



HAL
open science

Evaluation expérimentale des concentrations critiques de la témocilline vis-à-vis de souches d'entérobactérales.

Kévin Alexandre

► **To cite this version:**

Kévin Alexandre. Evaluation expérimentale des concentrations critiques de la témocilline vis-à-vis de souches d'entérobactérales.. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2019. Français. NNT : 2019NORMR074 . tel-02435131

HAL Id: tel-02435131

<https://theses.hal.science/tel-02435131v1>

Submitted on 10 Jan 2020

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

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

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Science de la vie et santé

Préparée au sein de l'Université Rouen Normandie

Evaluation expérimentale des concentrations critiques de la témocilline vis-à-vis de souches d'entérobactérales

Présentée et soutenue par

Kévin ALEXANDRE

Né le 01/03/1985

Thèse soutenue publiquement le 20 septembre 2019
devant le jury composé de

Mme Françoise VAN BAMBEKE	Professeur, Université Catholique de Louvain	Rapporteur
M. Pascal CHAVANET	Professeur, Université de Bourgogne	Rapporteur
Mme Audrey MERENS	Professeur, Ecole du Val de Grace	Examineur
M. Bruno FANTIN	Professeur, Université Paris-Diderot	Examineur
M. François CARON	Professeur, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse
M. Manuel ETIENNE	Professeur, Université de Rouen Normandie	Codirecteur de thèse

Thèse codirigée par François CARON et Manuel ETIENNE,
Laboratoire EA2656, Groupe de Recherche sur l'Adaptation Microbienne

Remerciements

A Madame le Professeur Françoise Van Bambeke et Monsieur le Professeur Pascal Chavanet,

Vous me faites l'honneur d'être les rapporteurs de ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde gratitude.

A Madame le Professeur Audrey Merens,

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Bruno Fantin,

Je vous remercie d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse. Surtout, merci de m'avoir initié à la recherche. J'espère que votre pragmatisme, vos idées claires et souvent visionnaires m'accompagneront encore longtemps. Soyez assuré de mon éternelle reconnaissance.

A Monsieur le Professeur François Caron,

Merci pour votre réactivité et vos commentaires constructifs qui ont permis la rédaction du manuscrit en un temps record. Plus largement, merci pour votre accompagnement durant toutes ces années, merci de m'avoir fait grandir et progresser. Il me reste encore quelques années pour espérer acquérir une partie de vos qualités scientifiques et humaines.

A Monsieur le Professeur Manuel Etienne,

Merci pour ton aide précieuse pour la réalisation de ce travail et particulièrement lors des expérimentations animales. Merci pour ta bienveillance tout au long de notre trajet commun. J'espère que nous trouverons le temps pour continuer ces séances brainstorming. Merci de partager ton expérience professionnelle et extra-professionnelle.

A mes collègues du CHU,

C'est un plaisir de partager le quotidien avec vous tous et de m'enrichir à vos côtés. Nous formons une belle équipe avec ses qualités et ses petits défauts. Merci pour votre présence pendant les bons moments et votre incroyable soutien pendant les moins bons.

A mes collègues du GRAM 2.0,

Le GRAM est une famille qui s'agrandit vite et dont je ne connais plus tous les membres. Nous avons encore beaucoup de chose à construire ensemble. Merci à Agnès, Sandrine, Stéphanie, et à tous les membres du GRAM pour votre aide et votre dynamisme. Une pensée particulière pour Nicolas qui reprend le relais et pour Anaïs, notre chemin parallèle au sein du GRAM se sépare bientôt pour le meilleur ! Tu nous manqueras.

A mes amis,

Eh oui, c'est enfin terminé après plus d'une décennie j'obtiendrai peut-être mon dernier diplôme. Merci à tous, pour votre bonne humeur, pour tous ces moments partagés, et pour continuer à m'ouvrir l'esprit en dehors du champ de la médecine et de la recherche.

A ma famille,

A mes parents, mes frères et sœurs, tous d'une manière ou d'une autre vous êtes responsables en partie de ce que je suis aujourd'hui.

A mes enfants, Oscar et Malo, pour quelques heures de sommeil amputé tant de sourire et de moments de bonheur partagés. Merci les loulous !

A Cloé my WildWiseWoman, compagne d'aventures, amarre dans la tempête, écho dans le futur...

Résumé

Titre : Evaluation expérimentale des concentrations critiques de témocilline vis-à-vis de souches d'entérobactérales

Résumé : Dans le monde entier l'antibiorésistance des entérobactérales communautaires, notamment par production de β -lactamase à spectre étendu (E-BLSE), conduit à une consommation préoccupante d'antibiotique de dernier recours tels les carbapénèmes. Dérivé de la ticarcilline la témocilline pourrait représentée une alternative y compris sur certaines entérobactérales productrices de carbapénémase (EPC). Néanmoins, il existe une incertitude concernant les concentrations critiques distinguant les entérobactérales sensibles des résistantes avec trois valeurs selon les pays utilisateurs de témocilline (8 mg/L, 16 mg/L ou 32 mg/L) tandis qu'une harmonisation internationale reste en attente. En ce contexte trois travaux originaux ont été poursuivi ainsi qu'une revue de la littérature.

Il fut d'abord étudié *in vitro* la sensibilité à la témocilline de 762 entérobactérales responsables d'infection urinaire communautaire. Dans un contexte de prévalence faible des E-BLSE (5%) et nulle des EPC, les trois méthodes de routine (disque, automate, Etest) se sont révélées très fiables, la borne épidémiologique pour la témocilline s'établissant à 8 mg/L.

Ensuite, l'efficacité de la témocilline vis-à-vis d'entérobactérales productrices ou non de β -lactamases (E-BLSE ou EPC) a été évaluée dans deux modèles murins complémentaires. Il a été montré l'efficacité de la témocilline à un schéma reproduisant la posologie humaine de 2 g toutes 12 h vis-à-vis d'entérobactérales pour lesquels la CMI de la témocilline était de 8 mg/L. L'efficacité de ce schéma posologique, bien que significative, était moindre vis-à-vis des isolats pour lesquels la CMI de la témocilline était de 16 mg/L. Par contre, il ne fut pas observé d'efficacité significative de la témocilline vis-à-vis des isolats avec une CMI à 32 mg/L quel que soit le schéma posologique (2 g toutes les 8 ou 12 h).

L'ensemble de ces résultats, ainsi qu'une revue exhaustive des données de la littérature, conduisent à proposer une concentration critique de 8 mg/L pour le schéma posologique de 2 g toutes les 12 h, et de 16 mg/L pour celui de 2 g toutes les 8h. Cette dernière proposition correspondrait au « sensible à forte exposition », nouvelle définition de la catégorisation « intermédiaire » selon les dernières recommandations de l'EUCAST.

Mots clés : Témocilline, pharmacocinétique, pharmacodynamique, infection urinaire, concentrations critiques, BLSE, carbapénémase

Abstract

Title: Experimental evaluation of temocillin clinical breakpoints against enterobacterales

Abstract: Worldwide spread of antimicrobial resistance among community-acquired enterobacterales, especially ESBL, leads to a worrying consumption of last resort antibiotics like carbapenem. Derivative of ticarcillin, temocillin may be an attractive carbapenem-sparing agent including against some carbapenemase-producing enterobacterales (CPE). Nevertheless, there is still uncertainty regarding clinical breakpoints with 3 different values depending on countries (8 mg/L, 16 mg/L, 32 mg/L), moreover international consensus about this issue is awaited. In this context, three original studies were conducted along with a literature review.

First, *in vitro* susceptibility to temocillin of 762 enterobacterales from community-acquired urinary tract infection was studied. In this area of low prevalence of ESBL and no CPE, the three routine susceptibility methods (disk diffusion, automate, Etest) were very accurate, epidemiological cut-off was set to 8 mg/L.

Then, temocillin efficacy against enterobacterales producing or not producing β -lactamase (ESBL or CPE) was assessed by two complementary murine models. We demonstrated that temocillin exposure reproducing 2 g q12h regimen showed efficacy against strains with temocillin MIC of 8 mg/L. This regimen exhibited a lower, even though significant, efficacy against strain with temocillin MIC of 16 mg/L. On the other hand, it was not observed significant efficacy against strain with temocillin MIC of 32 mg/L whatever the regimen used (2 g q12h or q8h).

All together this results and the literature review support a clinical breakpoints of 8 mg/L for 2 g q12h regimen, and 16 mg/L for 2 g q8h regimen. This last proposition correspond to the new susceptibility category : “Intermediate – Susceptible, increase exposure” from the last EUCAST recommendations.

Key words: temocillin, pharmacokinetics, pharmacodynamics, urinary tract infections, clinical breakpoints, ESBL, carbapenemase

Sommaire

Liste des figures.....	- 2 -
Liste des tableaux.....	- 3 -
Liste des abréviations	- 4 -
Introduction - Objectifs.....	- 5 -
Revue bibliographique.....	- 7 -
1. <i>Principe de détermination des concentrations critiques des antibiotiques en médecine humaine.....</i>	<i>- 7 -</i>
1.1 Qu'est-ce qu'une concentration critique d'un antibiotique ?.....	- 7 -
1.2 Qui détermine les concentrations critiques ?.....	- 8 -
1.3 Comment est déterminée une concentration critique ?.....	- 9 -
1.4 Regain d'intérêt pour des anciens antibiotiques	- 21 -
2. <i>Témocilline.....</i>	<i>- 22 -</i>
2.1 Historique.....	- 22 -
2.2 Place au sein de la famille des β -lactamines.....	- 22 -
3. Article 1 : Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Temocillin	- 25 -
4. <i>Conclusion de la revue bibliographique.....</i>	<i>- 36 -</i>
Données expérimentales	- 37 -
1. Article 2 : Temocillin against Enterobacteriaceae isolates from community-acquired urinary tract infections: low rate of resistance and good accuracy of routine susceptibility testing methods.....	- 37 -
2. <i>Discussion – conclusion de l'article 2.....</i>	<i>- 45 -</i>
2.1 Discussion.....	- 45 -
2.2 Conclusion	- 53 -
3. Article 3 : Temocillin breakpoints in pyelonephritis: evaluation in a murine model due to ESBL-producing Escherichia coli clinical isolates	- 54 -
4. Article 4 : Activity of temocillin in a lethal murine model of infection of intra-abdominal origin due to KPC-producing Escherichia coli	- 59 -
5. <i>Discussion articles 3 et 4.....</i>	<i>- 66 -</i>
5.1 Différences et complémentarité des modèles expérimentaux.....	- 66 -
5.2 Définition de la cible thérapeutique de la témocilline	- 69 -
5.3 Corrélation schémas posologiques et CMI	- 70 -
5.4 Limites des données actuelles de PK/PD.....	- 71 -
6. <i>Conclusion</i>	<i>- 74 -</i>
Conclusion générale.....	- 75 -
1. <i>Conclusion générale.....</i>	<i>- 75 -</i>
2. <i>Limites des travaux expérimentaux.....</i>	<i>- 77 -</i>
3. <i>Perspectives</i>	<i>- 79 -</i>
Références bibliographiques du texte	- 81 -

Liste des figures

- Figure 1** : Relation univariée entre la probabilité de réponse microbiologique et le %fT>CMI chez 526 patients traités par ceftaroline pour une dermo-hypodermite à *Staphylococcus aureus* - 11 -
- Figure 2** : Probabilité d'atteindre la cible en fonction de trois cibles thérapeutiques et de la distribution des CMI pour le linézolide..... - 15 -
- Figure 3** : Probabilité d'atteindre la cible pour l'imipenème (500 mg toutes les 6 h IV)... - 16 -
- Figure 4** : Distribution des CMI de l'imipenème vis-à-vis de 64332 isolats de *Pseudomonas aeruginosa* d'après la base de données de l'EUCAST..... - 18 -
- Figure 5** : Représentation schématique du processus permettant la définition des concentrations critiques par l'EUCAST - 20 -
- Figure 6** : Structure chimique de différentes sous-classes de β -lactamines..... - 23 -
- Figure 7** : Corrélation entre diamètre d'inhibition de la témocilline (30 μ g, Bio-Rad) et CMI mesurée par dilution en milieu gélosé..... - 46 -
- Figure 8** : Distribution des CMI de la témocilline vis-à-vis d'entérobactérales en fonction des espèces bactériennes et de la production de BLSE - 50 -
- Figure 9** : Distribution des CMI de la témocilline vis-à-vis de 613 (A) et 346 (B) isolats d'entérobactérales - 51 -
- Figure 10** : Distribution des CMI de la témocilline vis-à-vis de 1596 isolats d'E-BLSE .. - 52 -
- Figure 11** : Réduction bactérienne observée au sein des reins (modèle pyélonéphrite) et de la rate (modèle péritonite) en fonction du %fT>CMI chez 203 souris traitées pendant 24 h par témocilline - 67 -

Liste des tableaux

Tableau 1: Probabilité d'atteindre la cible (%) pour différents indices PK/PD pour la ceftazidime (1 g toutes les 8 h)..... - 14 -

Tableau 2 : Proposition de concentrations critiques et de diamètres critiques pour la témocilline
..... - 76 -

Tableau 3 : Schéma posologique de témocilline recommandée selon la catégorisation - 76 -

Liste des abréviations

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ATU : *Area of Technical Uncertainly*

BGN : Bacille à Gram Négatif

BLSE : β -Lactamase à Spectre Etendu

CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CLSI : *Clinical Laboratory Standard Institute*

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CMI₅₀ : Concentration nécessaire pour inhiber 50% des isolats

CMI₉₀ : Concentration nécessaire pour inhiber 90% des isolats

E-BLSE : Entérobactériale productrice de BLSE

ECOFF : *Epidemiological Cut-OFF*

EMA : *European Medicines Agency*

E-PC : Entérobactériale productrice de carbapénèmase

EUCAST : *European Commitee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FDA : *Food and Drug Administration*

PLP : Protéine de liaison aux pénicillines

PK/PD : *PharmacoKinetics and PharmacoDynamics*

PTA : *Probability of Target Attainment*

ZIT : Zone d'Incertitude Technique

fAUC/CMI : Aire sous la courbe de la concentration libre d'antibiotique au-dessus de la CMI

%fT>CMI : Pourcentage de temps où la concentration libre de l'antibiotique se situe au-dessus de la CMI

Introduction - Objectifs

L'antibiorésistance est un problème majeur de santé publique notamment chez les entérobactériales conduisant à une consommation de plus en plus importante d'antibiotique dit de dernier recours et à des impasses thérapeutiques. Ainsi, en parallèle au développement de nouveaux antibiotiques, il existe un regain d'intérêt pour des anti-infectieux plus anciens dont l'utilisation était jusqu'alors marginale pour des raisons diverses tenant parfois simplement à des stratégies de développement.

La témocilline est un antibiotique semi-synthétique de la sous-famille des carboxy-pénicillines, développée dans les années 1980 par modification de la ticarcilline. La témocilline n'était jusqu'en 2014 que commercialisée dans un nombre limité de pays (Royaume-Uni et Belgique) et d'utilisation confidentielle. En effet, son spectre d'activité restreint aux entérobactériales était considéré jusqu'alors comme un désavantage. Du fait d'une activité intrinsèque conservée sur les entérobactériales productrices de β -lactamase à spectre étendu (E-BLSE), la témocilline a connu un regain d'intérêt et l'autorisation de mise sur le marché (AMM) a été obtenue en France en 2014 selon une procédure accélérée. Néanmoins compte-tenu de l'historique particulier du développement de la molécule, il existait en 2016 une incertitude concernant les concentrations critiques de témocilline vis-à-vis des entérobactériales avec trois concentrations critiques différentes selon les indications et les pays. D'où le travail de thèse développé ici.

De ceci découle les objectifs de cette thèse : après une revue bibliographique sur les modalités de définition des concentrations critiques, quatre articles originaux publiés seront présentés. Le premier est une revue générale de la littérature centrée sur la pharmacodynamie et la pharmacocinétique de la témocilline. Le deuxième est une description épidémiologique de la sensibilité des entérobactérales communautaires vis-à-vis de la témocilline. Les deux derniers travaux s'intéressent à l'évaluation *in vivo* de l'efficacité de la témocilline vis-à-vis d'entérobactérales présentant des mécanismes de résistance différents dans deux modèles murins complémentaires. Enfin, une conclusion faisant de la synthèse des différents travaux essaiera de proposer une concentration critique de témocilline vis-à-vis des entérobactérales.

Revue bibliographique

1. Principe de détermination des concentrations critiques des antibiotiques en médecine humaine

1.1 Qu'est-ce qu'une concentration critique d'un antibiotique ?

Une concentration critique est une valeur de concentration minimale inhibitrice (CMI) qui catégorise une bactérie donnée vis-à-vis d'un antibiotique donné en sensible ou non selon la probabilité de succès clinique. Une concentration critique pour un couple antibiotique/espèce bactérienne peut connaître une seule valeur : espèce sensible (S) si $CMI \leq X$ mg/L et espèce résistante si $CMI > X$ mg/L, ou deux valeurs : S si $CMI \leq X$ mg/ et R si $CMI > Y$ mg/L laissant une zone entre les deux valeurs appelée catégorie intermédiaire (I). Classiquement le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) définissait les souches catégorisées S comme « celles pour lesquelles la probabilité de succès thérapeutique est forte dans le cas d'un traitement par voie systémique avec la posologie recommandée dans le résumé des caractéristiques du produit » (1).

Toujours selon les définitions classiques, les souches catégorisées I étaient celles « pour lesquelles le succès thérapeutique est imprévisible, ces souches formant un ensemble hétérogène pour lequel les résultats obtenus *in vitro* ne sont pas prédictifs d'un succès thérapeutique pour une des trois raisons suivantes : (i) souche présentant un mécanisme de résistance dont l'expression *in vitro* est faible, avec pour conséquence leur classement dans la catégorie S, mais la connaissance d'échecs cliniques *in vivo* ; (ii) souche présentant un mécanisme de résistance dont l'expression n'est pas suffisante pour justifier un classement dans la catégorie R, mais suffisamment faible pour espérer un effet thérapeutique dans certaines conditions (fortes concentrations locales ou posologies accrues) ; (iii) zone tampon tenant compte d'incertitudes techniques et biologiques » (1).

Récemment les définitions des catégories cliniques ont été revisitées par l'*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) dont le CA-SFM est membre depuis 2014. Annoncées dès 2017 (2), les nouvelles définitions sont officielles depuis 2019 (EUCAST v9, 2019) à la suite d'une concertation publique ayant suscité beaucoup de débats (www.eucast.org). Désormais S signifie « sensible, schéma posologique standard » : un micro-organisme est catégorisé ainsi quand il existe une haute probabilité de succès thérapeutique en utilisant un schéma posologique standard. Et I correspond à « sensible, à forte exposition » (pour *increased exposure* en anglais) lorsqu'il existe une haute probabilité de succès thérapeutique parce que l'exposition à l'anti-infectieux est augmentée soit par l'utilisation de posologie élevée soit par une concentration importante au site de l'infection (3). La « zone tampon » est désormais signalée différemment au thérapeute par l'acronyme « ATU » en anglais (*area of technical uncertainty*) et « ZIT » en français (*zone d'incertitude technique*). Ainsi une concentration critique définit donc une probabilité de succès clinique pour une espèce bactérienne, un schéma posologique, et souvent une situation clinique (type d'infection : localisation, sévérité) donnés.

1.2 Qui détermine les concentrations critiques ?

D'une part les agences du médicament, européenne (*European Medicines Agency*, EMA) et nord-américaine (*Food and Drug Administration*, FDA), définissent des concentrations critiques lors de la mise sur le marché des nouvelles molécules. En parallèle, des comités nationaux ont été créés pour standardiser l'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques et définir des concentrations critiques. Ainsi, en Europe jusqu'au début des années 2000, il existait six comités nationaux principaux (Allemagne, France [CA-SFM], Norvège, Pays-Bas, Suède, Royaume-Uni) pouvant définir des concentrations critiques distinctes en utilisant des méthodes différentes. Sous l'impulsion de Ian Philips, l'EUCAST fut créé en 1997 avec comme ambition la standardisation des méthodes et l'harmonisation des concentrations critiques. Son action fut

pleinement effective quelques années plus tard grâce à une structuration dans laquelle chaque comité national est représenté, est responsable de l'application des décisions de l'EUCAST, et peut le cas échéant demander une exception aux décisions afin de tenir compte des spécificités nationales (disponibilité des molécules, posologies différentes par exemple) (4).

Aux Etats-Unis d'Amérique, le *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI) est la deuxième entité internationale non gouvernementale d'importance à définir des concentrations critiques. Son organisation et ses méthodes pour la détermination diffèrent de ceux de l'EUCAST : (i) la FDA continue de définir des concentrations critiques en parallèle du CLSI (tandis que l'EMA ne s'y emploie pas), (ii) le financement du CLSI est assuré en partie par de l'industrie pharmaceutique, (iii) cette dernière est représentée et prend part aux décisions du CLSI, (iv) le CLSI n'intègre pas la borne épidémiologique (*cf. infra*) dans la détermination des concentrations critiques (5).

Si à sa création l'EUCAST regroupait six comités nationaux, un nombre important de pays européens et aussi extra-européens l'ont depuis rejoint avec désormais des représentants de cinquante pays chargés de définir les concentrations critiques.

1.3 Comment est déterminée une concentration critique ?

La détermination d'une concentration critique est une procédure complexe intégrant des données de trois ordres (6). D'abord la distribution des CMI au sein des espèces bactériennes d'intérêt. Ensuite les données des essais cliniques permettant de mettre en parallèle la valeur de la CMI et l'évolution sous traitement. Enfin des données de pharmacocinétique et de pharmacodynamie prenant une part croissante dans la définition des concentrations critiques ainsi que discuté *infra*.

1.3.1 Intérêt de la relation pharmacocinétique – pharmacodynamie dans la détermination des concentrations critiques

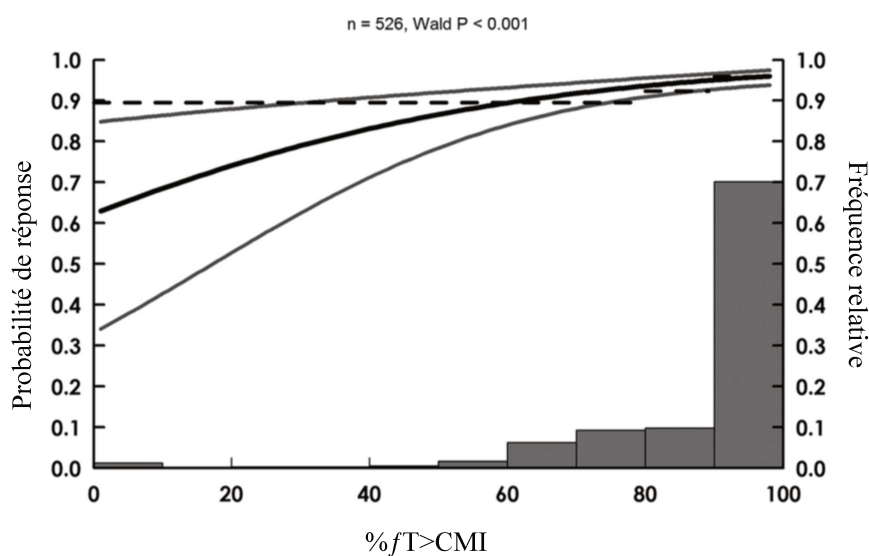
1.3.1.1 *Définition des cibles thérapeutiques*

« Le niveau d'activité antimicrobienne » indiqué par l'EUCAST pour définir une souche sensible fait référence à la relation entre exposition à un antimicrobien et réponse observée (relation exposition – réponse). L'étude de cette relation a été réalisée lors des trois dernières décennies à l'aide de modèles expérimentaux précliniques, principalement murins (7). La pertinence des modèles a depuis été validée par la corrélation entre les cibles thérapeutiques définies chez la souris et l'efficacité clinique observée chez l'homme (8).

Ainsi, le résultat clinique (succès ou échec) dépend d'une relation triangulaire entre (i) l'activité intrinsèque de l'antimicrobien, (ii) la CMI de l'antimicrobien vis-à-vis de l'isolat ciblé et (iii) l'exposition de l'isolat à l'antimicrobien chez le patient (dépendant notamment du schéma thérapeutique et du type d'infection) (9). Pour chaque antibiotique, et plus généralement pour chaque famille d'antibiotiques, il peut être défini des indices dits « PK/PD » intégrant des données de concentration (apportées par la pharmacocinétique : PK par référence au terme anglo-saxon) et d'effet pharmacodynamique (PD) de l'antibiotique au cours du temps. L'indice PK/PD le mieux corrélé à l'efficacité clinique dépend de chaque famille antibiotique. Pour les fluoroquinolones, par exemple, il s'agit de l'aire sous la courbe de la concentration libre d'antibiotique au-dessus de la CMI au cours du temps ($fAUC/CMI$) tandis que pour les β -lactamines il s'agit du temps (exprimé en pourcentage entre les doses) où la concentration libre de l'antibiotique se situe au-dessus de la CMI ($\%f>CMI$) (5).

A l'aide de ces indices PK/PD, il est défini des cibles thérapeutiques correspondant à la valeur minimum de l'indice PK/PD permettant d'obtenir la plus haute probabilité de succès thérapeutique (6). Deux types de méthode sont utilisés pour définir les cibles. D'abord l'approche clinique à travers l'analyse (via des modèles statistiques) des résultats des essais thérapeutiques en mettant en parallèle les indices PK/PD et le succès clinique exprimé soit de manière binaire (succès – échec) soit en pourcentage (généralement 90% de guérison clinique). Une illustration est présentée **figure 1** avec la régression logistique entre le succès microbiologique et l'indice PK/PD ($\%fT > CMI$) chez 526 patients traités par ceftaroline pour une dermo-hypodermite à *Staphylococcus aureus* ; il y apparaît qu'un $\%fT > CMI$ supérieur à 50% est associé à une probabilité de succès microbiologique supérieure à 90%, soit l'objectif généralement admis pour le traitement des infections sévères (10). Néanmoins, ces analyses souffrent paradoxalement du faible taux d'échec thérapeutique observé dans les essais cliniques (notamment pour les nouvelles molécules, 29/526 dans l'exemple de la **figure 1**).

*Figure 1 : Relation univariée entre la probabilité de réponse microbiologique et le $\%fT > CMI$ chez 526 patients traités par ceftaroline pour une dermo-hypodermite à *Staphylococcus aureus**



Régression logistique représentée par une ligne pleine noire et intervalle de confiance (95%) par les lignes fines grises. D'après Bhavnani *et al.* (10)

La seconde approche pour définir les cibles thérapeutiques est préclinique, faisant appel à des expérimentations soit *in vitro* (modèle d'infection en fibres creuses « *hollow fibre infection models* ») (11) soit *in vivo* chez l'animal, ces dernières étant dominées par le modèle d'infection de cuisse de la souris neutropénique (12). Ces modèles précliniques autorisent une grande amplitude de valeurs d'indice PK/PD étudié et l'analyse des mécanismes à l'origine de l'émergence de mutant résistant. Les deux approches (clinique et préclinique) étant corrélées et complémentaires (8) l'EUCAST intègre désormais l'ensemble de ces données pour définir les concentrations critiques (4,6).

1.3.1.2 Des cibles thérapeutiques aux concentrations critiques

Chez un patient donné l'atteinte de la cible thérapeutique dépend de deux facteurs principaux : bien sûr la CMI de l'antibiotique vis-à-vis de la bactérie à l'origine de l'infection mais aussi l'exposition individuelle à cet antibiotique dépendant des paramètres pharmacocinétiques tels le volume de distribution et la clairance d'élimination. Ainsi, une CMI élevée de l'antibiotique vis-à-vis de la bactérie en cause produira un indice PK/PD faible, lui-même associé à une haute probabilité d'échec thérapeutique. La bactérie sera alors définie comme résistante. Par ailleurs, une exposition plus importante à l'antibiotique (par la modification du schéma thérapeutique) peut permettre d'obtenir un indice PK/PD au-delà de la cible thérapeutique et donc *in fine* de catégoriser la bactérie comme sensible.

La détermination des concentrations critiques intègre donc ces deux éléments. La façon la plus simple de définir une concentration critique est de résoudre l'équation entre l'indice PK/PD observé (pour un schéma thérapeutique) sur la concentration critique (la CMI de l'isolat) et l'objectif thérapeutique :

$$\text{Indice PK/PD observé} / \text{concentration critique} = \text{objectif thérapeutique}$$

$$\text{Concentration critique} = \text{indice PK/PD observé} / \text{objectif thérapeutique}$$

Par exemple, l'objectif thérapeutique pour la lévofloxacine vis-à-vis de *Streptococcus pneumoniae* est $fAUC/CMI = 34$ tandis que l'indice PK/PD observé après 500 mg est $fAUC = 40 \text{ mg.h/L}$ (13). Aussi la concentration critique de la lévofloxacine vis-à-vis de *Streptococcus pneumoniae* définie selon cette méthode s'établit à 1 mg/L (*concentration critique = indice PK/PD observé / objectif thérapeutique = 40 / 34 = 1,18 ≈ 1 mg/L*).

Néanmoins cette méthode simple ne permet pas de rendre compte facilement des variations en termes de schémas thérapeutiques, de cibles thérapeutiques et de CMI. Ainsi, une méthode intégrative plus complexe appelée probabilité d'atteindre la cible (PTA pour « probability of target attainment » en anglais) s'appuyant principalement sur une simulation statistique dite de Monte-Carlo est maintenant utilisée.

1.3.1.3 *Simulation de Monte-Carlo et probabilité d'atteindre la cible thérapeutique*

La méthode de Monte-Carlo utilisée pour la première fois en microbiologie par Drusano *et al.* (14) consiste, en l'absence de nombreuses valeurs de pharmacocinétiques reflétant les variations interindividuelles, à simuler ces données. Ainsi, à partir d'un nombre restreint de dosages, il est simulé, en faisant varier les paramètres pharmacocinétiques (tels que le volume de distribution ou la clairance de l'anti-infectieux), un nombre très important (5000 à 10000) de courbes de concentrations de l'anti-infectieux en fonction du temps. Les courbes prédites sont ensuite comparées (via des tests paramétriques utilisant la moyenne et l'écart type) aux courbes observées afin de valider la simulation de Monte-Carlo. Une fois le modèle validé, ce dernier est utilisé pour calculer l'indice PK/PD pour chaque patient simulé et enfin une PTA pour l'ensemble de la population (15).

Il existe deux types de représentations de cette PTA. La première consiste à représenter à l'aide d'un tableau ou d'un graphique (intégrant la distribution des CMI au sein d'une population bactérienne) la PTA en fonction des CMI pour une cible ou plusieurs cibles thérapeutiques (**Tableau 1 – Figure 2**).

Tableau 1: Probabilité d'atteindre la cible (%) pour différents indices PK/PD pour la ceftazidime (1 g toutes les 8 h)

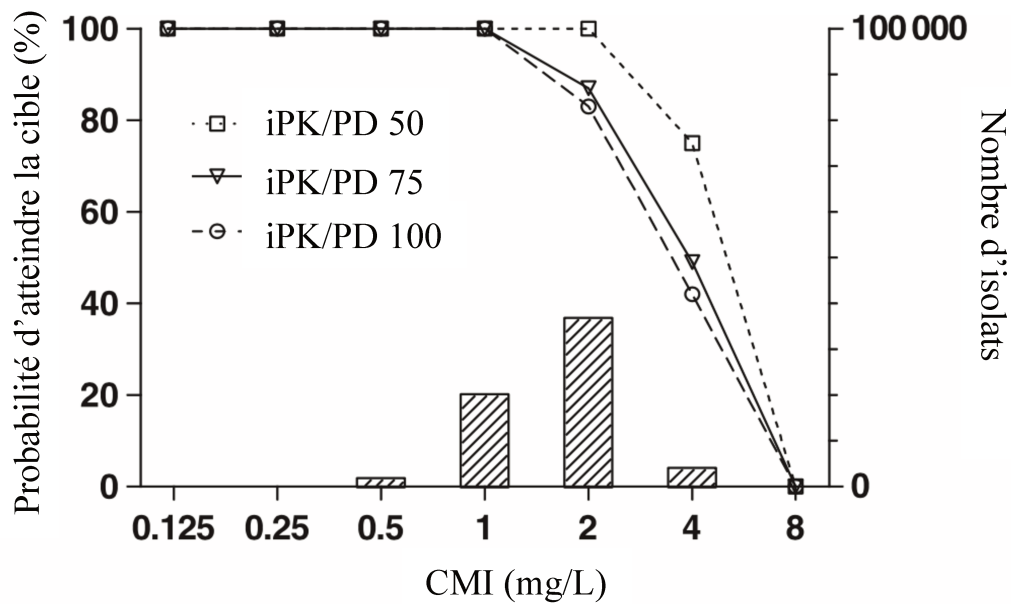
CMI (mg/L)	%fT>CMI			
	30	40	50	60
0,5	100	100	100	100
1	100	100	100	100
2	100	100	100	100
4	100	100	100	100
8	100	99	84	42
16	54	10	1	0
32	0	0	0	0

D'après Mouton *et al.* (16)

Ainsi, la concentration critique peut être déterminée aisément selon la cible thérapeutique et le niveau de probabilité choisis (100%, 95%, 90%). Par exemple, dans le **tableau 1**, une concentration critique de 4 mg/L permet d'atteindre la cible thérapeutique (%fT>CMI=50%) dans 100% des cas.

Puis à l'aide de la **figure 2**, il peut être défini une concentration critique de 1 mg/L permettant d'obtenir une probabilité proche de 100% pour l'ensemble des cibles thérapeutiques choisies mais ne couvrant pas l'ensemble de la distribution des CMI observées chez les isolats.

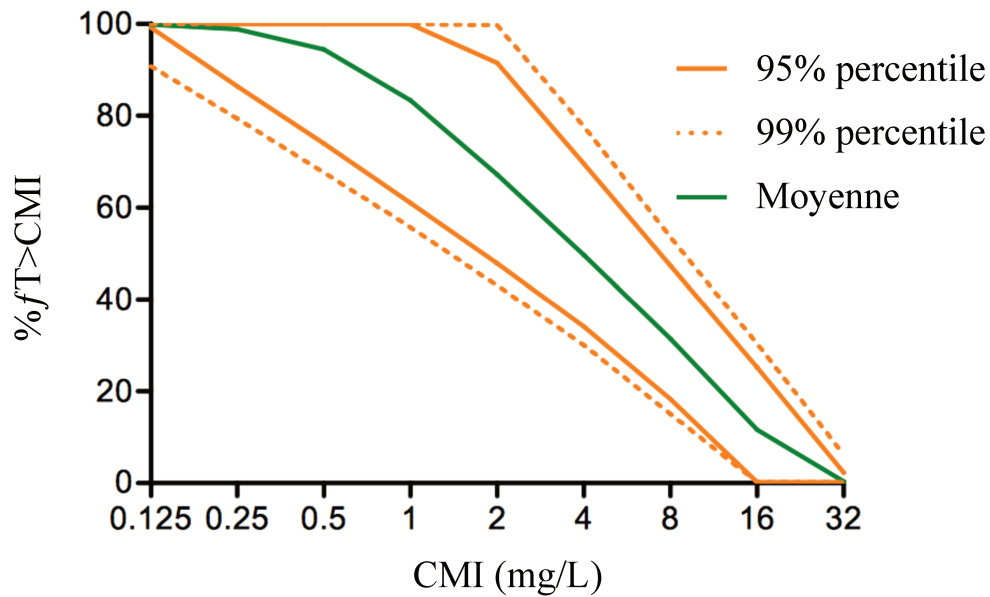
Figure 2 : Probabilité d'atteindre la cible en fonction de trois cibles thérapeutiques et de la distribution des CMI pour le linézolide



iPK/PD : indice pharmacocinétique / pharmacodynamique, D'après Mouton *et al.* (6)

La deuxième représentation consiste à figurer les valeurs de l'indice PK/PD (en intégrant des intervalles de confiance) en fonction des CMI (**figure 3**). Cette représentation permet de s'affranchir *a priori* du choix du niveau de cible thérapeutique. La concentration critique peut être extrapolée par l'intersection entre la valeur de la cible thérapeutique choisie et la borne inférieure de l'intervalle de confiance. Ainsi, un intervalle de confiance de 95% correspond à une probabilité d'atteindre une cible thérapeutique de 97,5% (concentration critique à 2 mg/L pour l'imipénème pour une cible de $fT > CMI$ à 50% dans l'exemple de la **figure 3**). Cette dernière représentation est maintenant privilégiée par l'EUCAST.

Figure 3 : Probabilité d'atteindre la cible pour l'imipenème (500 mg toutes les 6 h IV)



D'après l'EUCAST (accès le 09/06/2019, www.eucast.org)

Il est important de noter que plus les valeurs mesurées (ou observées) permettant la simulation sont dispersées (coefficient de variation élevé), plus l'intervalle de confiance des courbes simulées par la méthode de Monte-Carlo sera important, et *in fine* plus la concentration critique définie par cette méthode aura tendance à être faible.

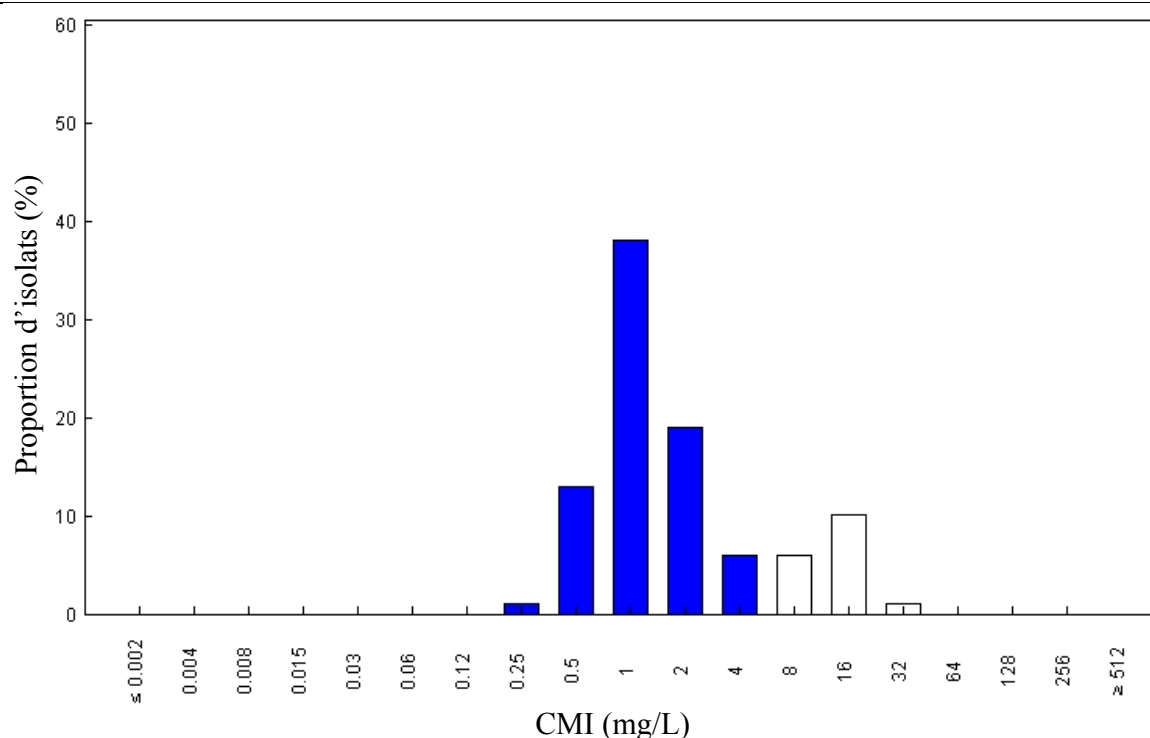
Au final, la détermination des concentrations critiques par l'EUCAST à l'aide des données PK/PD suit un processus complexe. De surcroît, il est important qu'une concentration critique ne divise pas une population bactérienne dépourvue de mécanisme de résistance (population dite « sauvage ») afin que l'ensemble de la population sauvage soit dans la même catégorie (S ou R) et que soit assurée la meilleure reproductivité possible des tests phénotypiques d'étude de la sensibilité (17,18). Afin d'éviter cet écueil l'EUCAST intègre dans la détermination des concentrations critiques la distribution des CMI au sein d'une population sauvage.

1.3.2 Distribution des CMI et borne épidémiologique (Epidemiological Cut-Off – ECOFF)

Ainsi, à l'aide de l'analyse de la distribution des CMI d'un anti-infectieux vis-à-vis d'une population « sauvage », il peut être défini une borne épidémiologique. L'ECOFF est définie comme la plus haute CMI d'un anti-infectieux vis-à-vis d'une population d'isolats bactériens dépourvus de mécanisme de résistance phénotypiquement détectable.

Afin de déterminer l'ECOFF, l'EUCAST s'appuie sur un système unique d'agrégation de distribution des CMI (et des diamètres d'inhibition correspondants) issue d'une grande variété de sources en termes de temporalité, de lieux, de type d'infection, et d'hôte (humain et animal). Ce système permet de générer, après validation selon un cahier des charges rigoureux, des courbes de distribution de CMI et de diamètres d'inhibition pour un nombre extrêmement important de couples antibiotique/espèce bactérienne (plusieurs dizaines de milliers de courbes de distribution représentant plusieurs millions de valeurs de CMI). L'ensemble de ces données est en libre accès sur le site internet de l'EUCAST (www.eucast.org). La **figure 4** illustre la distribution des CMI de l'imipénème vis-à-vis de 64332 isolats de *Pseudomonas aeruginosa* disponible dans ladite base d'où il ressort un ECOFF à 4 mg/L.

Figure 4 : Distribution des CMI de l'imipénème vis-à-vis de 64332 isolats de *Pseudomonas aeruginosa* d'après la base de données de l'EUCAST



Population sauvage en bleue. D'après l'EUCAST (accès le 09/06/2019, www.eucast.org)

L'ECOFF permet pour un couple antibiotique/espèce bactérienne donné de déterminer la plus faible valeur de concentration critique mais est également très utile pour détecter de faibles niveaux de résistance (19), et aussi comparer les niveaux et l'émergence de résistance lorsque les concentrations critiques sont différentes (au fil du temps, selon les comités nationaux même s'il y a désormais une harmonisation européenne, ou encore entre médecine humaine et vétérinaire) (4).

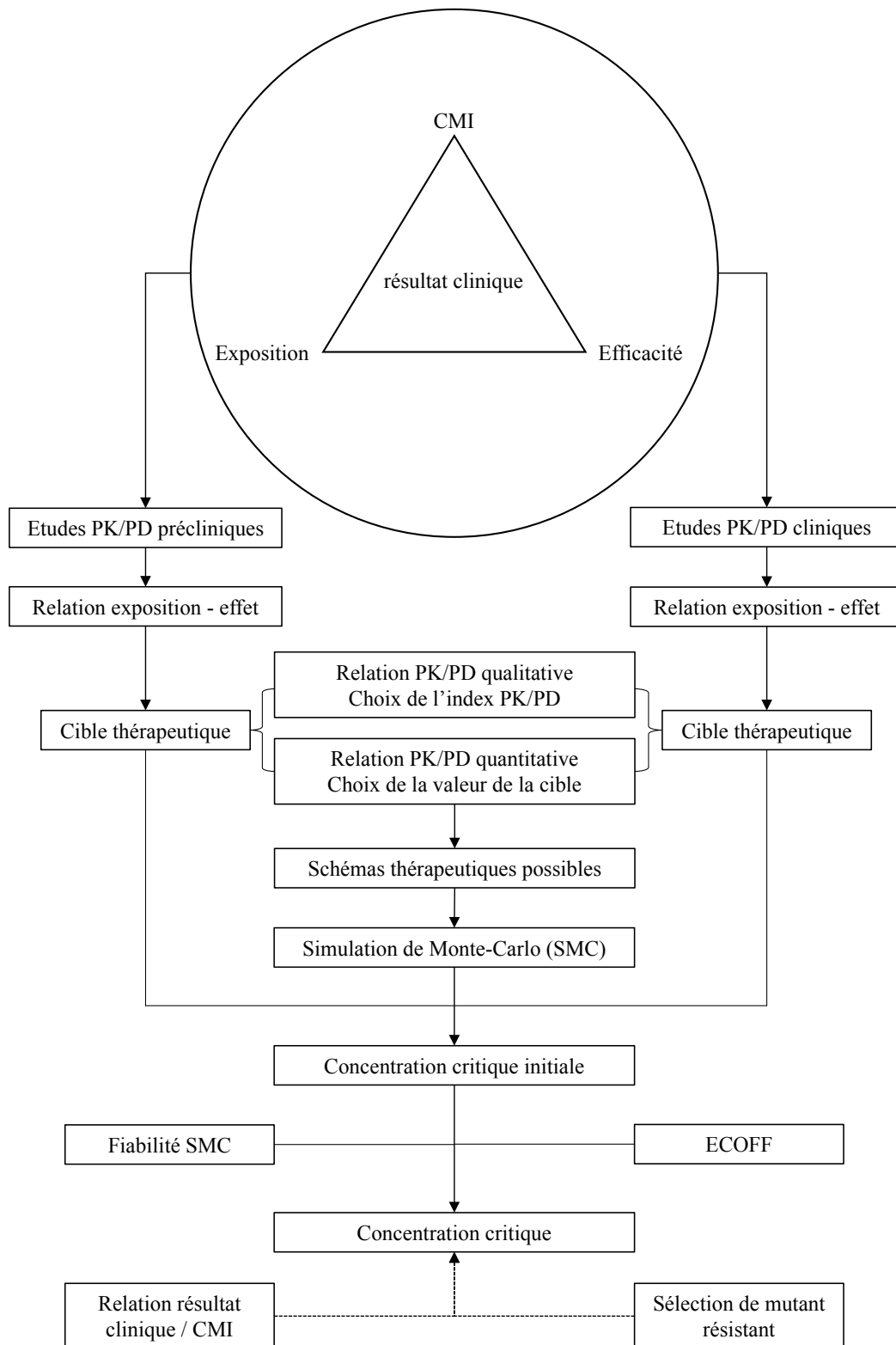
1.3.3 Intégration des données et choix des concentrations critiques par l'EUCAST

Comme résumé dans la **figure 5** d'après Mouton *et al.* (6), l'EUCAST intègre tant les données PK/PD que les données épidémiologiques (ECOFF) pour déterminer les concentrations critiques. Ainsi, lorsque la concentration critique extrapolée par les données PK/PD divise une distribution de CMI chez une population sauvage, l'EUCAST peut décider soit d'augmenter la concentration critique afin de rendre l'ensemble de la population sauvage sensible sous couvert d'une augmentation de la posologie (la concentration critique de l'imipénème vis-à-vis de *P. aeruginosa* est définie à 4 mg/L pour une posologie de 1 g toutes les 6 h) soit au contraire de diminuer la concentration critique pour rendre l'ensemble de la population résistante (exemple de la ciprofloxacine et *S. pneumoniae*).

Enfin, les données sont évolutives afin d'intégrer au fil des années l'expérience clinique et les échecs thérapeutiques en lien avec une éventuelle sélection de mutants résistants. Par exemple la concentration critique de la ciprofloxacine vis-à-vis de *Salmonella spp.* initialement fixée à 0,25 mg/L a été diminuée des années plus tard à 0,06 mg/L devant le constat d'échecs cliniques avec sélection de mutants résistants. *A contrario* la CMI reste à 0,25 mg/L pour les autres entérobactériales en l'absence d'échecs comparables ceci témoignant de la complexité de la problématique.

L'ensemble de ce processus est parfaitement adapté pour les nouvelles molécules dont le développement doit souscrire à un cahier des charges très rigoureux tant pour l'Europe (EMA /EUCAST) que l'Amérique du nord (FDA/CLSI) d'où découlent des dossiers très riches d'informations (20), condition *sine qua none* pour obtenir une AMM. Paradoxalement, bien qu'autorisés depuis parfois un demi-siècle, les anciens antibiotiques connaissent des données bien plus pauvres, *a fortiori* lorsqu'il s'agissait de médicaments « de niche » comme ce fut le cas pendant longtemps pour la témocilline.

Figure 5 : Représentation schématique du processus permettant la définition des concentrations critiques par l'EUCAST



D'après Mouton *et al.* (6)

1.4 Regain d'intérêt pour des anciens antibiotiques

Du fait de l'émergence de bactéries résistantes voire hautement résistantes aux antibiotiques et de la difficulté de développement de nouvelles molécules, il existe un regain d'intérêt pour d'anciens anti-infectieux tels que la colistine, la fosfomycine et la témocilline (21–23).

La grande majorité de ces anti-infectieux a été développée voilà maintenant 30 à 50 ans. Depuis, la structuration administrative pour l'obtention de l'AMM a changé : l'obligation d'obtenir une AMM en prouvant une efficacité clinique pour les antibiotiques aux Etats-Unis d'Amérique n'a été inscrite dans la loi qu'en 1962, tandis que l'EMA qui harmonise les conditions d'obtention des AMM au niveau européen n'a été créée qu'en 1995. Par ailleurs les indications, formulations, posologies et voie d'administration de ces anti-infectieux ont pu être modifiées au fil des années pour des raisons diverses, rendant caduques les concentrations critiques initiales. Surtout les connaissances en termes de relation PK/PD ont considérablement progressé pour aboutir aux règles actuellement en vigueur (24,25).

De ce fait, il existe clairement un écart entre les prérequis actuels nécessaires à l'obtention de l'AMM pour les nouvelles molécules et les données disponibles pour les anciens anti-infectieux, dont l'utilisation « précipitée » est cependant justifiée par l'émergence de la multi-résistance, en particulier chez les BGN. C'est le cas pour la témocilline dont l'usage thérapeutique s'est beaucoup développé en France comme dans d'autres pays ces dernières années, aidé par une autorisation revisitée, mais pour laquelle l'EUCAST n'a à ce jour toujours pas défini de concentration critique tandis que seulement quelques comités nationaux – dont le CA-SFM – se sont prononcés, mais avec des visions divergentes.

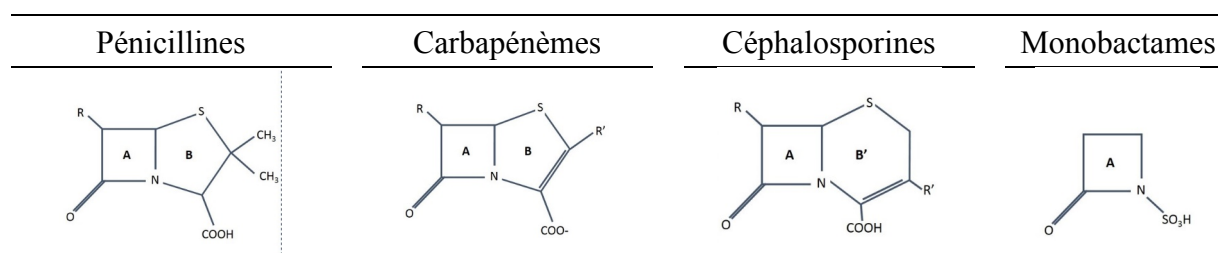
2. Témocilline

2.1 Historique

Dans les années 1980, la témocilline fut développée par le groupe pharmaceutique britannique créé par Thomas Beecham (Beecham Group) connu pour le développement de nombreuses pénicillines semi-synthétiques telle la méticilline (26). En France, jusqu'en 2014 la témocilline n'était disponible que pour le traitement des infections à *Burkholderia cepacia* chez les patients atteints de mucoviscidose via une procédure d'autorisation temporaire d'utilisation. La témocilline n'était alors commercialisée sous le régime d'une AMM que dans un nombre très limité de pays (Royaume-Uni et Belgique) et donc d'utilisation confidentielle. En effet, son spectre d'activité restreint aux entérobactérales était jadis considéré comme un désavantage majeur. A la fin des années 2000, la témocilline a connu un regain d'intérêt du fait d'une activité *in vitro* sur les E-BLSE. Aussi a-t-elle bénéficié d'une modification de son statut avec l'obtention en 2014 d'une AMM en France selon une procédure accélérée.

2.2 Place au sein de la famille des β -lactamines

La famille des β -lactamines (*stricto sensu* β -lactames puisque tous ne contenant pas de fonction aminée ; cependant la terminologie habituelle en France telle que figurant à l'AMM est « β -lactamines pour toutes les molécules) comporte les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames. Leur structure chimique commune tient à un cycle β -lactame auquel s'ajoute ou non un cycle thiazolidine ou dihydrothiazine et des chaînes latérales apportant des spécificités de spectre, de pharmacocinétique et de pharmacodynamique aux différentes molécules (**Figure 6**).

Figure 6 : Structure chimique de différentes sous-classes de β -lactamines

A : cycle β -lactame ; B : cycle thiazolidine ; B' : cycle dihydrothiazine ; R et R' : chaînes latérales

Les β -lactamines agissent sur la paroi bactérienne en bloquant la synthèse du peptidoglycane. La liaison covalente des β -lactamines avec les transpeptidases, chargées de catalyser les ponts inter-peptidiques polymérisant le peptidoglycane, entraîne une inhibition de la synthèse de ce dernier et un effet bactériostatique. Les transpeptidases cibles des β -lactamines sont nommées protéines de liaison à la pénicilline (PLP) (27). L'action bactéricide des β -lactamines n'est pas totalement comprise ; il semble qu'elle soit dépendante du cycle cellulaire, et qu'elle fasse intervenir la production de radicaux hydroxy et d'autolysine (28).

Les principaux mécanismes de résistance aux β -lactamines sont la modification de la cible (altération des PLP), la diminution de la concentration des β -lactamines au niveau de la cible (pompe à efflux, imperméabilité) et la production de β -lactamases.

Les β -lactamases sont des protéines, proches structurellement des PLP, produites par les bactéries et possédant une activité catalytique envers les β -lactamines. Les β -lactamases peuvent être classées selon deux critères : fonctionnel ou moléculaire. La classification fonctionnelle reconnaît 4 groupes (1 à 4) basés sur la caractérisation du substrat et les propriétés d'inhibition (29). La classification moléculaire d'Ambler fondée sur l'analogie de séquence définit également 4 groupes (A à D) (30). Les groupes A, C, et D incluent des enzymes avec une sérine dans leur site actif, alors que les enzymes du groupe B sont toutes des métallo-enzymes dépendantes du zinc (31).

La témocilline est une molécule semi-synthétique de la sous-famille des carboxy-pénicillines, développée dans les années 1980 par modification de la ticarcilline : ajout d'un groupement méthoxy en position 6- α du cycle β -lactame.

L'article 1 présenté ci-après propose une revue de la littérature concernant les propriétés antimicrobiennes, les données pharmacocinétiques et pharmacodynamiques, ainsi que la relation exposition – effet (en lien avec les études PK/PD) de la témocilline.

3. Article 1 : Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Temocillin

Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Temocillin

Auteurs : K. Alexandre, B. Fantin

Publié en Mars 2018 dans Clinical Pharmacokinetics

Doi :[10.1007/s40262-017-0584-7](https://doi.org/10.1007/s40262-017-0584-7)



REVIEW ARTICLE

Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Temocillin

Kevin Alexandre¹ · Bruno Fantin^{2,3}

© Springer International Publishing AG 2017

Abstract Temocillin, a 6- α -methoxy derivative of ticarcillin, is a forgotten antibiotic that has recently been rediscovered, and issues about clinical breakpoints and optimal therapeutic regimens are still ongoing. Temocillin spectrum is almost restricted to *Enterobacteriaceae*. The addition of the α -methoxy moiety on ticarcillin confers resistance to hydrolysis by Ambler classes A and C β -lactamases (extended spectrum β -lactamases, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase and AmpC hyperproduced enzymes). Temocillin is bactericidal, and the effect of inoculum size on its activity is relatively mild. The proportion of spontaneous resistant mutants in vitro to temocillin is low, as found in vivo. After intravenous infusion, temocillin showed a prolonged elimination half-life of approximately 5 h. The percentage of protein binding of temocillin is high (approximately 80%), and is concentration-dependent. Temocillin clearance is mainly renal, and urinary recovery is high, ranging from 72 to 82% after 24 h. Furthermore, the penetration of temocillin into bile and peritoneal fluid is high, but poor into cerebrospinal fluid. The cumulative percentage of a 24-h period during which the free drug concentration exceeds the minimum inhibitory concentration (fT > MIC) at steady-state pharmacokinetic conditions seems to be the best pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) index correlating with temocillin efficacy. An fT > MIC of

40–50% is associated with antibacterial effect and survival in vivo. Monte Carlo simulations performed in critically ill patients showed that the 2 g every 12 h and 2 g every 8 h regimens provide a 95% probability of target attainment of 40% fT > MIC up to an MIC of 8 mg/L. In less severely ill patients or in specific foci of infection, such as urinary tract infection, a 4 g daily regimen should be adequate for strains with temocillin MIC up to 16 mg/L. Data regarding actual wild-type MIC distribution, clinical efficacy, PK profiling in volunteers or patients, and PD targets are scarce, and further studies are required to support appropriate dosing recommendations and determination of clinical breakpoints.

Key Points

Temocillin is an old antibiotic that has been rediscovered because of its limited spectrum of activity focused on resistant enterobacteriaceae, which are worrying bacteria worldwide.

Optimal dosing regimens of temocillin, according to bacterial susceptibility and patient characteristics, are not yet well-defined.

Additional pharmacokinetic studies are required in infected, non-intensive care unit patients.

✉ Bruno Fantin
bruno.fantin@bjn.aphp.fr

¹ Infectious Diseases Department, Rouen University Hospital, GRAM (EA2656), Rouen, France

² Univ. Paris Diderot, IAME, UMR 1137, Sorbonne Paris Cité, 75018 Paris, France

³ Service de Médecine Interne, Hôpital Beaujon, AP-HP, 100 boulevard du Général Leclerc, 92110 Clichy, France

1 Introduction

Temocillin (BRL 17421) is a 6- α -methoxy derivative of ticarcillin belonging to the β -lactam family (Fig. 1), marketed as Negaban[®] (Eumedica, Brussels, Belgium), which contains an R:S epimer ratio of approximately 65:35.

Temocillin exhibits a low molecular weight (414 Da) and high water solubility ($\log D$ at pH 7.4 = -5.19) [1].

Temocillin was developed in the 1980s but was quickly abandoned due to its narrow spectrum, which, at that time, was perceived as a major drawback. It was mainly used as an orphan drug for the treatment of *Burkholderia cepacia* infections in patients with cystic fibrosis. As the epidemiologic threat of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* (ESBL-E) has grown, interest in neglected and disused antibiotics, such as colistin, ceftioxin, fosfomycin and temocillin, has increased [2]. Indeed, the singular spectrum of temocillin, almost restricted to *Enterobacteriaceae*, and its resistance to hydrolysis by numerous β -lactamases are now recognised as an important ecological and bacteriological advantage.

To date, temocillin is available in numerous countries (UK, Belgium, Luxembourg and France) and is recommended for the treatment of septicemia, urinary tract infection (UTI) and lower respiratory tract infection where susceptible Gram-negative bacilli are suspected or confirmed. French guidelines for the management of acute UTI restricted its use for documented UTI caused by proven susceptible ESBL-E [3].

We reviewed the antimicrobial activity, pharmacodynamics (PD) and pharmacokinetics (PK) of temocillin, and the impact of the temocillin PK/PD profile on its therapeutic use in clinical practice and in specific populations.

2 Antimicrobial Activity

The addition of the α -methoxy moiety on ticarcillin structure has some microbiological consequences.

1. Temocillin has reduced affinity to penicillin-binding protein (PBP)1, PBP2 and PBP3, but binds tightly to PBP5 and PBP6 [4, 5], explaining the restricted spectrum to *Enterobacteriaceae* and the lack of activity against Gram-positive bacteria and anaerobic bacteria [6–16]. Remarkably, *Neisseria gonorrhoea* is usually sensitive to temocillin (Table 1) [17].

2. By blocking the entry of a water molecule into a serine-dependent active site of β -lactamase [18], the α -methoxy radical confers resistance to hydrolysis by Ambler classes A and C β -lactamase (i.e. ESBL, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase [KPC] and AmpC hyperproduced enzymes), but not to class B metalloenzymes or some class D enzymes (Table 2) [19–28].

The MexAB-OprM-driven efflux contributes to the intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to temocillin, but some strains (15%) with mutations in *mexA* or *mexB*, isolated from cystic fibrosis patients, are sensitive to temocillin, with minimum inhibitory concentrations (MICs) ≤ 8 mg/L [29, 30].

3 Pharmacodynamics

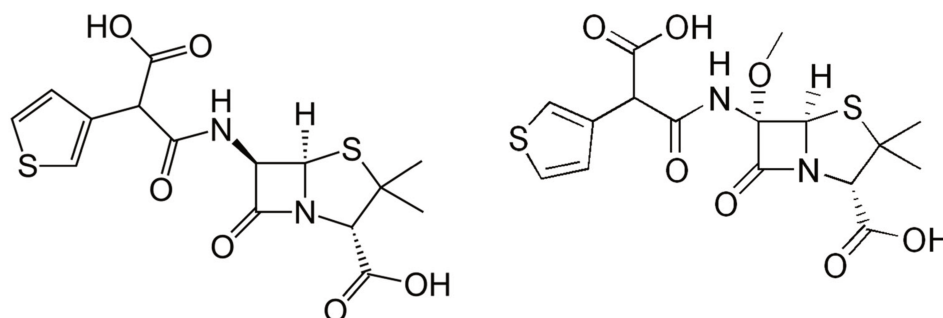
3.1 Relationship Between Concentrations and Bactericidal Activity

Temocillin is bactericidal, like all β -lactams, with minimal bactericidal concentration (MBC) values being the same or twofold greater than MIC values for *Enterobacteriaceae* [6, 7]. Bactericidal activity under discontinuous exposure to temocillin concentrations in vitro, simulating serum PKs of 2 g every 12 h in humans, showed a rapid bactericidal effect (< 8 h) against *Enterobacteriaceae*, with an MIC of 2 mg/L [10]. Nevertheless, bactericidal kinetics are slower against *Enterobacteriaceae* with chromosomal AmpC β -lactamase, despite similar temocillin MICs [8, 10]. The in vitro postantibiotic effect of temocillin has not yet been specifically assessed, but, as for other penicillins, it is expected to be absent against *Enterobacteriaceae*.

3.2 Inoculum Effect

The effect of inoculum size on temocillin activity is relatively mild and β -lactamase-producing-dependent. Indeed, minimal MIC and MBC changes are observed, with growing inoculum size between 10^3 and 10^7 colony-

Fig. 1 Chemical structure of ticarcillin (left) and temocillin (right). Adapted from PubChem



Temocillin PKPD

Table 1 Temocillin activity against various bacteria without acquired resistance [6–16]

Organisms	No. of isolates	MIC range (mg/L)	MIC50 (mg/L)	MIC90 (mg/L)
Enterobacteriaceae				
<i>Citrobacter freundii</i>	172	2–64	4	16
<i>Enterobacter cloacae</i>	445	1–128	4	8
<i>Escherichia coli</i>	932	0.5–32	4	8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	547	0.5–32	4	8
<i>Klebsiella oxytoca</i>	119	0.5–16	2	4
<i>Morganella morganii</i>	119	1–8	4	8
<i>Proteus mirabilis</i>	353	0.5–32	2	4
<i>Proteus vulgaris</i>	113	0.5–4	2	4
<i>Salmonella</i> spp.	212	1–16	4	8
<i>Serratia marcescens</i>	303	2–256	16	32
<i>Shigella</i> spp.	27	2–32	8	16
<i>Providencia stuartii</i>	86	1–256	2	4
Other Gram-negative rods				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	104	64 to ≥ 256	≥ 256	≥ 256
<i>Acinetobacter</i> spp.	51	2 to ≥ 256	≥ 256	≥ 256
<i>Burkholderia cepacia</i>	106	2 to ≥ 256	8	32
<i>Haemophilus influenzae</i>	218	0.1–2	1	2
Gram-positive cocci				
<i>Staphylococcus</i> spp.	110	≥ 256	≥ 256	≥ 256
<i>Streptococcus</i> spp.	21	64 to ≥ 256	≥ 256	≥ 256
<i>Enterococcus</i> spp.	50	≥ 256	≥ 256	≥ 256
Gram-negative cocci				
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	484	0.05–2	0.5	1
<i>Neisseria meningitidis</i>	32	0.05–0.125	0.125	0.125
Anaerobic Gram-negative				
<i>Bacteroides</i> spp.	118	8 to ≥ 256	32	≥ 256
Anaerobic Gram-positive				
<i>Clostridium</i> spp.	9	≥ 256	≥ 256	≥ 256

MIC minimum inhibitory concentration, MIC50 concentration required to inhibit 50% of the strains, MIC90 concentration required to inhibit 90% of the strains

Table 2 Cumulative temocillin MIC frequencies against *Enterobacteriaceae* according to β -lactamase production [19–28]

β -lactamase producing <i>Enterobacteriaceae</i>	MIC (mg/L)									
	≤ 0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	≥ 256
ESBL (<i>n</i> = 1603)	0	0	7	20	72	92	99	100	100	100
CTX-M (<i>n</i> = 1134)	0	0	8	19	74	93	100	100	100	100
Non-CTX-M ESBL (<i>n</i> = 207)	0	0	7	21	60	84	99	100	100	100
dAmpC (<i>n</i> = 265)	0	0	5	23	60	89	98	100	100	100
Carba-R (<i>n</i> = 1128)	0	1	2	10	31	52	66	74	100	100
KPC (<i>n</i> = 702)	0	1	3	16	49	79	94	99	100	100
OXA-48 (<i>n</i> = 101)	0	0	0	0	0	0	4	10	100	100
VIM/NDM/IMP (<i>n</i> = 252)	0	0	0	0	0	3	11	27	100	100
Without carbapenemase production (<i>n</i> = 73)	0	0	1	3	16	40	70	92	97	100

MIC minimum inhibitory concentration, ESBL extended spectrum β -lactamase, CTX-M cefotaximase-Munich, dAmpC derepressed AmpC cephalosporinases, Carba-R carbapenem-resistant strains, KPC *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, VIM Verona integron-encoded metallo- β -lactamase, NDM New Delhi metallo- β -lactamase, IMP active on imipenem

forming units (CFU)/mL for *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, whereas inoculum effect is markedly higher for *Enterobacteriaceae* with chromosomal AmpC β -lactamase (i.e. *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Morganella moraganii*, *Providencia stuartii*), mostly on MBC, with an 8- to 16-fold increase between 10^5 and 10^7 CFU/mL [6]. A modest inoculum effect was observed on MIC with emerging β -lactamase-producing strains (i.e. CTX-M-15, KPC), with a two- to fourfold MIC increase, but data regarding inoculum effect on MBC are lacking for such strains [26, 31].

3.3 Protein-Binding Impact

Since temocillin is highly bound to human serum proteins ($\approx 80\%$), the impact of protein binding on MIC was assessed in vitro by adding human serum or albumin to the medium. A two- to fourfold increase of MIC was observed in the presence of human serum, but the maximal killing rate (obtained at a concentration of four times the MIC) was not impaired by the addition of human serum, suggesting that the impact of protein binding on temocillin activity in vivo may be limited [6, 7, 31].

3.4 Mutant Selection Frequency

The proportion of spontaneous resistant mutants in vitro to temocillin is low (ranging from 1×10^{-8} to 1×10^{-10}), is not affected by β -lactamase production, and appears only after repeated (six to eight) subcultures [7, 26, 31]. These data are consistent with data found in vivo, with no temocillin mutant selection after treatment for 24 h in two animal models with two different inoculum sizes (10^5 and 10^7 CFU/mL) [31, 32]. Only one case of breakthrough bacteraemia during temocillin treatment has been reported, occurring in a *K. pneumoniae*-infected patient with transient renal dysfunction and probable insufficient dosing regimen (1 g once daily) [33]. In such mutants, resistance mechanisms to temocillin are still poorly studied.

3.5 Drug-to-Drug Interaction

3.5.1 Antibiotic Interaction Effect

The in vitro combination effect of temocillin with aminoglycosides produces no synergistic action against *Enterobacteriaceae* [6, 34], as against *Burkholderia cepacia* [11].

3.5.2 Temocillin Compatibility with Other Drugs

Temocillin compatibility with other drugs under conditions mimicking their coadministration through the same line of

infusion was assessed in one study. The main incompatibilities were with carbapenems, piperacillin/tazobactam and amoxicillin/clavulanate for chemical incompatibilities, and vancomycin, ciprofloxacin, propofol, and midazolam for physical incompatibilities [35]. These incompatibilities should be kept in mind as the combination of two or three antimicrobial agents through prolonged or continuous infusion is recommended for treating infections by multidrug-resistant, Gram-negative bacteria, especially in critically ill patients [36].

4 Pharmacokinetics (PKs)

4.1 PK Parameters in Healthy Volunteers

No oral formulation of temocillin is available; an o-methyl phenyl ester was studied but is not presently marketed [37]. Temocillin is administered intramuscularly or intravenously at doses of 1 or 2 g two or three times daily. The percentage of protein binding of temocillin is high (approximately 80%), and is concentration-dependent. Decreased serum binding was observed with increasing doses of temocillin (i.e. 85% after intravenous administration of 500 mg vs. 63% after intravenous administration of 2 g) [7, 38, 39]. Indeed, Overbosch et al. found that there was only one binding site for temocillin on each albumin molecule [38]. Key PK parameters from 10 healthy subjects are reported in Table 3 [39].

As a consequence of protein-binding saturation, the volume of distribution increases with increasing temocillin doses [39, 40]. The urinary concentration of temocillin after 500 mg twice daily is approximately 500 mg/L [7]. The penetration of temocillin in prostate tissue was assessed in 20 patients receiving a 2 g intravenous dose of temocillin prior to prostatectomy. The mean temocillin concentration was 38 and 27 mg/kg in peripheral and central prostate tissue, respectively [41]. Furthermore, the bile concentrations of temocillin were assessed in two studies in patients with biliary tract diseases [42, 43], and were up to eight to ten times the corresponding serum concentrations, but with huge variations in the bile/serum concentration ratios. Two studies focused on the intraperitoneal penetration of temocillin. Mean temocillin concentrations in peritoneal fluid were 46 mg/L 2 h after intravenous administration of 1 g, and 52 mg/L 4 h after intravenous administration of 2 g, corresponding to a tissue/plasma area under the curve over 24 h ratio of 0.6. Remarkably, temocillin accumulation was noted with a tissue/plasma concentration ratio of 1.7, 12 h after infusion [44, 45]. Cowan et al. studied lung tissue penetration of temocillin in eight patients undergoing elective resection of the whole or part of the lung. The serum and lung tissue

Temocillin PKPD

Table 3 Mean pharmacokinetics parameters (SD) of temocillin in 10 healthy volunteers [39]

Dose (g)	C_{max} (mg/L)	$t_{1/2}$ (h)	Vd_{ss} (L/kg)	AUC_{∞} (mg·h/L)	CL (mL/min)	CL_R (mL/min)	Urinary recovery (0–24 h, %)
0.5	77.9 (±28.4)	5.2 (±0.3)	0.15 (±0.01)	344.1 (±18.7)	25.0 (±1.5)	18.5 (±3.2)	74.0 (±12.9)
1.0	160.8 (±58.2)	5.0 (±0.2)	0.17 (±0.01)	573.3 (±27.8)	29.7 (±1.4)	19.6 (±5.0)	66.1 (±16.8)
2.0	236.1 (±93.3)	5.0 (±0.2)	0.24 (±0.01)	784.5 (±47.1)	43.8 (±2.7)	29.8 (±2.6)	68.1 (±6.0)

C_{max} maximum plasma concentration, $t_{1/2}$ elimination half-life, Vd_{ss} volume of distribution at steady-state, AUC area under the plasma concentration-time curve from time zero to infinity, CL total body clearance from plasma, CL_R renal clearance of drug from plasma, SD standard deviation

concentrations of temocillin were determined 30 min after a 2 g intravenous bolus of temocillin. The mean lung tissue concentration was 45 mg/kg, corresponding to a tissue/serum concentration ratio of 0.26 [46]. Temocillin concentration in sputum after administration of 2 g twice daily was approximately 2 mg/L [47]. Brückner et al. assessed the diffusion of temocillin in cerebrospinal fluid (CSF) in four neurosurgical patients with external ventricular drains and four patients with meningitis. The temocillin dose was 2 g twice daily. Temocillin concentration in CSF was low, with a CSF/serum concentration ratio of approximately 10%, albeit this ratio was higher in meningitis patients (15%, versus 8% in patients without meningitis). No CSF temocillin accumulation was observed [48]. Table 4 summarises temocillin concentrations in various tissues and compartments.

After intravenous infusion, temocillin showed a prolonged elimination half-life of approximately 5 h, regardless of dose infusion (i.e. 0.5, 1 or 2 g). Temocillin clearance is mainly renal. Glomerular filtration is more important than tubular excretion as probenecid slightly affects renal clearance of temocillin [38]. Renal clearance of temocillin increases with dose, but, as serum binding decreases, the renal clearance of free temocillin is not affected by dose variation [38]. The urinary recovery of unmetabolised temocillin is high, ranging from 72 to 82% after 24 h [7].

4.2 PKs in Specific Populations

4.2.1 Patients with Renal Impairment

As temocillin is primarily excreted by the renal route, impairment of renal function altered temocillin PKs. Nevertheless, peak serum concentration and distribution volume at steady state are not influenced by renal impairment. Temocillin clearance is found to be linearly correlated with creatinine clearance; therefore, several dosage adjustments have been proposed with dose or interval adjustments. As temocillin is a time-dependent antibacterial effect, and serum concentrations of temocillin in the

first 4 h are not affected by renal impairment, interval adjustments should be preferred (Table 5) [40, 49, 50].

4.2.2 Intermittent Haemodialysis Patients

In patients with end-stage renal disease (ESRD), the elimination half-life of temocillin is markedly prolonged—26 h for a 2 g every 48 h schedule. Volume of distribution is not affected in haemodialysis patients as it is in patients with renal impairment, and huge variations are observed in serum albumin and protein binding in ESRD. Temocillin is highly dialysable, with a fraction eliminated by dialysis of approximately 55%. According to these results, a three-times-weekly schedule was proposed by Vandecasteele et al., producing a time during which the free serum concentration remained above the MIC ($\%fT > MIC$) as high as 50–90%, even for MICs of 16 mg/L [51].

4.2.3 Intensive Care Unit Patients

Key PK parameters were evaluated in one study of 10 intensive care unit (ICU) patients. After a 2 g infusion of temocillin, peak serum concentration (147 mg/L), volume of distribution (14.3 L), total clearance (40.7 mL/min), serum half-life (4.3 h), and protein binding (76.3%) were consistent with values observed in healthy volunteers, despite use of two different PK/PD models (i.e. a one-compartment model for critically ill patients, a two-compartment open model for healthy volunteers) [35, 39]. Nevertheless, wide variations of PK parameters (mainly on clearance and volume of distribution) were observed in ICU patients, as reported for other β -lactams in ICU patients [52].

5 PK/PD Relationship and Temocillin Activity

5.1 PK/PD Predictive Parameter

Despite numerous in vivo studies having defined the cumulative percentage of a 24-h period during which the

Table 4 Temocillin penetration in various tissues and compartments [7, 41, 42, 44, 46, 48, 59]

Tissue/compartiment	Dose	No. of patients	Method	Time to sample (h)	Mean concentration	Tissue/plasma concentration ratio
Lung	2 g IV	8	Microbiological	0.5	45 mg/kg	0.26
Prostate	2 g IV	20	Microbiological	1.8	38 mg/kg	0.35
Peritoneal fluid	1 g IV	26	Microbiological	1	58 mg/L	0.59
Peripheral lymph	1 g IV	5	Microbiological	2	30 mg/L	0.64
Urine	500 mg IM	10	Microbiological	12	490 mg/L	98
Cerebrospinal fluid	2 g IV	8	HPLC	2	10 mg/L	0.10
Muscle	2 g IV	6	Microbiological	4	18 mg/kg	0.15
Bile	1 g IV	16	Microbiological	1	120 mg/L	1.10

HPLC high-performance liquid chromatography, IV intravenously, IM intramuscularly

Table 5 Dose adjustments for subjects with renal impairment

CL _{CR} (mL/min)	Daily dose		
	2 g ^a	4 g ^a	6 g ^b
>50	1 g q12 h	2 g q12 h	2 g q8 h
31–50	1 g q12 h	2 g q24 h	1 g q8 h
10–30	1 g q24 h	2 g q24 h	1.5 g q24 h
<10	1 g q48 h	2 g q48 h	750 mg q24 h
Haemodialysis ^c	NA	2 g q48 h ^c	2 g q48 h ^c

NA not available, CL_{CR} creatinine clearance, q x h every x hours

^a Leroy et al. [49]

^b Laterre et al. [55]

^c Vandecasteele et al. [51]

free drug concentration exceeds the MIC (%fT > MIC) at steady-state PK conditions, such as the major PK/PD index correlating with the efficacy of β -lactam antibiotics against Gram-negative bacteria [53], no specific study aimed to define the best PK/PD index correlating with the in vivo efficacy of temocillin. Nevertheless, it could be postulated that temocillin follows the same PK/PD index as other β -lactam antibiotics. Indeed, two experimental studies confirmed this hypothesis. In a murine model of UTI, Soubirou et al. treated mice infected with a well-characterised uropathogenic *E. coli* with a temocillin MIC of 8 mg/L, with various therapeutic schedules. The authors found that the fT > MIC was well-correlated with the maximum effect (E_{\max}) after 24 h of temocillin treatment [31]. Interestingly, they also found that the E_{\max} was observed for a fT > MIC of 40%, which is consistent with values for penicillin associated with bacteriostatic effect and survival in animal models with Gram-negative bacteria [54]. In a lethal murine model of infection, Alexandre et al. treated mice infected by isogenic strains with increasing temocillin MIC (MICs from 8 to 256 mg/L) with a humanised therapeutic

schedule [32]. Reduction in viable bacteria counts and survival rates after 24 h of treatment with temocillin were correlated with fT > MIC [32]. Together, these data suggest that fT > MIC is the best PK/PD index correlating with temocillin efficacy, and that a fT > MIC of 40–50% is associated with antibacterial effect and survival in vivo.

5.2 Probability of Target Attainment

Due to its singular commercial history, few data are available regarding the temocillin PK/PD index and probability of target attainment (PTA) for various dosing regimens in different patient populations. Indeed, only two studies using Monte Carlo simulations are available, focusing only on ICU patients. The first set of Monte Carlo simulations was performed by De Jongh et al. with PK data from six subjects receiving 30-min infusions of 2 g every 12 h for a mean duration of therapy of 8 days [35]. Population PK modelling was performed using a one-compartment model. The PTA of temocillin was estimated for one dosing regimen (2 g every 12 h) for MIC targets ranging from 0.25 to 128 mg/L (Fig. 2). This Monte Carlo simulation showed that the 2 g every 12 h regimen provides a 95% PTA of 40% fT > MIC up to an MIC of 8 mg/L. The mean fT > MIC values of populations were also simulated for two additional temocillin regimens: 2 g every 24 h and 2 g every 8 h (Table 6). An fT > MIC > 40% was expected to be reached for isolates with an MIC of 4 and 16 mg/L, for the 2 g every 24 h and 2 g every 8 h regimens, respectively. Due to the small subject sample and the singularity of ICU patients, wide variations in Monte Carlo simulation were observed, with 95% confidence intervals (CIs) for reaching MIC, with a fT > MIC of 40% ranging from 8 to 32 mg/L (Fig. 2).

The second set of Monte Carlo simulations was performed by Laterre et al. using data from 11 ICU patients

receiving temocillin as a 2 g every 8 h regimen (over a 30-min period) [55]. Population PK modelling was performed using a two-compartment model. The PTA of temocillin was estimated for one dosing regimen (2 g every 8 h) for MIC targets ranging from 2 to 256 mg/L. The 2 g every 8 h regimen provides a 95% PTA given at a 40% $fT > MIC$ target up to an MIC of 8 mg/L, according to this Monte Carlo estimation. The mean population $fT > MIC$ for MICs of 8, 16 and 32 mg/L were >90, 80%, and just below 40%, respectively (Fig. 3).

5.3 Clinical Applications

Despite these two discerning studies, PK/PD data regarding less severely ill patients are lacking. Moreover, epidemiologic data surveillance of temocillin resistance have just began in some countries (i.e. France). This could explain the two major issues regarding temocillin clinical use: (1) the optimal dosing regimen and (2) the lack of international consensus regarding clinical breakpoints.

One retrospective study including 92 patients infected with *Enterobacteriaceae* (with 52% of strains producing ESBL or dAmpC) treated with temocillin showed that a 1 g every 12 h regimen was associated with a relative risk of

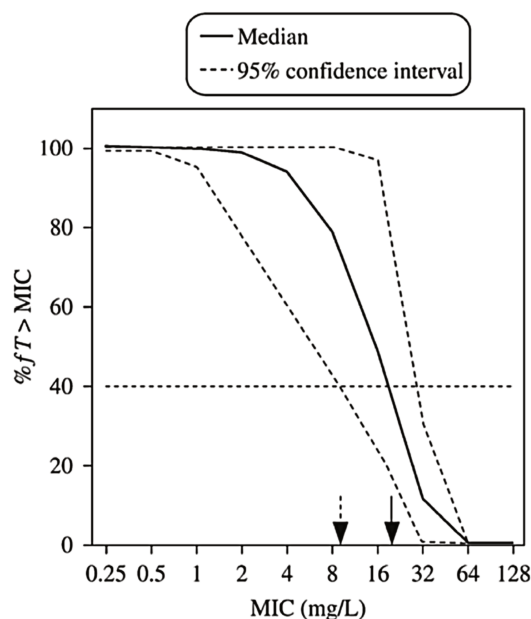


Fig. 2 Probabilities of target attainment of temocillin (obtained using Monte Carlo simulation: *solid line* indicates median value; *dotted lines* indicate 95% confidence interval) for the 2 g every 12 h schedule, using the pharmacokinetic data of the six patients treated according to this dosage. The abscissa shows the MIC range used for the simulations and the ordinate the fraction of time (as a percentage) during which free serum levels remain above the corresponding MIC. The *horizontal dotted line* indicates the 40% $fT > MIC$ limit. MIC minimum inhibitory concentration. Reproduced from De Jongh et al. [35], with permission

Table 6 Fraction of time (%) during which the free serum concentration (median values) remains above a given MIC ($fT > MIC$) after administration of temocillin 2 g q24 h, q12 h, or q8 h; results obtained by Monte Carlo simulation starting from the pharmacokinetic data of patients treated with a temocillin 2 g q12 h regimen in the study by De Jongh et al. Reproduced from De Jongh et al. [35], with permission

MIC (mg/L)	$fT > MIC$ (%) of free temocillin (2 g) administered		
	q24 h	q12 h	q8 h
0.5	100.0	100.0	100.0
1	87.5	100.0	100.0
2	70.6	100.0	100.0
4	53.7	100.0	100.0
8	36.7	79.7	100.0
16	19.4	45.1	80.3
32	1.6	9.5	26.9
64	0.0	0.0	0.0

MIC minimum inhibitory concentration, *qxh* every *x* h

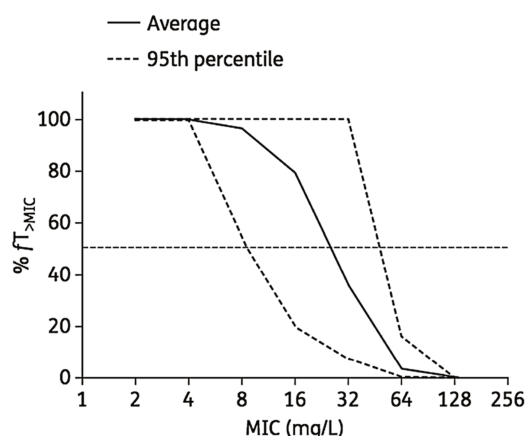


Fig. 3 Probabilities of target attainment of temocillin (obtained using Monte Carlo simulation) for the 2 g every 8 h schedule. The abscissa shows the MIC range used for the simulations and the ordinate the fraction of time (as a percentage) during which free serum levels remain above the corresponding MIC. The *horizontal dotted line* indicates the 50% $fT > MIC$ limit. MIC minimum inhibitory concentration. Reproduced from Laterre et al. [55], with permission

clinical and microbiological failure of 2.9 (95% CI 1.1–7.7) and 5.0 (95% CI 1.7–14.6), respectively, compared with a 2 g every 12 h dosing regimen [56]. It is now recognised that a 1 g every 12 h regimen is a suboptimal dosage with a higher risk of failure.

Controversy is still ongoing between the use of a 2 g every 12 h or 2 g every 8 h regimen. Based on their results, Laterre et al. proposed that temocillin 6 g daily was adequate to reach an average $fT > MIC$ value of 80% for an MIC of 16 mg/L (Table 6) [55]. However, this study was

not designed to assess the clinical efficacy of temocillin and included only severely ill patients. In less severely ill patients, or in a specific focus of infection, such as a UTI, a 4 g daily regimen should be adequate, even for strains with temocillin MIC up to 16 mg/L (Table 6; Fig. 2). Indeed, in the study by Balakrishnan et al., strains were defined as susceptible for a temocillin MIC up to 16 mg/L, and no clinical or microbiological cure rate differences were found according to temocillin MICs. Interestingly, 100% of clinical and microbiological cure rates were observed in the subset of patients with UTIs due to ESBL- or dAmpC-producing strains [56]. These data are consistent with recent data found in two animal models where a temocillin regimen simulating a 2 g every 12 h human regimen demonstrated significant activity against strains whose temocillin MIC were up to 16 mg/L [31, 32].

Saturable binding to albumin may have several consequences. First, in hypoalbuminemic patients, such as ICU patients, the unbound active fraction may increase. Second, a short duration perfusion could result in a higher peak concentration and higher unbound active fraction, leading to greater tissue penetration. Nevertheless, these considerations should be taken with caution according to the wide interindividual variability of protein binding.

Finally, in the majority of less severe patients, particularly in patients with UTI, a 2 g every 12 h regimen should be adequate, even against strains with a temocillin MIC up to 16 mg/L. For ICU patients, due to the wide variations in actual antibiotic concentrations and the need for a higher %fT > MIC target, a 2 g every 8 h regimen should be preferred. Moreover, to avoid intraindividual variation of antibiotic concentrations in such patients, temocillin may be administered by continuous infusion as this administration showed a higher probability of reaching the desired PK/PD target than three-times-daily infusion [55]. Nevertheless, no prospective study evaluating temocillin efficacy according to temocillin regimen, foci of infection, patient's severity and temocillin MICs is available. In addition, current epidemiological data of temocillin resistance focusing on a specific focus of infection, such as a UTI, are lacking. Hence, physicians should follow national guidelines regarding temocillin breakpoints and regimens pending for international consensus about these issues (Table 7).

6 Conclusion and Perspectives

Temocillin is an old 'revived' antibiotic with an interesting antimicrobial activity, with both (i) a narrow spectrum almost limited to *Enterobacteriaceae*, strongly suggesting a reduced impact on human gut microbiota and therefore little propensity for selecting resistance pathogen and a

Table 7 Clinical breakpoints of temocillin according to countries where temocillin is actually marketed

Country	MIC (mg/L)	
	S	R
Belgium [15]	≤16	≥32
UK, systemic infection [60]	≤8	>8
UK, uncomplicated UTI [60]	≤32	>32
France [61]	≤8	>8

S sensible strain, R resistant strain, UTI urinary tract infection

minimal risk of *Clostridium difficile* infection, as suggested by retrospective studies [33, 56, 57]; and (ii) a resistance to hydrolysis by numerous β -lactamases, including the pandemic ESBL or a worrying threat such as KPC.

As for other disused antibiotics, data regarding clinical efficacy, PK profiling in volunteers or patients, and the PD target are scarce [58]. This is in contrast with the urgent medical need of therapeutic options against emerging, multiresistant, Gram-negative bacteria, supporting the use of old antibiotics despite present-day processes and requirements.

Nevertheless, available PK/PD data provide valuable information. Temocillin exhibits a long serum half-life, suitable for its use in a twice-daily regimen. One gram twice daily in normal renal function patients should be abandoned. Renal clearance is predominant, and high unchanged temocillin concentrations are recovered in urine. Monte Carlo simulations regarding %fT > MIC revealed that a 2 g every 12 h regimen is adequate to treat infection caused by strains with temocillin MIC up to 16 mg/L. In specific populations with altered PK and PD parameters, such as ICU patients, a 2 g every 8 h regimen should be preferred for treating MIC with the same clinical breakpoints. However, based on actual PK/PD data, a clinical breakpoint of 32 mg/L appears difficult to reach, except for the treatment of uncomplicated UTIs, as recommended by the British Society for Antimicrobial Chemotherapy (Table 7).

There is a clear need for redevelopment for old antibiotics. Temocillin studies regarding wild-type MIC distribution (particularly from urine samples), PK data for non-severely ill patients or specific populations such as elderly patients, as well as clinical PK/PD studies, are required to support appropriate dosing recommendations and determination of clinical breakpoints.

Compliance with Ethical Standards

Funding No funding was received in the preparation of this manuscript.

Conflict of interest Bruno Fantin received funding from Eumedica pharmaceuticals for part of the temocillin experimental studies performed in the laboratory [31, 32]. Dr Kevin Alexandre has no conflicts of interest to declare regarding this manuscript.

References

- Miranda Bastos AC, Vandecasteele SJ, Tulkens PM, Spinewine A, Van Bambeke F. Development and validation of a high performance liquid chromatography assay for the determination of temocillin in serum of haemodialysis patients. *J Pharm Biomed Anal.* 2014;90:192–7.
- Livermore DM, Tulkens PM. Temocillin revived. *J Antimicrob Chemother.* 2008;63:243–5.
- SPILF. Diagnostic et antibiothérapie des infections urinaires bactériennes communautaires de l'adulte. 2015. Available at: <http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/spilf/recos/infection-s-urinaires-spilf-argumentaire.pdf>.
- Labia R, Baron P, Masson JM, Hill G, Cole M. Affinity of temocillin for *Escherichia coli* K-12 penicillin-binding proteins. *Antimicrob Agents Chemother.* 1984;26:335–8.
- Bush K, Smith SA, Ohringer S, Tanaka SK, Bonner DP. Improved sensitivity in assays for binding of novel beta-lactam antibiotics to penicillin-binding proteins of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987;31:1271–3.
- Jules K, Neu HC. Antibacterial activity and beta-lactamase stability of temocillin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1982;22:453–60.
- Slocombe B, Basker MJ, Bentley PH, Clayton JP, Cole M, Comber KR, et al. BRL 17421, a novel beta-lactam antibiotic, highly resistant to beta-lactamases, giving high and prolonged serum levels in humans. *Antimicrob Agents Chemother.* 1981;20:38–46.
- Malottke R, Potel J. Antibacterial activity of temocillin. *Drugs.* 1985;29(Suppl 5):67–73.
- Martinez-Beltran J, Loza E, Gomez-Alferez A, Romero-Vivas J, Bouza E. Temocillin. In vitro activity compared with other antibiotics. *Drugs.* 1985;29(Suppl 5):91–7.
- Bauernfeind A. Bacteriostatic and bactericidal activity of penicillins at constant and variable concentrations. *Drugs.* 1985;29(Suppl 5):9–14.
- Bonacorsi S, Fitoussi F, Lhopital S, Bingen E. Comparative in vitro activities of meropenem, imipenem, temocillin, piperacillin, and ceftazidime in combination with tobramycin, rifampin, or ciprofloxacin against *Burkholderia cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:213–7.
- Acker HV, Snick EV, Nelis HJ, Coenye T. In vitro activity of temocillin against planktonic and sessile *Burkholderia cepacia* complex bacteria. *J Cyst Fibros.* 2010;9:450–4.
- Van Landuyt HW, Boelaert J, Piot P, Verbist L. In vitro activity of temocillin against clinical isolates. *Drugs.* 1985;29(Suppl 5):1–8.
- Jephcott AE, Egglestone SI. In vitro activity of temocillin against *Neisseria gonorrhoeae* including penicillinase-producing strains. *Drugs.* 1985;29(Suppl 5):18–23.
- Fuchs PC, Barry AL, Jones RN, Thornsberry C. Temocillin: in vitro activity against 734 selected clinical isolates, including beta-lactamase-producing strains. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1984;2:55–63.
- Verbist L. In vitro activity of temocillin (BRL 17421), a novel beta-lactamase-stable penicillin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1982;22:157–61.
- Ghathian K, Calum H, Gyssens IC, Frimodt-Møller N. Temocillin in vitro activity against recent clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae* compared with penicillin, ceftriaxone and ciprofloxacin. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71:1122–3.
- Matagne A, Ghuysen M-F, Frère J-M. Interactions between active-site-serine beta-lactamases and mechanism-based inactivators: a kinetic study and an overview. *Biochem J.* 1993;295:705–11.
- Woodford N, Pike R, Meunier D, Loy R, Hill R, Hopkins KL. In vitro activity of temocillin against multidrug-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. and *Enterobacter* spp., and evaluation of high-level temocillin resistance as a diagnostic marker for OXA-48 carbapenemase. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69:564–7.
- Fournier D, Chirouze C, Leroy J, Cholley P, Talon D, Plésiat P, et al. Alternatives to carbapenems in ESBL-producing *Escherichia coli* infections. *Médecine Mal Infect.* 2013;43:62–6.
- Mischnik A, Baumert P, Hamprecht A, Rohde A, Peter S, Feihl S, et al. Susceptibility to penicillin derivatives among third-generation cephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae* recovered on hospital admission. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2017;87(1):71–3.
- Rodríguez-Villalobos H, Malaviolle V, Frankard J, de Mendonça R, Nonhoff C, Struelens MJ. In vitro activity of temocillin against extended spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57:771–4.
- Tärnberg M, Östholm-Balkhed A, Monstein H-J, Hällgren A, Hanberger H, Nilsson LE. In vitro activity of beta-lactam antibiotics against CTX-M-producing *Escherichia coli*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011;30:981–7.
- Livermore DM, Hope R, Fagan EJ, Warner M, Woodford N, Potz N. Activity of temocillin against prevalent ESBL- and AmpC-producing *Enterobacteriaceae* from south-east England. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57:1012–4.
- Glupczynski Y, Huang T-D, Berhin C, Claeys G, Delmée M, Ide L, et al. In vitro activity of temocillin against prevalent extended-spectrum beta-lactamases producing *Enterobacteriaceae* from Belgian intensive care units. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007;26:777–83.
- Adams-Haduch JM, Potoski BA, Sidjabat HE, Paterson DL, Doi Y. Activity of temocillin against KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:2700–1.
- Mutters NT, Zimmermann S, Kaase M, Mischnik A. Activity of temocillin, mecillinam, ceftazidime, and ceftazidime/avibactam against carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae* without carbapenemase production. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015;34:2429–37.
- Zykov IN, Sundsfjord A, Småbrekke L, Samuelsen Ø. The antimicrobial activity of mecillinam, nitrofurantoin, temocillin and fosfomycin and comparative analysis of resistance patterns in a nationwide collection of ESBL-producing *Escherichia coli* in Norway 2010–2011. *Infect Dis.* 2016;48:99–107.
- Buyck JM, Guénard S, Plésiat P, Tulkens PM, Bambeke FV. Role of MexAB-OprM in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to temocillin and impact on the susceptibility of strains isolated from patients suffering from cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67:771–5.
- Chalhoub H, Pletzer D, Weingart H, Braun Y, Tunney MM, Elborn JS, et al. Mechanisms of intrinsic resistance and acquired susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients to temocillin, a revived antibiotic. *Sci Rep.* 2017;7:40208.
- Soubirou JF, Rossi B, Couffignal C, Ruppé E, Chau F, Massias L, et al. Activity of temocillin in a murine model of urinary tract infection due to *Escherichia coli* producing or not producing the ESBL CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70:1466–72.
- Alexandre K, Chau F, Guérin F, Massias L, Lefort A, Cattoir V, et al. Activity of temocillin in a lethal murine model of infection

- of intra-abdominal origin due to KPC-producing *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71:1899–904.
33. Gupta ND, Smith RE, Balakrishnan I. Clinical efficacy of temocillin. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64:431–3.
 34. Just HM, Becker C, Gieringer J, Wenz A, Bassler M, Daschner F. In vitro combination-effect of temocillin with ticarcillin and aminoglycosides on gram-negative and gram-positive bacteria. *Drugs.* 1985;29(Suppl 5):74–7.
 35. De Jongh R, Hens R, Basma V, Mouton JW, Tulkens PM, Carryn S. Continuous versus intermittent infusion of temocillin, a directed spectrum penicillin for intensive care patients with nosocomial pneumonia: stability, compatibility, population pharmacokinetic studies and breakpoint selection. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61:382–8.
 36. Tzouveleki LS, Markogiannakis A, Piperaki E, Souli M, Daikos GL. Treating infections caused by carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20:862–72.
 37. Basker MJ, Merrikin DJ, Ponsford RJ, Slocombe B, Tasker TCG. BRL 20330, an oral prodrug of temocillin: bioavailability studies in man. *J Antimicrob Chemother.* 1986;18:399–405.
 38. Overbosch D, van Gulpen C, Mattie H. Renal clearance of temocillin in volunteers. *Drugs.* 1985;29(Suppl 5):128–34.
 39. Hampel B, Feike M, Koeppel P, Lode H. Pharmacokinetics of temocillin in volunteers. *Drugs.* 1985;29(Suppl 5):99–102.
 40. Höffler D, Koeppel P. Temocillin pharmacokinetics in normal and impaired renal function. *Drugs.* 1985;29(Suppl 5):135–9.
 41. Baert L, Aswarie H, Verbist L, Horton R. Penetration of temocillin into prostatic tissue after intravenous dosing. *Acta Clin Belg.* 1989;44:358–9.
 42. Spelsberg F, Bauernfeind A, Wiest W, Hanser P. Biliary concentrations of temocillin. *Drugs.* 1985;29(Suppl 5):122–7.
 43. Poston GJ, Greengrass A, Moryson CJ. Biliary concentrations of temocillin. *Drugs.* 1985;29(Suppl 5):140–5.
 44. Wise R, Donovan IA, Drumm J, Dyas A, Cross C. The intraperitoneal penetration of temocillin. *J Antimicrob Chemother.* 1983;12:93–6.
 45. Wittke RR, Adam D, Klein HE. Therapeutic results and tissue concentrations of temocillin in surgical patients. *Drugs.* 1985;29(Suppl 5):221–6.
 46. Cowan W, Baird A, Sleight JD, Gray JM, Leiper JM, Lawson DH. Lung tissue penetration of temocillin. *Drugs.* 1985;29(Suppl 5):151–3.
 47. Legge JS, Reid TM, Palmer JB. Clinical efficacy, tolerance and pharmacokinetics of temocillin in patients with respiratory tract infections. *Drugs.* 1985;29(Suppl 5):118–21.
 48. Brückner O, Trautmann M, Borner K. A study of the penetration of temocillin in the cerebrospinal fluid. *Drugs.* 1985;29(Suppl 5):162–6.
 49. Leroy A, Humbert G, Fillastre J-P, Borsa F, Godin M. Pharmacokinetics of temocillin (BRL 17421) in subjects with normal and impaired renal function. *J Antimicrob Chemother.* 1983;12:47–58.
 50. Boelaert J, Daneels R, Schurgers M, Lambert AM, Van Landuyt HW, Mellows G, et al. The pharmacokinetics of temocillin in patients with normal and impaired renal function. *J Antimicrob Chemother.* 1983;11:349–56.
 51. Vandecasteele SJ, Miranda Bastos AC, Capron A, Spinewine A, Tulkens PM, Van Bambeke F. Thrice-weekly temocillin administered after each dialysis session is appropriate for the treatment of serious Gram-negative infections in haemodialysis patients. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;46:660–5.
 52. Roberts JA, Paul SK, Akova M, Bassetti M, Waele JJD, Dimopoulos G, et al. DALI: defining antibiotic levels in intensive care unit patients: are current β -Lactam antibiotic doses sufficient for critically ill patients? *Clin Infect Dis.* 2014;58:1072–83.
 53. Craig WA. Basic pharmacodynamics of antibacterials with clinical applications to the use of beta-lactams, glycopeptides, and linezolid. *Infect Dis Clin N Am.* 2003;17:479–501.
 54. 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.
 55. Laterre P-F, Wittebole X, Van de Velde S, Muller AE, Mouton JW, Carryn S, et al. Temocillin (6 g daily) in critically ill patients: continuous infusion versus three times daily administration. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70:891–8.
 56. Balakrishnan I, Awad-El-Kariem FM, Aali A, Kumari P, Mulla R, Tan B, et al. Temocillin use in England: clinical and microbiological efficacies in infections caused by extended-spectrum and/or derepressed AmpC-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66:2628–31.
 57. Habayeb H, Sajin B, Patel K, Grundy C, Al-Dujaili A, Van de Velde S. Amoxicillin plus temocillin as an alternative empiric therapy for the treatment of severe hospital-acquired pneumonia: results from a retrospective audit. *Eur J Clin Microbiol Infect.* 2015;34:1693–9.
 58. Muller AE, Theuretzbacher U, Mouton JW. Use of old antibiotics now and in the future from a pharmacokinetic/pharmacodynamic perspective. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21:881–5.
 59. Bergan T, Olszewski WL, Engeset A. Temocillin penetration of peripheral lymph. *Drugs.* 1985;29(Suppl 5):114–7.
 60. British Society for Antimicrobial Chemotherapy. BSAC Clinical Breakpoints [Internet]. 2015. Available at: <http://www.bsac.org.uk/wp-content/uploads/2012/02/BSAC-Susceptibility-testing-version-143.pdf>.
 61. Société Française de Microbiologie. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. 2017. Available at: http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFM_V1_0_MARS_2017.pdf. Accessed 28 Apr 2017.

4. Conclusion de la revue bibliographique

Ainsi, au terme de cette revue bibliographique, il peut être tiré deux ordres de conclusion.

Concernant l'analyse générale de l'évaluation des concentrations critiques telle que recommandée par une instance comme l'EUCAST, il est donc désormais indispensable de disposer de données détaillées concernant tout à la fois :

- la distribution des CMI vis-à-vis des populations bactériennes sauvages et d'intérêt ;
- la définition de l'indice PK/PD et de la cible thérapeutique via des études précliniques ;
- la pharmacocinétique clinique en lien avec les différents schémas posologiques possibles ;
- la PTA chez différentes populations de patients (selon la sévérité et le type d'infection) et pour différents schémas posologiques ;
- l'étude des échecs cliniques et leurs liens éventuels avec la sélection de mutants résistants.

Concernant l'analyse spécifique de la concentration critique de la témocilline, il apparaît qu'il manque encore au dossier :

- la distribution des CMI vis-à-vis des isolats sauvages et en particulier ceux responsables d'infection urinaire afin de déterminer l'ECOFF (article 2) ;
- la confirmation via d'autres modèles précliniques de la cible thérapeutique (articles 3 et 4) ;
- l'évaluation de la relation exposition-effet selon les schémas posologiques (article 3) ;
- l'évaluation de la relation exposition-effet selon la sévérité et le type d'infection (articles 3 et 4).

Comme indiqué par les numéros d'article entre parenthèses, chacun de ces points a fait l'objet à la faveur de cette thèse d'un travail original publié comblant en partie un manque.

Ainsi, le second article de ce mémoire de thèse présenté *infra* s'est intéressé à la description de la distribution des CMI de la témocilline dans une population d'isolats d'intérêt, à savoir les souches d'entérobactériales responsables d'infection urinaire communautaire. De plus, il a été étudié la performance de plusieurs tests phénotypiques afin de définir ceux utilisables en routine pour catégoriser les isolats vis-à-vis de la témocilline.

Données expérimentales

1. Article 2 : Temocillin against *Enterobacteriaceae* isolates from community-acquired urinary tract infections: low rate of resistance and good accuracy of routine susceptibility testing methods

Temocillin against *Enterobacteriaceae* isolates from community-acquired urinary tract infections: low rate of resistance and good accuracy of routine susceptibility testing methods

Auteurs : K. Alexandre, M. Réveillon-Istin, R. Fabre, V. Delbos, M. Etienne, M. Pestel-Caron, S. Dahyot, F. Caron


Publié en Juillet 2018 dans Journal of Antimicrobial Chemotherapy

Doi : 10.1093/jac/dky101

Temocillin against Enterobacteriaceae isolates from community-acquired urinary tract infections: low rate of resistance and good accuracy of routine susceptibility testing methods

K. Alexandre ^{1,2*}, M. Réveillon-Istin¹, R. Fabre³, V. Delbos¹, M. Etienne^{1,2}, M. Pestel-Caron^{1,2}, S. Dahyot^{1,2} and F. Caron^{1,2}

¹Infectious Diseases Department, Rouen University Hospital, Rouen, France; ²EA 2656 (Groupe de Recherche sur l'Adaptation Microbienne 2.0), Institute for Research and Innovation in Biomedicine, Normandie Univ, Unirouen, Rouen, France; ³Laboratoire de Biologie Médicale Régional de Normandie, Elbeuf, France

*Corresponding author. Tel: +33232880674; Fax: +33232888275; E-mail: kevin.alexandre@chu-rouen.fr  orcid.org/0000-0001-7773-5695

Received 12 November 2017; returned 5 January 2018; revised 30 January 2018; accepted 4 March 2018

Background: Temocillin is an old 'revived' antibiotic that may play an important role in the treatment of febrile urinary tract infection (UTI). Data regarding its activity against current Enterobacteriaceae isolates as well as the performance of routine susceptibility testing methods are, however, scarce.

Objectives: To determine the MICs of temocillin for Enterobacteriaceae strains reflecting the current epidemiology and to analyse the accuracy of three commercial methods.

Methods: Enterobacteriaceae isolates causing community-acquired UTI were prospectively collected from September 2015 to January 2017 in two French centres. Temocillin MIC was determined by agar dilution (AD) as the reference method and then compared with: (i) susceptibility testing by disc diffusion; (ii) MIC determination by Etest; and (iii) MIC estimation by the Vitek 2 automated system.

Results: A total of 762 Enterobacteriaceae were analysed comprising 658 (86.4%) *Escherichia coli* and 37 (4.9%) ESBL-producing isolates. Susceptibility rate assessed by AD was 99.6% according to the 8 mg/L clinical breakpoint and was significantly lower against the ESBL-producing isolates than the non-ESBL-producing isolates (94.6% versus 99.9%, $P < 0.01$). The MIC₅₀ and MIC₉₀ for the total set were 3 and 6 mg/L, respectively. According to the 8 mg/L clinical breakpoint, the major error rate was <1% for disc diffusion and Etest, and significantly higher for Vitek 2 (4.3%, $P < 0.01$), but still low. No very major error was noticed.

Conclusions: Temocillin showed a high level of activity against Enterobacteriaceae from community-acquired UTI and good to excellent reliability of routine methods for susceptibility testing in such a setting.

Introduction

Temocillin (6- α -methoxy derivative of ticarcillin) is an old 'revived' antibiotic from the penicillin family currently available in several European countries (Belgium, France, Luxembourg and the UK) that has very attractive characteristics: narrow spectrum mainly restricted to Enterobacteriaceae, high resistance to hydrolysis by numerous β -lactamases including ESBL and hyperproduced AmpC, and minimal risk of *Clostridium difficile* infection. Thus, it may act as an alternative to carbapenems for the treatment of serious Enterobacteriaceae infections such as systemic urinary tract infections (UTIs).¹

As for other forgotten antibiotics, some microbiological data are, however, scarce. Studies are still in progress to better define the clinical breakpoints of temocillin, while Enterobacteriaceae are currently categorized susceptible for MIC values ≤ 8 , ≤ 16 or

≤ 32 mg/L depending on the country (Table 1).¹ If the *in vitro* activity of temocillin against ESBL-producing isolates has largely been described,²⁻⁴ data are paradoxically lacking for non-ESBL-producing isolates still commonly encountered in community-acquired UTIs.

Moreover, the performance of the three commercial methods commonly used to determine susceptibility (disc diffusion, Etest and the Vitek 2 automated instrument system) are not well described for the temocillin/Enterobacteriaceae pairs. Two previous studies concerning temocillin have reported marked discrepancies (up to 36%) between routine tests and a reference method,^{5,6} but these studies were biased by an overrepresentation of strains from healthcare-associated infections.

In this context, we aimed to precisely determine the MIC of temocillin for a large set of Enterobacteriaceae strains reflecting the current epidemiology of community-acquired UTIs and to

Alexandre *et al.***Table 1.** Clinical breakpoints of temocillin currently in use in different countries where this antibiotic is available

Country	MIC (mg/L)	
	susceptible	resistant
Belgium ^a	≤16	≥32
France ^b	≤8	>8
UK, systemic infection ^c	≤8	>8
UK, uncomplicated UTI ^c	≤32	>32

^aSee Fuchs *et al.*¹¹^bSee Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.¹³^cSee BSAC.¹²

assess the accuracy of disc diffusion, Etest and the Vitek 2 automated instrument system.

Materials and methods

Bacterial set

Enterobacteriaceae isolates causing community-acquired UTIs were prospectively collected from September 2015 to January 2017 in two French centres—a private practice laboratory (analysing ~4000 urine samples per year) and a teaching hospital—as part of an ongoing epidemiological study on community-acquired UTIs. Identification to the species level was performed routinely using either Vitek 2 or MALDI-TOF technology. Reliable clinical data were prospectively collected for patients by a dedicated staff, to ensure that no strain was hospital acquired or healthcare related. Duplicate specimens defined as the same species from the same patient within 3 months from the first positive culture were excluded. *Escherichia coli* ATCC 25922 was used as the reference strain for quality control in each series.

Ethics

Participating patients received an information letter and provided written informed consent. This study was approved by the Medical Research Ethics Committee of the Rouen University Hospital (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02292160).

Susceptibility testing

Each strain was first tested against first-line antibiotics by disc diffusion or the automated system, according to French national recommendations (CA-SFM 2016 guidelines, www.sfm-microbiologie.org/). ESBL production was screened for by using the double-disc synergy test.⁷ ESBLs were genotypically characterized by PCR for *bla* genes of the CTX-M, SHV and TEM families as previously described.^{8,9}

Temocillin susceptibility testing and definition

For each strain, temocillin MIC was determined by agar dilution (AD) as the reference method;¹⁰ analysis was performed according to CLSI guidelines with temocillin final concentrations of 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 32, 48, 64, 96 or 128 mg/L. These reference MIC values were then compared with: (i) susceptibility testing by disc diffusion using discs containing 30 µg of temocillin (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) according to CA-SFM 2016 guidelines; (ii) MIC determination by Etest (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) according to the manufacturer's recommendations; and (iii) MIC estimation

by the AST-N236 card of the Vitek 2 automated system (bioMérieux) according to the manufacturer's recommendations. Mueller-Hinton agar was used as the medium for AD, disc diffusion and Etest.

Susceptibility categorization was determined according to the different clinical breakpoints in use in Europe: susceptible if MIC ≤8, 16 or ≤32 mg/L, corresponding to inhibition diameters for disc diffusion of ≥20, ≥15 or ≥12 mm, respectively.^{11,12}

Discrepancies in susceptibility categorization were classified as follows: a major error when the reference method showed a susceptible result and the commercial method showed a resistant result; or a very major error when the reference method classified an isolate as resistant and the commercial method classified it as susceptible. As the AST-N236 Vitek 2 card provided an MIC range only from ≤4 to >16 mg/L, discrepancies of this method were evaluable only for the 8 and 16 mg/L clinical breakpoints.

Statistics

Continuous variables are expressed as mean ± SD. Rates of discrepancies in susceptibility categorization were compared between methods using Fisher's exact test. A *P* value <0.05 was considered to be significant. Statistical analyses were performed using R software (www.R-project.org/).

Results

Bacterial strains

A total of 762 Enterobacteriaceae (corresponding to 628 patients) were analysed comprising 658 (86.4%) *E. coli*, 42 (5.5%) *Klebsiella* spp., 25 (3.3%) *Proteus mirabilis*, 12 (1.6%) *Citrobacter koseri*, 12 (1.6%) *Enterobacter* spp. and 13 (1.7%) miscellaneous species. Thirty-seven (4.9%) isolates were ESBL producers including 30 (81.1%) CTX-M enzymes, 1 (2.7%) SHV enzyme and 3 (8.1%) TEM enzymes. Five isolates were AmpC-hyperproducing strains.

Temocillin susceptibility

Table 2 shows the susceptibility rate determined by AD and by the three routine tests according to the different clinical breakpoints. Susceptibility rates assessed by AD were 99.6%, 100% and 100% for the 8, 16 and 32 mg/L clinical breakpoints, respectively. Very similar rates were observed by disc diffusion and Etest, while Vitek 2 showed a significantly lower susceptibility rate of the *E. coli* isolates using a clinical breakpoint of 8 mg/L (94.7% versus 99.7%, *P* < 0.01).

Table 3 shows the distribution of MIC values assessed by AD according to bacterial characteristics. A large proportion of *E. coli* isolates had very low MIC values (26.9% of strains with MIC ≤2 mg/L and 35.9% with MIC of 3 mg/L). This proportion was even more important for other Enterobacteriaceae (69.2% of strains with MIC ≤2 mg/L and 14.4% with MIC of 3 mg/L). Temocillin activity was significantly lower against the ESBL-producing strains. By AD, the susceptibility rate according to the 8 mg/L clinical breakpoint was 94.6% for the 37 ESBL-producing strains compared with 99.9% for the 725 non-ESBL-producing isolates (*P* < 0.01).

Only 3 of 762 isolates were categorized as resistant according to AD using the 8 mg/L clinical breakpoint: one non-ESBL-producing *C. koseri* isolate with a temocillin MIC value of 16 mg/L, one ESBL-producing *E. coli* isolate with a temocillin MIC value of 12 mg/L and one ESBL-producing *Enterobacter cloacae* isolate with a temocillin MIC value of 16 mg/L.

Temocillin activity against community-acquired Enterobacteriaceae

Table 2. Temocillin susceptibility rate of 762 Enterobacteriaceae isolates from community-acquired UTIs by four methods according to the three clinical breakpoints currently in use

Bacterial species	Susceptibility rate (%) at clinical breakpoint of:											
	8 mg/L				16 mg/L				32 mg/L			
	AD	disc	Etest	Vitek 2	AD	disc	Etest	Vitek 2	AD	disc	Etest	Vitek 2
All (n = 762)	99.6	98.9	98.9	95.3 ^a	100	100	98.9	99.7	100	100	100	NE
<i>E. coli</i> (n = 658)	99.7	99.1	99.1	94.7 ^a	100	100	99.1	99.8	100	100	100	NE
Other Enterobacteriaceae (n = 104)	99.0	98.1	98.1	99.0	100	100	98.1	99.0	100	100	100	NE

NE, not evaluable.

^aP < 0.01 versus AD, disc and Etest (two-by-two comparisons).**Table 3.** Distribution of temocillin MIC assessed by AD according to bacterial characteristics

	Number (%) isolates with temocillin MIC (mg/L) of:									
	≤2	3	4	6	8	12	16	24	≥32	
All isolates (n = 762)	249 (32.7)	251 (32.9)	133 (17.5)	98 (12.9)	28 (3.7)	1 (0.1)	2 (0.3)	–	–	–
<i>E. coli</i> (n = 658)	177 (26.9)	236 (35.9)	125 (19.0)	93 (14.1)	25 (3.8)	1 (0.2)	1 (0.2)	–	–	–
Other Enterobacteriaceae (n = 104)	72 (69.2)	15 (14.4)	8 (7.7)	5 (4.8)	3 (2.9)	–	1 (1.0)	–	–	–
ESBL-producing isolates (n = 37)	5 (13.5)	8 (21.6)	11 (29.7)	9 (24.3)	2 (5.4)	1 (2.7)	1 (2.7)	–	–	–

Light grey shading, MIC₅₀; dark grey shading MIC₉₀.**Table 4.** Rate of error in temocillin susceptibility categorization of 762 Enterobacteriaceae urinary isolates by three routine tests in comparison with the AD method as the reference method

Routine test	Major error (%) at clinical breakpoint of:			Very major error (%) at clinical breakpoint of:		
	8 mg/L	16 mg/L	32 mg/L	8 mg/L	16 mg/L	32 mg/L
Disc diffusion	0.7	0	0	0	0	0
Etest	0.7	0.1	0	0	0	0
Vitek 2	4.3 ^a	0.3	NE	0	0	NE

NE, not evaluable.

^aP < 0.01 versus disc diffusion and Etest.**Accuracy of temocillin susceptibility testing**

Table 4 shows the rate of misclassification in the 762 isolates by the three routine tests compared with AD as the reference. No very major error was noticed for the total of the 6858 comparisons. According to the 8 mg/L clinical breakpoint, the rate of major error was significantly higher for Vitek 2 compared with disc diffusion and Etest ($P < 0.01$). All the 33 isolates misclassified by Vitek 2 according to the 8 mg/L clinical breakpoint (presented in Table S1, available as [Supplementary data](#) at JAC Online) were *E. coli*, among which only three strains were ESBL-producing isolates. While the temocillin MIC was estimated at 16 mg/L by Vitek 2 for all these 33 isolates, the MIC values varies from 2 to 8 mg/L by AD (mean: 6 mg/L). Only three of the strains misclassified by Vitek 2 were also misclassified by disc diffusion or Etest.

Precise comparison of MIC values could be achieved only between AD and Etest. As shown in Figure 1 an overall very high correlation was observed with a Pearson's $r = 0.80$ ($P < 0.001$), and very low differences between tests: absolute delta ≤ 2 mg/L for 95% of the isolates (mean = 0.86 ± 0.04 mg/L). Among the five isolates misclassified as resistant by Etest using the 8 mg/L clinical breakpoint, four were *E. coli* (of which one was an ESBL-producing isolate) and one was *Serratia marcescens*; Etest MICs were evaluated at 12 mg/L for these five strains, whereas AD MICs were measured at 8 mg/L for four of them and at 6 mg/L for the other one.

Discussion

The two major results of this study performed on a large set of Enterobacteriaceae strains from community-acquired UTI were:

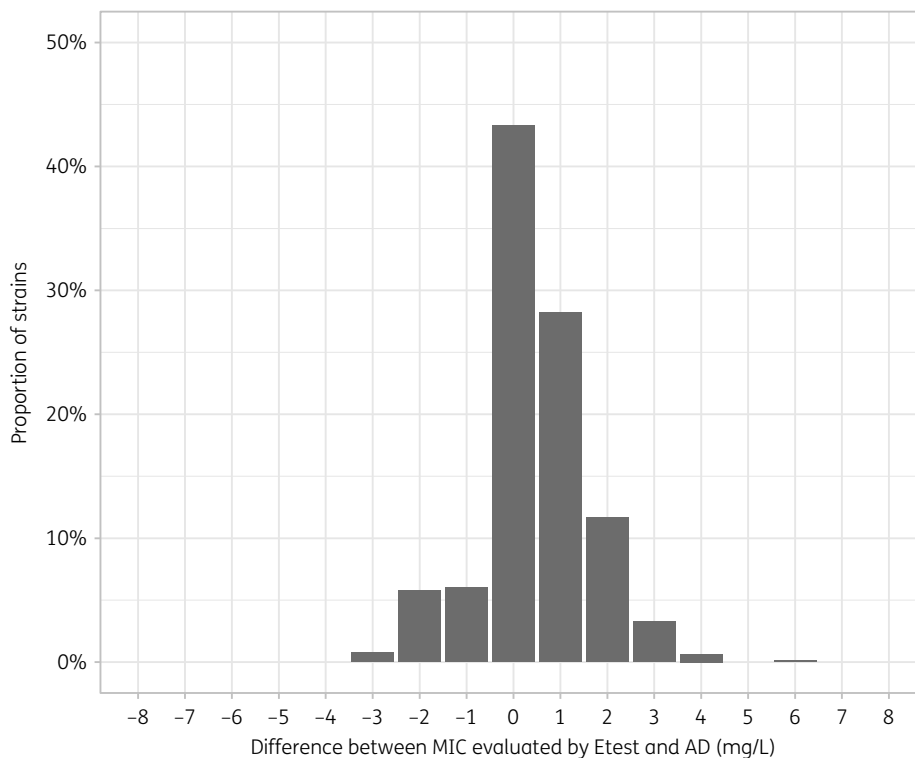


Figure 1. Distribution of difference between temocillin MIC assessed by Etest and AD. For each strain, the difference (D) between temocillin MICs measured by Etest (MIC_{Etest}) and AD (MIC_{AD}) was calculated as follows: $D = MIC_{Etest} - MIC_{AD}$. A positive value indicates that the temocillin MIC_{Etest} was above the temocillin MIC_{AD} and a negative value indicates that the temocillin MIC_{Etest} was below the temocillin MIC_{AD} .

(i) the high level of temocillin activity; and (ii) the good to excellent accuracy of the three methods routinely available for the susceptibility testing of this antibiotic.

The temocillin MIC calculated by the reference method was very low for most Enterobacteriaceae, far below the most stringent critical concentration currently applied in some countries, e.g. France, i.e. 8 mg/L.¹³ It is noteworthy that the MIC_{50} and MIC_{90} observed here for the total set (3 and 6 mg/L) were in accordance with historical studies carried out more than 30 years ago^{14–17} before the abandonment of the development of this antibiotic. Since resistance of Enterobacteriaceae to most other β -lactam antibiotics has markedly increased during the three last decades, this confirms that temocillin resists hydrolysis by β -lactamases widely produced by community Enterobacteriaceae^{18–20} and suggests there is no co-selection by mechanisms such as cross-resistance, co-resistance or pleiotropic resistance.²¹ Nevertheless, two recent studies carried out in the Asia Pacific region and studying both community-acquired and healthcare-associated UTIs found lower temocillin susceptibility rates than our study (89%–93% according to the 8 mg/L clinical breakpoint)^{22,23} suggesting that our conclusion should be retained only for the community setting.

ESBL-producing strains were significantly less susceptible than non-ESBL-producing isolates as found in other work.^{23,24} In the literature, temocillin susceptibility rates (according to the 8 mg/L clinical breakpoint) of ESBL-producing Enterobacteriaceae vary from 61% to 93%.^{2–4,24–27} Such discrepancies suggest that other

resistance mechanisms (such as altered outer membrane permeability) might be responsible for temocillin resistance.^{28,29}

The second major result is the very good to excellent accuracy of routine susceptibility testing methods for temocillin. Indeed, the concordance scores with the reference method were exceptionally high (i.e. >98%) for disc diffusion and Etest, and still good (i.e. >94%) for Vitek 2. As Vitek 2 is widely used in many laboratories such discrepancies may have clinical impact. Moreover, 30 out of the 33 (91%) isolates misclassified as resistant by Vitek 2 were correctly reported as susceptible by the two other routine methods, as previously reported for another automated system (Phoenix®).⁶ This finding suggests that disc diffusion or Etest should be run to analyse temocillin susceptibility in resistant isolates assessed by the Vitek 2 method.

The overall very good accuracy of routine susceptibility testing methods for temocillin observed in this work might be related to the low proportion (4.9%) of ESBL-producing isolates. This differs from two former studies in which the proportion of ESBL-producing isolates was much higher.^{5,6} Indeed, Rodriguez-Villalobos *et al.*⁵ evaluated the reliability of four commercial methods for a collection of 153 *E. coli* strains, 58% of which were ESBL-producing strains. According to the 8 mg/L clinical breakpoint, total discrepancy rates for Etest and Vitek 2 AST-N045/N046 cards were 15% and 14%, respectively.⁵ Similarly, Patel *et al.*,⁶ who assessed the accuracy of Etest and the Phoenix automated system for 281 Enterobacteriaceae, 10% of which were ESBL-producing

Temocillin activity against community-acquired Enterobacteriaceae

strains, found that the total discrepancy rate was 4% for Etest and 34% for the Phoenix[®] card (according to the 8 mg/L clinical breakpoint).⁶

Interestingly, in our work, a vast majority (83%) of community-acquired UTI-causing strains were highly susceptible to temocillin (temocillin MIC \leq 4 mg/L) with an MIC far below the lowest clinical breakpoint (i.e. 8 mg/L). This finding indicates that despite issues concerning clinical breakpoints and therapeutic regimen (i.e. 4 or 6 g per day),³⁰ temocillin may be safely used to treat community-acquired UTIs with 4 g per day as 2 g every 12 h would provide a sufficient $T_{0-24>MIC}$ of the free drug concentration in 96% of our isolates.³¹ This is consistent with a retrospective study involving patients infected by Enterobacteriaceae that found a clinical cure rate of 97% with 2 g of temocillin every 12 h.³²

A potential limitation of this study is the relatively low rate of ESBL-producing Enterobacteriaceae and the rarity of temocillin-resistant strains, which may underestimate categorization errors, especially very major errors. Nonetheless, the rate of ESBL-producing strains was in accordance with those reported in other recent works studying strains isolated from community-acquired UTIs in northern Europe and North America.^{33,34} Therefore, the current work reflects temocillin susceptibility testing performances in daily practice in areas sharing similar epidemiology in terms of community-acquired ESBL-producing Enterobacteriaceae.

In conclusion, temocillin showed a high level of activity against Enterobacteriaceae from community-acquired UTIs and good to excellent reliability of routine methods for susceptibility testing in such a setting. Taken together, our results suggest that temocillin could be proposed as a first-line treatment of febrile community-acquired UTIs and as a carbapenem-sparing agent whenever ESBL-producing strains are suspected or confirmed.

Funding

The epidemiological study on community-acquired UTIs (ClinicalTrials.gov identifier NCT02292160) was funded by a grant from the French Ministry of Health.

Etests were provided without charge by Eumedica and AST-N236 cards were provided without charge by bioMérieux.

Transparency declarations

K. A. and M. E. each received a travel grant from Eumedica. All other authors: none to declare.

Supplementary data

Table S1 is available as [Supplementary data](#) at JAC Online.

References

- Alexandre K, Fantin B. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of temocillin. *Clin Pharmacokinet* 2018; **57**: 287–96.
- Zykov IN, Sundsfjord A, Småbrekke L *et al.* The antimicrobial activity of mecillinam, nitrofurantoin, temocillin and fosfomycin and comparative analysis of resistance patterns in a nationwide collection of ESBL-producing *Escherichia coli* in Norway 2010–2011. *Infect Dis (Lond)* 2016; **48**: 99–107.
- Tärnberg M, Ostholm-Balkhed A, Monstein H-J *et al.* In vitro activity of β -lactam antibiotics against CTX-M-producing *Escherichia coli*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011; **30**: 981–7.
- Livermore DM, Hope R, Fagan EJ *et al.* Activity of temocillin against prevalent ESBL- and AmpC-producing Enterobacteriaceae from south-east England. *J Antimicrob Chemother* 2006; **57**: 1012–4.
- Rodriguez-Villalobos H, Cardentey-Reyes A, Thiroux C *et al.* Comparison of four commercial methods for determining temocillin susceptibility of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2009; **63**: 832–4.
- Patel TA, Dille R, Williams A *et al.* Comparison of the Phoenix automated system, the Etest method and broth microdilution in determining temocillin susceptibility of Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 1685–6.
- Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G *et al.* Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988; **10**: 867–78.
- Garrec H, Drieux-Rouzet L, Golmard J-L *et al.* Comparison of nine phenotypic methods for detection of extended-spectrum β -lactamase production by Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2011; **49**: 1048–57.
- Verdet C, Benzerara Y, Gautier V *et al.* Emergence of DHA-1-producing *Klebsiella* spp. in the Parisian region: genetic organization of the *ampC* and *ampR* genes originating from *Morganella morganii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 607–17.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically—Tenth Edition: Approved Standard M7-A10*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2015.
- Fuchs PC, Barry AL, Jones RN *et al.* Temocillin: in vitro activity against 734 selected clinical isolates, including β -lactamase-producing strains. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1984; **2**: 55–63.
- BSAC. *BSAC Clinical Breakpoints*. 2015. <http://www.bsac.org.uk/wp-content/uploads/2012/02/BSAC-Susceptibility-testing-version-143.pdf>.
- Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. *Tableaux des concentrations critiques pour l'interprétation des CMI et des diamètres des zones d'inhibition*. 2017; 33–43.
- Slocombe B, Basker MJ, Bentley PH *et al.* BRL 17421, a novel β -lactam antibiotic, highly resistant to β -lactamases, giving high and prolonged serum levels in humans. *Antimicrob Agents Chemother* 1981; **20**: 38–46.
- Malottke R, Potel J. Antibacterial activity of temocillin. *Drugs* 1985; **29** Suppl 5: 67–73.
- Martinez-Beltran J, Loza E, Gomez-Alferez A *et al.* Temocillin. In vitro activity compared with other antibiotics. *Drugs* 1985; **29** Suppl 5: 91–7.
- Bauernfeind A. Bacteriostatic and bactericidal activity of penicillins at constant and variable concentrations. *Drugs* 1985; **29** Suppl 5: 9–14.
- Ortega A, Oteo J, Aranzamendi-Zaldumbide M *et al.* Spanish multicenter study of the epidemiology and mechanisms of amoxicillin-clavulanate resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 3576–81.
- Bailey JK, Pinyon JL, Anantham S *et al.* Distribution of the *bla*_{TEM} gene and *bla*_{TEM}-containing transposons in commensal *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 745–51.
- Bush K. Extended-spectrum β -lactamases in North America, 1987–2006. *Clin Microbiol Infect* 2008; **14**: 134–43.
- Cantón R, Ruiz-Garbajosa P. Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. *Curr Opin Pharmacol* 2011; **11**: 477–85.
- Ip M, Lai CK, Fung KSC *et al.* Activity of temocillin and 15 other agents, including fosfomycin and colistin, against Enterobacteriaceae in Hong Kong. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2017; **36**: 2491–4.
- Seo M-R, Kim S-J, Kim Y *et al.* Susceptibility of *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract infection to fosfomycin, nitrofurantoin, and temocillin in Korea. *J Korean Med Sci* 2014; **29**: 1178–81.

Alexandre *et al.*

- 24** Glupczynski Y, Huang T-D, Berhin C *et al.* In vitro activity of temocillin against prevalent extended-spectrum β -lactamases producing Enterobacteriaceae from Belgian intensive care units. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; **26**: 777–83.
- 25** Mischnik A, Baumert P, Hamprecht A *et al.* Susceptibility to penicillin derivatives among third-generation cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae recovered on hospital admission. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2017; **87**: 71–3.
- 26** Fournier D, Chirouze C, Leroy J *et al.* Alternatives to carbapenems in ESBL-producing *Escherichia coli* infections. *Med Mal Infect* 2013; **43**: 62–6.
- 27** Rodriguez-Villalobos H, Malaviolle V, Frankard J *et al.* In vitro activity of temocillin against extended spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2006; **57**: 771–4.
- 28** Mutters NT, Zimmermann S, Kaase M *et al.* Activity of temocillin, mecillinam, ceftazidime, and ceftazidime/avibactam against carbapenem-nonsusceptible Enterobacteriaceae without carbapenemase production. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015; **34**: 2429–37.
- 29** Livermore DM, Warner M, Mushtaq S *et al.* What remains against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomycin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. *Int J Antimicrob Agents* 2011; **37**: 415–9.
- 30** Laterre P-F, Wittebole X, Van de Velde S *et al.* Temocillin (6 g daily) in critically ill patients: continuous infusion versus three times daily administration. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 891–8.
- 31** De Jongh R, Hens R, Basma V *et al.* Continuous versus intermittent infusion of temocillin, a directed spectrum penicillin for intensive care patients with nosocomial pneumonia: stability, compatibility, population pharmacokinetic studies and breakpoint selection. *J Antimicrob Chemother* 2008; **61**: 382–8.
- 32** Balakrishnan I, Awad-El-Kariem FM, Aali A *et al.* Temocillin use in England: clinical and microbiological efficacies in infections caused by extended-spectrum and/or derepressed AmpC β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 2628–31.
- 33** Morrill HJ, Morton JB, Caffrey AR *et al.* Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* urinary isolates in the Veterans Affairs health care system. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; **61**: e02236-16.
- 34** Rossignol L, Vaux S, Maugat S *et al.* Incidence of urinary tract infections and antibiotic resistance in the outpatient setting: a cross-sectional study. *Infection* 2017; **45**: 33–40.

Supplementary data

Table S1. Results of temocillin susceptibility tests according to methods for the 33 *E. coli* isolates misclassified by Vitek 2 method

Strain number	ESBL production	Disk-diffusion inhibition zone (mm)	Temocillin MIC (mg/L)		
			AD	Etest	Vitek 2
1013	-	21	6	8	16
1030	-	24	4	6	16
1154	-	22	8	8	16
1155	-	23	6	6	16
1233	-	22	4	6	16
1239	-	22	6	6	16
1282	-	24	4	4	16
1305	-	21	6	8	16
2008	+	22	6	8	16
2019	-	22	8	6	16
2070	-	21	6	8	16
2133	-	23	6	6	16
2220	+	23	6	6	16
2223	-	23	6	6	16
2310	-	21	6	8	16
2324	-	23	6	6	16
2350	-	25	2	4	16
2368	-	22	8	8	16
2379	-	25	3	4	16
2390	-	21	8	8	16
2448	-	22	6	6	16
2457	-	18	8	12	16
2471	-	26	3	3	16
2477	-	22	6	6	16
2545	-	20	8	8	16
2560	-	22	6	8	16
2613	-	21	8	8	16
2625	-	20	6	8	16
2626	-	23	8	6	16
2677	+	21	6	8	16
2725	-	20	8	12	16
2776	-	23	6	8	16
2827	-	19	6	12	16

AD: agar dilution

2. Discussion – conclusion de l'article 2

2.1 Discussion

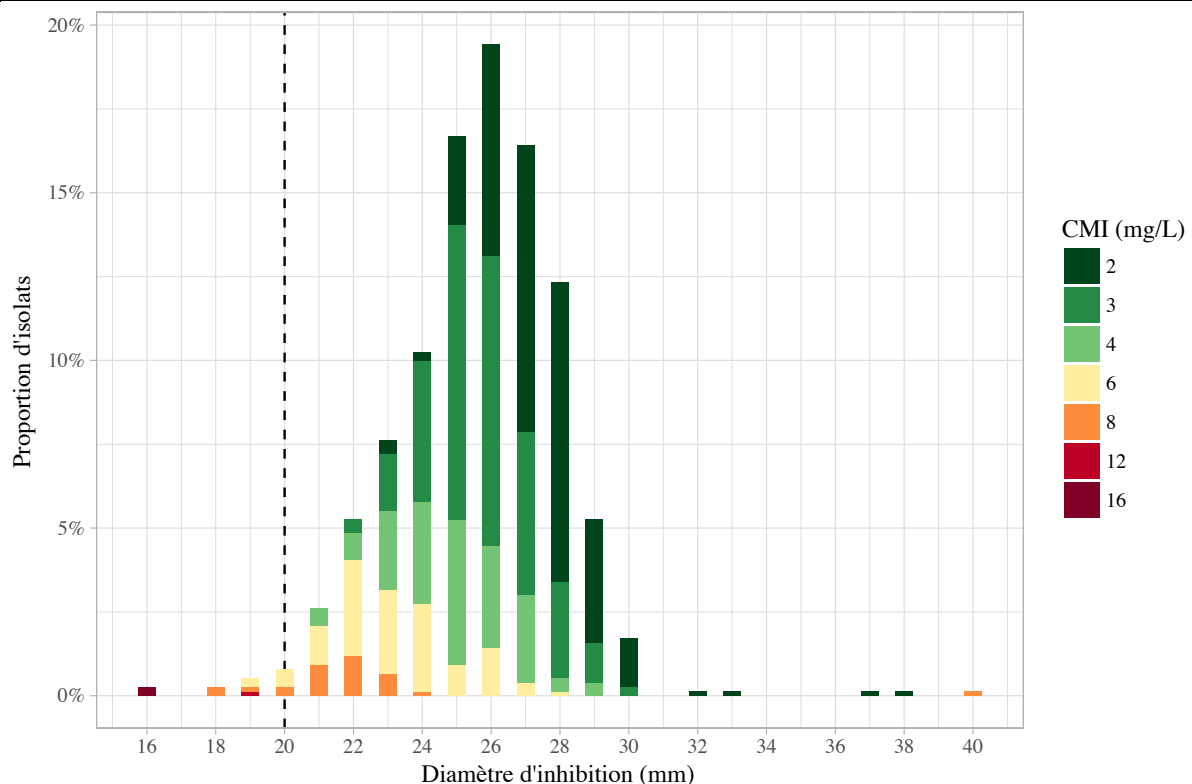
Ce travail original présenté dans l'article 2 présente trois forces méthodologiques : l'inclusion d'un nombre élevé de souches responsables d'infection urinaire communautaire (762 entérobactérales dont 658 *E. coli*), une analyse fine des CMI au-delà de la gamme de raison 2 habituelle permettant de ce fait de bien mieux cerner CMI₅₀ et CMI₉₀, et la confrontation des trois méthodes utilisées en routine (disque, automate et gradient) comparativement à une technique de référence. Des résultats, il peut être tiré deux enseignements majeurs : un taux de sensibilité élevé à la témocilline des entérobactérales actuellement circulant en France et une grande fiabilité des méthodes phénotypiques d'estimation de la sensibilité dans ce contexte.

Ces éléments méritent d'être discutés au regard de données récentes de la littérature, pas toutes concordantes, et des nouvelles définitions de l'EUCAST (3), ceci étant abordé sous l'angle de la ZIT et l'ECOFF pour lesquels l'instance européenne ne s'est pas à ce jour positionnée pour la paire entérobactérale-témocilline.

2.1.1 Faut-il retenir une zone d'incertitude technique ?

En première analyse le très faible taux d'erreur des méthodes phénotypiques (méthode des disques, Etest, automate VITEK2) observé dans notre travail ne justifie pas une ZIT (**figure 7**). Cependant nos données favorables doivent être pondérées par la faible proportion d'E-BLSE (4,9%) dans notre série (32). De fait, des travaux antérieurs comportant une plus grande proportion de E-BLSE (10-58%) avaient retrouvé des taux d'erreur plus importants : de 4% - 15% pour l'Etest par exemple (33,34). Néanmoins d'autres facteurs que la prévalence d'E-BLSE peuvent influencer la fiabilité d'une méthode phénotypique (notamment la méthode des disques) telle la qualité des disques, le milieu utilisé, la préparation de l'inoculum, et l'expérimentateur (35).

Figure 7 : Corrélation entre diamètre d'inhibition de la témocilline (30 μ g, Bio-Rad) et CMI mesurée par dilution en milieu gélosé



Ligne pointillée : diamètre critique défini par le CA-SFM. D'après Alexandre *et al.* (32)

Sur ce sujet, la fiabilité de la méthode des disques provenant de deux fournisseurs différents (BioRad et I2a) a été très récemment étudiée (36). Dans ce travail, les 11 laboratoires français participants devaient inclure au moins 50 isolats d'entérobactérales dont au moins 60% présentant une résistance phénotypique aux céphalosporines de 3^{ème} génération (E-C3GR). La méthode de référence utilisée était le Etest, ce qui peut être discuté. Au total, 888 isolats (dont 61% E-C3GR et 42% E-BLSE) ont été inclus. Le taux total d'erreur était de 10,6% comprenant 7,6% d'erreurs majeures et 2,9% d'erreurs très majeures. De façon intéressante, deux tiers des erreurs étaient constatées pour des diamètres d'inhibition compris dans l'intervalle [18 – 21 mm] et 56% impliquaient les E-BLSE. De plus, le taux d'erreur était significativement plus faible lors de l'utilisation des disques du fournisseur Bio-Rad plutôt que de ceux de I2a (8,6% contre 16%). Enfin comme dans d'autres travaux (37,38), il a été constaté des micro-colonies

au sein du diamètre d'inhibition qui se sont révélées être sensibles (selon la concentration critique de 8 mg/L et par Etest). Ces micro-colonies ajoutent de la complexité et peuvent être une source d'erreur dans l'évaluation phénotypique de la sensibilité de la témocilline.

Au total, l'évaluation de la sensibilité d'un antibiotique est une science inexacte du fait de variations biologiques (vitesse de croissance de la bactérie, expression de gènes impliqués dans la résistance) et techniques (densité bactérienne de l'inoculum, préparation et conservation des milieux de culture, stabilité de la température des incubateurs) (39). Au regard de notre travail et de la littérature, il peut être conclu (i) que l'évaluation par la méthode des disques est fiable mais avec des inégalités entre les fournisseurs (les disques Bio-Rad semblent à privilégier), (ii) que la majorité des erreurs de catégorisation implique (à la concentration critique de 8 mg/L) des E-BLSE avec des diamètres d'inhibition compris entre 18 et 21 mm, et enfin (iii) que l'estimation de la CMI par Etest est fiable. Aussi, il pourrait être proposé, si la concentration critique de la témocilline devait être maintenue à 8 mg/L, une ZIT pour des diamètres d'inhibition compris dans l'intervalle [18 – 21 mm]. Une évaluation de la CMI par Etest serait alors recommandée pour les isolats concernés.

2.1.2 Quel ECOFF proposer ?

Comme détaillé *supra* dans la revue bibliographique, l'ECOFF est défini comme la plus haute CMI d'un anti-infectieux vis-à-vis d'une population d'isolats bactériens dépourvus de mécanisme de résistance phénotypiquement détectable vis-à-vis de l'antibiotique étudié. Or pour la témocilline si les mécanismes de résistance sont aisément détectables (comme le démontrent les valeurs élevées de CMI₅₀ et CMI₉₀) au sein des espèces bactériennes présentant une résistance naturelle telles que les cocci à Gram positif (affinité moindre pour les PLP, CMI₅₀ ≥ 256 mg/L, CMI₉₀ ≥ 256 mg/L) et *P. aeruginosa* (expression de pompe à efflux, CMI₅₀ ≥ 256 mg/L, CMI₉₀ ≥ 256 mg/L) (40,41), la situation est bien plus complexe concernant les E-BLSE. En effet, la résistance de la témocilline à l'hydrolyse par les β-lactamases dépend

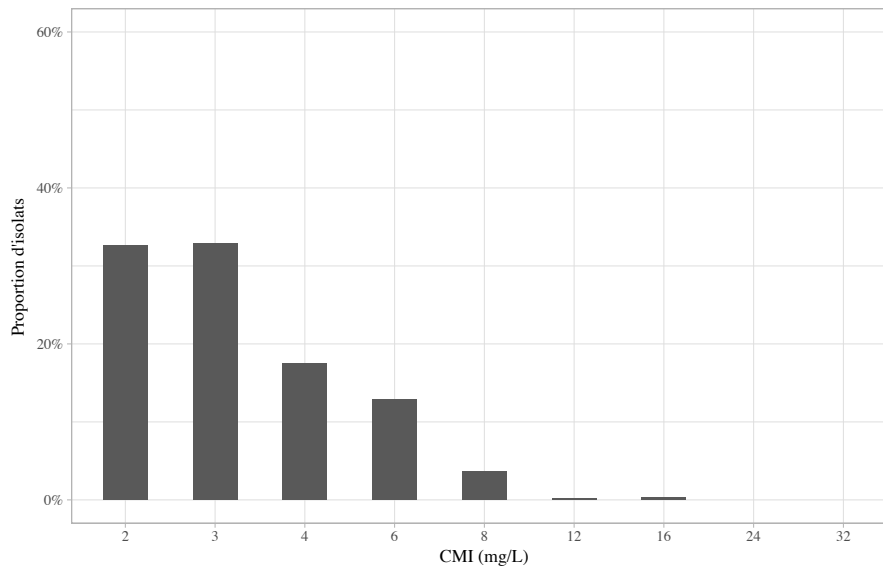
de la nature de celles-ci, étant bien discriminée par la classification de Amber. Ainsi, la témocilline est hydrolysée par les métalo- β -lactamases de la classe B et par les oxacillinases à spectre étendu de la classe D (tels les dérivés des OXA-48). De fait, la résistance conférée par ces β -lactamases est aisément détectable par des méthodes phénotypiques. La témocilline fait d'ailleurs partie de l'algorithme de détection phénotypique des OXA-48 et de leurs dérivées (42). *A contrario*, le résidu méthoxy de la témocilline entraîne en principe une résistance à l'hydrolyse par les β -lactamases dites « sérine dépendante » de la classe A telles les BLSE, et de la classe C comme les céphalosporinases chromosomiques (43). Cependant pour les E-BLSE la résistance de la témocilline à l'hydrolyse semble être partielle, sans pouvoir exclure l'association avec d'autres mécanismes de résistance (tels que la mutation de porines ou la surexpression de pompes d'efflux). En effet, dans la littérature le taux de résistance, les CMI₅₀ (8 mg/L) et CMI₉₀ (16 mg/L) des E-BLSE sont supérieurs à ceux des isolats non producteurs de BLSE (*cf.* tableau 2, article 1). Or la question de savoir si les E-BLSE font partie ou non de la population « sauvage » telle que définie par l'ECOFF est majeure, ce d'autant que les E-BLSE sont la cible thérapeutique majoritaire de la témocilline comme souligné dans les dernières recommandations françaises (44,45).

Au regard de ces éléments nous avons repris nos données individuelles pour définir les valeurs d'ECOFF, avec deux approches intégrant ou non les E-BLSE parmi les « sauvages » et en rendant les résultats d'une part pour *E. coli* (car la base de données de l'EUCAST fait figurer les ECOFF uniquement par genre et non par famille bactérienne) et d'autre part pour l'ensemble des entérobactérales à la fois pour aider à intégrer d'autres données de la littérature (*cf infra*) et parce que cela correspond à l'approche thérapeutique des traitements probabilistes : témocilline introduite devant une infection suspectée à entérobactérale sur la foi d'une coloration de Gram ou encore d'une bandelette positive pour les nitrites, sans connaissance à ce stade de l'espèce même si épidémiologiquement *E. coli* est très dominant.

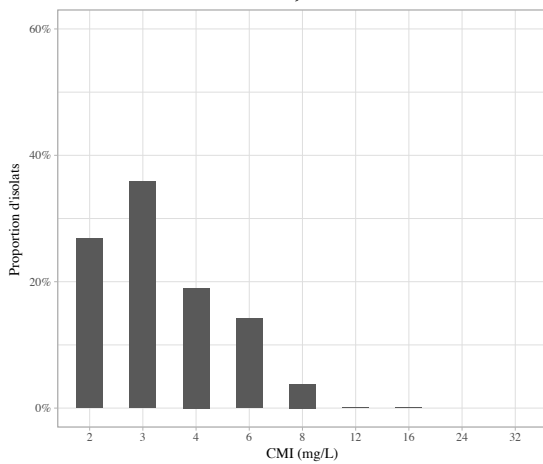
Ainsi, comme représenté sur la **figure 8**, l'ECOFF sur l'ensemble de la cohorte pourrait être défini à 8 mg/L (**figure 8A**), sans différence apparente entre les espèces d'entérobactériales (*E. coli* et autres entérobactériales, **figure 8B** et **figure 8C**). Par contre, les E-BLSE (même si en nombre limité dans notre série) présentent un ECOFF supérieur (16 mg/L, **figure 8E**) aux entérobactériales non BLSE (8 mg/L, **figure 8D**).

Figure 8 : Distribution des CMI de la témocilline vis-à-vis d'entérobactérales en fonction des espèces bactériennes et de la production de BLSE

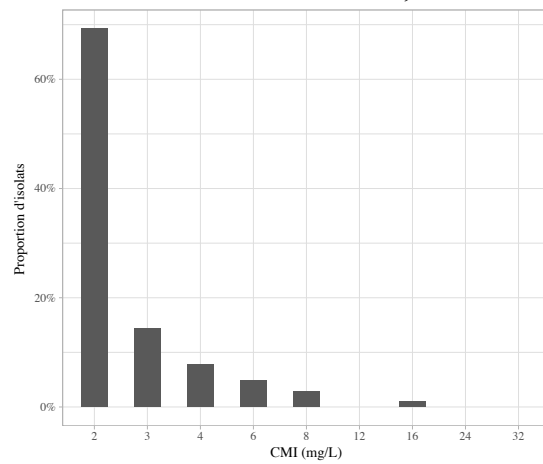
A : Ensemble de la cohorte, n=762



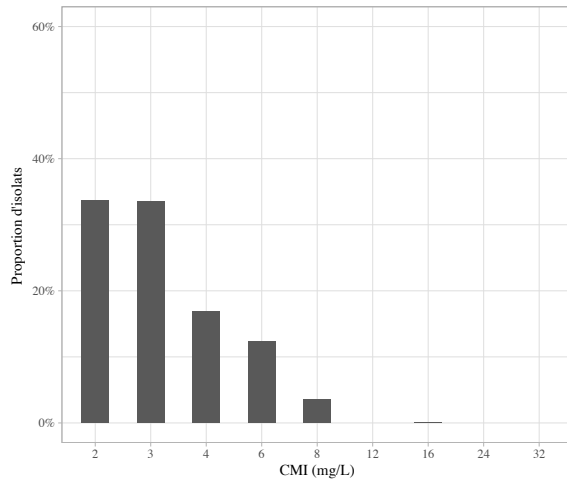
B : *E. coli*, n=658



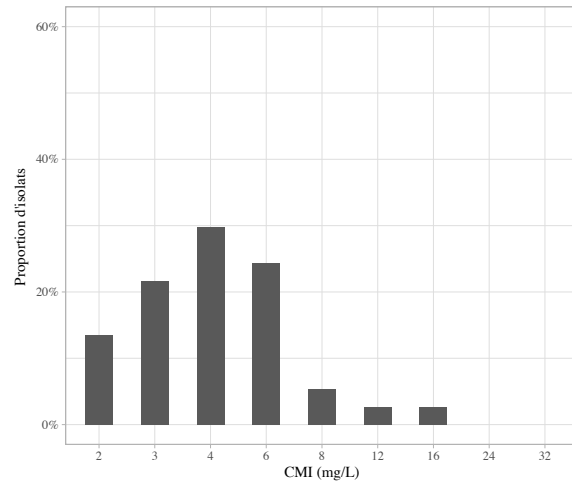
C : Autres entérobactérales, n=104



D : Entérobactérales non BLSE, n=725

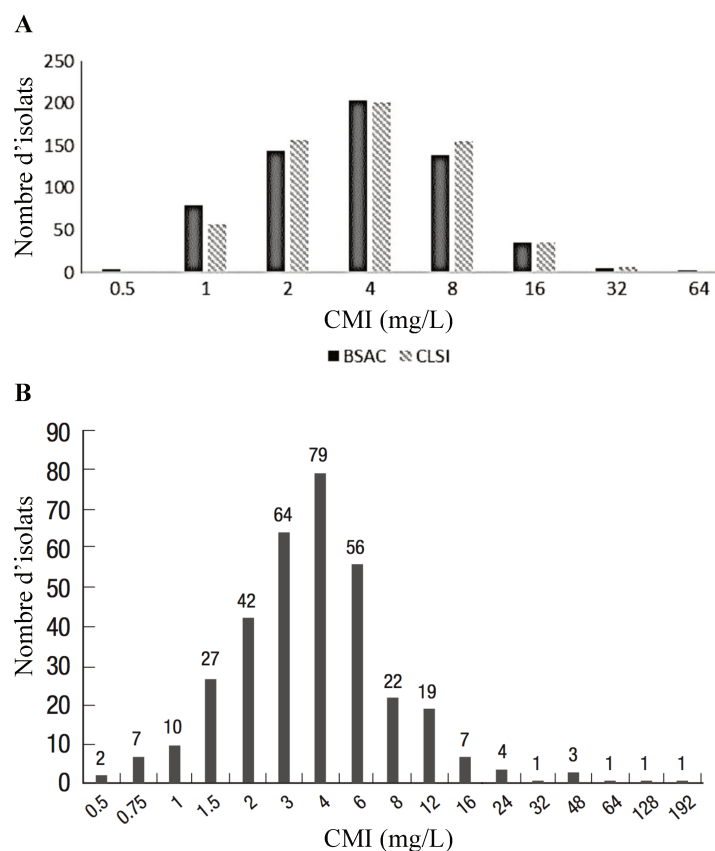


E : Entérobactérales BLSE, n=37



Cette différence d'ECOFF en fonction de la production ou non de BLSE est concordante avec les données de la littérature. En effet, deux travaux récents réalisés à Hong-Kong et en Corée du Sud ont évalué prospectivement la sensibilité des souches responsables d'infection urinaire (isolées d'hémoculture ou d'ECBU) vis-à-vis de la témocilline (46,47). Le nombre d'isolats était de 613 et 346, majoritairement des *E. coli*. La sensibilité de la témocilline était évaluée par microdilution (méthode de référence de l'EUCAST) dans l'étude de Ip *et al.* et par Etest dans l'étude de Seo *et al.* Le taux de sensibilité de la témocilline selon la concentration critique actuelle du CA-SFM (8 mg/L) était inférieur à celui de notre étude : 89-93% contre 99,6%. L'analyse de la distribution des CMI de la témocilline vis-à-vis des isolats étudiés dans ces travaux permet d'établir un ECOFF à 16 mg/L (**figure 9**). La proportion d'E-BLSE allait jusqu'à 23% dans l'étude de Ip *et al.*

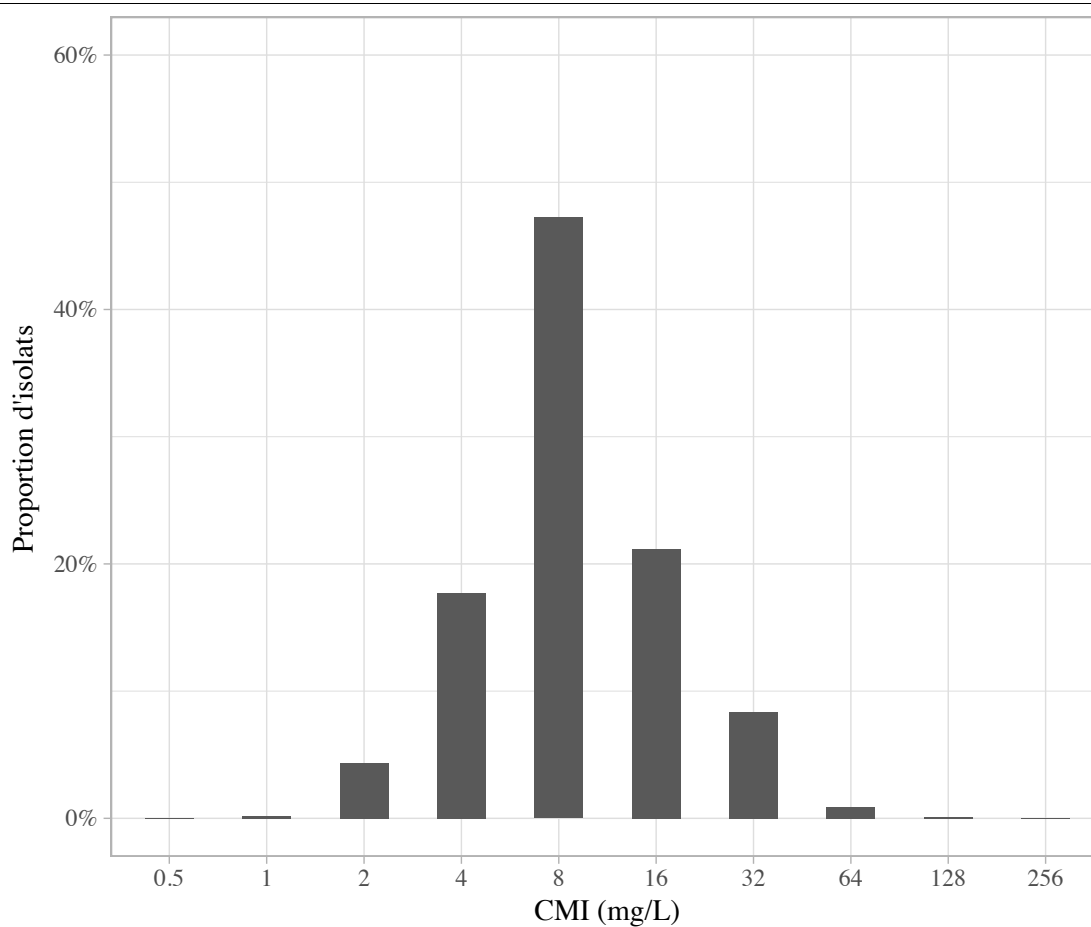
Figure 9 : Distribution des CMI de la témocilline vis-à-vis de 613 (A) et 346 (B) isolats d'entérobactériales



(A) d'après Ip *et al.* (46), (B) d'après Seo *et al.* (47)

De plus, il nous a été possible de colliger la distribution des CMI de la témocilline vis-à-vis de 1596 E-BLSE (dont 77% de *E. coli*) au total de 7 séries publiées par d'autres équipes (48–54) et de notre travail (article 2). Comme représenté sur la **figure 10**, il en ressort un ECOFF «E- BLSE » à 32 mg/L pour la témocilline.

Figure 10 : Distribution des CMI de la témocilline vis-à-vis de 1596 isolats d'E-BLSE



D'après 8 distributions correspondant aux références (48–54)

2.2 Conclusion

Au total, la définition de l'ECOFF de la témocilline vis-à-vis des entérobactérales est complexe et encore inconnue à ce jour. Cette valeur extrêmement importante dans le processus de définition des concentrations critiques selon la méthode de l'EUCAST peut varier pour la témocilline en fonction de l'inclusion ou non dans la population « sauvage » des E-BLSE. Comme développé dans la revue bibliographique l'ECOFF représente la valeur minimale de la concentration critique (séparant le S du R lorsqu'il n'y a que deux catégories ou le S du I lorsqu'il y en a trois). La concentration critique unique à 8 mg/L actuellement retenue par le CA-SFM (en l'absence d'harmonisation européenne disponible) correspond donc à l'ECOFF des entérobactérales non BLSE. Cette concentration critique à 8 mg/L divise par contre la population d'E-BLSE, indication thérapeutique majoritaire de la témocilline.

Ainsi, l'approche PK/PD, complémentaire de l'approche épidémiologique, apparaît comme primordiale pour la témocilline afin d'évaluer si les différents schémas posologiques chez l'homme permettent d'atteindre des cibles thérapeutiques pour des isolats vis-à-vis desquels la CMI de la témocilline est de 16 ou 32 mg/L (ECOFF des E-BLSE). Cette approche a fait l'objet de deux études originales publiées (articles 3 et 4) présentées ci-dessous. Ces deux travaux ont pour trait commun le recours à un modèle animal pour évaluer la pertinence des trois concentrations critiques envisageables (8, 16, et 32 mg/L) en adaptant les schémas posologiques. Ils divergent par contre quant au type d'infection traitée (urinaire ou péritonéale) et à quant à la nature des souches évaluées (isogéniques avec l'avantage de la comparabilité hormis la valeur de CMI ou cliniques à virulence établie chez l'homme) et enfin quant à la nature de la multi-résistance (BLSE ou carbapénèmase).

Ces deux articles seront suivis d'une discussion commune concernant l'évaluation par cette approche PK/PD de la concentration critique de la témocilline.

3. Article 3 : Temocillin breakpoints in pyelonephritis: evaluation in a murine model due to ESBL-producing *Escherichia coli* clinical isolates




Temocillin breakpoints in pyelonephritis: evaluation in a murine model due to ESBL-producing *Escherichia coli* clinical isolates

Auteurs : K. Alexandre, A. Soares, F. Chau, B. Fantin, F. Caron, M. Etienne


Publié en Janvier 2019 dans Journal of Antimicrobial Chemotherapy

Doi : 10.1093/jac/dky569

Temocillin breakpoints in pyelonephritis: evaluation in a murine model due to ESBL-producing *Escherichia coli* clinical isolates

Kévin Alexandre ^{1,2*}, Anaïs Soares^{1,3}, Françoise Chau⁴, Bruno Fantin ⁴, François Caron^{1,2} and Manuel Etienne ^{1,2}

¹EA 2656 (GRAM 2.0), IRIB, Normandie Univ, Unirouen, Rouen, France; ²Infectious Diseases Department, Rouen University Hospital, Rouen, France; ³Microbiology Department, Rouen University Hospital, Rouen, France; ⁴INSERM, IAME, UMR 1137, F-75018 Paris, France

*Corresponding author. Tel: +332-32-88-06-74; Fax: +332-32-88-82-75; E-mail: kevin.alexandre@chu-rouen.fr  orcid.org/0000-0001-7773-5695

Received 4 September 2018; returned 13 October 2018; revised 14 December 2018; accepted 18 December 2018

Background: Due to a spectrum restricted to Enterobacteriaceae and stability against ESBL and AmpC enzymes, temocillin is of major interest for the treatment of pyelonephritis. But there are still uncertainties about the optimal regimen and clinical breakpoints.

Objectives: To study in a murine model of pyelonephritis the activity of temocillin against *Escherichia coli* isolates with different MICs in order to evaluate clinical breakpoints.

Methods: Four clinical uropathogenic *E. coli* isolates with temocillin MICs of 8 mg/L (Ec8), 16 mg/L (Ec16), 32 mg/L (Ec32) and 64 mg/L (Ec64) were evaluated. Antibiotic 24 h T_{50-MIC} achieved in humans was reproduced in mice with either intravenous temocillin (2 g q12h or 2 g q8h) or intravenous imipenem (1 g q8h). Efficacy was assessed by bacterial count in kidneys.

Results: Compared with controls, temocillin at 2 g q12h was highly efficient against Ec8 ($-3.32 \log_{10}$ cfu/g and negative cultures in 93% of mice; $P < 0.001$); imipenem gave similar results. Temocillin at 2 g q12h also induced high reduction of bacterial count against Ec16 ($-2.92 \log_{10}$ cfu/g; $P < 0.001$), albeit cultures were negative in only 48% of mice. In contrast, no significant effect was observed in mice infected by Ec32 ($-0.01 \log_{10}$ cfu/g; $P = 0.981$) or Ec64 ($-0.55 \log_{10}$ cfu/g; $P = 0.523$). Even temocillin at 2 g q8h failed to control Ec32 infection ($-1.55 \log_{10}$ cfu/g; $P = 0.197$).

Conclusions: This model suggests a clinical breakpoint up to 16 mg/L for non-severe pyelonephritis treated with temocillin at 2 g q12h, a value consistent with the few previous available data.

Introduction

Urinary tract infections (UTIs) are the most common human infections due to ESBL-producing *Escherichia coli*. Temocillin has emerged as an attractive carbapenem-sparing option because of a spectrum mainly restricted to Enterobacteriaceae, a stability against numerous β -lactamases, including ESBL and AmpC enzymes, and minimal risk of *Clostridium difficile* infection.¹

Debate is, however, still ongoing about the optimal temocillin therapeutic schedule. Current recommended regimens are 2 g q12h or 2 g q8h depending on infection severity and strain susceptibility.^{1,2}

As a consequence, there is still no international consensus regarding temocillin breakpoints, with three different values for susceptible isolates, i.e. MIC ≤ 8 , ≤ 16 and ≤ 32 mg/L, depending on the country.³⁻⁵

Two previous animal studies have suggested that a humanized temocillin regimen of 2 g q12h retains activity against *E. coli* strains

with MICs up to 16 mg/L.^{6,7} Both studies used genetically modified bacteria. One study used a unique isolate with a temocillin MIC of 8 mg/L, the results being derived from pharmacokinetic calculations. The other study was not conducted in UTI, hence antibiotic concentrations at the site of infection might differ notably. Therefore, we aimed to further study in a murine model of pyelonephritis the *in vivo* activity of temocillin against different ESBL-producing *E. coli* clinical isolates, in order to contribute to better definition of clinical breakpoints for systemic UTI.

Materials and methods

Bacterial strains

Four clinical uropathogenic *E. coli* isolates belonging to phylogroup B2 (i.e. the most urovirulent phylogroup)⁸ were selected. All produced the most common ESBL currently encountered (i.e. CTX-M-15)⁹ with a minimal fitness cost estimated by a maximum growth rate (MGR) $\geq 1.4 \text{ h}^{-1}$ (calculated as previously described).¹⁰ Their temocillin MICs (determined by the

Alexandre et al.

CLSI-approved broth microdilution method in triplicate) were 8, 16, 32 and 64 mg/L. They were named Ec8, Ec16, Ec32 and Ec64, respectively, according to their temocillin MIC.

Murine model of pyelonephritis

Experiments were approved by the national ethics committees (agreement number 05214.02). All invasive procedures were performed under anaesthesia. Animals were housed in regulation cages (five animals per cage) with free access to food and water. Pyelonephritis was induced in 214 immunocompetent female CBA mice (8 weeks old, weight 20–23 g) as previously described, with several modifications.¹¹ Briefly, at day (D) 3 post-inoculation (PI) urine samples were collected to screen uninfected animals. D3-PI urine culture was performed to predict positive kidney culture at D4-PI in 28 mice, for which sensitivity and specificity were 86% and 79%, respectively. For each strain, mice with positive D3-PI urine culture were randomly assigned as follows: ≥ 7 were sacrificed at D4-PI (start of treatment), ≥ 7 were left untreated and sacrificed at D6-PI (controls), and ≥ 15 were treated for 24 h starting at D4-PI with temocillin (200 mg/kg q2h or q6h) or (only for Ec8) with imipenem (100 mg/kg q2h).

The pharmacokinetic/pharmacodynamic parameter the most predictive of efficacy for temocillin and imipenem is free-drug $T_{>MIC}$ ($fT_{>MIC}$). Hence, $fT_{>MIC}$ values reproduced in mice were those obtained in humans (Table 1). Since pharmacokinetic parameters of temocillin differ between humans ($C_{max} = 147$ mg/L, $t_{1/2} = 4.3$ h and protein binding = 76% after 2 g intravenously)¹² and mice ($C_{max} = 199$ mg/L, $t_{1/2} = 0.5$ h and protein binding = 16% after 200 mg subcutaneously),⁶ therapeutic regimens were subsequently adapted in mice. Due to ethical concerns (no more than 12 injections per animal) the human regimens of 2 g q8h against Ec8 and Ec16 were not reproduced in mice. To avoid a carry-over effect, treated mice were sacrificed 24 h after the last dose of antibiotic. Kidneys were aseptically removed and homogenized in 1 mL of saline. Dilutions of the solution were spread onto LB agar plates without antibiotic or with temocillin (to detect mutants resistant to 4-fold MIC) and incubated for 72 h. The detection threshold was $1 \log_{10}$ cfu/mL. Results are the median (IQR) for continuous variables. The statistical tests realized with R software (www.r-project.org/) were Mood's test for MGR values, Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests for continuous variables and Fisher's exact test for the proportion of sterile kidneys. A P value < 0.05 was considered to be significant.

Results

The MIC of imipenem was 0.125 mg/L for the four studied isolates. The MGRs were 1.99, 1.58, 1.87 and 1.89 h^{-1} for Ec8, Ec16, Ec32 and Ec64, respectively. The MGR was lower for Ec16 than for Ec64 ($P < 0.001$). Median bacterial counts in kidneys in untreated animals were $\sim 5 \log_{10}$ cfu/g and were stable from D4-PI to D6-PI whatever the strain used (data not shown). No important adverse event was noted during the experimental procedure.

Table 1 shows the bacterial count reduction and the sterilization rate in kidneys for each strain, according to the antibiotic regimen, the $fT_{>MIC}$ achieved in mice and the corresponding parameters in humans. Compared with controls, simulating temocillin at 2 g q12h in humans produced a bacterial reduction $\geq 2.9 \log_{10}$ cfu/g after 24 h in kidneys of mice infected by Ec8 and Ec16, whereas no difference was observed in mice infected by Ec32 and Ec64 (Figure 1). Significant differences in the sterility rate of kidneys and in bacterial count reduction were noted between Ec8 and the three other isolates ($P < 0.05$), but not in other comparisons ($P > 0.05$) (Table 1). A regimen simulating temocillin at 2 g q8h in mice infected by Ec32 (Figure 1) resulted in a $1.55 \log_{10}$ cfu/g bacterial reduction that did

not differ significantly from controls ($P = 0.197$), similarly to a regimen simulating temocillin at 2 g q12h ($P = 0.155$). The kidney sterility rate after a regimen simulating temocillin at 2 g q8h against Ec32 was 20% (3/15), not significantly different from the 17% rate observed with a regimen simulating temocillin at 2 g q12h ($P = 1$) (Table 1). No temocillin-resistant mutant was detected in mice whatever the regimen used.

Imipenem simulating 1 g q8h in humans for 24 h resulted in a significant bacterial count reduction compared with controls (Table 1), similar to that induced by temocillin at 2 g q12h against Ec8 ($P > 0.10$). The sterility rate of kidneys in mice infected by Ec8 was similar between imipenem (93%; 14/15) and temocillin at 2 g q12h ($P > 0.05$). In contrast, in mice infected by Ec16 the sterility rate of kidneys and bacterial count reduction were significantly lower for temocillin at 2 g q12h than for imipenem (Table 1).

Discussion

For now, there is no international consensus about temocillin clinical breakpoints and the optimal regimen. Our study, using clinical uropathogenic *E. coli* strains with similar fitness, demonstrates that temocillin at 2 g q12h displays excellent activity against a strain with an MIC of 8 mg/L, comparable to that of imipenem at 1 g q8h.

Regarding strains with a temocillin MIC of 16 mg/L, two previous experimental studies using isogenic strains in murine pyelonephritis or sepsis of intra-abdominal origin indicated the high efficacy of temocillin at 2 g q12h.^{6,7} In our experiments with Ec16, the mean bacterial reduction in kidneys was $2.9 \log_{10}$ cfu/g and 48% of kidneys were sterilized after only 24 h of temocillin at 2 g q12h. However, as compared with imipenem and with a similar temocillin regimen against Ec8 the sterility rate of kidneys and the bacterial reduction in kidneys were significantly lower. Optimizing the $fT_{>MIC}$ using a 2 g q8h regimen might improve the efficacy of the treatment, but such a regimen against Ec16 was not evaluated for ethical reasons. Finally, our model also demonstrates a lack of efficacy of temocillin against strains with MICs of ≥ 32 mg/L, even with a 2 g q8h regimen. It could be argued that we reproduced in mice the demanding pharmacokinetics seen in patients hospitalized in ICUs, i.e. with high volumes of distribution.^{2,12} It cannot be excluded that better pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters might be reached in patients with less severe infections. Furthermore, the 24 h washout period used in our model to ensure the absence of a carry-over effect might be responsible for regrowth of Ec32 and hence underestimation of the efficacy of treatments.

Our data are consistent with the only study in humans available to date.¹³ In a retrospective analysis of 19 patients with febrile UTI, the authors used temocillin at 2 g q12h to treat febrile UTIs caused by ESBL/AmpC-producing isolates with MICs up to 16 mg/L, with clinical and microbial cure rates of 100%. However, the authors did not determine the exact values of MICs; hence most, if not all, causative strains might have MICs < 16 mg/L. This debate about whether the critical concentration is 8 or 16 mg/L is of particular importance in determining whether temocillin could be used as a first-line treatment in systemic UTIs. In fact, the MIC₉₀ for Enterobacteriaceae isolated from community-acquired UTI was recently found to be 6 mg/L in an area of low ESBL prevalence¹⁴ and 16 mg/L in series including only MDR strains.¹

Experimental temocillin breakpoint evaluation

Table 1. Bacterial count reduction and sterility rate in kidneys according to simulated human antibiotic regimen and strain MIC

Strain MIC (mg/L)	Antibiotic					
	imipenem	temocillin				
	0.125	8	16	32	64	
Simulated human regimen (%fT _{>MIC})	1 g q8h (100%)	2 g q12h (80%)	2 g q12h (45%)	2 g q12h (10%)	2 g q8h (36%)	2 g q12h (0%)
Mouse regimen (%fT _{>MIC})	100 mg/kg q2h (100%)	200 mg/kg q2h (70%)	200 mg/kg q2h (58%)	200 mg/kg q6h (14%)	200 mg/kg q2h (43%)	200 mg/kg q2h (10%)
Bacterial count reduction versus controls						
median	3.35	3.32 ^a	2.92 ^a	0.01 ^a	1.55 ^a	0.55 ^a
IQR	0.04	0.04	1.31	2.23	2.10	2.76
P	<0.001	<0.001	0.002	0.981	0.197	0.523
No. sterilized/total no. (%)	14/15 (93%)	14/15 (93%) ^a	11/23 (48%) ^a	3/18 (17%) ^a	3/15 (20%) ^a	4/16 (25%) ^a

^aP < 0.05 between strain with temocillin MIC of 8 mg/L treated with a regimen simulating 2 g q12h and other groups.

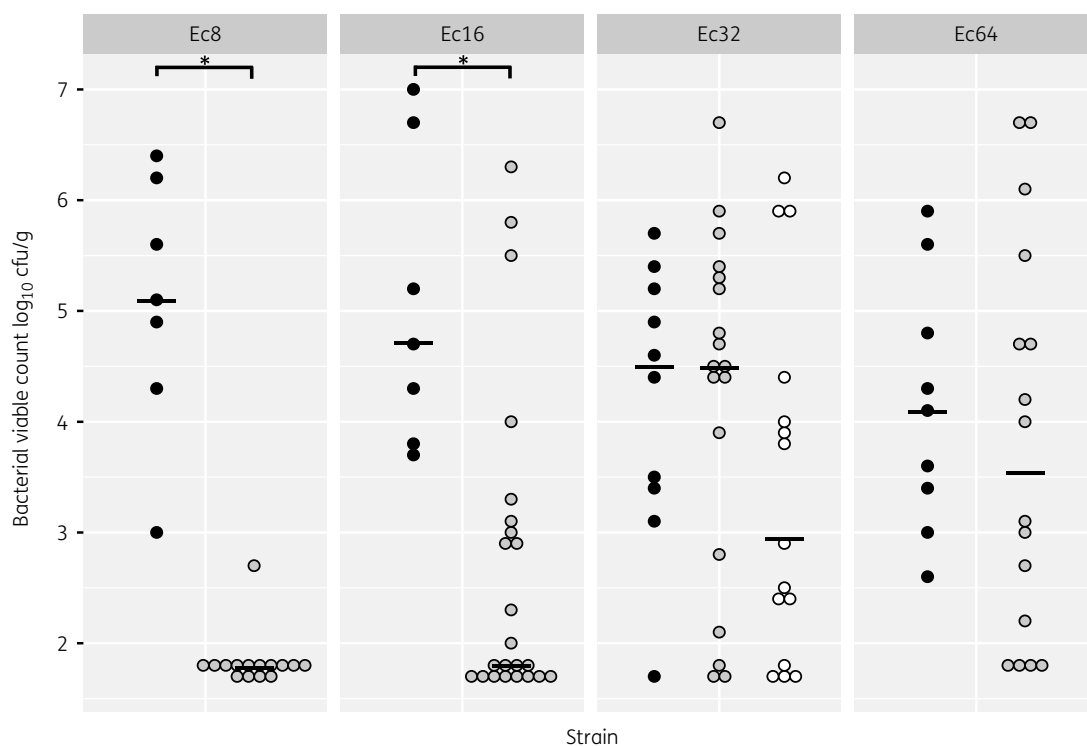


Figure 1. Bacterial counts at D6-PI in kidneys of mice infected by strains with different temocillin MICs (Ec8, 8 mg/L; Ec16, 16 mg/L; Ec32, 32 mg/L; Ec64, 64 mg/L) in control and treated groups. Each circle represents one mouse. Filled black circles, controls; grey circles, mice treated with a regimen simulating temocillin at 2 g q12h; white circles, mice treated with a regimen simulating temocillin at 2 g q8h. The black line represents the median. *P < 0.001 between groups.

In conclusion, our results confirm the *in vivo* efficacy of temocillin at 2 g q12h for the treatment of pyelonephritis due to *E. coli* strains with MICs of 8 mg/L and suggest that such efficacy might be conserved in non-severe infections for strains with MICs up to 16 mg/L.

In contrast, even higher temocillin doses (2 g q8h) failed to treat UTI due to strains with temocillin MICs ≥ 32 mg/L. Prospective clinical studies regarding clinical efficacy according to MIC and temocillin regimen are now awaited to confirm our findings.

Alexandre *et al.*

Funding

This study was supported by internal funding. Part of the animal purchase was supported by a grant from Eumedica SA (grant number CIC/010/2017/FR/GR).

Transparency declarations

K. A. and M. E. each received a travel grant from Eumedica. All other authors: none to declare.

References

- Alexandre K, Fantin B. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of temocillin. *Clin Pharmacokinet* 2018; **57**: 287–96.
- Laterre P-F, Wittebole X, Van de Velde S *et al.* Temocillin (6 g daily) in critically ill patients: continuous infusion versus three times daily administration. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 891–8.
- Fuchs PC, Barry AL, Jones RN *et al.* Temocillin: in vitro activity against 734 selected clinical isolates, including β -lactamase-producing strains. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1984; **2**: 55–63.
- Andrews JM, Jevons G, Walker R *et al.* Temocillin susceptibility by BSAC methodology. *J Antimicrob Chemother* 2007; **60**: 185–7.
- Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Tableaux des concentrations critiques pour l'interprétation des CMI et des diamètres des zones d'inhibition. In: *CASFM/EUCAST*. Paris: Société Française de Microbiologie, 2017; 33–43.
- Soubirou JF, Rossi B, Couffignal C *et al.* Activity of temocillin in a murine model of urinary tract infection due to *Escherichia coli* producing or not producing the ESBL CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 1466–72.
- Alexandre K, Chau F, Guérin F *et al.* Activity of temocillin in a lethal murine model of infection of intra-abdominal origin due to KPC-producing *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2016; **71**: 1899–904.
- Clermont O, Christenson JK, Denamur E *et al.* The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep* 2013; **5**: 58–65.
- Garrec H, Drieux-Rouzet L, Golmard J-L *et al.* Comparison of nine phenotypic methods for detection of extended-spectrum β -lactamase production by Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2011; **49**: 1048–57.
- Bleibtreu A, Gros P-A, Laouénan C *et al.* Fitness, stress resistance, and extraintestinal virulence in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2013; **81**: 2733–42.
- Lepeule R, Ruppe E, Le P *et al.* Cefoxitin as an alternative to carbapenems in a murine model of urinary tract infection due to *Escherichia coli* harboring CTX-M-15-type extended-spectrum β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 1376–81.
- De Jongh R, Hens R, Basma V *et al.* Continuous versus intermittent infusion of temocillin, a directed spectrum penicillin for intensive care patients with nosocomial pneumonia: stability, compatibility, population pharmacokinetic studies and breakpoint selection. *J Antimicrob Chemother* 2008; **61**: 382–8.
- Balakrishnan I, Awad-El-Kariem FM, Aali A *et al.* Temocillin use in England: clinical and microbiological efficacies in infections caused by extended-spectrum and/or derepressed AmpC β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 2628–31.
- Alexandre K, Réveillon-Istin M, Fabre R *et al.* Temocillin against Enterobacteriaceae isolates from community-acquired urinary tract infections: low rate of resistance and good accuracy of routine susceptibility testing methods. *J Antimicrob Chemother* 2018; **73**: 1848–53.

4. Article 4 : Activity of temocillin in a lethal murine model of infection of intra-abdominal origin due to KPC-producing *Escherichia coli*

Activity of temocillin in a lethal murine model of infection of intra-abdominal origin due to KPC-producing *Escherichia coli*

Auteurs : K. Alexandre, F. Chau, F. Guérin, L. Massias, A. Lefort, V.

Cattoir, B. Fantin

Publié en Juillet 2016 dans Journal of Antimicrobial Chemotherapy

Doi : 10.1093/jac/dkw066

Activity of temocillin in a lethal murine model of infection of intra-abdominal origin due to KPC-producing *Escherichia coli*

K. Alexandre¹, F. Chau^{1,2}, F. Guérin^{3,4}, L. Massias^{1,5}, A. Lefort^{1,2,6}, V. Cattoir^{3,4} and B. Fantin^{1,2,6*}

¹INSERM, IAME, UMR 1137, F-75018 Paris, France; ²Université Paris Diderot, IAME, UMR 1137, Sorbonne Paris Cité, F-75018 Paris, France; ³Université de Caen Basse-Normandie, EA 4655 (Équipe “Antibio-résistance”), F-14032 Caen, France; ⁴CHU de Caen, Service de Microbiologie, F-14033 Caen, France; ⁵AP-HP, Groupe Hospitalier Paris Nord Val de Seine, Laboratoire de Pharmacologie, F-75018 Paris, France; ⁶AP-HP, Groupe Hospitalier Paris Nord Val de Seine, Service de Médecine Interne, F-92210 Clichy, France

*Corresponding author. Hôpital Beaujon, Service de médecine interne, 100 boulevard du Général Leclerc F-92210 Clichy, France. Tel: +33140875227; Fax: +33140871081; E-mail: bruno.fantin@bjn.aphp.fr

Received 9 October 2015; returned 20 January 2016; revised 10 February 2016; accepted 17 February 2016

Objectives: Temocillin is a 6- α -methoxy derivative of ticarcillin that shows *in vitro* activity against Enterobacteriaceae producing *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC). Our objective was to assess *in vivo* temocillin activity against KPC-producing *Escherichia coli*.

Methods: Isogenic derivatives of the WT *E. coli* CFT073 producing KPC-2, KPC-3 or OXA-48 were constructed. An experimental murine model of intra-abdominal infection with sepsis was used. Mice were treated subcutaneously with temocillin 200 mg/kg every 2 h for 24 h, reproducing the duration of time that the free serum concentration of temocillin exceeded the MIC in humans with a regimen of 2 g every 12 h or 2 g every 8 h. Blood, peritoneal fluid (PF) and spleen were collected; 24 h survival and sterility rates were assessed.

Results: Temocillin MICs were 8, 16, 32, and 256 mg/L for the susceptible strain and KPC-2-, KPC-3-, and OXA-48-producing strains, respectively. In mice treated with temocillin, significant bacterial reduction was obtained in PF, blood, and spleen for the susceptible strain and KPC-2- and KPC-3-producing strains ($P < 0.001$) but not for the OXA-48-producing strain. Sterility rates in PF were 53%, 10%, 0% and 0% ($P < 0.001$) and sterility rates in blood were 77%, 40%, 3% and 0% ($P < 0.001$), while survival rates were 97%, 97%, 57%, 0% ($P < 0.001$) for mice infected with the susceptible strain and KPC-2-, KPC-3- and OXA-48-producing strains, respectively.

Conclusions: In a lethal-infection model with bacteraemia from intra-abdominal origin, temocillin retained significant activity in PF, blood and spleen and prevented death in mice by effectively working against KPC-producing *E. coli* with temocillin MICs ≤ 16 mg/L.

Introduction

The worldwide spread of ESBL-producing Enterobacteriaceae causing community-acquired and healthcare-associated infections¹ has led to a dramatic increase in the use of carbapenems.² Indeed, carbapenems are still recommended for the first-line treatment of urinary-tract infections or sepsis due to ESBL-producing Enterobacteriaceae.^{3,4} The emergence and spread of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli is now a worldwide public-health concern.⁵ Resistance to carbapenems among Gram-negative bacteria may involve different molecular mechanisms: (i) modification of outer-membrane permeability or up-regulation of efflux systems combined with overproduction of AmpC β -lactamases or ESBL; or (ii) production of carbapenemases.⁶ Therapeutic options against carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) are scarce, since such strains often harbour plasmids carrying genes that confer resistance to other antimicrobial classes.^{7,8} Therefore,

finding alternative therapeutic options against CPE is an urgent medical need.

Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC) enzymes are, by far, the most common class A carbapenemases. After initially being reported in the USA, KPC-producing strains spread worldwide, and they are now endemic in many countries (USA, Greece, Italy, China, Brazil, Argentina, Colombia).⁹ KPC enzymes are generally plasmid encoded, and KPC-producing isolates are usually resistant to non- β -lactam antibiotics such as fluoroquinolones, aminoglycosides and co-trimoxazole. Previously described mostly in *K. pneumoniae*, KPC-encoding plasmids have now also been reported in *Escherichia coli*.¹⁰ This is a worrying fact, as *E. coli* is both a pathogen, ranking first among species that cause urinary-tract and intra-abdominal infections,^{11–13} and also a commensal, representing the most frequently occurring cultivable, Gram-negative, aerobic bacteria of the human gut microbiota,¹⁴ making *E. coli* a major component of the antibiotic resistance reservoir.

Alexandre *et al.*

Temocillin is a 6- α -methoxy derivative of ticarcillin that is stable to the activity of numerous β -lactamases. Indeed, the addition of this methoxy radical confers resistance to hydrolysis by serine-protease enzymes of class A and class C β -lactamases.¹⁵ In contrast, it is hydrolysed by class B and D β -lactamases. Temocillin showed stability against ESBL and AmpC producers in experimental¹⁶ and uncontrolled clinical studies.¹⁷ Despite promising *in vitro* data in support of temocillin stability against KPC-producing isolates,^{18,19} *in vivo* or prospective clinical data are lacking. Moreover, there is no international consensus concerning clinical breakpoints for temocillin.

Therefore, the aims of our study were: (i) to assess the *in vivo* activity of temocillin against *E. coli* strains producing or not producing KPC enzymes in a lethal experimental murine model of intra-abdominal origin, and (ii) to determine the MIC associated with significant efficacy *in vivo*.

Materials and methods

Bacterial strains, plasmids and growth conditions

Three clinical isolates were used as sources of carbapenemase genes: *K. pneumoniae* KPC-2, *K. pneumoniae* KPC-3 and *E. coli* OXA-48. *E. coli* DH5 α was used for cloning experiments, and uropathogenic *E. coli* CFT073 (O6:K2:H1), previously used to produce pyelonephritis in mice, was used as the final recipient strain.²⁰ The plasmid pCR-Blunt II-TOPO (Life Technologies, Saint-Aubin, France), which carried a kanamycin resistance gene, was used for cloning experiments. In order to avoid plasmid loss, all subcultures were done in the presence of kanamycin (400 mg/L).

PCR, cloning and DNA sequencing

Regions corresponding to the *bla*_{KPC-2}, *bla*_{KPC-3} and *bla*_{OXA-48} structural genes and their promoters were amplified by PCR with *Pfu* DNA polymerase (Q5 High-Fidelity DNA polymerase; New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA) using the following primers: KPC2-F (5'-TGAAG GACAAGAGGAAGCG-3') and KPC2-R (5'-GTGGTTGGTAATCCATGCCG-3') for *bla*_{KPC-2} and *bla*_{KPC-3}; and OXA48-F (5'-TCAGTCACGATGAGAGGGGT-3') and OXA48-R (5'-CGCATCGAGCATCAGCATTT-3') for *bla*_{OXA-48}. PCR products were cloned in the pCR-Blunt II-TOPO vector, resulting in plasmids pTOPO-KPC-2, pTOPO-KPC-3 and pTOPO-OXA-48, which were then electroporated into *E. coli* DH5 α . To overcome fitness costs related to plasmids, *E. coli* DH5 α harbouring the empty backbone of the vector (pTOPO) was used as a control. Insertion was confirmed by PCR and sequencing and plasmids were extracted using the QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Finally, recombinant plasmids were introduced by electrotransformation into *E. coli* CFT073, resulting in CFT073-KPC2, CFT073-KPC3, CFT073-OXA48 and CFT073-pTOPO.

In vitro antibiotic activities and growth rates

MICs of temocillin and imipenem were determined by the broth microdilution method in accordance with EUCAST guidelines (www.eucast.org). Growth curves were measured at 37°C in LB broth using an automatic spectrophotometer (Tecan Infinite F200PRO, Männedorf, Switzerland) measuring OD at 600 nm (OD₆₀₀) every 5 min over a period of 24 h. The growth curves were analysed with R software, and maximum growth rates were calculated as described elsewhere.²¹

Experimental murine model

Ethics

Animals were housed in regulation cages and given free access to food and water. Experiments were approved by the local ethics committee

(Departmental Direction of Veterinary Services, Paris, France, agreement no. 75-861).

Swiss ICR-strain female mice weighing 25 to 30 g were used. An experimental sepsis model was used as previously described.²² Pellets of overnight cultures were mixed 1:1 with porcine mucin 10% (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, France). Mice were inoculated with a 250 μ L intraperitoneal injection of bacteria/mucin mix, corresponding to a final inoculum of $\sim 2.5 \times 10^7$ cfu.

Overall, 202 mice were used for experiments. Two hours after inoculation, just before the start of treatment, at least eight mice per strain were sacrificed to determine bacterial load. Spontaneous infection outcome was assessed by observing five mice per strain for 24 h without antibiotic treatment. In the therapeutic groups, treatment was started 2 h post infection and lasted 24 h. Mice were sacrificed by intraperitoneal injection of 200 μ L of sodium thiopental 4 h after the last antibiotic injection. Immediately after death, a peritoneal wash was performed by intraperitoneal injection of 2 mL of sterile saline solution followed by gentle massage of the abdomen and opening the peritoneum to collect 1 mL of fluid. Spleen was extracted and homogenized in 1 mL of sterile saline solution. Intracardiac puncture was performed, and 0.1 mL of blood was spread onto agar. In mice that did not survive the infection, only spleen was extracted within 2 h after death to avoid sample contamination. Samples diluted by a factor of 10 were plated onto agar for quantitative culture, containing or not containing kanamycin (400 mg/L) to assess *in vivo* plasmid loss, and containing or not containing temocillin at a concentration of $4 \times \text{MIC}$ to detect the selection of resistant mutants *in vivo*. Results were expressed as log₁₀ cfu/g for spleen and log₁₀ cfu/mL for blood and peritoneal fluid. The detection limit was 1.3 log₁₀ per gram or millilitre.

Therapeutic regimens

Temocillin was injected subcutaneously with a regimen of 200 mg/kg every 2 h (30 mice per strain) and imipenem with a regimen of 100 mg/kg every 3 h or every 4 h (15 mice per strain), for 24 h. These regimens were chosen in order to achieve in serum the same percentage of time of the dosing interval during which free-drug concentrations exceeded the MIC ($fT_{>\text{MIC}}$) as those obtained in humans with intravenous standard regimens^{16,23–25}; $fT_{>\text{MIC}}$ according to MIC and antibiotic therapeutic regimens in human and mouse are summarized in Table 1. Imipenem was used against the susceptible strain in order to compare temocillin with a reference antibiotic and to validate the model (positive control), and against the imipenem-resistant KPC-3 strain as a negative control.

Antibiotic assays

To evaluate temocillin peritoneal diffusion, blood samples and peritoneal washes were obtained from five anaesthetized infected mice at 30 and 120 min after a single temocillin subcutaneous injection of 200 mg/kg. Concentrations of temocillin were determined by HPLC with ultraviolet detection at 237 nm, as previously described.¹⁶ The limit of quantification was 1 mg/L in serum and in peritoneal fluid.

Statistical analysis

Results were expressed as median [minimum–maximum] for continuous variables; log₁₀ cfu/g in spleen, and log₁₀ cfu/mL in blood and peritoneal fluid were compared for the different groups by the Mann–Whitney *U*-test or the Kruskal–Wallis test when appropriate. Proportions of sterile organs (bacterial counts under the detection limit) in the different groups were compared by the Fisher's exact test. A *P* < 0.05 was considered significant.

Results

MICs and growth rates

MICs of temocillin and imipenem are shown in Table 1. As expected, CFT073-OXA48 was highly resistant to temocillin and CFT073-KPC2

Temocillin against KPC-producing *E. coli* in mice**Table 1.** MICs and proportions of time during which free serum concentrations exceed the MIC ($f_{T>MIC}$) for temocillin and imipenem according to therapeutic regimens used in humans and in mice

Strain	MIC (mg/L)		$f_{T>MIC}$ (%)					
			TEM			IPM		
	TEM	IPM	human (2 g every 12 h ^a)	human (2 g every 8 h ^b)	mouse (200 mg/kg every 2 h ^c)	human (1 g every 8 h ^d)	mouse (100 mg/kg every 3 h ^e)	mouse (100 mg/kg every 4 h ^e)
CFT073-pTOPO	8	0.5	80	95	70	75	67	50
CFT073-KPC2	16	8	45	80	58	25	32	24
CFT073-KPC3	32	16	10	40	43	19	26	20
CFT073-OXA48	256	4	0	0	0	42	37	28

Numbers in bold correspond to the $f_{T>MIC}$ (%) obtained in mice with the antibiotic regimen actually performed in this study for each strain and the corresponding $f_{T>MIC}$ (%) found in human studies corresponding to such an MIC. TEM, temocillin; IPM, imipenem.

^aSee De Jongh *et al.*²³

^bSee Laterre *et al.*²⁴

^cSee Soubirou *et al.*¹⁶

^dSee Signs *et al.*²⁵

^eSee Lepeule *et al.*²⁰

and CFT073-KPC3 were intermediate and resistant to imipenem, respectively. Notably, maximum growth rates did not differ among the four study strains ($P > 0.05$) (data not shown).

Experimental murine model

Bacterial load 2 h after inoculation was $7.69 \log_{10}$ cfu/mL (5.30–8.57) in peritoneal fluid, $7.00 \log_{10}$ cfu/g (6.11–8.38 \log_{10} cfu/g) in spleen and $5.68 \log_{10}$ cfu/mL (4.25–6.60 \log_{10} cfu/mL) in blood, with no difference between strains except between CFT073-pTOPO ($5.20 \log_{10}$ cfu/mL) and CFT073-OXA48 ($6.25 \log_{10}$ cfu/mL) in blood ($P < 0.001$). Overall, spontaneous mortality rate at 24 h without treatment was 97% and did not differ between strains. *In vivo* plasmid stability 2 h after infection was 100% for all strains.

Temocillin treatment

As shown in Figure 1, there was a significant reduction in bacterial viable counts after treatment with temocillin as compared with those at the start of treatment in peritoneal fluid, blood and spleen for mice infected with CFT073-pTOPO ($1.30 \log_{10}$ cfu/mL, $1.30 \log_{10}$ cfu/mL, $4.05 \log_{10}$ cfu/g, $P < 0.001$), CFT073-KPC2 ($2.38 \log_{10}$ cfu/mL, $1.60 \log_{10}$ cfu/mL, $4.66 \log_{10}$ cfu/g, $P < 0.001$), and CFT073-KPC3 ($3.00 \log_{10}$ cfu/mL, $3.00 \log_{10}$ cfu/mL, $5.84 \log_{10}$ cfu/g, $P < 0.001$), respectively. Bacterial viable count in spleen of mice infected by CFT073-OXA48 did not differ before treatment [$6.99 \log_{10}$ cfu/g (6.25–8.11 \log_{10} cfu/g)] and after treatment with temocillin [$6.65 \log_{10}$ cfu/g (5.77–8.37 \log_{10} cfu/g)] ($P = 0.16$). Because all mice infected with CFT073-OXA48 died despite temocillin treatment, no data concerning bacterial viable counts in blood or peritoneal fluid were available for this strain. Sterilization rates of peritoneal fluid and blood samples and mice survival rates according to strains after treatment with temocillin are shown in Figures 2 and 3, respectively. Regardless of strain, spleens were never sterilized except for that of one mouse infected with CFT073-KPC2. Peritoneal fluids were sterilized in 53% (16/30) of mice infected with CFT073-pTOPO, 10% (3/30) of mice infected

with CFT073-KPC2 and 0% of mice infected with CFT073-KPC3 and CFT073-OXA48 ($P < 0.001$ between CFT073-pTOPO and CFT073-KPC2). Blood was sterilized in 77% (23/30) of mice infected with CFT073-pTOPO, 40% (12/30) of mice infected with CFT073-KPC2, 3% (1/30) of mice infected with CFT073-KPC3 and 0% (0/30) of mice infected with CFT073-OXA48 ($P < 0.001$ between CFT073-pTOPO and CFT073-KPC2). Survival rates after temocillin treatment were 97% (29/30), 97% (29/30), 57% (17/30) and 13% (4/30) for mice infected with pTOPO, CFT073-KPC2, CFT073-KPC3 and CFT073-OXA48, respectively ($P < 0.001$ between CFT073-KPC2 and CFT073-KPC3). No temocillin-resistant mutant was detected *in vivo* after the end of treatment.

Imipenem treatment

In mice infected with CFT073-pTOPO, bacterial viable counts in peritoneal fluid, blood and spleen after treatment with imipenem were $1.30 \log_{10}$ cfu/mL (1.30–1.30 cfu/mL), $1.30 \log_{10}$ cfu/mL (1.30–1.30 cfu/mL) and $2.98 \log_{10}$ cfu/g (2.80–3.18 \log_{10} cfu/g), respectively (Figure 1). These results did not significantly differ from cfu counts obtained with temocillin, except for results for spleen, where cfu counts were lower with imipenem than with temocillin ($P < 0.001$). Sterility rates were 80% (12/15) and 67% (10/15) for blood and peritoneal fluid (Figure 2), respectively, and the survival rate was 93% (Figure 3), similar to those obtained with temocillin ($P > 0.05$). In mice infected with CFT073-KPC3 and treated with imipenem, bacterial viable counts in spleen were $7.50 \log_{10}$ cfu/g (6.10–8.30 \log_{10} cfu/g), which were significantly higher than those obtained with temocillin ($P < 0.001$). No peritoneal fluid or blood sample was sterilized. The survival rate was 20% (3/15), significantly lower than that obtained with temocillin ($P = 0.027$).

Temocillin concentrations in peritoneal fluid

Mean temocillin concentrations in peritoneal fluid and serum were 25.7 mg/L and 96.2 mg/L at 30 min and 19 mg/L and

Alexandre et al.

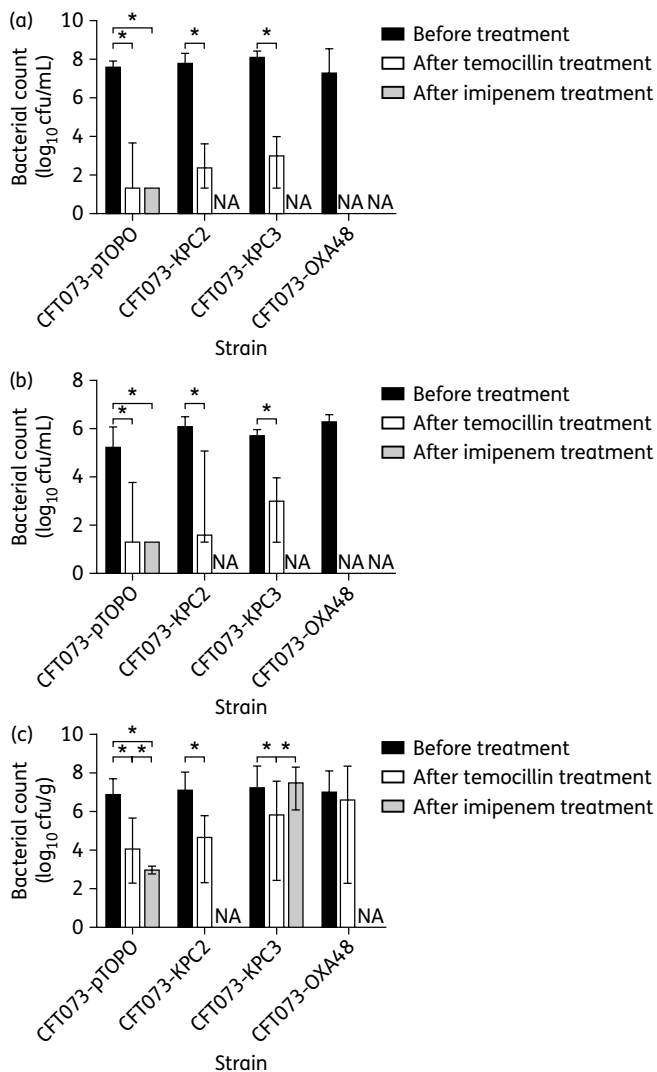


Figure 1. Colony counts in peritoneal fluid (a), blood (b), and spleen (c) in mice treated with temocillin or imipenem, according to bacterial strains. Data from peritoneal fluid and blood from imipenem-treated mice infected with the CFT073-KPC3 strain are not shown, as only 3 of 15 mice survived. * $P < 0.001$. NA, data not available.

18.5 mg/L at 2 h, representing a peritoneal fluid/blood temocillin concentration ratio of 27% at 30 min and 100% at 2 h.

Discussion

Our results demonstrated that a significant *in vivo* activity of temocillin was retained against isogenic *E. coli* KPC-producing strains in a murine model of severe sepsis from intra-abdominal infection. Indeed, initial bacterial inoculum in peritoneal fluid was high ($> 7 \log_{10}$ cfu/mL), which was associated with a mortality rate without treatment of nearly 100%. Because major differences exist between pharmacokinetic parameters of temocillin in mice and humans, adjustments were made in order to draw

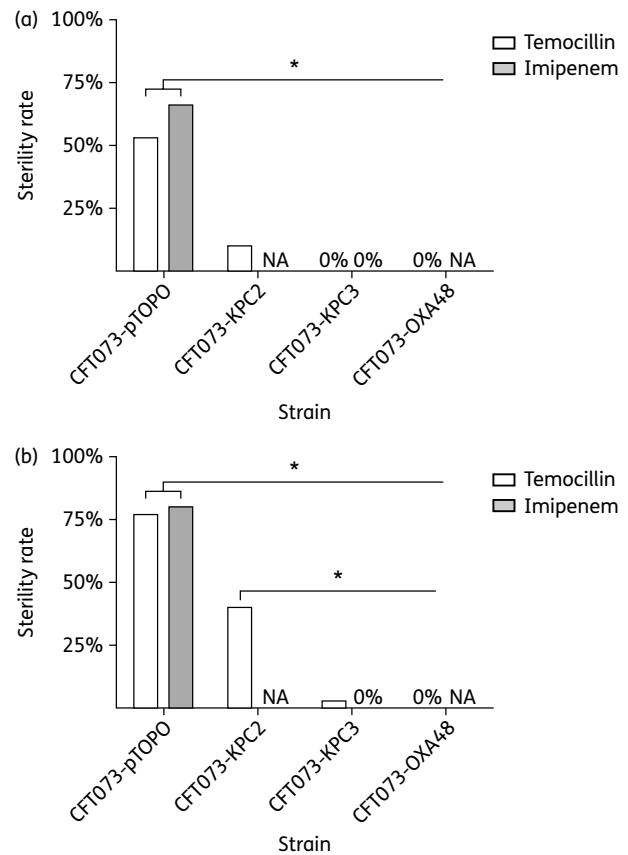


Figure 2. Sterility rates of peritoneal fluid (a) and blood (b) from mice treated with temocillin and imipenem according to bacterial strains. * $P < 0.001$. NA, data not available.

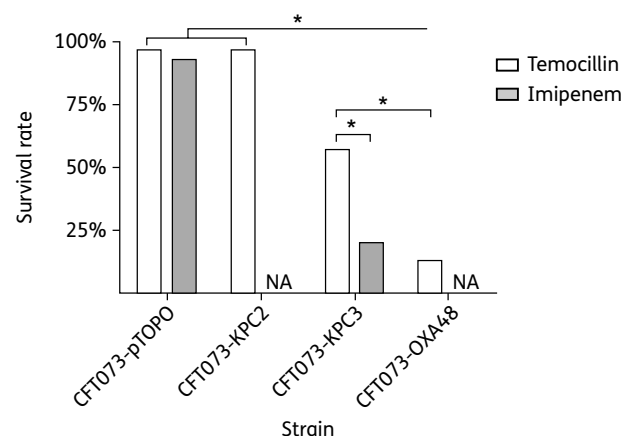


Figure 3. Survival rates of mice treated with temocillin or imipenem according to bacterial strains. * $P < 0.001$. NA, data not available.

relevant clinical conclusions.¹⁶ Indeed, temocillin activity was assessed with a therapeutic regimen in mice reproducing free-drug concentrations above an MIC corresponding to human optimal therapeutic regimens (Table 1).^{23,24} Thus, the *in vivo* efficacy

Temocillin against KPC-producing *E. coli* in mice

of temocillin in such experimental conditions probably reflects two temocillin properties: (i) good diffusion of temocillin in peritoneal fluid, as shown by a peritoneal fluid/serum concentration ratio of 100% 2 h post injection; this result is in agreement with human concentrations of temocillin in peritoneal fluid^{26,27}; and (ii) *in vivo* stability of temocillin against KPC enzymes despite the presence of a high bacterial inoculum.

There is no international consensus about clinical breakpoints for temocillin; in addition, some countries recognized different breakpoints according to the focus of infection (i.e. 32 mg/L for urinary infections and 8 mg/L for systemic infections).²⁸ In a previous study investigating *in vivo* temocillin activity against ESBL-producing *E. coli* in a mouse pyelonephritis model, we demonstrated a significant activity of temocillin against a strain whose temocillin MIC was 16 mg/L.¹⁶ Activity against an isogenic *E. coli* strain with a temocillin MIC of 32 mg/L was lower and less reproducible. In the present work, using a more severe model of infection with a 100-fold higher inoculum than that in the pyelonephritis model, we observed a significant activity of temocillin in terms of reduction of bacterial viable counts in peritoneal fluid, blood and spleen against strains producing KPC-2 or KPC-3 with a temocillin MIC \leq 32 mg/L, while no significant activity was observed, as expected, against the most resistant strain CFT073 expressing OXA-48. However, sterilization rates in peritoneal fluid and blood and survival rates under temocillin treatment of mice infected with the KPC-3-producing strain (temocillin MIC = 32 mg/L) were extremely low and significantly less than those in mice infected with the KPC-2-producing strain (temocillin MIC = 16 mg/L) ($P < 0.001$). Furthermore, while the temocillin regimen in mice reproduced an $fT_{>MIC}$ associated with a standard 2 g every 12 h regimen in humans for the pTOPO strain (temocillin MIC = 8 mg/L) and the KPC-2-producing strain, it corresponded to an $fT_{>MIC}$ that was achieved with the 2 g every 8 h regimen for the KPC-3-producing strain (Table 1). Therefore, these results suggest that temocillin was active *in vivo* against KPC-producing strains with a temocillin MIC \leq 16 mg/L even in an extra-urinary infection associated with a high inoculum but not against strains with a temocillin MIC of 32 mg/L. These results are in agreement with recent pharmacokinetic and pharmacodynamic data from human studies performed in critically ill patients, indicating that even with a temocillin regimen increased to 6 g/day given as a continuous infusion, a target $fT_{>MIC}$ higher than 40%, which is predictive of bacteriostatic effect and survival in Gram-negative bacterial infection,²⁹ was reached for the mean population for an MIC of 32 mg/L but was not reached reproducibly for the entire population.²⁴ Together, these data suggest that the limitation of temocillin *in vivo* activity in our study was not due *per se* to the production of KPC¹⁸ but rather to the increase in MICs that did not allow reliable $fT_{>MIC}$ despite an optimal temocillin dosing regimen.

Imipenem treatment was used as an additional validation control for our results. Indeed, temocillin and imipenem therapies were equally effective against the pTOPO strain (temocillin/imipenem MICs = 8/0.5 mg/L), as expected, while temocillin was more powerful in protecting mice infected with the imipenem-resistant KPC-3-producing strain from death (Figure 3). These results were in agreement with the $fT_{>MIC}$ generated by these antibiotic/strain combinations (Table 1).

One potential limitation of our study is the relatively short treatment duration (24 h). This factor may affect two endpoints:

(i) the low sterilization rates of tissue and fluid cultures that may increase with length of therapy; and (ii) the absence of resistant mutant selection under treatment *in vivo*. However, (i) the 24 h treatment duration allowed clear discrimination between effective regimens that protected mice against early death and less effective regimens; and (ii) the frequency of mutant selection *in vitro* with temocillin concentration equal to or above the MIC reported is low ($\sim 1 \times 10^{-10}$),¹⁹ in agreement with the fact that no resistant mutant was detected with a starting inoculum in the range of 10^7 cfu *in vivo*.

In conclusion, our results suggest that temocillin retains activity against KPC-producing strains with temocillin MICs \leq 16 mg/L, even in an extra-urinary infection with a high inoculum, such as intra-abdominal infection. The level of temocillin MIC rather than presence or absence of KPC production appears as the major determinant of temocillin activity *in vivo*. This result may not be translated to other foci of infections, as temocillin diffusion is particularly high in peritoneal fluid.

Acknowledgements

We are indebted to Sara Dion for her excellent technical assistance and Laurent Dortet (French National Reference Center for Antimicrobial Resistance, Lab 'carbapenemase-producing Enterobacteriaceae', Le Kremlin-Bicêtre, France) for providing clinical strains. Part of this work was presented at the 55th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Diego, USA, 2015 (abstract # B-073).

Funding

This work was supported by a grant from the Fondation Charles Nicolle of Rouen Hospital, France (K. A.), and by Eumedica, Belgium (B. F.).

Transparency declarations

None to declare.

Author contributions

B. F. designed the trial. B. F. and A. L. designed the animal model. K. A. and F. C. performed *in vitro* studies. K. A. and F. C. performed animal studies. F. G. and V. C. constructed the transconjugants. L. M. did the antibiotic assays. K. A. and B. F. wrote the article.

References

- Doi Y, Park YS, Rivera JI *et al.* Community-associated extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* infection in the United States. *Clin Infect Dis* 2013; **56**: 641–8.
- Van Boeckel TP, Gandra S, Ashok A *et al.* Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *Lancet Infect Dis* 2014; **14**: 742–50.
- Pitout JDD, Laupland KB. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* 2008; **8**: 159–66.
- Parienti JJ, Lucet JC, Lefort A *et al.* Empirical therapies among adults hospitalized for community-acquired upper urinary tract infections: a decision-tree analysis of mortality, costs, and resistance. *Am J Infect Control* 2015; **43**: 53–9.

Alexandre et al.

- 5 Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 2011; **17**: 1791–8.
- 6 Davies TA, Marie Queenan A, Morrow BJ et al. Longitudinal survey of carbapenem resistance and resistance mechanisms in Enterobacteriaceae and non-fermenters from the USA in 2007–09. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 2298–307.
- 7 Chen L, Hu H, Chavda KD et al. Complete sequence of a KPC-producing IncN multidrug-resistant plasmid from an epidemic *Escherichia coli* sequence type 131 strain in China. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 2422–5.
- 8 Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Analysis of the resistome of a multidrug-resistant NDM-1-producing *Escherichia coli* strain by high-throughput genome sequencing. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 4224–9.
- 9 Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis* 2013; **13**: 785–96.
- 10 Naas T, Cuzon G, Gaillot O et al. When carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC meets *Escherichia coli* ST131 in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 4933–4.
- 11 Ronald A. The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *Am J Med* 2002; **113** Suppl 1A: 14S–9S.
- 12 Wilcox CM, Dismukes WE. Spontaneous bacterial peritonitis. a review of pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Medicine (Baltimore)* 1987; **66**: 447–56.
- 13 Lorber B, Swenson RM. The bacteriology of intra-abdominal infections. *Surg Clin North Am* 1975; **55**: 1349–54.
- 14 Adlerberth I, Strachan DP, Matricardi PM et al. Gut microbiota and development of atopic eczema in 3 European birth cohorts. *J Allergy Clin Immunol* 2007; **120**: 343–50.
- 15 Livermore DM, Warner M, Mushtaq S et al. What remains against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomycin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. *Int J Antimicrob Agents* 2011; **37**: 415–9.
- 16 Soubirou JF, Rossi B, Couffignal C et al. Activity of temocillin in a murine model of urinary tract infection due to *Escherichia coli* producing or not producing the ESBL CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 1466–72.
- 17 Balakrishnan I, Awad-El-Kariem FM, Aali A et al. Temocillin use in England: clinical and microbiological efficacies in infections caused by extended-spectrum and/or derepressed AmpC β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 2628–31.
- 18 Woodford N, Pike R, Meunier D et al. *In vitro* activity of temocillin against multidrug-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. and *Enterobacter* spp., and evaluation of high-level temocillin resistance as a diagnostic marker for OXA-48 carbapenemase. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 564–7.
- 19 Adams-Haduch JM, Potoski BA, Sidjabat HE et al. Activity of temocillin against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 2700–1.
- 20 Lepeule R, Ruppe E, Le P et al. Cefoxitin as an alternative to carbapenems in a murine model of urinary tract infection due to *Escherichia coli* harboring CTX-M-15-type extended-spectrum β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 1376–81.
- 21 Bleibtreu A, Gros P-A, Laouénan C et al. Fitness, stress resistance, and extraintestinal virulence in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2013; **81**: 2733–42.
- 22 Docobo-Perez F, Lopez-Cerero L, Lopez-Rojas R et al. Inoculum effect on the efficacies of amoxicillin-clavulanate, piperacillin-tazobactam, and imipenem against extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing and non-ESBL-producing *Escherichia coli* in an experimental murine sepsis model. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 2109–13.
- 23 De Jongh R, Hens R, Basma V et al. Continuous versus intermittent infusion of temocillin, a directed spectrum penicillin for intensive care patients with nosocomial pneumonia: stability, compatibility, population pharmacokinetic studies and breakpoint selection. *J Antimicrob Chemother* 2007; **61**: 382–8.
- 24 Laterre P-F, Wittebole X, Van de Velde S et al. Temocillin (6 g daily) in critically ill patients: continuous infusion versus three times daily administration. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 891–8.
- 25 Signs SA, Tan JS, Salstrom SJ et al. Pharmacokinetics of imipenem in serum and skin window fluid in healthy adults after intramuscular or intravenous administration. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; **36**: 1400–3.
- 26 Wise R, Donovan IA, Drumm J et al. The intraperitoneal penetration of temocillin. *J Antimicrob Chemother* 1983; **12**: 93–6.
- 27 Wittke RR, Adam D, Klein HE. Therapeutic results and tissue concentrations of temocillin in surgical patients. *Drugs* 1985; **29** Suppl 5: 221–6.
- 28 Andrews JM, Jevons G, Walker R et al. Temocillin susceptibility by BSAC methodology. *J Antimicrob Chemother* 2007; **60**: 185–7.
- 29 Leggett JE, Ebert S, Fantin B et al. Comparative dose-effect relations at several dosing intervals for β -lactam, aminoglycoside and quinolone antibiotics against Gram-negative bacilli in murine thigh-infection and pneumonia models. *Scand J Infect Dis Suppl* 1990; **74**: 179–84.

5. Discussion articles 3 et 4

Les points forts méthodologiques des travaux originaux présentés dans les articles 3 et 4 tiennent dans la mise en œuvre de deux modèles expérimentaux animaux robustes et apportant ici une complémentarité à trois égards discutés *infra*. Ces deux modèles ont été largement utilisés dans la littérature, mais pour d'autres antibiotiques (55–57). Pour la témocilline, Pubmed référence seulement trois études antérieures aux nôtres : deux modèles de méningite à *K. pneumoniae* et *H. influenzae* ainsi qu'un modèle de pyélonéphrite (58–60). Le dernier travail est celui réalisé par l'équipe de B. Fantin (Soubirou *et al.*) correspondant exactement au même modèle de pyélonéphrite de la souris traité par témocilline et dont nous avons pu emprunter des données de pharmacocinétique.

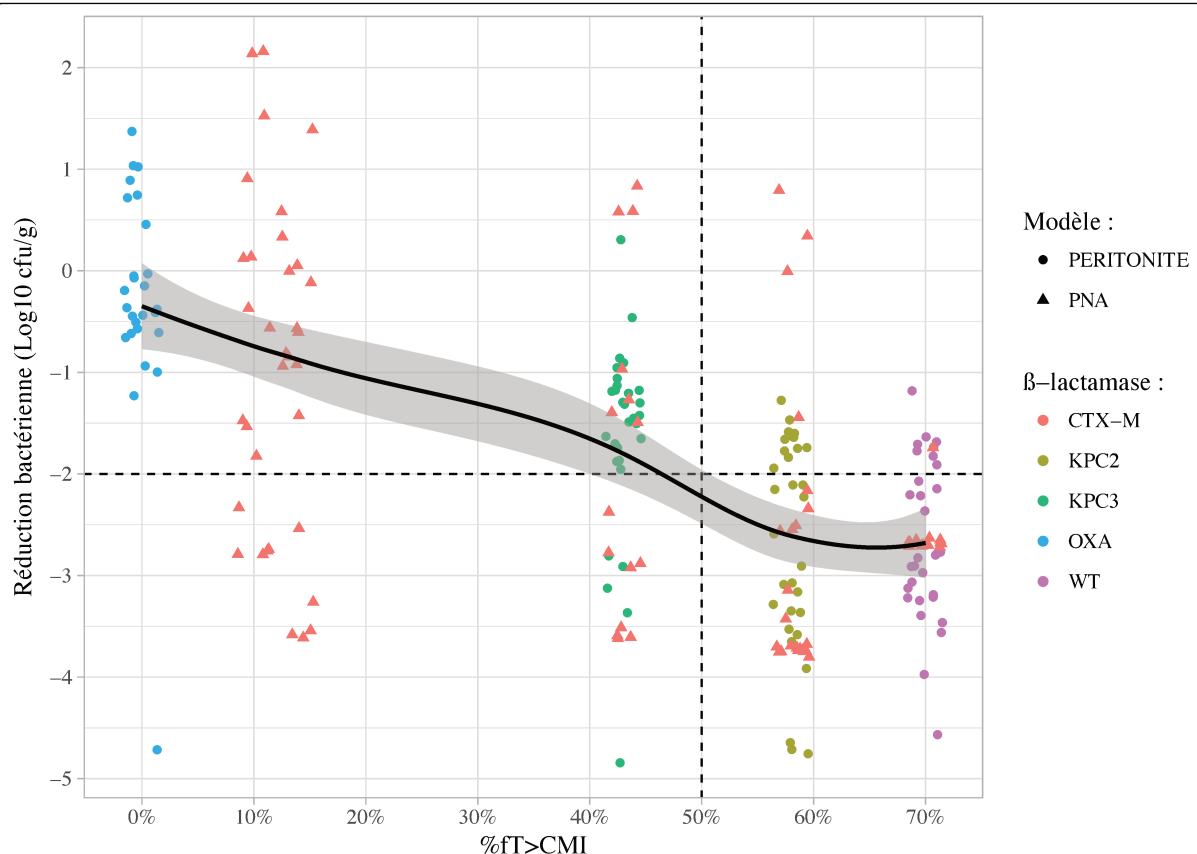
5.1 Différences et complémentarité des modèles expérimentaux

Premièrement, une différence de sévérité et de localisation de l'infection : l'article 3 présente un modèle d'infection urinaire ascendante non sévère chez la souris mais dont la physiopathologie est proche de celle de l'Homme, alors que l'article 4 recourt à un sepsis à point de départ péritonéal dont l'évolution sans traitement est fatale dans 100% des cas chez l'animal. Cette divergence ne fait pas obstacle à la transposition des résultats expérimentaux à l'Homme. En effet, l'indication préférentielle de la témocilline, comme spécifiée dans l'AMM et dans les recommandations françaises (45), reste les infections urinaires parenchymateuses qui dans l'espèce humaine connaissent encore une mortalité, laquelle est très majoritairement liée au sepsis (61,62).

Deuxièmement, une différence d'inoculum bactérien : « standard » (10^5 ufc/g) dans le modèle de pyélonéphrite et « élevé » (10^7 ufc/g) dans le modèle de sepsis à point de départ abdominal. Ce point a été tiré à profit pour évaluer *a posteriori* indirectement l'effet inoculum *in vivo*, lequel se définit comme une moindre activité de l'antibiotique vis-à-vis d'une forte population bactérienne lorsque celle-ci amplifie les mécanismes de résistance, un phénomène rapporté

pour de nombreuses paires β -lactamine - bactérie productrice de β -lactamases. L'impact thérapeutique de la témocilline relativement aux deux modèles et aux huit souches a en effet été évalué, comme représenté **figure 11**. Cette analyse (détaillée *infra* pour les paramètres PK/PD) révèle que l'élément déterminant pour la réduction bactérienne tenait bien davantage au niveau de résistance de la souche (répartition très homogène selon les couleurs) qu'au modèle animal étudié (pour une même couleur répartition proche des triangles et ronds figurant pyélonéphrite ou péritonite), ce dernier point étant en faveur d'une absence d'effet inoculum marqué.

Figure 11 : Réduction bactérienne observée au sein des reins (modèle pyélonéphrite) et de la rate (modèle péritonite) en fonction du %fT>CMI chez 203 souris traitées pendant 24 h par témocilline



La courbe pleine représente la régression locale (selon la méthode LOESS, logiciel R, package ggplot2) et son intervalle de confiance à 95% en gris.

WT : absence de production de β -lactamase

Comme détaillé dans la revue de la littérature PK/PD de la témocilline (article 1) les données jusqu'alors publiées suggéraient plutôt un effet inoculum *in vitro* vis-à-vis des cibles thérapeutiques actuelles de la témocilline, les publications « historiques » des caractéristiques de la molécule révélant une parfaite stabilité des CMI/CMB de souches non productrices de β -lactamases lorsque l'inoculum était porté de 10^3 à 10^7 ufc/mL, mais une augmentation pour les isolats producteurs de β -lactamases notamment chromosomiques de type AmpC (63,64). Deux publications récentes ont aussi rapporté un effet inoculum, mais modeste (élévation de la CMI d'un facteur 2) vis-à-vis d'entérobactériales productrices de β -lactamases de type CTX-M ou KPC (60,65). Par ailleurs dans nos deux modèles aucune émergence de mutant résistant à la témocilline n'a été observée (dans la limite des 24 h de temps d'exposition pour cette recherche, mais qui reste une durée comparable aux modèles de référence) (55–57) et en particulier chez les souris infectées par une forte densité d'entérobactériales productrices de carbapénèmase (E-PC) de type KPC ce qui, là encore indirectement, suggère l'absence d'impact de l'inoculum *in vivo* (contrairement à l'effet inoculum observé *in vitro*).

Troisièmement, l'utilisation d'isolats bactériens de nature génétique différente. En effet dans le modèle péritonéal le choix a été fait de souches isogéniques, et donc génétiquement modifiées associant à un *E. coli* sauvage de collection un élément génétique codant pour une carbapénèmase lui-même provenant de souches cliniques distinctes. Cette approche fréquente dans les modèles animaux actuels avait pour intérêt de limiter les variations liées aux souches et de focaliser l'analyse sur l'effet de la variation de la CMI (corrélée à la souche) vis-à-vis des comptes bactériens *in vivo*, toutes choses étant superposables par ailleurs. *A contrario* dans le modèle urinaire il s'agissait d'isolats cliniques, et donc par essence « naturels » c'est-à-dire au fond génétique très différent, la divergence étant toutefois limitée par la sélection exclusivement de souches de phylogroupe B2 (connu pour être le plus uro-virulent) et codant une BLSE toujours de type CTX-M-15 (dont la prévalence est la plus élevée en France). Cette approche

collant davantage à la réalité clinique implique d'intégrer la relation hôte – bactérie pouvant expliquer des différences thérapeutiques à niveau de CMI identique. Mais ceci a pu ici être raisonnablement exclu par les analyses de capacité de croissance *in vitro* (« fitness ») ainsi que par la comparaison des titres bactériens des groupes contrôles, très proches.

5.2 Définition de la cible thérapeutique de la témocilline

Malgré ces différences, la comparaison et la discussion conjointes des articles est possible en raison d'un point commun majeur aux deux modèles : la reproduction chez la souris de l'indice PK/PD observé chez l'homme. En effet, dans les deux travaux nous avons reproduit le $\%fT > CMI$ de la témocilline en fonction de plusieurs régimes thérapeutiques et CMI. Afin de combler les différences de paramètres PK entre la souris et l'Homme, les schémas posologiques dans le modèle murin ont dû comporter un nombre plus important d'injections par 24 h ce qui nous a limités (*cf. infra*) dans l'étude de certains couples $\%fT - CMI$ pour des raisons éthiques. Néanmoins, cette méthodologie nous a permis de confirmer que, comme pour les autres β -lactamines, l'indice PK/PD corrélé à l'activité de la témocilline est le $\%fT > CMI$, et de définir la cible thérapeutique.

Ainsi, la **figure 11** déjà introduite succinctement plus haut, mérite une analyse détaillée, puisqu'elle synthétise l'ensemble des résultats animaux pour aboutir *in fine* à une proposition de concentration critique humaine. Il y est représenté la diminution de l'inoculum bactérien pour chaque souris (au sein des reins pour le modèle de pyélonéphrite ou de la rate pour le modèle de péritonite) traitée par témocilline pendant 24 h en fonction du $\%fT > CMI$, et de la production ou non de β -lactamase. A l'aide de la courbe de régression locale, il peut être défini une valeur de cible thérapeutique associée à une réduction bactérienne de $2 \log_{10}$ ufc s'avérant être exactement $50\%fT > CMI$ lorsqu'il est pris en compte la borne la plus défavorable de l'intervalle de confiance de 95%, ainsi que procède l'EUCAST pour l'analyse des simulations de Monte-Carlo. Point majeur, cette valeur de 50% s'avérait homogène quels que soient la

nature de la β -lactamase (à niveau de CMI identique) ou le type d'infection. Evidemment l'objectif thérapeutique était plus aisé à atteindre pour les souches à CMI basses (les sauvages et une partie des E-BLSE et E-PC) mais inatteignable pour d'autres (les E-PC de type OXA). Cette cible de 50% est pleinement cohérente avec la littérature, expérimentale animale, aussi bien pour une étude antérieure avec la témocilline (60) que pour des travaux relatifs à d'autres paires entérobactérales- β -lactamines (7,66,67).

L'absence de conséquence de la sévérité de l'infection (péritonite *versus* pyélonéphrite) sur la valeur de la cible thérapeutique observée ici peut paraître discordante avec certaines recommandations actuelles. En effet, la société française d'anesthésie et de réanimation recommande des cibles thérapeutiques des β -lactamines bien plus élevées ($\%fT > 4 \times \text{CMI} = 100\%$) pour les patients en réanimation (68). Néanmoins, l'EUCAST continue d'utiliser la valeur du $\%f > \text{CMI}$ associée à la diminution de $2 \log_{10}$ ufc pour définir les cibles thérapeutiques et ceci sans distinguer selon la situation clinique (www.eucast.org).

5.3 Corrélation schémas posologiques et CMI

Nos résultats expérimentaux concernant la cible thérapeutique de la témocilline méritent maintenant une projection quant à la thérapeutique humaine en termes de valeur de CMI et de schéma posologique possible.

Pour le couple 'CMI = 8 mg/L – 2 g toutes les 12 h' il semble clairement établi que la témocilline possède une activité significative quels que soient les modèles (pyélonéphrite, sepsis à point de départ abdominal), les souches (cliniques, isogéniques, productrice ou non de β -lactamase) ou les comparateurs utilisés (céfotaxime, imipénème) (60,69,70).

Pour le couple 'CMI = 16 mg/L – 2 g toutes les 12h', bien qu'il ait été observé une réduction significative de l'inoculum bactérien dans nos deux travaux (de $2,9 \log_{10}$ cfu/g dans le modèle pyélonéphrite et de $1,4 \log_{10}$ cfu/g dans le modèle de sepsis), la dispersion des valeurs était plus importante que pour le couple précédent, tandis que d'autres paramètres d'évaluation tels que

le taux de stérilisation étaient significativement inférieurs aux comparateurs (témocilline 2 g toutes les 12 h pour une CMI de 8 mg/L ou imipénème). Ce résultat peut être lié au fait que les modèles utilisés visaient à reproduire un $\%fT > CMI$ (58%) proche de la cible thérapeutique (50%). Or, le régime thérapeutique murin de la témocilline a été choisi à l'aide d'une modélisation réalisée grâce aux données de pharmacocinétique issues d'une dizaine de souris (60). Ainsi, individuellement (pour une souris en particulier) il existe une variation de pharmacocinétique et donc de $\%fT > CMI$ pouvant être inférieure à la cible thérapeutique. Il est très probable que la simulation d'une augmentation de posologie : couple 'CMI = 16 mg/L – 2 toutes les 8 h' ($\%fT > CMI = 80\%$) (71,72) aurait permis d'obtenir des résultats comparables au couple 'CMI = 8 mg/L – 2 g toutes les 12 h' ($\%fT > CMI = 70\%$). Comme discuté dans l'article 3 nous n'avons pas pu vérifier cette hypothèse pour des raisons éthiques (il eût fallu plus de 24 injections par 24 h pour atteindre l'exposition requise).

Pour les couples 'CMI = 32 mg/L – 2 g toutes 12 h' et 'CMI = 32 mg/L – 2 g toutes les 8 h', la témocilline a démontré dans nos travaux une activité significativement moindre que les comparateurs quels que soient les paramètres étudiés (réduction bactérienne, taux de stérilisation, taux de survie). Il ne peut être exclu qu'une augmentation de l'exposition puisse engendrer un effet significatif pour les isolats vis-à-vis desquels la CMI est de 32 mg/L ; une telle augmentation d'exposition se ferait soit par modification du régime thérapeutique systémique (perfusion continue après une dose de charge), soit par concentration au site de l'infection (typiquement dans la vessie pour les infections urinaires).

5.4 Limites des données actuelles de PK/PD

L'ensemble de ces conclusions doit néanmoins être pondéré par la nature des données chez l'Homme ayant permis la simulation de l'indice PK/PD chez la souris. En effet, nous avons utilisé les valeurs issues des deux seules simulations de Monte-Carlo publiées à ce jour (71,72). Or, ces simulations ont été réalisées à l'aide de dosages sériques chez des patients hospitalisés

en réanimation, peu nombreux (respectivement 6 et 13 patients dans ces études) et chez lesquels deux biais intrinsèques sont bien connus pour tout antibiotique. D'abord une grande variabilité interindividuelle des paramètres PK/PD de sorte que l'intervalle de confiance des courbes de PTA est plus important que chez des patients moins sévères ce qui entraîne une sous-estimation de la concentration critique (comme indiqué *supra* dans la revue bibliographique). L'impact de ce biais a toutefois été limité ici en utilisant dans nos modèles la médiane des $\%fT > CMI$ des simulations de Monte-Carlo. Ensuite et surtout, les paramètres PK/PD des patients hospitalisés en réanimation diffèrent grandement de ceux des malades moins sévères. Certains éléments, comme l'insuffisance rénale ou la diminution de la fixation protéique, sont associés à une augmentation de l'exposition à l'anti-infectieux ; et d'autres, comme l'augmentation du volume de distribution, l'hyper-débit de filtration glomérulaire du sepsis diminuent l'exposition à l'antibiotique (68). Ainsi, il a été clairement démontré que la PTA et donc la concentration critique définies à l'aide de la simulation de Monte-Carlo pouvaient être nettement différentes pour un même couple 'isolat – régime thérapeutique' selon la population dont étaient issues les données de pharmacocinétique (16,73).

Concernant la témocilline, il n'existe pas à ce jour de simulation de Monte-Carlo réalisée à l'aide de données de patients infectés mais non hospitalisés en réanimation. Ceci est un manque majeur dans l'estimation de la concentration critique de la molécule, *a fortiori* alors que les simulations de PTA via la méthode de Monte-Carlo sont réalisées en fonction de la concentration libre de l'antibiotique. Or le taux de fixation protéique de la témocilline est élevé - de l'ordre de 80% - mais saturable et donc variable. En effet, il semble exister un seul site de fixation par molécule d'albumine, soit une capacité de maximale de fixation de l'ordre de 250 mg/L chez le volontaire sain (74,75). Dès lors, une augmentation de la dose unitaire ou une diminution de la capacité de fixation totale (soit par hypo-albuminémie, soit par compétition avec d'autres xénobiotiques) entraînent *in fine* une augmentation de la concentration libre et

donc une augmentation du $\%f_{T>CMI}$. Pour la témocilline, il n'existe que peu de données publiées sur la variation de fixation selon la population et notamment chez les patients les moins sévères. Des études anciennes ont retrouvé chez le volontaire sain une fixation protéique de l'ordre de 80% après 1 g et de l'ordre de 65-75% après 2 g (74,76), avec une saturation à partir d'une concentration sérique totale de 200 mg/L. Des travaux récents ont confirmé le caractère saturable de fixation protéique au-delà de 150 mg/L (75,77). Par contre, le taux de fixation protéique dans une étude récente chez le volontaire sain était bien inférieur aux données historiques, avec seulement 6 à 13% de fraction libre de témocilline selon la concentration totale (77). Aussi une simulation à partir de ces données s'avère catastrophique avec une PTA de 0% (pour une cible de $\%f_{T>CMI}=40\%$) pour le couple 'CMI = 8 mg/L – 2 g toutes les 12 h' (77). Cependant cette simulation est en contradiction avec les données cliniques telle la série de Balakrishnan *et al* validant l'efficacité de 2 g toutes les 12 h (78) et aussi la pratique courante (pas de signaux de défaut d'efficacité malgré un usage croissant dans différents pays). Ceci est probablement expliqué par la fixation protéique moindre chez les patients hospitalisés pour infection comparativement aux volontaires sains. Ce point a été très bien démontré par Ngougni Pokem *et al* pour des patients hospitalisés en réanimation avec, comparativement à des volontaires sains, un taux de fixation protéique plus faible (de 30% à 70% *versus* 63% à 93%) en rapport d'une part, avec une hypo-albuminémie induisant une diminution de la capacité totale de fixation (107 mg/L *versus* 234 mg/L) et d'autre part, avec une compétition par les autres xénobiotiques (d'où une augmentation de la constante de dissociation : 28 mg/L *versus* 9 mg/L) (77). De même, dans les simulations de Monte-Carlo récentes en réanimation (71,72), la fixation protéique était de 70-75% chez les patients recevant 4 g par jour, et de 60% chez ceux recevant 6 g par jour. Au total et en l'absence de données publiées, il reste difficile de prévoir les paramètres PK/PD et donc le $\%f_{T>CMI}$ chez les malades relevant d'un traitement de témocilline hors réanimation, ce qui est un paradoxe car là est pourtant l'essentiel de l'usage

de la molécule. Néanmoins, il est probable que le $\%fT > CMI$ chez ces patients « infectés non réanimatoires » soit plus favorable à la fois que chez le volontaire sain (du fait d'une fixation protéique moindre) et que chez le malade de réanimation (du fait d'un volume de distribution et d'une clairance moindres).

6. Conclusion

En conclusion de ce volet animal nos travaux ont confirmé que la cible thérapeutique pour le couple témocilline – entérobactérales était un $\%fT > CMI \geq 50\%$ et ceci quelles que soient la β -lactamase produite ou la sévérité de l'infection. De plus, nous avons démontré une activité de la témocilline à la posologie de 2 g toutes les 8 h contre des isolats vis-à-vis desquels la CMI est à 8 mg/L. Pour les isolats vis-à-vis desquels la CMI de la témocilline est à 16 mg/L, il semble nécessaire d'augmenter la posologie quotidienne à 6 g. De fait, et dans l'attente d'études de PK/PD chez le patient infecté non hospitalisé en réanimation, il pourrait être proposé selon la nouvelle définition « sensible, haute exposition » de l'EUCAST une catégorie I pour la témocilline correspondant à une CMI comprise $> 8 \text{ mg/L}$ et $\leq 16 \text{ mg/L}$ et pour laquelle il serait recommandé un schéma posologique de 6 g par jour, avec toutefois une réserve pour les patients de réanimation. Les souches $> 16 \text{ mg/L}$ seraient rendues résistantes. Cette catégorisation permettrait d'ailleurs de clarifier les indications présentes dans le résumé des caractéristiques du produit indiquant une : «... dose élevée notamment chez les patients gravement malades : 6 grammes par jour [...] en cas d'infections sévères et/ou impliquant des souches multi-résistantes ...» (Résumé des caractéristique du produit, Negaban[®], juin 2019).

Conclusion générale

1. Conclusion générale

Devant l'augmentation croissante de l'antibiorésistance et en particulier la pandémie mondiale d'E-BLSE, la témocilline, du fait d'une activité préservée sur ces bactéries, connaît un regain d'intérêt. Néanmoins, sa place dans l'arsenal thérapeutique actuel reste incertaine, tant en termes d'indication (infections urinaires et infections d'autres sites) que de posologie (4 g ou 6 g par jour) et de concentrations critiques. En effet, avant la réalisation du travail présenté dans ce mémoire de thèse, il existait trois concentrations critiques selon l'indication et le pays, sans harmonisation par l'instance européenne (EUCAST).

Ainsi, notre travail s'est attaché à l'évaluation expérimentale des concentrations critiques de témocilline vis-à-vis des entérobactérales en s'inscrivant dans les procédures requises par l'EUCAST, dans le but d'aboutir à une pratique englobant toutes les éventualités.

Nous avons pu démontrer que l'ECOFF, représentant la plus faible valeur possible de concentration critique selon l'EUCAST, était de 8 mg/L pour les entérobactérales communautaires dans leur globalité mais de 32 mg/L pour les E-BLSE, lesquelles représentent la cible préférentielle de la molécule en alternative aux carbapénèmes et en stratégie d'épargne. De plus, si l'évaluation de la sensibilité de la témocilline par Etest s'est avérée fiable, il existe dans la littérature un taux d'erreur parfois important de la méthode des disques notamment vis-à-vis des E-BLSE lorsque le diamètre d'inhibition se situe entre 18 mm et 21 mm inclus.

L'évaluation *in vivo* de l'efficacité de la témocilline dans deux modèles expérimentaux simulant des paramètres PK/PD nous a permis de démontrer que la cible thérapeutique était un $\%fT > CMI \geq 50\%$, valeur attendue pour une β -lactamine. Cette cible thérapeutique peut être atteinte, selon les données actuellement connues de pharmacocinétique humaine (chez un nombre limité de patients exclusivement hospitalisés en réanimation), quel que soit le schéma

thérapeutique (4 g ou 6 g par jour) pour les isolats vis-à-vis desquels la CMI de la témocilline est de 8 mg/L. Par contre, pour les isolats vis-à-vis desquels la CMI est à 16 mg/L il semble nécessaire de recourir à une posologie élevée de 2 g toutes les 8 h et ceci sans certitude absolue d'efficacité pour les patients de réanimation.

Ainsi, l'ensemble des travaux présentés dans ce manuscrit et l'analyse de la littérature actuelle pourraient amener à la proposition suivante concernant l'interprétation des CMI et des diamètres d'inhibition de la témocilline vis-à-vis des entérobactérales et d'après la présentation 2019 du CASFM/EUCAST. Pour les concentrations critiques, retenir deux valeurs, soit trois catégorisations possibles par introduction du « nouveau I » correspondant désormais à « sensible à haute exposition (S^{HE}) », avec pour l'évaluation selon la méthode des disques une ZIT interdisant de répondre de façon fiable pour les diamètres de 18 à 21 mm :

Tableau 2 : Proposition de concentrations critiques et de diamètres critiques pour la témocilline

	Concentrations critiques (mg/L)				Charge du disque (μ g)	Diamètres critiques (mm)			
	S \leq	I= S^{HE}	R >	ZIT		S \geq	I= S^{HE}	R <	ZIT
Témocilline	8	16	16		30	22	17-15	15	18-21

Ces propositions sont basées sur les posologies respectivement de 2 g toutes les 12 h ou toutes les 8 h sur la base d'un sujet adulte normo-rénal non obèse :

Tableau 3 : Schéma posologique de témocilline recommandée selon la catégorisation

	Posologie standard (valant pour S)	Forte posologie (valant pour I= S^{HE})
Témocilline	2 g x 2 IV	2 g x 3 IV

Ainsi, pour une infection documentée à entérobactériale à CMI ≤ 8 mg/L ou à diamètre d'inhibition ≥ 22 mg/L, la posologie quotidienne serait de 4 g. La posologie de 2 g toutes les 8 h serait recommandée dans trois situations : (i) usage probabiliste de la témocilline pour une infection suspectée à entérobactériale dans l'attente de l'évaluation exacte ; (ii) évaluation de la sensibilité selon la méthode des disques avec diamètre dans la ZIT, pour ne pas prendre de risque ; (iii) résultat en zone I=S^{HE} quelle que soit la méthode. Ces recommandations vaudraient hors réanimation, les patients en cette situation nécessitant des recommandations spécifiques, comme pour les autres β -lactamines, et qui ne peuvent être ébauchées là en l'état du dossier.

2. Limites des travaux expérimentaux

Il peut être souligné plusieurs limites aux travaux expérimentaux colligés en ce mémoire, aucune n'ayant toutefois été bloquante pour les publications respectives.

Concernant l'étude de la sensibilité *in vitro* de la témocilline rapportée dans l'article 2 du manuscrit, la principale limite est le caractère mono-centrique et mono-expérimentateur de l'évaluation de la sensibilité de la témocilline par quatre méthodes distinctes. En effet il est bien établi dans la littérature qu'il existe une variabilité des tests phénotypiques de détermination de la sensibilité aux antibiotiques en inter-laboratoire, mais aussi en intra-laboratoire selon les jours ou les expérimentateurs, avec des dispersions pouvant être conséquentes notamment pour l'évaluation des β -lactamines vis-à-vis des souches productrices de β -lactamases (35,79). En particulier, la mesure du diamètre d'inhibition pour la méthode des disques et l'évaluation de l'ellipse d'inhibition pour la méthode Etest sont sujettes à une interprétation visuelle (sauf pour les laboratoires disposant d'un appareil de lecture automatisé, de tels équipements restant rares en France). Il ne peut être donc exclu dans notre travail un biais d'estimation dans un sens ou un autre conduisant, plutôt à type de surévaluation du taux de sensibilité à la témocilline au regard des résultats très favorables obtenus. De plus, dans ce travail le taux d'isolats bactériens exprimant un mécanisme de résistance (notamment une production de BLSE) était faible ce qui

là aussi a pu contribuer à surévaluer le taux de sensibilité ainsi qu'explicitement souligné dans la discussion de l'article 2. L'ensemble de ces limites a été en grande partie comblé par un travail postérieur au notre et discuté *supra* (Henry *et al.*) ayant évalué la fiabilité de la méthode des disques par 11 laboratoires différents sur une collection de 888 isolats comprenant 42% de E-BLSE et concluant à taux d'erreur de catégorisation plus important que dans notre travail (8.6% à 16% selon les disques).

Concernant les études *in vivo* présentées dans les articles 3 et 4, leur limite majeure (déjà abordée au paragraphe 5.4 de ce mémoire) est l'utilisation de données pharmacocinétiques présentant une variabilité conséquente aussi bien chez l'animal que pour les données humaines servant de référence et issues d'une population particulière de patient. Ainsi, si l'efficacité *in vivo* et clinique de la témocilline vis-à-vis des isolats pour lesquels la CMI est de 8 mg/L semble établie, les résultats concernant les isolats pour lesquels la CMI est de 16 mg/L doivent être analysés avec réserve. Les régimes thérapeutiques utilisés dans les modèles murins visaient à reproduire une exposition ($\%fT > CMI$) calculée à l'aide d'une modélisation. Cependant la dispersion de l'efficacité de la témocilline vis-à-vis des isolats à CMI de 16 mg/L dans le modèle murin pourrait être le reflet la variabilité de la pharmacocinétique de la molécule à l'échelon individuel (*cf.* notamment la réduction bactérienne à 24 h, présentée à la figure 1 de l'article 3). Ainsi une réduction bactérienne moindre chez une souris n'a pu être que le reflet d'une exposition moindre à la témocilline chez cette souris en particulier. Malheureusement, nous n'avons pas pu implémenter une étude pharmacocinétique individualisée pour chaque souris dans chacun des deux travaux, les contraintes étant trop fortes. Seule une telle approche eut permis de préciser pour chaque souris infectée le rapport exposition/efficacité. De plus, la proposition d'augmentation de posologie (2 g toutes les 8 h) pour les isolats vis-à-vis desquels la CMI est de 16 mg/L n'a pas pu être évaluée *in vivo* pour des raisons éthiques ainsi que discuté dans l'article 4. Enfin à cette variabilité inhérente au modèle murin s'ajoute une incertitude

quant aux cibles thérapeutiques reproduites. Ainsi, pour chaque « couple » CMI – schéma posologique, il a été reproduit chez la souris le $\%fT < \text{CMI}$ observé chez l’homme. Or les seules données dont nous disposons sont issues de deux études réalisées chez des patients hospitalisés en réanimation. L’exposition à la témocilline (comme aux autres β -lactamines) est attendue plus faible, pour un même schéma posologique, chez les patients hospitalisés en réanimation que chez les patients moins sévères. Néanmoins, la pharmacocinétique de la témocilline est complexe (notamment en lien avec une fixation protéique saturable), et l’hypothèse selon laquelle l’exposition à la témocilline (selon un schéma de 2 g toutes les 8 h voire les 12 h) chez les patients non sévères pourrait permettre d’obtenir une efficacité clinique vis-à-vis des isolats dont la CMI est de 16 mg/L reste incertaine.

3. Perspectives

L’ensemble des résultats présentés dans ce manuscrit confirme que la cible thérapeutique pour la témocilline vis-à-vis des entérobactérales est un $\%fT > \text{CMI} \geq 50\%$.

Néanmoins, la probabilité d’atteindre cette cible thérapeutique selon le régime thérapeutique (2 g toutes les 12 h ou 8 h) et la CMI (16 mg/L ou 32 mg/L) reste incertaine notamment chez les patients infectés non sévères. En lien avec la grande différence du taux de fixation protéique entre les volontaires sains (fixation protéique importante) et les patients hospitalisés en réanimation (fixation protéique moindre), il est indispensable de disposer de données concernant la pharmacocinétique de la témocilline chez le patient infecté non sévère tant pour la concentration totale que pour la concentration libre.

Ainsi, une étude de pharmacocinétique chez les patients infectés non sévères étudiant le taux de fixation protéique de la témocilline dans cette population et la réalisation de simulation de Monte-Carlo permettrait d’estimer une probabilité d’atteindre la cible thérapeutique selon les régimes thérapeutiques et la CMI. Une telle étude serait décisive dans la définition de la

concentration critique vis-à-vis des entérobactérales et pourrait confirmer les propositions issues de ce travail.

En parallèle, il est nécessaire de collecter et d'analyser les données quant à l'utilisation en pratique courante de la témocilline afin d'étudier la relation entre niveau de CMI, régime thérapeutique (au prorata de la fonction rénale) et succès clinique. Une telle analyse mériterait de distinguer les infections urinaires de celles d'autres sites, car les données cliniques aujourd'hui disponibles sont surtout étayées pour les premières (les traitements ciblant très prioritairement les entérobactéries BLSE, dont le pouvoir pathogène dominant concerne la sphère urinaire). Or, l'exposition à la témocilline pour certains sites non urinaires pourrait être réduit et conduire à un sur-risque d'échecs thérapeutiques y compris par sélection de mutant résistant ainsi que cela a été démontré pour la céfoxitine vis-à-vis de *Klebsiella pneumoniae* (80).

Cette proposition d'une étude de pratique rétrospective et non d'un essai randomisé se veut pragmatique, partant du constat des difficultés de recrutement et de la clôture prématurée du protocole français TEMOBLSE et qui de surcroît n'incluait que des infections urinaires. Une étude prospective multicentrique randomisée est néanmoins en cours en France (TEMO-CARB, NT03543436, www.clinicaltrials.gov/) et pourrait confirmer les données rétrospectives et expérimentales quant à l'efficacité de la témocilline pour les traitements des infections urinaires dues à des entérobactérales vis-à-vis desquelles la CMI de la témocilline est à 8 mg/L (puisque n'incluant que des souches sensibles selon la concentration critique en vigueur en France).

Références bibliographiques du texte

1. Société Française de Microbiologie. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM), recommandations 2013 [Internet]. 2013. Disponible sur: www.sfm-microbiologie.org/
2. Kahlmeter G. EUCAST proposes to change the definition and usefulness of the susceptibility category 'Intermediate'. *Clin Microbiol Infect.* déc 2017;23(12):894-5.
3. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0 [Internet]. 2019. Disponible sur: www.eucast.org
4. Kahlmeter G. The 2014 Garrod Lecture: EUCAST – are we heading towards international agreement? *J Antimicrob Chemother.* 1 sept 2015;70(9):2427-39.
5. Labreche MJ, Graber CJ, Nguyen HM. Recent Updates on the Role of Pharmacokinetics-pharmacodynamics in Antimicrobial Susceptibility Testing as Applied to Clinical Practice. *Clin Infect Dis.* 1 nov 2015;61(9):1446-52.
6. Mouton JW, Brown DFJ, Apfalter P, Cantón R, Giske CG, Ivanova M, et al. The role of pharmacokinetics/pharmacodynamics in setting clinical MIC breakpoints: the EUCAST approach. *Clin Microbiol Infect.* 1 mars 2012;18(3):E37-45.
7. Craig WA. Interrelationship between pharmacokinetics and pharmacodynamics in determining dosage regimens for broad-spectrum cephalosporins. *Diagn Microbiol Infect Dis.* juin 1995;22(1-2):89-96.
8. 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.* 1 janv 2007;44(1):79-86.
9. Mouton JW, Ambrose PG, Canton R, Drusano GL, Harbarth S, MacGowan A, et al. Conserving antibiotics for the future: New ways to use old and new drugs from a pharmacokinetic and pharmacodynamic perspective. *Drug Resist Updat.* 1 avr 2011;14(2):107-17.
10. Bhavnani SM, Hammel JP, Wart SAV, Rubino CM, Reynolds DK, Forrest A, et al. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Analysis for Efficacy of Ceftaroline Fosamil in Patients with Acute Bacterial Skin and Skin Structure Infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 janv 2015;59(1):372-80.

11. Wu J, Racine F, Wismer MK, Young K, Carr DM, Xiao JC, et al. Exploring the Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Relationship of Relebactam (MK-7655) in Combination with Imipenem in a Hollow-Fiber Infection Model. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 mai 2018;62(5):e02323-17.
12. Safdar N, Andes D, Craig WA. In Vivo Pharmacodynamic Activity of Daptomycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 janv 2004;48(1):63-8.
13. Ambrose PG, Bhavnani SM, Owens RC. Clinical pharmacodynamics of quinolones. *Infect Dis Clin North Am.* sept 2003;17(3):529-43.
14. Drusano GL, D'Argenio DZ, Preston SL, Barone C, Symonds W, LaFon S, et al. Use of drug effect interaction modeling with Monte Carlo simulation to examine the impact of dosing interval on the projected antiviral activity of the combination of abacavir and amprenavir. *Antimicrob Agents Chemother.* juin 2000;44(6):1655-9.
15. Bonate PL. A Brief Introduction to Monte Carlo Simulation: *Clin Pharmacokinet.* 2001;40(1):15-22.
16. Mouton JW, Punt N, Vinks AA. A retrospective analysis using Monte Carlo simulation to evaluate recommended ceftazidime dosing regimens in healthy volunteers, patients with cystic fibrosis, and patients in the intensive care unit. *Clin Ther.* juin 2005;27(6):762-72.
17. Kahlmeter G, Brown DFJ, Goldstein FW, MacGowan AP, Mouton JW, Österlund A, et al. European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 1 août 2003;52(2):145-8.
18. Arendrup MC, Kahlmeter G, Rodriguez-Tudela JL, Donnelly JP. Breakpoints for Susceptibility Testing Should Not Divide Wild-Type Distributions of Important Target Species. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 avr 2009;53(4):1628-9.
19. EUCAST subcommittee for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 2.0 [Internet]. 2017. Disponible sur: <http://www.eucast.org>
20. European Medicines Agency, Committee for Human Medicinal Products. Guideline on the evaluation of medicinal products indicated for treatment of bacterial infections, Rev. 3 [Internet]. 2019. Disponible sur: www.ema.europa.eu
21. Livermore DM, Tulkens PM. Temocillin revived. *J Antimicrob Chemother.* 19 nov 2008;63(2):243-5.

-
22. Putensen C, Ellger B, Sakka SG, Weyland A, Schmidt K, Zoller M, et al. Current clinical use of intravenous fosfomycin in ICU patients in two European countries. *Infection*. 12 juin 2019;
 23. Landman D, Georgescu C, Martin DA, Quale J. Polymyxins Revisited. *Clin Microbiol Rev*. 1 juill 2008;21(3):449-65.
 24. Zayyad H, Eliakim-Raz N, Leibovici L, Paul M. Revival of old antibiotics: needs, the state of evidence and expectations. *Int J Antimicrob Agents*. mai 2017;49(5):536-41.
 25. Muller AE, Theuretzbacher U, Mouton JW. Use of old antibiotics now and in the future from a pharmacokinetic/pharmacodynamic perspective. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. oct 2015;21(10):881-5.
 26. Corley TAB. *Beechams, 1848 - 2000: from pills to pharmaceuticals*. Lancaster: Crucible Books; 2011. 322 p.
 27. Ghuysen JM. Molecular structures of penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Trends Microbiol*. oct 1994;2(10):372-80.
 28. Giesbrecht P, Kersten T, Maidhof H, Wecke J. Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*. déc 1998;62(4):1371-414.
 29. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. mars 2010;54(3):969-76.
 30. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 16 mai 1980;289(1036):321-31.
 31. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. juin 1995;39(6):1211-33.
 33. Patel TA, Dilley R, Williams A, Vanstone GL, Balakrishnan I. Comparison of the Phoenix automated system, the Etest method and broth microdilution in determining temocillin susceptibility of Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*. 7 janv 2013;68(7):1685-6.
 34. Rodriguez-Villalobos H, Cardentey-Reyes A, Thiroux C, Nonhoff C, Struelens MJ. Comparison of four commercial methods for determining temocillin susceptibility of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*. 4 janv 2009;63(4):832-4.

35. Åhman J, Matuschek E, Kahlmeter G. The quality of antimicrobial discs from nine manufacturers—EUCAST evaluations in 2014 and 2017. *Clin Microbiol Infect.* mars 2019;25(3):346-52.
36. Henry A, Michaud A, Lourtet J, Guillard T, Corvec S, Plouzeau C, et al. Are disc diffusion method and ETEST suitable for in vitro temocillin susceptibility testing ? Poster P2273 présenté à: 29th ECCMID; 2019; Amsterdam.
37. Duployez C, Loïez C, Cattoen C, Wallet F, Vachée A. In vitro activity of temocillin against extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from urinary tract infections in France. *Médecine Mal Infect.* févr 2019;49(1):47-53.
38. Yung T, Rolais D, Cardot E, Limousin L, Mathonnet D, Henry A, et al. Evaluation de la corrélation entre méthode des disques et CMI pour 3 couples/antibiotiques. Poster P-031 présenté à: RICAI; 2018; Paris.
39. Hombach M, Jetter M, Keller PM, Blöchliger N, Kolesnik-Goldmann N, Böttger EC. Rapid detection of ESBL, carbapenemases, MRSA and other important resistance phenotypes within 6–8 h by automated disc diffusion antibiotic susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother.* 1 nov 2017;72(11):3063-9.
40. Buyck JM, Guénard S, Plésiat P, Tulkens PM, Bambeke FV. Role of MexAB-OprM in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to temocillin and impact on the susceptibility of strains isolated from patients suffering from cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother.* 3 janv 2012;67(3):771-5.
41. Chalhoub H, Pletzer D, Weingart H, Braun Y, Tunney MM, Elborn JS, et al. Mechanisms of intrinsic resistance and acquired susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients to temocillin, a revived antibiotic. *Sci Rep.* 16 janv 2017;7:40208.
42. Robert J, Pantel A, Merens A, Meiller E, Lavigne J-P, Nicolas-Chanoine M-H, et al. Development of an algorithm for phenotypic screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in the routine laboratory. *BMC Infect Dis.* 17 janv 2017;17(1):78.
43. Matagne A, Ghuysen M-F, Frère J-M. Interactions between active-site-serine beta-lactamases and mechanism-based inactivators: a kinetic study and an overview. *Biochem J.* 1993;295:705–711.

-
44. Caron F, Galperine T, Flateau C, Azria R, Bonacorsi S, Bruyère F, et al. Practice guidelines for the management of adult community-acquired urinary tract infections. *Médecine Mal Infect.* 2018;48(5):327-58.
45. Haute Autorité de Santé, services des bonnes pratiques professionnelles. Antibiothérapie des infections à entérobactéries et à *Pseudomonas aeruginosa* chez l'adulte : place des carbapénèmes et de leurs alternatives [Internet]. 2019. Disponible sur: www.has-sante.fr
46. Ip M, Lai CK, Fung KSC, Wong K-T, Zhu C, Velde SV de, et al. Activity of temocillin and 15 other agents, including fosfomycin and colistin, against Enterobacteriaceae in Hong Kong. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* déc 2017;36(12):2491-4.
47. Seo M-R, Kim S-J, Kim Y, Kim J, Choi TY, Kang JO, et al. Susceptibility of *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract infection to fosfomycin, nitrofurantoin, and temocillin in Korea. *J Korean Med Sci.* août 2014;29(8):1178-81.
48. Henderson A, Tan E, Cottrell K, Bauer M, Tambyah PA, Yilmaz M, et al. Activity of temocillin against a collection of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from bloodstream isolates non-susceptible to ceftriaxone. Poster P1904 présenté à: 29th ECCMID; 2019; Amsterdam.
49. Fournier D, Chirouze C, Leroy J, Cholley P, Talon D, Plésiat P, et al. Alternatives to carbapenems in ESBL-producing *Escherichia coli* infections. *Médecine Mal Infect.* févr 2013;43(2):62-6.
50. Tärnberg M, Ostholm-Balkhed A, Monstein H-J, Hällgren A, Hanberger H, Nilsson LE. In vitro activity of beta-lactam antibiotics against CTX-M-producing *Escherichia coli*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* août 2011;30(8):981-7.
51. Rodriguez-Villalobos H, Malaviolle V, Frankard J, Mendonça R de, Nonhoff C, Struelens MJ. In vitro activity of temocillin against extended spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 4 janv 2006;57(4):771-4.
52. Livermore DM, Hope R, Fagan EJ, Warner M, Woodford N, Potz N. Activity of temocillin against prevalent ESBL- and AmpC-producing Enterobacteriaceae from south-east England. *J Antimicrob Chemother.* 5 janv 2006;57(5):1012-4.
53. Glupczynski Y, Huang T-D, Berhin C, Claeys G, Delmée M, Ide L, et al. In vitro activity of temocillin against prevalent extended-spectrum beta-lactamases producing Enterobacteriaceae from Belgian intensive care units. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1 août 2007;26(11):777-83.

-
54. Zykov IN, Sundsfjord A, Småbrekke L, Samuelsen Ø. The antimicrobial activity of mecillinam, nitrofurantoin, temocillin and fosfomicin and comparative analysis of resistance patterns in a nationwide collection of ESBL-producing *Escherichia coli* in Norway 2010-2011. *Infect Dis Lond Engl*. févr 2016;48(2):99-107.
55. Hvidberg H, Struve C, Krogfelt KA, Christensen N, Rasmussen SN, Frimodt-Møller N. Development of a Long-Term Ascending Urinary Tract Infection Mouse Model for Antibiotic Treatment Studies. *Antimicrob Agents Chemother*. 1 janv 2000;44(1):156-63.
56. Lepeule R, Ruppe E, Le P, Massias L, Chau F, Nucci A, et al. Cefoxitin as an Alternative to Carbapenems in a Murine Model of Urinary Tract Infection Due to *Escherichia coli* Harboring CTX-M-15-Type Extended-Spectrum β -Lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*. 1 mars 2012;56(3):1376-81.
57. Docobo-Perez F, Lopez-Cerero L, Lopez-Rojas R, Egea P, Dominguez-Herrera J, Rodriguez-Bano J, et al. Inoculum Effect on the Efficacies of Amoxicillin-Clavulanate, Piperacillin-Tazobactam, and Imipenem against Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL)-Producing and Non-ESBL-Producing *Escherichia coli* in an Experimental Murine Sepsis Model. *Antimicrob Agents Chemother*. 1 mai 2013;57(5):2109-13.
58. Woodnutt G, Catherall EJ, Kernutt I, Mizen L. Temocillin efficacy in experimental *Klebsiella pneumoniae* meningitis after infusion into rabbit plasma to simulate antibiotic concentrations in human serum. *Antimicrob Agents Chemother*. nov 1988;32(11):1705-9.
59. Yogev R, Glogowski W, Connor E. Comparative in vitro and in vivo activity of temocillin (BRL 17421) and ampicillin against *Haemophilus influenzae* type b. *Antimicrob Agents Chemother*. janv 1983;23(1):182-4.
60. Soubirou JF, Rossi B, Couffignal C, Ruppé E, Chau F, Massias L, et al. Activity of temocillin in a murine model of urinary tract infection due to *Escherichia coli* producing or not producing the ESBL CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother*. mai 2015;70(5):1466-72.
61. Ortega M, Marco F, Soriano A, Almela M, Martínez JA, Pitart C, et al. Epidemiology and prognostic determinants of bacteremic acute pyelonephritis in women. *J Infect*. févr 2013;66(2):193-6.
62. Efstathiou SP, Pefanis AV, Tsioulos DI, Zacharos ID, Tsiakou AG, Mitromaras AG, et al. Acute Pyelonephritis in Adults: Prediction of Mortality and Failure of Treatment. *Arch Intern Med*. 26 mai 2003;163(10):1206-12.
63. Jules K, Neu HC. Antibacterial activity and beta-lactamase stability of temocillin.

Antimicrob Agents Chemother. 1 sept 1982;22(3):453-60.

64. Slocombe B, Basker MJ, Bentley PH, Clayton JP, Cole M, Comber KR, et al. BRL 17421, a novel beta-lactam antibiotic, highly resistant to beta-lactamases, giving high and prolonged serum levels in humans. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 juill 1981;20(1):38-46.

65. Adams-Haduch JM, Potoski BA, Sidjabat HE, Paterson DL, Doi Y. Activity of Temocillin against KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 juin 2009;53(6):2700-1.

66. Craig WA, Andes DR. In Vivo Pharmacodynamics of Ceftobiprole against Multiple Bacterial Pathogens in Murine Thigh and Lung Infection Models. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 oct 2008;52(10):3492-6.

67. Frimodt-Møller N. Correlation between pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters and efficacy for antibiotics in the treatment of urinary tract infection. *Int J Antimicrob Agents.* juin 2002;19(6):546-53.

68. Guilhaumou R, Benaboud S, Bennis Y, Dahyot-Fizelier C, Dailly E, Gandia P, et al. Optimization of the treatment with beta-lactam antibiotics in critically ill patients—guidelines from the French Society of Pharmacology and Therapeutics (Société Française de Pharmacologie et Thérapeutique—SFPT) and the French Society of Anaesthesia and Intensive Care Medicine (Société Française d’Anesthésie et Réanimation—SFAR). *Crit Care.* déc 2019;23(1):104.

69. Alexandre K, Chau F, Guérin F, Massias L, Lefort A, Cattoir V, et al. Activity of temocillin in a lethal murine model of infection of intra-abdominal origin due to KPC-producing *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* juill 2016;71(7):1899-904.

70. Alexandre K, Soares A, Chau F, Fantin B, Caron F, Etienne M. Temocillin breakpoints in pyelonephritis: evaluation in a murine model due to ESBL-producing *Escherichia coli* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother.* 25 janv 2019;

71. Laterre P-F, Wittebole X, Van de Velde S, Muller AE, Mouton JW, Carryn S, et al. Temocillin (6 g daily) in critically ill patients: continuous infusion versus three times daily administration. *J Antimicrob Chemother.* mars 2015;70(3):891-8.

72. De Jongh R, Hens R, Basma V, Mouton JW, Tulkens PM, Carryn S. Continuous versus intermittent infusion of temocillin, a directed spectrum penicillin for intensive care patients with nosocomial pneumonia: stability, compatibility, population pharmacokinetic studies and breakpoint selection. *J Antimicrob Chemother.* févr 2008;61(2):382-8.

73. Vinks AA, van Rossem RN, Mathot RAA, Heijerman HGM, Mouton JW.

Pharmacokinetics of Aztreonam in Healthy Subjects and Patients with Cystic Fibrosis and Evaluation of Dose-Exposure Relationships Using Monte Carlo Simulation. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 sept 2007;51(9):3049-55.

74. Overbosch D, van Gulpen C, Mattie H. Renal clearance of temocillin in volunteers. *Drugs.* 1985;29 Suppl 5:128-34.

75. Ngougni Pokem P, Matzneller P, Wulkersdorfer B, Capron A, Elens L, Wallemacq P, et al. Population pharmacokinetic modelling of total and unbound temocillin in the plasma of healthy volunteers after intravenous administration. Poster P2220 présenté à: 28th ECCMID; 2018; Madrid.

76. Hampel B, Feike M, Koeppe P, Lode H. Pharmacokinetics of temocillin in volunteers. *Drugs.* 1985;29 Suppl 5:99-102.

77. Ngougni Pokem P, Matzneller P, Wulkersdorfer B, Capron A, Tulkens PM, Wallemacq P, et al. Protein binding of temocillin is lower in plasma from patients in intensive care units compared to healthy subjects: in vitro and in vivo studies. Poster P2219 présenté à: 28th ECCMID; 2018; Madrid.

78. Balakrishnan I, Awad-El-Kariem FM, Aali A, Kumari P, Mulla R, Tan B, et al. Temocillin use in England: clinical and microbiological efficacies in infections caused by extended-spectrum and/or derepressed AmpC β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 1 nov 2011;66(11):2628-31.

79. Livermore DM, Andrews JM, Hawkey PM, Ho P-L, Keness Y, Doi Y, et al. Are susceptibility tests enough, or should laboratories still seek ESBLs and carbapenemases directly? *J Antimicrob Chemother.* 1 juill 2012;67(7):1569-77.

80. Pilmis B, Parize P, Zahar JR, Lortholary O. Alternatives to carbapenems for infections caused by ESBL-producing Enterobacteriaceae. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* août 2014;33(8):1263-5.

Résumé / Abstract

Evaluation expérimentale des concentrations critiques de la témocilline vis-à-vis de souches d'entérobactérales

Dans le monde entier l'antibiorésistance des entérobactérales communautaires, notamment par production de β -lactamase à spectre étendu (E-BLSE), conduit à une consommation préoccupante d'antibiotique de dernier recours tels les carbapénèmes. Dérivée de la ticarcilline la témocilline pourrait représentée une alternative y compris sur certaines entérobactérales productrices de carbapénémase (EPC). Néanmoins, il existe une incertitude concernant les concentrations critiques distinguant les entérobactérales sensibles des résistantes avec trois valeurs selon les pays utilisateurs de témocilline (8 mg/L, 16 mg/L ou 32 mg/L) tandis qu'une harmonisation internationale reste en attente. En ce contexte trois travaux originaux ont été poursuivis ainsi qu'une revue de la littérature.

Il fut d'abord étudié *in vitro* la sensibilité à la témocilline de 762 entérobactérales responsables d'infection urinaire communautaire. Dans un contexte de prévalence faible des E-BLSE (5%) et nulle des EPC, les trois méthodes de routine (disque, automate, Etest) se sont révélées très fiables, la borne épidémiologique pour la témocilline s'établissant à 8 mg/L. Ensuite, l'efficacité de la témocilline vis-à-vis d'entérobactérales productrices ou non de β -lactamases (E-BLSE ou EPC) a été évaluée dans deux modèles murins complémentaires. Il a été montré l'efficacité de la témocilline à un schéma reproduisant la posologie humaine de 2 g toutes 12 h vis-à-vis d'entérobactérales pour lesquels la CMI de la témocilline était de 8 mg/L. L'efficacité de ce schéma posologique, bien que significative, était moindre vis-à-vis des isolats pour lesquels la CMI de la témocilline était de 16 mg/L. Par contre, il ne fut pas observé d'efficacité significative de la témocilline vis-à-vis des isolats avec une CMI à 32 mg/L quel que soit le schéma posologique (2 g toutes les 8 ou 12 h).

L'ensemble de ces résultats, ainsi qu'une revue exhaustive des données de la littérature, conduisent à proposer une concentration critique de 8 mg/L pour le schéma posologique de 2 g toutes les 12 h, et de 16 mg/L pour celui de 2 g toutes les 8h. Cette dernière proposition correspondrait au « sensible à forte exposition », nouvelle définition de la catégorisation « intermédiaire » selon les dernières recommandations de l'EUCAST.

Mots clés : Témocilline, pharmacocinétique, pharmacodynamique, infection urinaire, concentrations critiques, BLSE, carbapénémase

Experimental evaluation of temocillin clinical breakpoints against enterobacteriales

Worldwide spread of antimicrobial resistance among community-acquired enterobacteriales, especially ESBL, leads to a worrying consumption of last resort antibiotics like carbapenem. Derivative of ticarcillin, temocillin may be an attractive carbapenem-sparing agent including against some carbapenemase-producing enterobacteriales (CPE). Nevertheless, there is still uncertainty regarding clinical breakpoints with 3 different values depending on countries (8 mg/L, 16 mg/L, 32 mg/L), moreover international consensus about this issue is awaited. In this context, three original studies were conducted along with a literature review.

First, *in vitro* susceptibility to temocillin of 762 enterobacteriales from community-acquired urinary tract infection was studied. In this area of low prevalence of ESBL and no CPE, the three routine susceptibility methods (disk diffusion, automate, Etest) were very accurate, epidemiological cut-off was set to 8 mg/L. Then, temocillin efficacy against enterobacteriales producing or not producing β -lactamase (ESBL or CPE) was assessed by two complementary murine models. We demonstrated that temocillin exposure reproducing 2 g q12h regimen showed efficacy against strains with temocillin MIC of 8 mg/L. This regimen exhibited a lower, even though significant, efficacy against strain with temocillin MIC of 16 mg/L. On the other hand, it was not observed significant efficacy against strain with temocillin MIC of 32 mg/L whatever the regimen used (2 g q12h or q8h).

All together this results and the literature review support a clinical breakpoints of 8 mg/L for 2 g q12h regimen, and 16 mg/L for 2 g q8h regimen. This last proposition correspond to the new susceptibility category : "Intermediate – Susceptible, increase exposure" from the last EUCAST recommendations.

Key words: temocillin, pharmacokinetics, pharmacodynamics, urinary tract infections, clinical breakpoints, ESBL, carbapenemase