1.3 Courbes de bactéricidies avec concentration constante d'antibiotique

Les courbes de bactéricidie permettent de connaître *in vitro* les effets des antibiotiques sur des bactéries au cours du temps.

Les courbes de bactéricidie sont le plus souvent obtenues par des dénombrements de bactéries exposées à des concentrations constantes en antibiotiques pendant une durée relativement courte, en général 24h. Ces courbes réalisées pour plusieurs classes d'antibiotiques ont permis de mettre en évidence deux profils pharmacodynamiques (Figure 4) : un profil concentration-dépendant et un profil temps-dépendant.

La classification des antibiotiques en concentration ou temps-dépendants a conduit à une meilleure efficacité des antibiothérapies par une adaptation des schémas thérapeutiques. Ainsi, des administrations fréquentes ont été préconisées pour les antibiotiques temps-dépendants afin de maintenir longtemps les concentrations au-dessus de la CMI 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.

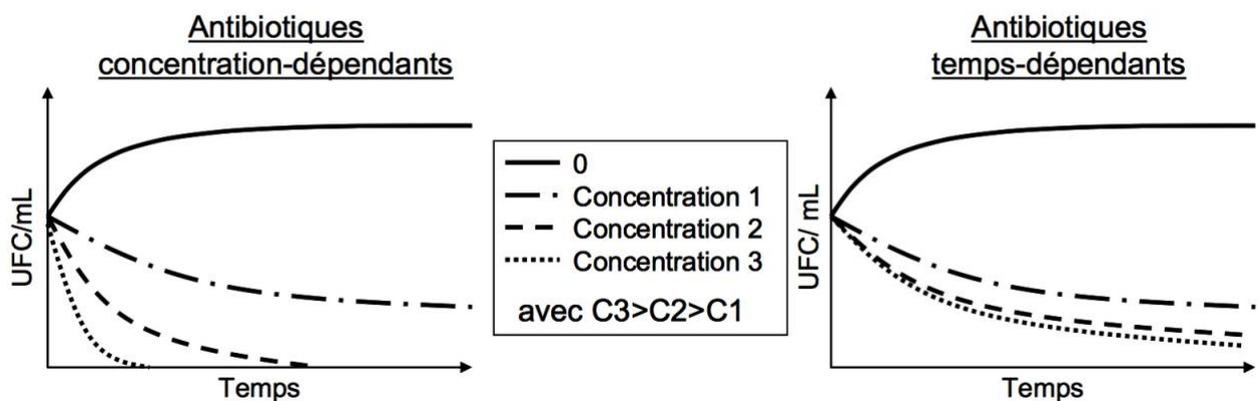


Figure 4 : Représentation schématique des courbes de bactéricidie. La figure de gauche représente le cas d'un antibiotique concentration-dépendant ; l'activité bactéricide augmente avec la concentration utilisée. La figure de droite représente le cas d'un antibiotique temps-dépendant ; l'activité de l'antibiotique n'augmente pas avec la concentration, mais avec le temps.

Les courbes de bactéricidie, obtenues en exposant les bactéries à des concentrations en antibiotique constantes, sont faciles à réaliser et permettent de connaître le mode d'action d'un antibiotique sur une souche bactérienne. Un autre avantage comparé à la CMI est que

l'évaluation de l'efficacité d'un antibiotique se fait par comptages bactériens. Cette méthode est plus objective que l'évaluation de la turbidité d'un puits et permet d'évaluer l'efficacité de l'antibiotique sur des tailles d'inocula plus importantes. Les courbes de bactéricidie peuvent être réalisées avec une taille d'inoculum standard, 5×10^5 UFC/mL ou avec de plus gros inocula. Il est en effet connu que la taille de l'inoculum bactérien peut avoir un effet sur l'efficacité d'un antibiotique [47] et sur la sélection de résistances [69]. *S. aureus* est par exemple connu pour son effet inoculum sur la vancomycine, la rendant quasi inefficace en présence de gros inocula [70].

Cependant, cette méthode ne prend pas en compte la dynamique temporelle des concentrations en antibiotiques *in vivo*.

1.3.1.4 Courbes de bactéricidies avec concentration variable d'antibiotique

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. Ces techniques prennent plus de temps que les techniques dites statiques mais ont l'avantage de pouvoir mimer l'élimination des antibiotiques par l'organisme *in vivo*. L'apport de milieu de culture frais permet des études plus longues que les études avec concentrations statiques en antibiotiques et donc de se rapprocher un peu plus de l'*in vivo*.

1.3.1.4.1 Le système ouvert

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 5).

Le compartiment central contenant du bouillon de culture représente le système vasculaire et l'objectif est d'y retrouver l'équivalent des concentrations plasmatiques libres 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. 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 1.3.1.4.3). 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.

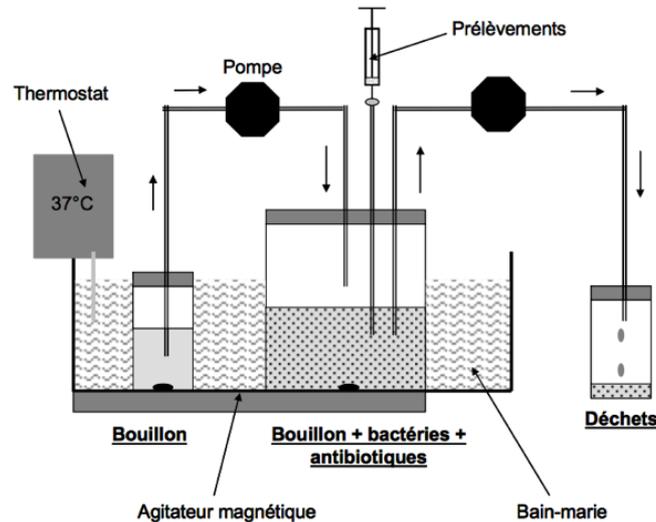


Figure 5 : Système in vitro dynamique ouvert. Les bactéries sont mises au contact de l'antibiotique dans le compartiment central immergé dans un bain-marie thermostaté à 37°C. Une pompe assure la dilution des antibiotiques et l'autre maintient le volume constant. Un agitateur magnétique homogénéise la suspension bactérienne.

La culture bactérienne peut être réalisée dans différents compartiments 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 5). La dilution des bactéries doit alors être prise en compte dans l'interprétation des résultats [68]. Dans les systèmes les plus complexes, les bactéries sont piégées dans un compartiment alimenté par le compartiment central.

1.3.1.4.2 Le modèle Hollow Fiber

Pour diluer uniquement l'antibiotique sans diluer les bactéries, des modèles dits fermés ont été développés. Une membrane semi-perméable sépare les bactéries du reste du compartiment central. Le modèle actuellement le plus répandu pour les études PK/PD avec des antibiotiques est le modèle Hollow Fiber (HF) ou fibres creuses.

Ce système clos est constitué de deux compartiments distincts. Un compartiment central dans lequel un milieu nutritif circule au moyen d'une pompe, et un compartiment périphérique contenant les bactéries. Le compartiment périphérique, dans lequel les bactéries sont confinées, est dans une cartouche et séparé du compartiment central par des milliers de fibres

creuses (ou capillaires). La paroi des capillaires est une membrane semi-perméable parsemée de pores de taille suffisamment large pour laisser traverser nutriments, antibiotiques et déchets métaboliques et cellulaires, mais trop étroite pour laisser passer les bactéries. Les bactéries baignent donc en permanence dans le milieu nutritif et sont soumises aux mêmes fluctuations de concentrations d'antibiotiques que celles rencontrées dans le compartiment central (Figure 6). Du fait du grand nombre de capillaires la surface d'échange est très importante ce qui favorise un équilibre des concentrations entre espace intra- et extra-capillaire rapide. La cartouche possède deux ports permettant d'accéder directement à l'espace extra-capillaire où sont confinées les bactéries [68,71].

Ce système offre l'opportunité de tester un ensemble de conditions qui visent à se rapprocher des situations rencontrées *in vivo* afin d'accroître le potentiel prédictif des expériences *in vitro*. D'abord développé pour mimer des traitements par voie générale d'infection systémiques [72], la configuration du système permettrait également de simuler l'exposition des bactéries à des substances administrées par voie locale en les injectant directement dans le compartiment périphérique, ou de reproduire des processus d'élimination naturelle des bactéries en suspension dans l'urine (en mimant la vidange de la vessie suite à la miction) ou en suspension dans le lait (en mimant la vidange de la mamelle suite à la traite).

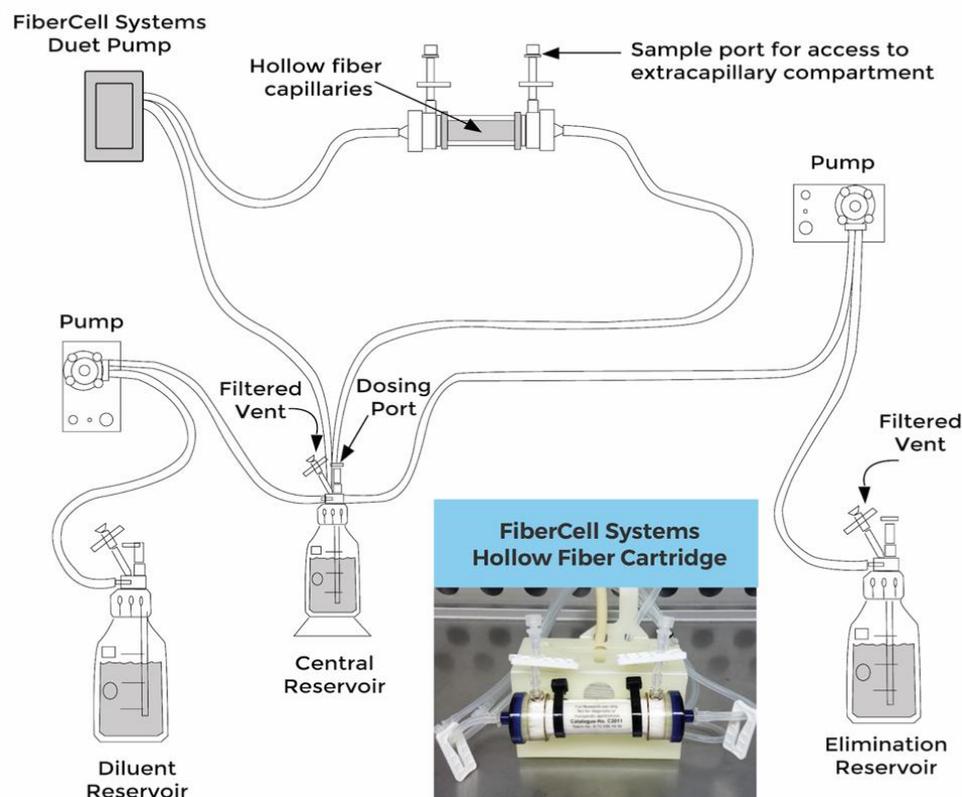


Figure 6 : Système Hollow Fiber complet. La Duet Pump assure la circulation de milieu de culture dans tout le système. Deux pompes permettent la dilution de l'antibiotique et l'élimination de milieu pour rester à volume constant. La cartouche est directement mise dans une étuve. Adapté de Cadwell

Certaines études l'utilisent également ce système dans le cadre de modèles tripartites incluant bactéries, antibiotiques et composants du système immunitaire comme les macrophages pour étudier les phénomènes de résistances observés *in vivo* lors d'infection complexes comme la tuberculose ou d'échec de traitement [72].

1.3.1.4.3 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 7).

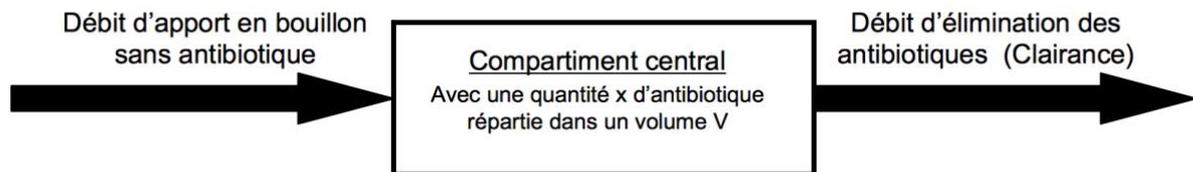


Figure 7 : Schéma des entrées et sorties du compartiment central. Le débit d'élimination choisi pour faire décroître les concentrations en antibiotique à la même vitesse qu'*in vivo* est aussi appliqué à l'entrée du système

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).

$$Cl = \frac{\text{Vitesse d'élimination}(t) \text{ en } \mu\text{g/h}}{\text{Concentration}(t) \text{ en } \mu\text{g/mL}} \quad \text{Équation 2}$$

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).

$$K_{10} = \frac{Cl}{V} \quad \text{Équation 3}$$

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 la fraction à épurer par unité de temps (K_{10}) pour obtenir ce temps de demi-vie d'après l'équation 4.

$$K_{10} = \frac{\ln 2}{T_{1/2}} \quad \text{Équation 4}$$

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.

1.3.1.5 Modèles d'études sur animaux

L'utilisation de modèles animaux pour l'évaluation des antimicrobiens a été décrite par Andes et Craig dans une revue en 2002 [73]. 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 de la souris est, par exemple, un modèle de choix dans le screening des molécules antibiotiques qui a été utilisé pour étudier les effets du premier sulfamide en 1935 [74].

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 permettent d'évaluer l'efficacité d'un traitement lors d'une situation physiologique particulière, comme l'insuffisance rénale [75], ou selon le site d'infection [76].

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 15 ans avaient une bonne concordance avec les valeurs retrouvées dans des études cliniques [77].

Cependant, la vitesse d'élimination d'un traitement n'est pas la même entre les animaux et les humains. Par exemple, la vancomycine est éliminée bien plus rapidement chez la souris ($T_{1/2} = 32$ minutes) que chez l'humain ($T_{1/2} = 4-6$ heures) [78] ce qui peut rendre difficile

l'extrapolation d'un résultat d'une espèce à l'autre. L'utilisation d'un modèle *in vitro* dynamique mimant plus précisément les variations de concentrations d'un traitement chez l'espèce cible semble plus judicieux, bien que le manque de composants du système immunitaire soit un point limitant.

1.3.1.6 Paramètres prédictifs de l'efficacité

Trois paramètres pharmacocinétiques (PK) sont généralement utilisés pour décrire l'exposition d'un organisme à un antibiotique (Figure 8) :

- **T_{>Concentration}** : le pourcentage de temps au-dessus d'une concentration,
- **AUC** : (Area Under the Curve) l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques,
- **C_{max}** : la concentration plasmatique maximale.

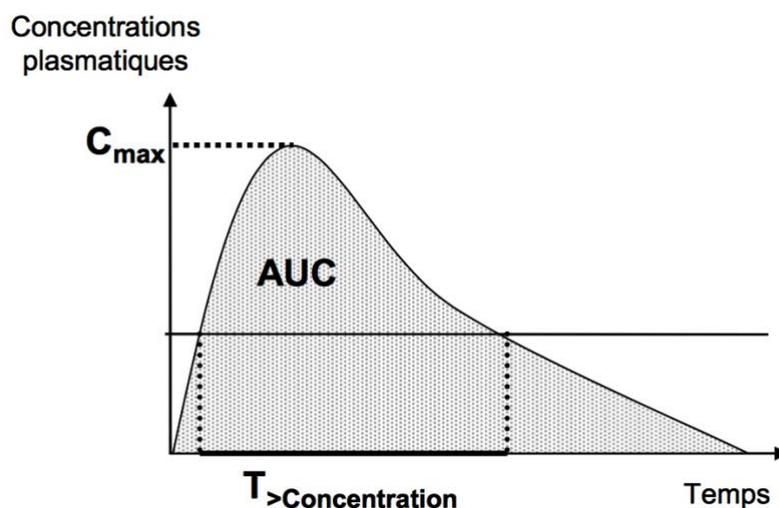


Figure 8 : Paramètres pharmacocinétiques utilisés pour décrire l'exposition d'un organisme à un antibiotique

Les indices pharmacocinétique/pharmacodynamique (PK/PD) sont hybrides ; ils tiennent compte à la fois de la sensibilité et de l'exposition de la souche à l'antibiotique. 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 très souvent représentatives des concentrations tissulaires au contact des bactéries. 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 tissus indique que les concentrations plasmatiques libres sont les mêmes que les concentrations libres tissulaires.

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

- **T_{>CMI}** : le pourcentage de temps entre 0 et 24 heures à l'équilibre pendant lequel les concentrations plasmatiques sont au-dessus de la CMI. Cet indice est exprimé en pourcents, il 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.
- **C_{max}/CMI** : la concentration plasmatique maximale divisée par la CMI. Cet indice est un rapport entre 2 concentrations et n'a pas d'unité. A l'opposé du T_{>CMI}, il tient compte de l'intensité de l'exposition mais pas de la durée.
- **AUC/CMI** : l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques entre 0 et 24 heures à l'équilibre divisée par la CMI ce qui correspond à l'AUC de 0 à l'infini divisée par la CMI 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.

1.3.2 Étude de l'efficacité sur les biofilms bactériens

Un antibiotique peut démontrer *in vitro* un effet bactéricide sur des bactéries planctoniques, sans pour autant que cela assure une efficacité sur des bactéries en biofilm. Ci-après seront détaillées les techniques les plus classiques utilisées pour étudier l'efficacité d'un traitement sur un biofilm bactérien.

1.3.2.1 *Bactéricidie avec concentration constante d'antibiotique*

1.3.2.1.1 La concentration minimale d'éradication du biofilm

La concentration minimale d'éradication du biofilm ou MBEC (Minimal Biofilm Eradication Concentration) permet d'évaluer la sensibilité d'un biofilm bactérien aux antibiotiques. Il s'agit de la plus petite concentration capable d'éradiquer *in vitro* un biofilm développé dans

des conditions standardisées. Plusieurs méthodes de réalisation sont possibles, mais la plus répandue est la méthode utilisant le Calgary Biofilm Device (CBD). Le CBD est un couvercle de plaque avec 96 picots qui peuvent s'insérer dans les puits d'une plaque 96 puits. Le couvercle est d'abord posé sur une plaque sans puits qui contient une solution à 5×10^5 UFC/mL de la souche bactérienne à tester. La plaque est mise à incuber 18 à 24h à 35°C, avec une légère agitation pour favoriser les interactions entre les bactéries et les picots. Le lendemain, le couvercle est retiré et transféré sur une plaque 96 puits préparée comme pour une détermination de CMI, avec une gamme de concentrations d'antibiotiques obtenue par une série de dilutions de progression géométrique au demi (Figure 9).

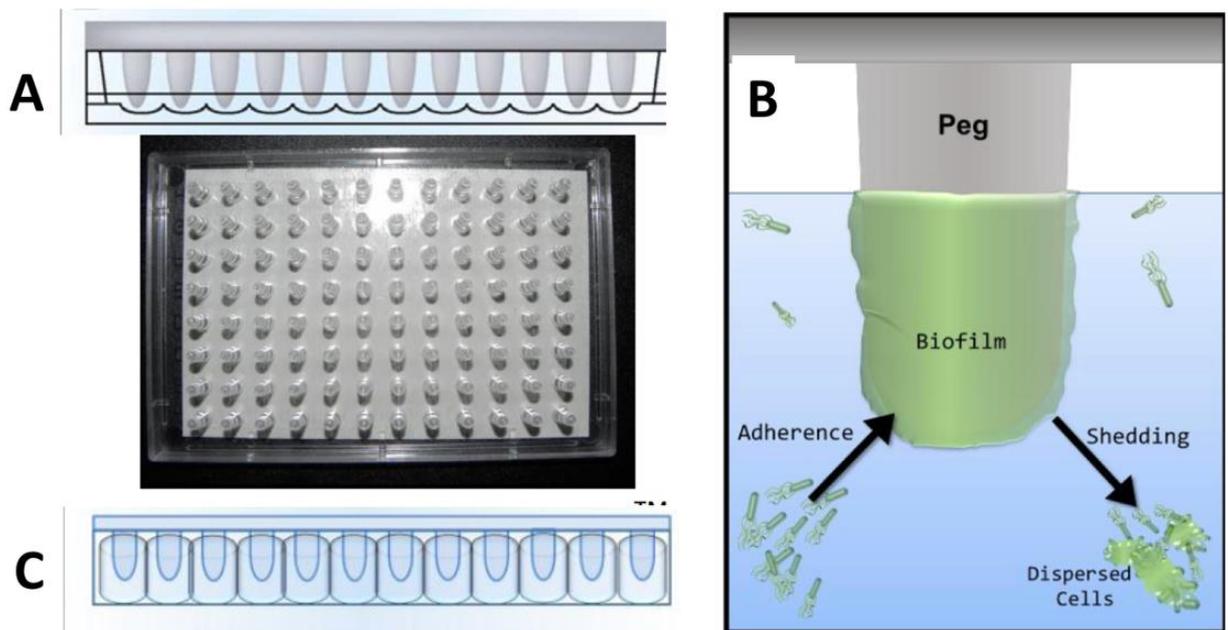


Figure 9 : Le CBD et la détermination de la MBEC. A/ Formation du biofilm, B/ Schéma d'un biofilm sur un picot, C/ Transfert du couvercle avec les picots sur une plaque 96 puits. Adapté de Innovotech.ca

Après incubation une nuit à 35°C, le couvercle est à nouveau transféré sur une plaque 96 puits contenant du milieu de culture frais. L'ensemble est mis 30 minutes dans un bain à ultrasons pour détruire le biofilm et disperser les bactéries du biofilm dans le milieu. Cette plaque est ensuite remise à l'étuve 16 à 20h à 35°C et la croissance bactérienne est observée le lendemain. La mesure est visuelle, par observation directe de la turbidité des solutions après une nuit d'incubation à l'étuve. La MBEC correspond à la concentration la plus faible en antibiotique pour laquelle aucune croissance n'est visible à l'œil nu, signifiant que le biofilm a été éradiqué. La MBEC peut avoir la même valeur que la CMI de la bactérie sous forme planctonique, ou au contraire être 100 à 1000 fois plus élevée. Cette méthode est facile à mettre en place et reproductible d'un laboratoire à l'autre [79].

1.3.2.1.2 Modèles de croissance de biofilm en plaques

Sur le même principe que pour les bactéries planctoniques, il est possible de réaliser des courbes de bactéricidie sur biofilm. Pour cela, il faut laisser des biofilms se former dans des plaques six puits pendant une nuit, rincer soigneusement et renouveler le surnageant pour ne garder que les bactéries en biofilm au fond des puits, et ensuite soumettre ces biofilms à des concentrations constantes d'antibiotiques. A intervalle régulier on peut soumettre une plaque à une sonication pour déstructurer le biofilm et compter les bactéries [69]. Ce modèle permet une évaluation rapide de la concentration bactérienne dans le biofilm pour chaque puits. Cependant un inconvénient est qu'on n'a qu'un seul prélèvement par puits et qu'il faut tenir compte de la variabilité inter-puits dans l'étude des résultats. De plus, sur le même principe que pour les bactéries planctoniques, un checkerboard peut être réalisé avec le CBD ou ce modèle en plaques pour évaluer l'effet d'une combinaison d'antibiotiques sur un biofilm *in vitro*.

L'inconvénient majeur de ces techniques est qu'une concentration constante d'un antibiotique pendant une vingtaine d'heure n'est pas représentative des concentrations obtenues chez un individu traité.

Une fois qu'un traitement a démontré une efficacité en conditions statiques sur un biofilm, il convient de vérifier cette efficacité dans des conditions dynamiques, avec des fluctuations de concentrations d'antibiotiques au cours du temps.

1.3.2.2 Bactéricidies avec concentration variable d'antibiotique

Des systèmes *in vitro* dynamiques ont été développés pour permettre d'exposer les biofilms à des concentrations d'antibiotiques variables au cours du temps. Ces techniques prennent plus de temps que les techniques dites statiques mais ont l'avantage de permettre de mimer l'élimination des antibiotiques par l'organisme *in vivo*. De plus, l'apport de milieu de culture frais permet une durée d'étude plus longue que lors d'études avec concentrations statiques en antibiotiques. Ces modèles sont donc plus prédictifs des effets *in vivo* que les modèles statiques.

La structure générale des systèmes dynamiques ressemble à la structure des systèmes ouverts décrits au paragraphe 1.3.1.4.1 pour les bactéries planctoniques. Le compartiment central contenant du milieu de culture représente le système vasculaire et l'objectif est d'y retrouver l'équivalent des concentrations plasmatiques d'antibiotique observées *in vivo*. Les

administrations d'antibiotiques sont réalisées de la même façon que pour les modèles de bactéries planctoniques et un jeu de pompes dilue les antibiotiques de la même façon. Au milieu du compartiment central on retrouve des structures spécifiques, comme des coupons, prévues pour que les bactéries y adhèrent et puissent développer un biofilm. Dans la plupart des systèmes, l'homogénéisation des bactéries est assurée par une agitation magnétique, ce qui crée un flux permettant aux bactéries planctoniques de rencontrer les surfaces d'adhésion. Il faut cependant noter que cette agitation soumet le biofilm à des forces de cisaillement qui ne seraient pas forcément rencontrées *in vivo*, et peut donc modifier les propriétés du biofilm. Une fois le biofilm formé, les antibiotiques sont ajoutés et les pompes démarrées.

Un modèle assez simple consiste en un nombre limité de tiges au milieu du compartiment central. Chaque tige est récupérée en fin de traitement et soumise à une sonication par ultrasons pour récupérer les bactéries du biofilm. Ce modèle est le plus utilisé pour simuler les endocardites bactériennes [80].

Un modèle plus évolué est le CDC bioreactor (Figure 10) qui permet d'avoir plusieurs prélèvements au cours du temps. Le couvercle du compartiment central sert de point d'attache à huit supports. Chaque support permet de fixer trois pièces circulaires, de même diamètre, appelées coupons, sur lesquels un biofilm va se former. Le matériau du coupon peut être choisi, et chaque coupon peut être récupéré individuellement. Un CDC permet donc d'avoir 24 prélèvements. Ce modèle peut être utilisé pour étudier la formation d'un biofilm, ou l'efficacité d'un traitement sur un biofilm déjà formé [81]. Cependant, le compartiment central d'un CDC présente un volume important, de 350 mL. Utiliser un tel modèle sur plusieurs jours nécessite une grande quantité de milieu de culture pour la dilution et une grande quantité d'antibiotique ce qui n'est pas toujours possible dans les phases de développement pré-clinique.

Comme pour les systèmes ouverts utilisés pour les bactéries planctoniques, les bactéries en suspension dans le compartiment central sont éliminées vers le compartiment déchet en même temps que les antibiotiques (Figure 4). La dilution des bactéries doit être prise en compte dans l'interprétation des résultats [68]. Ces modèles de biofilm sont très utiles mais il n'existe actuellement pas (ou peu) de modèles permettant d'évaluer l'efficacité d'un traitement dans son ensemble, en dynamique, à la fois sur les bactéries planctoniques et sur les bactéries du biofilm.

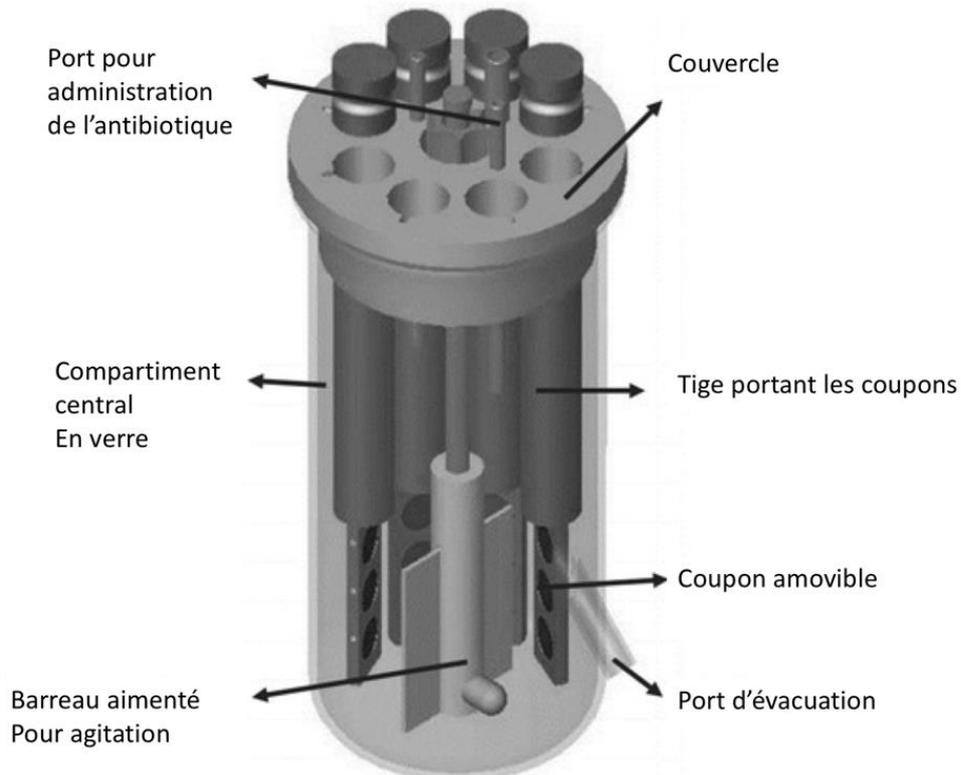


Figure 10 : Représentation d'un CDC bioréacteur, adapté de BioSurface Technologies Corp., Bozeman, MT, USA

1.3.2.3 Modèles animaux

Les modèles *ex vivo*, très utiles pour étudier et analyser la progression d'un biofilm sur une surface, ne présentent pas d'intérêt pour évaluer l'efficacité d'un traitement antibiotique sur un biofilm déjà formé. Les modèles de biofilm *in vivo* sur invertébrés et Zebra fish apportent de nombreuses informations sur l'efficacité d'un traitement mais des modèles plus proches de l'humain sont nécessaires. Les modèles animaux présentent comme principal avantage la présence du système immunitaire dans son ensemble. Cependant, *in vivo*, les infections liées à des biofilms sont généralement associées à une pathologie sous-jacente favorisant l'adhésion et/ou la prolifération des bactéries. Par exemple lors de pyodermites chez le chien. L'épithélium présente des lésions, ce qui facilite l'adhésion des bactéries et la formation d'un biofilm. Pour les patients atteints de mucoviscidose, le mucus épais freine l'élimination des bactéries pulmonaires. Ces pathologies parfois spécifiques d'espèces sont souvent difficilement reproductibles sur un modèle animal chez qui un biofilm bactérien ne développera pas. Le modèle ne sera pas suffisamment proche de la pathologie envisagée mais de nombreux efforts d'amélioration ont été faits pour imiter de façon la plus réaliste possible les infections liées à des biofilms. On retrouve des modèles de biofilms pulmonaires, ou de biofilm sur un corps étranger introduit chirurgicalement en position sous-cutanée sur les rongeurs. Pour un modèle de biofilm intra-vésical, censé mimer une infection chronique du

tractus urinaire, les bactéries sont directement introduites dans la vessie via un cathéter vésical. Les modèles de souris, rats, cochons ou lapins sont couramment utilisés [27,82].

En conclusion, les modèles d'études *in vitro* et *in vivo* qui sont complémentaires permettent de mieux connaître l'activité antibactérienne de nombreux antibiotiques. Ces modèles sont maintenant de plus en plus utilisés pour l'étude de l'émergence de résistances bactériennes.

Les résultats expérimentaux de cette thèse ont été obtenus à partir de détermination de la CMI, de réalisation de checkerboard assays, de courbes de bactéricidie et d'expérimentations avec le modèle HF.

1.4 La vancomycine

La vancomycine est un agent antibactérien obtenu à partir de *Streptomyces orientalis*.

A usage strictement humain, cet antibiotique appartient à la famille des glycopeptides. La plupart des informations de cette section sont tirées de l'ouvrage « The Pharmacological basis of Therapeutics » [83].

1.4.1 Spectre d'activité

La vancomycine a un spectre d'activité assez large contre les bactéries Gram +. Elle est bactéricide sur la plupart des organismes sensibles, et bactériostatique sur les entérocoques.

La vancomycine est indiquée pour le traitement des infections graves causées par des souches de *Staphylococcus aureus* résistant à la Méthicilline (SARM ou MRSA), pour les patients allergiques à la pénicilline, pour ceux qui ne peuvent recevoir ou qui ont déjà eu, sans succès, d'autres traitements comme les pénicillines ou les céphalosporines. La vancomycine est efficace pour le traitement des endocardites dues à des staphylocoques, et son efficacité a été documentée dans d'autres infections à staphylocoques, comme les septicémies, les infections osseuses, les infections du tractus respiratoire inférieur et certaines affections cutanées. Elle est aussi efficace contre des organismes comme *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Actinomyces* et le genre *Lactobacillus*.

Cependant considérée comme un traitement de « dernier recours », elle est surtout indiquée lorsqu'une infection à MRSA est suspectée ou en cas d'échec thérapeutique précédent.

1.4.2 Propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques

La vancomycine est un glycopeptide tricyclique de masse moléculaire d'environ 1500 daltons. C'est une molécule hydrophile.

La Figure 11 présente la structure de la molécule de vancomycine.

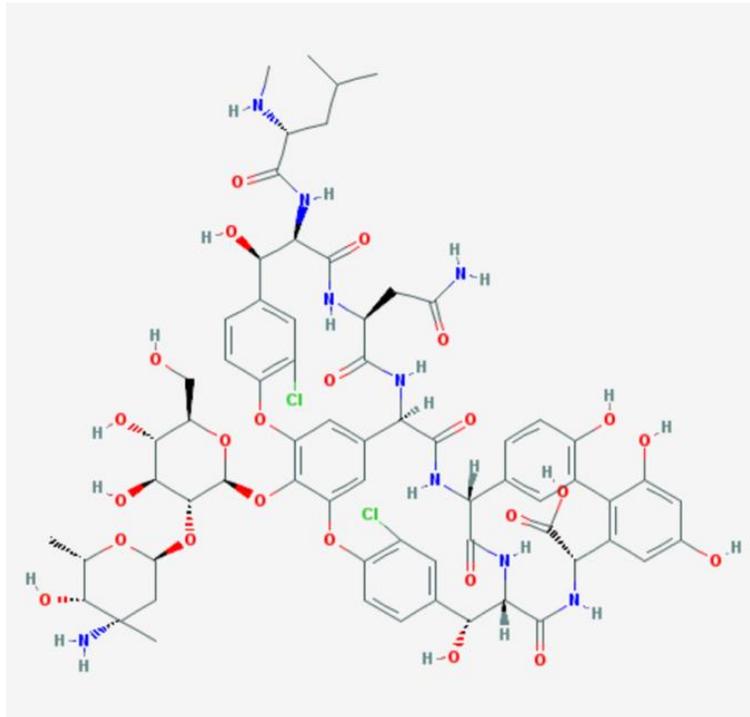


Figure 11 : molécule de vancomycine

- **Absorption** : En milieu hospitalier, la vancomycine est administrée par voie intraveineuse lente. La vancomycine est peu absorbée par voie orale (moins de 5%) et n'est jamais administrée par voie intramusculaire.
- **Distribution** : Une administration unique de 1g de vancomycine par voie intraveineuse chez l'adulte produit un pic de concentration plasmatique de 15 à 30 $\mu\text{g/mL}$ 1 à 2 heures après arrêt de la perfusion. La liaison aux protéines plasmatiques est de 55% i.e. pour un pic à 30 $\mu\text{g/mL}$, la concentration plasmatique libre de vancomycine est donc d'environ 18 $\mu\text{g/mL}$. Le volume de distribution, tel que discuté dans la littérature, varie entre 0.4 et 1 L/kg selon les sources. La vancomycine diffuse dans le lait et passe la barrière placentaire. La vancomycine ne passe pas la barrière hémato-méningée si celle-ci n'est pas inflammée.
- **Élimination** : L'élimination est relativement rapide, sous forme inchangée dans les urines, après excrétion par filtration glomérulaire (Dans les premières 24 heures, environ 75 à 80% d'une dose administrée est excrétée). La clairance plasmatique moyenne de la vancomycine est d'environ 0,058 L/kg/h. Chez un patient en bonne santé, sans trouble rénal, la demi-vie d'élimination plasmatique varie de 4 à 11h (6h en moyenne). Chez les patients atteints de maladie rénale, cette demi-vie s'allonge fortement, pouvant atteindre 7.5 jours.

Le mécanisme d'action de la vancomycine, similaire à celui des autres glycopeptides, est présenté dans la section suivante.

1.4.3 Mécanisme d'action des glycopeptides

1.4.3.1 Cibles

L'action bactéricide de la vancomycine résulte principalement de l'inhibition de la biosynthèse de la paroi cellulaire. La vancomycine se lie via des liaisons hydrogène à la partie D-alanyl-D-alanine (D-ala-D-ala) des précurseurs de la paroi bactérienne et va donc interférer avec la synthèse de la paroi bactérienne. Une fois liée, la vancomycine empêche mécaniquement l'incorporation de sous unités de l'acide N-acétylmuramique et de la N-acétylglucosamine dans la matrice de peptidoglycane, qui constitue le composant structurel majeur des parois cellulaires des bactéries Gram +. Cela va conduire à une lyse et donc destruction de la paroi bactérienne, et aboutir à la mort de la bactérie [83,84]. Son mode d'action est temps-dépendant.

1.4.3.2 Paramètres prédictifs de l'efficacité

La pertinence des trois indices PK/PD les plus communément décrits (AUC/CMI , C_{max}/CMI et $T > CMI$) pour prédire l'efficacité de la vancomycine a été testée *in vitro*, sur des modèles animaux et lors d'études cliniques. Pour la vancomycine, c'est le ratio AUC/CMI qui est considéré comme le plus prédictif de l'efficacité de l'antibiotique [85]. Un rapport de 400 a été prédictif de l'efficacité pour des patients atteints de pneumonie due à un MRSA [86]. Ce ratio est facilement atteignable à la posologie classique si la souche présente une CMI de $1\mu g/mL$. C'est donc la CMI qui est le facteur limitant de l'efficacité de la vancomycine. Même avec une CMI sous le cut-off épidémiologique, ce ratio peut être difficile à obtenir sans des ajustements thérapeutiques importants et du fait de la toxicité de la vancomycine, il est difficile d'augmenter les doses. Par exemple, un *S. aureus* avec une CMI de $2\mu g/mL$ est considéré comme sensible à la vancomycine, mais un ratio de 400 est difficile à atteindre avec le régime thérapeutique standard et la probabilité de guérison est plus faible.

1.4.4 Toxicité

La toxicité la plus fréquente induite par un traitement à la vancomycine est la toxicité rénale. Le risque de néphrotoxicité augmente fortement si les patients sont âgés de plus de 65 ans. Cette toxicité est le plus souvent réversible. Les facteurs de risque de cette néphrotoxicité sont la dose et la durée du traitement. Une corrélation significative entre les concentrations résiduelles avant une nouvelle administration lors de traitement à la vancomycine seule et la néphrotoxicité a été mise en évidence [87].

Une ototoxicité, transitoire ou permanente, a déjà été rapportée chez plusieurs patients. L'ototoxicité est surtout recensée chez des patients ayant eu de fortes doses IV de vancomycine, présentant une dysfonction rénale avant traitement, ou étant traités avec d'autres molécules ototoxiques, comme les aminoglycosides.

Des effets indésirables moins importants comme des vertiges, des acouphènes, ou une neutropénie réversible peuvent survenir. Lors d'administration intraveineuse, une réaction de type anaphylactique peut survenir avec hypotension, urticaire, douleurs musculaires et rougeurs sur le haut du corps et de la face. En cas de surdosage et d'apparition d'effets indésirables, le patient peut être dialysé. Les cartouches de dialyse utilisées sont en polysulfone, matériau qui laisse passer la vancomycine.

Les concentrations dans l'organisme doivent être contrôlées et ajustées afin d'être les plus efficaces possibles pour éradiquer les bactéries sans pour autant être délétères pour l'organisme.

1.4.5 Résistance

Une des causes de la résistance à la vancomycine est la modification des cibles de l'antibiotique. La vancomycine a une très forte affinité pour les fragments D-alanyl-D-alanine. Chez les souches résistantes d'entérocoques, après acquisition du gène *van*, ce fragment est modifié en D-alanyl-D-lactate. L'affinité de la vancomycine pour ce fragment est bien plus faible et donc l'antibiotique est moins efficace.

Cas particulier de *S. aureus* :

La résistance à la vancomycine est moins fréquente chez *S. aureus* que pour les entérocoques, mais est plus importante en termes d'élévation de CMI avec pour conséquence des bactéries plus virulentes. Pour les *S. aureus*, on distingue les souches intermédiaires des souches

résistantes à la vancomycine. Les souches intermédiaires, ou VISA pour Vancomycin Intermediate *Staphylococcus aureus*, ont une CMI en vancomycine comprise entre 2 et 8 µg/mL. Les souches résistantes, ou VRSA pour Vancomycin Resistant *S. aureus*, ont une CMI supérieure à 16µg/mL, qui peut parfois être atteindre 100µg/mL [88].

Le type VISA, retrouvé chez des souches MSSA et MRSA, semble être plutôt dû à une mutation lors d'un traitement prolongé à la vancomycine et non à un transfert de matériel génétique [88]. La mutation la plus fréquente retrouvée chez les souches VISA est la mutation du gène *rpoB*. Le gène *rpoB* code pour la sous-unité β d'une ARN polymérase. *rpoB* n'est pas décrit comme étant un gène régulateur mais sa mutation modifie radicalement le profil de transcription de la bactérie. Cette modification structurale de l'ARN polymérase semble conférer une résistance de *S. aureus* à la vancomycine et à d'autres antibiotiques. D'autres mutations retrouvées sur des VISA concernent les loci des gènes *walRK* et *vraUTSR* [89]. Une hypothèse est de considérer que des mutations concernant *rpoB*, *walRK* et *vraUTSR* sont la première étape d'une mutation d'un profil sensible à un profil VISA. Une hypothèse proposée pour expliquer la résistance à la vancomycine chez *S. aureus* est que la paroi des bactéries est modifiée, altérée, et que la vancomycine ne peut se fixer efficacement sur ses cibles. Des fragments D-ala-D-ala seraient présents en grande quantité sous forme libre dans la paroi de ces souches. On parle alors de pseudo-cibles sur lesquelles la vancomycine libre va se fixer mais n'aura aucun effet. La vancomycine n'est donc plus disponible dans le milieu pour éventuellement agir sur des bactéries sensibles, elle est comme immobilisée, mais est pourtant fonctionnelle [90]. Ce phénomène d'immobilisation de la vancomycine est représenté sur la Figure 12.

Le type VRSA, donnant lieu à une résistance de haut niveau, semble plutôt dû à un transfert de matériel génétique. Les VRSA sont la plupart du temps retrouvés dans des plaies de patients diabétiques et en présence d'autres bactéries, comme *E. faecalis* [88].

Les souches VISA et VRSA apparaissent morphologiquement plus petites que les souches sensibles, avec une paroi souvent plus épaisse et altérée, ce qui pourrait expliquer la résistance.

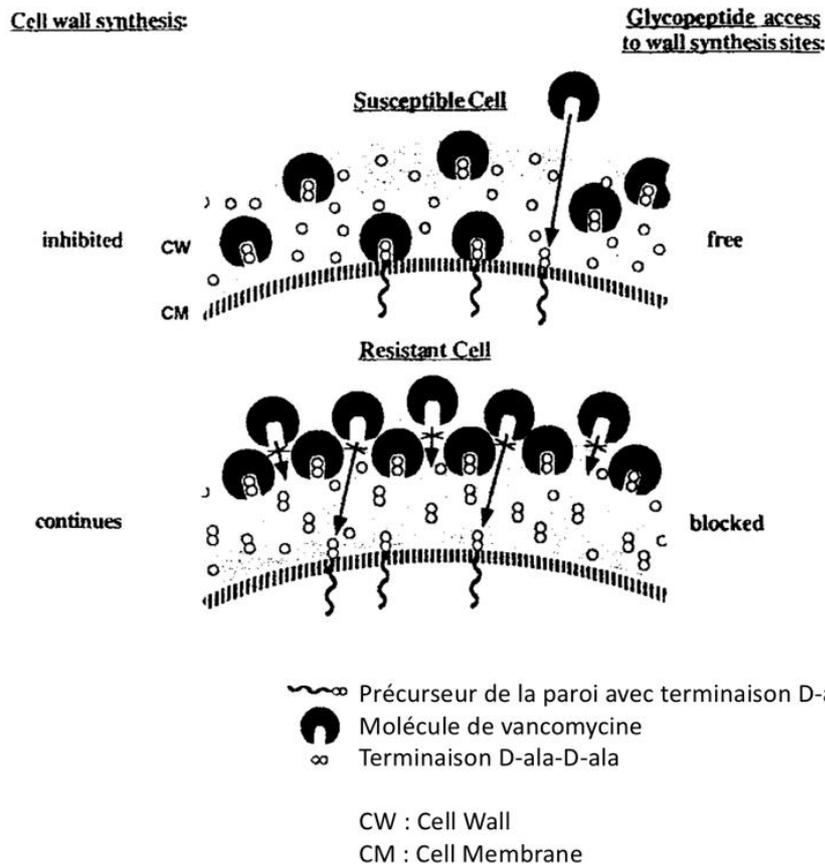


Figure 12 : modèle proposé pour expliquer la capture et immobilisation de la vancomycine par les bactéries VISA. Adapté de Sieradzki, Pinho et Tomasz

1.4.6 Associations

Lorsqu'une faible efficacité d'un traitement est anticipée (par exemple lors d'infection à VISA), une option thérapeutique facile à tester et à mettre en pratique est l'utilisation de deux molécules. Les combinaisons sont réfléchies pour élargir le spectre d'activité d'un traitement, obtenir une synergie entre les molécules et donc un effet bactéricide plus important, mais surtout, limiter l'apparition des résistances lors du traitement [63].

Lors d'endocardite ou lors d'infection due à un MRSA, la combinaison la plus commune avec la vancomycine est l'ajout d'un antibiotique appartenant à la famille des aminoglycosides [91,92]. Dans cette famille, on retrouve des molécules comme la gentamicine, ou l'amikacine.

Nous avons choisi d'utiliser l'amikacine pour ces travaux de recherche.

1.5 L'amikacine

La plupart des informations de cette section sont tirées de l'ouvrage « The Pharmacological basis of Therapeutics » [93].

L'amikacine est un agent antibactérien appartenant à la famille des aminoglycosides. Surtout destinée à l'usage humain, l'amikacine peut être utilisée en médecine vétérinaire pour traiter les poulains atteints de rhodococcose à *Rhodococcus equi* et pour des lavages intra-utérins. L'amikacine peut aussi être utilisée chez le chien pour traiter les otites à *Pseudomonas*.

Le nom de cette famille des aminoglycosides provient directement de leur structure générale. Les aminoglycosides comportent un hexose central, relié par des liaisons glycosidiques à des sucres aminés. L'hexose central, ou cycle aminocyclitol, peut être une streptidine ou une 2-deoxystreptamine. Selon les sucres aminés, on distingue deux familles, les néomycines et les kanamycines. Chez les kanamycines, deux sucres aminés sont liés à une fraction 2-deoxystreptamine centrale. L'amikacine est un dérivé semi-synthétique de la kanamycine, obtenu après acylation du premier sucre aminé de la fraction 2-deoxystreptamine avec un acide 2-hydroxy-4-aminobutyrique.

1.5.1 Spectre d'activité

L'amikacine est un antibiotique hémi-synthétique large spectre dérivé de la kanamycine. Cet agent est habituellement utilisé dans le traitement à court terme d'infections graves dues à des souches sensibles de bactéries Gram-négatives comme *Pseudomonas*, *Escherichia (E.) coli*, les genres *Proteus*, les genres *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* et les *Acinetobacter*. L'amikacine peut également être utilisée pour traiter les infections à *Mycobacterium avium* et à *Mycobacterium tuberculosis*. En association, l'amikacine peut être utilisée pour augmenter l'efficacité des traitements contre certaines bactéries Gram +.

1.5.2 Propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques

La Figure 13 présente la structure de la molécule d'amikacine.

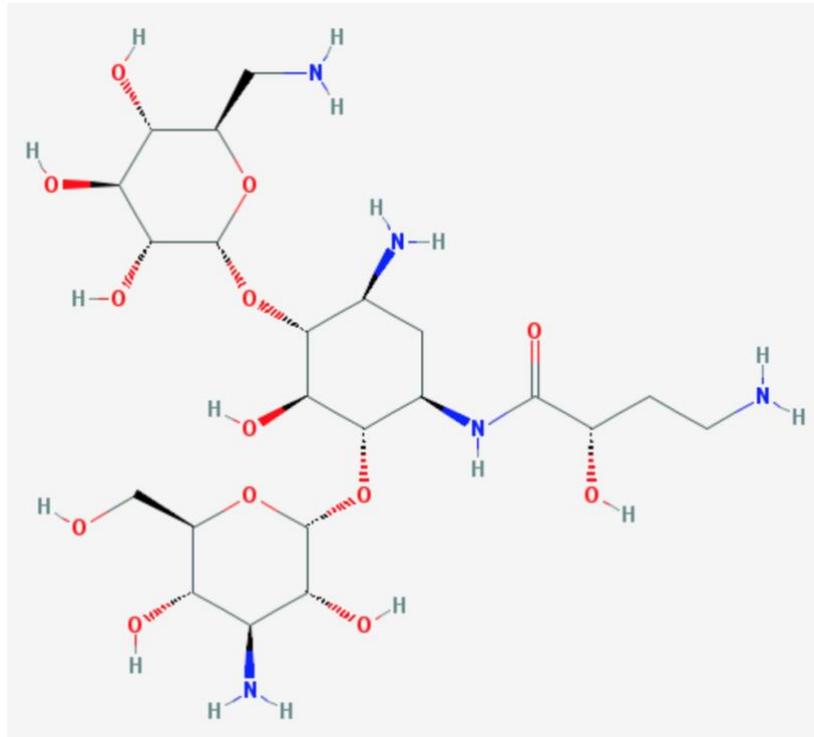


Figure 13 : molécule d'amikacine, avec le noyau central, les deux sucres aminés et la chaîne associés

- **Absorption :** Les aminoglycosides sont des cations très polaires, et donc très peu absorbés par le tractus gastro-intestinal. La biodisponibilité par voie orale est inférieure à 1%. En milieu hospitalier, l'amikacine est administrée par voie intraveineuse mais l'absorption est rapide après une injection intramusculaire.
- **Distribution :** Le volume de distribution pour un adulte en bonne santé est estimé à 25% du poids vif, ce qui correspond approximativement au volume extracellulaire. L'amikacine passe la barrière placentaire et est distribuée dans le liquide amniotique. Le pic de concentration fœtale est estimé à 16% du pic plasmatique de la mère. La liaison aux protéines plasmatique peut être considérée comme négligeable.
- **Élimination :** L'élimination est relativement rapide et essentiellement sous forme inchangée dans les urines. Chez un adulte avec une fonction rénale normale, 94 à 98% d'une administration unique intraveineuse ou intramusculaire d'amikacine est éliminée en 24h dans les urines par filtration glomérulaire. La clairance plasmatique moyenne de l'amikacine est d'environ 0.080 L/kg/h. Chez un patient en bonne santé, sans trouble rénal, la demi-vie d'élimination plasmatique est courte, de 2 à 3h en moyenne. Chez les patients atteints de maladie rénale, cette demi-vie s'allonge, jusqu'à atteindre 28 à 86 heures.

Le mécanisme d'action de l'amikacine, similaire à celui des autres aminosides, est présenté dans la section suivante.

1.5.3 Mécanisme d'action des aminosides

1.5.3.1 Cibles

Les aminosides sont des antibiotiques bactéricides concentration-dépendants. L'amikacine se lie de manière irréversible à la sous-unité ribosomale bactérienne 30S. Cette sous-unité est composée de 21 protéines et d'une molécule d'ARNr 16S. L'amikacine bloque spécifiquement l'ARNr 16S et la protéine S12. Cela conduit à une interférence avec le complexe d'initiation de la traduction et à une mauvaise lecture de l'ARNm, ce qui entrave la synthèse des protéines et entraîne un effet bactéricide.

1.5.3.2 Paramètres prédictifs de l'efficacité

Pour les aminoglycosides, qui sont des antibiotiques concentration-dépendants, c'est le rapport C_{\max}/CMI qui est considéré comme le plus prédictif de l'efficacité [94] et une valeur de 8 à 10 est recommandée pour assurer une efficacité du traitement contre le pathogène [95].

1.5.4 Toxicité

Les aminoglycosides présentent surtout une toxicité rénale et auditive. La toxicité est liée à la dose administrée, et donc au pic de concentration après administration et à la concentration résiduelle avant nouvelle administration, mais aussi à la durée du traitement. Pour limiter cette toxicité, les traitements doivent être les plus courts possibles, et aucune donnée de sécurité n'est disponible pour des traitements de plus de 14 jours.

La néphrotoxicité des aminosides est due à leur élimination dans les urines par filtration glomérulaire. Dans les urines, les aminosides sont sous forme ionisée, chargés positivement. La membrane des cellules des tubes contournés proximaux est riche en phospholipides, et est plutôt chargée négativement. Ceci favorise l'internalisation des aminosides, qui pénètrent par pinocytose. Dans les cellules se met alors en place un processus dégénératif puis nécrotique aboutissant à la mort de la cellule.

Le risque d'ototoxicité augmente si le patient présente des troubles rénaux avant traitement. Le premier signe est l'apparition de vertiges, marqueurs d'une atteinte vestibulaire, mais les

symptômes peuvent apparaître après l'arrêt du traitement. Cette toxicité est le plus souvent irréversible.

Comme tous les aminosides, l'amikacine présente une toxicité nécessitant une surveillance étroite, des ajustements thérapeutiques et une optimisation du choix des doses. Cette toxicité est le frein majeur à leur utilisation.

1.5.5 Persistance des infections, le cas particulier des Small Colony Variants

Chez *S. aureus*, un phénotype particulier a été mis en évidence il y a près d'un siècle. Des colonies plus petites et plus pâles apparaissent spontanément dans les cultures. Ces colonies sont appelées les Small Colony Variants (SCV). Ces SCV ont un rythme métabolique ralenti mais ne sont pas pour autant dans un état de dormance. Les SCV peuvent « se cacher » en position intracellulaire dans l'organisme et revenir à une forme de croissance rapide très virulente et lyser la cellule hôte une fois que le traitement antibiotique est terminé ou que la réponse immunitaire de l'hôte est diminuée. Cette position intracellulaire protège les SCV des défenses de l'hôte, diminue leur exposition aux antibiotiques, et est donc responsable de la chronicité et récurrence des infections [96].

Bien que ce phénotype apparaisse spontanément dans les populations sauvages de *S. aureus*, la fréquence d'apparition augmente fortement après un traitement antibiotique avec des d'aminoglycosides avec sélection de SCV menadione-dépendants ou hemine-dépendants [97–100]. Pour les SCV hemine-dépendants, il semblerait que ce phénotype fasse suite à des mutations génétiques, notamment à une délétion sur le gène *hemH* [98] ou *hemB*. Garcia *et al* [101] ont mis en évidence une moindre activité de la vancomycine sur des SCV mutants de *S. aureus* hemine- et menadione-dépendants par rapport à la souche sauvage.

Ce phénotype est réversible, ce qui les rend particulièrement difficile à identifier et caractériser [102] mais il ne doit pas être sous-estimé lors d'infection chronique à *S. aureus*, et plus particulièrement si un aminoglycoside a été utilisé.

1.5.6 Résistance

La résistance d'une bactérie à un antibiotique peut être due à un défaut de perméabilité, une diminution de l'affinité de l'antibiotique pour les ribosomes bactériens ou à une inactivation de l'antibiotique par des enzymes bactériennes. C'est l'inactivation et dégradation par les enzymes bactériennes qui est la cause principale des résistances aux aminoglycosides. Les enzymes bactériennes phosphorylent, adénylent ou acétylent les groupements hydroxyl ou aminés.

Les gènes codant pour ces enzymes sont acquis par conjugaison et transfert d'ADN via des plasmides. Ces plasmides sont assez répandus et codent pour plus de 20 enzymes différentes. L'amikacine est l'aminoglycoside le moins vulnérable à la modification par les enzymes, la chaîne moléculaire lui conférant une protection vis-à-vis des enzymes. L'amikacine peut donc être utilisée même si une résistance à la gentamicine ou à la tobramycine a été mise en évidence.

1.6 La marbofloxacin

La plupart des des informations de cette section sont tirées de l'ouvrage « The Pharmacological basis of Therapeutics » [93] et « Veterinary Pharmacology and Therapeutics » [102].

La marbofloxacin est un agent antibactérien de synthèse, à usage vétérinaire, appartenant à la famille des **fluoroquinolones**. Cet antibiotique ayant des indications thérapeutiques aussi bien chez les animaux de compagnie que chez les animaux de rente a été utilisé pour les études expérimentales de ce travail de thèse qui ont été réalisées dans le laboratoire de Vétuquinol.

1.6.1 Spectre d'activité

La marbofloxacin a un spectre d'activité large et est indiquée dans le traitement de diverses infections à bactéries à Gram négatif ou à Gram positif. Si le genre *Staphylococcus* est en général sensible à la marbofloxacin, les *S. aureus* résistants à la méthicilline sont le plus souvent résistants aux fluoroquinolones.

Elle est indiquée dans le traitement d'infections respiratoires à *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* et *Mycoplasma bovis* chez les bovins et à *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae* et *Pasteurella multocida* chez le porc. La marbofloxacin est également utilisable pour le traitement des gastro-entérites dues à *Escherichia coli* K99 chez le veau, truie et en deuxième intention pour les mammites de la vache laitière lorsque la souche y est sensible. Chez le chien, la marbofloxacin est indiquée dans le traitement des pyodermites, des infections respiratoires et des infections du tractus urinaire dues à *Escherichia coli* ou à *Proteus mirabilis*. Chez le chat, la marbofloxacin est indiquée dans le traitement des infections cutanées.

1.6.2 Usage des fluoroquinolones en France : réglementation

En France, l'utilisation des fluoroquinolones est règlementée depuis que cette famille d'antibiotiques est inscrite sur la liste des antibiotiques d'importance critique de l'arrêté du 18 mars 2016, au même titre que les céphalosporines de 3^{ème} et 4^{ème} génération.

Le décret n°2016-317 du 16 mars 2016 relatif à la prescription et à la délivrance des médicaments utilisés en médecine vétérinaire contenant une ou plusieurs substances antibiotiques d'importance critique, entré en vigueur au 1^{er} avril 2016, contient 3 articles dont les spécificités concernant l'utilisation de fluoroquinolones sont les suivantes :

L'article R. 5141-117-1 détaille que « La prescription d'un médicament en médecine vétérinaire contenant une ou plusieurs substances antibiotiques d'importance critique mentionnées à l'article L. 5144-1-1 est **réservée aux traitements métaphylactiques et curatifs** ».

L'article R. 5141-117-2 dit que « la prescription d'un médicament utilisé en médecine vétérinaire contenant une ou plusieurs substances antibiotiques d'importance critique mentionnées à l'article L. 5144-1-1 est subordonnée :

1° A la réalisation préalable d'un **examen clinique effectué par le vétérinaire prescripteur** ou d'un examen nécropsique effectué à sa demande, ainsi que d'une analyse du contexte épidémiologique ;

2° A la réalisation préalable d'un examen complémentaire visant à **identifier la souche bactérienne responsable de l'infection** à partir d'un échantillon prélevé par le vétérinaire prescripteur ou à sa demande, sur un ou plusieurs animaux vivants ou morts, sous réserve que la localisation de l'infection, le type d'infection ou l'état général du ou des animaux permettent le prélèvement d'échantillon ;

3° A la réalisation préalable d'un examen complémentaire visant à **démontrer la sensibilité de la souche bactérienne** identifiée à **cet antibiotique** au moyen d'un test de sensibilité réalisé selon une des méthodes fixées par arrêté conjoint des ministres chargés de la santé et de l'agriculture ;

Par dérogation, le vétérinaire n'est pas tenu de réaliser les examens complémentaires mentionnés aux 2° et 3° si les résultats d'examens complémentaires effectués depuis moins de trois mois pour le même animal ou **des animaux du même stade physiologique présents sur le même site et pour la même affection ont été portés à sa connaissance** ».

« Par dérogation [...], un médicament contenant une ou plusieurs substances antibiotiques d'importance critique [...] **peut être prescrit avant connaissance des résultats des examens complémentaires lorsqu'il s'agit d'un cas aigu d'infection bactérienne pour laquelle un traitement avec d'autres familles d'antibiotiques serait insuffisamment efficace**. Dans un délai de quatre jours après la prescription, le vétérinaire adapte le traitement en fonction de l'évolution du contexte clinique et épidémiologique et des résultats des examens complémentaires portés à sa connaissance ».

1.6.3 Propriétés PK/PD

La Figure 14 présente la structure de la molécule de marbofloxacin.

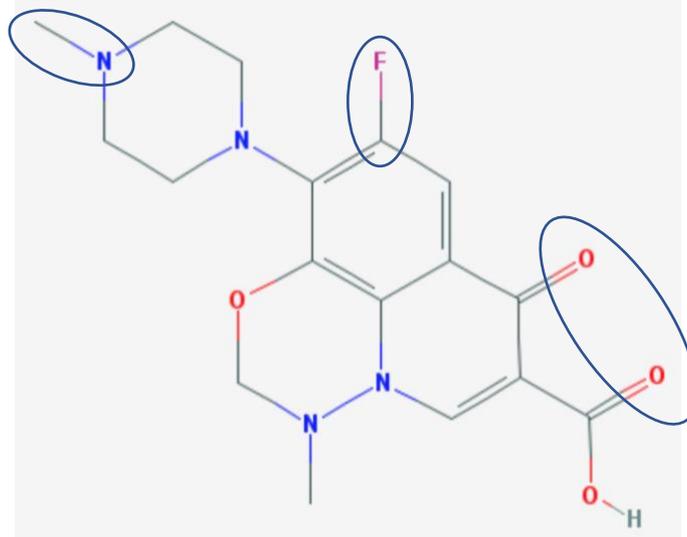


Figure 14 : Molécule de marbofloxacin avec les groupements d'intérêt pour l'activité antibactérienne entourés

Les 2 atomes d'oxygène entourés sur la figure 14 permettent la liaison de la molécule à ses cibles bactériennes. Deux autres groupements chimiques de la molécule, le fluor et le groupement méthyle, sont particulièrement intéressants. La présence d'un fluor facilite le passage de la membrane des bactéries à Gram positif et le groupement méthyle confère à la marbofloxacin une activité bactéricide sur les *Pseudomonas*.

- **Absorption :** La biodisponibilité de la marbofloxacin est élevée. Le pourcentage de la dose qui parvient au système vasculaire après une administration extravasculaire varie entre 62 à 100 % selon la voie d'administration. Le temps nécessaire pour atteindre le pic de concentration plasmatique est court (inférieur à 2 heures).
- **Distribution :** La diffusion dans l'organisme de la marbofloxacin est large ; le volume de distribution à l'équilibre est d'environ 1.3 L/kg. La liaison aux protéines plasmatiques est faible (inférieure à 10% pour les carnivores domestiques et les porcs, inférieure à 30% pour les bovins). La marbofloxacin pénètre dans le cytoplasme des bactéries à Gram positif par diffusion. Le passage de la membrane externe des bactéries à Gram négatif se fait par la complexation des ions magnésium qui provoque une désorganisation des lipopolysaccharides ou par un passage actif à travers des protéines transmembranaires appelées porines. Le mécanisme d'action de la marbofloxacin, similaire à celui des autres fluoroquinolones, est présenté dans la section suivante.

- Élimination : L'élimination est lente. La marbofloxacin est essentiellement éliminée sous forme active, pour 2/3 par voie urinaire et pour 1/3 par voie fécale dans la plupart des espèces animales. Le temps de demi-vie est de 4 à 14 heures selon l'espèce.

1.6.4 Mécanisme d'action

Les connaissances actuelles sur le mécanisme d'action des fluoroquinolones ont fait l'objet d'une revue en 2008 par Drlica et al [103].

1.6.4.1 Cibles intrabactériennes

Les cibles bactériennes des fluoroquinolones sont deux enzymes : la gyrase et la topoisomérase IV. La gyrase et la topoisomérase IV sont des enzymes intervenant dans la réplication de l'ADN qui créent au cours de leur activité des paires de fragments simples brins à plusieurs endroits sur l'ADN. Elles se lient alors de manière covalente à l'extrémité 5' de l'ADN clivé.

1.6.4.2 Mécanisme de fixation des fluoroquinolones aux complexes enzymes/ADN

Les quinolones qui se lient au complexe enzyme/ADN se fixent rapidement à la gyrase ou à la topoisomérase IV probablement avant que l'ADN ne soit clivé ; il se forme alors un **complexe ternaire**. La fixation des fluoroquinolones aux complexes enzyme-ADN inhibe la religation des fragments simples brins de l'ADN en maintenant les enzymes fixées à l'ADN. Ces structures, appelées « complexes clivés », inhibent la synthèse d'ADN en bloquant la fourche de réplication. Pour les bactéries à Gram négatif où la gyrase est la cible préférentielle pour la majorité des fluoroquinolones, la réplication est bloquée en quelques minutes. Pour les bactéries à Gram positif où la topoisomérase IV est la cible bactérienne préférentielle des fluoroquinolones l'inhibition de la synthèse d'ADN est plus lente probablement parce que la topoisomérase IV est située en aval des fourches de réplication alors que la gyrase est en amont.

1.6.4.3 Paramètre prédictif de l'efficacité

Pour les fluoroquinolones, d'après des études *in vitro* [104,105] et *in vivo* [106–108], c'est le paramètre AUC/CMI qui semble être le plus prédictif de l'efficacité du traitement.

1.6.5 Toxicité

En raison de sa chondrotoxicité, l'usage de la marbofloxacin est déconseillé chez les jeunes animaux. Son utilisation est relativement sûre dans toutes les autres situations. Si l'usage des fluoroquinolones a pu être corrélé à des tendinites chez l'humain, cette toxicité n'a pas été mise en évidence chez les animaux.

1.6.6 Résistance

Les mécanismes de résistance aux fluoroquinolones peuvent être dus à :

- Des mutations sur les gènes codant pour les cibles : Pour *Escherichia coli* et les autres bactéries à Gram négatif, la gyrase est la cible préférentielle et la topoisomérase IV est la cible secondaire pour la plupart des fluoroquinolones. Les mutations les plus fréquentes sont celles sur *gyrA* et *parC*. Les mutations sur *gyrB* et *parE* sont rarement observées et confèrent des résistances bien moins élevées que celles dues à des mutations sur *gyrA* et *parC*.
- Une surexpression des pompes à efflux chromosomiques : Les résistances dues à une baisse des concentrations intrabactériennes proviennent de variations d'expression des protéines de transports membranaires telles que les porines et les pompes à efflux. Les porines permettent aux fluoroquinolones de franchir la membrane externe des bactéries à Gram négatif pour entrer dans la cellule. Les pompes à efflux, à l'opposé, font sortir l'antibiotique de la cellule par un transport actif. La diminution des concentrations intrabactériennes en antibiotique sans mutation supplémentaire induit rarement des résistances élevées mais ce phénomène peut potentialiser des résistances dues à des mutations sur les cibles des fluoroquinolones.
- Des résistances plasmidiques : Les résistances aux fluoroquinolones sont aujourd'hui le plus souvent dues à des mutations sur les gènes codant pour les cibles bactériennes. Cependant, de plus en plus d'études montrent l'existence de résistances aux fluoroquinolones dues à des protéines codées par des gènes plasmidiques (PMQR).

:Plasmid-mediated Quinolone Resistance). Ces résistances sont souvent de faible degré mais la capacité de diffusion de ces gènes entre les bactéries et l'association possible à des gènes codant pour des résistances à d'autres antibiotiques font des résistances plasmidiques aux fluoroquinolones un nouvel enjeu en antibiothérapie.

1.7 Conclusion et projet de thèse

L'antibiorésistance est actuellement un enjeu majeur de santé publique en termes de mortalité et de coûts engendrés.

De nouvelles stratégies doivent être développées pour lutter contre les résistances bactériennes et pour optimiser l'usage des antibiotiques. La mise sur le marché de nouvelles molécules est un processus fastidieux, long et coûteux. Une piste qui semble plus facile à étudier et à mettre en place est le développement de combinaisons d'antibiotiques déjà existants.

La synthèse bibliographique a mis en évidence que l'efficacité d'une combinaison de molécules connues est d'abord testée en laboratoire, avec des méthodes standardisées. La sensibilité d'une souche à un antibiotique est évaluée par la CMI, et celle d'une combinaison par le checkerboard assay, mais les conditions de réalisation de ces méthodes sont très standardisées et peu représentatives de situations cliniques. Un inoculum de taille standard est utilisé et est confronté à une concentration constante en antibiotique sur une durée relativement courte, alors que la charge bactérienne lors d'une infection peut être bien plus importante et que les concentrations d'antibiotiques fluctuent au cours du temps et pendant la durée du traitement. Ces méthodes standard donnent donc des indications sur la potentielle efficacité d'un traitement, mais les résultats sont difficilement extrapolables.

L'objectif de cette thèse a été de développer et valider un modèle *in vitro* dynamique mimant les fluctuations de concentrations d'antibiotiques au cours du temps pendant toute la durée d'un traitement pour évaluer leur activité antibactérienne, et d'utiliser ce modèle pour adapter et optimiser *in vitro* les schémas thérapeutiques des antibiotiques lors d'utilisation de combinaisons et/ou lors d'infections associées à des biofilms.

En effet, la synthèse bibliographique a aussi mis en évidence que les biofilms et leur implication dans la chronicité des infections sont souvent négligés. Le caractère récalcitrant aux traitements d'un biofilm est souvent sous-évalué, voire non évalué. La structure du biofilm offre une protection aux bactéries et lui permet de supporter de fortes concentrations en antibiotiques, et un traitement *a priori* efficace sur une population planctonique peut se révéler totalement inefficace sur la même bactérie vivant dans un biofilm.

Il apparaissait donc pertinent d'étudier simultanément l'efficacité d'un traitement antibiotique sur un biofilm et sur les bactéries planctoniques associées, à la fois en termes de bactéricidie mais aussi de sélection de résistance.

Les objectifs de cette thèse ont été de :

- Mettre en évidence l'intérêt des systèmes *in vitro* dynamiques pour évaluer l'efficacité d'une combinaison d'antibiotiques pour des infections complexes.
- Développer un système *in vitro* dynamique innovant permettant d'évaluer l'efficacité d'un traitement réalisé dans son ensemble, sur un biofilm mature et sur les bactéries planctoniques associées, pour évaluer l'optimisation d'un traitement en termes d'efficacité et d'impact sur la sélection des résistances
- Développer des améliorations de ce système pour mimer des conditions associées à certains types d'infections rencontrées chez l'Homme ou chez l'animal

Ce travail de thèse est constitué de plusieurs études *in vitro*.

La première a été la comparaison de techniques de laboratoire qualifiées de statiques et dynamiques face à deux tailles d'inoculum bactérien pour évaluer leur capacité à détecter l'efficacité d'une combinaison de deux antibiotiques.

La deuxième étude a consisté à développer un modèle de biofilm et à tenter, grâce au système dynamique, d'optimiser la combinaison d'antibiotiques sélectionnés en reproduisant plusieurs profils de concentrations basés sur leurs caractéristiques pharmacocinétiques. L'originalité réside en l'évaluation d'un traitement sur plusieurs jours sur des bactéries d'un biofilm et sur les bactéries planctoniques associées.

Enfin, une fois le modèle maîtrisé, des pistes d'amélioration du système ont été testées séparément, comme l'utilisation dans du lait pour reproduire les conditions rencontrées lors de mammites de la vache laitière plutôt qu'un milieu de culture de laboratoire, ou la sélection de composants du système immunitaire dans l'idée de les incorporer ultérieurement au système *in vitro* dynamique.

2 Étude expérimentale

2.1 Contribution de l'utilisation de modèles *in vitro* dynamiques à l'évaluation de l'efficacité d'une combinaison d'antibiotiques sur des bactéries planctoniques

Cette partie s'appuie sur l'article « *In vitro* static and dynamic assays are complementary tools to evaluate the efficacy of antimicrobial drugs combination against *Staphylococcus aureus* complicated infections » soumis dans le journal PLOs one (voir paragraphe 2.1.6).

2.1.1 Problématique

La plupart des études pour évaluer la sensibilité d'une souche bactérienne à un antibiotique, comme la mesure de la CMI, sont menées en exposant une taille fixe d'inoculum bactérien (environ $5 \log_{10}$ CFU/mL) à différentes concentrations constantes d'antibiotiques sur une durée déterminée, souvent moins de 24 heures à cause de l'absence de renouvellement de milieu de culture. Les études pour évaluer l'efficacité d'une combinaison de molécules sur une souche bactérienne, comme le checkerboard assay (CA), sont souvent réalisées sur le même modèle. Or, en situation clinique, la taille de l'inoculum bactérien est souvent supérieure à cette taille fixée *a priori* et la concentration d'antibiotiques fluctue au cours du temps : l'antibiotique est éliminé par l'organisme, et les traitements sont la plupart du temps constitués d'administrations répétées sur plusieurs jours. Des techniques pour étudier l'effet de concentrations fluctuantes d'antibiotiques au cours du temps sur des charges bactériennes plus importantes sont disponibles, mais elles sont plus coûteuses et plus chronophages que les techniques plus classiques comme la détermination de la CMI ou les CA. Nous nous sommes donc demandé si ces techniques plus complexes apportaient plus d'informations sur l'efficacité d'une combinaison d'antibiotiques que les techniques les plus simples.

2.1.2 Objectif

L'objectif de cette étude était de comparer la capacité de différentes techniques de laboratoire à prédire l'efficacité d'une combinaison d'antibiotiques sur une souche bactérienne donnée, selon la taille de l'inoculum et/ou le milieu utilisé.

Cette étude a été réalisée en exposant deux tailles différentes d'inoculum (environ 5 et 9 log₁₀ UFC/mL) de deux souches de *S. aureus*, un MRSA et un MSSA, à deux antibiotiques, la vancomycine et l'amikacine, utilisés seuls puis en combinaison, en conditions statiques et dynamiques.

Pour les techniques les plus simples, l'activité des antibiotiques a été évaluée par observation directe de la turbidité du milieu. Pour d'autres essais, le nombre de bactéries vivantes a été suivi au cours du temps afin de comparer l'activité des antibiotiques utilisés seuls ou en combinaison.

2.1.3 Matériel et Méthodes

2.1.3.1 Souches bactériennes et antibiotiques

Deux souches de *S. aureus* ont été utilisées :

- *S. aureus* Hg 001, dérivé de la souche NCTC 8325, sensible à la méthicilline (MSSA),
- *S. aureus* ATCC 33591, résistant à la méthicilline (MRSA).

Ces deux souches ont été utilisées pour la détermination de la CMI, pour le CA, pour les courbes de bactéricidie avec concentrations constantes d'antibiotiques (sTKS pour Static Time Kill Studies). Seule la souche Hg 001 a été utilisée pour les courbes de bactéricidie avec concentrations dynamiques d'antibiotiques (dTKS pour dynamic TKS).

Les fractions aliquotes de bactéries ont été stockées à -80°C dans du Bouillon Mueller-Hinton (BMH) supplémenté avec 15% de glycérol. La veille de chaque essai, 10µL de cette suspension étaient étalés sur gélose MH et mis à incuber à 37°C pour la nuit.

Deux antibiotiques ont été utilisés : la vancomycine et l'amikacine.

De la poudre d'amikacine sulfate (Amikacine Mylan®) et de la poudre de chlorhydrate de vancomycine (Vancomycin Sandoz®) pour injections intraveineuses ont été utilisées pour

préparer des solutions d'antibiotiques aux concentrations désirées dans de l'eau stérile. Les aliquots ont été conservés à -20°C pour moins d'un mois et décongelés juste avant chaque essai.

Les essais ont été réalisés soit dans du BMH soit dans du RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium) qui est un milieu de culture utilisé en culture cellulaire.

2.1.3.2 Schéma expérimental

Le programme de tous les essais réalisés dans cette étude est détaillé dans le tableau 1.

Tableau 1 : Schéma expérimental de l'étude et conditions de réalisation des différents essais

	MSSA		MRSA	
	BMH	RPMI	BMH	RPMI
CMI	SI	SI	SI	SI
Checkerboard	SI	SI	SI	SI
sTKS	SI et LI	SI et LI	SI et LI	SI et LI
dTKS	NR	SI et LI	NR	NR

SI : inoculum standard

LI : gros inoculum (Large inoculum)

NR : non réalisé

2.1.3.3 Évaluation de la sensibilité

La détermination de la CMI de la vancomycine et de l'amikacine a été réalisée dans du BMH et dans du RPMI selon la méthode de microdilution préconisée par le CLSI [66] et décrite dans le paragraphe 1.3.1.1. Un inoculum de $5.7 \log_{10}$ 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 18 heures à 35°C.

2.1.3.4 Checkerboard assay

La détermination du FIC index de la vancomycine et de l'amikacine utilisées en combinaison a été réalisée dans du BMH et dans du RPMI selon la méthode de microdilution décrite dans le

paragraphe 1.3.1.2 [67]. Un inoculum de $5.7 \log_{10}$ UFC/mL a été mis en contact avec une gamme de concentrations d'antibiotiques obtenue par une série de dilutions au demi le long de l'abscisse et le long de l'ordonnée d'une plaque 96 puits. Le FIC index a été calculé selon l'équation 1 à partir des CMI des antibiotiques utilisés seuls et en combinaison après une incubation de 18 heures à 35°C.

2.1.3.5 *Courbes de bactéricidie avec concentrations statiques d'antibiotiques*

La relation entre les concentrations et l'activité de la vancomycine et de l'amikacine, seules ou en combinaison, sur deux tailles d'inocula de bactéries a été évaluée en réalisant des courbes de bactéricidie. Les concentrations en antibiotiques au contact de la suspension bactérienne étaient constantes pendant toute la durée de l'essai. Des colonies de *S. aureus* (MRSA et MSSA) ensemencées la veille sur une gélose MH ont été mises en suspension dans 20 mL de BMH ou de RPMI puis placées à l'agitation pour la nuit à 37°C. Le lendemain, ces suspensions ont été diluées dans du BMH ou du RPMI pour obtenir des concentrations en bactéries de 5 et $9 \log_{10}$ UFC/mL.

De l'antibiotique ou non (témoin) a été ajouté dans chaque tube, à une concentration équivalente à la concentration plasmatique libre obtenue après une administration intraveineuse de 1g de vancomycine (i.e. $18 \mu\text{g/mL}$) et/ou de 15mg/kg d'amikacine (i.e. $70 \mu\text{g/mL}$) à des patients.

Les suspensions ont ensuite été placées à l'étuve à 37°C et des prélèvements ont été effectués dans chaque tube 0, 1, 2, 4, 6, 8 et 24 heures après l'ajout d'antibiotique pour dénombrer les bactéries vivantes. Tous les essais ont été réalisés en duplicat.

2.1.3.6 *Courbes de bactéricidie avec concentrations fluctuantes d'antibiotiques*

Un système *in vitro* dynamique a été utilisé pour étudier l'efficacité de deux antibiotiques, utilisés seuls ou en combinaison, sur deux tailles d'inocula différentes de *S. aureus* Hg 001 dans du RPMI, en mimant les fluctuations de concentrations obtenues *in vivo* lors d'un traitement de 5 jours.

Un système Hollow Fiber comme décrit dans le paragraphe 1.3.1.4.2 a été utilisé et placé dans un incubateur à 37°C pendant toute la durée de l'étude. A partir d'une suspension bactérienne mise à l'agitation toute la nuit dans du RPMI à 37°C et de dilutions en série dans du milieu frais, une solution bactérienne de 5.0 log₁₀ UFC/mL a été injectée directement dans le compartiment extra-capillaire d'une cartouche (FiberCell System, Fredericks, MD, USA). L'antibiotique a été administré pour la 1^{ère} fois une demi-heure après ajout des bactéries pour les essais sur inoculum standard (SI), et 3 jours après inoculation des bactéries dans l'espace extra-capillaire pour les essais sur gros inoculum (LI pour Large Inoculum).

Nous avons souhaité reproduire un traitement de vancomycine, administrée seule deux fois par jour à la posologie de 1g par administration, d'amikacine administrée seule une fois par jour à la dose de 15mg/kg et la combinaison des deux antibiotiques à la même posologie sur une durée de 5 jours.

Chaque antibiotique a été administré à la concentration maximale représentative de la concentration libre plasmatique maximale après administration de chacun des antibiotiques, i.e. 18µg/mL deux fois par jour pour la vancomycine et 70µg/mL une fois par jour pour l'amikacine. Après la première administration, l'élimination a été mimée en diluant l'antibiotique avec une pompe péristaltique apportant du RPMI sans antibiotique. Nous avons souhaité reproduire l'élimination de la vancomycine et de l'amikacine chez le patient où la demi-vie est de 4h. Le volume de notre système étant de 265 mL, nous avons appliqué un débit de 47.5 mL/h aux pompes situées en amont et en aval du système pour maintenir le volume du système constant (voir le calcul au paragraphe 1.3.1.4.3).

Des prélèvements ont été effectués dans l'espace extra-capillaire à 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 34, 48, 58, 82, 80, 96 et 104 heures après la première injection d'antibiotique pour dénombrer les bactéries.

Les expériences (contrôle et exposition aux antibiotiques seuls ou en combinaison) ont été effectués en duplicat pour le gros inoculum pour s'assurer de la reproductibilité.

2.1.3.7 *Méthode de dénombrement des bactéries*

A chaque temps de prélèvement, un aliquot d'environ 1mL a été prélevé du compartiment central et centrifugé 5 minutes à 3000g. Le surnageant a été stocké à -80°C pour dosage ultérieur d'antibiotique. Le culot a été remis en suspension dans du NaCl 0.9%. Le dénombrement des bactéries vivantes dans la suspension s'est fait à partir de dilutions en série au dixième. 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 18h à 37°C, les colonies formées à l'emplacement de chaque dépôt ont été comptées si leur nombre était compris entre 0 et 15. 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 était de 300 UFC/mL.

2.1.4 Résultats

2.1.4.1 Sensibilité des souches

Les CMI pour l'amikacine et la vancomycine des deux souches de *S. aureus* sont reportées dans le tableau 2.

Tableau 2 : CMI pour la vancomycine et l'amikacine ($\mu\text{g/mL}$) pour la souche MRSA et la MSSA

	Vancomycine		Amikacine	
	BMH	RPMI	BMH	RPMI
MRSA ATCC 35591	1 (S)	1	16 (I)	8
MSSA HG001	1 (S)	1	1 (S)	0.5

(S) sensible d'après les breakpoints EUCAST

(I) intermédiaire d'après les breakpoints EUCAST

D'après les breakpoints de l'EUCAST, les deux souches sont considérées comme sensibles à la vancomycine. Le MSSA est considéré comme sensible à l'amikacine et le MRSA présente une sensibilité intermédiaire à l'amikacine.

2.1.4.2 Évaluation de l'activité des antibiotiques seuls ou en combinaison par des méthodes statiques

2.1.4.2.1 Checkerboard assay

Pour les deux souches, que ce soit en BMH ou en RPMI, le FIC index calculé pour l'amikacine et la vancomycine utilisées ensemble avait des valeurs entre 1 et 1.5.

Dans les conditions classiques de réalisation d'un checkerboard, il n'y a aucune interaction entre les deux antibiotiques sur un inoculum standard de *S. aureus* [67].

2.1.4.2.2 Bactéricidie avec concentration constante d'antibiotiques

Deux expériences indépendantes ont été réalisées afin de suivre l'évolution de deux populations bactériennes d'un MSSA et d'un MRSA en présence de vancomycine et/ou d'amikacine pendant 24 heures dans du BMH ou du RPMI. Les résultats sont représentés sur la Figure 15 pour un inoculum initial de 4.6 ± 0.4 et $8.7 \pm 0.4 \log_{10}$ UFC/mL.

En absence d'antibiotique, pour les deux milieux et les deux souches, les comptages bactériens de l'inoculum standard ont atteint des valeurs de $7.8 \pm 0.1 \log_{10}$ UFC/mL et $8.3 \pm 0.1 \log_{10}$ UFC/mL en 24 heures dans le BMH et le RPMI respectivement, tailles comparables à celles des gros inocula sans antibiotique, restées stable sur les 24 heures entre $8.6 \pm 0.1 \log_{10}$ UFC/mL et $8.8 \pm 0.2 \log_{10}$ UFC/mL.

Utilisée seule, la vancomycine a été bactéricide sur l'inoculum standard pour les deux souches et dans les deux milieux de culture puisque tous les comptages étaient inférieurs à la LOD en moins de 24 heures (Figure 15, courbes vertes). Sur les gros inocula, la vancomycine n'a pas eu d'effet bactéricide, quel que soit le milieu (Figure 15, courbes vertes). Dans le meilleur des cas, on a observé pour le MRSA dans du RPMI une réduction de $1.4 \log_{10}$ UFC/mL après 24 heures (Figure 15 D, courbe bleue).

L'amikacine seule a été bactéricide pour les inocula standard du MSSA quel que soit le milieu de culture puisque les deux charges bactériennes étaient sous la LOD en moins de 8 heures (Figure 15 A et B, courbes bleues). Pour l'inoculum standard du MRSA, la charge bactérienne est restée similaire pendant 24 heures, autour de $5 \log_{10}$ UFC/mL (Figure 15 C et D, courbes bleues), démontrant un effet bactériostatique de l'amikacine. Sur les gros inocula, 24 heures d'exposition à l'amikacine n'ont eu aucun effet sauf pour le MSSA dans du RPMI où la population bactérienne a été réduite de $3 \log_{10}$ après 24 heures d'exposition (Figure 15 B, courbe bleue).

Pour le MSSA, la combinaison n'a pas augmenté ou accéléré l'effet bactéricide par rapport à celui obtenu avec l'amikacine seule. Pour le MRSA, la combinaison n'a pas augmenté ou accéléré l'effet bactéricide par rapport à celui obtenu avec la vancomycine. Ces résultats montrent qu'en conditions statiques il n'y a pas d'interaction entre les deux antibiotiques.

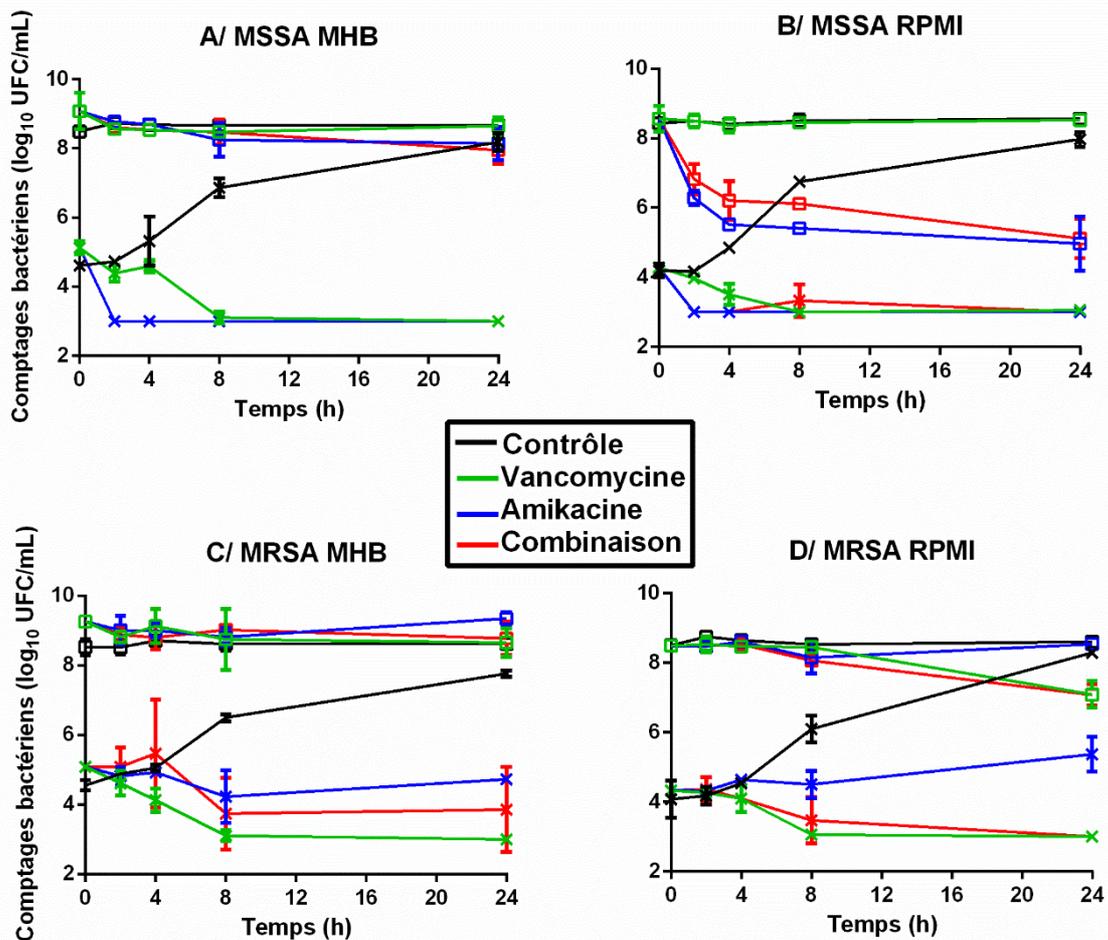


Figure 15 : Courbes de bactéricidie (en \log_{10} UFC/mL) pour le MSSA (A et B) et le MRSA (C et D) exposées à $18\mu\text{g/mL}$ de vancomycine (en vert), $70\mu\text{g/mL}$ d'amikacine (en bleu) et leur combinaison (en rouge) ou sans antibiotique (en noir) dans du BMH (A et C) ou du RPMI (B et D) (concentration moyenne de bactéries \pm écart-type, $n=2$) pendant 24h.

2.1.4.3 Évaluation de l'activité des antibiotiques seuls ou en combinaison lors de bactéricidie avec concentrations dynamiques d'antibiotiques

Le HF permet de reproduire les fluctuations de concentrations en antibiotiques lors d'un traitement de 5 jours avec administrations répétées de vancomycine et d'amikacine, utilisées seules ou en association. Les courbes de bactéricidie du MSSA exposé à la vancomycine deux fois par jour, l'amikacine une fois par jour ou les deux combinées sont représentées sur la Figure 16.

Les courbes contrôles sans antibiotique ne sont pas représentées ici mais ont donné des résultats comparables à ceux obtenus lors des essais statiques sur 24 heures.

Pour l'inoculum standard, les deux antibiotiques, utilisés seuls ou en combinaison ont réduit la charge bactérienne sous la limite de détection en moins de 8 heures, ce qui est comparable aux résultats obtenus en conditions statiques. Une recroissance de la charge bactérienne exposée à la vancomycine seule a été observée à partir de 34 heures tout en restant inférieure à $7 \log_{10}$ UFC/mL jusqu'à la fin de l'étude. Les inocula exposés à l'amikacine et à la combinaison sont restés sous la LOD jusqu'à la fin de l'étude.

Pour le gros inoculum exposé à la vancomycine seule, la charge bactérienne est restée stable au cours du temps et comparable à la courbe contrôle sans antibiotique ce qui est en accord avec les résultats obtenus en conditions statiques.

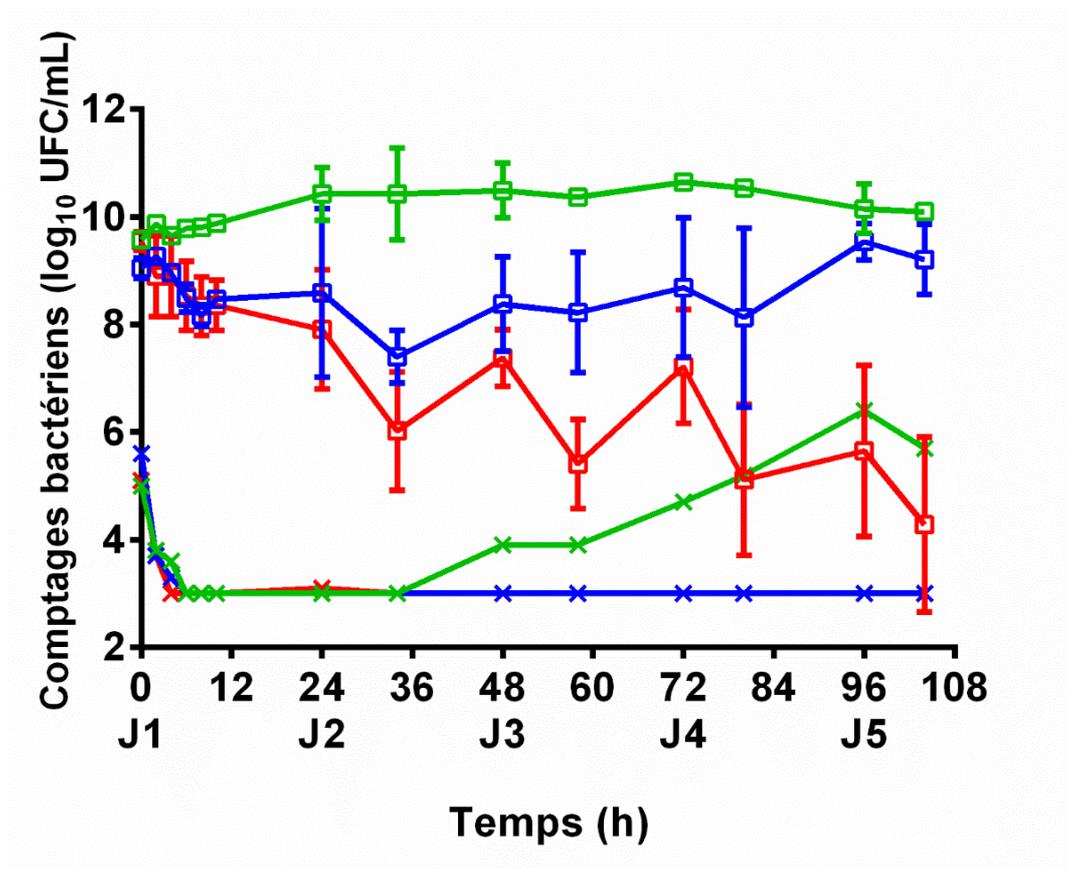


Figure 16 : Courbes de bactéricidie (en \log_{10} UFC/mL) des deux inocula du MSSA (croix pour l'inoculum standard et carrés pour le gros inoculum) exposés à $18\mu\text{g/mL}$ de vancomycine (en vert), $70\mu\text{g/mL}$ d'amikacine (en bleu) et leur combinaison (en rouge) dans du RPMI (concentration moyenne de bactéries \pm écart-type, $n=2$) pendant 24h.

L'exposition à des concentrations fluctuantes d'amikacine seule a permis une légère décroissance de la charge bactérienne le premier jour, avant d'observer une croissance bactérienne vers une charge similaire à celle de la courbe contrôle au bout de 5 jours de traitement.

L'exposition du gros inoculum à la combinaison d'antibiotiques n'a pas montré de différence avec l'inoculum exposé à l'amikacine seule sur les 24 premières heures de traitement, ce qui est en accord avec les résultats obtenus en conditions statiques. Cependant, à partir du deuxième jour de traitement, la combinaison a graduellement fait décroître la concentration bactérienne dans le milieu, et après 5 jours d'exposition, la concentration finale était de $4.6 \pm 1.6 \log_{10}$ UFC/mL, soit une réduction de plus de $5 \log_{10}$ UFC/mL de l'inoculum initial.

L'absence d'efficacité des monothérapies et l'effet bactéricide de la combinaison sur le gros inoculum a mis en évidence une augmentation de l'efficacité des deux antibiotiques sur 5 jours dans le modèle dynamique par rapport aux monothérapies.

2.1.5 Discussion

L'objectif de cette étude était de comparer la capacité de techniques de laboratoire comme le checkerboard et les bactéricidies avec concentrations statiques ou dynamiques d'antibiotique à identifier une modification de l'efficacité de la combinaison d'amikacine et de vancomycine face à deux tailles d'inoculum d'un MSSA et d'un MRSA par rapport à leur utilisation en monothérapie.

Pour évaluer la sensibilité des souches nous avons déterminé la CMI, puis réalisé un checkerboard et des bactéricidies avec concentrations statiques et dynamiques d'antibiotiques sur deux tailles d'inoculum. Nous avons utilisé un inoculum dit « standard », comme utilisé en routine en laboratoire pour évaluer l'efficacité d'un antibiotique, et un inoculum plus important dit « gros inoculum » plus représentatif de la charge bactérienne retrouvée lors d'infection bactérienne *in vivo*. Nous avons observé que l'évaluation de l'efficacité d'une combinaison d'antibiotiques sur *S. aureus* pouvait conduire à des résultats différents selon la taille de l'inoculum testé et des méthodes utilisées.

Les souches testées de *S. aureus* étaient considérées comme sensibles à la vancomycine après détermination de la CMI, ce qui a été confirmé par l'éradication systématique des inocula standard exposés à des concentrations maximales de vancomycine atteintes *in vivo* chez les patients lors des bactéricidies statiques et par une diminution du nombre de bactéries en dessous de la limite de détection entre 8 et 34 heures lors des bactéricidies dynamiques. Dans

ces expériences dynamiques, la charge bactérienne a ensuite légèrement augmenté jusqu'à $7 \log_{10}$ UFC/mL après 5 jours malgré les administrations répétées de vancomycine deux fois par jour. Cependant, en considérant les dénombrements bactériens indétectables sur plus de 24 heures, nous pourrions supposer que, *in vivo*, le système immunitaire interviendrait et contribuerait à limiter la recroissance des bactéries.

En testant deux tailles d'inoculum, nous avons identifié un effet inoculum important pour la vancomycine. Aucune activité bactéricide n'a été démontrée sur de grands inocula pour les deux souches dans les deux milieux de culture bien que la souche soit considérée comme sensible à la vancomycine. Une hypothèse proposée pour cet effet est la diminution rapide des concentrations de vancomycine libre dans le milieu en raison du piégeage par les bactéries. Cui *et al.* [109] ont décrit ce phénomène sur un MRSA et suggéré que les épaisse couches de peptidoglycanes des MRSA piègent la vancomycine libre. Yanagisawa *et al.* [110] ont également démontré que lorsqu'on ajoutait $4 \mu\text{g/mL}$ de vancomycine à une culture bactérienne de $7 \log_{10}$ UFC/mL d'une souche MRSA, la concentration de vancomycine libre passait immédiatement de 4 à $3.5 \mu\text{g/mL}$, suggérant que le piégeage de la vancomycine par les bactéries est très rapide. D'autres études *in vitro* ont également confirmé cet effet inoculum sur les souches de MSSA sensibles à la vancomycine [111] et sur des souches MRSA résistantes à la vancomycine [90].

Pour l'amikacine, la souche MSSA a été considérée comme sensible tandis que la souche MRSA a montré une sensibilité intermédiaire selon l'EUCAST [112]. Pour les aminoglycosides, le rapport $fC_{\text{max}}/\text{CMI}$ (concentration plasmatique maximale divisée par la CMI) est considéré comme le meilleur indice pour prédire l'efficacité d'un traitement [94] et il est généralement recommandé de cibler une valeur seuil du rapport supérieure à 8-10 pour assurer l'efficacité clinique contre le pathogène [95]. En considérant la concentration d'amikacine testée de $70 \mu\text{g/mL}$ en statique, les rapports de la concentration testée sur la CMI étaient respectivement de 70 et 140 en BMH et RPMI pour la souche MSSA correspondant à des valeurs beaucoup plus élevées que la valeur critique du rapport. Une éradication rapide des bactéries a été observée après l'exposition d'un inoculum standard à l'amikacine lors des essais statiques et dynamiques. Pour la souche MRSA, les valeurs des rapports $fC_{\text{max}}/\text{CMI}$ étaient respectivement de 4.4 et de 8.8 au cours des 24 heures d'exposition en BMH et RPMI et étaient donc plus faibles ou très proches de la valeur du breakpoint suggérant une activité antibactérienne incertaine. Dans notre étude, nous avons trouvé des résultats cohérents avec l'observation d'une activité bactériostatique et non bactéricide de l'amikacine sur l'inoculum standard de la souche MRSA dans les deux milieux.

Les gros inocula de MRSA et MSSA n'ont pas été éradiqués par l'amikacine lors des essais statiques. Ces résultats ont démontré que la classification des bactéries comme sensibles ou intermédiaires à l'amikacine d'après la CMI ne pouvait pas prédire un effet antibactérien sur

un inoculum de grande taille, ce qui était en accord avec les études précédentes menées sur un grand inoculum de *S. aureus* sensible à la gentamicine, un autre aminoglycoside [80,113].

Ces résultats obtenus avec un antibiotique utilisé seul confirment l'existence d'un effet inoculum puisque aucune éradication des bactéries n'a été atteinte lors de l'utilisation de monothérapies sur de grands inocula de souches pourtant sensibles aux antibiotiques utilisés d'après les valeurs de CMI.

Pour évaluer l'intérêt potentiel d'utiliser une combinaison de deux antibiotiques, nous avons d'abord effectué l'équivalent de la détermination de la CMI pour une combinaison i.e. le checkerboard assay. Ce test réalisé avec un inoculum de taille standard a prédit une indifférence entre l'amikacine et la vancomycine. Ce résultat est en accord avec l'absence d'amélioration de l'activité antibactérienne de la combinaison par rapport à celle démontrée par l'antibiotique le plus efficace sur un inoculum standard, en statique et en dynamique.

Pour les inocula de grande taille, l'évaluation de l'efficacité des combinaisons ne peut pas être réalisée avec un checkerboard puisque cette méthode, basée sur l'évaluation de la CMI, repose sur l'évaluation de la turbidité après 16-20 heures d'incubation et nécessite donc un inoculum initial clair, soit généralement inférieur à $7 \log_{10}$ CFU/mL. Il en résulte que l'efficacité d'un antibiotique utilisé seul ou en combinaison sur un grand inoculum ne peut être déterminée uniquement par les courbes de bactéricidie.

Lors des bactéricidies en conditions statiques chaque fois qu'une réduction de la charge bactérienne a été observée avec une monothérapie, la combinaison n'a jamais amélioré la vitesse d'action ni l'efficacité par rapport à la monothérapie, que ce soit sur l'inoculum standard ou sur le gros inoculum. En conditions statiques l'association a à chaque fois eu une activité similaire à celle de la monothérapie la plus efficace, indiquant une indifférence entre les antibiotiques, ce qui est en accord avec les résultats du checkerboard. Les bactéricidies classiques avec concentrations constantes d'antibiotiques ont certaines limites et ne peuvent pas être représentatives des conditions *in vivo* en raison de la courte durée d'exposition des bactéries aux traitements (habituellement moins de 24 heures en raison de l'absence de renouvellement du milieu de culture) et des concentrations constantes d'antibiotiques au fil du temps. En particulier pour les antibiotiques ayant des demi-vies d'élimination courtes, l'utilisation de concentrations constantes peut surestimer l'efficacité du médicament puisque les bactéries sont exposées de manière continue et artificielle à la concentration maximale.

L'autre point clé est la durée de l'étude qui peut être un problème crucial pour observer un effet bactéricide lent, une tolérance ou une sélection de résistance. Dans cette étude, les bactéricidies dynamiques dans le modèle HF ont été menées sur 5 jours, mais d'autres expériences réalisées en HF sur des semaines ou des mois ont également été décrites [114,115]. Dans notre étude, sur le grand inoculum, nous avons obtenu des résultats similaires

au cours de la première journée entre bactéricidies statiques et dynamiques avec observation d'une activité bactéricide de l'amikacine et aucun avantage de l'association par rapport à l'utilisation de l'amikacine seule. Ces résultats sont également en accord avec les résultats du checkerboard. Cependant, du deuxième au cinquième jour en dynamique nous avons observé certains effets sur le gros inoculum qui n'ont pas été prédits par le checkerboard ou les bactéricidies en statique. L'activité de l'amikacine seule a diminué au fil des jours et a finalement conduit à la même charge bactérienne que l'inoculum initial au bout de 5 jours. La réduction de l'activité de l'amikacine peut être une conséquence de la tolérance, également appelée résistance adaptative [116,117] ou sélection de résistance par une exposition répétée à des concentrations fluctuantes d'antibiotique sur 5 jours [118]. Au contraire, du deuxième au cinquième jour, la combinaison de vancomycine et d'amikacine a été associée à une décroissance progressive de la population bactérienne et a finalement conduit à une réduction de 5.1 log₁₀ UFC/mL par rapport à la charge bactérienne initiale. Une des explications de cette efficacité tardive pourrait être une activité séquentielle de l'amikacine et de la vancomycine. On pourrait supposer que l'activité de l'amikacine le premier jour en réduisant la population bactérienne a permis une meilleure efficacité de la vancomycine les jours d'après. Ainsi, la réalisation de bactéricidies avec des fluctuations de concentrations d'antibiotiques sur plusieurs jours peut aider à comprendre les échecs thérapeutiques même si une limitation des modèles dynamiques *in vitro* est le manque de composants du système immunitaire. Cependant, l'utilisation d'un milieu de culture cellulaire eucaryote comme le RPMI dans ces expériences permettrait l'ajout de composants du système immunitaire dans des études ultérieures.

En conclusion, la CMI et le checkerboard sont des méthodes rapides et pertinentes pour évaluer l'activité antibactérienne des infections associées à une faible charge bactérienne. Cependant, pour les infections associées à une forte charge bactérienne, l'augmentation de l'activité bactéricide entre les antibiotiques a seulement été mise en évidence au bout de plusieurs jours et dans des conditions dynamiques, bien plus proches de la réalité clinique.

Les résultats de cette étude justifient l'utilisation d'un modèle dynamique sur plusieurs jours comme le Hollow Fiber pour évaluer l'efficacité d'une combinaison d'antibiotiques sur une infection bactérienne complexe.

2.1.6 Article 1

Diane C Broussou, Marlene Z Lacroix, Pierre-Louis Toutain, Farid El Garch, Frédérique Woehrlé, Alain Bousquet-Mélou and Aude A Ferran

***In vitro* static and dynamic assays are complementary tools to evaluate the efficacy of antimicrobial drugs combination against *Staphylococcus aureus* infections.**

PIOs one, en review au moment de la rédaction.

1 ***In vitro* static and dynamic assays are complementary tools to evaluate the**
2 **efficacy of antimicrobial drugs combination against *Staphylococcus aureus***
3 **infections.**

4

5 Diane C Broussou ^{1,2}, Pierre-Louis Toutain³, Frédérique Woehrlé², Farid El Garch², Alain
6 Bousquet-Melou¹, Aude A Ferran^{1*}

7

8 ¹ UMR 1436 INTHERES, Université de Toulouse, INRA, ENVT, Toulouse, France

9 ² Vetoquinol SA, Lure, France

10 ³ Department of Veterinary Basics Sciences, Royal Veterinary College, London, United
11 Kingdom

12

13 *corresponding author

14 Email: a.ferran@envt.fr

15 **Abstract**

16 An easily implementable strategy to reduce treatment failures in severe bacterial infections is to combine
17 already available antibiotics. However, most *in vitro* combination assays are performed by exposing
18 standard bacterial inocula to constant concentrations of antibiotics over less than 24h, which is poorly
19 representative of clinical situations.

20 The aim of this study was to assess the ability of static and dynamic *in vitro* Time-Kill Studies (TKS)
21 to identify the potential benefits of an amikacin and vancomycin combination on two different inoculum
22 sizes of two *S. aureus* strains.

23 In the static TKS (sTKS), performed by exposing bacteria over 24h to constant antibiotic concentrations,
24 the activity of the two drugs combined was very similar to that of the better drug used alone. However,
25 the dynamic TKS (dTKS) performed over 5 days by exposing bacteria to fluctuating concentrations
26 representative of those observed in patients revealed that, with the large inoculum, the activities of the
27 drugs, used alone or in combination, differed over time. Vancomycin had no effect, amikacin led to
28 bacterial regrowth whereas the combination progressively decreased the bacterial load. Thus, only dTKS
29 were able to reveal the enhanced effect of the combination on a large inoculum of *S. aureus*.

30 In conclusion, for severe infections associated with a high bacterial load, the potential benefit of a
31 combined treatment would be more accurately predicted by performing *in vitro* dynamic assays over the
32 entire expected treatment duration rather than by static assays based on steady concentrations over 24h.

33 **Introduction**

34 The recalcitrance of severe, chronic bacterial infections to antibiotic treatments, due to
35 tolerance or resistance, is necessitating a search for new antimicrobial strategies. One
36 therapeutic option to extend the spectrum, minimize the emergence of resistance or achieve
37 synergistic bactericidal activity, and which can be easily and rapidly implemented, is to use a
38 combination of existing antimicrobials [1,2]. However, the potential advantage of the
39 combination for managing an infection has to be assessed *in vitro* before its implementation in
40 clinical practice. Currently, one of the most commonly used *in vitro* assays to evaluate the
41 efficacy of a combination is the checkerboard assay (CA). This is based on a similar method to
42 the one used for MIC determination and involves exposure of a standard inoculum of $5.7 \log_{10}$
43 CFU/mL [3] to constant concentrations of one or two drugs followed by assessment of the
44 turbidity after incubating the mixture for 16-20 hours. These CA results are used to classify the
45 combination in one of three categories: synergy, indifference or antagonism [4]. Another more
46 time-consuming method is to carry out static time-kill studies (sTKS) in which constant
47 concentrations of drugs are used to monitor the kinetics of bacterial killing over time (5–8).
48 sTKS is a more quantitative approach than CA as the bacterial counts during exposure to the
49 drugs alone or in combination are compared over 24 h. However, although both CA and sTKS
50 assays are inexpensive and quite easy to perform, their limitations include short duration and
51 the exposure to constant concentrations. Indeed, due to the absence of broth renewal, both
52 assays take less than 24 hours, which can prevent the detection of potential bacterial regrowth,
53 predictive of a relapse in the patient [9], or of progressive activity leading to bacterial
54 eradication after several days of treatment. Thus, an exposure to constant concentrations does
55 not reflect the behaviour of drugs in patients since the phenomena of drug absorption,
56 metabolism and elimination lead to fluctuating concentrations over time and to a potential
57 exposure of bacteria to sub-inhibitory concentrations which promote the development of

58 resistance [10]. A Hollow-Fiber (HF) infection model has been proposed to overcome these
59 limitations [11]. This model is used in dynamic time-kill studies (dTKS) to follow the evolution
60 of a bacterial population exposed to antibiotic concentrations that are similar to those observed
61 in patients treated over several days.

62 Although many studies of antibiotic combinations have focused on standard inoculum sizes,
63 infections that are refractory to treatments and require an improved antibiotic strategy are
64 mainly associated with biofilms and a large bacterial load. Moreover, an inoculum effect that
65 reduces antibacterial activity on large bacterial population has been described for many drugs
66 including vancomycin against inoculum sizes of *Staphylococcus (S.) aureus* strains ranging
67 from 8 to 9.5 log₁₀ CFU/mL [12,13]. We can therefore conclude that *in vitro* assessments of
68 antibiotic combinations need to be performed in conditions that will predict their efficacy
69 against severe refractory infections associated with large inocula. Besides, the use of Mueller-
70 Hinton Broth (MHB) was shown to be poorly predictive of *in vivo* outcomes for some specific
71 cases [14].

72 The activity of a combination of an aminoglycoside and vancomycin has previously been
73 investigated on *S. aureus* under static conditions with CA and sTKS [15–17] and in this study,
74 we investigated the possibility that assessments of the efficacy of the same antibiotic
75 combination could lead to different results depending on the methods, culture media or on the
76 inoculum sizes tested.

77 Therefore, we decided to compare the efficacy of the combination of amikacin and vancomycin
78 on standard (around 5 log₁₀ CFU/mL) and large (around 9 log₁₀ CFU/mL) inocula of one
79 Methicillin Resistant *S. aureus* (MRSA) and one Methicillin Sensitive *S. aureus* (MSSA) strain
80 by performing CA, sTKS and dTKS in different media. For sTKS, the inocula were exposed
81 for 24 hours to the maximum free plasma concentrations obtained in patients at the current
82 dosing regimen, i.e. after one administration of 15mg/kg amikacin [18] and/or 1 g of

83 vancomycin by IV route [19]. For dTKS in a HF model, the inocula were exposed for 5 days to
84 fluctuating concentrations, as would be observed in patients treated once a day with amikacin
85 and/or every 12h with vancomycin [20,21].

86 **MATERIAL AND METHODS**

87 **Bacterial strains**

88 A MRSA ATCC 33591 and a MSSA (MSSA) HG001, derived from NCTC 8325, were used
89 for the CA and for sTKS with constant antibiotic concentrations. The MSSA strain HG001 was
90 used for the dTKS with fluctuating antibiotic concentrations in the HF model. Stock cultures of
91 the bacteria were preserved at -80°C in MHB (Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France)
92 supplemented with 15% glycerol. Before each assay, 10µL of the bacterial suspension was
93 incubated overnight at 37°C on a Mueller-Hinton agar plate.

94

95 **Antimicrobial agents**

96 Amikacin sulfate powder (Amikacine Mylan®) and vancomycin chlorhydrate powder
97 (Vancomycin Sandoz®) for intravenous administration were used to prepare antibiotic stock
98 solutions in water at desired concentrations and stored at -20°C for less than 1 month.
99 Antibiotic solutions were thawed and diluted to desired concentrations just before use.

100

101 **Minimal Inhibitory Concentration (MIC) determination**

102 The MICs of vancomycin and amikacin for the MRSA and MSSA strains were performed in
103 triplicate by broth microdilution with cation adjusted-MHB (Mueller-Hinton II, Sigma Aldrich,
104 Saint-Quentin-Fallavier, France) according to the CLSI reference methods [3] and also in
105 Roswell Park Medium Institute 1640 medium (RPMI) (Gibco, Thermofischer Scientific, MA,
106 USA). Briefly, a bacterial suspension diluted in MHB or RPMI to give a final organism density
107 of $5.7 \log_{10}$ CFU/mL was added to wells of a microtiter plate containing serial 2-fold dilutions
108 of vancomycin or amikacin. Bacterial growth was recorded after incubation for 18 hours at
109 35°C.

110 **Checkerboard assays (CA)**

111 The combined effect of vancomycin and amikacin on the tested *S. aureus* strains was first
112 evaluated by CA in MHB and RPMI [4]. Briefly, a bacterial suspension diluted in MHB or
113 RPMI to give a final organism density of $5.7 \log_{10}$ CFU/mL was added to wells of a microtiter
114 plate containing serial 2-fold dilutions of amikacin along the ordinate and serial 2-fold dilutions
115 of vancomycin along the abscissa. After incubation at 35°C for 18 hours, the MIC of both drugs
116 were determined in wells containing one drug and in wells containing the combination of both
117 drugs. The Fractional Inhibitory Concentration (FIC) index was then calculated according to
118 equation 1.

$$119 \text{ FIC index} = \frac{\text{MIC of amikacin in combination}}{\text{MIC of amikacin alone}} + \frac{\text{MIC of vancomycin in combination}}{\text{MIC of vancomycin alone}} \quad \text{equation 1}$$

120 According to Odds [4], synergism is defined as an FIC index < 0.5 , the absence of interaction as an FIC
121 index between 0.5 and 4 and antagonism as an FIC index > 4 . These assays were performed in triplicate.
122

123 **sTKS (constant antibiotic concentrations)**

124 A few colonies from an overnight culture of *S. aureus* were grown at 37°C for 18 h in MHB or
125 RPMI. The bacterial suspension was then centrifuged for 10 min at 3000g and the bacteria were
126 resuspended in fresh pre-warmed MHB or RPMI and diluted to obtain standard ($5.0 \log_{10}$
127 CFU/mL) or large ($9.0 \log_{10}$ CFU/mL) bacterial inocula in MHB or RPMI.

128 Each inoculum size was exposed to no drug (control), 18 µg/mL of vancomycin, 70 µg/mL of
129 amikacin or both for 24 hours corresponding to the maximum free plasma concentrations of the
130 antibiotics when administered at their current dosing regimen. Samples were collected from
131 each suspension at 0, 2, 4, 8 and 24h to count the viable bacteria. All experiments were
132 performed in duplicate.

133

134

dTKS (fluctuating antibiotic concentrations)

135
136 A Hollow-Fiber model was used to assess the antibacterial activity of the combination of
137 amikacin and vancomycin on *S. aureus* during exposure to fluctuating clinically-relevant
138 antibiotic concentrations. Basically, the HF model includes a cartridge with capillaries
139 composed of a semipermeable polysulfone membrane. The pore size of the capillaries (42kDa)
140 allows equilibration of the concentrations of chemicals which circulate through the central and
141 peripheral compartments by means of a peristaltic pump (Duet pump, FiberCell Systems, Inc.,
142 Frederick, MD, USA) while the bacteria stay confined to the extracapillary space in the
143 peripheral compartment.

144 Twenty milliliters of a suspension containing $5.0 \log_{10}$ CFU/mL of MSSA were inoculated into
145 the extracapillary space of a hollow-fiber cartridge (C2011 polysulfone cartridge, FiberCell
146 Systems, Inc., Frederick, MD, USA) and incubated at 37°C. The antibiotics were added either
147 30 min later (standard inoculum assays) or 3 days later (large inoculum assays). For each
148 experiment, the exposure to amikacin and/or vancomycin lasted 5 days to simulate the
149 pharmacokinetic profiles of patients receiving the antibiotics at current dosing regimens i.e.
150 15mg/kg amikacin once a day [22] and/or 1 g vancomycin twice a day [23] corresponding to
151 maximum concentrations (C_{max}) in the central compartment of 70µg/mL for amikacin and
152 18µg/mL for vancomycin. We showed in a previous study that there were no issue with the
153 drug binding to the polysulfone fibers [24]. The drugs were continuously diluted by means of
154 a second peristaltic pump (MiniRhythmic PN+, SMD, Fleury sur Orne, France) to simulate an
155 elimination half-life of 4 hours, similar to the plasma elimination half-lives of amikacin and
156 vancomycin in patients [20,21].

157 One milliliter samples were collected aseptically from the extracapillary space in the HF
158 cartridge to count bacteria 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 34, 48, 58, 72, 80, 96 and 104h after the first
159 antibiotic administration. The experiments, including controls and exposure to amikacin and

160 vancomycin in monotherapy or in combination, were all performed in duplicate to check
 161 reproducibility on the large inoculum.

162 The general design of the study is indicated in Table 1.

163

164 **Table 1: General design of the study with all the assays performed on each bacterial strain**

	MSSA		MRSA	
	MHB	RPMI	MHB	RPMI
MIC	SI	SI	SI	SI
Checkerboard assay	SI	SI	SI	SI
sTKS	SI and LI	SI and LI	SI and LI	SI and LI
dTKS	NA	SI and LI	NA	NA

165 SI : Standard Inoculum

166 LI : Large Inoculum

167 NA : Not Assessed

168

169 **Bacterial counts in TKS**

170 The sampled bacterial suspensions were centrifuged at 3000g for 5 min, the supernatant was
 171 discarded, and the pellet was resuspended in NaCl 0.9%. The suspension was then serially
 172 diluted and plated in triplicate on tryptic soy agar supplemented with magnesium sulfate and
 173 activated charcoal to prevent antibiotic carry-over effects. The colonies were counted after
 174 overnight incubation at 37°C. The limit of detection (LOD) was 2.5 log₁₀ CFU/mL.

175 RESULTS

176 MIC

177 The MICs of vancomycin and amikacin for the MRSA and the MSSA strains in MHB and in
178 RPMI are given in Table 2.

179

180 **Table 2: MICs ($\mu\text{g/mL}$) of vancomycin and amikacin for the MRSA and the MSSA strains**
181 **in MHB and in RPMI.**

182

	Vancomycin		Amikacin	
	MHB	RPMI	MHB	RPMI
MRSA ATCC 33591	1 (S)	1	16 (I)	8
MSSA HG001	1 (S)	1	1 (S)	0.5

183 (S) classified as susceptible according to EUCAST breakpoints

184 (I) classified as intermediate according to EUCAST breakpoints [25]

185

186 Based on the EUCAST breakpoints (standard determination with MHB), both strains were
187 considered as susceptible to vancomycin. The MSSA strain was considered as susceptible to
188 amikacin and the MRSA strain showed an intermediate susceptibility to amikacin.

189

190 Checkerboard assays

191 To assess the possible relevance of a combination of amikacin and vancomycin on *S. aureus*, CA were
192 performed in duplicate for the two strains in MHB and RPMI.

193 The FIC index of amikacin and vancomycin for each of the 2 tested strains, ranged between 1 and 1.5
194 in both MHB and RPMI, meaning that under the classical conditions of this CA, no interaction (no
195 synergy or antagonism) was demonstrated between these two antibiotics [4].

196

197

198

199 **sTKS**

200 We then assessed the activity of constant concentrations of vancomycin at 18 μ g/mL and of amikacin at
201 70 μ g/mL, used alone or in combination, for 24hours in MHB and RPMI on a large initial *S. aureus*
202 bacterial burden of $8.7 \pm 0.4 \log_{10}$ CFU/mL and on a standard inoculum of $4.6 \pm 0.4 \log_{10}$ CFU/mL. The
203 stability of both antibiotics in MHB and RPMI over 24h was assessed and no significant degradation of
204 the antibiotics was observed after 24h at 37°C (data not shown).

205 The time-kill curves obtained by exposing the different inoculum sizes of the two strains to
206 antibiotics are shown in Fig 1.

207

208 **Fig 1: Time-kill curves of the 2 strains subjected to constant concentrations of antibiotic**

209 Evolution of the bacterial population (\log_{10} CFU/mL) for the MSSA (A and B) and MRSA (C and D)
210 strains after exposure to 70 μ g/mL amikacin (blue) or 18 μ g/mL vancomycin (green) or the combination
211 of both (red) over 24hours in MHB (A and C) and in RPMI (B and D). The marks represent the mean
212 \pm SD of the bacterial counts for the different tested treatments (n=2 for each treatment). Curves with
213 open squares represent the bacterial counts on a large initial inoculum and curves with crosses represent
214 the bacterial counts on a standard initial inoculum. (LOD = $2.5 \log_{10}$ CFU/mL)

215

216 In absence of antibiotic, the bacterial counts obtained after incubating the initial standard
217 inocula for 24 hours, ranged between $7.8 \pm 0.1 \log_{10}$ CFU/mL and $8.3 \pm 0.1 \log_{10}$ CFU/mL for
218 both strains in MHB and RPMI. The size of the initial large inoculum remained stable with
219 bacterial counts ranging from $8.6 \pm 0.1 \log_{10}$ CFU/mL to $8.8 \pm 0.2 \log_{10}$ CFU/mL after 24 hours.

220 Vancomycin alone was bactericidal on standard inocula of the two strains in MHB and in RPMI
221 since it reduced the bacterial burden to below the LOD after 8 to 24h of antibiotic exposure.

222 Exposure of a large inoculum to vancomycin for 24 h did not reduce the bacterial populations
223 except for the MRSA strain in RPMI where the bacterial population was reduced by $1.4 \log_{10}$
224 CFU/mL.

225 Amikacin alone was bactericidal on the standard inoculum of the MSSA strain and reduced the
226 bacterial counts to below the LOD within less than 8h in both media. The reduction of the
227 standard inoculum was smaller for the MRSA strain for which the bacterial counts were $4.8 \pm$
228 0.1 and $5.4 \pm 0.5 \log_{10}$ CFU/mL in MHB and in RPMI respectively after 24h of exposure. These
229 counts were $3 \log_{10}$ CFU/mL less than the counts in control experiments but close to the initial
230 bacterial counts, thereby demonstrating a bacteriostatic effect. The bacterial populations in
231 large inocula were not reduced by exposure for 24 h to amikacin alone except for the MSSA
232 strain in RPMI where the population was reduced by $3.6 \log_{10}$ CFU/mL.

233 The combination of amikacin and vancomycin at constant concentrations over 24 hours never
234 showed any higher or more rapid activity than the better of the two drugs used alone. For the
235 MSSA strain, the combination gave similar results to those obtained with amikacin alone. The
236 bacterial loads after exposure of the standard inocula to the combination for 24 hours were
237 below the LOD. For the large inocula, the bacterial counts were $8.0 \pm 0.4 \log_{10}$ CFU/mL and
238 $5.1 \pm 0.6 \log_{10}$ CFU/mL after 24h in MHB and RPMI respectively. For the MRSA strain, the
239 combination gave similar results to vancomycin used alone. The bacterial counts after exposure
240 of the standard inocula to the combination for 24 hours were $3.2 \pm 0.3 \log_{10}$ CFU/mL in MHB
241 and below the LOD in RPMI. For the large initial inocula, the bacterial counts were 8.8 ± 0.5
242 \log_{10} CFU/mL and $7.1 \pm 0.1 \log_{10}$ CFU/mL after 24 hours in MHB and RPMI respectively.

243 **dTKS**

244 The HF model was applied to assess the efficacy of vancomycin and amikacin used alone or in
245 combination under dynamic conditions over 5 days in RPMI on a standard inoculum of $5.4 \pm 0.3 \log_{10}$
246 CFU/mL and on a large inoculum of $9.4 \pm 0.3 \log_{10}$ CFU/mL.

247 In dTKS, the antibiotic concentrations fluctuated over time so as to resemble the concentration profiles
248 observed in patients receiving repeated recommended doses of amikacin and vancomycin over 5 days.
249 Vancomycin was administered twice a day at a C_{\max} of $18 \mu\text{g/mL}$ and amikacin was administered once
250 a day at a C_{\max} of $70 \mu\text{g/mL}$. Both antibiotics were continuously diluted to simulate an elimination half-
251 life of 4 hours.

252 In the absence of antibiotic (control experiments), the standard inocula increased to $9.5 \pm 0.4 \log_{10}$
253 CFU/mL in 24h. Thereafter, all the inocula (standard and large) increased slightly over the next 4 days
254 to reach a final bacterial count of $10.8 \pm 0.2 \log_{10}$ CFU/mL at the end of 5 days (data not shown).

255 The time-kill curves for bacteria exposed in the HF model to amikacin and vancomycin alone or in
256 combination are shown in Fig 2.

257

258 **Fig 2: Time-kill curves of the MSSA strain subjected to dynamic concentrations of antibiotic**

259 Evolution of the bacterial population (\log_{10} CFU/mL) after exposure to amikacin or vancomycin alone
260 or the combination of both over 5 days in RPMI. The marks represent the mean \pm SD of the bacterial
261 counts for the different tested treatments (green: vancomycin twice a day, blue: amikacin once a day,
262 red: amikacin once a day and vancomycin twice a day. Curves with open squares represent the bacterial
263 counts on a large initial inoculum and curves with crosses represent the bacterial counts on a standard
264 initial inoculum. (n=2 for each treatment on the large inocula and n=1 for each treatment on the standard
265 inocula) and LOD = $2.5 \log_{10}$ CFU/mL).

266 On standard inocula, both antibiotics, alone or in combination, decreased the bacterial burden to below
267 the LOD within less than 8h, as had been obtained with a constant antibiotic concentration in sTKS.

268 When exposed to amikacin alone or in combination, the bacterial population remained below the LOD

269 until the end of the experiment whereas the bacterial population increased from 34h onwards until it was
270 $6.4 \log_{10}$ CFU/mL at the end of the experiment with vancomycin alone.

271 Large inocula of bacteria exposed to fluctuating concentrations of vancomycin alone were never
272 reduced, as in sTKS. After exposure for 5 days, the population size in the HF model was comparable
273 to that of control experiments, the final bacterial count being $10.0 \pm 0.1 \log_{10}$ CFU/mL. Exposure to
274 fluctuating concentrations of amikacin alone led to a slight reduction of the bacterial population over
275 the first 24 hours, as had been observed with constant amikacin concentrations in sTKS. However, the
276 reduction of $0.9 \log_{10}$ CFU/mL observed on the first day in the HF model was quite slight and, after 5
277 days of treatment, the final bacterial count of $9.2 \pm 0.7 \log_{10}$ CFU/mL was very similar to that of the
278 initial population and not much lower than in control experiments.

279 When amikacin and vancomycin were used in combination in the HF model, a decrease of the bacterial
280 population was observed over the first 24 hours, similar to the treatment with amikacin alone, with
281 bacterial counts of around $8 \log_{10}$ CFU/mL. However, different results (from amikacin alone) were
282 obtained after exposure to the combination for 5 days, the mean final bacterial count of $4.3 \pm 1.6 \log_{10}$
283 CFU/mL corresponding to an overall reduction of more than $5 \log_{10}$ CFU/mL.

284 This observation of bactericidal activity with the combination after 5 days and no or only slight activity
285 with both drugs used alone demonstrated a synergy between amikacin and vancomycin for *S. aureus* in
286 the HF model.

287 DISCUSSION

288 In this study, our objective was to compare the ability of checkerboard assays (CA), static Time-
289 Kill studies (sTKS) and dynamic Time-Kill Studies (dTKS) to reveal the synergy of two
290 antibiotics used for the management of *S. aureus* infection, namely amikacin and vancomycin.
291 The activities of the two drugs, alone or in combination, were investigated by performing MIC
292 determinations, CA, static and dynamic TKS on two different inoculum sizes of one MSSA and
293 one MRSA strain. The efficacy of the antibiotic combination on *S. aureus* was found to differ
294 depending on the inoculum size and the methods used.

295 Both *S. aureus* strains tested were classified as susceptible to vancomycin according to the MIC
296 determination. This was then confirmed in sTKS by the systematic eradication of standard
297 inocula exposed to the concentrations of vancomycin achievable in patients, and in dTKS by a
298 decrease of bacterial counts of the standard inocula to below the LOD after 8 to 34 hours. In
299 these dynamic experiments, slight bacterial regrowth was observed which attained $7 \log_{10}$
300 CFU/mL after 5 days, despite repeated administrations of vancomycin twice a day. However,
301 because no bacteria could be detected during 24 hours, we hypothesized that, *in vivo*, the
302 immune system could also help to eradicate the bacteria, prevent regrowth and lead to a
303 bacterial cure. Testing two inoculum sizes revealed an important effect of inoculum size for
304 vancomycin, since no bactericidal activity was demonstrated on large bacterial inocula of the
305 two strains in either culture medium. One hypothesis for this effect is that bacteria are able to
306 trap and rapidly decrease free vancomycin concentrations in the medium. Cui *et al.* [26]
307 described this phenomenon on MRSA and suggested that the thickened peptidoglycan layers
308 of MRSA could trap free vancomycin. Yanagisawa *et al.* [27] also demonstrated that when 4
309 $\mu\text{g/mL}$ of vancomycin was added to a $7 \log_{10}$ CFU/mL culture of a MRSA strain, the
310 concentration of free vancomycin immediately fell from 4 to 3.5 $\mu\text{g/mL}$ suggesting that the

311 initial trapping by bacteria occurred very rapidly. Other *in vitro* studies also confirmed this
312 inoculum effect on vancomycin susceptible MSSA [28] and on highly vancomycin resistant
313 MRSA strains [29].

314 For amikacin, the MSSA strain was classified as susceptible whereas the MRSA strain showed
315 intermediate susceptibility according to the EUCAST MIC breakpoint [25]. For
316 aminoglycosides, the fC_{\max}/MIC ratio (peak free plasma concentration divided by the MIC) is
317 considered as the best index to predict the efficacy of a treatment [30] and targeting a breakpoint
318 value of more than 8 to 10 for this ratio is usually recommended to ensure clinical efficacy
319 against the pathogen [31]. When the amikacin concentration tested in sTKS was 70 $\mu\text{g/mL}$, the
320 ratios of the tested concentration over the MIC were 70 and 140 in MHB and RPMI respectively
321 for the MSSA strain, i.e. far higher than the breakpoint value for clinical efficacy. Indeed, the
322 standard bacterial inoculum was rapidly eradicated after exposure to amikacin in both sTKS
323 and dTKS. For the MRSA strain, the fC_{\max}/MIC ratios were 4.4 and 8.8 over the 24h of
324 exposure in MHB and RPMI respectively and were lower than or very close to the breakpoint
325 value, suggesting that antibacterial activity would be uncertain. Our results confirmed that
326 amikacin exhibited bacteriostatic but not bactericidal activity on a standard inoculum of the
327 MRSA strain in the two media.

328 Large inocula of MSSA and MRSA bacteria were not eradicated by amikacin in the sTKS.
329 Thus, the classification of these bacteria as susceptible or intermediate to amikacin, based on
330 the MIC determination, could not be predictive of an antibacterial effect on a large inoculum in
331 sTKS. Similar results had been obtained in previous studies when a large inoculum of
332 susceptible *S. aureus* was challenged by another aminoglycoside [32,33].

333 Our results confirmed that no eradication of the bacterial burden was attained with
334 monotherapy in either medium when the inoculum was large.

335 To assess the potential interest of combining drugs, we first performed a CA which is a
336 derivative of the MIC determination for drug combinations. This assay, classically carried out
337 with a standard inoculum, indicated indifference between amikacin and vancomycin. This
338 corroborated the sTKS and dTKS results, indicating that the combination did not exhibit better
339 antibacterial activity against standard inocula than the better drug used alone. For large inocula,
340 the assessment of combination efficacy cannot be performed by a standardized CA since this
341 method, like the MIC determination, relies on an assessment of turbidity after incubation for
342 16-20 h and the initial inoculum therefore needs to be clear and generally below $7 \log_{10}$
343 CFU/mL. This means that the efficacy of a combination or of one drug alone can only be
344 determined by TKS when the inoculum is large.

345 With standard inocula, amikacin and vancomycin alone or in combination decreased the
346 bacterial burden to below the limit of detection in less than 24h in sTKS, except for amikacin
347 on the MRSA strain. Reductions of large bacterial inocula were only observed after exposure
348 of the MRSA strain to vancomycin alone or in combination and after exposure of the MSSA
349 strain to amikacin alone or in combination. Thus, in sTKS, the combination showed similar
350 activity to the better drug used alone and never improved the efficacy or rate of bacterial killing
351 over monotherapy, as already shown by the CA results.

352 Classical sTKS have limitations and cannot represent *in vivo* conditions due to the brief period
353 of bacterial exposure to the drugs (usually less than 24 h due to the absence of broth renewal)
354 and the constant concentrations of antibiotic over time. The use of constant concentrations,
355 especially of antibiotics with short half-lives, may overestimate drug efficacy since the bacteria
356 are continuously and artificially exposed to the peak concentration. Another key-point is the
357 length of the experiment which can be a crucial issue if the aim is to reveal a slow bactericidal
358 effect, tolerance or amplification of resistance. In this study, the dTKS with the HF model were

359 conducted over 5 days, but weeks or months have also been described in other experiments
360 using the same model [34,35]. With the large inoculum, similar results were obtained for sTKS
361 and dTKS over the first day i.e. bactericidal activity of amikacin and no advantage of the
362 combination over amikacin alone, which also agreed with the results obtained with the CA.
363 However, some effects on the large inoculum were observed from the second to the fifth day
364 in dTKS, that were not predicted by the CA or sTKS results. The activity of amikacin alone
365 decreased over the days and the final bacterial load was the same as in the initial inoculum.
366 Reduced amikacin activity can be due to tolerance, also known as adaptive resistance [36,37],
367 or to the selection of resistance by repeated exposure to fluctuating concentrations over 5 days
368 [24]. In contrast, from the second to the fifth day, the vancomycin and amikacin combination
369 produced a progressive decline of the bacterial population and a final reduction of 5.1 log₁₀
370 CFU/mL, compared to the initial bacterial load. This late enhancement of the bactericidal
371 activity might result from a sequential activity of amikacin and vancomycin, the activity of
372 amikacin on the first day reducing the bacterial population and thereby improving the
373 subsequent efficacy of vancomycin. So, performing dTKS with fluctuations of antibiotic
374 concentrations over several days might be helpful to understand therapeutic failures even
375 though a limitation of dynamic *in vitro* models is the absence of consideration of the immune
376 system. However, by using a eukaryotic cell culture medium in sTKS experiments it should be
377 possible to add components of the immune system in further studies.

378 To conclude, MIC and CA may be rapid and relevant methods for assessing antibacterial
379 activity if an infection is associated with a low bacterial load. However, when the bacterial load
380 is high and possibly associated with a biofilm containing tolerant bacteria, longer experiments
381 need to be designed to assess bactericidal activity, tolerance or the selection of resistance over
382 several days.

383 **References:**

- 384 1. Eliopoulos GM, Eliopoulos CT. Antibiotic combinations: should they be tested? Clin
385 Microbiol Rev. 1988;1: 139–156.
- 386 2. Deresinski S. Vancomycin in combination with other antibiotics for the treatment of
387 serious methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. Clin Infect Dis Off Publ
388 Infect Dis Soc Am. 2009;49: 1072–1079. doi:10.1086/605572
- 389 3. Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial
390 Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth
391 Edition. CLSI document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
- 392 4. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. J
393 Antimicrob Chemother. 2003;52: 1. doi:10.1093/jac/dkg301
- 394 5. Abreu AC, Serra SC, Borges A, Saavedra MJ, Salgado AJ, Simões M. Evaluation of the best
395 method to assess antibiotic potentiation by phytochemicals against *Staphylococcus*
396 *aureus*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014;79: 125–134.
397 doi:10.1016/j.diagmicrobio.2014.03.002
- 398 6. Dong C-L, Li L-X, Cui Z-H, Chen S-W, Xiong YQ, Lu J-Q, et al. Synergistic Effect of
399 Pleuromutilins with Other Antimicrobial Agents against *Staphylococcus aureus In Vitro*
400 and in an Experimental *Galleria mellonella* Model. Front Pharmacol. 2017;8: 553.
401 doi:10.3389/fphar.2017.00553

- 402 7. White RL, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA. Comparison of three different *in vitro*
403 methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrob Agents*
404 *Chemother.* 1996;40: 1914–1918.
- 405 8. Laishram S, Pragasam A, Bakthavatchalam Y, Veeraraghavan B. An update on technical,
406 interpretative and clinical relevance of antimicrobial synergy testing methodologies.
407 *Indian J Med Microbiol.* 2017;35: 445–468. doi:10.4103/ijmm.IJMM_17_189
- 408 9. Cantón R, Morosini M-I. Emergence and spread of antibiotic resistance following
409 exposure to antibiotics. *FEMS Microbiol Rev.* 2011;35: 977–991. doi:10.1111/j.1574-
410 6976.2011.00295.x
- 411 10. Firsov AA, Smirnova MV, Lubenko IY, Vostrov SN, Portnoy YA, Zinner SH. Testing the
412 mutant selection window hypothesis with *Staphylococcus aureus* exposed to daptomycin
413 and vancomycin in an *in vitro* dynamic model. *J Antimicrob Chemother.* 2006;58: 1185–
414 1192. doi:10.1093/jac/dkl387
- 415 11. Cadwell JS. The Hollow Fiber Infection Model: Principles and Practice. *Adv Antibiotics*
416 *Antibodies.* 2015;1.
- 417 12. Rose WE, Leonard SN, Rossi KL, Kaatz GW, Rybak MJ. Impact of inoculum size and
418 heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (hVISA) on vancomycin
419 activity and emergence of VISA in an *in vitro* pharmacodynamic model. *Antimicrob*
420 *Agents Chemother.* 2009;53: 805–807. doi:10.1128/AAC.01009-08
- 421 13. LaPlante KL, Rybak MJ. Impact of high-inoculum *Staphylococcus aureus* on the activities
422 of nafcillin, vancomycin, linezolid, and daptomycin, alone and in combination with

- 423 gentamicin, in an *in vitro* pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother.*
424 2004;48: 4665–4672. doi:10.1128/AAC.48.12.4665-4672.2004
- 425 14. Buyck JM, Plésiat P, Traore H, Vanderbist F, Tulkens PM, Van Bambeke F. Increased
426 Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to Macrolides and Ketolides in Eukaryotic Cell
427 Culture Media and Biological Fluids Due to Decreased Expression of oprM and Increased
428 Outer-Membrane Permeability. *Clin Infect Dis.* 2012;55: 534–542.
429 doi:10.1093/cid/cis473
- 430 15. Watanakunakorn C, Glotzbecker C. Enhancement of antistaphylococcal activity of
431 nafcillin and oxacillin by sisomicin and netilmicin. *Antimicrob Agents Chemother.*
432 1977;12: 346–348.
- 433 16. Gallo J, Kolár M, Florschütz AV, Novotný R, Pantůček R, Kesselová M. *In vitro* testing of
434 gentamicin-vancomycin loaded bone cement to prevent prosthetic joint infection.
435 *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czechoslov.* 2005;149: 153–158.
- 436 17. Cokça F, Arman D, Altay G. *In vitro* activity of vancomycin combined with rifampin,
437 amikacin, ciprofloxacin or imipenem against methicillin-resistant and methicillin-
438 susceptible *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection.* 1998: 657–659.
- 439 18. Kato H, Hagihara M, Hirai J, Sakanashi D, Suematsu H, Nishiyama N, et al. Evaluation of
440 Amikacin Pharmacokinetics and Pharmacodynamics for Optimal Initial Dosing Regimen.
441 *Drugs RD.* 2017;17: 177–187. doi:10.1007/s40268-016-0165-5
- 442 19. Nicasio AM, Bulitta JB, Lodise TP, D’Hondt RE, Kulawy R, Louie A, et al. Evaluation of once-
443 daily vancomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a hollow-fiber

- 444 infection model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56: 682–686.
445 doi:10.1128/AAC.05664-11
- 446 20. Adamis G, Papaioannou MG, Giamarellos-Bourboulis EJ, Gargalianos P, Kosmidis J,
447 Giamarellou H. Pharmacokinetic interactions of ceftazidime, imipenem and aztreonam
448 with amikacin in healthy volunteers. *Int J Antimicrob Agents.* 2004;23: 144–149.
449 doi:10.1016/j.ijantimicag.2003.07.001
- 450 21. Matzke GR, Zhanel GG, Guay DRP. Clinical Pharmacokinetics of Vancomycin. *Clin*
451 *Pharmacokinet.* 1986;11: 257–282. doi:10.2165/00003088-198611040-00001
- 452 22. Gálvez R, Luengo C, Cornejo R, Kosche J, Romero C, Tobar E, et al. Higher than
453 recommended amikacin loading doses achieve pharmacokinetic targets without
454 associated toxicity. *Int J Antimicrob Agents.* 2011;38: 146–151.
455 doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.03.022
- 456 23. Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, et al.
457 Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines
458 on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis Off Publ*
459 *Infect Dis Soc Am.* 2007;44 Suppl 2: S27-72. doi:10.1086/511159
- 460 24. Broussou DC, Lacroix MZ, Toutain P-L, Woehrlé F, El Garch F, Bousquet-Melou A, et al.
461 Differential Activity of the Combination of Vancomycin and Amikacin on Planktonic vs.
462 Biofilm-Growing *Staphylococcus aureus* Bacteria in a Hollow Fiber Infection Model. *Front*
463 *Microbiol.* 2018;9: 572. doi:10.3389/fmicb.2018.00572

- 464 25. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for
465 interpretation of MICs and zone diameters, version 8.0 [Internet]. 2018. Available:
466 http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.
- 467 26. Cui L, Murakami H, Kuwahara-Arai K, Hanaki H, Hiramatsu K. Contribution of a Thickened
468 Cell Wall and Its Glutamine Nonamidated Component to the Vancomycin Resistance
469 Expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44:
470 2276–2285. doi:10.1128/AAC.44.9.2276-2285.2000
- 471 27. Yanagisawa C, Hanaki H, Matsui H, Ikeda S, Nakae T, Sunakawa K. Rapid Depletion of Free
472 Vancomycin in Medium in the Presence of β -Lactam Antibiotics and Growth Restoration
473 in *Staphylococcus aureus* Strains with β -Lactam-Induced Vancomycin Resistance.
474 *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53: 63–68. doi:10.1128/AAC.00762-08
- 475 28. Ekdahl C, Hanberger H, Hällgren A, Nilsson M, Svensson E, Nilsson LE. Rapid decrease of
476 free vancomycin in dense staphylococcal cultures. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ*
477 *Eur Soc Clin Microbiol*. 2005;24: 596–602. doi:10.1007/s10096-005-0011-0
- 478 29. Sieradzki K, Tomasz A. Inhibition of cell wall turnover and autolysis by vancomycin in a
479 highly vancomycin-resistant mutant of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 1997;179:
480 2557–2566.
- 481 30. Moore RD, Lietman PS, Smith CR. Clinical response to aminoglycoside therapy:
482 importance of the ratio of peak concentration to minimal inhibitory concentration. *J*
483 *Infect Dis*. 1987;155: 93–99.

- 484 31. Toutain PL, del Castillo JRE, Bousquet-Mélou A. The pharmacokinetic-pharmacodynamic
485 approach to a rational dosage regimen for antibiotics. *Res Vet Sci.* 2002;73: 105–114.
- 486 32. McGrath BJ, Kang SL, Kaatz GW, Rybak MJ. Bactericidal activities of teicoplanin,
487 vancomycin, and gentamicin alone and in combination against *Staphylococcus aureus* in
488 an *in vitro* pharmacodynamic model of endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother.*
489 1994;38: 2034–2040.
- 490 33. LaPlante KL, Rybak MJ. Impact of high-inoculum *Staphylococcus aureus* on the activities
491 of nafcillin, vancomycin, linezolid, and daptomycin, alone and in combination with
492 gentamicin, in an *in vitro* pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother.*
493 2004;48: 4665–4672. doi:10.1128/AAC.48.12.4665-4672.2004
- 494 34. Ferro BE, Srivastava S, Deshpande D, Sherman CM, Pasipanodya JG, van Soolingen D, et
495 al. Amikacin Pharmacokinetics/Pharmacodynamics in a Novel Hollow-Fiber
496 *Mycobacterium abscessus* Disease Model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;60:
497 1242–1248. doi:10.1128/AAC.02282-15
- 498 35. Gumbo T, Pasipanodya JG, Nuermberger E, Romero K, Hanna D. Correlations Between
499 the Hollow Fiber Model of Tuberculosis and Therapeutic Events in Tuberculosis Patients:
500 Learn and Confirm. *Clin Infect Dis.* 2015;61: S18–S24. doi:10.1093/cid/civ426
- 501 36. Karlowsky JA, Zelenitsky SA, Zhanel GG. Aminoglycoside Adaptive Resistance.
502 *Pharmacother J Hum Pharmacol Drug Ther.* 1997;17: 549–555. doi:10.1002/j.1875-
503 9114.1997.tb03063.x

- 504 37. Yuan W, Hu Q, Cheng H, Shang W, Liu N, Hua Z, et al. Cell wall thickening is associated
505 with adaptive resistance to amikacin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
506 clinical isolates. J Antimicrob Chemother. 2013;68: 1089–1096. doi:10.1093/jac/dks522

507

Figure 1

[Click here to download Figure Fig1.tif](#)

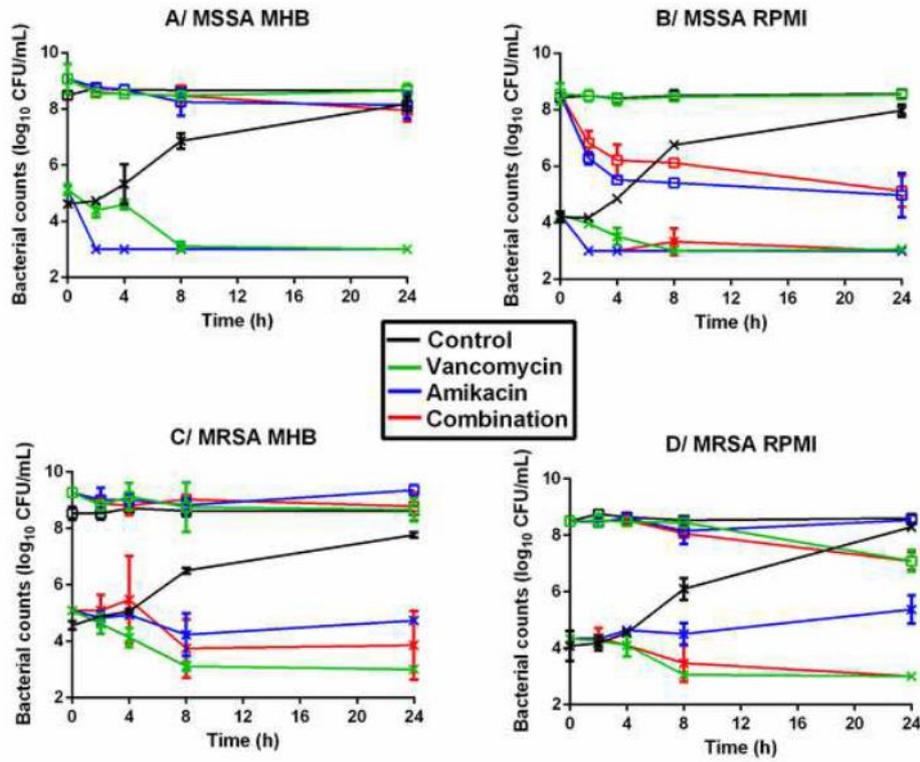
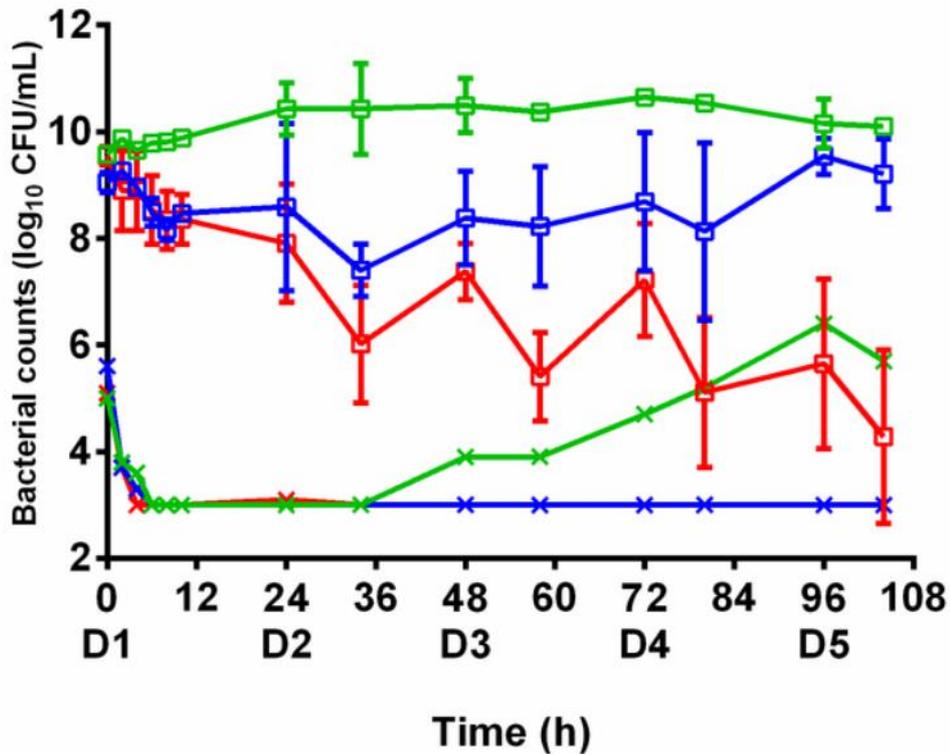


Figure 2

[Click here to download Figure Fig2.tif](#)



2.2 Évaluation *in vitro* de modifications des posologies de deux antibiotiques utilisés en combinaison pour optimiser leur usage sur un biofilm bactérien.

Cette partie s'appuie sur l'article « Differential activity of the combination of vancomycin and amikacin on planktonic vs. Biofilm-growing *Staphylococcus aureus* bacteria in a Hollow Fiber Infection Model » publié dans le journal *Frontiers in Microbiology* (voir partie 2.2.6).

2.2.1 Problématique

Les biofilms sont un mode de vie qui permet aux bactéries de tolérer de fortes concentrations d'antibiotiques et d'échapper au système immunitaire de l'hôte. Ils sont difficiles à éliminer et sont responsables d'infections chroniques. La partie bibliographique a mis en évidence le manque de techniques de laboratoire permettant d'étudier l'efficacité d'un traitement à la fois sur les bactéries d'un biofilm et sur les bactéries planctoniques associées.

Le modèle HF présente l'avantage de soumettre les bactéries à des concentrations fluctuantes d'antibiotiques, ce qui permet de se rapprocher de conditions rencontrées *in vivo* et d'extrapoler plus facilement l'efficacité d'un traitement démontrée *in vitro* vers la clinique. Du fait de la grande surface offerte par la paroi des capillaires nous avons émis l'hypothèse que les bactéries, si elles étaient laissées suffisamment longtemps dans la cartouche sans antibiotique, pourraient former un biofilm et que le système pourrait être utilisé pour tester l'efficacité d'un traitement ainsi que des modifications de posologies et d'administration sur un biofilm et sur les bactéries planctoniques associées.

S. aureus possède la capacité de former des biofilms et est responsable d'infections chroniques pour lesquelles aucun traitement efficace n'a encore été trouvé. La première étude, présentée dans la partie 2.1, a mis en avant l'intérêt de la combinaison d'amikacine et de vancomycine pendant plusieurs jours sur des infections à forte charge bactérienne de *S. aureus* en utilisant un modèle Hollow Fiber. Nous avons donc décidé d'étudier l'efficacité de cette combinaison sur un biofilm de *S. aureus* en utilisant le modèle HF.

2.2.2 Objectif

Cette étude a été réalisée en mimant l'exposition d'un biofilm mature de *Staphylococcus aureus* (environ $8.0 \log_{10}$ UFC/mL) et du fort inoculum bactérien associé (environ $9.0 \log_{10}$ UFC/mL) à deux antibiotiques, la vancomycine et l'amikacine, d'abord seuls puis en combinaison, en conditions dynamiques sur 5 jours pour mimer la réalisation d'un traitement dans son ensemble.

L'intérêt de la combinaison sur un fort inoculum de bactéries planctoniques a été prouvé dans la partie 2.1. Pour les aminoglycosides, nous avons vu au paragraphe 1.5.3.2 que l'indice PK/PD le plus prédictif est le rapport C_{max}/CMI . Pour la vancomycine, le meilleur indice prédictif est l'aire sous la courbe sur 24 heures divisée par la CMI (AUC_{24h}/CMI) [119] et une valeur de 400 est recommandée pour obtenir une efficacité clinique [120–122]. Les concentrations testées dans cette étude sont considérées comme suffisantes pour atteindre les indices PK/PD classiquement attendus pour obtenir une efficacité du traitement sur les bactéries planctoniques.

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'efficacité de cette même combinaison sur le biofilm, et d'évaluer la capacité de la combinaison à limiter l'apparition de résistances au cours du traitement à la fois dans le biofilm mais aussi dans les bactéries planctoniques.

Nous avons ensuite essayé d'optimiser le schéma thérapeutique de la combinaison, en jouant sur les propriétés pharmacocinétiques des deux antibiotiques et en testant différentes modalités d'administration. Nous avons exploré les effets d'un léger écart par rapport aux doses standards en simulant une dose accrue d'amikacine, qui est un antibiotique concentration-dépendant [123] et en modifiant le mode d'administration (perfusion vs bolus) de la vancomycine, qui est un antibiotique temps-dépendant [124].

Le nombre de bactéries planctoniques et dans le biofilm a été suivi au cours du temps afin de comparer l'activité des antibiotiques utilisés. Nous avons simultanément suivi le nombre de bactéries totales et l'évolution de la sensibilité des bactéries à la vancomycine et à l'amikacine au cours du traitement pour les bactéries planctoniques, et en fin de traitement pour les bactéries du biofilm.

2.2.3 Matériel et Méthodes

Cette étude s'inscrit dans la continuité de l'étude précédente. Nous avons utilisé les mêmes antibiotiques (amikacine et vancomycine) et la même souche bactérienne que celle utilisée lors des essais en dynamique dans le HFIM (*S. aureus* Hg 001, sensible à l'amikacine et à la vancomycine). Les concentrations de référence de la combinaison d'antibiotiques testés sont aussi celles décrites dans le paragraphe 2.1.3.6. Ne seront détaillés dans cette partie que les nouveautés/différences par rapport à ce paragraphe.

2.2.3.1 Étude PK/PD

2.2.3.1.1 Courbes de bactéricidie avec concentrations fluctuantes d'antibiotiques dans le HFIM

Un modèle HF a été utilisé pour évaluer l'activité antibactérienne de la combinaison d'amikacine et de vancomycine sur un biofilm mature de *S. aureus* et sur les bactéries planctoniques associées. Les bactéries ont été exposées pendant 5 jours à des concentrations fluctuantes d'antibiotiques correspondant à celles qui seraient retrouvées chez un patient traité pendant 5 jours. L'étude a été réalisée de la même manière et avec le même matériel que dans le paragraphe 2.1.3.6.

Dans cette étude, vingt millilitres d'une suspension de RPMI contenant $5.7 \log_{10}$ UFC / mL de *S. aureus* ont été inoculés dans l'espace extra-capillaire de chaque cartouche (cartouche de polysulfone C2011, FiberCell Systems, Inc., Frederick, MD, USA). La cartouche a été placée dans un incubateur à 37 ° C du jour 0 (J0) au jour 2 (J2) sans aucun traitement, pour permettre la formation d'un biofilm dans la cartouche.

De J3 à J7, les bactéries ont ensuite été soumises à l'amikacine et/ou à la vancomycine. Les antibiotiques ont été injectés dans le compartiment central pour obtenir la concentration maximale (C_{max}) et ont été continuellement dilués avec RPMI au moyen d'une pompe péristaltique (MiniRhythmic PN +, SMD, Fleury sur Orne, France) pour imiter la demi-vie terminale humaine de chaque antibiotique. Les antibiotiques ont également circulé constamment à travers les compartiments central et périphérique au moyen d'une seconde pompe péristaltique (pompe Duet, FiberCell Systems, Inc., Frederick, MD, USA).

La première exposition aux antibiotiques testée dans le HF a simulé les concentrations plasmatiques libres retrouvées chez des patients recevant 15 mg/kg d'amikacine une fois par

jour et/ou 1g de vancomycine toutes les 12 heures, soit une concentration maximale de vancomycine de 18 µg/mL et une concentration maximale d'amikacine de 70 µg/mL, avec une demi-vie d'élimination plasmatique simulée de 4 heures.

Après avoir testé la combinaison aux posologies recommandées, nous avons essayé d'optimiser le traitement. Pour cela, nous nous sommes basés sur les propriétés pharmacocinétiques des deux antibiotiques. L'amikacine étant un antibiotique concentration-dépendant, nous avons augmenté le C_{max} , tout en simulant des concentrations plasmatiques atteignables cliniquement et non délétères pour l'organisme. Nous avons donc testé deux concentrations maximales plus élevées de 90 µg/mL (traitement A90 V18) et 130 µg/mL (traitement A130 V18) d'amikacine, théoriquement atteintes chez des patients ayant reçu une dose de 2500 mg [125] pour étudier la relation entre la concentration et l'activité de l'amikacine.

Pour la vancomycine, une dose de 2g par jour en perfusion continue a été récemment recommandée [124,126]. Nous avons donc simulé une perfusion à débit continu (CRI pour Continuous Rate Infusion) de 2g par jour de vancomycine en ajoutant directement l'antibiotique dans le milieu de dilution pour obtenir une concentration constante de vancomycine de 9 µg/mL (traitement A70 CRIV9) [127].

Toutes les expériences, y compris le contrôle et l'exposition à l'amikacine et à la vancomycine en monothérapie ou en association, ont été réalisées en duplicat pour vérifier la reproductibilité.

2.2.3.1.2 Méthode de dénombrement des bactéries planctoniques

Des échantillons d'un millilitre ont été prélevés dans l'espace extra-capillaire de la cartouche HF pour compter les bactéries planctoniques à 0 h (valeur initiale), 2h, 4h, 6h, 8h et 10h après l'administration matinale d'antibiotiques chaque jour pendant cinq jours (J3 à J7). Les échantillons ont été centrifugés à 3000g pendant 5 minutes. Le surnageant a été retiré et le culot a été remis en suspension dans 1 mL de NaCl à 0,9%. Le dénombrement des bactéries vivantes dans une suspension à un instant donné s'est fait par dilutions au 10^{ème} en série. 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 18h à 37°C, les colonies formées à l'emplacement de chaque dépôt ont été comptées si leur nombre était compris entre 0 et 15. 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 était de 300 UFC/mL soit 2.5 log₁₀ UFC/mL.

Après deux lavages pour éliminer l'antibiotique contenu dans la suspension, les bactéries planctoniques moins sensibles ont été comptées une fois par jour avant les administrations antibiotiques matinales de J3 à J7 sur des géloses supplémentées avec 3 fois (3 µg/mL) et 6 fois (6 µg/mL) la CMI d'amikacine ou de vancomycine. Les géloses ont été mises à l'étuve à 37°C pendant 3 jours avant de compter les bactéries. La proportion de bactéries « moins sensibles » a été calculée en divisant le nombre de colonies sur gélose supplémentée en antibiotique par le nombre de colonies sur gélose sans antibiotique au même moment.

2.2.3.1.3 Méthode de dénombrement des bactéries du biofilm

A la fin de l'expérience (J7), l'espace extra-capillaire dans la cartouche contenant les bactéries a été lavé quatre fois avec 50 mL de NaCl stérile à 0.9% pour éliminer le plus possible de bactéries planctoniques. Un comptage a été réalisé sur la suspension restant dans la cartouche.

Le biofilm a ensuite été détruit par sonication de la cartouche pendant 15 minutes à 42 kHz (Branson 5800, Branson Ultrasonics Corporation, Emerson, Angoulême, France). Le bain d'ultrasons permet de mettre les bactéries du biofilm en suspension dans les 20 mL de NaCl 0.9% restant dans la cartouche après les lavages. Un comptage a à nouveau été réalisé sur la suspension bactérienne dans la cartouche.

Après une nuit d'incubation à 37 °C, ou plus si nécessaire, les colonies ont été dénombrées et la population totale des bactéries du biofilm a été calculée en \log_{10} UFC/mL à partir de la différence entre les comptages bactériens dans l'espace extra-capillaire après et avant ultrasons. Pour chaque combinaison testée, la CMI pour chaque antibiotique a également été déterminée sur une seule colonie bactérienne se développant sur les géloses supplémentées en antibiotique afin de quantifier avec précision la perte de sensibilité.

2.2.3.1.4 Dosage des antibiotiques

Des échantillons pour le dosage des antibiotiques ont été prélevés dans le compartiment central et dans l'espace extra-capillaire avant et après chaque administration d'antibiotique et à 2h, 4h, 6h, 8h le premier jour, puis deux fois par jour par la suite jusqu'au 5^{ème} jours lors de deux études indépendantes réalisées sans bactéries. Les échantillons ont été centrifugés à 3000g pendant 10 min et le surnageant a été conservé à -20 °C moins de 2 mois avant d'être dosé.

Les échantillons ont été préparés dans des tubes de 1.5 mL. Deux cents microlitres de 15% d'acide trichloroacétique contenant les étalons internes de vancomycine d12 et d'amikacine d5 à 10 µg/mL ont été ajoutés à 100 µL de calibrateurs, de contrôles qualité ou d'échantillons. Les antibiotiques ont été quantifiés par Chromatographie Liquide Ultra haute Performance (UPLC) couplée à un spectromètre de masse Xevo triple quadrupole (Waters, Milford, MA, USA). Les données chromatographiques ont été contrôlées par le logiciel Targetlynx (Waters, Milford, MA, USA). La méthode a été validée en termes de linéarité, de sensibilité et de répétabilité. Les précisions variaient de 84 à 94% et de 99 à 107% avec des coefficients de variabilité pour la précision intra-journalière inférieurs à 9% et 10% pour l'amikacine et la vancomycine, respectivement. La limite de quantification a été fixée à 0.5 µg/mL pour les deux antibiotiques.

La concentration d'antibiotique dans le système a été calculée selon l'équation 5.

$$\text{Concentration HF} = \frac{(\text{Concentration RC} * \text{Volume RC}) + (\text{Concentration EEC} * \text{Volume EEC})}{\text{Volume RC} + \text{Volume EEC}} \quad \text{Équation 5}$$

Avec HF pour le Hollow Fiber, RC pour le Réservoir Central et EEC pour l'Espace Extra Capillaire

2.2.3.2 Statistiques

Pour l'utilisation de la vancomycine et de l'amikacine en combinaison, les tailles des inocula bactériens planctoniques avant (J3) et après (J7) traitement de 5 jours ont été comparées en appliquant un T-test de Student apparié avec le logiciel R® [128].

Les tailles des populations de bactéries planctoniques et du biofilm après traitement avec la combinaison d'amikacine et de vancomycine pendant 5 jours (J7) ont également été comparées avec un T-test de Student apparié avec R®.

2.2.4 Résultats

2.2.4.1 Analyse pharmacocinétique

L'équilibre entre les concentrations dans le compartiment central et dans l'espace extra-capillaire a été atteint dans les 15 min suivant l'administration de l'antibiotique dans le compartiment central (données non présentées). Les profils de concentrations prédites et de concentrations observées au cours du temps pour l'amikacine et pour la vancomycine dans le HF sont présentés sur la Figure 17.

Pour la vancomycine, l' AUC_{24h} ciblée était de $400 \mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$, soit 16.6 fois la CMI sur 24 heures [129]. Les valeurs d' AUC_{24h} obtenues variaient de 372 à $417 \mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$, soit des écarts de -7.0 à + 4.3% par rapport à l' AUC_{24h} ciblée. Pour l'amikacine, le C_{max} ciblé était de $70 \mu\text{g}/\text{mL}$ et, à l'état d'équilibre, un C_{max} de $59.3 \pm 25.8 \mu\text{g}/\text{mL}$ (moyenne \pm écart-type) a été obtenu, soit une déviation moyenne de 15.3% par rapport au C_{max} attendu.

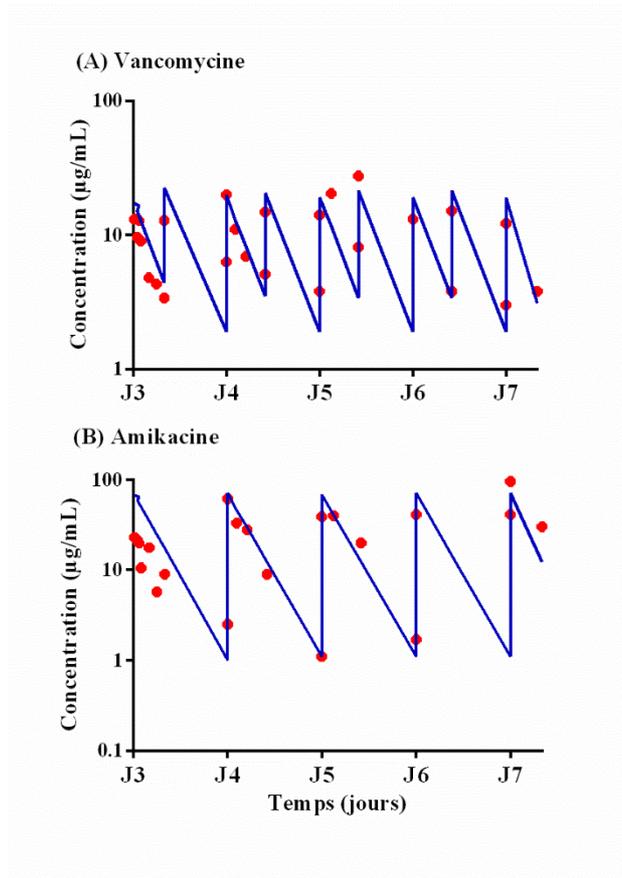


Figure 17 : Profils de concentrations attendues (bleu) et obtenues (rouge) dans le HF lors des 5 jours d'essai

2.2.4.2 Analyse PK/PD

2.2.4.2.1 Efficacité du traitement sur les bactéries planctoniques

Après incubation pendant 3 jours dans la cartouche (J3), les populations de bactéries planctoniques et de bactéries du biofilm de *S. aureus* étaient respectivement de $9.3 \pm 0.3 \log_{10}$ UFC/mL et de $8.4 \pm 0.1 \log_{10}$ UFC/mL.

En l'absence d'antibiotique (expériences contrôle), les populations de bactéries planctoniques et de bactéries du biofilm sont restées assez stables pendant 5 jours supplémentaires sans traitement, avec des comptages bactériens de respectivement $10.8 \pm 0.2 \log_{10}$ UFC/mL et de $8.1 \pm 0.1 \log_{10}$ UFC/mL, à la fin des essais (J7) (Figure 18).

Les courbes de bactéricidie pour les bactéries planctoniques exposées à l'amikacine ou à la vancomycine seule, ainsi que les comptages bactériens des bactéries planctoniques ayant poussé sur géloses supplémentées avec 3 fois la CMI d'amikacine au cours d'un traitement à l'amikacine seule (A70) pendant 5 jours (de J3 à J7) sont présentés sur la Figure 18. Après 5 jours d'exposition à la vancomycine (de J3 à J7) administrée deux fois par jour à la concentration maximale de $18 \mu\text{g/mL}$ (traitement V18), la population planctonique n'a jamais diminué par rapport à la charge bactérienne initiale. Après exposition à l'amikacine administrée une fois par jour à la concentration maximale de $70 \mu\text{g/mL}$ (traitement A70), une réduction moyenne de $0.9 \log_{10}$ a été observée au cours du premier jour de traitement (J3), mais après 5 jours (J7), la population planctonique était de $9.2 \pm 0.7 \log_{10}$ UFC/mL, soit très similaire à celle de la population bactérienne avant exposition à l'amikacine et seulement très faiblement inférieure à celle des expériences témoins.

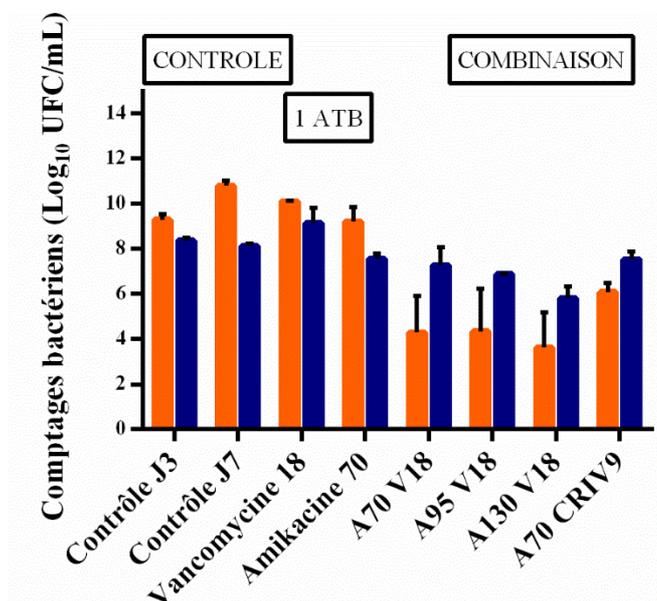


Figure 18 : Taille des populations bactériennes planctoniques (en orange) et du biofilm (en bleu) (en \log_{10} UFC/mL) pour les essais contrôles et en présence d'antibiotiques utilisés seuls ou en combinaison pendant 5 jours dans un HF

Nous avons ensuite évalué l'activité bactéricide de l'amikacine et de la vancomycine en combinaison pendant 5 jours (de J3 à J7). Pour l'amikacine, trois concentrations maximales de $70 \mu\text{g/mL}$ (traitement A70 V18), $95 \mu\text{g/mL}$ (traitement A95 V18) ou $130 \mu\text{g/mL}$ (traitement A130 V18) ont été testées. Pour la vancomycine, une administration de 1g deux fois par jour, correspondant à une concentration maximale de $18 \mu\text{g/mL}$ (traitement A70 V18) deux fois par

jour a été comparée à une administration de 2 grammes par jour administrés en perfusion continue, représenté dans le modèle par une concentration constante de 9 µg/mL (traitement A70 CRIV9). Les courbes de bactéricidie des bactéries planctoniques exposées aux combinaisons d'antibiotiques de J3 à J7 sont représentées sur la figure 20. Des profils de bactéricidie similaires ont été observés pour les bactéries planctoniques, quel que soit le profil de concentrations testé. Lors du 1^{er} jour de traitement (J3), la diminution moyenne de la population bactérienne planctonique pour chacune des combinaisons a été très similaire et a varié de -0.9 à -1.4 log₁₀ UFC/mL, suivie d'une stabilisation ou d'une légère augmentation durant la nuit. L'activité bactéricide des combinaisons les jours suivants (J4 à J7) allait d'une diminution de 3.0 log₁₀ à une augmentation de 0.5 log₁₀ de la population planctonique entre deux administrations successives d'amikacine.

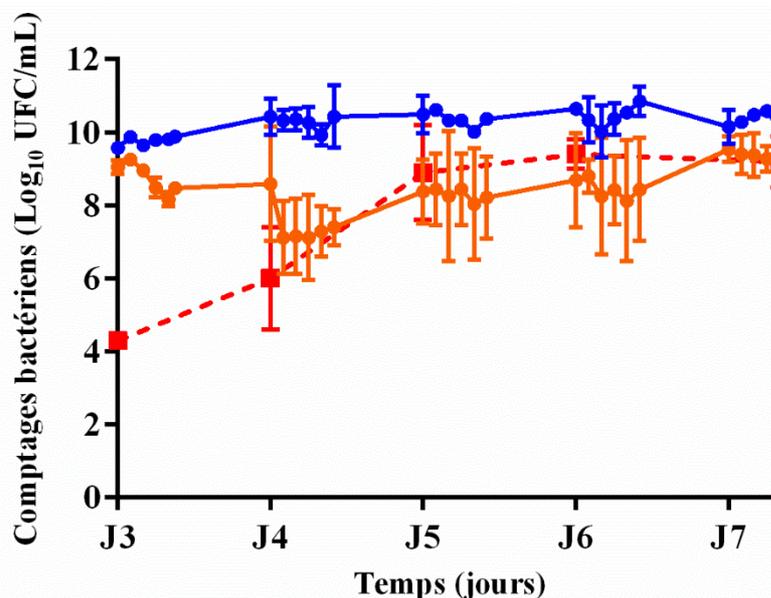


Figure 19 : Suivi des populations bactériennes planctoniques lors de traitements à la vancomycine seule (bleu) ou amikacine seule (orange) et suivi des bactéries planctoniques capables de pousser sur des géloses supplémentées avec 3 fois la CMI d'amikacine au cours d'un traitement à l'amikacine seule (moyenne ± écart-type, n = 2 pour chaque traitement)

Après exposition aux combinaisons pendant 5 jours (J7), aucune éradication des bactéries planctoniques n'a été observée, mais la réduction globale a varié de -3.0 log₁₀ à -6.0 log₁₀ par rapport à la population bactérienne avant traitement. Cette réduction de la population bactérienne planctonique entre le premier jour (J3) et le dernier jour (J7) de traitement avec une combinaison de vancomycine et d'amikacine est significative ($p < 0.001$) alors que l'amikacine ou la vancomycine utilisée seule n'avaient eu aucun effet sur la charge bactérienne planctonique pendant 5 jours de traitement (Figure 19).

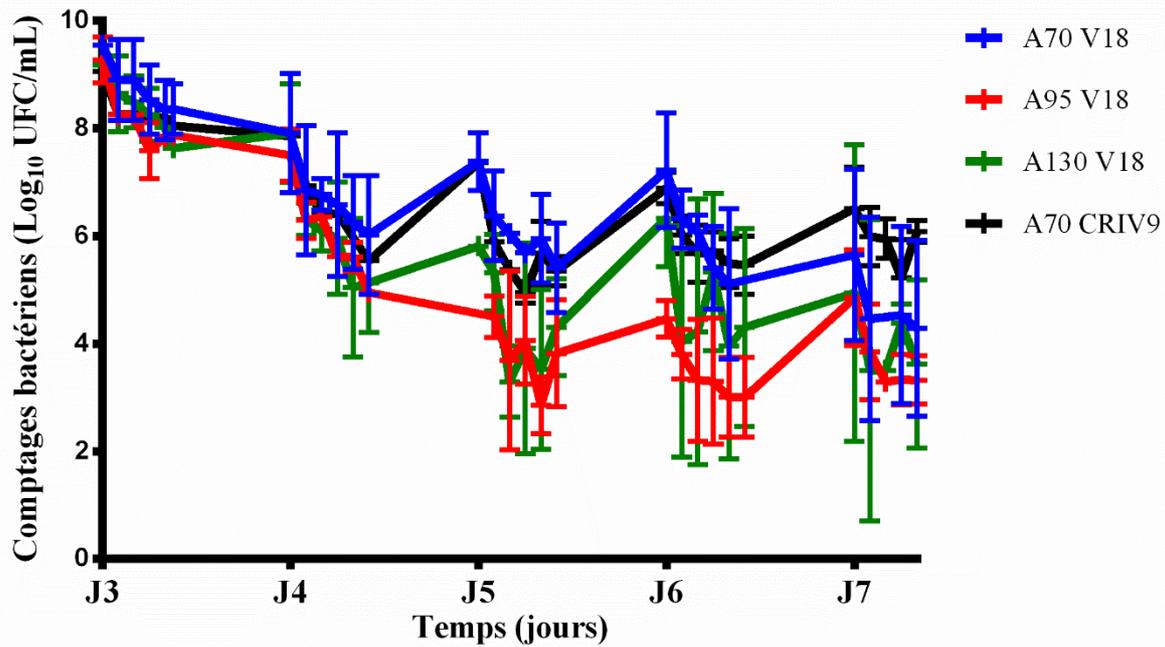


Figure 20 : Suivi des populations bactériennes planctoniques lors de 5 jours de traitements avec une combinaison de vancomycine et amikacine aux posologies recommandées en bolus (bleu), aux posologies recommandées mais en mimant une perfusion continue de vancomycine (noir) et avec C_{max} plus importants d'amikacine (rouge et vert) (moyenne \pm écart-type, $n = 2$ pour chaque traitement)

2.2.4.2.2 Efficacité du traitement sur les bactéries du biofilm

Les comptages des bactéries dans le biofilm à la fin de chaque expérience (J7) ainsi que les comptages des bactéries planctoniques au même moment sont comparés sur la Figure 18.

Après exposition à la vancomycine seule, le nombre de bactéries dans le biofilm était de $9.2 \pm 0.7 \log_{10}$ UFC/mL, soit environ 1 \log_{10} de plus que le biofilm sans traitement, tandis que l'amikacine seule (A70) a diminué la taille du biofilm de 0.6 \log_{10} UFC/mL. L'ajout de vancomycine (V18 ou CRI V9) à l'amikacine (A70) n'a pas diminué la taille du biofilm et a montré que la combinaison d'amikacine et de vancomycine ne présente aucune synergie sur les bactéries du biofilm.

En parallèle, nous avons remarqué que la population de bactéries dans le biofilm était inférieure à la population planctonique dans les expériences de contrôle et après traitement avec une monothérapie. En revanche, après chaque traitement utilisant une combinaison de vancomycine et d'amikacine, les populations de bactéries dans le biofilm étaient systématiquement supérieures de 1.2 à 2.0 \log_{10} UFC/mL aux populations planctoniques ($p < 0.001$).

2.2.4.2.3 Prévention de la sélection de résistances

Aucune croissance bactérienne n'a été observée sur les géloses supplémentées en vancomycine, quelle que soit l'expérience.

Les comptages bactériens pour les bactéries planctoniques et du biofilm ayant formé des colonies sur des géloses supplémentées avec 3 fois et 6 fois la CMI d'amikacine dans les expériences contrôle et après 5 jours d'exposition aux antibiotiques sont présentés sur les Figures 21 et 22.

Ces bactéries dites « moins sensibles » ont systématiquement été observées sur géloses supplémentées en amikacine avant même d'être confrontées aux antibiotiques (J3), avec une proportion d'environ 10^{-6} de la population totale, et ceci dans toutes les expériences, à la fois pour les bactéries planctoniques et pour les bactéries du biofilm (évalué dans les expériences contrôle). Des proportions similaires (environ 10^{-6}) ont aussi été retrouvées à J7 dans les bactéries planctoniques et dans les bactéries du biofilm des expériences contrôle.

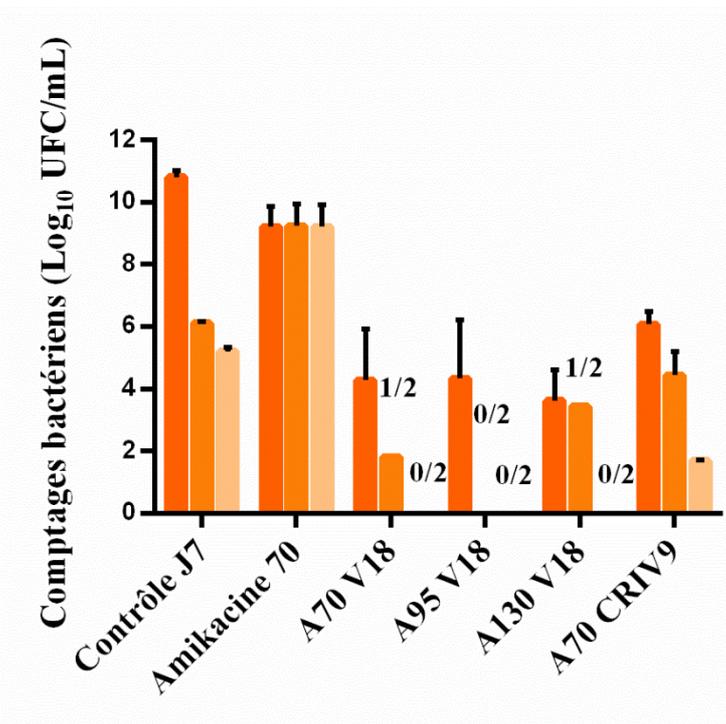


Figure 21 : Populations de bactéries planctoniques totales (orange foncé), capables de croître sur géloses supplémentées avec 3 fois (orange) et 6 fois la CMI d'amikacine (orange pâle) après 5 jours dans le HF sans traitement (contrôle), à l'amikacine seule (Amikacine 70) ou avec différents schémas thérapeutiques de la combinaison amikacine et vancomycine (A70 V18, 195 V18, A130 V18 et A70 CRIV9).

Après 5 jours d'exposition à l'amikacine seule (J7), toutes les bactéries planctoniques et du biofilm était capables de croître sur les géloses supplémentées avec 6 fois la CMI d'amikacine (proportion proche de 1, Figure 21 et Figure 22), impliquant que ces bactéries dites « moins

sensibles » ont été favorisées, sélectionnées par le traitement à l'amikacine seule. La Figure 19 présente l'évolution au cours du temps des comptages de bactéries planctoniques capables de pousser sur géloses supplémentées avec 3 fois la CMI d'amikacine. Cette population a remplacé progressivement la population de bactéries dites « sensibles » à l'amikacine jusqu'à devenir majoritaire à partir du troisième jour de traitement (J5).

L'ajout de vancomycine à l'amikacine a réduit le nombre de bactéries planctoniques capables de pousser sur géloses supplémentées avec 3 fois et 6 fois la CMI d'amikacine. Ces bactéries moins sensibles n'ont été détectées que dans respectivement 4 et 1 essai sur 8.

L'exposition du biofilm aux combinaisons, plutôt qu'à l'amikacine seule, a également réduit les populations de bactéries moins sensibles, bien que des bactéries capables de pousser sur géloses avec 3 fois et 8 fois la CMI d'amikacine ont respectivement été détectées dans 8 et 7 essais sur 8 (Figure 22).

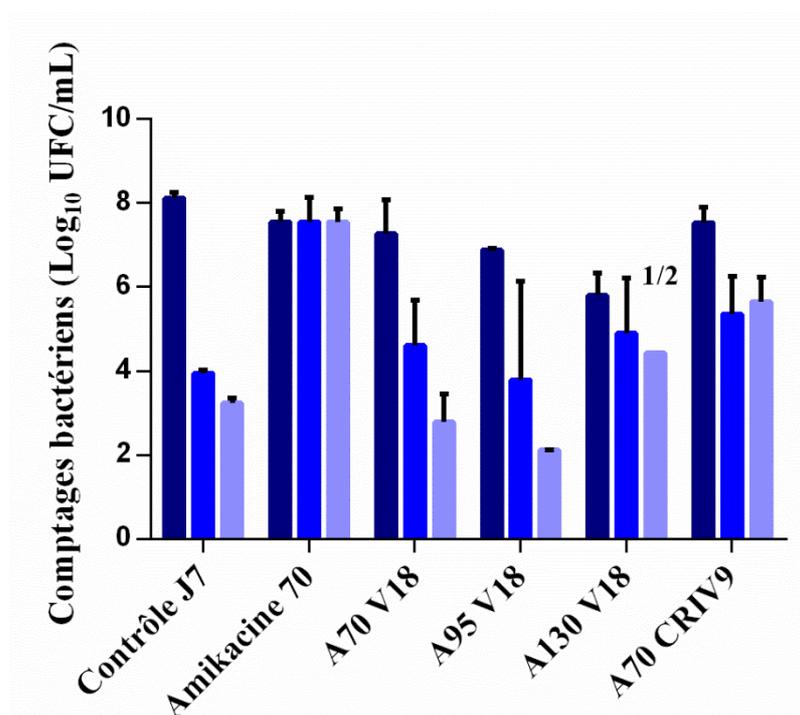


Figure 22 : Populations de bactéries du biofilm totales (bleu marine), capables de croître sur géloses supplémentées avec 3 fois (bleu roi) et 6 fois la CMI d'amikacine (bleu clair) après 5 jours dans le HF sans traitement (contrôle), à l'amikacine seule (Amikacine 70) ou avec différents schémas thérapeutiques de la combinaison amikacine et vancomycine (A70 V18, 195 V18, A130 V18 et A70 CRIV9).

La CMI la plus élevée des bactéries du biofilm pour l'amikacine était de 16 µg/mL, i.e. une augmentation de 16 fois la CMI initiale. D'après les breakpoints de l'EUCAST, une CMI de 16µg/mL correspond à des bactéries ayant une sensibilité intermédiaire à l'amikacine.

2.2.5 Discussion

En raison du caractère récalcitrant aux traitements des biofilms, notamment à *S. aureus*, l'optimisation de l'utilisation des antibiotiques disponibles devient un enjeu majeur pour augmenter l'efficacité des traitements contre les bactéries et prévenir l'apparition des résistances. Dans cette étude, nous avons utilisé le modèle HF de façon originale puisque nous avons étudié les effets d'une combinaison d'antibiotiques à la fois sur les bactéries d'un biofilm mais aussi sur les bactéries planctoniques associées tout en se rapprochant le plus possible des conditions rencontrées *in vivo*. Différents profils de concentrations ont été testés et les bactéries ont été soumises aux fluctuations de concentrations qui pourraient être rencontrées chez les patients au cours d'un traitement complet. Des conditions expérimentales avec fluctuations de concentrations au cours du temps ont une plus grande valeur prédictive que les tests statiques classiques dans lesquels les bactéries sont exposées à une concentration fixe d'antibiotique dans le temps. De plus, en raison du manque de renouvellement de milieu de culture, les expériences en conditions statiques sont souvent réalisées sur 24h tandis que des périodes plus longues sont nécessaires pour évaluer la sélection de résistance par des antibiotiques [130]. Par rapport aux modèles animaux, qui peuvent présenter des pharmacocinétiques très différentes de celles observées chez l'homme et dans lesquelles certains pathogènes humains ne peuvent se développer, toutes les bactéries peuvent être cultivées dans le HF et être exposées à des profils de concentration de médicaments représentatives des profils rencontrés chez l'homme [131]. Par exemple, la vancomycine est éliminée beaucoup plus rapidement chez la souris (demi-vie = 32 min) que chez l'humain [78], et donc des schémas thérapeutiques testés chez la souris peuvent difficilement être extrapolés à l'homme. Cependant, la principale faiblesse des tests *in vitro* statiques ou dynamiques est l'absence du système immunitaire qui peut coopérer avec les antibiotiques pour éliminer une infection.

Plusieurs études *in vitro* ont déjà étudié l'activité d'une combinaison d'antibiotiques incluant la vancomycine sur des *S. aureus* planctoniques dans des systèmes dynamiques, dont le modèle HF [132,133]. Le HF a déjà été utilisé dans deux études distinctes pour simuler les profils de concentration au cours du temps de l'amikacine ou de la vancomycine pouvant être atteints chez les patients recevant les doses recommandées [114,132]. Cependant, l'utilisation de systèmes *in vitro* pour étudier l'efficacité d'une combinaison sur un biofilm est rarement rapportée. Notre étude est, à notre connaissance, la première à utiliser un HF pour réaliser des essais sur un biofilm mature d'une souche de *S. aureus* afin d'évaluer l'activité d'une combinaison d'antibiotiques sur les bactéries planctoniques et d'un biofilm pendant 5 jours.

Dans notre étude, l'exposition à différentes posologies d'une souche sensible de *S. aureus* avec des CMI de 1 µg/mL pour l'amikacine et la vancomycine a conduit à des valeurs PK/PD

égales ou supérieures à celles classiquement attendues pour prédire l'efficacité du traitement [121,122,134]. Pour les aminoglycosides, pour lesquels l'indice PK/PD le plus prédictif est le rapport C_{max}/CMI , nous avons ciblé des valeurs C_{max}/CMI de 70 à 130 dans le HF alors qu'une valeur de 8 à 10 est recommandée pour assurer l'efficacité contre le pathogène. Pour la vancomycine, pour laquelle le meilleur indice prédictif est l' AUC_{24h}/CMI , nous avons ciblé la valeur de 400 recommandée pour atteindre l'efficacité clinique et obtenu des valeurs comprises entre 372 et 417 pour le bolus de vancomycine dans le HF et 480 pour la perfusion continue. Même si ces valeurs cibles des indices PK/PD ont été atteintes pour les deux antibiotiques, presque aucune activité bactéricide n'a été observée sur le biofilm âgé de 3 jours ou sur les bactéries planctoniques associées lorsque l'amikacine ou la vancomycine étaient administrées seules pendant 5 jours.

Ces résultats sont en accord avec des études antérieures qui ont démontré la faible activité de la vancomycine sur de grands inocula bactériens [80,135] et sur les biofilms [136]. Une étude menée avec un HF a montré qu'une concentration maximale de 80 mg/L de vancomycine était nécessaire pour obtenir une activité bactéricide contre un grand inoculum d'un MRSA ayant une CMI de 1 μ g/mL [133]. Une explication proposée pour l'effet inoculum et l'efficacité réduite de la vancomycine est que lorsque les bactéries sont présentes à forte densité elles sont en phase de croissance stationnaire, avec donc une faible vitesse de division et une faible synthèse de paroi, qui est la cible de la vancomycine [137]. Une autre explication, comme vu dans le paragraphe 1.4.5, est que la vancomycine peut être séquestrée dans les couches de peptidoglycanes, réduisant ainsi les concentrations de vancomycine libres. Enfin, une pénétration réduite de la vancomycine à travers la matrice de biofilms de *S. aureus* et de *S. epidermidis* a déjà été décrite [50,138], ainsi que la stimulation de la formation du biofilm pour certains isolats cliniques de *S. epidermidis* par de faibles concentrations de vancomycine [139]. Dans notre étude, nos résultats concordent puisque le biofilm qui était exposé à la vancomycine seule contenait 10 fois plus de bactéries que le biofilm témoin.

L'absence d'efficacité de la vancomycine en monothérapie dans cette étude est en accord avec la recommandation d'y associer un aminoglycoside pour le traitement des infections à biofilm de *S. aureus* [91]. Comparée à l'absence d'activité de l'amikacine ou de la vancomycine seule, l'exposition des bactéries à la combinaison des deux antibiotiques pendant 5 jours dans le modèle HF a eu un effet bactéricide sur les bactéries planctoniques. Cependant, malgré cette activité augmentée, après 5 jours d'exposition à la combinaison (J7), les comptages des bactéries planctoniques étaient encore supérieurs au seuil de quantification.

Nous avons donc testé d'autres schémas thérapeutiques pour cette combinaison pour essayer d'améliorer l'efficacité antibactérienne. Contrairement à nos attentes étant donné l'activité concentration-dépendante des aminoglycosides, l'augmentation du C_{max} de l'amikacine de 1.8 fois (de 70 μ g/mL à 130 μ g/mL) n'a pas augmenté l'efficacité sur les bactéries planctoniques. Pour la vancomycine, l'efficacité de l'association semble être légèrement diminuée lorsqu'elle

est administrée en perfusion continue, en particulier sur les bactéries planctoniques, mais nous n'avons pas réalisé suffisamment d'essais pour tirer de conclusion définitive. Contrairement à ce qui a été observé sur les bactéries planctoniques, l'ajout de vancomycine à l'amikacine (en bolus ou en perfusion constante) n'a pas entraîné de réduction supplémentaire de la taille biofilm de *S. aureus* par rapport à la biomasse du biofilm après 5 jours de traitement à l'amikacine seule.

L'activité distincte de la combinaison sur les bactéries planctoniques et du biofilm a confirmé les différents phénotypes de ces deux populations de bactéries et que les antibiotiques sont moins actifs sur les bactéries du biofilm. En effet, les biofilms sont présumés contenir un grand nombre de persister, qui ont des taux de croissance plus faibles et sont donc moins affectés par les antibiotiques [43,140]. De plus, aucun schéma thérapeutique testé dans cette étude, même s'il dépassait les valeurs d'indice PK/PD recommandées, n'a pu éradiquer complètement les bactéries planctoniques coexistant avec un biofilm, ce qui pourrait suggérer que certaines bactéries sont continuellement libérées du biofilm et remises en suspension sous forme planctonique.

Comme notre étude est la première étudiant un biofilm dans un HF, l'imagerie microscopique pourrait permettre d'étudier la répartition du biofilm dans la cartouche. Cette répartition pourrait être expliquée par les forces de cisaillement dans l'espace extra-capillaire. Il faut aussi noter que notre système était caractérisé par une absence totale de composants du système immunitaire et par la présence d'un milieu de culture riche, favorable à la croissance bactérienne. Ces deux conditions limitent l'efficacité des traitements antibiotiques *in vitro* par rapport à la même situation *in vivo*. Cependant, nos résultats *in vitro* sont restés en accord avec le manque d'efficacité des traitements antibiotiques systémiques chez des patients pour qui des traitements supplémentaires, tels que l'élimination mécanique des biofilms ou des concentrations antibiotiques locales très élevées, seraient fortement conseillés [61,141].

En plus de l'efficacité de la combinaison, nous avons évalué sa capacité à limiter l'émergence de résistances dans les populations bactériennes planctoniques et du biofilm. L'absence de résistance à la vancomycine retrouvée dans cette étude est en accord avec d'autres études menées sur *S. aureus* [80]. Inversement, des bactéries (environ 10^{-6}) capables de croître sur gélose additionnée de 6 µg/mL (6 fois la CMI) d'amikacine étaient systématiquement présentes dans les populations planctoniques et du biofilm avant exposition au traitement. Ceci qui implique que de faibles proportions de bactéries plus résistantes sont spontanément présentes dans de grandes populations bactériennes, comme décrit précédemment [114]. Puisque des proportions similaires ont également été trouvées à la fin des expériences contrôle, cela suggère que les taux de croissance et de survie des bactéries « moins sensibles » et « sensibles » étaient similaires en l'absence d'exposition à un antibiotique.

Après 5 jours d'exposition aux antibiotiques, la CMI de l'amikacine pour les bactéries capables de pousser sur géloses additionnées d'amikacine n'a jamais dépassé le seuil de résistance (> 16µg/mL). Ces bactéries présentaient donc une sensibilité intermédiaire à l'amikacine d'après l'EUCAST, impliquant que la probabilité de guérison suite à l'administration d'amikacine à des patients infectés par ces bactéries serait incertaine [142]. Cependant, il convient également de souligner que la CMI initiale de la souche testée était faible (1 µg/mL). Ceci suggère que le même phénomène de sélection se produisant sur une autre souche avec une CMI deux ou quatre fois plus élevée conduirait probablement à la sélection de "vraies" bactéries résistantes. La sélection de bactéries « moins sensibles » à l'amikacine mais toujours sensibles à la vancomycine, qui représentaient la principale population de bactéries planctoniques et du biofilm après 5 jours d'exposition à l'amikacine seule, pourrait s'expliquer par un mécanisme inductible de résistance dans lequel l'épaississement de la paroi cellulaire entraîne une moindre pénétration de l'amikacine dans la cellule bactérienne [117].

Il est important de noter que l'ajout de vancomycine à l'amikacine a considérablement réduit les proportions de ces bactéries « moins sensibles » à la fois dans les bactéries planctoniques et dans celles du biofilm par rapport à l'administration d'amikacine seule, en particulier lorsque la vancomycine a été administrée en bolus. Ces résultats suggèrent que la vancomycine a permis de limiter la croissance de ces bactéries « moins sensibles » à l'amikacine et d'empêcher leur sélection. La vancomycine administrée par perfusion continue associée à l'amikacine semble limiter dans une moindre mesure la sélection des bactéries « moins sensibles », mais ces différences nécessitent une investigation plus approfondie.

En conclusion, en étudiant les bactéries planctoniques et celles du biofilm en parallèle et en reproduisant les fluctuations de concentrations d'antibiotiques sur 5 jours, comme cela peut se produire *in vivo* après des administrations quotidiennes, nous avons démontré l'efficacité augmentée de la combinaison d'amikacine et de vancomycine sur les bactéries planctoniques mais pas sur celles du biofilm. Cependant, bien que la vancomycine n'ait pas augmenté l'activité bactéricide de l'amikacine sur les bactéries du biofilm, elle a réduit la sélection de bactéries « moins sensibles » à l'amikacine, ce qui pourrait aider à maintenir l'efficacité de cette molécule pendant les traitements. Même si ces résultats doivent être confirmés avec des isolats cliniques de MRSA et de MSSA, ils soulignent l'importance du choix des combinaisons.

2.2.6 Article 2

Diane C Broussou, Marlene Z Lacroix, Pierre-Louis Toutain, Farid El Garch, Frédérique Woehrlé, Alain Bousquet-Mélou and Aude A Ferran

Differential activity of the combination of vancomycin and amikacin on planktonic versus biofilm-growing *Staphylococcus aureus* in a Hollow Fiber Infection Model

Frontiers in Microbiology, Section Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy, volume 9



Differential Activity of the Combination of Vancomycin and Amikacin on Planktonic vs. Biofilm-Growing *Staphylococcus aureus* Bacteria in a Hollow Fiber Infection Model

Diane C. Broussou^{1,2}, Marlène Z. Lacroix¹, Pierre-Louis Toutain³, Frédérique Woehrlé², Farid El Garch², Alain Bousquet-Melou¹ and Aude A. Ferran^{1*}

¹ INHERES, INRA, ENVT, Université de Toulouse, Toulouse, France, ² Vétquinol, Global Drug Development, Lure, France, ³ Department of Veterinary Basic Sciences, Royal Veterinary College, London, United Kingdom

OPEN ACCESS

Edited by:

Mariana Henriques,
University of Minho, Portugal

Reviewed by:

Fintan Thomas Moriarty,
AO Research Institute, Switzerland
Anabela Portela Borges,
Faculdade de Engenharia da
Universidade do Porto, Portugal

*Correspondence:

Aude A. Ferran
a.ferran@envt.fr

Specialty section:

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

Received: 15 September 2017

Accepted: 13 March 2018

Published: 27 March 2018

Citation:

Broussou DC, Lacroix MZ, Toutain P-L, Woehrlé F, El Garch F, Bousquet-Melou A and Ferran AA (2018) Differential Activity of the Combination of Vancomycin and Amikacin on Planktonic vs. Biofilm-Growing *Staphylococcus aureus* Bacteria in a Hollow Fiber Infection Model. *Front. Microbiol.* 9:572. doi: 10.3389/fmicb.2018.00572

Combining currently available antibiotics to optimize their use is a promising strategy to reduce treatment failures against biofilm-associated infections. Nevertheless, most assays of such combinations have been performed *in vitro* on planktonic bacteria exposed to constant concentrations of antibiotics over only 24 h and the synergistic effects obtained under these conditions do not necessarily predict the behavior of chronic clinical infections associated with biofilms. To improve the predictivity of *in vitro* combination assays for bacterial biofilms, we first adapted a previously described Hollow-fiber (HF) infection model by allowing a *Staphylococcus aureus* biofilm to form before drug exposure. We then mimicked different concentration profiles of amikacin and vancomycin, similar to the free plasma concentration profiles that would be observed in patients treated daily over 5 days. We assessed the ability of the two drugs, alone or in combination, to reduce planktonic and biofilm-embedded bacterial populations, and to prevent the selection of resistance within these populations. Although neither amikacin nor vancomycin exhibited any bactericidal activity on *S. aureus* in monotherapy, the combination had a synergistic effect and significantly reduced the planktonic bacterial population by -3.0 to -6.0 log₁₀ CFU/mL. In parallel, no obvious advantage of the combination, as compared to amikacin alone, was demonstrated on biofilm-embedded bacteria for which the addition of vancomycin to amikacin only conferred a further maximum reduction of 0.3 log₁₀ CFU/mL. No resistance to vancomycin was ever found whereas a few bacteria less-susceptible to amikacin were systematically detected before treatment. These resistant bacteria, which were rapidly amplified by exposure to amikacin alone, could be maintained at a low level in the biofilm population and even suppressed in the planktonic population by adding vancomycin. In conclusion, by adapting the HF model, we were able to demonstrate the different bactericidal activities of the vancomycin and amikacin combination on planktonic and biofilm-embedded bacterial populations, suggesting that, for

biofilm-associated infections, the efficacy of this combination would not be much greater than with amikacin monotherapy. However, adding vancomycin could reduce possible resistance to amikacin and provide a relevant strategy to prevent the selection of antibiotic-resistant bacteria during treatments.

Keywords: hollow-fiber infection model, antibiotic combination, amikacin, vancomycin, biofilm, antimicrobial resistance, *Staphylococcus aureus*

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus possesses the ability to form biofilms and is responsible for chronic infections which are hard to treat and cause significant morbidity and mortality.

Biofilms are communities of bacteria which adhere to surfaces and are encapsulated in a self-produced extracellular polysaccharide matrix. They constitute an important strategy implemented by microorganisms to survive in harsh environmental conditions (Donlan and Costerton, 2002). Biofilms are responsible for chronic, recurrent infections and are known to survive very high concentrations of antibiotics (Lewis, 2008; Lebeaux et al., 2014). One hypothesis to explain the lower activity of antimicrobial drugs on biofilms is the high prevalence of persister cells in biofilms (Lewis, 2008; Singh et al., 2009). These persisters, unlike resistant bacteria which are genetically modified, consist of clones of bacteria expressing a different but reversible phenotype which allows them to transiently escape the effects of antibiotics (Lewis, 2008).

The antibiotic therapies currently used against biofilm infections are often associated with poor clinical responses and frequent relapses (Davies, 2003). For several years, different solutions have been proposed to eradicate biofilm bacteria such as phages, quorum sensing inhibitors or physical methods (Ivanova et al., 2017). However, although highly innovative strategies still need to be developed to deal with severe infections by both tolerant and multi-resistant bacteria, the method which can most rapidly and easily be implemented in patients at present is to combine existing drugs or to modify their therapeutic regimen (dose, frequency, and mode of administration).

In the case of suspected *S. aureus* infection, vancomycin therapy is often initiated in patients to provide antibacterial activity against both Methicillin-Sensitive *S. aureus* (MSSA) and Methicillin-Resistant *S. aureus* (MRSA) (Deresinski, 2009). However, although vancomycin can kill planktonic bacteria, its activity against Biofilm-Embedded Bacteria (BEB) is quite low. Lebeaux et al. (2015) showed that after exposure to a very high, constant concentration of vancomycin (5000 mg/L) for 24 h, the percentage of bacteria surviving in a 24 h-old *S. aureus* biofilm exceeded 20% and was even close to 100% for 2 of the 4 tested strains. Singh et al. (2009) reported similar results and found no statistically significant difference between the bacteria remaining in a non-treated *S. aureus* biofilm or in a biofilm exposed for 24 h to vancomycin concentrations equal to or higher than those clinically achievable. Post et al. (2017) demonstrated that vancomycin is able to eradicate a mature biofilm of *S. aureus* from metal implants by using a static concentration

of 200 mg/L over 28 days. Nevertheless, such a concentration profile cannot be achieved by systemic administration or local delivery vehicles currently available. To overcome this poor activity on biofilms, an aminoglycoside is often combined with vancomycin. Synergistic activity between vancomycin and aminoglycosides had already been demonstrated on *S. aureus* (Watanakunakorn and Glotzbecker, 1974; Cokça et al., 1998) but these studies were performed by exposing planktonic bacteria for no more than 24 h to constant antibiotic concentrations whereas in the *in vivo* situation, antibiotic concentrations continuously fluctuate over several days. The effects of a combination of gentamicin and vancomycin on *S. aureus* were more rarely tested under dynamic *in vitro* conditions with varying antibiotic concentrations or in animal models of infection. No significant synergy was observed in two studies where low inocula of *S. aureus* were exposed to the two drugs (Backo et al., 1999; Aeschlimann et al., 2000). Another study on large inocula of MRSA and MSSA, representative of a biofilm-associated infection, was performed in an *in vitro* simulated endocardial vegetation model. The effect of vancomycin alone was statistically significant compared to the control after 3 days but the activity of vancomycin on MSSA or MRSA was not improved by adding gentamicin (LaPlante and Woodmansee, 2009). However, in this study, the vancomycin concentrations tested were almost two times higher than the free and active concentrations routinely obtained in patients because no correction was performed for the 45% plasma protein binding of vancomycin (Liu et al., 2002; Butterfield et al., 2011).

To propose new treatment optimizations, the predictivity of *in vitro* experiments needs to be improved, for example by exposing both planktonic and BEB in parallel over the complete duration of treatment (several days), to drug concentrations identical to those that would be encountered under clinical conditions in patients.

In this study, we studied the effects of amikacin, an aminoglycoside, and vancomycin on planktonic and biofilm-embedded *S. aureus* by using an *in vitro* dynamic model, the Hollow-Fiber (HF) infection model, which mimics the fluctuations of antibiotic concentrations over time, as would occur in the plasma of patients during a 5-day treatment. The HF model was recently labeled by the European Medicines Agency (European Medicines Agency, 2015; Gumbo et al., 2015) for drug dosage optimization in the treatment of tuberculosis. We have further adapted this model to explore drug activity not only on planktonic but also on biofilm-embedded *S. aureus*. Indeed, in previous studies conducted in HF (Nicasio et al., 2012; Ferro et al., 2015), the bacteria were systematically

exposed to drugs during the exponential phase of growth, when there was no time for biofilm development, whereas in this study, the biofilm was allowed to form for 3 days before drug exposure. The killing effects of drugs and the potential selection of resistance were assessed both on planktonic bacteria over time and on BEB at the end of exposure. We first compared monotherapy and combinations of amikacin and vancomycin at the currently recommended dosing regimens, i.e., 1g vancomycin twice a day and 15 mg/kg amikacin once a day for 5 days. Such therapeutic regimens are considered sufficient to achieve the PK/PD indices classically expected to obtain drug efficacy. For aminoglycosides, the most predictive PK/PD index is the Maximal Concentration (C_{max}) divided by the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) ratio (Moore et al., 1987) and a value from 8 to 10 is usually recommended to ensure efficacy against the pathogen (Toutain et al., 2002). For vancomycin, the best predictive index is the AUC over 24 h divided by the MIC (AUC_{24h}/MIC) (Nielsen et al., 2011), and value of 400 is recommended to achieve clinical effectiveness (Rybak et al., 2009; Jung et al., 2014; Song et al., 2015).

We then explored the effects of a slight deviation from these standard dosages by simulating an increased dose of amikacin, which is a concentration-dependent antibiotic, (Frimodt-Møller, 2002) and by modifying the mode of administration (infusion vs. bolus) of vancomycin, which is a time-dependent antibiotic (Wainee et al., 2015).

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strain

The Methicillin-sensitive *S. aureus* strain HG 001, derived from NCTC 8325, was used for all experiments.

Antimicrobial Agents

Amikacin sulfate powder (Amikacine Mylan®) and vancomycin chlorhydrate powder (Vancomycine Sandoz®) were used to prepare antibiotic stock solutions with water. Vials were stored at $-20^{\circ}C$ for less than 1 month and were thawed and diluted to the desired concentrations for the assay just before each antibiotic administration.

Minimal Inhibitory Concentration (MIC) Determination

Minimal inhibitory concentrations of vancomycin and amikacin on the MSSA strain were performed in triplicate by broth microdilution in cation-adjusted Mueller Hinton broth (Ca-MH, Mueller-Hinton II, Sigma Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France) according to the CLSI reference methods (Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI], 2012), and also in Roswell Park Medium Institute 1640 Medium (RPMI, Gibco, Thermo Fischer Scientific, MA, United States). Briefly, a bacterial suspension, diluted in Mueller-Hinton Broth or RPMI to give a final organism density of $5.7 \log_{10}$ CFU/mL, was added to wells of a microtiter

plate containing serial twofold dilutions of vancomycin or amikacin. Growth was recorded after incubation for 18 h at $35^{\circ}C$.

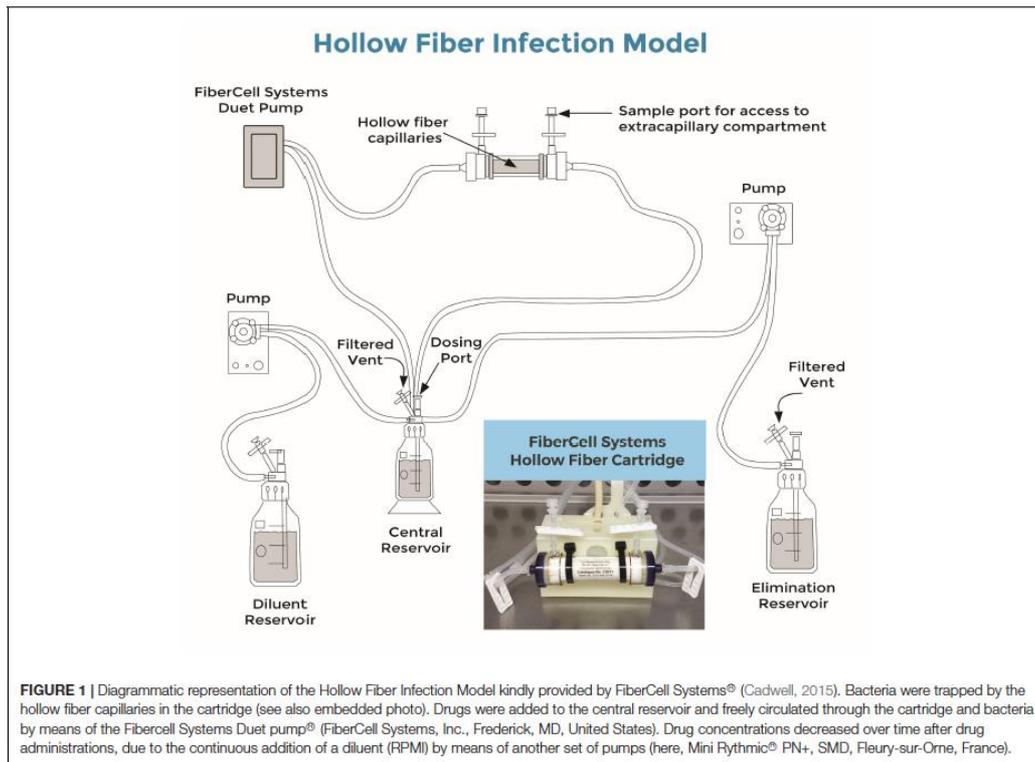
PK/PD Study Hollow-Fiber Infection Model

A HF infection model was used to assess the antibacterial activity of the combination of amikacin and vancomycin on planktonic and biofilm-embedded *S. aureus* during exposure to fluctuating clinically relevant antibiotic concentrations. A diagrammatic representation of the Hollow Fiber Infection Model was kindly provided by FiberCell Systems® (Figure 1). Basically, the HF model includes a cartridge with capillaries composed of a semipermeable polysulfone membrane. The pore size of the capillaries (42 kDa) allows equilibration of the concentrations of chemicals which circulate through the central and peripheral compartments by means of a peristaltic pump (Duet pump, FiberCell Systems, Inc., Frederick, MD, United States) while the bacteria stay confined to the extracapillary space in the peripheral compartment.

In this study, twenty milliliters of a suspension containing $5.7 \log_{10}$ CFU/mL of *S. aureus* were inoculated into the extracapillary space of each hollow-fiber cartridge (C2011 polysulfone cartridge, FiberCell Systems, Inc., Frederick, MD, United States) and incubated at $37^{\circ}C$ in RPMI from Day 0 (D0) to Day 2 (D2) without any drug, to allow biofilm formation.

From D3 to D7, the bacteria were then subjected to amikacin and/or vancomycin. The drugs were added to the central compartment to obtain the maximum concentration (C_{max}) and were continuously diluted with RPMI by means of a peristaltic pump (Mini Rythmic PN+, SMD, Fleury-sur-Orne, France) to mimic the human terminal half-life of each antibiotic. The antibiotics also constantly circulated through the central and peripheral compartments by means of a second peristaltic pump (Duet pump, FiberCell Systems, Inc., Frederick, MD, United States).

The first antibiotic exposure tested in the HF model simulated the plasma concentrations of patients receiving 15 mg/kg amikacin once a day (Kato et al., 2017) and/or 1 g vancomycin every 12 h (Nicasio et al., 2012). Since the free plasma drug concentration is known to be one of the best surrogates of the concentration at the site of infection (Liu et al., 2002), we exposed the bacteria in the HF model to concentrations similar to the free plasma concentrations obtained in patients after administration of the above dosing regimens. For amikacin, plasma protein binding was considered negligible and a plasma C_{max} of treated patients ranging from 60 to 80 mg/L (A70 treatment) was reproduced in the HF model (Gálvez et al., 2011). For vancomycin, plasma protein binding is around 45% (Butterfield et al., 2011) so the total plasma concentrations obtained from patients described in the literature were corrected to calculate the free C_{max} of 18 $\mu g/mL$, which was then simulated in the HF model (V18 treatment) (Mandell et al., 2007). The simulated elimination half-life for both drugs in the HF model (4 h) was similar to the plasma elimination half-lives of amikacin and vancomycin in patients (Matzke et al., 1986; Adamis et al., 2004).



For the combinations, we first tested both drugs at the current dosing regimens for amikacin and vancomycin (A70 V18 treatment) and then simulated different pharmacokinetic profiles. We then tested two higher peak concentrations of 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (A90 V18 treatment) and 130 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (A130 V18 treatment) of amikacin, that could theoretically be attained in patients with a dose of 2500 mg (Álvarez et al., 2016), to investigate the relation between amikacin concentration and activity. For vancomycin, a dosage of 2 g a day has been recently recommended (Patel et al., 2011; Wainee et al., 2015), so a Continuous Rate Infusion (CRI) of 2 g a day of vancomycin was simulated by directly adding the drug to the fresh diluting medium to obtain a constant vancomycin concentration of 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (A70 CRIV9 treatment) (Hanrahan et al., 2015). All the experiments, including control and exposure to amikacin and vancomycin in monotherapy or in combination, were performed in duplicate to check reproducibility.

Planktonic Bacteria Quantification

One milliliter samples were collected from the extracapillary space in the HF cartridge to count the planktonic bacteria at 0 h (baseline), 2, 4, 6, 8, and 10 h after the morning antibiotic

administration each day for 5 days (D3 to D7). The samples were centrifuged at 3000 g for 10 min. The supernatant was removed and the pellet resuspended in 1 mL of NaCl 0.9%. The suspension was then serially diluted and the bacteria counted in triplicate after an overnight incubation at 37°C on tryptic soy agar supplemented with magnesium sulfate and activated charcoal to prevent any carry-over effect of the antibiotic. The counts were verified again 8 h after to include colonies that could have slower grown. The limit of detection was 2.5 \log_{10} CFU/mL.

After two washes to remove the antibiotic contained in the suspension, the less-susceptible planktonic bacteria were counted once a day prior to morning antibiotic administrations from D3 to D7 on agars containing threefold (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and sixfold MIC (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of amikacin or vancomycin. The plates were incubated for 3 days at 37°C before the bacteria were counted. The proportion of less-susceptible bacteria in the total bacterial population was calculated as the ratio of the colony counts on drug-supplemented agar divided by the colony counts on drug-free agar at the same sampling time.

Biofilm Bacteria Quantification

At the end of the experiment (D7), the extracapillary space in the cartridge containing the bacteria was washed four times

with 50 mL of sterile NaCl 0.9% to remove the planktonic bacteria. The biofilm was then disrupted by sonication of the cartridge for 15 min at 42 kHz (Branson 5800, Branson Ultrasonics Corporation, Emerson, Angoulême, France) which suspended the BEB in the 20 ml of NaCl 0.9% remaining in the cartridge after the washes. These bacteria were collected for quantification with the same technic as for planktonic bacteria. The colonies were plated on the drug-free and drug-supplemented agar and were counted, before and after ultrasound treatment. After an overnight incubation at 37°C, or more if needed, the size of the biofilm was calculated in log₁₀ CFU/μL from the difference between the bacterial counts in the extracapillary space before and after ultrasound treatment. For each combination, the MIC of amikacin or vancomycin was also determined on a single bacterial colony growing on the drug-containing agar plates to accurately quantify the loss of susceptibility.

Drug Assay

Samples for antibiotic quantification were withdrawn from the central reservoir and from the extracapillary space of the cartridge before and after each antibiotic administration and at 2, 4, 6, and 8 h on the 1st day and twice a day thereafter. Samples were centrifuged at 3000 g for 10 min and stored at -20°C for less than 2 months before dosing.

Samples were prepared in 1.5 mL tubes. Two hundred μL of 15% of trichloroacetic acid containing the vancomycin d12 and amikacin d5 internal standards at 10 μg/mL were added to 100 μL of calibrators, quality controls, or samples. Antibiotics were quantified on an Acquity ultra performance liquid chromatography (UPLC) coupled to a Xevo triple quadrupole mass spectrometer (Waters, Milford, MA, United States). Chromatographic data were monitored by Targetlynx software (Waters, Milford, MA, United States). The method was validated in terms of linearity, sensitivity and repeatability. Accuracies ranged from 84 to 94% and from 99 to 107% with CV intra-day precisions below 9 and 10% for amikacin and vancomycin, respectively. The limit of quantification was set at 0.5 μg/mL for both antibiotics.

The concentration of antibiotic in the system was calculated according to equation 1.

Statistics

The planktonic bacterial inoculum sizes before (D3) and after (D7) in the 5-day combined treatments were compared by applying a paired T-test with the R[®] software (R Development Core Team, 2014).

The sizes of the planktonic bacteria and BEB populations after treatment with the amikacin and vancomycin combination for 5 days (D7) were also compared by paired T-test with R[®].

RESULTS

Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

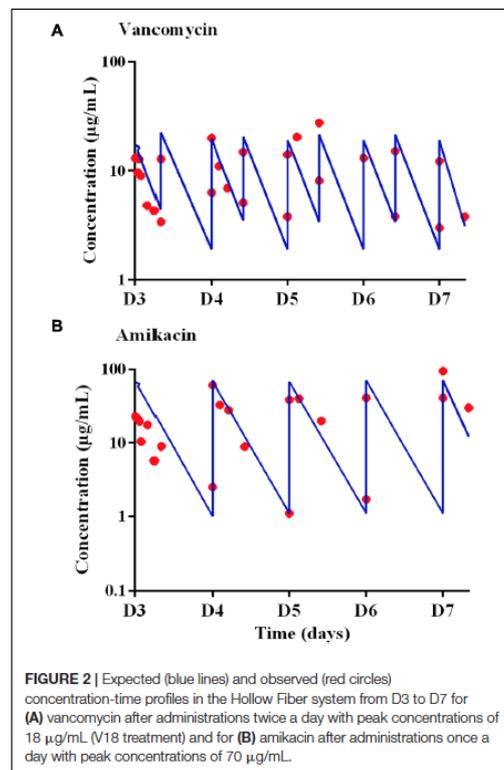
The MIC of vancomycin, for the *S. aureus* strain tested, was 1 μg/mL both in Ca-MH and in RPMI and the MIC

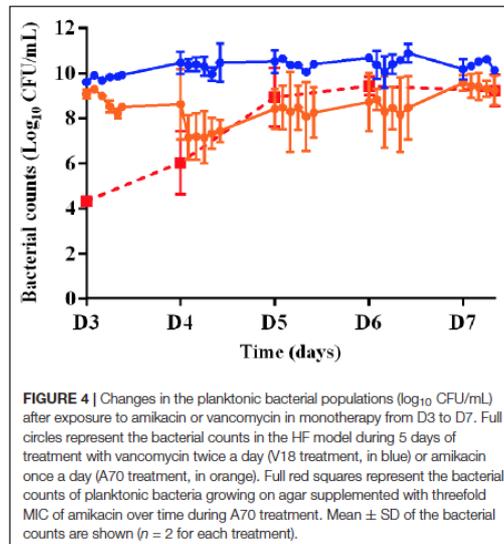
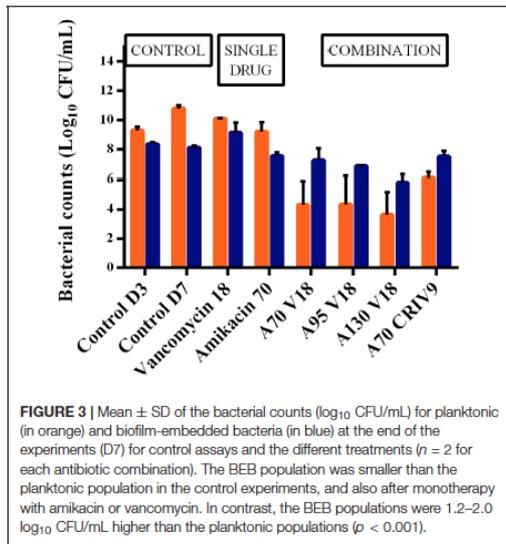
of amikacin was 1 μg/mL in Ca-MH and 0.5 μg/mL in RPMI. Based on the EUCAST breakpoints, the tested strain was therefore considered as susceptible to vancomycin and amikacin.

PK Analysis

The concentrations in the central compartment and in the extra capillary space of the cartridge (containing bacteria) attained equilibrium within 15 min after adding the antibiotic to the central compartment (data not shown). The predicted vs. observed free concentration-time profiles of amikacin and vancomycin in the HF model, corresponding to the dosing regimen of 15 mg/kg of amikacin once a day (A70) and 1 g of vancomycin every 12 h (V18), are provided in Figure 2.

For vancomycin, the targeted AUC_{24 h} was 400 μg.h.mL⁻¹, i.e., 16.6 times the MIC over 24 h (Toutain et al., 2007), and AUC_{24 h} ranging from 372 to 417 μg.h.mL⁻¹, i.e., deviations ranging from -7.0 to +4.3% from the targeted AUC_{24 h}, were obtained. For amikacin, the targeted C_{max} was 70 μg/mL and, at steady-state, a C_{max} of 59.3 ± 25.8 μg/mL (mean ± SD) i.e., a mean deviation of 15.3% from the expected C_{max}, was obtained.





PK/PD Study

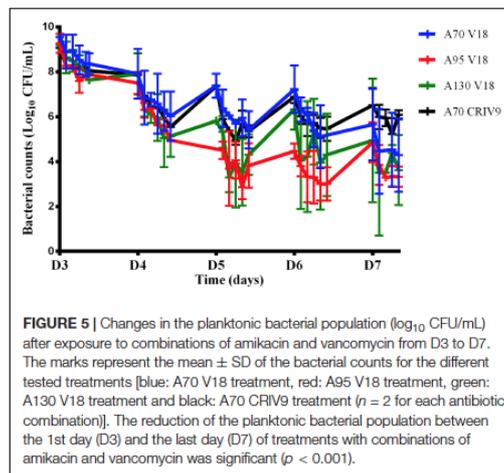
Killing Activity on Planktonic Bacterial Populations

After incubation for 3 days in the HF cartridge (D3), the planktonic and biofilm populations of *S. aureus* were $9.3 \pm 0.3 \log_{10}$ CFU/mL and $8.4 \pm 0.1 \log_{10}$ CFU/mL, respectively.

In the absence of antibiotic (control experiments), the planktonic and biofilm populations remained quite stable for a further 5 days with bacterial counts of $10.8 \pm 0.2 \log_{10}$ CFU/mL and $8.1 \pm 0.1 \log_{10}$ CFU/mL, respectively, at the end of the experiments (D7) (Figure 3).

The time-kill curves for the planktonic bacteria associated with the 3-days old biofilm and exposed to amikacin or vancomycin alone and the bacterial counts of planktonic bacteria growing on agar supplemented with threefold MIC of amikacin over time during A70 treatment for 5 days (from D3 to D7) are shown in Figure 4. After 5 days of exposure to vancomycin (from D3 to D7) administered twice a day with a peak concentration of 18 μ g/mL (V18 treatment), the planktonic population never decreased below the initial population size. After exposure to amikacin administered once a day with a peak concentration of 70 μ g/mL (A70 treatment), a mean reduction of 0.9 \log_{10} was observed over the 1st day of treatment (D3) but after 5 days (D7), the size of the planktonic population, $9.2 \pm 0.7 \log_{10}$ CFU/mL, was very similar to that of the population before exposure to amikacin and not much lower than in the control experiments.

We then assessed the killing activity of the amikacin and vancomycin combinations over 5 days (from D3 to D7). For amikacin, three peak concentrations of 70 (A70 V18 treatment), 95 (A95 V18 treatment), or 130 (A130 V18 treatment) μ g/mL were tested and for vancomycin, a single peak concentration of 18 μ g/mL (A70 V18 treatment) twice a day was compared



to a steady concentration of 9 μ g/mL (A70 CRIV9 treatment). The time-kill curves of planktonic bacteria exposed to the drug combinations from D3 to D7 are shown in Figure 5. Similar time-kill profiles were observed for the planktonic bacteria, whatever the drug concentration profiles tested. The mean decrease of the bacterial population during the 1st day of treatment (D3) with the different drug combination regimens was very similar and ranged from -0.9 to $-1.4 \log_{10}$ CFU/mL, followed by stabilization or a slight increase overnight. The killing activity of the drugs during the following days (D4–D7) ranged from

a decrease of 3.0 log₁₀ to an increase of 0.5 log₁₀ of the planktonic population between two successive administrations of amikacin.

After exposure to combinations for 5 days (D7), no eradication of planktonic bacteria was observed but the overall reduction ranged from -3.0 log₁₀ to -6.0 log₁₀ compared to the population before drug exposure. This reduction of the planktonic bacterial population between the 1st day (D3) and the last day (D7) of treatments with combinations of amikacin and vancomycin was significant (*p* < 0.001) whereas amikacin or vancomycin alone failed to reduce the planktonic population over 5 days (the planktonic bacterial populations were equal to or higher after monotherapy than before monotherapy, Figure 4).

Killing Activity on BEB

The counts of biofilm-embedded bacteria recovered at the end of each experiment (D7) and the planktonic bacterial counts at the same time point are compared in Figure 3.

After exposure to vancomycin alone, the BEB count was 9.2 ± 0.7 log₁₀ CFU/mL, i.e., approximately one log₁₀ higher than the biofilm without treatment, while amikacin alone (A70) decreased the size of the biofilm by 0.6 log₁₀ CFU/mL. The addition of vancomycin (V18 or CRI V9) to amikacin (A70) did not increase BEB reduction and showed that the combination did not exhibit any synergy on these bacteria.

In parallel, we observed that the BEB population was smaller than the planktonic population in the control experiments, and also after monotherapy with amikacin or vancomycin. In contrast, the BEB populations were 1.2 to 2.0 log₁₀ CFU/mL higher than the planktonic populations (*p* < 0.001) in all the combination experiments.

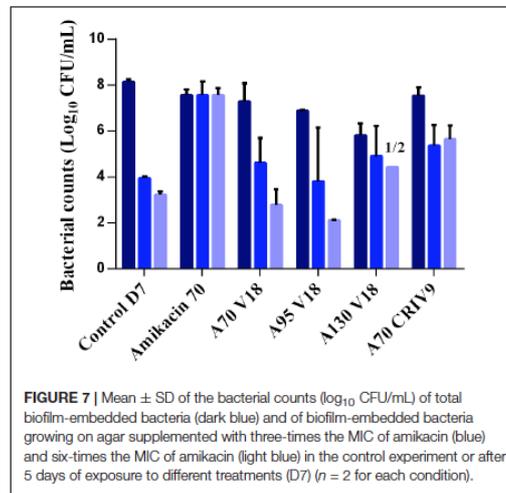
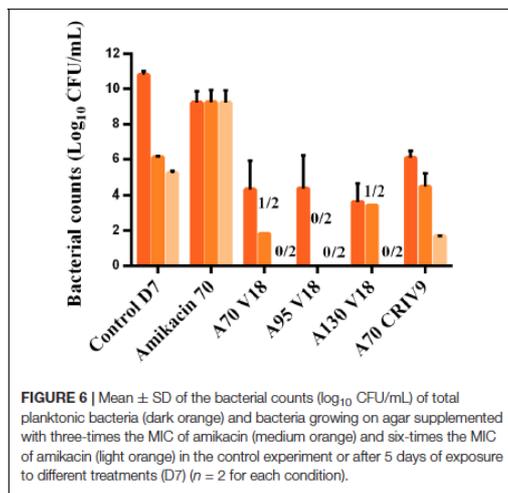
Prevention of the Selection of Resistance

No bacterial growth was observed on vancomycin-supplemented agar, whatever the experiment.

The counts of planktonic bacteria and BEB growing on agar supplemented with 3-MIC and 6-MIC-amikacin, after exposure to the drugs for 5 days (D7), are compared to the total counts in Figures 6, 7. Less-susceptible bacteria were systematically observed on the amikacin-supplemented agar plates before any drug exposure (D3) at a proportion of about 10⁻⁶ of the total bacterial population for planktonic bacteria (assessed in all the experiments) and BEB (assessed in control experiments). Similar proportions (around 10⁻⁶) were also found at the end of the control experiments (D7).

After 5 days of exposure to amikacin alone (D7), all the planktonic bacteria and BEB (proportion around 1) were able to grow on 6MIC-amikacin agar (Figure 6), which implied that the less-susceptible bacterial population, rather than fully susceptible bacteria, was selected by the drug. The time-development of the less-susceptible planktonic population, represented in Figure 4, showed that the fully susceptible population was drastically reduced from the 3rd day of treatment (D5). The addition of vancomycin to amikacin reduced the counts of planktonic bacteria growing on 3-MIC-amikacin and 6-MIC-amikacin, which were only detected in 4 on 1 out of 8 assays, respectively. Exposure of biofilm to the drug combinations, rather than to amikacin alone, also reduced the populations of less-susceptible bacteria (Figure 7).

The highest MIC of amikacin for the sampled biofilm bacteria was 16 µg/mL (a 16-fold increase), corresponding to bacteria with intermediate amikacin-susceptibility with regard to the EUCAST breakpoints.



DISCUSSION

Due to the refractoriness of *S. aureus* biofilm infections to antibiotic treatments, there is an urgent need to optimize the use of currently available drugs to ensure bacterial killing and the prevention of resistance. In this study, we developed an innovative use of the HF model by delaying exposure to the antibiotics and studied the effects of a combination of vancomycin and amikacin both on planktonic bacteria and on BEB in conditions representative of clinical situations. Different concentration profiles of the drugs were tested, and bacteria were subjected to the fluctuating concentrations that might be encountered in patients during a complete treatment. These experimental conditions should have greater predictive value than simple static assays in which bacteria are exposed to a fixed concentration over time. Moreover, due to the lack of medium renewal in static assays, such experiments are often conducted over 24 h whereas longer periods are needed to assess the selection of resistance by antibiotics (Drusano, 2017). Compared to animal models, which may exhibit very different pharmacokinetics to humans and in which some human pathogens cannot develop, all bacteria can be cultured in the HF model and exposed to drug concentration profiles that mimic the range of human profiles (Toutain et al., 2010). For example, as vancomycin is eliminated much faster in mice (half-life = 32 min) than in humans (Knudsen et al., 2000), dosage regimens tested in mice can hardly be extrapolated to humans. Obviously, the main weakness of static or dynamic *in vitro* assays is the absence of the immune system which can cooperate with antibiotics to clear an infection.

Several *in vitro* studies in dynamic systems including the HF model (Nicasio et al., 2012; Lenhard et al., 2016) have investigated the antibacterial activity of drugs combined with vancomycin against planktonic *S. aureus*. However, the use of dynamic *in vitro* systems, such as the CDC biofilm device or others, to study the effects of combinations on biofilm is rarely reported. To our knowledge, the present study is the first to use a HF model to conduct experiments on a 3-day old biofilm of a single *S. aureus* strain to assess the activity of drugs combination, over 5 days, on both planktonic bacteria and BEB. The HF model had already been used to simulate in two distinct studies the free concentration-time profiles of amikacin or vancomycin that can be achieved in patients receiving the recommended doses (Nicasio et al., 2012; Ferro et al., 2015). In our study, exposure to different dosage regimens of a susceptible strain of *S. aureus* with MICs of 1 µg/mL for amikacin and vancomycin led to equal or higher values of the PK/PD indices than those classically expected to obtain drug efficacy (Zelenitsky et al., 2003; Rybak et al., 2009; Song et al., 2015). For aminoglycosides, for which the most predictive PK/PD index is the C_{max}/MIC ratio (Moore et al., 1987), we targeted C_{max}/MIC values from 70 to 130 in the HF model whereas a value from 8 to 10 is usually recommended to ensure efficacy against the pathogen (Toutain et al., 2002). For vancomycin, for which the best predictive index is the AUC over 24 h divided by the MIC ($AUC_{24\ h}/MIC$) (Nielsen et al., 2011), we targeted the value of 400 recommended to achieve clinical effectiveness (Rybak et al., 2009; Jung et al., 2014; Song

et al., 2015) and obtained $AUC_{24\ h}/MIC$ values ranging from 372 to 417 for the bolus of vancomycin in the HFIM and 480 for the constant infusion. Even though these targeted values of the PK/PD indices were attained for both drugs, almost no bactericidal activity was observed on the 3-day old biofilm or on the co-existing planktonic bacteria when amikacin or vancomycin were administered alone for 5 days. These results are in agreement with previous studies which demonstrated the low activity of vancomycin on large bacterial inocula (LaPlante and Rybak, 2004; LaPlante and Woodmansee, 2009) and on biofilms (Hogan et al., 2016). One study involving a HF model showed that a peak concentration as high as 80 mg/L was needed to achieve bactericidal activity against a large inoculum of a MRSA strain with a MIC of 1 µg/mL for vancomycin (Lenhard et al., 2016). One proposed explanation for the inoculum effect and reduced efficacy of vancomycin is that bacteria at high density are in a stationary growth phase with low dividing rate and low cell wall synthesis (Brown et al., 1988; Lamp et al., 1992). Another explanation is that vancomycin may be sequestered by *S. aureus* on peptidoglycan layers, thus reducing the free vancomycin concentrations surrounding the bacteria (Srinivasan et al., 2002; Ekdahl et al., 2005; Yanagisawa et al., 2009). Finally, a reduced penetration of vancomycin through *S. aureus* and *S. epidermidis* biofilms has also been described (Doroshenko et al., 2014; Singh et al., 2016) and, even worse than the lack of efficacy, low concentrations of vancomycin were reported to stimulate biofilm formation in some clinical isolates of *S. epidermidis* (Cargill and Upton, 2009). In this study on *S. aureus*, our results were concordant as the biofilm which was exposed to vancomycin alone contained 10 times more bacteria than the control.

The lack of efficacy of the drugs used in monotherapy in this study supports the clinical recommendation to associate an aminoglycoside with vancomycin for the treatment of *S. aureus* biofilm infection (Deresinski, 2009). Compared with the absence of activity of amikacin or vancomycin alone, exposure to combinations of vancomycin and amikacin for 5 days in the HF model had a synergistic bactericidal effect on the planktonic bacterial populations. However, despite this synergy, the planktonic bacteria remaining after 5 days of exposure to the combination (D7) still exceeded 2.5 log₁₀ CFU/mL. We therefore investigated the ability of other dosage regimens of amikacin and vancomycin to improve the antibacterial efficacy against this planktonic population. Contrary to our expectations, given the concentration-dependent activity of aminoglycosides, increasing the C_{max} of amikacin 1.8-fold (from 70 to 130 µg/mL) did not increase the efficacy on planktonic bacteria. For vancomycin, the efficacy of the combination seemed to be slightly decreased by constant rate infusion, especially on planktonic bacteria, but there were not enough replicates to draw a definitive conclusion. Contrary to the planktonic population, the addition of vancomycin (as a bolus or constant infusion) to amikacin did not result in an additional bacterial reduction on *S. aureus* biofilm, and no synergy between the two drugs was observed. The distinct activity of the combination on planktonic bacteria and BEB confirmed the different phenotypes of these two populations of bacteria and that the drugs were less active on BEB. Indeed, biofilms are supposed to contain more persisters

bacteria which have lower growth rates and are therefore less affected by antibiotic drugs (Singh et al., 2009; Conlon et al., 2015). Moreover, no dosing regimen tested in this study, even if it exceeded the recommended PK/PD index values, was able to fully eradicate the planktonic bacteria co-existing with a biofilm, which could suggest that some planktonic bacteria were continuously released from the biofilm. As our study is the first one focusing on the biofilm in the HF, microscopy imaging will be further needed to investigate the distribution of the biofilm in the HF cartridge, which could be influenced, among others, by the shear forces in the extracapillary space. It should also be kept in mind that our system was characterized by an absence of the immune system and the presence of a rich medium – more favorable to bacterial growth –, that both limit the efficacy of antibiotic treatments compared to the *in vivo* situation. However, our *in vitro* results are in agreement with the reported lack of efficacy of systemic antibiotic treatments in patients for whom additional treatments, such as mechanical removal of biofilms or very high local antibiotic concentrations, are advised whenever possible (McConoughy et al., 2014; Wu et al., 2015).

In addition to efficacy, we assessed the ability of the combination to reduce the selection of resistant bacteria in planktonic and biofilm populations. The absence of resistance to vancomycin in this study was in accordance with other experiments conducted on *S. aureus* (LaPlante and Rybak, 2004). Conversely, bacteria (approximately 10^{-6}) able to grow on agar supplemented with 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (sixfold MIC) of amikacin were systematically present in the planktonic and biofilm populations before drug exposure, implying that small proportions of such bacteria are spontaneously present in large populations, as previously reported (Ferro et al., 2015). Since similar proportions were also found at the end of the control experiments, it suggests that the growth and survival rates of less-susceptible and fully susceptible bacteria were similar in the absence of drugs. After 5 days of antibiotic exposure, the MIC of amikacin for these bacteria able to grow on agar supplemented with amikacin and termed “less-susceptible,” never exceeded the resistance breakpoint ($> 16 \mu\text{g}/\text{mL}$). These bacteria showed an intermediate amikacin-susceptibility with regard to the EUCAST breakpoints, implying that the administration of amikacin to patients infected by these bacteria would have an uncertain therapeutic effect (Rodloff et al., 2008), but it should also be stressed that the initial MIC of the tested strain was low (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). This suggests that the same selection phenomenon occurring on a strain with a two or four-fold higher MIC would lead to the selection of “true” resistant bacteria. The selection of less-susceptible bacteria, which represented the main population of planktonic bacteria and BEB after exposure for 5 days to amikacin in monotherapy, could be explained by an inducible mechanism of resistance, known as adaptive resistance, in which thickening of the cell wall results in less penetration of amikacin into the bacterial

cell (Yuan et al., 2013). Interestingly, the addition of vancomycin to amikacin considerably reduced the proportions of these less-susceptible bacteria in both planktonic bacteria and BEB compared to amikacin alone, especially when vancomycin was administered in boluses. These results suggest that vancomycin was able to limit the growth of these bacteria less-susceptible to amikacin and prevent their selection. The vancomycin administered by CRI associated with amikacin seemed to limit the selection of less-susceptible bacteria to a lesser extent, but these differences require more thorough investigation.

CONCLUSION

By studying planktonic bacteria and BEB in parallel and by mimicking the fluctuations in antibiotic concentrations over 5 days, as can occur *in vivo* after daily administrations, we demonstrated the increased efficacy of a combination of amikacin and vancomycin on planktonic bacteria but not on BEB. However, even though vancomycin did not increase the killing activity of amikacin on BEB, it reduced the selection of bacteria less-susceptible to amikacin, which could help to maintain the efficacy of this drug during treatments. Even if these results need to be further confirmed with clinically relevant strains of MSSA and MRSA, they highlight the importance of selecting combination therapies not only based on efficacy but also on resistance selection endpoints by taking into account the 2 co-existing populations of planktonic bacteria and BEB.

Equations:

Concentration HF =

$$\frac{(\text{Concentration CR} * \text{Volume CR}) + (\text{Concentration ECS} * \text{Volume ECS})}{\text{Volume CR} + \text{Volume ECS}} \quad (1)$$

With HF being the Hollow-Fiber, CR the Central Reservoir and ECS the Extra-Capillary Space.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

DB, AF, FW, FE, P-LT, and AB-M: substantial contributions to the conception or design of the work. DB, ML, AF, P-LT, and AB-M: acquisition, analysis, or interpretation of data for the work. DB, ML, FW, FE, P-LT, AB-M, and AF drafting the work or revising it critically for important intellectual content. Final approval of the version to be published. Agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

REFERENCES

- Adamis, G., Papaioannou, M. G., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Gargalianos, P., Kosmidis, J., and Giamarellou, H. (2004). Pharmacokinetic interactions of ceftazidime, imipenem and aztreonam with amikacin in healthy volunteers. *Int. J. Antimicrob. Agents* 23, 144–149. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2003.07.001
- Aeschlimann, J. R., Allen, G. P., Hershberger, E., and Rybak, M. J. (2000). Activities of LY333328 and vancomycin administered alone or in combination with

- gentamicin against three strains of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in an in vitro pharmacodynamic infection model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 2991–2998. doi: 10.1128/AAC.44.11.2991-2998.2000
- Álvarez, R., López Cortés, L. E., Molina, J., Cisneros, J. M., and Pachón, J. (2016). Optimizing the clinical use of vancomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 2601–2609. doi: 10.1128/AAC.03147-14
- Backo, M., Gaenger, E., Burkart, A., Chai, Y. L., and Bayer, A. S. (1999). Treatment of experimental staphylococcal endocarditis due to a strain with reduced susceptibility in vitro to vancomycin: efficacy of ampicillin-subactam. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 2565–2568.
- Brown, M. R., Allison, D. G., and Gilbert, P. (1988). Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth-rate related effect? *J. Antimicrob. Chemother.* 22, 777–780. doi: 10.1093/jac/22.6.777
- Butterfield, J. M., Patel, N., Pai, M. P., Rosano, T. G., Drusano, G. L., and Lodise, T. P. (2011). Refining vancomycin protein binding estimates: identification of clinical factors that influence protein binding. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 4277–4282. doi: 10.1128/AAC.01674-10
- Cadwell, J. (2015). The hollow fiber infection model: principles and practice. *Adv. Antibiotics Antibodies* 1:101. doi: 10.4172/aaa.1000101
- Cargill, J. S., and Upton, M. (2009). Low concentrations of vancomycin stimulate biofilm formation in some clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Clin. Pathol.* 62, 1112–1116. doi: 10.1136/jcp.2009.069021
- Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI] (2012). *CLSI Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; CLSI Document M07-A9*, 9th Edn. Wayne, PA: CLSI.
- Cokça, F., Arman, D., and Altay, G. (1998). In vitro activity of vancomycin combined with rifampin, amikacin, ciprofloxacin or imipenem against methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* 4, 657–659. doi: 10.1111/j.1469-0691.1998.tb00349.x
- Conlon, B. P., Rowe, S. E., and Lewis, K. (2015). Persister cells in biofilm associated infections. *Adv. Exp. Med. Biol.* 831, 1–9. doi: 10.1007/978-3-319-09782-4_1
- Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 114–122. doi: 10.1038/nrd1008
- Deresinski, S. (2009). Vancomycin in combination with other antibiotics for the treatment of serious methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Clin. Infect. Dis.* 49, 1072–1079. doi: 10.1086/605572
- Donlan, R. M., and Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 167–193. doi: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002
- Doroshenko, N., Tseng, B. S., Howlin, R. P., Deacon, J., Wharton, J. A., Thurner, P. J., et al. (2014). Extracellular DNA impedes the transport of vancomycin in *Staphylococcus epidermidis* biofilms preexposed to subinhibitory concentrations of vancomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 7273–7282. doi: 10.1128/AAC.03132-14
- Drusano, G. L. (2017). Pre-clinical in vitro infection models. *Curr. Opin. Pharmacol.* 36, 100–106. doi: 10.1016/j.coph.2017.09.011
- Ekdahl, C., Hanberger, H., Hallgren, A., Nilsson, M., Svensson, E., and Nilsson, L. E. (2005). Rapid decrease of free vancomycin in dense staphylococcal cultures. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 24, 596–602. doi: 10.1007/s10096-005-0111-0
- European Medicines Agency (2015). *Qualification Opinion, In Vitro Hollow Fiber System Model of Tuberculosis (HFS-TB)*. Canary Wharf: European Medicines Agency.
- Ferro, B. E., Srivastava, S., Deshpande, D., Sherman, C. M., Pasipanodya, J. G., van Soolingen, D., et al. (2015). Amikacin pharmacokinetics/pharmacodynamics in a novel hollow-fiber *Mycobacterium abscessus* disease model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 1242–1248. doi: 10.1128/AAC.02282-15
- Frimodt-Møller, N. (2002). How predictive is PK/PD for antibacterial agents? *Int. J. Antimicrob. Agents* 19, 333–339. doi: 10.1016/S0924-8579(02)00029-8
- Gálvez, R., Luengo, C., Cornejo, R., Kosche, J., Romero, C., Tobar, E., et al. (2011). Higher than recommended amikacin loading doses achieve pharmacokinetic targets without associated toxicity. *Int. J. Antimicrob. Agents* 38, 146–151. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2011.03.022
- Gumbo, T., Pasipanodya, J. G., Nuermberger, E., Romero, K., and Hanna, D. (2015). Correlations between the hollow fiber model of tuberculosis and therapeutic events in tuberculosis patients: learn and confirm. *Clin. Infect. Dis.* 61, S18–S24. doi: 10.1093/cid/civ426
- Hanrahan, T., Whitehouse, T., Lipman, J., and Roberts, J. A. (2015). Vancomycin-associated nephrotoxicity: a meta-analysis of administration by continuous versus intermittent infusion. *Int. J. Antimicrob. Agents* 46, 249–253. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2015.04.013
- Hogan, S., Zapotoczna, M., Stevens, N. T., Humphreys, H., O'Gara, J. P., and O'Neill, E. (2016). In vitro approach for identification of the most effective agents for antimicrobial lock therapy in the treatment of intravascular catheter-related infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 2923–2931. doi: 10.1128/AAC.02885-15
- Ivanova, K., Ramon, E., Hoyo, J., and Tzanov, T. (2017). Innovative approaches for controlling clinically relevant biofilms: current trends and future prospects. *Curr. Top. Med. Chem.* [Epub ahead of print] doi: 10.2174/1568026617666170105143315
- Jung, Y., Song, K.-H., Cho, J., Kim, H. S., Kim, N.-H., Kim, T. S., et al. (2014). Area under the concentration-time curve to minimum inhibitory concentration ratio as a predictor of vancomycin treatment outcome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Int. J. Antimicrob. Agents* 43, 179–183. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2013.10.017
- Kato, H., Hagihara, M., Hirai, J., Sakanashi, D., Suematsu, H., Nishiyama, N., et al. (2017). Evaluation of amikacin pharmacokinetics and pharmacodynamics for optimal initial dosing regimen. *Drugs R D* 17, 177–187. doi: 10.1007/s40268-016-0165-5
- Knudsen, J. D., Fuursted, K., Raber, S., Espersen, F., and Frimodt-Møller, N. (2000). Pharmacodynamics of glycopeptides in the mouse peritonitis model of *Streptococcus pneumoniae* or *Staphylococcus aureus* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 1247–1254. doi: 10.1128/AAC.44.5.1247-1254.2000
- Lamp, K. C., Rybak, M. J., Bailey, E. M., and Kaatz, G. W. (1992). In vitro pharmacodynamic effects of concentration, pH, and growth phase on serum bactericidal activities of daptomycin and vancomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 2709–2714. doi: 10.1128/AAC.36.12.2709
- LaPlante, K. L., and Rybak, M. J. (2004). Impact of high-inoculum *Staphylococcus aureus* on the activities of nafcillin, vancomycin, linezolid, and daptomycin, alone and in combination with gentamicin, in an in vitro pharmacodynamic model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 4665–4672. doi: 10.1128/AAC.48.12.4665-4672.2004
- LaPlante, K. L., and Woodmansee, S. (2009). Activities of daptomycin and vancomycin alone and in combination with rifampin and gentamicin against biofilm-forming methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in an experimental model of endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 3880–3886. doi: 10.1128/AAC.00134-09
- Lebeaux, D., Ghigo, J.-M., and Beloin, C. (2014). Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78, 510–543. doi: 10.1128/MMBR.00013-14
- Lebeaux, D., Leflon-Guibout, V., Ghigo, J.-M., and Beloin, C. (2015). In vitro activity of gentamicin, vancomycin or amikacin combined with EDTA or L-arginine as lock therapy against a wide spectrum of biofilm-forming clinical strains isolated from catheter-related infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 1704–1712. doi: 10.1093/jac/dkv044
- Lenhard, J. R., Brown, T., Rybak, M. J., Meaney, C. J., Norgard, N. B., Bulman, Z. P., et al. (2016). Sequential evolution of vancomycin-intermediate resistance alters virulence in *Staphylococcus aureus*: pharmacokinetic/pharmacodynamic targets for vancomycin exposure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 1584–1591. doi: 10.1128/AAC.02657-15
- Lewis, K. (2008). Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 322, 107–131. doi: 10.1007/978-3-540-75418-3_6
- Liu, P., Müller, M., and Derendorf, H. (2002). Rational dosing of antibiotics: the use of plasma concentrations versus tissue concentrations. *Int. J. Antimicrob. Agents* 19, 285–290. doi: 10.1016/S0924-8579(02)00024-9
- Mandell, L. A., Wunderink, R. G., Anzueto, A., Bartlett, J. G., Campbell, G. D., Dean, N. C., et al. (2007). Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin. Infect. Dis.* 44(Suppl. 2), S27–S72. doi: 10.1086/511159

- Matzke, G. R., Zhanel, G. G., and Guay, D. R. P. (1986). Clinical pharmacokinetics of vancomycin. *Clin. Pharmacokinet.* 11, 257–282. doi: 10.2165/0003088-198611040-00001
- McConoughey, S. J., Howlin, R., Granger, J. F., Manring, M. M., Calhoun, J. H., Shirdif, M., et al. (2014). Biofilms in periprosthetic orthopedic infections. *Future Microbiol.* 9, 987–1007. doi: 10.2217/fmb.14.64
- Moore, R. D., Lietman, P. S., and Smith, C. R. (1987). Clinical response to aminoglycoside therapy: importance of the ratio of peak concentration to minimal inhibitory concentration. *J. Infect. Dis.* 155, 93–99. doi: 10.1093/infdis/155.1.93
- Nicasio, A. M., Bulitta, J. B., Lodise, T. P., D'Hondt, R. E., Kulawy, R., Louie, A., et al. (2012). Evaluation of once-daily vancomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a hollow-fiber infection model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 682–686. doi: 10.1128/AAC.05664-11
- Nielsen, E. I., Cars, O., and Friberg, L. E. (2011). Pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) indices of antibiotics predicted by a semimechanistic PKPD model: a step toward model-based dose optimization. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 4619–4630. doi: 10.1128/AAC.00182-11
- Patel, N., Pai, M. P., Rodvold, K. A., Lomaestro, B., Drusano, G. L., and Lodise, T. P. (2011). Vancomycin: we can't get there from here. *Clin. Infect. Dis.* 52, 969–974. doi: 10.1093/cid/cir078
- Post, V., Wahl, P., Richards, R. G., and Moriarty, T. F. (2017). Vancomycin displays time-dependent eradication of mature *Staphylococcus aureus* biofilms. *J. Orthop. Res.* 35, 381–388. doi: 10.1002/jor.23291
- R Development Core Team (2014). *A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.
- Rodloff, A., Bauer, T., Ewig, S., Kujath, P., and Müller, E. (2008). Susceptible, intermediate, and resistant—the intensity of antibiotic action. *Dtsch. Arztebl. Int.* 105, 657–662. doi: 10.3238/arztebl.2008.0657
- Rybak, M., Lomaestro, B., Rotschafer, J. C., Moellering, R., Craig, W., Billeter, M., et al. (2009). Therapeutic monitoring of vancomycin in adult patients: a consensus review of the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 66, 82–98. doi: 10.2146/ajhp080434
- Singh, R., Ray, P., Das, A., and Sharma, M. (2009). Role of persisters and small-colony variants in antibiotic resistance of planktonic and biofilm-associated *Staphylococcus aureus*: an in vitro study. *J. Med. Microbiol.* 58, 1067–1073. doi: 10.1099/jmm.0.009720-0
- Singh, R., Sahore, S., Kaur, P., Rani, A., and Ray, P. (2016). Penetration barrier contributes to bacterial biofilm-associated resistance against only select antibiotics, and exhibits genus-, strain- and antibiotic-specific differences. *Pathog. Dis.* 74:ftw056. doi: 10.1093/femspd/ftw056
- Song, K.-H., Kim, H. B., Kim, H., Lee, M. J., Jung, Y., Kim, G., et al. (2015). Impact of area under the concentration-time curve to minimum inhibitory concentration ratio on vancomycin treatment outcomes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Int. J. Antimicrob. Agents* 46, 689–695. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2015.09.010
- Srinivasan, A., Dick, J. D., and Perl, T. M. (2002). Vancomycin resistance in *Staphylococci*. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 430–438. doi: 10.1128/CMR.15.3.430-438.2002
- Toutain, P.-L., Bousquet-Mélou, A., and Martinez, M. (2007). AUC/MIC: a PK/PD index for antibiotics with a time dimension or simply a dimensionless scoring factor? *J. Antimicrob. Chemother.* 60, 1185–1188. doi: 10.1093/jac/dkm360
- Toutain, P. L., del Castillo, J. R. E., and Bousquet-Mélou, A. (2002). The pharmacokinetic-pharmacodynamic approach to a rational dosage regimen for antibiotics. *Res. Vet. Sci.* 73, 105–114. doi: 10.1016/S0034-5288(02)00039-5
- Toutain, P.-L., Ferran, A., and Bousquet-Mélou, A. (2010). "Species differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics," in *Comparative and Veterinary Pharmacology*, eds F. Cunningham, J. Elliott, and P. Lees (Berlin: Springer), 19–48. doi: 10.1007/978-3-642-10324-7_2
- Waite, M. F., Kuhn, T. C., and Brown, D. L. (2015). The pharmacokinetic/pharmacodynamic rationale for administering vancomycin via continuous infusion. *J. Clin. Pharm. Ther.* 40, 259–265. doi: 10.1111/jcpt.12270
- Watanakunakorn, C., and Glotzbecker, C. (1974). Enhancement of the effects of anti-staphylococcal antibiotics by aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 6, 802–806. doi: 10.1128/AAC.6.6.802
- Wu, H., Moser, C., Wang, H.-Z., Hoiby, N., and Song, Z.-J. (2015). Strategies for combating bacterial biofilm infections. *Int. J. Oral Sci.* 7, 1–7. doi: 10.1038/ijos.2014.65
- Yanagisawa, C., Hanaki, H., Matsui, H., Ikeda, S., Nakae, T., and Sunakawa, K. (2009). Rapid depletion of free vancomycin in medium in the presence of β -lactam antibiotics and growth restoration in *Staphylococcus aureus* strains with β -lactam-induced vancomycin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 63–68. doi: 10.1128/AAC.00762-08
- Yuan, W., Hu, Q., Cheng, H., Shang, W., Liu, N., Hua, Z., et al. (2013). Cell wall thickening is associated with adaptive resistance to amikacin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 1089–1096. doi: 10.1093/jac/dks522
- Zelenitsky, S., Harding, G., Sun, S., Ubhi, K., and Ariano, R. (2003). Treatment and outcome of *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia: an antibiotic pharmacodynamic analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 668–674. doi: 10.1093/jac/dkg403

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 © 2018 Broussou, Lacroix, Toutain, Woehrlé, El Garch, Bousquet-Melou and Ferran. 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) and the copyright owner 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.

2.3 Optimisation du modèle et application à la médecine vétérinaire : développement d'un modèle adapté à l'étude des mammites bactériennes

2.3.1 Problématique

La mammite est une inflammation de la mamelle affectant au moins un des quartiers. C'est une affection caractérisée par la présence des symptômes fonctionnels (modifications macroscopiques de la quantité et de la qualité de la composition du lait), par des signes d'une inflammation locale (quartier douloureux, pis dur et gonflé) et par des signes cliniques généraux (hyperthermie, anorexie). En pratique, on parle de mammite clinique dès que la composition du lait est modifiée [143].

Les mammites bactériennes de la vache laitière sont responsables de coûts induits non négligeables pour l'éleveur (coût pécuniaire et chronophage du traitement, perte directe de lait). On distingue les mammites aiguës, d'apparition soudaine, des mammites chroniques.

Parmi les agents pathogènes responsables de mammites on retrouve *S. aureus*, *Streptococcus uberis* et *E. coli* [143]. Les mammites à *E. coli* peuvent être traitées avec de la marbofloxacin, qui est une fluoroquinolone. La posologie classique est une administration intramusculaire unique à la dose de 10 mg/kg PV. Comme vu dans la partie 1.6, l'utilisation de marbofloxacin en France est possible mais réglementée, et son usage doit être optimisé pour limiter l'apparition de résistances. Cette optimisation passe par une utilisation d'une la dose efficace la plus faible possible. Pour cela, des essais *in vitro* peuvent être envisagés pour tester différentes doses.

Les modèles *in vitro* dynamiques permettent de se rapprocher un peu plus des conditions rencontrées *in vivo* que les modèles classiques statiques disponibles en routine. Ces modèles miment l'élimination des traitements par l'organisme au cours du temps en reproduisant les variations de concentrations au cours du temps. Cependant, ces modèles utilisent le plus souvent des milieux de culture standardisés comme du BMH. Buyck *et al* ont récemment mis en évidence des valeurs de CMI différentes selon le milieu de culture utilisé [144]. Une amélioration des systèmes *in vitro* dynamiques serait d'utiliser un milieu de culture de composition plus proche du milieu dans lequel l'antibiotique diffusera *in vivo*.

En médecine vétérinaire, il est parfois plus aisé d'utiliser des animaux comme modèle d'étude, car l'exploitation des résultats est directe. Cependant, dans un contexte de protection des animaux de laboratoire, la règle des 3R (Reduce, Replace, Refine) incite les chercheurs à remettre en question leur méthodes de travail et à essayer de développer de nouvelles techniques tout en ayant une bonne valeur prédictive de l'efficacité des traitements. Le modèle HF s'inscrit pleinement dans la démarche des 3R. Améliorer (Refine) le modèle pour se rapprocher encore plus de l'*in vivo* permettrait de remplacer (Replace) un grand nombre d'animaux en limitant leur utilisation (Reduce).

Le laboratoire Vétoquinol® souhaite d'abord vérifier qu'il est possible d'utiliser un modèle *in vitro* dynamique pour mimer les fluctuations de concentrations de marbofloxacin dans le lait après une administration intramusculaire unique à la dose de 10 mg/kg PV et donc évaluer *in vitro* l'efficacité du traitement plus aisément et de façon plus fiable qu'avec un système statique.

Puis, dans un souci d'utilisation raisonnée des antibiotiques, Vétoquinol® souhaite évaluer la possibilité de diminuer la dose de marbofloxacin administrée tout conservant la même efficacité clinique. Pour cela, il est nécessaire de modéliser différentes doses décroissantes d'antibiotiques et comparer la capacité de chacune des doses à éradiquer l'inoculum bactérien pour en déduire des index PK/PD pouvant prédire les doses d'antibiotiques nécessaires pour être efficaces.

2.3.2 Objectifs

L'objectif de cette étude est de valider l'utilisation du HF comme modèle d'étude pour les mammites bactériennes de la vache laitière et de l'utiliser pour déterminer la dose d'antibiotique efficace. Nous avons donc :

- Exploré la capacité du système à fonctionner avec du lait comme milieu de culture,
- Exploré la capacité du système à reproduire les concentrations en antibiotiques obtenues dans le lait pendant 48 heures après une administration unique d'antibiotique par voie intramusculaire,
- Utilisé ce modèle pour valider *in vitro* le choix de la dose d'antibiotique à administrer pour assurer une efficacité clinique sans rechute plusieurs jours après l'administration unique d'antibiotique.

2.3.3 Matériel et méthodes

2.3.3.1 *Bactérie et antibiotique*

La bactérie *E. coli* XX-36838 provenant d'un isolat clinique d'une mammite de vache laitière a été utilisée pour toutes les études. L'antibiotique utilisé a été la marbofloxacin.

La souche bactérienne et l'antibiotique ont été fournis par Vétoquinol®. La CMI de la souche, annoncée par Vétoquinol® était de 0,03µg/mL. Cette CMI a été vérifiée dans les locaux de l'ENVT par la méthode décrite dans le paragraphe 1.3.1.1. Pour l'antibiotique, des solutions ont été préparées dans de l'eau stérile et stockées au congélateur à -20°C pendant moins d'un mois avant utilisation.

2.3.3.2 *Préparation de l'inoculum bactérien*

Les fractions aliquotes de bactéries étaient stockées à -80°C dans du Bouillon Müller-Hinton (BMH) supplémenté avec 15% de glycérol. La veille de chaque essai, 10µL de cette suspension étaient étalés sur gélose MH et mis à incuber à 37°C pour la nuit.

Le lendemain, 5 colonies bien isolées étaient récupérées et inoculées dans 20mL de lait de vache UHT demi-écrémé préalablement chauffé puis l'ensemble était mis à incuber 18 à 24h dans une étuve à 37°C.

Des dilutions dans du lait UHT ont été réalisées après incubation afin d'obtenir un inoculum voisin de 10⁶ UFC/mL dans un volume d'au moins 30 mL. Vingt millilitres de cette solution ont ensuite été inoculés le matin de chaque essai dans l'espace extra-capillaire d'un Hollow Fiber.

2.3.3.3 *Hollow Fiber et bactéricidie dynamique*

2.3.3.3.1 Préparation du système

Le Hollow Fiber a été conditionné pendant deux fois 24 heures avec du PBS, puis deux fois avec du lait UHT demi-écrémé, le tout placé à l'étuve à 37°C. Le lait UHT demi-écrémé non utilisé pour la préparation du système n'a pas été conservé plus d'une semaine à 2-8°C.

2.3.3.3.2 Pharmacocinétique et choix des paramètres

2.3.3.3.2.1 Débit d'élimination

Nous disposons des concentrations obtenues dans le lait après administration intramusculaire unique de marbofloxacin à 10mg/kg à 10 vaches laitières. La courbe moyenne des concentrations totales dans le lait au cours du temps est représentée sur la Figure 23.

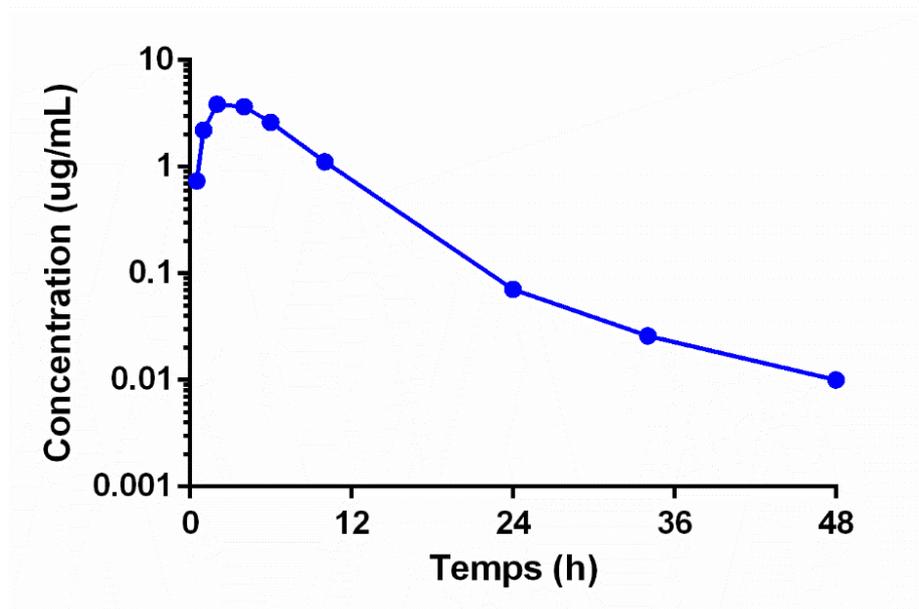


Figure 23 : concentration moyennes dans le lait après une administration unique de marbofloxacin à 10mg/kg à 10 vaches laitières

Cette cinétique peut être décomposée en plusieurs phases :

- 0-2h : croissance jusqu'au C_{max}

Cette augmentation des concentrations sur les deux premières heures est mimée par une injection par perfusion continue d'antibiotique, sur deux heures, *via* un pousse-seringue.

- 2-4h : plateau

Pour mimer cette phase, le pousse seringue est arrêté pendant 2 heures. Seule la DuetPump® fait circuler le lait dans tout le système.

- 4-24h : première phase de décroissance.

Le débit des pompes est calculé selon la méthode décrite dans le paragraphe 1.3.1.4.3. pour un volume total de 265mL, on a $Cl/V = 0.197 \text{ h}^{-1}$ soit un débit de pompes à 52.2 mL/h pendant 20 heures.

- 24-48h : deuxième phase de décroissance, plus lente.

Le débit des pompes est calculé selon la méthode décrite dans le paragraphe 1.3.1.4.3. pour un volume total de 265mL, on a $Cl/V = 0.081 \text{ h}^{-1}$ soit un débit de pompes à 21.5 mL/h pendant 24 heures.

La liaison aux protéines plasmatiques de la marbofloxacin étant faible, il a été décidé arbitrairement de reproduire les concentrations totales dosées dans le système HF.

2.3.3.3.2.2 Choix des doses

La dose initiale est de 10 mg/kg de poids vif. Pour tester différentes posologies, nous avons voulu reproduire les profils de concentrations correspondant aux doses de 2, 4, 6 et 8 mg/kg PV. La cinétique de la marbofloxacin étant linéaire (donnée non montrée), le calcul des doses plus faible s'est fait par simple calcul de proportionnalité, en conservant la même vitesse d'élimination.

Les concentrations théoriques (en $\mu\text{g/mL}$) à simuler dans le HF sont présentées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Concentrations de marbofloxacin obtenues dans le lait (en $\mu\text{g/mL}$) après une administration unique intramusculaire à 10mg/kg et concentrations théoriques pour les autres doses à reproduire dans le modèle dynamique

Temps (h)	10mg/kg	8mg/kg	6mg/kg	4mg/kg	2mg/kg
0	0	0	0	0	0
0.5	0.74	0.59	0.44	0.30	0.15
1	2.22	1.77	1.33	0.89	0.44
2	3.88	3.11	2.33	1.55	0.78
4	3.67	2.93	2.20	1.47	0.73
10	1.11	0.89	0.67	0.44	0.22
24	0.07	0.06	0.04	0.03	0.01

La quantité à injecter dans le HF a été calculée à partir du C_{max} théorique. Par exemple, pour 10 mg/kg, le C_{max} est de 3.88 µg/mL. Le volume du HF est de 265 mL. Nous avons donc ajouté 3.88 x 265 soit 1028 µg de marbofloxacin dans 20 mL de lait qui ont été injectés via un pousse-seringue au débit de 10 mL/h en 2 heures.

2.3.3.4 Dosage

Des prélèvements ont été effectués dans l'espace extra-capillaire avant ajout d'antibiotique puis 2, 4, 10, 24, 34 et 48 heures après le début de l'administration d'antibiotique pour dosage ultérieur de la marbofloxacin dans le système.

Chaque prélèvement a été identifié et congelé à -80°C avant d'être transmis au Laboratoire Bioanalyse et Pharmacocinétique de Vétoquinol® pour dosage suivant la méthode HPLC-Fluorimétrie. Chaque prélèvement a été traité après décongélation par un ajout de chloroforme, à raison de 15% minimum de chloroforme par prélèvement de 1mL. Ces manipulations ont été réalisées au Laboratoire de Microbiologie DEV de Vétoquinol®.

Les dosages obtenus permettent de calculer les AUC sur 24 heures, via la méthode des trapèzes linéaire. En calculant la déviation en % entre l'AUC attendue et celle obtenue, on peut vérifier si le modèle HF est un modèle convenable pour reproduire la cinétique de la marbofloxacin dans le lait.

La déviation entre une valeur attendue et une valeur obtenue est déterminée suivant l'équation 6.

$$\text{Déviation (\%)} = \frac{\text{Valeur attendue} - \text{Valeur Obtenue}}{\text{Valeur attendue}} * 100 \quad \text{Équation 6}$$

2.3.3.5 Analyse PK/PD

L'efficacité du traitement a été déterminée par comptage direct des bactéries dans le système au cours du temps. Des prélèvements ont été effectués dans l'espace extra-capillaires avant ajout d'antibiotique puis 2, 4, 10, 24, 34 et 48 heures après le début de l'administration d'antibiotique. Les comptages ont été effectués sans centrifugation préalable selon la méthode décrite dans le paragraphe 2.1.3.7. Ici la LOD était fixée à 33 UFC/mL. La réduction de la charge bactérienne est calculée comme la différence entre la charge bactérienne en fin de traitement et avant traitement.

Les dosages de la marbofloxacin dans le lait ont permis de calculer l'AUC₂₄ obtenue et donc des index comme l'AUC/CMI et de mettre en relation ces valeurs avec la réduction de la charge bactérienne.

2.3.4 Résultats

2.3.4.1 Concentrations d'antibiotiques simulées dans le HF

Dans un HF, l'équilibre de concentrations entre espace intra-capillaire et espace extra-capillaire n'est pas immédiat. Seule la Duet Pump® fonctionne de 2 à 4 heures après le début de l'administration d'antibiotique et permet au lait de circuler en continu dans le système. Il n'y a pas d'ajout de lait sans antibiotique pendant cette période, la concentration de marbofloxacin dans le système est la même. On estime que ces deux heures à concentration constante sont suffisantes pour que l'équilibre soit atteint entre le compartiment central et le compartiment extracellulaire et que la concentration dans l'espace extra-capillaire soit bien celle que l'on voulait obtenir. Les tableaux 4 et 5 représentent pour chaque dosage reproduit, la concentration en marbofloxacin à T4h dans l'espace extra-capillaire, théorique et obtenue, les valeurs d'AUC_{0-10h} et AUC₂₄, théoriques et obtenues, les déviations en % entre valeurs obtenues et attendues ainsi que la valeur d'AUC/CMI obtenue.

Tableau 4 : Concentrations théoriques et obtenues dans le hollow fiber à 4h pour les différentes posologies testées ainsi que les déviations (en %) entre valeur attendue et obtenue.

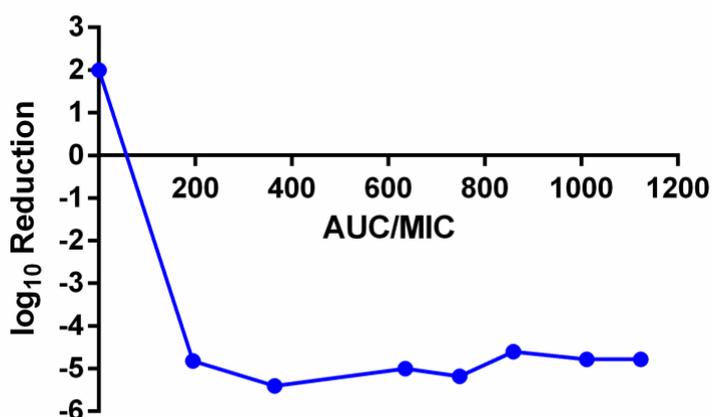
Dosage (mg/kg)	T4h attendu (µg/mL)	T4h obtenu (µg/mL)	Déviations (%)
2	0.73	0.74	0.69
4	1.47	1.18	-19.67
6	2.20	2.26	2.85
		2.51	14.32
10	3.67	3.13	-14.62
		3.60	-1.65
		3.86	5.44

Tableau 5 : AUC/CMI, AUC0-10h et AUC 0-24h attendues et obtenues dans le Hollow Fiber ainsi que les déviations (en %) entre valeur attendue et obtenue.

Dosage (mg/kg)	AUC 0-10h			AUC 0-24			AUC/CMI (h)
	attendue ($\mu\text{g.h/mL}$)	obtenue ($\mu\text{g.h/mL}$)	Déviations (%)	attendue ($\mu\text{g.h/mL}$)	obtenue ($\mu\text{g.h/mL}$)	Déviations (%)	
2	4.71	4.63	-1.76	5.50	5.85	6.36	195.00
4	9.42	8.43	-10.53	10.99	10.94	-0.50	364.67
6	14.13	14.99	6.10	16.49	19.05	15.55	635.00
		16.79	18.84		22.43	36.03	747.67
10	23.55	20.58	-12.61	27.48	25.76	-6.27	858.67
		23.55	0.01		30.32	10.33	1027.33
		23.87	1.37		33.69	22.61	1123.00

2.3.4.2 Évaluation de l'efficacité du traitement

Vingt-quatre heures après une administration unique de marbofloxacin, aucune repousse bactérienne au-dessus de la LOD n'a été observée à 24 heures, ce qui permet de considérer que les inocula bactériens ont été éradiqués. La réduction de la charge bactérienne en fonction du critère AUC/CMI est présentée sur la Figure 24.

Figure 24 : \log_{10} réduction à 24h de l'inoculum initial en fonction de l'AUC/CMI obtenue dans le modèle

D'autres essais sont actuellement en cours chez Vétoquinol®, avec d'autres souches de *E. coli* présentant des CMI différentes de celle de la souche précédemment utilisée.

2.3.5 Discussion

L'objectif de cette étude était de valider l'utilisation du système HF avec du lait pour reproduire un traitement antibiotique initié lors de mammite bactérienne et vérifier ainsi *in vitro* l'efficacité du traitement testé.

Les valeurs des dosages obtenues dans le lait sont plus que satisfaisantes. Les déviations entre les valeurs attendues et les valeurs obtenues étant relativement faibles : sauf pour un essai, la déviation pour la concentration à 4h est de moins de 20%, et parfois presque exactement la concentration attendue. Cela signifie que les pores des capillaires ne sont pas obstrués par le lait et que les molécules de marbofloxacin diffusent bien à travers les capillaires.

Pour l' AUC_{24} la déviation a pu être plus importante, bien qu'en général inférieure à 30%, mais cela peut être expliqué par le calcul en lui-même et par l'erreur analytique. L' AUC calculée entre 10h et 24h compte pour une grande part de l' AUC totale. A 24h, la concentration théorique obtenue est très faible (0,07 μ g/mL pour la valeur la plus élevée) et une légère erreur analytique ou difficulté de dosage peut vite avoir de lourdes conséquences. L'erreur analytique est en général estimée à plus ou moins 15%, mais sur de si faibles valeurs, on peut vite obtenir le double ou le triple de la valeur attendue, et ainsi largement surestimer une AUC . Ceci est en accord avec les résultats obtenus et présentés dans le tableau 5 où avec une déviation de 1.37% de l' AUC_{0-10h} on obtient finalement une déviation de 22.61% de l' AUC_{24} .

Cependant, vu les valeurs d' AUC_{24} obtenues, qui correspondent parfois presque exactement aux valeurs attendues, comme pour l'exemple à 4 mg/kg, et les valeurs satisfaisantes de concentrations à T4h, le système HF est largement adapté à l'utilisation avec du lait pour tester *in vitro* l'efficacité d'un antibiotique.

Les concentrations dosées dans le lait qui nous ont servi à modéliser une administration unique de marbofloxacin sont les concentrations totales dans le lait lors de l'administration d'une dose intramusculaire unique de marbofloxacin. Lorsque l'on travaille en HF, on doit adapter les concentrations selon la fraction libre dans le milieu utilisé. Les quinolones sont assez peu liées aux protéines plasmatiques dans le sang. La liaison est estimée entre 20 et 25% [145–147] mais il n'y a pas de données sur la fraction libre dans le lait. Nous n'avons donc pas corrigé les concentrations par un éventuel binding et avons cherché à reproduire les concentrations de marbofloxacin totales dans le lait, telles que dosées après une administration intramusculaire unique à une vache laitière. La proportion de protéines dans le lait entier et demi-écrémé est sensiblement la même (environ 3,3g de protéines pour 100g de lait). Nous avons donc délibérément choisi de travailler avec du lait demi-écrémé qui est

plus fluide que le lait entier car il contient moins de matières grasses et est donc moins susceptible d'obstruer les pores des capillaires.

La question est éventuellement de savoir si la composition d'un lait « mammiteux » est différente de celle d'un lait « sain » et si cette différence a une influence sur la liaison de la marbofloxacin aux protéines du lait.

La composition du lait lors de mammite est relativement controversée. Dans leur rapport, Waes et Van Belleghem rapportent que certains auteurs trouvent une corrélation positive entre le taux de protéines totales dans le lait et le degré d'inflammation du pis, d'autres au contraire estiment que la teneur en protéines totales dans le lait resterait à peu près égale. Enfin, ils rapportent que certains auteurs ont remarqué que la teneur en protéines totales pouvait diminuer avec l'inflammation [148]. En ce qui concerne les protéines, il serait logique de retrouver plus de protéines spécifiques de l'inflammation dans le lait lors de mammite clinique. L'albumine est une protéine de petit poids moléculaire qui devrait facilement passer du sang au lait lors d'inflammation, mais il aurait été trop compliqué de compenser cette éventuelle liaison, et nous avons souhaité avant tout tester le modèle en reproduisant les concentrations obtenues de façon la plus exacte possible. Il serait éventuellement intéressant d'avoir des cinétiques de marbofloxacin dans le lait sur des vaches en mammite.

Concernant l'efficacité du traitement, la réduction de la charge bactérienne en fonction du ratio AUC/CMI montre que la réduction est efficace à partir de valeurs du rapport d'AUC/CMI inférieures à celles retrouvées pour une administration à 10mg/kg.

Le ratio AUC/CMI fait appel à deux valeurs calculées dans deux milieux différents. L'AUC a été calculée à partir des concentrations dans le lait. Il n'est pas possible de calculer une CMI dans le lait étant donné que la lecture de CMI est basée sur la turbidité du milieu et le lait est opaque. Cependant, nous avons vérifié avant l'étude (données non présentées) que l'activité de la marbofloxacin était la même dans le lait ou dans le MH, en déposant des gouttes de marbofloxacin dans du MH ou dans du lait sur des géloses contenant des bactéries. Les diamètres d'inhibition autour de la zone de dépôt des gouttes étaient sensiblement les mêmes, écartant une chélation de la marbofloxacin suffisamment importante pour inhiber son efficacité dans le lait. L'utilisation de ce rapport AUC/CMI semble donc tout de même utilisable pour évaluer l'efficacité de la marbofloxacin sur *E. coli*.

Le modèle HF semble donc être un modèle approprié pour reproduire des cinétiques d'antibiotiques dans le lait. Cependant, le modèle pourrait encore être amélioré pour se rapprocher encore plus des situations cliniques.

Le premier marqueur d'une mammite clinique est souvent le dénombrement de « cellules » dans le lait. Ces cellules sont des leucocytes, marqueurs de l'inflammation et de l'infection. En

cas de mammite clinique, en plus d'administrer un traitement antibiotique à sa vache, l'éleveur traite le lait pour vidanger le lait infecté de la mamelle et donc pour évacuer mécaniquement le plus de bactéries possibles.

Il semble donc pertinent de réfléchir à l'ajout de composant du système immunitaire dans le modèle, et/ou de mimer la vidange de la mamelle.

2.4 Optimisation du modèle, vers l'ajout de composants du système immunitaire : toxicité des antibiotiques et phagocytose des bactéries, une étude préliminaire.

2.4.1 Problématique

Peu d'études s'intéressent aux conséquences sur la bactéricidie des interactions entre les antibiotiques et les cellules de l'immunité. Si des modèles mathématiques commencent à prendre en compte simplement la composante immunitaire [149], la contribution des effecteurs du système immunitaire est trop souvent négligée dans les études *in vitro*, que ce soit pour évaluer la collaboration entre antibiotique et système immunitaire dans le traitement des infections bactériennes ou la prévention de l'émergence de résistances au cours d'un traitement [150]. Il est pourtant établi que l'immunité joue un rôle clef dans la défense contre les infections bactériennes et que la phagocytose représente une des premières étapes du contrôle d'une infection bactérienne par la réponse immunitaire innée. L'étude de la phagocytose et de la survie des bactéries dans des macrophages apporte par exemple beaucoup d'informations sur la récurrence des infections dues aux bactéries [151], et étudier cette survie intracellulaire après confrontation à un traitement antibiotique pourrait permettre de mieux évaluer son efficacité.

Dans le but d'optimiser l'évaluation préclinique de molécules antibactériennes, une étude réalisée précédemment dans notre laboratoire a développé un modèle *in vitro* statique associant les éléments de l'immunité innée, les macrophages, aux modèles classiques d'évaluation des interactions bactéries/antibiotiques [152]. Parallèlement, nous avons montré dans les parties 2.1 et 2.2 que les modèles *in vitro* dynamiques apportent plus d'informations que les modèles statiques pour évaluer l'efficacité d'un traitement sur une infection due à une forte charge bactérienne ou à un biofilm. Pour prendre en compte le rôle des cellules immunitaires et faire progresser les systèmes *in vitro* il faudrait maintenant proposer un système dynamique capable de faire varier au cours du temps à la fois les concentrations d'antibiotiques (mimant la pharmacocinétique *in vivo*) ainsi que le nombre et la nature des cellules en contact avec les bactéries, de façon à reproduire le recrutement cellulaire observé *in vivo* lors d'infection bactérienne, avec d'abord les cellules résidentes comme les phagocytes, qui jouent un rôle dans la réponse innée puis dans un second temps les cellules liées à la réponse adaptative, comme les lymphocytes.

L'élaboration d'un tel modèle demande du temps et des ajustements. Dans le cadre de cette thèse nous avons préféré d'abord maîtriser le modèle *in vitro* dynamique avec une combinaison d'antibiotiques et lors d'une infection liée à un biofilm avant de développer l'ajout de composants du système immunitaire. Avec le temps restant, nous avons essayé de reproduire la phagocytose des bactéries par une lignée cellulaire bien décrite dans la littérature, les THP-1.

2.4.2 Objectifs

Pour cette étude nous nous sommes placés dans un contexte d'infection du tractus urinaire traitée avec de la marbofloxacin chez un animal. Le système HF étant initialement un système utilisé pour la culture cellulaire à haute densité, il nous a paru intéressant d'essayer d'y ajouter des composants du système immunitaire. Cependant, avant de combiner simultanément les trois acteurs bactéries-antibiotiques-système immunitaire dans le HF, il nous a semblé judicieux d'étudier d'abord les interactions bipartites. Nous disposions déjà de données sur le diptyque bactéries-antibiotiques dans le HF, comme nous l'avons montré dans les parties 2.1 et 2.2.

Afin d'évaluer l'impact des cellules de l'immunité innée sur l'efficacité des antibiotiques dans un système *in vitro* dynamique, nous avons au préalable vérifié la toxicité potentielle des antibiotiques sur les macrophages en s'intéressant à leur survie, puis avons étudié leurs activités de phagocytose et de bactéricidie.

Les macrophages ont été exposés à des concentrations croissantes d'antibiotique pendant 12 heures et comptés pour appréhender une éventuelle cytotoxicité de la marbofloxacin, puis, dans une seconde étude, différentes tailles d'inoculum d'*Escherichia coli* et de *S. aureus* ont été confrontées à des macrophages pendant 4 heures pour évaluer leurs capacités de phagocytose. Le nombre de bactéries vivantes dans le surnageant a été suivi au cours du temps afin d'évaluer la croissance bactérienne en présence ou non de macrophages.

2.4.3 Matériel et méthodes

2.4.3.1 Souches bactériennes

Les souches *E. coli* ATCC 700938 (souche uro-pathogène ou UroPathogenic *Escherichia coli* ou UPEC) et *S. aureus* Hg 001 ont été utilisées.

Nous avons choisi ces deux bactéries car elles sont responsables d'infections chroniques et peuvent vivre sous forme intracellulaire [153]. De plus, dans une vessie, les macrophages résidents correspondent à la population majoritaire de cellules du système immunitaire [154].

2.4.3.2 Les macrophages

2.4.3.2.1 La lignée cellulaire de monocytes

La lignée cellulaire THP-1 (ATCC® TIB-202) a été choisie pour cette étude. Cette lignée de monocytes a pour origine une leucémie aiguë chez l'humain. Une fiole conservée dans de l'azote liquide a été décongelée suivant les recommandations du fournisseur.

Ces cellules ont été cultivées stérilement en milieu RPMIc dans un incubateur à 37°C, en atmosphère humide 95% d'air et 5% de CO₂. Le RPMIc est du RPMI 1640 Glutamax Hepes supplémenté de 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF) préalablement inactivé 30 minutes au bain-marie à 56°C.

Les passages pour renouveler le milieu ont été réalisés tous les deux à trois jours, de façon à maintenir une concentration en monocytes de 2×10^5 cellules/mL. Les monocytes ont été cultivés en flasque en suspension non agitée avant d'être différenciés en macrophages.

2.4.3.2.2 Différenciation des monocytes en macrophages

La différenciation des monocytes en macrophages a été initiée sur des monocytes entre le 5^{ème} et le 10^{ème} passage par ajout de Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) dans le milieu de culture selon le protocole décrit par Lund *et al* [155] qui permet une différenciation en macrophages pro-inflammatoires optimale et standardisée :

Entre le 5^{ème} et le 10^{ème} passage, les monocytes ont été remis en suspension à une concentration de 2×10^5 à 4×10^5 cellules/mL dans une solution de RPMIc supplémentée en PMA à 25nM (i.e. 15ng/mL) puis incubés à 37°C, en atmosphère humide 95% d'air et 5% de CO₂ en plaques 6 puits pendant 48 heures, temps suffisant pour initier la différenciation en macrophages pro-inflammatoires et l'adhérence des THP-1. Le surnageant contenant la PMA a ensuite été éliminé puis le milieu a été renouvelé avec du RPMIc avant de laisser à reposer pendant 24 heures. Cette phase de repos sans PMA est nécessaire pour éviter la surexpression

de certains de gènes qui auraient été trop stimulés lors de la différenciation [156]. Les macrophages ainsi différenciés étaient prêts à être utilisés.

2.4.3.2.3 Récupération et comptage des macrophages

Le comptage a requis une phase de décollement des macrophages adhérents au fond des plaques pour les remettre en suspension.

2.4.3.2.3.1 Décollement des macrophages

Cette étape a été réalisée en remplaçant le surnageant de culture par une solution de PBS (Ca⁺/Mg⁺) complétement avec 5mM d'ETDA. La plaque 6 puits a été placée sur de la glace pendant 10 minutes. Plusieurs cycles aspiration/refoulement du tampon ont été effectués afin de remettre en suspension les macrophages décollés. Un dernier rinçage de chaque puits a été réalisé avec du PBS.

2.4.3.2.3.2 Comptage à la lame Thoma

La suspension ainsi obtenue a été récoltée dans un tube en verre et centrifugé à 300g pendant 10 minutes afin de laver les cellules du tampon de décollement. Le surnageant a ainsi été éliminé et le culot remis en suspension dans du PBS. Un aliquot de 10µL de la suspension a ensuite été ajouté à 10 µL de bleu trypan. Après homogénéisation, 10 µL de cette solution ont été transférés sur une lame Thoma pour comptage des cellules viables et les cellules ont été comptées au microscope à un grossissement 20X.

2.4.3.3 *Évaluation de la toxicité de la marbofloxacin sur les macrophages*

2.4.3.3.1 Co-incubation antibiotique et macrophages

L'antibiotique choisi a été la marbofloxacin. La marbofloxacin est une fluoroquinolone connue pour s'accumuler dans les macrophages alvéolaires chez le chien [157]. Cet

antibiotique a été fourni par Vétoquinol® sous forme de poudre, reconstituée dans de l'eau stérile et les aliquots de solutions ont été stockés au congélateur à -20°C.

Lors des essais, chaque puits a été rempli de 3 mL d'une suspension de monocytes THP-1 à une densité de 4×10^5 cellules/mL soit un nombre total potentiel de 1.2×10^6 cellules par puits. Une différenciation a été initiée selon la méthode décrite dans le paragraphe 2.4.3.2.2. Après élimination de la PMA et lors du renouvellement de milieu avec du RPMIc, de la marbofloxacin a été ajoutée à des concentrations de 0 (contrôle), 1, 10, 100 ou 500 µg/mL, les deux derniers puits de chaque plaque ont servi de contrôle. La plaque 6 puits a ainsi été incubée pour la nuit à 37°, en atmosphère humide 95% d'air et 5% de CO₂. Chaque essai a été réalisé en triplicate.

2.4.3.3.2 Évaluation de la toxicité de la marbofloxacin par comptage et cytométrie de flux

Après 24h de co-incubation avec de la marbofloxacin, les macrophages ont été récupérés. Une partie a été utilisée pour effectuer un comptage selon la méthode décrite dans le paragraphes 2.4.3.2.3.1, l'autre a été récupérée pour comptage et comparaison des profils taille-granulosité au cytomètre de flux (MACSQuant Analyzer, Miltenyi Biotec). L'analyse des profils a été réalisée au moyen du logiciel FlowJo v10. Un test de Student sur échantillons non appariés a été réalisé à l'aide du logiciel R® pour comparer la moyenne des comptages sans antibiotique avec celle des essais contenant différentes concentrations de marbofloxacin.

2.4.3.4 *Diptyque macrophages – bactéries*

2.4.3.4.1 Courbes de bactéricidie des bactéries extracellulaires à différentes MOI

Des courbes de bactéricidie dans le surnageant ont été réalisées en l'absence ou en présence de macrophages (3mL de suspension de RPMI à 2×10^5 cellules/mL) différenciés selon la méthode décrite dans le paragraphe 2.4.3.2.2.

Les concentrations des suspensions bactériennes ont été ajustées afin d'obtenir des ratios bactéries / macrophages ou « multiplicity of infection » (MOI) de 0.01 et 0.05 pour *S. aureus*

et des MOI de 0.01, 0.05 et 1 pour *E. coli* correspondant à des concentrations bactériennes de 10^4 (MOI 0.01), 5×10^4 (MOI 0.05) et 10^6 UFC/mL (MOI 1).

Après vérification que le lieu de prélèvement dans un puits (en surface ou en profondeur) n'avait pas d'influence sur le comptage bactérien (non montré ici), à chaque temps de prélèvement 80µL de surnageant a été prélevé dans chaque puits pour comptage selon la méthode décrite au paragraphe 2.2.3.1.2. Chaque expérience a été répétée indépendamment deux fois.

2.4.3.4.2 Quantification de la phagocytose des bactéries par les macrophages

Après 4h de co-incubation avec des bactéries, l'intégralité du surnageant de chaque puits a été récupéré. Chaque puits a été rincé plusieurs fois à l'aide de PBS à 37°C pour retirer le plus possible de bactéries extracellulaires.

Deux millilitres d'une solution de streptomycine à 100 mg/mL ont été déposés dans chaque puits pour tuer les bactéries non récupérées lors du rinçage, notamment celles adhérentes aux cellules. Chaque plaque a été soumise pendant 5 minutes à une agitation de 100 g à 37°C. Le surnageant a une fois de plus été récupéré et deux rinçages supplémentaires avec du RPMI à 37°C ont été réalisés. Un comptage bactérien a été réalisé comme décrit dans le paragraphe 2.1.3.7 pour s'assurer de l'élimination totale des bactéries planctoniques.

Les macrophages ont ensuite été décollés comme décrit dans le paragraphe 2.4.3.2.3.1 et centrifugés à 300g pendant 7 minutes. Le surnageant a été éliminé, le culot a été remis en suspension dans une solution de PBS-Tween 20® (0.05%, vol/vol) pour induire un éclatement des macrophages par choc osmotique. L'ensemble a été centrifugé 10 minutes à 3000 g, le surnageant contenant les débris de cellules et les bactéries mortes a été éliminé. Le culot a été remis en suspension et échantillonné pour comptage des bactéries vivantes libérées après destruction des macrophages par dilutions en séries au $10^{\text{ème}}$.

2.4.4 Résultats

2.4.4.1 Toxicité de la marbofloxacin

2.4.4.1.1 Évaluation par comptage direct

Les valeurs des comptages de macrophages viables dans chacun des puits après 24 heures d'incubation en présence ou absence de marbofloxacin sont détaillées dans le tableau 6.

Il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les comptages réalisés dans les puits contrôles sans antibiotique et ceux avec de l'antibiotique ($p > 0.6$) et il ne semble pas y avoir de différence entre les puits avec 500 $\mu\text{g/mL}$ de marbofloxacin et ceux sans antibiotique. La marbofloxacin ne semble pas induire de mortalité des macrophages, même à forte concentration.

Tableau 6 : Comptages de macrophages dans les puits en présence ou non de marbofloxacin (\log_{10} cellules/puits)

	1er essai	2ème essai	3ème essai	Moyenne \pm Ecart-type
Contrôle 1 0 $\mu\text{g/mL}$	5.60	5.63	6.03	5.75 \pm 0.24
Contrôle 2 0 $\mu\text{g/mL}$	5.73	5.88	6.08	5.90 \pm 0.18
1 $\mu\text{g/mL}$	5.53	5.98	6.34	5.95 \pm 0.41
10 $\mu\text{g/mL}$	5.56	6.03	6.30	5.97 \pm 0.37
100 $\mu\text{g/mL}$	5.56	6.00	6.06	5.87 \pm 0.27
500 $\mu\text{g/mL}$	5.66	6.00	5.92	5.86 \pm 0.18

Il est à noter que le comptage de macrophages viables ne permet pas de mettre en évidence une éventuelle modification de la morphologie des cellules lors de co-incubation avec l'antibiotique.

2.4.4.1.2 Évaluation par FACS de la taille et granulosité des macrophages après incubation en présence ou absence de marbofloxacine

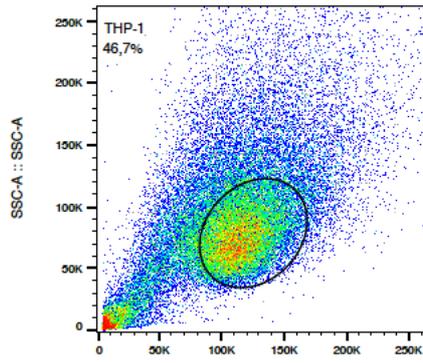
Les nuages de points après passages des cellules au FACS sont présentés sur la Figure 25. Chaque point correspond à un évènement caractérisé par une taille/surface (forward scatter ou FSC) et une granularité/complexité (side scatter ou SSC). Les cercles noirs entourent les évènements dont le profil FSC/SSC correspond à une population cellulaire intègre, excluant les débris cellulaires. Si les cellules sont mortes on observe une diminution nette de la taille/granularité et donc un profil FSC/SSC complètement différent. Ces fenêtres ont été dessinées à partir des graphiques correspondant aux échantillons contrôles (sans antibiotique) et ont été reportées sur les graphiques correspondant aux échantillons avec différentes concentrations en antibiotiques. Le nombre d'évènements totaux comptés ainsi que le nombre d'évènements dans chaque fenêtre pour chacune des conditions sont présentés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Événements totaux et dans la fenêtre de taille – granulométrie correspondant à des macrophages vivants lors de passage au FACS après incubation pendant 24h ou non avec de la marbofloxacine et récupération des macrophages adhérents

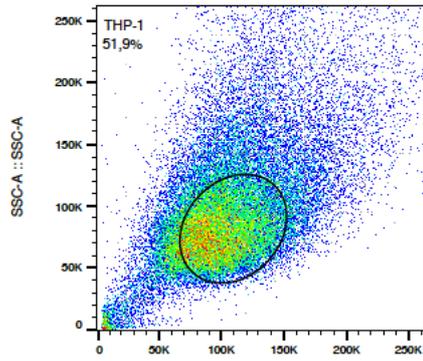
Événements /Concentration marbofloxacine	Plaque 1			Plaque 2			Moyenne
	Fenêtre	Total	%	Fenêtre	Total	%	%
1 µg/mL	18765	40201	46.7	20538	39564	51.9	49.3
10 µg/mL	15229	40924	37.2	19728	36056	54.7	46.0
100 µg/mL	18579	38174	48.7	19220	36371	52.8	50.8
500 µg/mL	18470	41558	44.4	19623	38172	51.4	47.9
Contrôle	26808	52386	51.2	20298	38639	52.5	51.9

Par observation directe des nuages de points et de la fréquence d'évènements dans la fenêtre pré-choisie, l'ajout de marbofloxacine ne semble pas entraîner de modification particulière de la taille et/ou la granulométrie des macrophages.

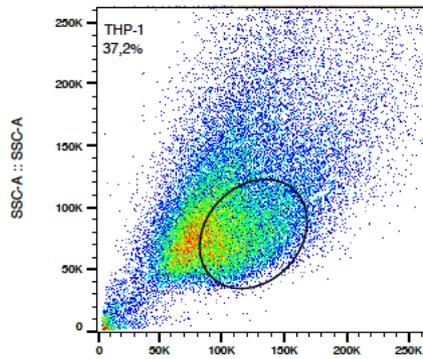
Même si on peut observer un petit décalage des nuages de points par rapport à la fenêtre, surtout aux petites concentrations en ATB, si on compare les fréquences d'évènements dans la fenêtre, l'ajout de marbofloxacine ne semble pas entraîner de modification importante de la taille et/ou la granularité des macrophages. Même si nous ne pouvons pas conclure à une différence non significative à cause du faible nombre d'échantillons (n=2), ces résultats sont cohérents avec les comptages au bleu trypan.



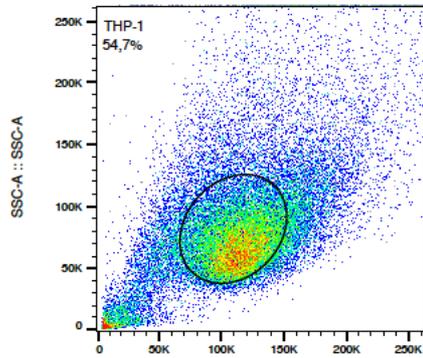
FSC-A :: FSC-A
1 ug_ml pl 1 THP-1+PMA _ ATB
Ungated
Contour Plot* of FSC-A(null) vs. SSC-A(null)
40201
1 ug_ml pl 1 THP-1+PMA _ ATB



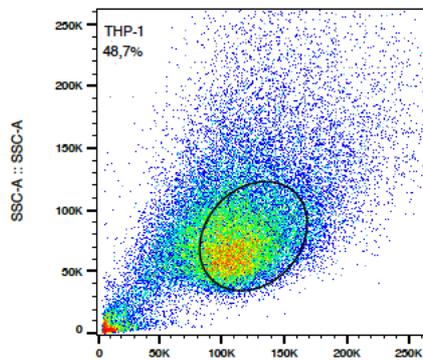
FSC-A :: FSC-A
1 ug_ml pl 2 THP-1+PMA _ ATB
Ungated
Contour Plot* of FSC-A(null) vs. SSC-A(null)
39564
1 ug_ml pl 2 THP-1+PMA _ ATB



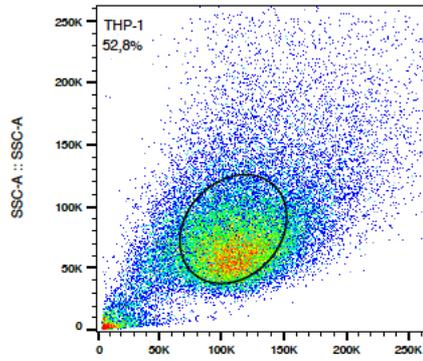
FSC-A :: FSC-A
10 ug_ml pl 1 THP-1+PMA _ ATB
Ungated
Contour Plot* of FSC-A(null) vs. SSC-A(null)
40924
10 ug_ml pl 1 THP-1+PMA _ ATB



FSC-A :: FSC-A
10 ug_ml pl 2 THP-1+PMA _ ATB
Ungated
Contour Plot* of FSC-A(null) vs. SSC-A(null)
36056
10 ug_ml pl 2 THP-1+PMA _ ATB



FSC-A :: FSC-A
100 ug_ml pl 1 THP-1+PMA _ ATB
Ungated
Contour Plot* of FSC-A(null) vs. SSC-A(null)
38174
100 ug_ml pl 1 THP-1+PMA _ ATB



FSC-A :: FSC-A
100 ug_ml pl 2 THP-1+PMA _ ATB
Ungated
Contour Plot* of FSC-A(null) vs. SSC-A(null)
36371
100 ug_ml pl 2 THP-1+PMA _ ATB

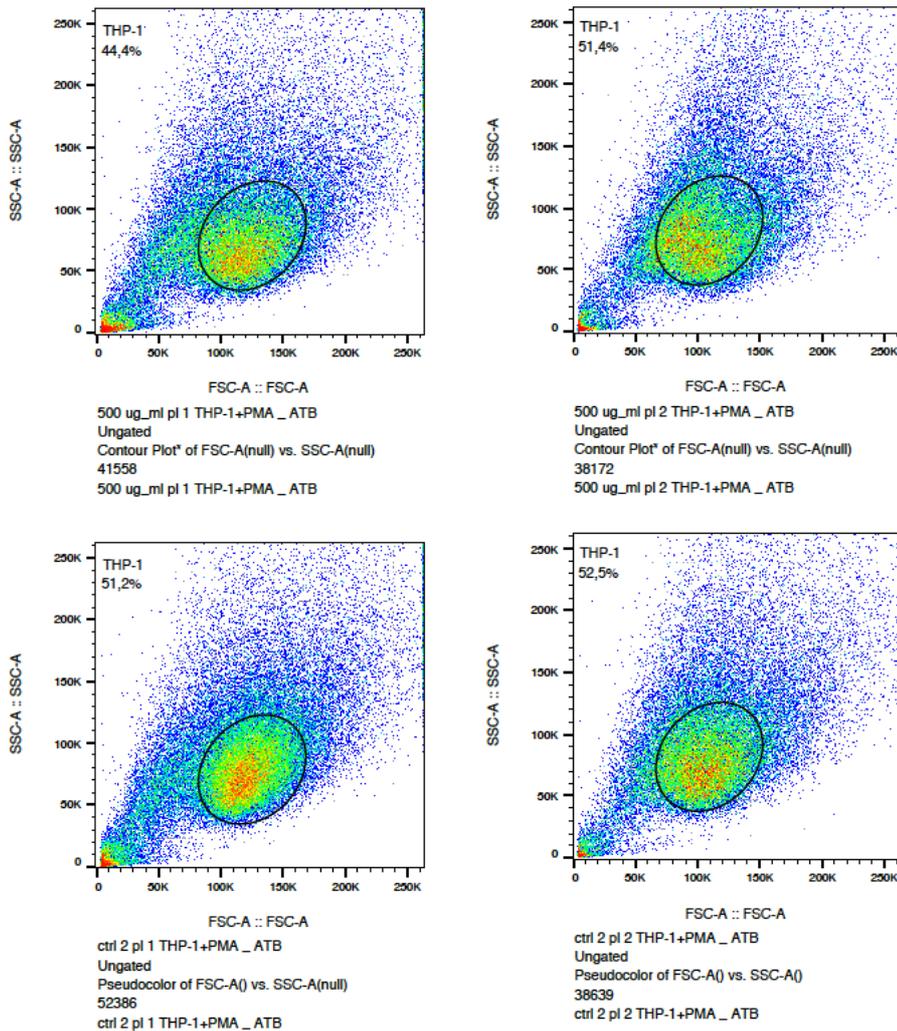


Figure 25 : Profils taille-granulométrie au FACS après incubation des macrophages avec de la marbofloxaciné à différentes concentrations (0, 1, 10, 100 ou 500 ug/mL) ou non (contrôle) pendant 12 heures pour les deux plaques

2.4.4.2 Une action limitée des macrophages sur la prévention de la croissance bactérienne extracellulaire et une faible internalisation de bactéries

Nous avons voulu déterminer si les macrophages exposés à différentes tailles d'inoculum bactérien étaient capables de contrôler la croissance bactérienne dans le milieu de culture. Pour cela nous avons exposé les inocula à des macrophages pendant 4 heures, avons suivi la concentration de bactéries planctoniques puis avons essayé de quantifier le nombre de bactéries internalisées encore vivantes dans les macrophages après 4 heures d'incubation pour *E. coli* et *S. aureus*.

Les concentrations de bactéries planctoniques avec des macrophages (M+) et lors des expériences contrôles sans macrophages (M-) ainsi que les concentrations de bactéries intra-macrophages vivantes en fin d'essai sont représentées sur la Figure 26 uniquement pour les essais où une élimination des bactéries extracellulaires par la streptomycine a été objectivée dans les puits contrôle, ce qui correspond uniquement aux essais à une MOI de 0.05 pour *S. aureus* et *E. coli*.

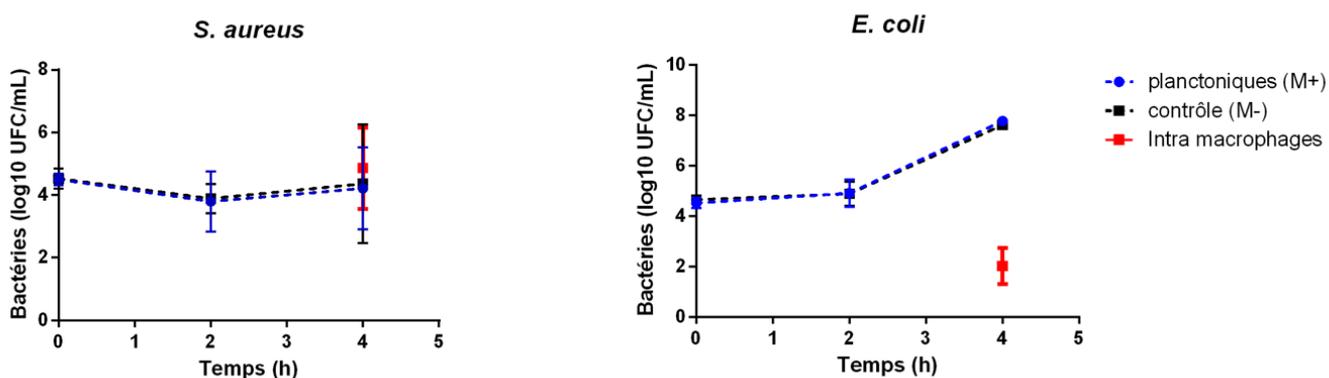


Figure 26 : Concentration bactérienne planctonique de *S. aureus* et *E. coli* en présence de macrophages à une MOI de 0.05 (M+) ou lors d'expériences contrôle sans macrophages (M-) et concentration de bactéries internalisées par les macrophages après 4 heures d'incubation (\log_{10} UFC/mL) à une MOI de 0.05 (moyenne \pm écart type, $n=2$ pour chaque condition)

La croissance des bactéries a été maintenue stable en présence de macrophages pour *S. aureus* mais pas pour *E. coli* où la charge bactérienne a augmenté de près de 3 \log_{10} en 4 heures. Aucune différence de concentration bactérienne n'a été objectivée entre les puits contenant des macrophages et ceux sans macrophages.

L'internalisation des bactéries est plus importante pour *S. aureus* que *E. coli* avec presque autant de bactéries internalisées que de planctoniques alors que la quantité de *E. coli* internalisées est très faible. Il faut cependant noter que pour *S. aureus*, avec potentiellement 6 \log_{10} cellules par puits, une internalisation de 4 \log_{10} correspond à une bactérie internalisée pour 100 macrophages.

2.4.5 Discussion

Pour augmenter la prédictibilité des modèles *in vitro* actuellement disponibles, nous souhaiterions faire progresser les modèles *in vitro* dynamiques qui reproduisent les fluctuations de concentrations d'antibiotiques au cours du temps en ajoutant des composants du système immunitaire, et plus particulièrement de l'immunité innée.

Les principaux rôles des macrophages sont de :

- Reconnaître les pathogènes,
- Proliférer pour accroître le nombre de cellules capables d'éliminer ces pathogènes,
- Produire des cytokines et chémokines pro-inflammatoires pour activer le recrutement d'effecteurs au site de l'infection puis des chémokines anti-inflammatoires lorsque l'infection est sous contrôle,
- Phagocyter les pathogènes.

Nous avons choisi de travailler ici avec une lignée de monocytes, les THP-1, car cette lignée est bien connue et est *a priori* un assez bon modèle pour étudier le rôle de l'immunité innée [156].

Nous avons d'abord voulu vérifier que les antibiotiques qui seraient testés ultérieurement n'étaient pas toxiques pour les cellules utilisées, ce qui rendrait inutile l'ajout de tels composants du système immunitaire dans des systèmes d'évaluation de l'efficacité conjointe d'antibiotiques et du système immunitaire pour lutter contre des infections bactériennes.

Pour cela nous avons co-incubé les macrophages avec des concentrations croissantes de marbofloxacin. La gamme de concentration testée était très large, de 1 à 500 µg/mL, mais correspondait à des concentrations en fluoroquinolones que l'on pourrait retrouver *in vivo*. Les concentrations plasmatiques de fluoroquinolones sont souvent inférieures à 10 µg/mL après administrations aux posologies recommandées mais peuvent être bien supérieures dans les urines. Une étude sur 6 chiens a mis en évidence des concentrations urinaires en orbifloxacin proches de 500 µg/mL après une administration unique par voie orale à la posologie recommandée de 5 mg/kg [158].

D'après nos résultats, il semble que la marbofloxacin ne soit pas cytotoxique *in vitro* sur les macrophages THP-1, même à une concentration de 500 µg/mL, ce qui est en accord avec la littérature [159]. Cependant, les études de cytométrie devraient être complétées, en ajoutant un marqueur spécifique des macrophages (CD14 par exemple) pour compter plus précisément les cellules, vérifier la différenciation (marqueurs spécifiques M1/M2), la viabilité (marquage

F4/80) et le phénotype des macrophages puisque les conditions de culture peuvent avoir un effet [160], effet qui n'aurait pas été objectivé par simple observation au microscope.

Bien que la moyenne des 3 comptages soit chaque fois inférieure au nombre théorique de cellulesensemencées, les comptages individuels avec la lame Thoma ont parfois donné des résultats qui semblent aberrants. En effet, 1.2 millions de cellules correspond à $6.08 \log_{10}$ et lors du troisième essai nous avons obtenu deux comptages avec un nombre de cellules supérieur à cette valeur seuil (Tableau 6) alors que les macrophages THP-1 une fois différenciés ne se multiplient pas. Ceci peut être dû à une erreur du manipulateur lors du comptage ayant servi de base pour préparer la suspension de monocytes à ensemercer avant différenciation, lors de l'ensemencement, et/ou une erreur lors du comptage après décollement des macrophages ou bien à une différenciation incomplète de la population, où des monocytes non différenciés auraient pu continuer de se multiplier. Cette dernière hypothèse aurait pu être confirmée ou invalidée en évaluant la différenciation au FACS.

L'absence de cytotoxicité ayant été objectivée, nous avons ensuite voulu évaluer les capacités de phagocytose des macrophages THP-1, ainsi que leur capacité à limiter la croissance des bactéries dans le milieu. Pour cela, nous avons co-incubé les macrophages adhérents avec deux souches bactériennes, un *S. aureus* et un *E. coli*, à différentes MOI pendant 4 heures et avons suivi la croissance bactérienne dans le milieu ainsi que le nombre de bactéries internalisées vivantes après décollement et rupture des macrophages. Aucune différence n'a été remarquée entre les populations bactériennes en contact avec des macrophages et celles dans les puits contrôles sans macrophages, montrant l'incapacité de ces cellules à contrôler la croissance des bactéries dans le milieu lors d'un essai de 4 heures.

Il a été montré précédemment que la phagocytose des bactéries par les macrophages est limitée et plus efficace à des faibles MOI, i.e. inférieures à 10 [152]. Dans notre étude, la phagocytose semble surtout dépendre de la souche bactérienne avec une meilleure phagocytose de *S. aureus* que de *E. coli*, bien que la phagocytose de *S. aureus* soit limitée à 1 bactérie pour 100 macrophages. Une étude précédente avec les mêmes macrophages THP-1 et une autre souche de *S. aureus* avait montré une internalisation d'environ une bactérie par macrophage à une MOI de 0.05 après 5 heures de co-incubation [161]. Cette internalisation était plus élevée quand la MOI augmentait mais restait tout de même limitée à moins de 3 bactéries par macrophages à une MOI de 5. Ces résultats montrent l'intérêt d'étudier la phagocytose en conditions statiques et à de faibles MOI avec des techniques différentes telles que des marquages FACS complémentaires et des dosages en cytokines pro-inflammatoires pour chaque souche d'intérêt avant de passer à un système dynamique et/ou avec de plus fortes charges bactériennes pour objectiver une éventuelle coopération entre le système immunitaire et les antibiotiques.

Le principal frein à l'utilisation de macrophages THP-1 dans un système dynamique tel que le HF est l'adhérence de ces cellules. Pour ces cellules adhérentes, plus que la densité c'est la confluence et les interactions entre les macrophages qui importent. Il faut qu'ils soient suffisamment proches pour que les interactions aient lieu et donc suffisamment nombreux lors de la différenciation pour couvrir environ 60% de la surface de fixation offerte. Étant donné la grande surface de la paroi des capillaires des HF, le nombre de monocytes produits lors de culture en flasques est insuffisant pour assurer la confluence minimale nécessaire à la survie des macrophages. Il faudrait augmenter la production de monocytes. Le HF étant initialement utilisé pour de la culture cellulaire, il serait possible d'utiliser ce système pour produire une grande quantité de monocytes. Ces derniers pourraient ensuite être différenciés en macrophages dans une cartouche pour évaluer l'action conjointe du système immunitaire et d'un traitement sur une population bactérienne. Cependant, il faut 3 jours pour induire la différenciation, et l'utilisation de macrophages adhérents pour une étude comme nous l'avons fait pour étudier l'efficacité d'un traitement sur un biofilm ne serait pas possible en HF. Dans ce cas, l'utilisation de macrophages adhérents dans une cartouche serait limitée aux études sur des bactéries uniquement planctoniques.

Une autre possibilité serait de travailler avec des cellules uniquement suspension. Une étude a été menée pendant 14 jours en HF avec des THP-1 non différenciés [162] ayant internalisé *Mycobacterium kansasii* pour évaluer et quantifier la survie des bactéries internalisées après un traitement antibiotique réalisé sur sa durée complète. Cependant, vu la durée de l'essai il paraît fort probable qu'une partie des monocytes se soit différenciée en macrophages après stimulation par les bactéries et ait adhéré aux parois ou aux capillaires. Aucune étape de décollement de ces cellules adhérente n'ayant été effectuée, les bactéries internalisées par ces macrophages n'ont probablement pas été dénombrées.

Les THP-1 font partie des cellules les plus utilisées en laboratoire pour étudier les fonctions de phagocytose et de production de chémokines et cytokines [156]. Compte-tenu de la faible phagocytose de nos souches d'intérêt par ces THP-1, des résultats décevants quant au contrôle de la population bactérienne planctonique par les macrophages et de l'impossibilité d'utiliser ces cellules avec un biofilm dans un HF, ces essais ont été laissés en suspens. Une alternative aux THP-1 est l'utilisation de macrophages dérivés de PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) obtenus directement à partir du sang de l'espèce concernée. Ces cellules sont associées à une forte variabilité inter-individuelle et réduisent la durée de l'étude à quelques jours car ce sont des cellules primaires qui dégénèrent rapidement. Cependant, ces cellules semblent produire plus de cytokines de l'inflammation après stimulation [163] et avoir des niveaux d'expression basale de cytokines plus élevés que les THP-1 [164] ce qui peut rendre leur utilisation plus pertinente selon le type d'étude envisagée.

2.5 Optimisation du modèle pour l'étude des mammites de la vache laitière, étude préliminaire à l'ajout de composants du système immunitaire.

2.5.1 Problématique

Afin d'ajouter des composants du système immunitaire inné pour l'étude d'efficacité d'antibiotiques sur des bactéries et à la suite de l'échec de l'utilisation des cellules THP-1 décrit précédemment, nous avons choisi de tester d'autres cellules, les cellules mononucléées de sang périphérique ou PBMC.

Dans la partie 2.3 nous avons commencé à élaborer dans le HF un modèle adapté à l'étude des mammites de la vache laitière. La présence de cellules somatiques dans le lait est un marqueur de mammite. Le California Mastitis Test (CMT) qui évalue la viscosité du lait et permet un comptage semi-quantitatif des cellules somatiques est, actuellement, la technique de détection des mammites la plus facilement réalisable en routine. Des essais visent à optimiser le CMT pour détecter des plus faibles proportions de cellules somatiques [165]. Une détection précoce permet de traiter plus tôt les vaches et d'augmenter la probabilité de succès thérapeutique ce qui diminue *in fine* l'utilisation des antibiotiques, l'efficacité des antibiotiques et la prévention de sélection de résistance étant corrélées à la taille de l'inoculum bactérien initial [48]. Les cellules somatiques recherchées dans le lait par le CMT sont des leucocytes. Ces cellules sont donc présentes dès le début de l'infection dans la mamelle, bien avant les manifestations cliniques. Elles sont donc au contact des bactéries et des antibiotiques lorsque le traitement est initié et nous avons essayé d'inclure ces cellules dans le modèle développé précédemment. Un moyen pour récupérer des leucocytes est d'isoler des PBMC de l'espèce concernée. Les PBMC regroupent des lymphocytes (lymphocytes B, lymphocytes T) mais aussi des cellules du système immunitaire inné tel que des monocytes et macrophages, des cellules Natural Killer, des cellules dendritiques et quelques granulocytes basophiles. Bien que la proportion de chacune des cellules varie selon les individus, chez l'humain, les lymphocytes représentent la population majoritaire avec une proportion de 70 à 90% des PBMC [166].

2.5.2 Objectifs

Le but de cette étude était de récupérer des PBMC à partir de sang de vaches et de vérifier leur viabilité après mise en culture dans du lait.

Les objectifs ont été :

- De collecter des populations de leucocytes de vache laitière,
- De les compter et cultiver *in vitro*,
- D'essayer de comparer leur survie sur une courte période dans le lait et dans un milieu de culture standardisé.

2.5.3 Matériel et méthodes

2.5.3.1 Récupération des PBMC à partir du sang de génisses

2.5.3.1.1 Prélèvement de sang périphérique

Environ 4 x 12 mL de sang ont été récupérés à la veine caudale de 4 génisses dans des tubes contenant un anti-coagulant lithium-héparine avec un système Vacutainer®. Ce sang a ensuite été regroupé dans un seul tube avant d'être immédiatement traité pour récupérer les cellules d'intérêt.

2.5.3.1.2 Isolement des cellules mononuclées du sang périphérique

Les différents composants du sang ont des densités différentes, ce qui permet de les isoler grâce à un gradient. On utilise du polyfluorocarbure liquide (ou Ficoll®) dont la densité est de 1.077. Les globules rouges et polynucléaires granulocytes sont plus denses que le Ficoll et vont sédimenter au fond du tube. Les PBMC sont moins denses et restent à l'interface du Ficoll.

Le sang a été dilué au demi avec du RPMI. Chaque tube avait été préalablement rempli de Ficoll avant d'ajouter doucement à la pipette le mélange « Sang + RPMI » avec 2 volumes de

Ficoll pour un volume de sang. Chaque tube a ensuite été centrifugé 30 minutes à 1200g à température ambiante avec une accélération modérées et une décélération minimum.

Après centrifugation, les PBMC qui forment un anneau blanc ont été récupérés délicatement à la pipette et transférés dans un tube pour un rinçage avec du RPMI.

Une nouvelle centrifugation de 10 minutes à 600g à température ambiante a ensuite été effectuée et le surnageant a été jeté pour éliminer le Ficoll toxique pour les cellules. Un deuxième lavage a été effectué comme précédemment. Le culot a été remis en suspension dans du RPMI. Un aliquot de 100 μ L a été prélevé et dilué au demi en bleu trypan avant de procéder au comptage des cellules viables, comme décrit dans le paragraphe 2.4.3.2.3.2.

2.5.3.2 Évaluation de la survie selon le milieu de culture utilisé

Le milieu le plus classique pour la culture cellulaire de cellules immunitaires est le RPMI. En plaque 6 puits, 2 puits ont été remplis avec 2.8mL de RPMI et 4 avec 2.8mL lait demi-écrémé comme utilisé dans la partie 2.3. Deux cents microlitres de la suspension de PBMC ont été ajoutés dans chaque puits pour obtenir une concentration de 10⁶ cellules/puits. La plaque a été mise dans un incubateur à 37°C et 5% CO₂. Après 48h, deux comptages ont été effectués dans chaque puits par le même opérateur.

Les moyennes des comptages ont été comparées en utilisant un test t de Student réalisé avec le logiciel R avec un seuil de significativité statistique fixé à $p \leq 0.05$.

2.5.4 Résultats

2.5.4.1 Rendement de récupération de PBMC

Cinquante millilitres de sang de vache ont permis de récupérer 77 x 10⁶ cellules, soit un rendement de 1.5 x 10⁶ cellules/mL de sang.

2.5.4.2 *Survie dans le lait par rapport au RPMI*

Après 48h, la moyenne de cellules dans le RPMIc est de $5.91 \pm 0.003 \log_{10}$ cellules par puits et la moyenne dans le lait est de $5.96 \pm 0.041 \log_{10}$ cellules par puits. Bien qu'une mortalité soit remarquée au bout de 48h par rapport à la taille initiale de cellules mises à incuber, il n'y a pas de différence statistiquement significative du nombre de cellules entre les deux milieux après 48 heures d'incubation ($p = 0.07$).

2.5.5 Discussion

Chez la vache laitière, la mammite est le résultat d'une compétition entre un agent infectieux et les cellules du système immunitaire. Ces cellules, ou leucocytes, affluent massivement vers le lieu de l'infection pour lutter contre le pathogène. En cas d'échec du système immunitaire, on aboutit à une mammite clinique qu'il faut traiter. Dans ce cas, on a co-incubation entre les cellules, les bactéries, et le traitement.

Nous avons déjà montré dans la partie 2.3 qu'un modèle dynamique comme le HF peut être utilisé avec du lait. Le but de cette étude préliminaire était d'étudier la faisabilité de collecte et culture de PBMC pour essayer d'intégrer ces composants du système immunitaire à un système *in vitro* dynamique comme le HF.

La collecte de PBMC requiert du matériel simple et peu de manipulations. Cinquante millilitres de sang nous ont permis de récolter près de 80 millions de cellules en quelques heures, ce qui est un rendement bien supérieur à ce qui peut être obtenu avec de la culture de lignées cellulaires « classique » où il faut plusieurs jours et plusieurs passages pour obtenir autant de cellules. Un test comme le CMT détecte 250 000 cellules/mL lors de mammite à *S. aureus*. Une telle concentration est facilement reproductible dans un HF dont le volume de l'espace extra-capillaire est de 20mL, soit à partir de PBMC congelés, voire même en prélevant le sang directement le matin.

Bien que ces cellules soient relativement fragiles et aient une durée de vie limitée, notre étude comparant la survie sur 48 heures dans du lait et du RPMIc n'a pas montré de différence entre les deux milieux. L'utilisation de PBMC dans un modèle de mammite de la vache laitière semble facilement applicable et permettrait d'avoir des modèles encore plus proches des conditions *in vivo*. De plus, nous pouvons émettre l'hypothèse que des vaches laitières avec un rang de lactation non nul devraient déjà avoir été confrontées à des *S. aureus* et que leur

système immunitaire devrait déjà posséder des effecteurs orientés contre *S. aureus* dans les PBMC récoltés et donc être plus efficaces que des cellules issues d'une lignée.

D'autres essais doivent être réalisés, notamment pour évaluer la cytotoxicité de l'antibiotique à utiliser sur les PBMC et l'effet des PBMC sur les bactéries seules, mais leur facilité de collecte, de culture et le fait que ces cellules soient en suspension rendent leur utilisation assez facile en pratique pour des essais *ex vivo*.

Discussion générale

L'antibiorésistance est actuellement un problème majeur de santé publique. Des analyses prospectives estiment qu'au niveau mondial le nombre annuel de morts en 2050 pour cause d'antibiorésistance pourrait être de 10 millions. La réalisation de ce chiffre en ferait la première cause de mortalité chez l'homme avant le cancer [167], remettant en cause la possibilité de pratiquer des chirurgies et des greffes pour lesquelles l'antibioprophylaxie est souvent nécessaire pour prévenir les infections.

La lutte contre le développement des résistances aux antimicrobiens nécessite, entre autres mesures, l'optimisation des stratégies thérapeutiques contre les infections bactériennes. Au sein des priorités de recherche définies à l'échelle nationale [168] et internationale [169] figure la nécessité d'optimiser la pharmacocinétique et la pharmacodynamie (PK/PD) d'antibiotiques déjà connus afin d'en assurer une meilleure utilisation.

Une des clefs d'une meilleure utilisation des antibiotiques est l'étude des combinaisons de molécules dans le but de réduire les quantités et/ou la durée des traitements, et de limiter l'émergence de résistance au cours du traitement. Pour chaque association potentielle des tests *in vitro* doivent être menés avant l'implémentation en clinique. Les essais réalisés en routine (détermination de la CMI, courbes de bactéricidie) utilisent des modèles dits statiques. On étudie l'effet d'une concentration d'antibiotique constante au cours du temps sur un inoculum bactérien de taille fixée pendant une durée relativement courte, généralement inférieure à 24 heures [66]. Ces méthodes de référence sont utiles et souvent rapides mais parfois trop éloignées de la clinique où l'on peut observer des charges bactériennes parfois plus élevées comme lors d'infection associée à un biofilm, mais aussi une décroissance des concentrations des médicaments dans l'organisme au cours du temps. Un biofilm est une communauté de bactéries adhérent à une surface naturelle (comme l'épithélium vésical) ou artificielle (comme un cathéter), les bactéries étant encapsulées dans une matrice polysaccharidique [170]. En se basant uniquement sur les résultats obtenus par des techniques statiques on pourrait rejeter de potentielles associations qui présenteraient un intérêt *in vivo* [171], ou inversement, sélectionner une combinaison qui aurait montré un intérêt *in vitro* et aboutir à un échec thérapeutique lors des essais *in vivo*.

L'objectif de cette thèse a été de développer un modèle *in vitro* innovant permettant de reproduire plus fidèlement certaines conditions rencontrées *in vivo*, comme un biofilm ou une forte charge bactérienne, et de l'utiliser pour explorer de façon plus pertinente l'efficacité d'un traitement.

Le modèle utilisé au cours de cette thèse est un modèle qualifié de dynamique, c'est-à-dire capable de reproduire les fluctuations de concentrations en antibiotiques au cours du temps, sur plusieurs jours, comme cela se produit dans l'organisme lors d'un traitement. Il s'agit du système HF, ou fibres creuses, récemment labélisé par l'Agence Européenne du Médicament

pour étudier de nouveaux traitement contre la tuberculose [172] et qui est actuellement considéré comme un des systèmes *in vitro* dynamiques qui permet de mener des études PK/PD particulièrement proches des conditions rencontrées *in vivo* [130].

Une première étude avait pour but de comparer différentes techniques de laboratoire, de la plus simple à la plus complexe, pour évaluer la capacité de chacune à mettre en évidence une interaction entre deux antibiotiques sur une souche bactérienne donnée, selon la taille de l'inoculum initial et le milieu de culture utilisé. Nous avons décidé d'utiliser une combinaison de vancomycine et d'amikacine. L'association d'un aminoglycoside à de la vancomycine fait partie des recommandations en clinique chez l'Homme lors d'une infection à *S. aureus* ne répondant pas à un premier traitement antibiotique.

Si les techniques statiques les plus simples comme le checkerboard assay ou les courbes de bactéricidies ont confirmé l'efficacité des deux antibiotiques utilisés seuls sur des inocula standard de souches sensibles et ont mis en évidence un effet inoculum avec une inefficacité des antibiotiques sur les gros inocula, qu'ils soient utilisés seuls ou en association, ces techniques n'ont jamais mis en évidence une meilleure efficacité de ces deux antibiotiques utilisés en combinaison, que ce soit sur l'inoculum standard ou sur le gros inoculum. Seul le HF permettant de reproduire les fluctuations de concentrations au cours d'un traitement réalisé sur plusieurs jours a mis en évidence une augmentation de l'activité des deux antibiotiques utilisés en combinaison pendant 5 jours sur le gros inoculum. Dans cette étude nous n'avons testé que la combinaison de vancomycine et d'amikacine. D'autres essais devraient donc être réalisés avec d'autres combinaisons pour évaluer les capacités de la méthode à objectiver de manière plus générale les interactions entre deux molécules. Cependant, on peut supposer que les résultats obtenus lors d'études menées en conditions dynamiques sur la durée complète d'un traitement seront plus pertinents qu'avec des conditions statiques et lorsqu'on veut évaluer l'efficacité d'une combinaison d'antibiotiques lors d'une infection due à une forte charge bactérienne mais aussi si l'on veut suivre l'émergence de résistances au cours d'un traitement [173]. Dans notre étude nous avons utilisé des antibiotiques avec des temps de demi-vies d'élimination plasmatique similaires mais le modèle pourrait être utilisé avec des antibiotiques ayant des demi-vies différentes, en rajoutant un compartiment, selon la méthode de Blaser [174].

Nous nous sommes ensuite demandé si ce modèle dynamique pouvait être utilisé pour évaluer des ajustements posologiques de cette même combinaison d'antibiotiques en prenant en compte les bactéries planctoniques et celles du biofilm. A cet effet, la souche bactérienne a été incubée pendant trois jours dans un HF sans antibiotique. Ce temps a été considéré comme suffisant pour qu'un biofilm ait le temps de se former. Nous avons évalué l'efficacité de la combinaison en utilisant les antibiotiques aux posologies recommandées et avons ensuite essayé d'optimiser le traitement en nous basant sur les propriétés pharmacocinétiques des antibiotiques. Pour l'amikacine qui est un antibiotique

concentration-dépendant nous avons augmenté la dose pour augmenter la concentration maximale au site infectieux, et pour la vancomycine qui est un antibiotique temps-dépendant nous avons modifié l'administration de la dose quotidienne. Au lieu de deux administrations par jour, nous avons mimé l'administration de la même quantité de vancomycine par perfusion continue tout au long de la journée, avec une concentration constante d'antibiotique.

L'efficacité de la combinaison sur les bactéries planctoniques avait été démontrée dans la première étude. Les modifications du schéma thérapeutique de la combinaison n'ont pas montré d'amélioration de l'efficacité du traitement sur les bactéries planctoniques par rapport à la combinaison des deux antibiotiques à la posologie recommandée pour chacun d'eux. L'utilisation des antibiotiques en combinaison n'a pas montré de meilleure efficacité sur la taille du biofilm après 5 jours de traitement par rapport à l'amikacine utilisée seule. En revanche, l'utilisation des antibiotiques en combinaison a permis de maintenir les populations de bactéries moins sensibles à l'amikacine dans des proportions similaires à celles obtenues sur les populations contrôles, en l'absence de traitement. A l'inverse, quand l'amikacine a été utilisée seule, toutes les bactéries, planctoniques ou dans le biofilm, étaient moins sensibles à l'amikacine après traitement. Un tel résultat a pu être objectivé grâce à la durée de l'étude, suffisamment longue pour que des mécanismes de tolérance et de résistance aient le temps de se mettre en place. Nous avons donc vu que la combinaison n'avait pas d'impact particulier sur la taille du biofilm mais pouvait prévenir l'émergence de résistances. De manière générale, la sélection des combinaisons doit non seulement être établie sur sa capacité à augmenter l'efficacité bactéricide mais aussi sur sa capacité à limiter l'apparition de résistance, en tenant compte des 2 populations co-existantes : les bactéries planctoniques et celles du biofilm. Dans ces travaux de thèse, nous n'avons pas étudié comment cette combinaison limitait l'émergence de résistance dans les populations bactériennes planctoniques et du biofilm ni comment agissaient les antibiotiques utilisés ensemble pour diminuer la population de bactéries planctoniques. Les mécanismes de l'efficacité de cette combinaison, alors que les antibiotiques seuls n'ont eu aucun effet, pourraient être étudiés. Nous avons montré l'inefficacité de la vancomycine sur un gros inoculum de $9 \log_{10}$ UFC/mL et une efficacité limitée de l'amikacine sur un inoculum de même taille, permettant une réduction de $2 \log_{10}$. Une hypothèse serait que l'amikacine agit d'abord seule et diminue légèrement la charge bactérienne, et que la vancomycine, inefficace sur un trop gros inoculum, retrouve alors une certaine efficacité sur un inoculum de taille moyenne. L'amikacine présentant une toxicité non négligeable, on pourrait envisager de raccourcir sa durée d'utilisation et de tester *in vitro* en conditions dynamiques d'utiliser la combinaison sur une durée plus courte, le temps de réduire la population bactérienne à un inoculum de 7 ou $8 \log_{10}$ avant de n'utiliser plus que de la vancomycine. L'utilisation d'amikacine seule ayant montré dans cette étude que toutes les bactéries planctoniques présentaient une sensibilité moindre à l'amikacine en seulement 2 jours de traitement, on pourrait essayer de n'utiliser l'amikacine que 2 jours en association avec la vancomycine.

Le HF permet de mimer les profils de concentrations que l'on rencontre chez un patient, mais aussi, à l'inverse, de déterminer quels sont les profils qui garantissent une activité optimale et donc d'optimiser un traitement. Bien évidemment, les essais devraient être comparés ultérieurement à des situations cliniques pour valider l'utilisation du modèle comme prédicteur de l'efficacité d'un traitement. Notre étude n'a pas permis d'optimiser la posologie des antibiotiques puisqu'aucun des essais n'a montré plus d'efficacité sur les bactéries planctoniques ou sur le biofilm que la combinaison aux posologies recommandées pour chaque antibiotique utilisé seul. Une des limites de notre étude est le faible nombre d'essais. Des duplicatas ne sont probablement pas suffisants pour objectiver une différence d'efficacité entre les traitements notamment si la différence attendue est faible.

Les caractéristiques de ce système offrent l'opportunité de tester tout un ensemble de conditions, qui visent à se rapprocher des situations rencontrées *in vivo* afin d'accroître son potentiel prédictif. Cependant, son utilisation reste limitée. Si son avantage principal est de pouvoir mimer les fluctuations de concentrations sur la durée complète d'un traitement, c'est aussi un de ses principaux inconvénients. Devoir attendre plusieurs jours pour évaluer l'efficacité d'un traitement rend son utilisation impossible pour du diagnostic à l'échelle d'un individu où les résultats doivent être rendus le plus rapidement possible pour adapter le traitement du patient. Il n'existe pour l'instant pas de méthode standardisée prédictive de l'efficacité d'un traitement sur une situation complexe, comme associée à une charge bactérienne importante ou à un biofilm. Dans cette optique, nous pourrions envisager de développer des méthodes diagnostiques plus simples et plus rapides (moins de 24 heures) qui donneraient les mêmes résultats qu'un HF sur plusieurs jours. Ceci nécessiterait des phases de développement et de comparaison des résultats obtenus avec ceux obtenus avec un HF ainsi que des comparaisons entre résultats obtenus *in vitro* et *in vivo*.

Étant dans une ENV, mon travail de thèse s'est aussi orienté sur l'antibiothérapie en médecine vétérinaire. En médecine vétérinaire, une des affections chroniques les plus fréquentes responsable d'une diminution du bien-être animal et de pertes économiques pour l'éleveur est la mammite de la vache laitière.

Dans une troisième étude nous avons donc essayé de reproduire un modèle de mammite en utilisant un milieu de culture le plus proche possible de celui dans lequel diffuserait un antibiotique après son administration par voie intramusculaire à une vache lors d'une mammite bactérienne, i.e. le lait, car le milieu de culture peut avoir un impact sur la détermination de la CMI [144] et donc sur l'évaluation *in vitro* de l'efficacité d'un traitement.

Pour des raisons de confidentialité, tous les résultats n'ont pas été montrés dans ce manuscrit mais la technique a été transférée avec succès dans les locaux du laboratoire Vétôquinol, qui

a depuis réalisé de nouveaux essais dans le but de déterminer de nouvelles posologies assurant une efficacité suffisante du traitement tout en limitant l'émergence de résistances.

Que ce soit pour prédire l'efficacité chez l'animal ou chez l'Homme, la principale limite des essais *in vitro* est l'absence de composants du système immunitaire dans les techniques de laboratoire alors que l'immunité innée est un acteur incontournable de la lutte contre les infections bactériennes. Il est donc reconnu que l'évaluation de l'efficacité réelle des antibiotiques en l'absence d'effecteurs du système immunitaire est incomplète. Une réelle avancée dans l'optimisation des modèles *in vitro* serait d'inclure des composants du système immunitaire, soit pour étudier la survie des bactéries dans les cellules du système immunitaire, soit pour évaluer les capacités du système immunitaire à coopérer avec les antibiotiques pour résoudre une infection bactérienne. Les exigences éthiques actuelles en matière d'expérimentation animale demandent de remplacer les modèles animaux chaque fois que cela est possible, et un modèle *in vitro* dynamique incluant des composants du système immunitaire et reproduisant certains phénomènes physiologiques associés aux défenses de l'hôte pourrait se substituer à une partie des essais réalisés sur des animaux, comme les modèles d'infection de cuisses de souris.

C'est dans cette perspective que nous avons réalisé des tests préliminaires pour choisir une population de cellules du système immunitaire qui pourrait être incluse ultérieurement dans notre modèle dynamique. Le système HF étant initialement dédié à la culture cellulaire à haute densité [71], le facteur limitant à l'ajout de composant du système immunitaire est la sélection de populations pertinentes plus que l'ajout de ces composants dans le système. Nos essais ont montré que si l'objectif principal est d'évaluer la survie de bactéries phagocytées et confrontées à un traitement antibiotique, des lignées cellulaires peuvent être utilisées, après avoir préalablement vérifié pour chaque souche que la phagocytose est suffisante. Si en revanche l'objectif est d'évaluer les capacités du système immunitaire à diminuer la population bactérienne, voire de l'éradiquer, les lignées cellulaires immortelles ne sont pas assez virulentes. Dans ce cas, il vaudrait mieux privilégier des PBMC, avec la problématique de la variabilité inter individuelle associée à chaque collecte de PBMC. Toutefois, un tel modèle, même associant plusieurs populations de cellules ne reproduira jamais le système immunitaire dans son ensemble avec les nombreuses interactions entre ses acteurs et sera toujours inférieur sur ce critère à un modèle animal.

Même si nous avons montré que le modèle HF permettait d'améliorer les études *in vitro* en exposant les biofilms à des concentrations fluctuantes d'antibiotiques ou en ajoutant des composants du système immunitaire, il présente cependant certains inconvénients. Outre le prix et l'usage unique de chaque cartouche, son utilisation requiert de travailler avec les concentrations libres et donc d'avoir des connaissances préalables sur la liaison de la molécule à tester aux protéines plasmatiques. Nous avons aussi montré que le HF pouvait être un bon modèle pour étudier l'efficacité d'un traitement sur un biofilm ; avec cependant la limite que

l'évaluation de la population de bactéries dans le biofilm nécessite la destruction du système et ne peut donc être réalisée qu'une fois à la fin du traitement. De plus, l'utilisation combinée avec certaines techniques de microscopie pour évaluer la forme du biofilm est rendue impossible à cause de la fluorescence intrinsèque du plastique de la cartouche et de sa forme arrondie qui rend difficile son utilisation avec un microscope. De tels essais sur biofilms pourraient être effectués avec des modèles plus simples permettant un échantillonnage au cours du temps, comme le CDC bioreactor®, où l'on peut prélever un coupon à chaque temps de prélèvement. Cependant avec un CDC on ne peut évaluer l'efficacité d'un traitement que sur les bactéries du biofilm. Les bactéries planctoniques sont en effet diluées en même temps que les concentrations d'antibiotiques lors de l'ajout de milieu frais et des bactéries sont perdues en permanence par l'évacuation hors du compartiment central permettant de maintenir le volume de travail constant. Le CDC offre l'avantage du choix du matériau de chaque coupon sur lequel on veut que le biofilm se développe, et avec 6 supports, on peut tester 24 coupons donc 24 matériaux différents. De plus, son compartiment central en verre limite la fixation des molécules sur les parois. Un CDC peut donc être utilisé avec n'importe quelle molécule sans essai préalable. *A contrario*, il n'existe pour l'instant que deux types de matériaux pour les capillaires dans les HF : la cellulose et la polysulfone, les deux étant dans une cartouche en plastique. Avant même d'effectuer des essais de bactéricidie il faut s'assurer que les molécules utilisées ne vont pas se fixer sur la paroi ou s'adsorber sur les capillaires et donc réaliser des essais préliminaires avec des dosages d'antibiotiques pour vérifier que les PK prédites pourront être atteintes. De telles études augmentent encore le coût des essais conduits avec des HF. Les avantages et les inconvénients de chacune des méthodes doivent être pris en compte dans le choix du modèle et du critère à évaluer.

Ces inconvénients relatifs semblent néanmoins contrebalancés par le principal intérêt du HF qui est de pouvoir reproduire une grande diversité de situations rencontrées lors d'infections cliniques. Nous n'avons pas encore exploré toutes les pistes d'optimisation du système HF pour mimer de façon encore plus fiable certaines situations, mais plusieurs pistes de travail sont actuellement à l'étude.

L'accès direct à l'espace extra-capillaire présente un intérêt particulier si on veut mimer des infections ayant lieu dans des organes creux. On pourrait par exemple utiliser cette particularité pour :

- **Reproduire un mécanisme de vidange** : la configuration du système permet de simuler les processus d'élimination naturelle des bactéries en suspension, comme la vidange de la vessie lors de miction ou la vidange de la mamelle lors de la traite.
- **Mimer une administration par voie locale et une administration par voie générale** : En plus de reproduire la PK d'un antibiotique administré par voie générale et arrivant par l'intérieur des fibres, il est possible de reproduire une administration par voie

locale en administrant le traitement directement dans l'EEC, ceci dans l'optique de comparer les stratégies d'administration simultanée et séquentielles de molécules actives par voie systémique et par voie locale, afin d'optimiser les synergies ou d'en identifier de nouvelles.

- **Reproduire un ensemble de conditions (voie d'administration, présence de biofilm, ...) pertinentes vis-à-vis de certaines infections, dont les infections pulmonaires :** Chez les patients atteints de mucoviscidose de nombreuses bactéries opportunistes colonisent l'épithélium pulmonaire et forment un biofilm. En plus de la formation d'un biofilm classique, *Pseudomonas aeruginosa* peut aussi présenter un phénotype mucoïde et croître sous forme d'agrégats protégés par du mucus. Cette forme mucoïde est associée à une perte des capacités pulmonaires [175,176] et les biofilms de la forme mucoïde sont différents de ceux de la forme non mucoïde, avec une surproduction d'exopolysaccharides dans les EPS rendant le biofilm plus visqueux et plus élastique [177]. Ces modes de vie la rendent la bactérie difficile à éradiquer et une antibiothérapie sur plusieurs mois est souvent proposée, en combinant des traitements par voie générale et par voie locale *via* des inhalations [175]. Actuellement, les modèles pour étudier l'efficacité d'un traitement sur un biofilm de *P. aeruginosa* comprennent des modèles *in vitro* simples permettant de développement de biofilms en plaques [178] ou sur des billes d'alginate [179], des modèles d'épithélium pulmonaire [180] et des modèles *in vivo* comme des modèles de souris [181] ou de rats [182]. Cependant, très peu de modèles permettent l'étude de l'efficacité des traitements par voie locale et générale utilisés conjointement sur un biofilm et sur les agrégats pendant la durée classique d'un traitement, soit plusieurs semaines. Le HF, avec son accès direct à l'espace extra-capillaire et la possibilité de faire durer un essai sur plusieurs semaines, voire plusieurs mois, devrait permettre de tels essais.

En conclusion, cette thèse a permis de mettre en évidence l'intérêt d'utiliser des modèles dynamiques pour évaluer *in vitro* l'efficacité d'un traitement lors d'une infection bactérienne complexe associée à un biofilm sur la population bactérienne totale mais aussi sur la sélection de résistances au cours d'un traitement.

Nos résultats suggèrent que le développement, l'optimisation de ce type de modèle et son expansion devraient constituer des sources de progrès dans le domaine des thérapeutiques des infections bactériennes à la fois pour identifier plus rapidement des associations pertinentes cliniquement mais aussi en termes de limitation de l'expérimentation animale. Ce modèle sera repris ultérieurement au laboratoire avec l'arrivée de deux nouveaux doctorants qui l'utiliseront pour développer des combinaisons d'antibiotiques en médecine vétérinaire avant de valider *in vivo* les résultats obtenus *in vitro*.

Références

- [1] Donlan RM. Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. *Clin Infect Dis* 2001;33:1387–92. doi:10.1086/322972.
- [2] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284:1318–22.
- [3] Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2004;2:95–108. doi:10.1038/nrmicro821.
- [4] Flemming H-C, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:623–33. doi:10.1038/nrmicro2415.
- [5] Götz F. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol* 2002;43:1367–78.
- [6] Latasa C, Solano C, Penadés JR, Lasa I. Biofilm-associated proteins. *C R Biol* 2006;329:849–57. doi:10.1016/j.crvi.2006.07.008.
- [7] Lasa I, Penadés JR. Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res Microbiol* 2006;157:99–107. doi:10.1016/j.resmic.2005.11.003.
- [8] Valle J, Latasa C, Gil C, Toledo-Arana A, Solano C, Penadés JR, et al. Bap, a biofilm matrix protein of *Staphylococcus aureus* prevents cellular internalization through binding to GP96 host receptor. *PLoS Pathog* 2012;8:e1002843. doi:10.1371/journal.ppat.1002843.
- [9] Yang L, Barken KB, Skindersoe ME, Christensen AB, Givskov M, Tolker-Nielsen T. Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading, Engl)* 2007;153:1318–28. doi:10.1099/mic.0.2006/004911-0.
- [10] Izano EA, Amarante MA, Kher WB, Kaplan JB. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2008;74:470–6. doi:10.1128/AEM.02073-07.
- [11] Zogaj X, Nimtze M, Rohde M, Bokranz W, Römling U. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol* 2001;39:1452–63.
- [12] Wilkins M, Hall-Stoodley L, Allan RN, Faust SN. New approaches to the treatment of biofilm-related infections. *J Infect* 2014;69 Suppl 1:S47–52. doi:10.1016/j.jinf.2014.07.014.
- [13] Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infect Dis* 2002;8:881–90. doi:10.3201/eid0809.020063.
- [14] Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 2010;35:322–32. doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011.
- [15] Stoodley P, Cargo R, Rupp CJ, Wilson S, Klapper I. Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2002;29:361–7. doi:10.1038/sj.jim.7000282.
- [16] Lee SF, Li YH, Bowden GH. Detachment of *Streptococcus mutans* biofilm cells by an endogenous enzymatic activity. *Infect Immun* 1996;64:1035–8.
- [17] Rupp CJ, Fux CA, Stoodley P. Viscoelasticity of *Staphylococcus aureus* biofilms in response to fluid shear allows resistance to detachment and facilitates rolling migration. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:2175–8. doi:10.1128/AEM.71.4.2175-2178.2005.
- [18] Beyenal H, Lewandowski Z, Harkin G. Quantifying biofilm structure: facts and fiction. *Biofouling* 2004;20:1–23. doi:10.1080/0892701042000191628.
- [19] Raad I, Costerton W, Sabharwal U, Sacilowski M, Anaissie E, Bodey GP.

Ultrastructural analysis of indwelling vascular catheters: a quantitative relationship between luminal colonization and duration of placement. *J Infect Dis* 1993;168:400–7.

[20] Maurice NM, Bedi B, Sadikot RT. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Host Response and Clinical Implications in Lung Infections. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2018;58:428–39. doi:10.1165/rcmb.2017-0321TR.

[21] Oliveira M, Dias FR, Pomba C. Biofilm and fluoroquinolone resistance of canine *Escherichia coli* uropathogenic isolates. *BMC Res Notes* 2014;7:499. doi:10.1186/1756-0500-7-499.

[22] Melchior MB, Vaarkamp H, Fink-Gremmels J. Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? *Vet J* 2006;171:398–407. doi:10.1016/j.tvjl.2005.01.006.

[23] Schönborn S, Krömker V. Detection of the biofilm component polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* infected cow udders. *Vet Microbiol* 2016;196:126–8. doi:10.1016/j.vetmic.2016.10.023.

[24] Notcovich S, DeNicolo G, Flint SH, Williamson NB, Gedye K, Grinberg A, et al. Biofilm-Forming Potential of *Staphylococcus aureus* Isolated from Clinical Mastitis Cases in New Zealand. *Vet Sci* 2018;5. doi:10.3390/vetsci5010008.

[25] Hensen SM, Pavčić MJ, Lohuis JA, de Hoog JA, Poutrel B. Location of *Staphylococcus aureus* within the experimentally infected bovine udder and the expression of capsular polysaccharide type 5 in situ. *J Dairy Sci* 2000;83:1966–75. doi:10.3168/jds.S0022-0302(00)75073-9.

[26] Gilbert P, Das J, Foley I. Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res* 1997;11:160–7. doi:10.1177/08959374970110010701.

[27] Lebeaux D, Chauhan A, Rendueles O, Beloin C. From *in vitro* to *in vivo* Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. *Pathogens* 2013;2:288–356. doi:10.3390/pathogens2020288.

[28] Stewart PS. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol* 2002;292:107–13. doi:10.1078/1438-4221-00196.

[29] Stewart PS. Antimicrobial Tolerance in Biofilms. *Microbiol Spectr* 2015;3. doi:10.1128/microbiolspec.MB-0010-2014.

[30] Kirby AE, Garner K, Levin BR. The relative contributions of physical structure and cell density to the antibiotic susceptibility of bacteria in biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:2967–75. doi:10.1128/AAC.06480-11.

[31] Driffield K, Miller K, Bostock JM, O'Neill AJ, Chopra I. Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:1053–6. doi:10.1093/jac/dkn044.

[32] Molin S, Tolker-Nielsen T. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr Opin Biotechnol* 2003;14:255–61.

[33] Soto SM. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence* 2013;4:223–9. doi:10.4161/viru.23724.

[34] Høiby N, Ciofu O, Bjarnsholt T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiol* 2010;5:1663–74. doi:10.2217/fmb.10.125.

[35] Van Acker H, Coenye T. The Role of Efflux and Physiological Adaptation in Biofilm Tolerance and Resistance. *J Biol Chem* 2016;291:12565–72. doi:10.1074/jbc.R115.707257.

[36] Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:167–93. doi:10.1128/CMR.15.2.167-193.2002.

[37] Tresse O, Jouenne T, Junter GA. The role of oxygen limitation in the resistance of agar-entrapped, sessile-like *Escherichia coli* to aminoglycoside and beta-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1995;36:521–6.

[38] Bigger J. TREATMENT OF STAPHYLOCOCCAL INFECTIONS WITH

- PENICILLIN BY INTERMITTENT STERILISATION. *The Lancet* 1944;244:497–500. doi:10.1016/S0140-6736(00)74210-3.
- [39] Lewis K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008;322:107–31.
- [40] Gefen O, Balaban NQ. The importance of being persistent: heterogeneity of bacterial populations under antibiotic stress. *FEMS Microbiol Rev* 2009;33:704–17. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00156.x.
- [41] Jayaraman R. Bacterial persistence: some new insights into an old phenomenon. *J Biosci* 2008;33:795–805.
- [42] Wood TK, Knabel SJ, Kwan BW. Bacterial persister cell formation and dormancy. *Appl Environ Microbiol* 2013;79:7116–21. doi:10.1128/AEM.02636-13.
- [43] Singh R, Ray P, Das A, Sharma M. Role of persisters and small-colony variants in antibiotic resistance of planktonic and biofilm-associated *Staphylococcus aureus*: an *in vitro* study. *J Med Microbiol* 2009;58:1067–73. doi:10.1099/jmm.0.009720-0.
- [44] Waters EM, Rowe SE, O’Gara JP, Conlon BP. Convergence of *Staphylococcus aureus* Persister and Biofilm Research: Can Biofilms Be Defined as Communities of Adherent Persister Cells? *PLoS Pathog* 2016;12:e1006012. doi:10.1371/journal.ppat.1006012.
- [45] Roberts ME, Stewart PS. Modelling protection from antimicrobial agents in biofilms through the formation of persister cells. *Microbiology (Reading, Engl)* 2005;151:75–80. doi:10.1099/mic.0.27385-0.
- [46] Lewis K. Persister cells. *Annu Rev Microbiol* 2010;64:357–72. doi:10.1146/annurev.micro.112408.134306.
- [47] Udekwu KI, Parrish N, Ankomah P, Baquero F, Levin BR. Functional relationship between bacterial cell density and the efficacy of antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 2009;63:745–57. doi:10.1093/jac/dkn554.
- [48] Ferran AA, Kesteman A-S, Toutain P-L, Bousquet-Mélou A. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Analysis of the Influence of Inoculum Size on the Selection of Resistance in *Escherichia coli* by a Quinolone in a Mouse Thigh Bacterial Infection Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009;53:3384–90. doi:10.1128/AAC.01347-08.
- [49] Singh R, Ray P, Das A, Sharma M. Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:1955–8. doi:10.1093/jac/dkq257.
- [50] Doroshenko N, Tseng BS, Howlin RP, Deacon J, Wharton JA, Thurner PJ, et al. Extracellular DNA impedes the transport of vancomycin in *Staphylococcus epidermidis* biofilms preexposed to subinhibitory concentrations of vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:7273–82. doi:10.1128/AAC.03132-14.
- [51] Suci PA, Mittelman MW, Yu FP, Geesey GG. Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:2125–33.
- [52] Jesaitis AJ, Franklin MJ, Berglund D, Sasaki M, Lord CI, Bleazard JB, et al. Compromised host defense on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: characterization of neutrophil and biofilm interactions. *J Immunol* 2003;171:4329–39.
- [53] Thurlow LR, Hanke ML, Fritz T, Angle A, Aldrich A, Williams SH, et al. *Staphylococcus aureus* biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation *in vivo*. *J Immunol* 2011;186:6585–96. doi:10.4049/jimmunol.1002794.
- [54] Dasgupta MK. Biofilm causes decreased production of interferon-gamma. *J Am Soc Nephrol* 1996;7:877–82.
- [55] Gries CM, Kielian T. Staphylococcal Biofilms and Immune Polarization During Prosthetic Joint Infection. *J Am Acad Orthop Surg* 2017;25 Suppl 1:S20–4. doi:10.5435/JAAOS-D-16-00636.

- [56] Lebeaux D, Ghigo J-M, Beloin C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol Mol Biol Rev* 2014;78:510–43. doi:10.1128/MMBR.00013-14.
- [57] Bhattacharya M, Wozniak DJ, Stoodley P, Hall-Stoodley L. Prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2015;13:1499–516. doi:10.1586/14787210.2015.1100533.
- [58] Beloin C, Renard S, Ghigo J-M, Lebeaux D. Novel approaches to combat bacterial biofilms. *Curr Opin Pharmacol* 2014;18:61–8. doi:10.1016/j.coph.2014.09.005.
- [59] Algburi A, Comito N, Kashtanov D, Dicks LMT, Chikindas ML. Control of Biofilm Formation: Antibiotics and Beyond. *Appl Environ Microbiol* 2016. doi:10.1128/AEM.02508-16.
- [60] Chen Y, Liu T, Wang K, Hou C, Cai S, Huang Y, et al. Baicalein Inhibits *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation and the Quorum Sensing System *In Vitro*. *PLoS One* 2016;11. doi:10.1371/journal.pone.0153468.
- [61] Wu H, Moser C, Wang H-Z, Høiby N, Song Z-J. Strategies for combating bacterial biofilm infections. *International Journal of Oral Science* 2015;7:1–7. doi:10.1038/ijos.2014.65.
- [62] Conlon BP, Nakayasu ES, Fleck LE, LaFleur MD, Isabella VM, Coleman K, et al. Activated ClpP kills persisters and eradicates a chronic biofilm infection. *Nature* 2013;503:365–70. doi:10.1038/nature12790.
- [63] Eliopoulos GM, Eliopoulos CT. Antibiotic combinations: should they be tested? *Clinical Microbiology Reviews* 1988;1:139–56.
- [64] Mohammad H, Mayhoub AS, Cushman M, Seleem MN. Anti-biofilm activity and synergism of novel thiazole compounds with glycopeptide antibiotics against multidrug-resistant staphylococci. *J Antibiot* 2015;68:259–66. doi:10.1038/ja.2014.142.
- [65] Torres NS, Abercrombie JJ, Srinivasan A, Lopez-Ribot JL, Ramasubramanian AK, Leung KP. Screening a Commercial Library of Pharmacologically Active Small Molecules against *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60:5663–72. doi:10.1128/AAC.00377-16.
- [66] Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition*. CLSI document M07-A9. 2012.
- [67] Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:1. doi:10.1093/jac/dkg301.
- [68] Nielsen EI, Friberg LE. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of antibacterial drugs. *Pharmacol Rev* 2013;65:1053–90. doi:10.1124/pr.111.005769.
- [69] Ferran AA, Liu J, Toutain P-L, Bousquet-Mélou A. Comparison of the *In vitro* Activity of Five Antimicrobial Drugs against *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Front Microbiol* 2016;7:1187. doi:10.3389/fmicb.2016.01187.
- [70] Srinivasan A, Dick JD, Perl TM. Vancomycin Resistance in Staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:430–8. doi:10.1128/CMR.15.3.430-438.2002.
- [71] Cadwell JS. The Hollow Fiber Infection Model: Principles and Practice. *Adv Antibiotics Antibodies* 2015;1.
- [72] Ferro BE, Srivastava S, Deshpande D, Sherman CM, Pasipanodya JG, Soolingen D van, et al. Amikacin Pharmacokinetics/Pharmacodynamics in a Novel Hollow-Fiber *Mycobacterium abscessus* Disease Model. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60:1242–8. doi:10.1128/AAC.02282-15.
- [73] Andes D, Craig WA. Animal model pharmacokinetics and pharmacodynamics: a critical review. *Int J Antimicrob Agents* 2002;19:261–8.
- [74] Brock TE, Fred EB, Domagk G. A Contribution to the Chemotherapy of Bacterial Infections. *Reviews of Infectious Diseases* 1986;8:163–6.

- [75] Craig WA, Redington J, Ebert SC. Pharmacodynamics of amikacin *in vitro* and in mouse thigh and lung infections. *J Antimicrob Chemother* 1991;27 Suppl C:29–40.
- [76] Leggett JE, Fantin B, Ebert S, Totsuka K, Vogelmann B, Calame W, et al. Comparative antibiotic dose-effect relations at several dosing intervals in murine pneumonitis and thigh-infection models. *J Infect Dis* 1989;159:281–92.
- [77] 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. *Clin Infect Dis* 2007;44:79–86. doi:10.1086/510079.
- [78] Knudsen JD, Fuursted K, Raber S, Espersen F, Frimodt-Møller N. Pharmacodynamics of Glycopeptides in the Mouse Peritonitis Model of *Streptococcus pneumoniae* or *Staphylococcus aureus* Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2000;44:1247–54. doi:10.1128/AAC.44.5.1247-1254.2000.
- [79] Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* 1999;37:1771–6.
- [80] LaPlante KL, Rybak MJ. Impact of high-inoculum *Staphylococcus aureus* on the activities of nafcillin, vancomycin, linezolid, and daptomycin, alone and in combination with gentamicin, in an *in vitro* pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:4665–72. doi:10.1128/AAC.48.12.4665-4672.2004.
- [81] Hall Snyder AD, Vidailac C, Rose W, McRoberts JP, Rybak MJ. Evaluation of High-Dose Daptomycin Versus Vancomycin Alone or Combined with Clarithromycin or Rifampin Against *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis* in a Novel *In Vitro* PK/PD Model of Bacterial Biofilm. *Infect Dis Ther* 2014. doi:10.1007/s40121-014-0055-5.
- [82] Asseray N, Caillon J, Roux N, Jacqueline C, Bismuth R, Kergueris MF, et al. Different aminoglycoside-resistant phenotypes in a rabbit *Staphylococcus aureus* endocarditis infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1591–3.
- [83] MacDougall C, Chambers HF. Proteins synthesis inhibitors and miscellaneous antibacterial agents. Goodman & Gilman's, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 12th ed., n.d.
- [84] Riviere JE, Papich MG. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, Ninth Edition. Wiley-Blackwell. 2009.
- [85] Rybak M, Lomaestro B, Rotschafer JC, Moellering R, Craig W, Billeter M, et al. Therapeutic monitoring of vancomycin in adult patients: a consensus review of the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Am J Health Syst Pharm* 2009;66:82–98. doi:10.2146/ajhp080434.
- [86] Moise-Broder PA, Forrest A, Birmingham MC, Schentag JJ. Pharmacodynamics of vancomycin and other antimicrobials in patients with *Staphylococcus aureus* lower respiratory tract infections. *Clin Pharmacokinet* 2004;43:925–42.
- [87] Jeffres MN. The Whole Price of Vancomycin: Toxicities, Troughs, and Time. *Drugs* 2017;77:1143–54. doi:10.1007/s40265-017-0764-7.
- [88] Gardete S, Tomasz A. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 2014;124:2836–40. doi:10.1172/JCI68834.
- [89] Hiramatsu K, Kayayama Y, Matsuo M, Aiba Y, Saito M, Hishinuma T, et al. Vancomycin-intermediate resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Glob Antimicrob Resist* 2014;2:213–24. doi:10.1016/j.jgar.2014.04.006.
- [90] Sieradzki K, Tomasz A. Inhibition of cell wall turnover and autolysis by vancomycin in a highly vancomycin-resistant mutant of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1997;179:2557–66.
- [91] Deresinski S. Vancomycin in combination with other antibiotics for the treatment of

serious methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. Clin Infect Dis 2009;49:1072–9. doi:10.1086/605572.

[92] Watanakunakorn C, Glotzbecker C. Enhancement of antistaphylococcal activity of nafcillin and oxacillin by sisomicin and netilmicin. Antimicrob Agents Chemother 1977;12:346–8.

[93] MacDougall C, Chambers HF. Aminoglycosides. Goodman & Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics. 12th ed., n.d.

[94] Moore RD, Lietman PS, Smith CR. Clinical response to aminoglycoside therapy: importance of the ratio of peak concentration to minimal inhibitory concentration. J Infect Dis 1987;155:93–9.

[95] Toutain PL, del Castillo JRE, Bousquet-Mélou A. The pharmacokinetic-pharmacodynamic approach to a rational dosage regimen for antibiotics. Res Vet Sci 2002;73:105–14.

[96] von Eiff C, Proctor RA, Peters G. Small colony variants of Staphylococci: a link to persistent infections. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 2000;113:321–5.

[97] Lechner S, Lewis K, Bertram R. *Staphylococcus aureus* persists tolerant to bactericidal antibiotics. J Mol Microbiol Biotechnol 2012;22:235–44. doi:000342449.

[98] Schaaff F, Bierbaum G, Baumert N, Bartmann P, Sahl H-G. Mutations are involved in emergence of aminoglycoside-induced small colony variants of *Staphylococcus aureus*. Int J Med Microbiol 2003;293:427–35. doi:10.1078/1438-4221-00282.

[99] von Eiff C, Peters G, Becker K. The small colony variant (SCV) concept -- the role of staphylococcal SCVs in persistent infections. Injury 2006;37 Suppl 2:S26-33. doi:10.1016/j.injury.2006.04.006.

[100] Garcia LG, Lemaire S, Kahl BC, Becker K, Proctor RA, Denis O, et al. Pharmacodynamic evaluation of the activity of antibiotics against hemin- and menadione-dependent small-colony variants of *Staphylococcus aureus* in models of extracellular (broth) and intracellular (THP-1 monocytes) infections. Antimicrob Agents Chemother 2012;56:3700–11. doi:10.1128/AAC.00285-12.

[101] Garcia LG, Lemaire S, Kahl BC, Becker K, Proctor RA, Denis O, et al. Pharmacodynamic Evaluation of the Activity of Antibiotics against Hemin- and Menadione-Dependent Small-Colony Variants of *Staphylococcus aureus* in Models of Extracellular (Broth) and Intracellular (THP-1 Monocytes) Infections. Antimicrob Agents Chemother 2012;56:3700–11. doi:10.1128/AAC.00285-12.

[102] Proctor RA, Peters G. Small colony variants in staphylococcal infections: diagnostic and therapeutic implications. Clin Infect Dis 1998;27:419–22.

[103] Drlica K, Malik M, Kerns RJ, Zhao X. Quinolone-mediated bacterial death. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:385–92. doi:10.1128/AAC.01617-06.

[104] Firsov AA, Zinner SH, Vostrov SN, Portnoy YA, Lubenko IY. AUC/MIC relationships to different endpoints of the antimicrobial effect: multiple-dose *in vitro* simulations with moxifloxacin and levofloxacin. J Antimicrob Chemother 2002;50:533–9.

[105] MacGowan A, Rogers C, Holt HA, Wootton M, Bowker K. Assessment of different antibacterial effect measures used in *in vitro* models of infection and subsequent use in pharmacodynamic correlations for moxifloxacin. J Antimicrob Chemother 2000;46:73–8.

[106] Andes D, Craig WA. Pharmacodynamics of the new fluoroquinolone gatifloxacin in murine thigh and lung infection models. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:1665–70.

[107] Ambrose PG, Grasela DM, Grasela TH, Passarell J, Mayer HB, Pierce PF. Pharmacodynamics of fluoroquinolones against *Streptococcus pneumoniae* in patients with community-acquired respiratory tract infections. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:2793–7. doi:10.1128/AAC.45.10.2793-2797.2001.

[108] Drusano GL, Preston SL, Fowler C, Corrado M, Weisinger B, Kahn J. Relationship

- between fluoroquinolone area under the curve: minimum inhibitory concentration ratio and the probability of eradication of the infecting pathogen, in patients with nosocomial pneumonia. *J Infect Dis* 2004;189:1590–7. doi:10.1086/383320.
- [109] Cui L, Murakami H, Kuwahara-Arai K, Hanaki H, Hiramatsu K. Contribution of a Thickened Cell Wall and Its Glutamine Nonamidated Component to the Vancomycin Resistance Expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2000;44:2276–85. doi:10.1128/AAC.44.9.2276-2285.2000.
- [110] Yanagisawa C, Hanaki H, Matsui H, Ikeda S, Nakae T, Sunakawa K. Rapid Depletion of Free Vancomycin in Medium in the Presence of β -Lactam Antibiotics and Growth Restoration in *Staphylococcus aureus* Strains with β -Lactam-Induced Vancomycin Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:63–8. doi:10.1128/AAC.00762-08.
- [111] Ekdahl C, Hanberger H, Hällgren A, Nilsson M, Svensson E, Nilsson LE. Rapid decrease of free vancomycin in dense staphylococcal cultures. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005;24:596–602. doi:10.1007/s10096-005-0011-0.
- [112] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 8.0 2018.
- [113] McGrath BJ, Kang SL, Kaatz GW, Rybak MJ. Bactericidal activities of teicoplanin, vancomycin, and gentamicin alone and in combination against *Staphylococcus aureus* in an *in vitro* pharmacodynamic model of endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:2034–40.
- [114] Ferro BE, Srivastava S, Deshpande D, Sherman CM, Pasipanodya JG, van Soolingen D, et al. Amikacin Pharmacokinetics/Pharmacodynamics in a Novel Hollow-Fiber *Mycobacterium abscessus* Disease Model. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;60:1242–8. doi:10.1128/AAC.02282-15.
- [115] Gumbo T, Pasipanodya JG, Nuermberger E, Romero K, Hanna D. Correlations Between the Hollow Fiber Model of Tuberculosis and Therapeutic Events in Tuberculosis Patients: Learn and Confirm. *Clin Infect Dis* 2015;61:S18–24. doi:10.1093/cid/civ426.
- [116] Karlowsky JA, Zelenitsky SA, Zhanel GG. Aminoglycoside Adaptive Resistance. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* 1997;17:549–55. doi:10.1002/j.1875-9114.1997.tb03063.x.
- [117] Yuan W, Hu Q, Cheng H, Shang W, Liu N, Hua Z, et al. Cell wall thickening is associated with adaptive resistance to amikacin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 2013;68:1089–96. doi:10.1093/jac/dks522.
- [118] Broussou DC, Lacroix MZ, Toutain P-L, Woehrlé F, El Garch F, Bousquet-Melou A, et al. Differential Activity of the Combination of Vancomycin and Amikacin on Planktonic vs. Biofilm-Growing *Staphylococcus aureus* Bacteria in a Hollow Fiber Infection Model. *Frontiers in Microbiology* 2018;9:572. doi:10.3389/fmicb.2018.00572.
- [119] Nielsen EI, Cars O, Friberg LE. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic (PK/PD) Indices of Antibiotics Predicted by a Semimechanistic PKPD Model: a Step toward Model-Based Dose Optimization ∇ . *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:4619–30. doi:10.1128/AAC.00182-11.
- [120] Jung Y, Song K-H, Cho J eun, Kim H, Kim N-H, Kim TS, et al. Area under the concentration-time curve to minimum inhibitory concentration ratio as a predictor of vancomycin treatment outcome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Int J Antimicrob Agents* 2014;43:179–83. doi:10.1016/j.ijantimicag.2013.10.017.
- [121] Rybak MJ, Lomaestro BM, Rotscahfer JC, Moellering RC, Craig WA, Billeter M, et al. Vancomycin Therapeutic Guidelines: A Summary of Consensus Recommendations from the Infectious Diseases Society of America, the American Society of Health-System Pharmacists, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Clin Infect Dis* 2009;49:325–7. doi:10.1086/600877.

- [122] Song K-H, Kim HB, Kim H, Lee MJ, Jung Y, Kim G, et al. Impact of area under the concentration-time curve to minimum inhibitory concentration ratio on vancomycin treatment outcomes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Int J Antimicrob Agents* 2015;46:689–95. doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.09.010.
- [123] Fridodt-Møller N. How predictive is PK/PD for antibacterial agents? *International Journal of Antimicrobial Agents* 2002;19:333–9. doi:10.1016/S0924-8579(02)00029-8.
- [124] Waineo MF, Kuhn TC, Brown DL. The pharmacokinetic/pharmacodynamic rationale for administering vancomycin via continuous infusion. *J Clin Pharm Ther* 2015;40:259–65. doi:10.1111/jcpt.12270.
- [125] White BP, Lomaestro B, Pai MP. Optimizing the Initial Amikacin Dosage in Adults. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:7094–6. doi:10.1128/AAC.01032-15.
- [126] Patel N, Pai MP, Rodvold KA, Lomaestro B, Drusano GL, Lodise TP. Vancomycin: we can't get there from here. *Clin Infect Dis* 2011;52:969–74. doi:10.1093/cid/cir078.
- [127] Hanrahan T, Whitehouse T, Lipman J, Roberts JA. Vancomycin-associated nephrotoxicity: A meta-analysis of administration by continuous versus intermittent infusion. *Int J Antimicrob Agents* 2015;46:249–53. doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.04.013.
- [128] Development Core Team, R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0 2005.
- [129] Toutain P-L, Bousquet-Mélou A, Martinez M. AUC/MIC: a PK/PD index for antibiotics with a time dimension or simply a dimensionless scoring factor? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007;60:1185–8. doi:10.1093/jac/dkm360.
- [130] Drusano GL. Pre-clinical in vitro infection models. *Current Opinion in Pharmacology* 2017;36:100–6. doi:10.1016/j.coph.2017.09.011.
- [131] Toutain P-L, Ferran A, Bousquet-Mélou A. Species Differences in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. In: Cunningham F, Elliott J, Lees P, editors. *Comparative and Veterinary Pharmacology*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010, p. 19–48. doi:10.1007/978-3-642-10324-7_2.
- [132] Nicasio AM, Bulitta JB, Lodise TP, D'Hondt RE, Kulawy R, Louie A, et al. Evaluation of once-daily vancomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a hollow-fiber infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:682–6. doi:10.1128/AAC.05664-11.
- [133] Lenhard JR, Brown T, Rybak MJ, Meaney CJ, Norgard NB, Bulman ZP, et al. Sequential Evolution of Vancomycin-Intermediate Resistance Alters Virulence in *Staphylococcus aureus*: Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Targets for Vancomycin Exposure. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;60:1584–91. doi:10.1128/AAC.02657-15.
- [134] Zelenitsky S, Harding G, Sun S, Ubhi K, Ariano R. Treatment and outcome of *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia: an antibiotic pharmacodynamic analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003;668–74.
- [135] LaPlante KL, Woodmansee S. Activities of daptomycin and vancomycin alone and in combination with rifampin and gentamicin against biofilm-forming methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in an experimental model of endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:3880–6. doi:10.1128/AAC.00134-09.
- [136] Hogan S, Zapotoczna M, Stevens NT, Humphreys H, O'Gara JP, O'Neill E. In Vitro Approach for Identification of the Most Effective Agents for Antimicrobial Lock Therapy in the Treatment of Intravascular Catheter-Related Infections Caused by *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60:2923–31. doi:10.1128/AAC.02885-15.
- [137] Brown MR, Allison DG, Gilbert P. Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth-rate related effect? *J Antimicrob Chemother* 1988;22:777–80.
- [138] Singh R, Sahore S, Kaur P, Rani A, Ray P. Penetration barrier contributes to bacterial biofilm-associated resistance against only select antibiotics, and exhibits genus-, strain- and antibiotic-specific differences. *Pathog Dis* 2016;74. doi:10.1093/femspd/ftw056.

- [139] Cargill JS, Upton M. Low concentrations of vancomycin stimulate biofilm formation in some clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Pathol* 2009;62:1112–6. doi:10.1136/jcp.2009.069021.
- [140] Conlon BP, Rowe SE, Lewis K. Persister cells in biofilm associated infections. *Adv Exp Med Biol* 2015;831:1–9. doi:10.1007/978-3-319-09782-4_1.
- [141] McConoughey SJ, Howlin R, Granger JF, Manring MM, Calhoun JH, Shirtliff M, et al. Biofilms in periprosthetic orthopedic infections. *Future Microbiology* 2014;9:987–1007. doi:10.2217/fmb.14.64.
- [142] Rodloff A, Bauer T, Ewig S, Kujath P, Müller E. Susceptible, Intermediate, and Resistant – The Intensity of Antibiotic Action. *Deutsches Ärzteblatt International* 2008;105:657–62. doi:10.3238/arztebl.2008.0657.
- [143] Burvenich C, Van Merris V, Mehrzad J, Diez-Fraile A, Duchateau L. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet Res* 2003;34:521–64. doi:10.1051/vetres:2003023.
- [144] Buyck JM, Plésiat P, Traore H, Vanderbist F, Tulkens PM, Van Bambeke F. Increased Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to Macrolides and Ketolides in Eukaryotic Cell Culture Media and Biological Fluids Due to Decreased Expression of *oprM* and Increased Outer-Membrane Permeability. *Clinical Infectious Diseases* 2012;55:534–42. doi:10.1093/cid/cis473.
- [145] Bidgood TL, Papich MG. Plasma and interstitial fluid pharmacokinetics of enrofloxacin, its metabolite ciprofloxacin, and marbofloxacin after oral administration and a constant rate intravenous infusion in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 2005;28:329–41. doi:10.1111/j.1365-2885.2005.00664.x.
- [146] Tohamy MA, El-Gendy AAM. Some pharmacokinetic aspects and bioavailability of marbofloxacin in foals. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences* 2013;2:46–50. doi:10.1016/j.bjbas.2013.09.007.
- [147] Goudah A, Cho H-J, Shin H-C, Shim J-H, Regmi NL, Shimoda M, et al. Pharmacokinetics and milk distribution characteristics of orbifloxacin following intravenous and intramuscular injection in lactating ewes. *J Vet Pharmacol Ther* 2009;32:338–44. doi:10.1111/j.1365-2885.2008.01046.x.
- [148] WAES G, Van BELLEGHEM M. Influence de la mammite sur les propriétés technologiques du lait et sur la qualité des produits laitiers. *Le Lait* 1969;49:266–90.
- [149] Ankomah P, Levin BR. Exploring the collaboration between antibiotics and the immune response in the treatment of acute, self-limiting infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111:8331–8. doi:10.1073/pnas.1400352111.
- [150] Handel A, Margolis E, Levin BR. Exploring the role of the immune response in preventing antibiotic resistance. *J Theor Biol* 2009;256:655–62. doi:10.1016/j.jtbi.2008.10.025.
- [151] Garzoni C, Kelley WL. *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence. *Trends in Microbiology* 2009;17:59–65. doi:10.1016/j.tim.2008.11.005.
- [152] Lallemand EA. 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. phd. Université de Toulouse, Université Toulouse III - Paul Sabatier, 2017.
- [153] Fraunholz M, Sinha B. Intracellular *Staphylococcus aureus*: Live-in and let die. *Front Cell Infect Microbiol* 2012;2. doi:10.3389/fcimb.2012.00043.
- [154] Mora-Bau G, Platt AM, van Rooijen N, Randolph GJ, Albert ML, Ingersoll MA. Macrophages Subvert Adaptive Immunity to Urinary Tract Infection. *PLoS Pathog* 2015;11:e1005044. doi:10.1371/journal.ppat.1005044.
- [155] Lund ME, To J, O'Brien BA, Donnelly S. The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate

- differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. *J Immunol Methods* 2016;430:64–70. doi:10.1016/j.jim.2016.01.012.
- [156] Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: an *in vitro* cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol* 2014;23:37–45. doi:10.1016/j.intimp.2014.08.002.
- [157] Boothe HW, Jones SA, Wilkie WS, Boeckh A, Stenstrom KK, Boothe DM. Evaluation of the concentration of marbofloxacin in alveolar macrophages and pulmonary epithelial lining fluid after administration in dogs. *Am J Vet Res* 2005;66:1770–4.
- [158] Shimizu T, Harada K, Manabe S, Tsukamoto T, Ito N, Hikasa Y. Assessment of urinary pharmacokinetics and pharmacodynamics of orbifloxacin in healthy dogs with *ex vivo* modelling. *J Med Microbiol* 2017;66:616–21. doi:10.1099/jmm.0.000476.
- [159] Vouldoukis I, Rougier S, Dugas B, Pino P, Mazier D, Woehrlé F. Canine visceral leishmaniasis: comparison of *in vitro* leishmanicidal activity of marbofloxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. *Vet Parasitol* 2006;135:137–46. doi:10.1016/j.vetpar.2005.09.003.
- [160] Aldo PB, Craveiro V, Guller S, Mor G. Effect of Culture Conditions on the Phenotype of THP-1 Monocyte Cell Line. *American Journal of Reproductive Immunology* 2013;70:80–6. doi:10.1111/aji.12129.
- [161] Jubrail J, Morris P, Bewley MA, Stoneham S, Johnston SA, Foster SJ, et al. Inability to sustain intraphagolysosomal killing of *Staphylococcus aureus* predisposes to bacterial persistence in macrophages. *Cell Microbiol* 2016;18:80–96. doi:10.1111/cmi.12485.
- [162] Srivastava S, Pasipanodya J, Sherman CM, Meek C, Leff R, Gumbo T. Rapid drug tolerance and dramatic sterilizing effect of moxifloxacin monotherapy in a novel hollow-fiber model of intracellular *Mycobacterium kansasii* disease. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:2273–9. doi:10.1128/AAC.04441-14.
- [163] Schildberger A, Rossmannith E, Eichhorn T, Strassl K, Weber V. Monocytes, peripheral blood mononuclear cells, and THP-1 cells exhibit different cytokine expression patterns following stimulation with lipopolysaccharide. *Mediators Inflamm* 2013;2013:697972. doi:10.1155/2013/697972.
- [164] Bruckmeier M, Kuehnl A, Culmes M, Pelisek J, Eckstein H-H. Impact of oxLDL and LPS on C-type natriuretic peptide system is different between THP-1 cells and human peripheral blood monocytic cells. *Cell Physiol Biochem* 2012;30:199–209. doi:10.1159/000339044.
- [165] Paduch J-H, Herold M, Krömker V. [Diagnostic characteristics of a new California Mastitis Test]. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere* 2013;41:81–7.
- [166] Andrea. Types of immune cells present in human PBMC. *Sanguine Bio Researcher Blog* n.d. <https://technical.sanguinebio.com/types-of-immune-cells-present-in-human-pbmc/> (accessed August 7, 2018).
- [167] The Review on Antimicrobial Resistance, chaired by Jim O’Neill. *Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations*. 2014.
- [168] Carlet J, Le Coz P. Tous ensemble, sauvons les antibiotiques, propositions du groupe de travail spécial pour la préservation des antibiotiques. http://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/rapport_antibiotiques.pdf 2015.
- [169] Communication de la Commission. Lignes directrices pour une utilisation prudente des antimicrobiens en médecine vétérinaire (2015/ C 299/04). https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/antimicrobial_resistance/docs/2015_prudent_use_guidelines_fr.pdf 2015.
- [170] Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:114–22. doi:10.1038/nrd1008.
- [171] Bayer AS, Lam K. Efficacy of vancomycin plus rifampin in experimental aortic-valve

- endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: *in vitro-in vivo* correlations. *J Infect Dis* 1985;151:157–65.
- [172] European Medicines Agency C. Qualification opinion, *In vitro* hollow fiber system model of tuberculosis (HFS-TB) 2015.
- [173] Siala W, Rodriguez-Villalobos H, Fernandes P, Tulkens PM, Van Bambeke F. Activities of Combinations of Antistaphylococcal Antibiotics with Fusidic Acid against Staphylococcal Biofilms in *In Vitro* Static and Dynamic Models. *Antimicrob Agents Chemother* 2018;62. doi:10.1128/AAC.00598-18.
- [174] Zinner SH, Blaser J. *In vitro* models in the study of antibiotic therapy of infections in neutropenic patients. *Am J Med* 1986;80:40–4.
- [175] Döring G, Hoiby N. Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: a European consensus. *Journal of Cystic Fibrosis* 2004;3:67–91. doi:10.1016/j.jcf.2004.03.008.
- [176] Ratjen F, McColley SA. Update in Cystic Fibrosis 2011. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185:933–6. doi:10.1164/rccm.201202-0306UP.
- [177] Gloag ES, German GK, Stoodley P, Wozniak DJ. Viscoelastic properties of *Pseudomonas aeruginosa* variant biofilms. *Sci Rep* 2018;8:9691. doi:10.1038/s41598-018-28009-5.
- [178] Orazi G, O’Toole GA. *Pseudomonas aeruginosa* Alters *Staphylococcus aureus* Sensitivity to Vancomycin in a Biofilm Model of Cystic Fibrosis Infection. *MBio* 2017;8. doi:10.1128/mBio.00873-17.
- [179] Cao B, Christophersen L, Thomsen K, Sønderholm M, Bjarnsholt T, Jensen PØ, et al. Antibiotic penetration and bacterial killing in a *Pseudomonas aeruginosa* biofilm model. *J Antimicrob Chemother* 2015;70:2057–63. doi:10.1093/jac/dkv058.
- [180] Crabbé A, Liu Y, Matthijs N, Rigole P, De La Fuente-Núñez C, Davis R, et al. Antimicrobial efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in a three-dimensional lung epithelial model and the influence of fetal bovine serum. *Sci Rep* 2017;7:43321. doi:10.1038/srep43321.
- [181] Holguín AV, Rangel G, Clavijo V, Prada C, Mantilla M, Gomez MC, et al. Phage ΦPan70, a Putative Temperate Phage, Controls *Pseudomonas aeruginosa* in Planktonic, Biofilm and Burn Mouse Model Assays. *Viruses* 2015;7:4602–23. doi:10.3390/v7082835.
- [182] Alasil SM, Omar R, Ismail S, Yusof MY. Inhibition of Quorum Sensing-Controlled Virulence Factors and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* by Culture Extract from Novel Bacterial Species of *Paenibacillus* Using a Rat Model of Chronic Lung Infection. *Int J Bacteriol* 2015;2015:671562. doi:10.1155/2015/671562.

Parmi les stratégies d'amélioration des traitements des infections bactériennes chroniques, visant à accroître l'activité bactéricide ou à limiter la sélection de résistances, le développement de combinaisons d'antibiotiques existants constitue une stratégie prometteuse.

L'objectif de cette thèse était d'évaluer l'efficacité d'une combinaison d'antibiotiques sur un biofilm bactérien dans un système *in vitro* dynamique qui permet de simuler les concentrations d'antibiotiques observées chez les patients traités.

Nous avons montré que pour des infections complexes dues à de fortes charges bactériennes ou à la présence d'un biofilm, les études dans le système *in vitro* dynamique menées sur plusieurs jours apportaient plus d'informations sur l'efficacité d'une combinaison d'antibiotiques que des techniques standardisées menées avec des concentrations d'antibiotiques stables au cours du temps. Nous avons aussi montré que sur un biofilm, même si certaines associations n'ont pas d'impact sur la biomasse du biofilm elles permettent en revanche de maintenir des populations moins sensibles aux antibiotiques à des seuils relativement bas, alors que les mêmes antibiotiques utilisés seuls favorisent l'émergence de résistances au cours du traitement. Enfin, des essais préliminaires pour mimer des infections comme les mammites bovines ou les cystites ont montré que ce système pouvait être plus largement utilisé pour l'optimisation des schémas thérapeutiques en médecine humaine et en médecine vétérinaire.

Among strategies to improve the treatment of chronic bacterial infections by increasing the bactericidal activity or by limiting the selection of resistance, the development of combinations of existing drugs is a promising strategy.

The aim of this thesis was to evaluate the efficacy of a combination of antibiotics on a bacterial biofilm in a dynamic *in vitro* system which allows to simulate the concentrations observed in patients.

We have shown that for complicated infections due to large bacterial loads or to biofilms, *in vitro* dynamic studies over several days provided more information on the efficacy of a combination of antibiotics than classical methods conducted with constant antibiotic concentrations over time. We have also shown that on a biofilm, even if associations do not have an impact on the overall size of the biofilm, they maintain less-susceptible populations at relatively low levels, whereas the same antibiotics promote the emergence of resistance during treatment when used alone. Finally, preliminary trials to mimic infections such as bovine mastitis or cystitis have shown that this system could be more widely used for the optimization of dosage regimens in human medicine and veterinary medicine.