

UNIVERSITE DE NANTES
UFR DE MEDECINE ET TECHNIQUES MEDICALES

ANNEE 2003

**EVALUATION EXPERIMENTALE DES
NOUVEAUX ANTISTAPHYLOCOCCIQUES :
CORRELATION IN VITRO - IN VIVO**

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale : Chimie-Biologie

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Spécialité : Pharmacologie, Thérapeutique

*Présentée et soutenue
publiquement par*

JACQUELINE Cédric

Le 9 décembre 2003, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs :	M. LECLERCQ Roland , Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Caen. M. CHAVANET Pascal , Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Dijon.
Examineurs :	M. MOREILLON Philippe , Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Lausanne. Mme CAILLON Jocelyne , Maître de Conférence des Universités - Praticien Hospitalier, Nantes. M. DRUGEON Henri , Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Nantes.

PLAN

LISTE DES ABREVIATIONS {8}

INTRODUCTION. {9}

RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES : EMERGENCE DE LA MULTIRESISTANCE. {11}

I. INTRODUCTION. {11}

II. COCCI A GRAM POSITIF MULTIRESISTANTS AUX ANTIBIOTIQUES. {12}

III. MULTIRESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES CHEZ LES ENTEROCOQUES. {12}

IV. *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RESISTANT A LA METICILLINE. {13}

IV.1. PRESENTATION DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*. {13}

IV.2. MULTIRESISTANCE DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*. {15}

IV.2.1. INTRODUCTION. {15}

IV.2.2. RESISTANCE A LA METICILLINE (SARM). {15}

IV.2.2.1. INTRODUCTION. {15}

IV.2.2.2. SYNTHÈSE DU PEPTIDOGLYCANE. {16}

IV.2.2.3. PROTEINES DE LIAISON AUX PENICILLINES. {18}

IV.2.2.4. SUPPORT ET MÉCANISME DE LA RESISTANCE A LA METICILLINE. {18}

IV.2.3. EMERGENCE DE LA RESISTANCE AUX GLYCOPEPTIDES. {19}

IV.2.3.1. INTRODUCTION. {19}

IV.2.3.2. EMERGENCE DE SOUCHES DE SENSIBILITÉ DIMINUÉE AUX GLYCOPEPTIDES. {21}

IV.2.3.3. VRSA : EMERGENCE DE LA RESISTANCE A LA VANCOMYCINE. {21}

IV.2.3.4. HÉTÉRO-RESISTANCE. {22}

IV.2.3.5. MÉCANISME DE LA RESISTANCE AUX GLYCOPEPTIDES. {27}

NOUVELLES STRATÉGIES ANTIBIOTIQUES. {31}

I. INTRODUCTION. {31}

II. NOUVELLES MOLECULES. {33}

II.1. OXAZOLIDINONES. {33}

II.2. SYNERGISTINES (QUINUPRISTINE-DALFOPRISTINE). {33}

- II.3. KETOLIDES (TELITHROMYCINE). {34}
- II.4. GLYCOPEPTIDES ET LIPOPEPTIDES. {36}
 - II.4.1. DAPTOMYCINE. {36}
 - II.4.2. ORITAVANCINE ET DALVABANCINE. {36}
 - II.4.3. RAMOPLANINE. {36}
- II.5. EVERNINOMICINES. {37}
- II.6. GLYCYLCYCLINES. {37}
- II.7. CEPHALOSPORINES. {39}
- II.8. CARBAPENEMES. {39}

III. LINEZOLIDE : PREMIER REPRESENTANT D'UNE NOUVELLE CLASSE D'ANTIBIOTIQUES. {40}

- III.1. INTRODUCTION. {40}
- III.2. MECANISME D'ACTION ET RESISTANCE. {40}
- III.3. ACTIVITE ANTIBACTERIENNE. {47}
- III.4. DONNEES PHARMACOCINETIQUES. {50}
- III.5. INDICATIONS ET UTILISATION CLINIQUE DU LINEZOLIDE. {54}
 - III.5.1. INDICATIONS. {54}
 - III.5.2. EXPERIENCE CLINIQUE. {54}
 - III.5.2.1. DANS LE CADRE DE L'AMM. {54}
 - III.5.2.2. HORS AMM. {55}

APPORT DES ETUDES EXPERIMENTALES SUR L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DE NOUVELLES MOLECULES : CORRELATION *IN VITRO* – *IN VIVO*. {58}

- I. INTRODUCTION. {58}
- II. TECHNIQUES D'ETUDES DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE *IN VITRO*. {60}
 - II.1. L'ANTIBIOGRAMME. {60}
 - II.2. CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE (CMI). {60}
 - II.3. CINETIQUES DE BACTERICIDIE. {60}
- III. ASSOCIATIONS D'ANTIBIOTIQUES. {61}
 - III.1. INDICATIONS. {61}
 - III.2. INDIFFERENCE, SYNERGIE ET ANTAGONISME. {61}
 - III.2.1. DEFINITIONS. {61}
 - III.2.2. SYNERGIES OU ANTAGONISMES DEJA DECRITS ENTRE MOLECULES OU CLASSES D'ANTIBIOTIQUES. {61}
 - III.2.2.1. ASSOCIATIONS DEMONTRANT UNE SYNERGIE. {62}

III.2.2.2. ASSOCIATIONS DEMONTRANT UN ANTAGONISME. {62}

III.2.3. MECANISMES D’ACTION. {63}

IV. LIMITES DES TECHNIQUES D’ETUDES *IN VITRO*. {63}

V. L’EXPERIMENTATION ANIMALE : DE L’*IN VITRO* A L’*IN VIVO*. {64}

V.1. ETHIQUE. {64}

V.2. DE L’*IN VITRO* A L’*IN VIVO*. {65}

V.3. ETUDES PHARMACOCINETIQUES ET PHARMACODYNAMIQUES : OPTIMISATION DE L’EFFICACITE THERAPEUTIQUE. {66}

V.3.1. ASPECTS PK/PD : CONCENTRATION- ET TEMPS-DEPENDANCE. {66}

V.3.2. OPTIMISATION DE L’EFFICACITE THERAPEUTIQUE : CAS DU LINEZOLIDE. {68}

V.3.3. MODE OPTIMAL D’ADMINISTRATION DU LINEZOLIDE : PERFUSION CONTINUE OU PERFUSION DISCONTINUE ? {69}

V.3.4. PERFUSION CONTINUE : QUELLES LIMITES ? {70}

SYNTHESE. {72}

OBJECTIFS DES TRAVAUX. {73}

- ARTICLE I : Etude de l’activité *in vivo* du linézolide. Influence du mode d’administration. Comparaison à la vancomycine {75}.
 1. PRESENTATION DU TRAVAIL. {76}
 2. CHOIX DU MODELE. {77}
 3. CHOIX DES SOUCHES BACTERIENNES. {77}
 4. CHOIX DE LA MOLECULE COMPARATIVE. {78}
 5. MODE D’ADMINISTRATION DES ANTIBIOTIQUES. {78}
 6. MISE AU POINT DE LA SIMULATION DE LA PHARMACOCINETIQUE HUMAINE DU LINEZOLIDE CHEZ L’ANIMAL. {78}
 7. PRINCIPAUX RESULTATS. {80}
 8. ARTICLE. {83}
- ARTICLE II : Etude de l’activité *in vitro* du linézolide en association avec trois antibiotiques possédant des mécanismes d’action différents {104}.
 1. PRESENTATION DU TRAVAIL. {105}
 2. CHOIX DES ANTIBIOTIQUES TESTES EN ASSOCIATION AVEC LE LINEZOLIDE. {105}
 3. CHOIX DE LA TECHNIQUE D’ETUDE DE L’ACTIVITE *IN VITRO* DES ASSOCIATIONS INCLUANT LE LINEZOLIDE. {106}

3a. METHODE DE L'ECHIQUIER ET CALCUL D'UN FIC INDEX. {107}

3b. METHODE DES VITESSES DE BACTERICIDIE. {107}

4. RESULTATS DES ASSOCIATIONS INCLUANT LE LINEZOLIDE. {108}

5. ARTICLE. {109}

- ARTICLE III : Etude de l'activité *in vivo* du Synercid seul ou en association avec la gentamicine. Impact de la présence du gène *ermA* {131}.

1. PRESENTATION DU TRAVAIL. {132}

2. RESULTATS. {133}

3. ARTICLE. {135}

- ARTICLE IV : Impact de l'antagonisme *in vitro* sur l'activité *in vivo* de l'association linézolide plus gentamicine {158}.

1. PRESENTATION DU TRAVAIL. {159}

2. RESULTATS. {160}

3. OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE. {162}

CONCLUSIONS - PERSPECTIVES {165}

REFERENCES {170}

LISTE DES FIGURES {192}

LISTE DES TABLEAUX {195}

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN		Acide désoxyribonucléique.
AMM		Autorisation de Mise sur le Marché.
ARNm		Acide ribonucléique messenger.
BHI		Brain Heart Infusion.
CASFM		Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.
CMI		Concentration Minimale Inhibitrice.
IV		Intraveineuse.
MEB		Microscopie Electronique à Balayage.
MH		Mueller-Hinton.
PD		Pharmacodynamique.
PLP		Protéines de Liaison aux Pénicillines.
PK		Pharmacocinétique.
QD		Quinupristine-Dalfopristine.
SARM		<i>Staphylococcus aureus</i> Résistant à la Méricilline.
VRE		Entérocoques résistants à la Vancomycine.

INTRODUCTION

Les bactéries à Gram positif occupent depuis le début des années 90 le devant de la scène infectiologique en raison du développement inquiétant de leur résistance aux antibiotiques anciens et récents (Levy 1998). Les staphylocoques sont responsables d'infections communautaires et hospitalières sévères difficiles à traiter en raison de la multirésistance de ces bactéries (β -lactamines, aminosides, fluoroquinolones, macrolides...).

Les glycopeptides restent encore le traitement de référence des infections à *S. aureus* résistant à la méticilline. Si ces molécules ont été largement employées, elles demeurent malgré tout de « mauvais antistaphylococciques » : Propriétés pharmacodynamiques médiocres, vitesse de bactéricidie lente, diffusion intracellulaire faible, voie parentérale stricte (nécessité le plus souvent d'une voie centrale), dosages sanguins répétés indispensables... (Fantin 2002). De plus, l'émergence de souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides (Hiramatsu et coll 1997a) et la description récente d'une souche de *S. aureus* résistante à la vancomycine (Chang et coll 2003) n'ont fait que renforcer le besoin de nouvelles molécules antistaphylococciques insensibles à ces mécanismes de résistance. Si la recherche est toujours en cours pour découvrir de nouveaux antimicrobiens, l'arsenal thérapeutique comprend maintenant deux nouvelles molécules ayant démontré leur efficacité sur *S. aureus*. Il s'agit du linézolide (Zyvoxid[®]) et de l'association quinupristine-dalfopristine (Synercid[®]). Même si ces antibiotiques ont obtenu leur AMM, leur récente utilisation fait que de nombreux aspects de leur activité antibactérienne restent encore méconnus : mode d'administration optimum, développement de la résistance, activité en

association avec d'autres molécules... L'expérience clinique va fournir une base solide d'étude de l'activité de ces antibiotiques mais pour des raisons éthiques évidentes, seule la recherche expérimentale pourra être en mesure d'appréhender les différents aspects de l'activité antibactérienne de ces molécules. Les avantages d'un modèle animal expérimental discriminant, en plus de reproduire le plus fidèlement possible les caractéristiques de l'infection chez l'homme, est de pouvoir obtenir des données permettant une comparaison statistique entre différents régimes thérapeutiques testés (Fantin et coll 1992). De plus, la simulation des pharmacocinétiques humaines chez l'animal des molécules étudiées a permis de pouvoir extrapoler beaucoup plus facilement les résultats obtenus à l'homme.

Notre travail était donc essentiellement orienté sur l'étude de ces deux nouvelles molécules et plus particulièrement sur l'activité du linézolide en cherchant à définir et à étudier le mode optimal d'administration, l'activité antibactérienne *in vitro* et *in vivo* sur différentes souches de *S. aureus* et l'activité des associations incluant le linézolide *in vitro* et *in vivo*. Dans une première partie, nous détaillerons les différents thèmes relatifs au contexte de l'arrivée de ces nouvelles molécules antibactériennes (émergence de la multirésistance et nouvelles stratégies antibiotiques) ainsi que l'intérêt des études expérimentales dans la détermination de l'activité antibactérienne. Enfin, nous présenterons et discuterons dans une deuxième partie les résultats de nos travaux.

RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES : EMERGENCE DE LA MULTIRESISTANCE.

I. INTRODUCTION.

L'arrivée des antibiotiques a considérablement bouleversé notre attitude vis-à-vis des infections d'origine bactérienne. Alors que l'optimisme était de mise au début de l'ère de l'antibiothérapie, nous sommes passés d'un état d'inquiétude et de mise en garde à une véritable crise. Si la surconsommation des antibiotiques peut expliquer en partie l'émergence de la résistance bactérienne (Figure 1), ce problème est un phénomène complexe, dynamique et multi-factoriel.

Aujourd'hui, un certain nombre de bactéries sont devenues résistantes à tout l'arsenal thérapeutique disponible. Si l'augmentation de la résistance a d'abord touché les bactéries à Gram négatif, elle concerne essentiellement les bactéries à Gram positif depuis une dizaine d'années (Levy 1998). Il n'est donc pas étonnant que l'industrie pharmaceutique ait concentré essentiellement ses recherches sur la résistance de ce type de bactéries. Les germes principalement incriminés sont les staphylocoques (*Staphylococcus aureus* et staphylocoques à coagulase négative (*Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus haemolyticus*)), les entérocoques (*Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*), les pneumocoques, les streptocoques... La multirésistance est aujourd'hui un problème reconnu de santé publique et a conduit à toute une série de mesures visant à réduire la consommation et à une meilleure utilisation des antibiotiques, à améliorer le contrôle de l'infection bactérienne ainsi qu'à

favoriser le développement de nouvelles molécules. Cependant, la résistance bactérienne étant indissociable de l'utilisation des antibactériens, la sortie de cette crise ne pourra certainement se faire qu'en ralentissant le développement de la résistance tout en continuant à développer des nouvelles molécules insensibles à ces mécanismes de résistance.

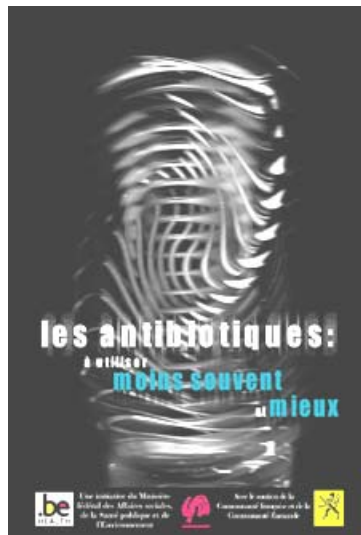


Figure 1. Affichage publicitaire pour sensibiliser le public au problème de la résistance bactérienne.

II. COCCI A GRAM POSITIF MULTIRESISTANTS AUX ANTIBIOTIQUES

Depuis le début des années 1990, on a assisté à l'émergence et à une augmentation de la résistance chez les cocci à Gram positif (Levy 1998). Ainsi la résistance à la méticilline continue à augmenter chez *S. aureus*, les entérocoques ne cessent de développer leur résistance à la pénicilline, la gentamicine, la streptomycine et à la vancomycine. Plus d'une souche sur quatre de *Streptococcus pneumoniae* apparaît résistante à la pénicilline et ce germe tend également vers la multirésistance (notamment aux céphalosporines et macrolides) (Thornsberry 1996).

III. MULTIRESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES CHEZ LES ENTEROCOQUES.

Les entérocoques possèdent des résistances naturelles multiples dont les aminosides (à bas niveau), les céphalosporines (à haut niveau), la clindamycine, les fluoroquinolones (à bas niveau) s'ajoutant à des résistances acquises aux pénicillines, glycopeptides et aminosides (Rice 2001). Pour réussir à contourner cette multirésistance, des associations d'antibiotiques sont fréquemment utilisées pour pouvoir récupérer l'activité bactéricide initiale. Les options thérapeutiques devant une infection à VRE apparaissent donc extrêmement limitées. Devant cette impasse, le linézolide et la quinupristine-dalfopristine représente une alternative intéressante et efficace pour le traitement de ce type d'infection (Leclercq 2002a, Kauffman 2003). En France, la résistance à la vancomycine chez les entérocoques reste encore anecdotique comparée aux taux observés dans d'autres pays, notamment aux USA. Une étude récente relate des taux de 0 à 1.7% de VRE en Europe à l'exception du Royaume-Uni (10.4%) et de l'Italie (19.6%) avec une incidence globale de 2.9% (8 pays européens étudiés) (Goossens et coll 2003). Aux Etats-Unis, plus de 25% des souches d'entérocoques isolées des unités de soins intensifs sont des VRE (National Nosocomial Infections Surveillance 1999, Prystowsky et coll 2001).

IV. *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RESISTANT A LA METICILLINE

IV.1. PRESENTATION RAPIDE DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Staphylococcus aureus est un membre de la famille des *Micrococcaceae*. Il s'agit d'un cocci à Gram positif se présentant sous forme de grappes à l'examen microscopique. Son génome est constitué d'un chromosome circulaire d'environ 2,8 Mb avec la présence de plasmides et de transposons. Les gènes de virulence ou de résistance aux antibiotiques peuvent être localisés au niveau du chromosome ou sur des éléments extra-chromosomiques. La structure de cette bactérie est représentée sur la Figure 2.

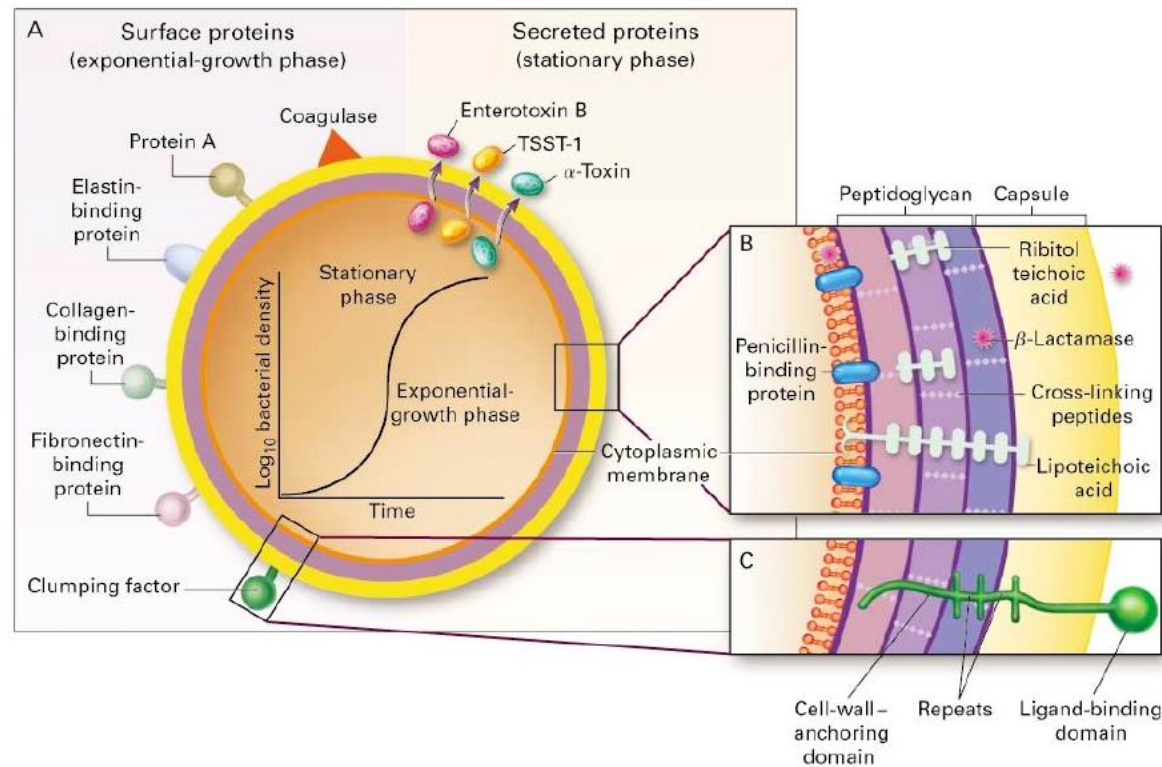


Figure 2. Structure de *Staphylococcus aureus* (Lowy 1998). La partie A représente la surface cellulaire et les protéines secrétées. La synthèse de beaucoup de ces protéines est dépendante de la croissance bactérienne et peut être contrôlée par des gènes régulateurs (exemple gène *agr*). Les parties B et C montrent des coupes de la membrane cellulaire. La plupart des protéines de surface possèdent une organisation structurale proche de celle du « clumping factor », incluant des segments répétés d'acides aminés (C).

IV.2. MULTIRÉSISTANCE DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*.

IV.2.1. INTRODUCTION.

Le phénomène de multirésistance chez *Staphylococcus aureus* pose un problème thérapeutique majeur. En effet, cette bactérie apparaît résistante à la quasi-totalité des agents antimicrobiens disponibles à l'hôpital. Si la vancomycine restait l'unique alternative aux traitements des infections à SARM il y a encore quelques années, l'apparition de souches de SARM de sensibilité diminuée aux glycopeptides a remis en cause cette situation précaire (Hiramatsu et coll 1997a).

Le staphylocoque doré est naturellement sensible à la plupart des antibiotiques à l'exception des antibiotiques ayant un spectre comprenant exclusivement les bactéries à Gram négatif. Ce germe a démontré une facilité importante d'adaptation au développement de la résistance, ce qui explique la place prépondérante qu'il occupe dans un grand nombre d'infections (infections de la peau et des tissus mous, bactériémies, infections ostéo-articulaires, ostéomyélites, endocardites, pneumonies,...). Cette bactérie est devenue multirésistante par l'acquisition successive de gènes de résistance portés par des plasmides et des transposons.

IV.2.2. RESISTANCE A LA METICILLINE (SARM).

IV.2.2.1. INTRODUCTION.

La résistance à la méticilline (ou oxacilline) est apparue en 1961 un an après l'introduction de cet antibiotique sur le marché. Cette résistance a constamment varié au cours du temps (Figure 3) mais chez certaines catégories de malades, le SARM est devenu la première bactérie responsable d'infections nosocomiales (Brun-Buisson 1998). En effet, en 2001, *Staphylococcus aureus* représentait en France environ 20% des germes identifiés, faisant partie d'un trio de tête comprenant également *Escherichia coli* (22.6%) et *Pseudomonas*

aeruginosa (11%) (L'infection nosocomiale sous surveillance 2001). Des différences énormes sont observées d'un pays à l'autre de l'Union Européenne : Alors que dans certains pays, on dépasse allègrement la barre des 50% de souches résistantes à la méticilline, des niveaux extrêmement faibles sont observés en Suède et au Danemark (Figure 4) (European Antimicrobial Resistance Surveillance System 2000). En France, le pourcentage de *S. aureus* résistants à la méticilline est d'environ 30% (Lepelletier et coll 2001). Il est important de noter que depuis le milieu des années 90, de nouveaux clones sont apparus et sont caractérisés par leur sensibilité à la gentamicine et par leur résistance hétérogène à la méticilline (Aubry-Damon et coll 1997). Si la résistance à la méticilline inclut une résistance à l'ensemble des β -lactamines, elle est le plus souvent également accompagnée d'une résistance aux aminosides, aux fluoroquinolones et aux macrolides.

IV.2.2.2. SYNTHÈSE DU PEPTIDOGLYCANE.

Le peptidoglycane est un hétéropolymère composé de chaînes glucidiques reliées les unes aux autres par des chaînons peptidiques. La chaîne polysaccharidique est formée de chaînons N-acétyl-glucosamine-acide-N-acétylmuramique. Les chaînes peptidiques formées au minimum de quatre amino-acides sont toujours fixées sur l'acide muramique.

La synthèse du peptidoglycane fait intervenir 3 étapes majeures :

- (i) Une étape cytoplasmique de synthèse du précurseur UDP-acide-N-acétylmuramique-(MurNAc)-pentapeptide.
- (ii) Une étape de translocation des précurseurs à travers la membrane cytoplasmique.
- (iii) Une étape de polymérisation du peptidoglycane à partir de ces précurseurs lipidiques.

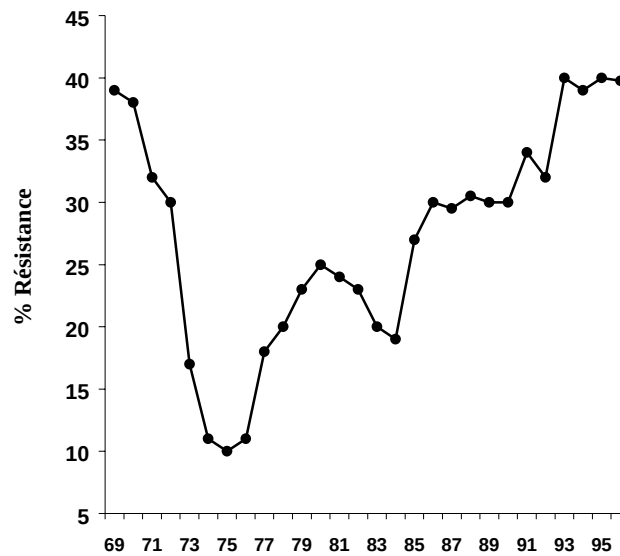


Figure 3. Evolution de la résistance à l'oxacilline chez *Staphylococcus aureus* à l'hôpital Henri-Mondor de 1969 à 1996 (d'après Aubry-Damon et coll 1997).

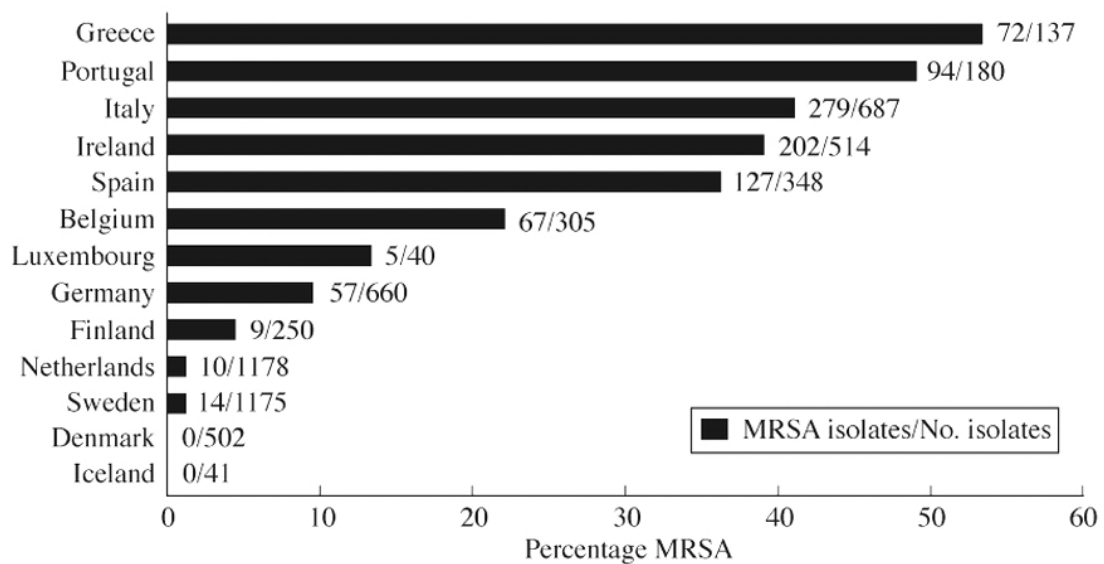


Figure 4. Taux de prévalence des souches de SARM en Europe (Wise 2003).

D'autres enzymes sont aussi nécessaires pour une synthèse harmonieuse de la paroi : hydrolases permettant de couper les chaînes glucidiques du peptidoglycane (rôle essentiel lors de la division), D,D carboxypeptidases coupant le dipeptide D-Alanine -D-Alanine...

IV.2.2.3. PROTEINES DE LIAISON AUX PENICILLINES.

Les β -lactamines se fixent sur des protéines membranaires, les Protéines de Liaison aux Pénicillines (PLP). Ces protéines sont des enzymes catalysant les liaisons entre chaînes peptidiques dans la paroi ou assurant le remaniement de ces chaînons. Les PLP essentielles sont capables de réactions de transpeptidation et des transglycosylation. Certaines PLP sont des D,D-endorpeptidases. Il existe chez les bactéries une grande diversité des PLP. Les β -lactamines jouent le rôle d'un substrat formant une liaison stable avec la PLP et bloquant son action. L'effet bactéricide ne semble pas dû uniquement aux PLP : c'est plus l'équilibre entre synthèse et lyse naturelle (sous l'action d'autres enzymes telles des hydrolases), qui en est la cause.

IV.2.2.4. SUPPORT ET MECANISME DE LA RESISTANCE A LA METICILLINE.

Le support génétique de cette résistance est un fragment d'ADN additionnel de 30-40 kb, le gène *mecA*. Ce gène code pour une PLP additionnelle, la PLP2a (ou PLP2'), qui possède une faible affinité pour la méticilline et qui est à la base de la résistance à la méticilline (Archer et coll 1994). Le phénomène de régulation est complexe et met en jeu de nombreux gènes et des systèmes régulateurs agissant au niveau de la transcription donc de l'expression de PLP2a : *mecI* code pour un répresseur de *mecA*, mais l'expression de la résistance à la méticilline nécessite que ce gène soit inactivé par mutation ou délétion (Hiramatsu et coll 1999). La production de PLP2a est sous le double contrôle des éléments

régulateurs *mecRI-mecI*- et *blaRI-blaI* (pénicillinase) (Berger-Bachi 1999). Il existe également des gènes accessoires impliqués dans la résistance de haut niveau à la méticilline et contribuant à la complexité du système.

Ce système de régulation complexe et cette importante variabilité génétique sont à l'origine de l'expression variable de la résistance à la méticilline de *S. aureus* et celle-ci n'est pas corrélée avec la quantité de PLP2a produite. En effet, cette résistance peut être homogène ou hétérogène et de différents niveaux. La plupart des bactéries présentent un bas niveau de résistance mais une petite sous-population exprime un haut niveau de résistance. Cette dernière est dépendante de la souche et peut varier de 10^{-2} à 10^{-8} à l'intérieur de la population (Pierre 1988). En conséquence, les souches de SARM ont été classées en 4 classes principales décrites par Tomasz (Figure 5) (Tomasz et coll 1991) :

- Résistance hétérogène de très bas niveau (classe I).
- Résistance hétérogène de bas niveau à la méticilline (classe II).
- Résistance hétérogène de haut niveau à la méticilline (classe III).
- Résistance homogène à la méticilline (classe IV).

Cette caractérisation permet de différencier les différentes souches de SARM et de mieux connaître l'épidémiologie de *S. aureus*. De plus, il apparaît que le niveau de résistance à la méticilline peut avoir un impact sur l'activité de certains antibactériens et sur le résultat de certaines associations d'antibiotiques (Drugeon et coll 1994).

IV.2.3. EMERGENCE DE LA RESISTANCE AUX GLYCOPEPTIDES.

IV.2.3.1. INTRODUCTION.

Si les cliniciens sont régulièrement confrontés au problème de la résistance à la méticilline, la description au Japon en 1997 d'une souche de *Staphylococcus aureus* de sensibilité diminuée aux glycopeptides (Hiramatsu et coll 1997a) a remis en cause l'utilisation quasi-

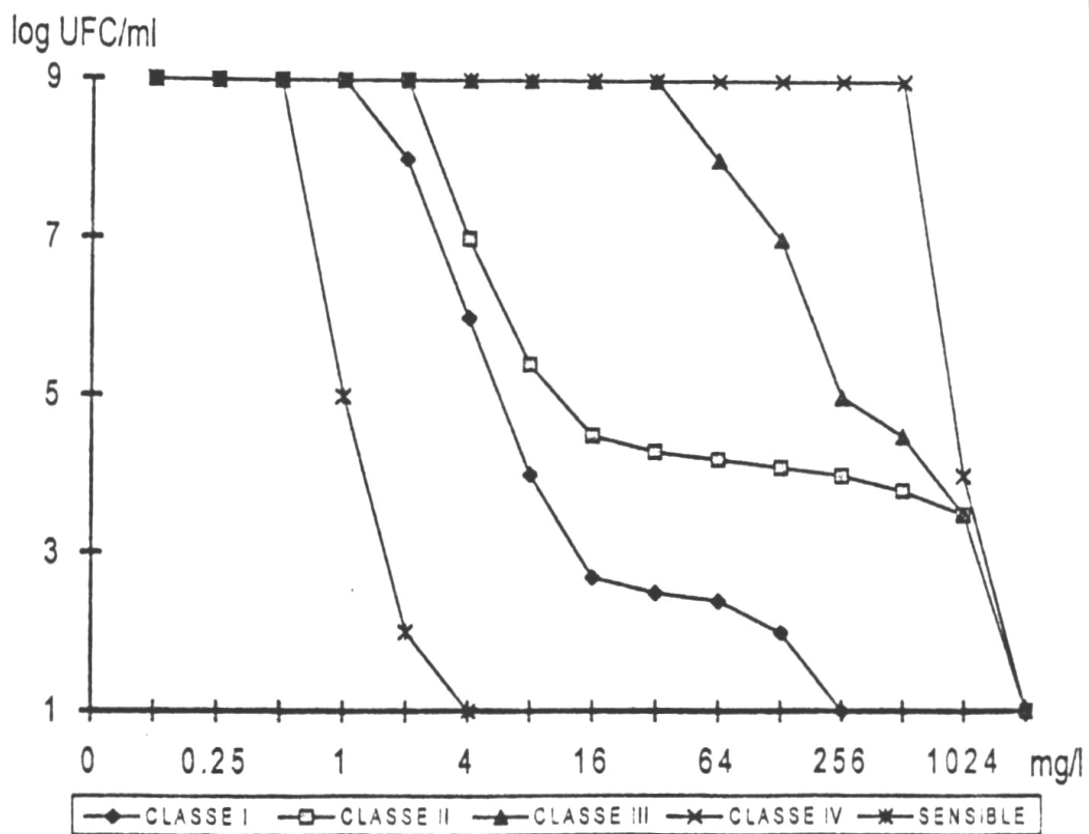


Figure 5. Analyse des populations selon la classe d'expression de la résistance à la méticilline (Drugeon et coll 1994).

exclusive des glycopeptides (vancomycine et teicoplanine) dans les infections à SARM (« which has been the drug of last resort to treat MRSA» (Khurshid 2000)). Il faut noter que les premiers signalements de souches de *S. aureus* présentant une sensibilité diminuée à la teicoplanine datent plutôt du début des années 90, mais ces souches conservaient leur sensibilité à la vancomycine (Kaatz et coll 1990, Mainardi et coll 1995). Si l'impact clinique des souches présentant une sensibilité diminuée est encore mal connu, la description récente d'une souche de *S. aureus* résistant à la vancomycine démontre qu'il faudra composer prochainement avec la résistance aux glycopeptides (Sievert 2002, Chang et coll 2003).

IV.2.3.2. EMERGENCE DE SOUCHES DE SENSIBILITE DIMINUEE AUX GLYCOPEPTIDES.

La première souche décrite de sensibilité diminuée à la vancomycine avait une CMI de 8 mg/L, ce qui la classait dans la catégorie de sensibilité intermédiaire (VISA : vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*). Depuis, plusieurs souches (toutes résistantes à la méticilline) ont été décrites en Europe, en Asie et aux Etats-Unis (Smith et coll 1999, Rotun et coll 1999, Fridkin 2001). Ces souches sont le plus souvent isolées dans des contextes particuliers d'infection sévère sur des terrains difficiles auxquels vient s'ajouter une antibiothérapie de longue durée par un glycopeptide (plusieurs semaines à plusieurs mois...) (Leclercq 2002b). Si les infections dues à ces souches VISA restent pour le moment des cas rares, le phénomène d'hétéro-résistance chez *S. aureus* (hVISA) semble être plus largement décrit dans la littérature (paragraphe IV.2.3.4).

IV.2.3.3. VRSA : EMERGENCE DE LA RESISTANCE A LA VANCOMYCINE.

La résistance à la vancomycine est définie par une CMI supérieure ou égale à 32 mg/L (NCCLS). La première souche clinique de *Staphylococcus aureus* démontrant cette

résistance (VRSA) a été isolée en juin 2002 aux Etats-Unis (Chang et coll 2003). Le gène *vanA* (responsable de la résistance à la vancomycine chez les entérocoques) a été mis en évidence chez cette souche hautement résistante présentant une CMI à la vancomycine de 1024 mg/L. Il semble qu'il y ait eu un transfert conjugatif du gène *vanA* entre un entérocoque résistant à la vancomycine (VRE) co-présent au site de l'infection et la souche de SARM incriminée. Néanmoins, cette souche restait cependant sensible au chloramphénicol, linézolide, quinupristine/dalfopristine, tétracyclines et à l'association triméthoprim/sulfaméthoxazole (Tableau I). Cette explication semble être commune avec la seconde souche isolée de VRSA (Centers for Disease Control and Prevention 2002).

IV.2.3.4. HETERO-RESISTANCE.

Une troisième classe de *S. aureus* peut-être à l'origine de confusion (Tableau II, Figure 6). Il s'agit des souches exhibant une hétéro-résistance à la vancomycine (hVISA). Ces souches, bien que sensibles à la vancomycine, présentent des sous-populations de cellules filles (avec des fréquences de 10^{-6} à 10^{-8}) résistantes à la vancomycine avec des CMI de 2 à 8 fois plus élevées que l'isolat clinique original alors que la souche mère possède des CMI de 1 à 4 mg/L (Hiramatsu et coll 1997b, Chesneau et coll 2000). En revanche, ces souches sont le plus souvent intermédiaires ou résistantes à la teicoplanine. Cette hétéro-résistance de *S. aureus* semble être l'état qui précède le développement de la résistante intermédiaire à la vancomycine, notamment sous la pression continue exercée par cet antibiotique. La signification clinique et le rôle dans les échecs thérapeutiques de ces souches restent encore pour le moment mal connues. Cependant, aucune technique à l'heure actuelle ne fait l'unanimité pour la mise en évidence de ces souches hétéro-VISA.

Différentes méthodes ont été utilisées pour identifier ces souches :

Tableau I. CMI aux principaux antibiotiques de la souche de *S. aureus* résistante à la vancomycine. Cette souche était de plus résistante à la clindamycine, l'érythromycine, la gentamicine, la lévofloxacine, l'oxacilline, la rifampicine et à la teicoplanine (d'après Chang et coll 2003).

ANTIBIOTIQUE	CMI (mg/L)	INTERPRETATION
Chloramphénicol	8	SENSIBLE
Gatifloxacine	4	INTERMEDIAIRE
Linézolide	2	SENSIBLE
Minocycline	0.25	SENSIBLE
Quinupristine-dalfopristine	≤ 1	SENSIBLE
Tétracycline	2	SENSIBLE
Triméthoprim- sulfaméthoxazole	2	SENSIBLE
Vancomycine	1024	RESISTANT

Tableau II. Classement des souches de *Staphylococcus aureus* suivant leur sensibilité à la vancomycine.

Souches	Abréviation	CMI Vancomycine (mg/L)	Référence(s)
		souche « parente »	
Hetero-resistant VISA	Hetero-VISA	1 - 4	Hiramatsu <i>et al.</i> (1997). Lancet
		sous-population	
Vancomycin- intermediate <i>S. aureus</i>	VISA	8 - 16	Smith <i>et al.</i> (1999). NEJM
Vancomycin-resistant <i>S. aureus</i>	VRSA	≥ 32	Chang <i>et al.</i> (2003). NEJM

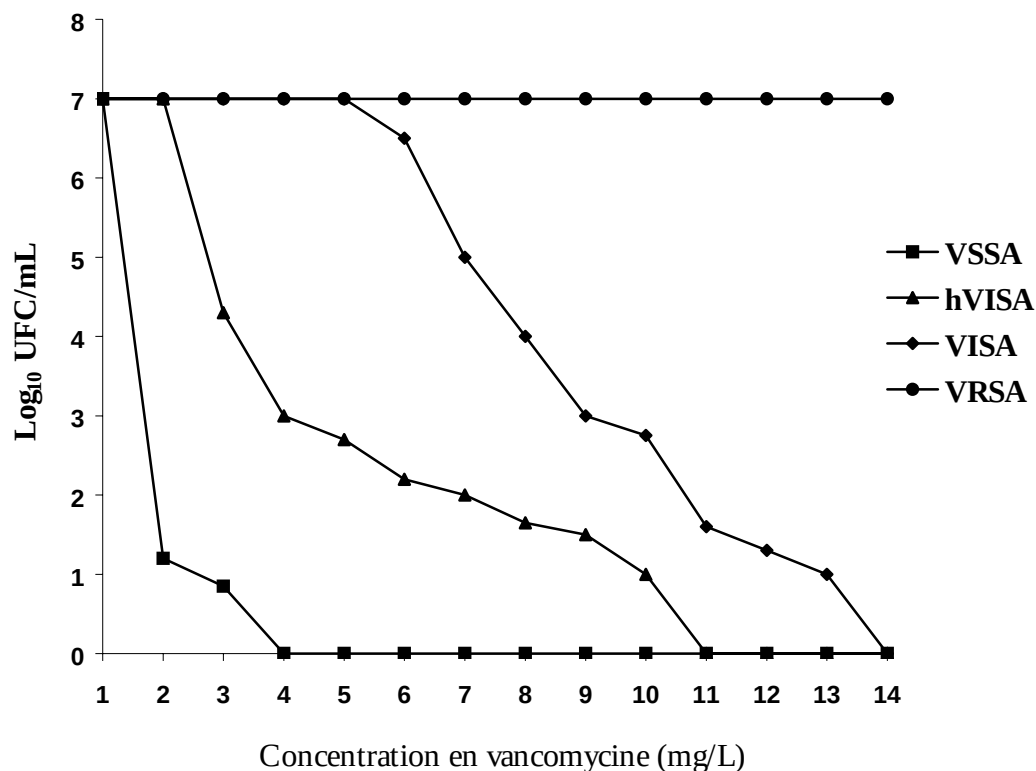


Figure 6. Analyse de population permettant de différencier les souches sensibles (VSSA), présentant une hétéro-résistance (hVISA), une résistance intermédiaire (VISA) ou une résistance homogène (VRSA) à la vancomycine. Les souches VRSA exhibent une résistance homogène à la vancomycine avec une population croissant à toutes les concentrations testées. Les souches VISA montrent une résistance intermédiaire avec 100% de la population poussant à 4 mg/L et une partie importante de celle-ci poussant à 8 mg/L. Les souches hVISA présentent une résistance hétérogène avec des sous-populations présentant différents niveaux à la vancomycine et une faible population capable de croître à une concentration de 8 mg/L (d'après Lui et coll 2003).

- L'analyse de population (Figure 6) permet de mettre en évidence les différentes catégories de résistance à la vancomycine. A partir d'une solution bactérienne à 10^8 CFU/mL, différentes dilutions sont étalées sur des géloses BHI (Brain Heart Infusion) contenant des concentrations croissantes de vancomycine. Le nombre de colonies survivantes est compté après 48 heures d'incubation pour chaque concentration de vancomycine. Cependant, cette méthode demande beaucoup de travail et n'a pas montré de supériorité par rapport aux autres méthodes.
- L'identification peut s'effectuer par la croissance pendant 24 heures sur un milieu contenant de la vancomycine (généralement 4-6 mg/L). En France, le CASFM recommande l'utilisation d'une gélose MH additionnée de 5 mg/L de teicoplanine (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie 2002). La sensibilité diminuée est suspectée par la présence d'au moins une colonie après ensemencement d'un dépôt de 10 μ L d'une suspension de 6.10^8 UFC/mL (MacFarland 2), après incubation à 35-37°C et lecture à 24 et 48 heures. L'utilisation d'une gélose BHI additionnée de 6 mg/L de teicoplanine et ensemencée par dépôt de 10 μ L d'une suspension à 10^8 UFC/mL (MacFarland 0.5) ne permettrait pas d'obtenir de résultats reproductibles d'un lot à l'autre (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie 2002).
- Enfin, d'autres méthodes existent mais sont pour la plupart des variations autour des techniques citées précédemment.

Cette catégorie de SARM (hVISA) semble être finalement plus présente en France que les souches dites VISA. Ces souches peuvent disséminer de façon épidémique et la fréquence peut varier de 0.6% à 25% suivant les régions (Reverdy et coll 2001, Pina et coll 2000). Une telle différence pourrait éventuellement s'expliquer par l'absence de consensus à l'heure actuelle sur la détection de ce type de souches.

Deux problèmes majeurs sont posés par l'hétéro-résistance des souches de SARM:

- (i) Ce phénomène pourrait être associé à des échecs thérapeutiques.

Wong et coll. (Wong et coll 2000) ont décrit quatre cas de septicémies causées par *S. aureus* présentant une hétéro-résistance à la vancomycine avec des CMI de 8 mg/L pour la vancomycine et de 24 mg/L pour la teicoplanine. Pour au moins deux de ces cas, la mortalité pouvait être imputée au phénomène d'hétéro-résistance.

- (ii) Ces souches pourraient constituer un réservoir pouvant conduire à l'obtention de souches VISA :

Hiramatsu et coll. (Hiramatsu et coll 1997b) ont étudié deux souches qui présentent le même profil en électrophorèse à champ pulsé : Mu3 and Mu50 (souche de sensibilité diminuée à la vancomycine). Lorsque Mu3 est cultivé dans un milieu sans antibiotique, cette souche produit des sous-populations de cellules présentant des degrés différents de résistance à la vancomycine, ce qui est caractéristique d'une souche de résistance hétérogène. En présence de vancomycine, Mu3 produit des cellules avec une résistance proportionnelle à la concentration utilisée. Autrement dit, si Mu3 est cultivé dans un milieu contenant 8 mg/L de vancomycine, la CMI de cette souche va être de 8 mg/L, ce qui est équivalent à la CMI de Mu50. Cette résistance à la vancomycine est sélectionnée à une fréquence de 10^{-6} . En conséquence, il semble que l'hétéro-résistance

puisse constituer une étape préliminaire qui autorise le passage vers la résistance sous la pression exercée par la vancomycine.

IV.2.3.5. MECANISME DE LA RESISTANCE AUX GLYCOPEPTIDES.

Les dissacharides pentapeptides, précurseurs du peptidoglycane, sont normalement incorporés dans le peptidoglycane en cours d'élaboration sous l'action des PLP. Les glycopeptides se fixent sur le d-Ala-d-Ala terminal du pentapeptide et cette fixation va perturber deux étapes cruciales de la synthèse du peptidoglycane.

Les entérocoques sensibles à la vancomycine synthétisent des précurseurs de la paroi se terminant par la séquence d-Ala-d-Ala, qui vont se lier à la vancomycine avec une haute affinité. Lorsqu'ils sont résistants, ils vont générer des précurseurs présentant différentes terminaisons (d-Ala-d-Lac ou d-Ala-d-Ser) possédant une faible affinité pour la vancomycine (Figure 7). Plusieurs gènes de résistance ont été mis en évidence comme les gènes *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE*, *vanF* et *vanG*. Cependant, aucun de ces gènes n'avait jamais été retrouvé dans des isolats cliniques de *S. aureus* (Woodford 2001). Néanmoins, il avait été démontré *in vitro* que le transfert conjugatif du gène *vanA* était possible de *Enterococcus faecalis* vers *Staphylococcus aureus* (Noble et coll 1992).

Le mécanisme de résistance de *S. aureus* aux glycopeptides est encore imparfaitement connu. Des anomalies morphologiques ont été mises en évidence chez une souche résistante incubée en présence de vancomycine (Figure 8). Celle-ci, observée en microscopie électronique à transmission, montre la formation d'agrégats multicellulaires avec la présence de grande quantité de matériel à la surface (Sieradzki et coll 1999). De même, la microscopie électronique a montré que la paroi subissait un épaissement chez les souches résistantes. Cette observation semble démontrer une relation étroite entre l'épaisseur de la paroi (biosynthèse et taux de renouvellement du peptidoglycane

augmentés) et le degré de résistance à la vancomycine. Cependant, cette théorie semble être remise en question par des observations contradictoires (Bergogne-Bérézin 2003).

Si plusieurs cas d'émergence de souches VISA ont été décrits dans différents pays du monde, les infections documentées à *S. aureus* de sensibilité diminuée restent (pour le moment) relativement rares. La description de souches VRSA se limite pour l'instant à deux cas.

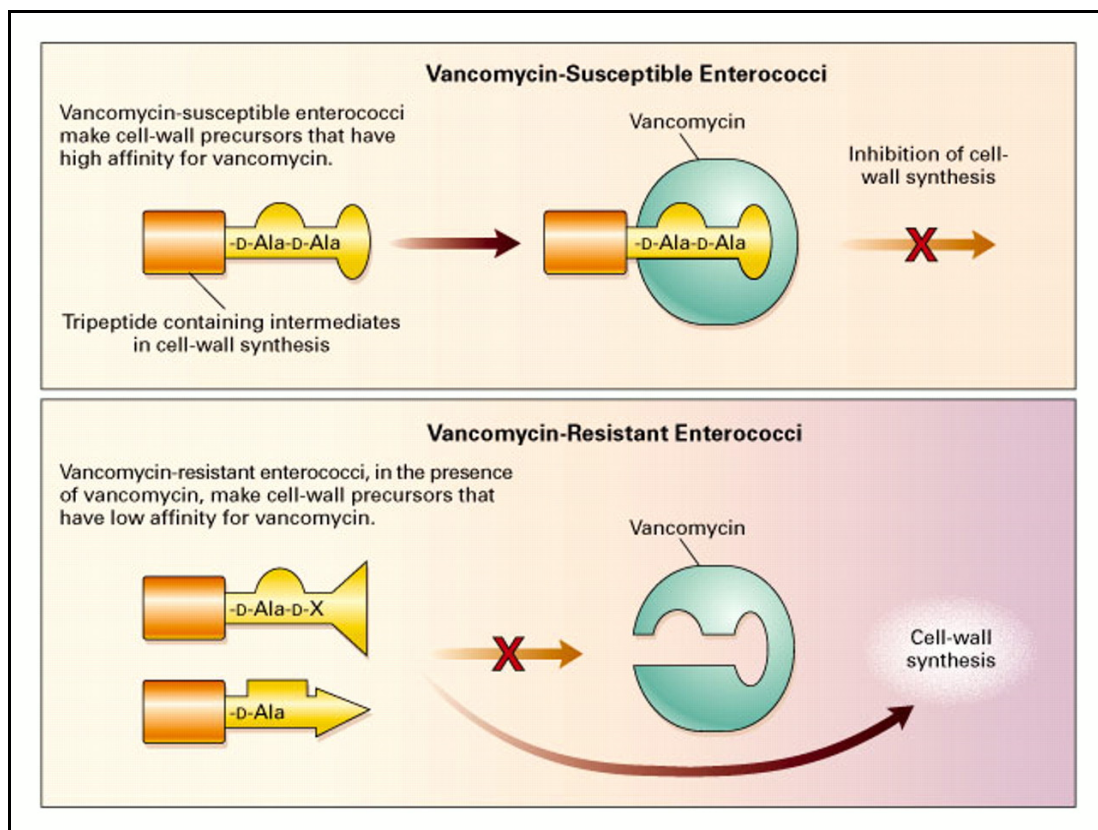


Figure 7. Mécanisme de résistance à la vancomycine chez l'entérocoque. Ala : alanine ; X : lactate pour les types de résistance *vanA*, *vanB* and *vanD* et sérine pour les types *vanC* et *vanE* (d'après Murray 2000).

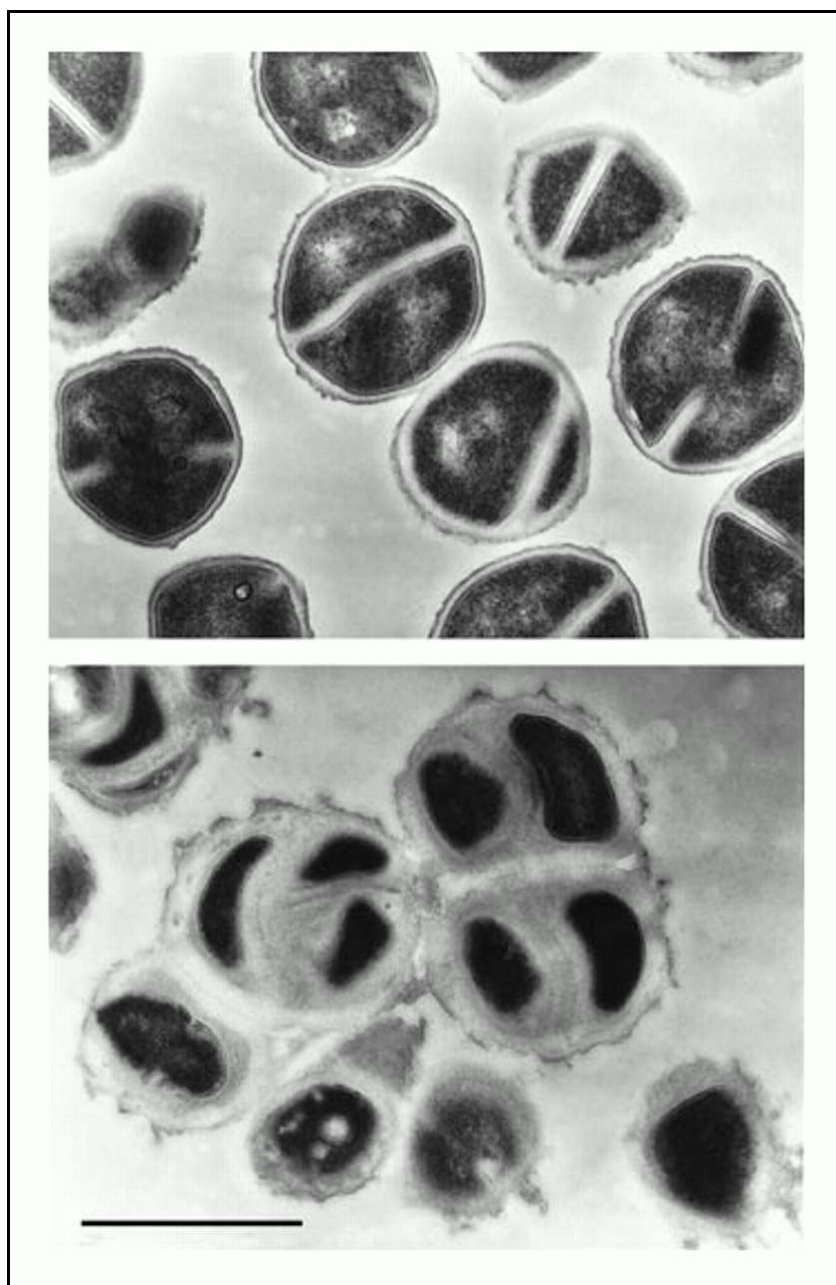


Figure 8. Anomalies morphologiques d'une souche de SARM résistante à la vancomycine. L'image du haut représente la souche incubée dans un bouillon trypticase-soja sans antibiotique. Celle du bas montre la même bactérie incubée dans un bouillon trypticase-

soja contenant 8 µg/mL de vancomycine. La barre représente 1 µm (Sieradzki et coll 1999).

NOUVELLES STRATEGIES ANTIBIOTIQUES

I. INTRODUCTION

Paroi bactérienne et synthèse des macromolécules (ADN, ARN ou protéines) sont les principales cibles des antibiotiques (Figure 9). Les bactéries ont su s'adapter à l'activité antibactérienne de ces molécules par mutation ou par acquisition de nouveaux gènes exogènes (via des éléments génétiques mobiles : plasmides, transposons...). Cette défense s'est organisée autour d'enzymes, d'altération de la perméabilité membranaire, de pompes d'efflux ou encore par modifications des cibles antibactériennes. Aujourd'hui, de nouvelles molécules arrivent sur le marché ou sont encore en phase d'essais et devraient être disponibles prochainement. Ces innovations concernent principalement les bactéries multirésistantes à Gram positif. Deux approches ont été utilisées :

- La première a été de rechercher de nouveaux antibiotiques agissant sur de nouvelles cibles afin d'éviter toute résistance croisée avec d'autres classes d'antibactériens.
- La seconde a consisté en la modification chimique de molécules déjà existantes afin d'augmenter l'activité et/ou le spectre antibactérien.

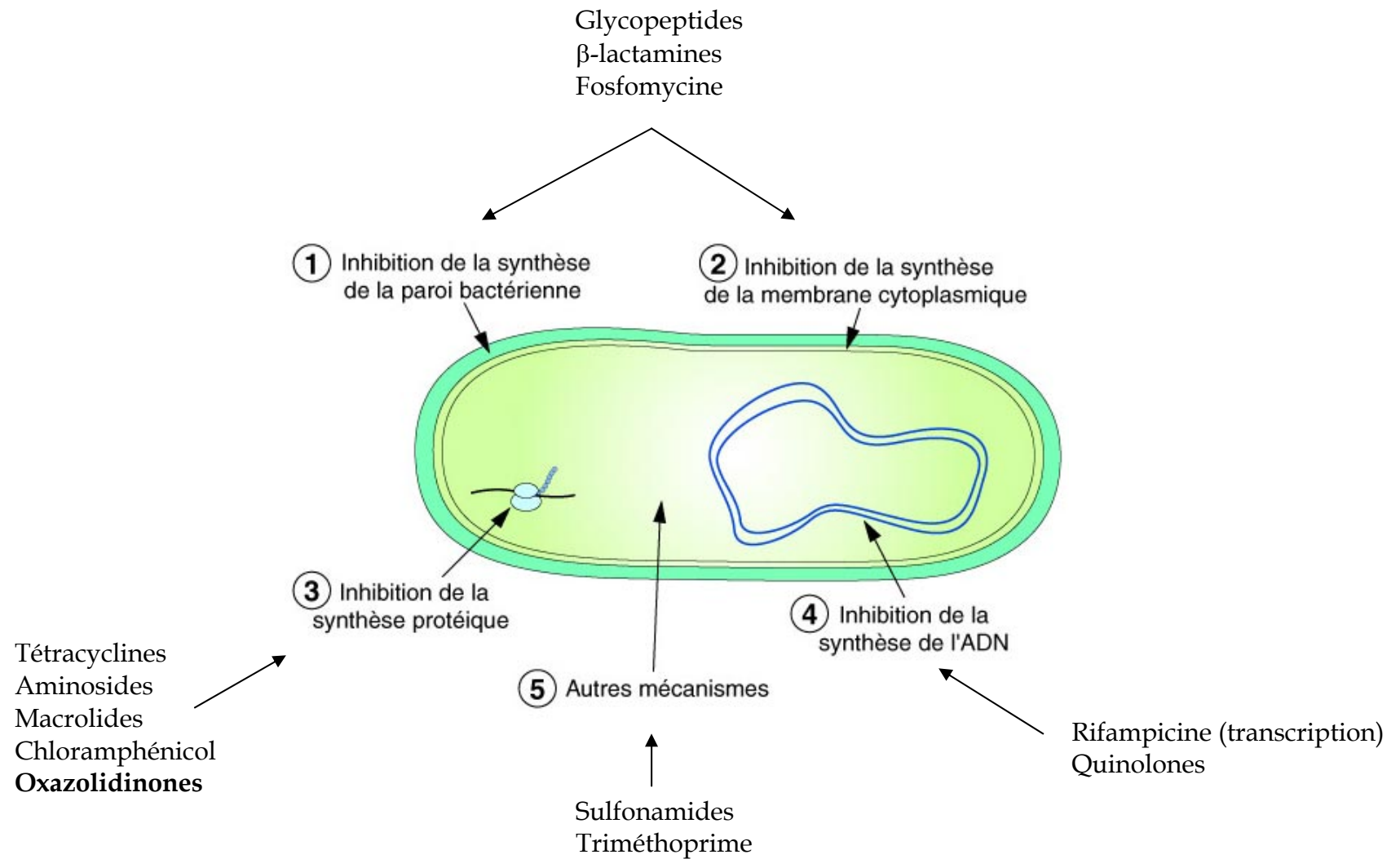


Figure 9. Cibles d'action des antibiotiques

II. NOUVELLES MOLECULES.

II.1. OXAZOLIDINONES.

Les oxazolidinones sont une nouvelle classe à part entière d'antibactériens de synthèse. Leur découverte date de la fin des années 80 par la firme du Pont de Nemours, mais les premiers composés étudiés possédant des caractéristiques antibactériennes intéressantes (DuP 105 et Dup 721) ont vu leur développement interrompu en raison de problèmes de toxicité (Slee et coll 1987). La recherche a été relancée sur cette nouvelle classe d'antibactériens par Pharmacia Upjohn au début des années 1990 et a abouti au développement de deux analogues de synthèse non toxiques, U-100592 (épirézolide) et U-100766 (linézolide) (Ford et coll 1997). Sur la base de données pharmacocinétiques (deux *versus* trois injections quotidiennes nécessaires), seule la molécule U-100766 a dépassé les essais de phase I.

Le linézolide est le chef de file d'une nouvelle famille d'antibiotiques, la première depuis 30 ans et est maintenant disponible sur le marché. Les oxazolidinones sont des inhibiteurs de la synthèse protéique. Son spectre d'action comprend essentiellement les bactéries à Gram positif. Les propriétés du linézolide seront décrites plus loin (paragraphe III, page 40).

II.2. SYNERCID (QUINUPRISTINE-DALFOPRISTINE).

Le Synercid (solution injectable) résulte de l'association de deux composés semi-synthétiques, la quinupristine et la dalfoprastine (Figure 10). La dalfoprastine, streptogramine A, est un peptolide cyclique polyinsaturé ; la quinupristine, streptogramine B, est un hexadepsipeptide cyclique. Prises séparément, ces molécules sont bactériostatiques mais agissent de façon synergique lorsqu'elles sont utilisées en association avec un ratio de 30:70 (activité bactéricide). Les streptogramines inhibent la traduction protéique en agissant sur le centre peptidyl-transférase de la sous-unité 50S

ribosomale. Les streptogramines A inhibent la phase d'élongation en empêchant la liaison des amino-acyl-ARNt et peptidyl-ARNt respectivement aux sites A et P du centre peptidyl-transférase, alors que les streptogramines B inhibent la formation du lien peptidique et induisent le détachement du peptide incomplet du ribosome (Cocito et coll 1997).

Comme le linézolide, le Synercid est essentiellement actif sur les bactéries à Gram positif comprenant les souches de SARM, les entérocoques résistants à la vancomycine ainsi que les pneumocoques résistants à la pénicilline. En revanche, il est inactif sur *Enterococcus faecalis*.

II.3. KETOLIDES

La télithromycine est un nouvel antibiotique de la famille des kétolides, sous-classe des macrolides, et est le premier kétolide à être disponible sur le marché. La structure chimique de la télithromycine comporte un macrocycle lactone à 14 liaisons comme les autres macrolides mais elle se différencie par l'existence de substituants différents, notamment une fonction cétone d'où le terme de kétolides (Figure 11). Les kétolides démontrent une bonne activité sur les bactéries aérobies à Gram positif, sur certains aérobies à Gram négatif et plus particulièrement sur *Streptococcus pneumoniae*, notamment les souches résistantes aux macrolides (*mefA* et *ermB*) (Zhanel et coll 2002).

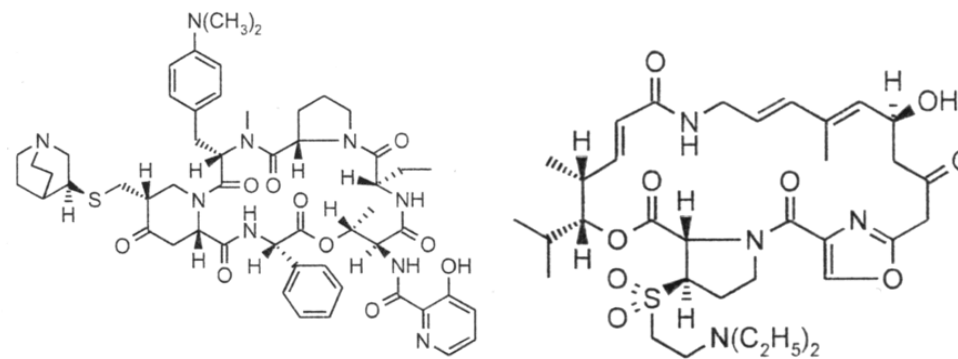
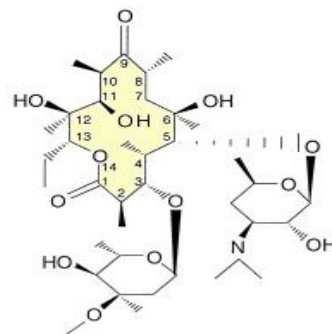


Figure 10. Structure chimique de la quinupristine (gauche) et de la dalbapristine (droite).

Erythromycine



Telithromycine

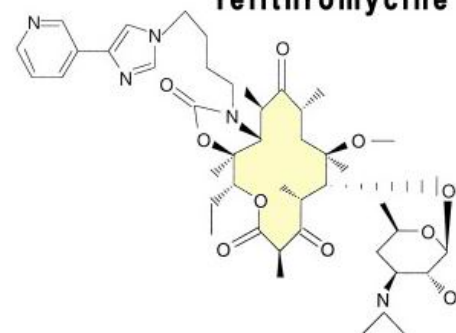


Figure 11. Structure chimique comparée des composés télithromycine et érythromycine.

II.4. GLYCOPEPTIDES ET LIPOPEPTIDES.

II.4.1. DAPTOMYCINE.

Cette molécule est un nouveau lipopeptide cyclique (en cours d'investigation) actif sur de nombreux germes multirésistants (Gram positif), comme les entérocoques résistants à la vancomycine, les SARM (y compris les souches intermédiaires aux glycopeptides) et les pneumocoques résistants à la pénicilline (Figure 12). Dans une récente étude *in vitro*, Richter *et al.* ont étudié l'activité de la daptomycine sur un grand nombre de souches de *S. aureus* et d'entérocoques (Richter et coll 2003). Toutes les souches de staphylocoques, qu'elles soient sensibles ou résistantes à la méticilline, et 96.5% des entérocoques étaient considérés sensibles à la daptomycine avec une activité comparable au linézolide et à la quinupristine-dalfopristine.

II.4.2. ORITAVANCINE ET DALBAVANCINE.

Ces molécules sont des glycopeptides semi-synthétiques démontrant *in vitro* une activité supérieure à celle de la vancomycine et de la teicoplanine. Dans une étude *in vitro* concernant 300 souches de *S. aureus*, l'oritavancine était active sur l'ensemble des souches, y compris les souches multirésistantes avec des CMI de 1 à 4 mg/L (Critchley et coll 2002). Dans un modèle expérimental d'endocardite chez le lapin, la dalbavancine administrée pendant 4 jours apparaissait aussi efficace *in vivo* que la vancomycine et la teicoplanine sur une souche de *S. aureus* sensible aux glycopeptides et plus active que la teicoplanine sur une souche intermédiaire à la vancomycine (CMI=6 mg/L) et à la teicoplanine (CMI=16 mg/L) (Lefort et coll 2002).

II.4.3. RAMOPLANINE.

Il s'agit d'un glycolipodepsipeptide produit par la fermentation de *Actinoplanes* spp. La ramoplanine bloque la biosynthèse de la paroi bactérienne en interférant avec la production

du peptidoglycane. Elle inhibe la conversion de l'intermédiaire lipidique I à l'intermédiaire lipidique II, une étape qui précède les réactions de transglycosylation et de transpeptidation (Reynolds et coll 1990). Ce mécanisme d'action est distinct des autres glycopeptides et la ramoplanine n'interagit pas avec la séquence D-Ala-D-Ala. Cette molécule est bactéricide *in vitro* sur *Enterococcus faecium* et *Enterococcus faecalis* résistants à la vancomycine (Collins et coll 1993). La ramoplanine est administrée par voie orale et ne subit pas de diffusion systémique. Elle pourrait jouer un rôle dans la prophylaxie orale des infections à entérocoques résistants à la vancomycine (Montecalvo 2003).

II.5. EVERNINOMICINES.

L'evernimicine, produite par *Micromonospora carbonacea*, est un composé oligosaccharidique (Figure 13) qui interagit avec la grande sous-unité du ribosome bactérien (inhibant ainsi la synthèse protéique). Ce produit est bactéricide contre les pneumocoques mais apparaît bactériostatique contre les staphylocoques et les entérocoques. Il possède une longue demi-vie (8-18 heures) et une forte liaison aux protéines.

II.6. GLYCYLCYCLINES.

La tigecycline (GAR-936) est un dérivé semi-synthétique de la minocycline actif sur de nombreuses espèces bactériennes dont les SARM, sans résistance croisée avec la tétracycline et la minocycline. Cette molécule semblerait montrer *in vitro* une activité comparable ou supérieure (vis-à-vis de SARM) à celle du linézolide, de la vancomycine, de la minocycline et de la quinupristine-dalfopristine (Kuwahara-Arai et coll 2002).

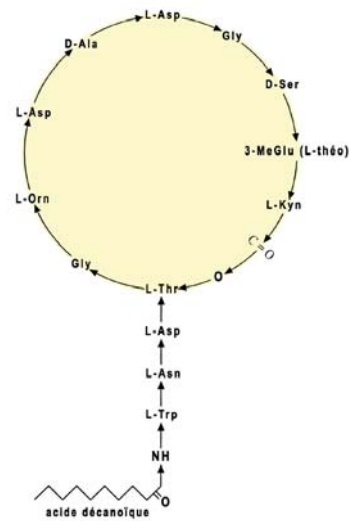


Figure 12. Structure chimique de la daptomycine (lipopeptide).

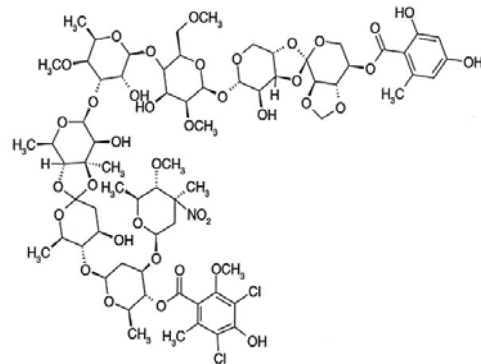


Figure 13. Structure chimique de l'evernimicine.

II.7. CEPHALOSPORINES.

Une nouvelle céphalosporine, LB11058, apparaît être active *in vitro* sur des souches de SARM. La CMI est de l'ordre de 2 mg/L et LB11058 semble plus rapidement bactéricide que la vancomycine avec une réduction de l'inoculum bactérien de 3 log₁₀ UFC/mL après 24 heures (Cho et coll 2002). Un certain nombre de céphalosporines sont actuellement à l'étude, développées par différentes compagnies pharmaceutiques : BMS247243, PGE-9882816 et PGE9739390, RWJ-333441...

II.7. CARBAPENEMES.

L'imipénème et le méropénème sont deux carbapénèmes couramment utilisés en milieu hospitalier et possédant une activité bactéricide importante sur de nombreuses espèces bactériennes... Cependant, le SARM échappe à l'activité de ces molécules. Récemment, de nouveaux carbapénèmes actifs sur le SARM sont à l'étude. En raison d'une forte affinité pour la PLP2a, CP5609, un nouveau carbapénème, est actif sur le SARM mais aussi sur *Streptococcus pneumoniae* résistant à la pénicilline. Testé *in vitro* et *in vivo* sur des souches de SARM, CP5609 est apparu au moins aussi efficace que la vancomycine avec des CMI de 2 mg/L (Kurazono et coll 2002, Nagura et coll 2002).

III. LINEZOLIDE : PREMIER REPRESENTANT D'UNE NOUVELLE CLASSE D'ANTIBIOTIQUE.

III.1. INTRODUCTION

Les oxazolidinones sont une nouvelle classe d'antibiotiques de synthèse présentant une alternative intéressante dans le traitement des bactéries multirésistantes à Gram positif (Figure 14). Le linézolide est le premier composé issu de cette famille à être commercialisé.

La formule chimique du linézolide, (S)-N-[[3-[3-fluoro-4-(4-morpholinyl)phenyl]-2-oxo-5-oxazolodiny]methyl]-acétamide est $C_{16}H_{20}FN_3O_4$ (Figure 15). La structure chimique des oxazolidinones autorise une importante quantité de modifications chimiques possibles qui pourraient augmenter le spectre antibactérien, l'activité ou encore les caractéristiques d'administration (Figure 16). Ces recherches « structure-activité » sont actuellement en cours et plusieurs nouvelles sous-classes ont déjà été identifiées, ce qui devrait permettre la commercialisation de nouvelles molécules dans un avenir proche (Gadwood et coll 2000).

III.2. MECANISME D'ACTION ET RESISTANCE

Le linézolide est un inhibiteur de la synthèse protéique mais agit par un mécanisme d'action original, ce qui explique l'absence de résistance croisée avec d'autres classes d'antibiotiques, et notamment ceux agissant également sur la synthèse des protéines (chloramphénicol, macrolides, lincosamides, streptogramines, tétracyclines et aminosides). (Kaatz et coll 1996, Rybak et coll 1998). Un travail de Fines *et al.* a étudié l'activité *in vitro* du linézolide sur des bactéries présentant des gènes conférant la résistance aux inhibiteurs de la synthèse protéique. Il en ressort que l'activité du linézolide n'est altérée ni par les enzymes LinA, LinA', LinB, Vgb, Vat, SatA, ANT(4') (4'')-I, AAC(6')-APH(2''),

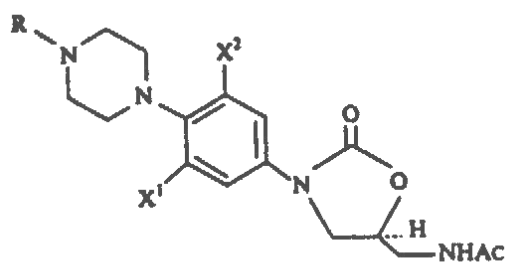


Figure 14. Structure des oxazolidinones.

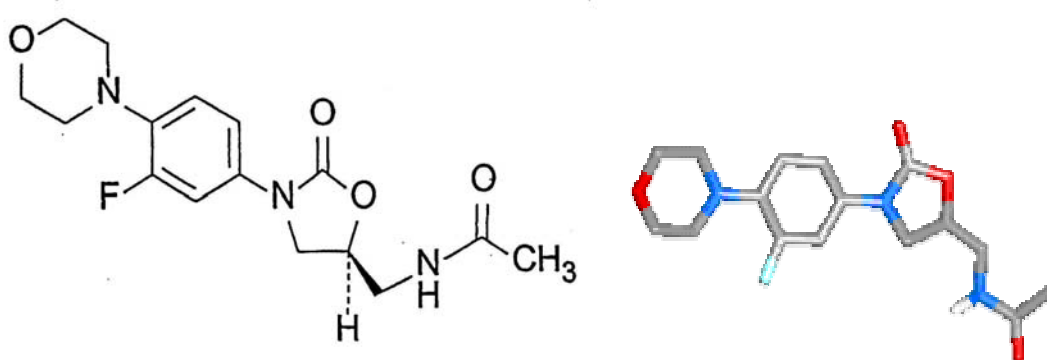


Figure 15. Structure du linézolide.

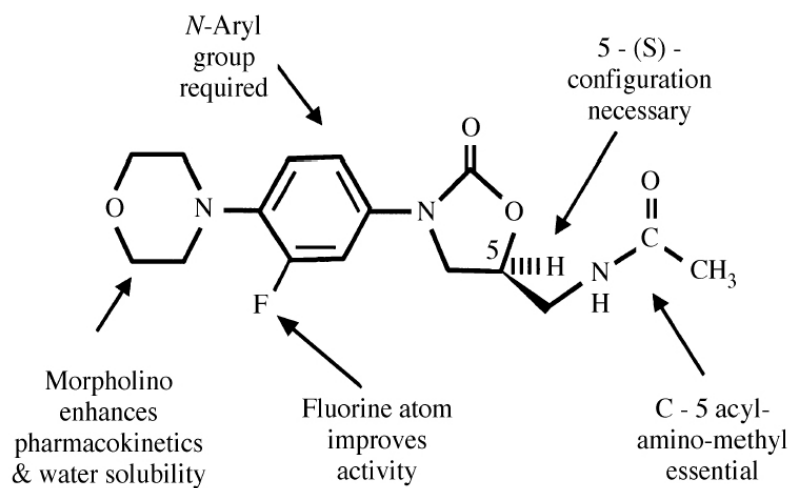


Figure 16. Relations structure-activité conduisant au développement de nouvelles molécules (d'après Livermore 2003).

APHA-3 et Cat, ni par la présence d'un mécanisme d'efflux (MsrA, MefE, MefA, MreA, Vga, TetK et TeL), ni par la modification ou la protection de la cible cellulaire de l'antibiotique (méthylases ribosomales, TetM et TetO) (Fines et coll 2000, Rodriguez-Avial et coll 2003).

Le linézolide agit sur la synthèse protéique en bloquant à un stade très précoce la traduction au niveau de la phase d'initiation (Figure 17 A et B). Il n'a aucun effet sur les phases de réplication et de transcription (Eustice et coll 1988). Le linézolide se lie au niveau du domaine V de l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S à un site de liaison proche de ceux du chloramphénicol et de la lincomycine. Cette liaison empêche donc la formation du complexe d'initiation, qui comprend le N-formylmethionyl-ARNt, l'ARNm, les facteurs d'initiation IF2 et IF3 et les sous-unités ribosomales (Figure 18) (Aoki et coll 2002, Shinabarger et coll 1997, Swaney et coll 1998). C'est d'ailleurs l'ARNr 23S qui constitue la base moléculaire de la résistance au linézolide. A ce niveau, la mutation d'une guanine en uracile à la position 2576 (principalement) confère la résistance au linézolide (Figure 19) (Prystowsky et coll 2001, Xiong et coll 2000). Cette résistance est difficile à mettre en évidence *in vitro* avec des fréquences d'apparition de l'ordre de 10^{-9} à 10^{-11} chez *Staphylococcus aureus* en utilisant des concentrations de 2 à 8 fois la CMI (Zurenko et coll 1996). Bien que le développement d'une résistance *in vitro* au linézolide semble difficile, plusieurs cas d'apparition de résistance *in vivo* ont été décrits principalement chez des souches d'*Enterococcus faecium* et *Enterococcus faecalis* (Gonzales et coll 2001, Boo et coll 2003) mais également chez deux souches de *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM) (Tsiodras et coll 2001, Wilson et coll 2003). Même si la résistance demeure rare pour l'instant (Mutnick et coll 2003), l'ensemble de ces données incite à la prudence lors de l'utilisation clinique du linézolide en monothérapie afin de ne pas

favoriser l'apparition de la résistance au linézolide d'une part mais aussi à une nouvelle classe d'antibactériens.

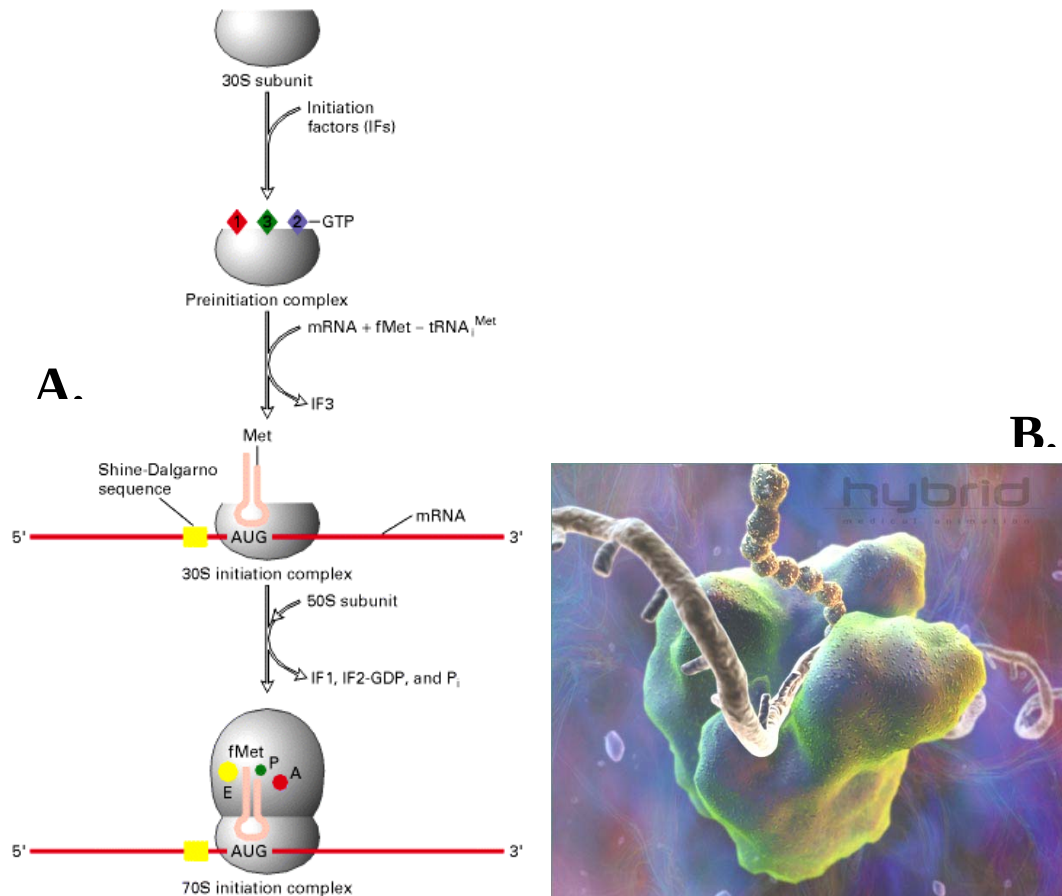


Figure 17. (A). Mécanismes de la phase d'initiation de la synthèse protéique bactérienne mettant en jeu les différents acteurs du processus (sous-unités ribosomales, ARN_m, facteurs d'initiation...) [Online Réf1]. (B). Représentation tridimensionnelle du complexe ribosomal [Online Réf2].

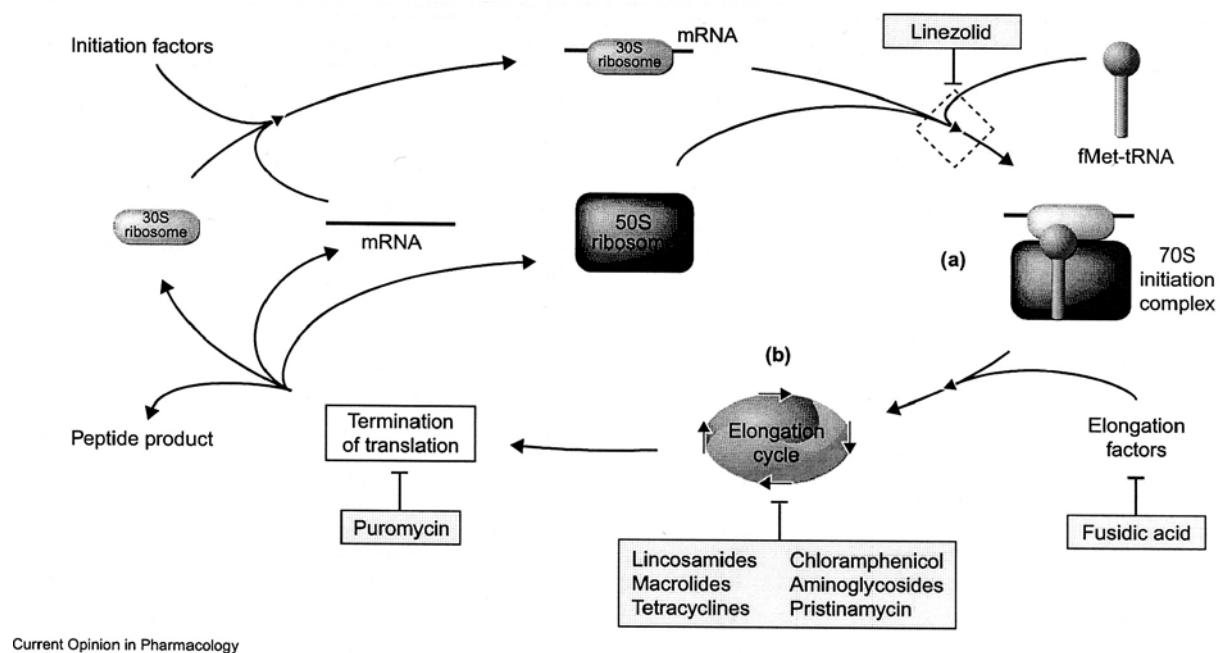


Figure 18. Représentation schématique du mécanisme d'action des oxazolidinones (Zurenko et coll 2001).

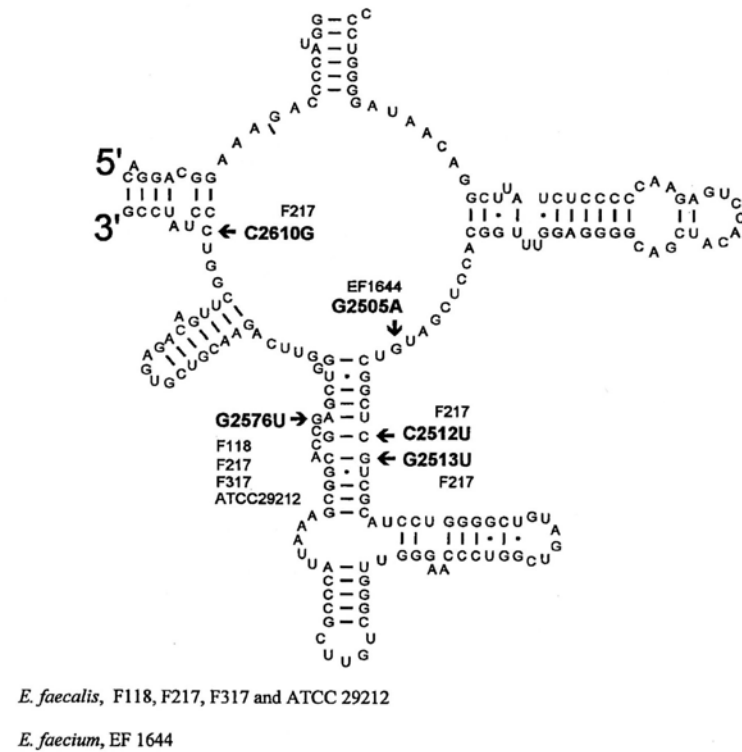


Figure 19. Localisation des mutations conférant la résistance au linézolide au niveau de l'ARNr 23S chez *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* (Prystowsky et coll 2001).

III.3. ACTIVITE ANTIBACTERIENNE

Les oxazolidinones démontrent une bonne activité *in vitro* contre la plupart des Cocci à Gram positif pathogènes pour l'homme (Zurenko et coll 1996, Rybak et coll 1998). Le Tableau III résume les bactéries les plus communément sensibles au linézolide. Celui-ci démontre une bonne activité sur *Staphylococcus aureus*, sensible ou résistant à la méticilline, sur les entérocoques (résistants ou non à la vancomycine), sur *Streptococcus pneumoniae* et autres streptocoques, mais également sur des germes moins fréquents comme *Bacillus* spp, *Corynebacterium* spp, *Listeria monocytogenes*... Bien que le linézolide pénètre au travers de la cellule des bactéries à Gram négatif, il est inactif sur ces germes en raison de son élimination rapide de la cellule via les pompes d'efflux transmembranaires.

Le linézolide est un inhibiteur de la synthèse protéique et comme la plupart des antibiotiques appartenant à cette classe, son activité antibactérienne est considérée comme « bactériostatique » aux concentrations atteignables en clinique avec une diminution de l'inoculum bactérien de 1 à 2 log₁₀ UFC/mL/24h (Zurenko et coll 1996, Rybak et coll 1998). Cet antibiotique est considéré comme temps-dépendant ; L'activité antibactérienne n'augmente plus en fonction de la concentration passée un certain seuil (Figure 20).

Tableau III. CMI du linézolide aux bactéries à Gram positif (D'après Zabransky 2002).

Organisme	CMI (µg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i>	2 - 4
<i>Staphylococcus aureus</i> (sensible à la méticilline)	2 - 4
<i>Staphylococcus aureus</i> (résistant à la méticilline)	2 - 4
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (sensible à la méticilline)	2 - 4
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (résistant à la méticilline)	2 - 4
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (sensible à la méticilline)	1
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (résistant à la méticilline)	1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1 - 2
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (sensible à la pénicilline)	1 - 2
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (intermédiaire/résistant à la pénicilline)	1 - 2
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (résistant à l'érythromycine)	1 - 2
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1 - 2
<i>Enterococcus faecalis</i>	2 - 4
<i>Enterococcus faecium</i>	2 - 4
<i>Clostridium spp.</i>	< 2
<i>Clostridium difficile</i>	1 - 2
<i>Clostridium perfringens</i>	1 - 4
<i>Peptostreptococcus spp.</i>	0.25 - 2

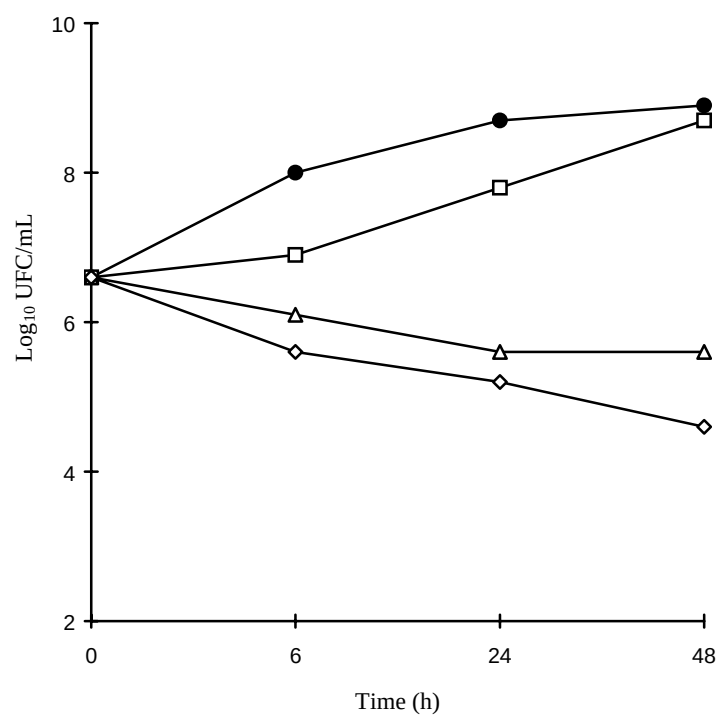


Figure 20. Activité *in vitro* du linézolide sur une souche de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline. (●) Témoin, (□) Linézolide à 1 fois la CMI, (△) Linézolide à 4 fois la CMI, (◇) Linézolide à 8 fois la CMI. Données personnelles.

III.4. DONNEES PHARMACOCINETIQUES

Les principales caractéristiques pharmacocinétiques du linézolide sont résumées dans les Tableaux IV (A et B). Possédant une demi-vie de quatre à cinq heures, la posologie actuellement recommandée en clinique est de 600 mg deux fois par jour pour le traitement des infections sévères. Avec ce dosage (IV), la concentration sérique maximale (à l'état d'équilibre) est de l'ordre de 15 µg/mL (pic atteint en 30 minutes environ) (Zyvoxid® (linézolide) : Résumé des Caractéristiques Produit (RCP)). La biodisponibilité de cette nouvelle molécule est de 100% chez l'homme (Gee et coll 2001). Ceci sous-entend que les concentrations sériques atteintes sont quasi-équivalentes que le linézolide soit administré par voie I.V. ou orale (Figure 21). Ainsi, aucun ajustement de dose n'est nécessaire pour passer d'un traitement par voie I.V. à un traitement per os, ce qui pourrait contribuer à réduire la durée d'hospitalisation des patients traités par cette molécule (Li et coll 2003).

Le linézolide possède une diffusion tissulaire importante : dans le liquide de revêtement épithélial pulmonaire, le ratio (par rapport à la concentration plasmatique) est supérieur à quatre, quatre heures après la dernière administration de linézolide (Conte et coll 2002). De même, 104% de la concentration plasmatique est retrouvée dans le liquide inflammatoire chez le volontaire sain 3 heures après la dernière administration (Gee et coll 2001). Enfin, environ 70% de la concentration plasmatique en linézolide est retrouvée dans le LCR non inflammatoire.

Le taux de fixation aux protéines est relativement faible (30%). L'élimination se fait par voie urinaire sous forme inchangée pour environ 90% de la dose. La présence d'une insuffisance rénale légère à modérée ne nécessite pas d'ajustement posologique. La métabolisation du linézolide intervient essentiellement par oxydation. Deux métabolites inactifs sont produits après oxydation du noyau morpholine : l'acide amino-éthoxyacétique et l'hydroxyéthyle de glycine. De plus, aucune métabolisation du linézolide

par le cytochrome P450 n'a été démontrée (Slatter et coll 2001, Zyvoxid® (linézolide) :
Résumé des Caractéristiques Produit (RCP)).

Tableau IVA. Paramètres pharmacocinétiques chez le volontaire sain après administration per os ou I.V. d'une dose unique ou de doses multiples (à l'état d'équilibre) de linézolide. (Zyvoxid® (linézolide) : Résumé des Caractéristiques Produit (RCP)).

PARAMETRES	LINEZOLIDE – comprimé de		LINEZOLIDE – perfusion I.V.	
	600 mg x 2/j		de 600 mg x 2/j	
	dose unique	doses multiples	dose unique	doses multiples
C _{max} (mg/L)	12.7 ± 3.9	21.2 ± 5.8	12.9 ± 1.6	15.1 ± 2.5
C _{min} (mg/L)	-	6.1 ± 2.9	-	3.7 ± 2.4
T _{max} (h)	1.3 ± 0.7	1.0 ± 0.6	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.03
AUC (µg.h/mL)	91.4 ± 39.3	138.0 ± 42.1	80.2 ± 33.3	89.7 ± 31.0
T _{1/2} (h)	4.3 ± 1.7	5.4 ± 2.1	5 – 7	5 – 7

C_{max} : concentration plasmatique maximale.

C_{min} : concentration plasmatique minimale.

T_{max} : temps pour atteindre la concentration plasmatique maximale.

AUC : aire sous la courbe.

T_{1/2} : demi-vie d'élimination.

Tableau IVB. Caractéristiques pharmacocinétiques du linézolide (d'après Zyvoxid®
(linézolide) : Résumé des Caractéristiques Produit (RCP)).

Caractéristique	Valeur
Biodisponibilité orale (%)	100
Liaison plasmatique aux protéines (%)	31
Volume de distribution (L)	40 - 50
Clairance	
Totale (mL/min)	100 - 200
Rénale (mL/min)	30 - 50
Non rénale (mL/min)	70 - 150

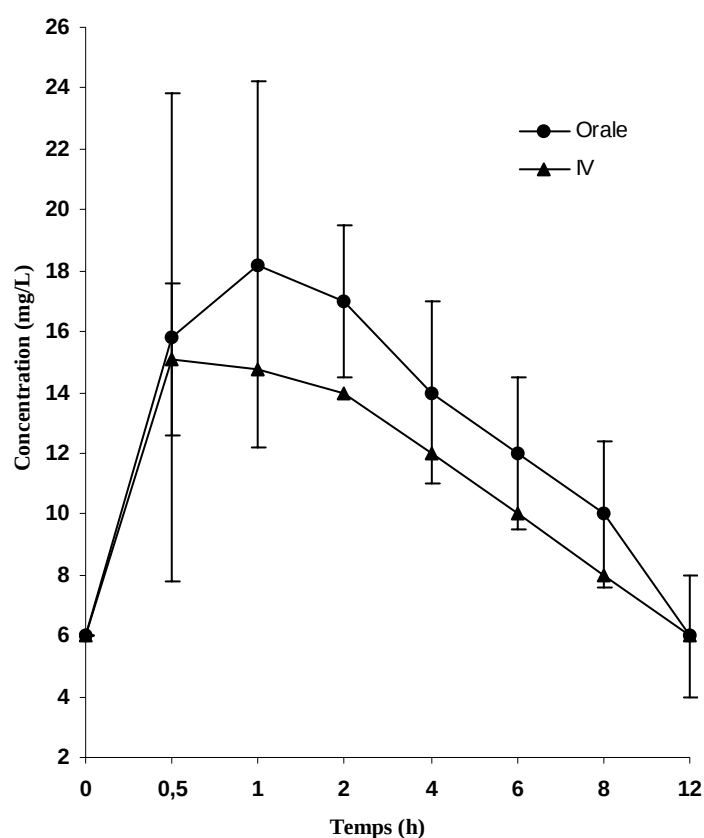


Figure 21. Concentrations sériques de linézolide à l'état d'équilibre après administrations répétées per os ou I.V. de 600 mg x 2/j chez le volontaire sain (n=16) (d'après Zyvoxid®
(linézolide) : Résumé des Caractéristiques Produit (RCP)).

III.5. INDICATIONS ET UTILISATION CLINIQUE DU LINEZOLIDE

III.5.1. INDICATIONS.

Les indications du linézolide chez l'adulte sont (pour le moment) peu nombreuses. Les données étant encore insuffisantes chez les patients de moins de 18 ans, un traitement par linézolide n'est pas recommandé. Un traitement par linézolide est indiqué lors des infections bactériennes suivantes documentées ou suspectées à bactéries à Gram positif :

- Pneumonies nosocomiales.
- Infections compliquées de la peau et des tissus mous.

En général, le linézolide est relativement bien toléré (Bouza et coll 2001). Cependant, des cas de thrombocytopénies (Attassi et coll 2002, Waldrep et coll 2002) et de myélosuppression (Green et coll 2001) ont été rapportés chez des patients traités par linézolide. Dans tous les cas, les différents paramètres hématologiques sont revenus à la normale après arrêt du traitement. Cette toxicité semble corrélée à la durée du traitement (au-delà de 10-14 jours de traitement). Néanmoins, une numération sanguine complète est recommandée (1 fois par semaine) chez les patients traités par linézolide, *a fortiori* pour les traitements d'une durée supérieure à 14 jours.

III.5.2. EXPERIENCE CLINIQUE.

III.5.2.1. DANS LE CADRE DE L'AMM.

Différents essais cliniques ont été menés pour étudier l'efficacité du linézolide dans les pneumopathies nosocomiales et dans les infections compliquées de la peau et des tissus mous.

Pour la première indication, une étude multicentrique randomisée contrôlée en double aveugle a étudié l'efficacité du linézolide en comparaison avec la vancomycine dans des pneumopathies nosocomiales acquises après 48 heures d'hospitalisation (Rubinstein et coll

2001). L'aztréonam était associé en cas de suspicion de la présence d'un bacille Gram négatif. Dans cette étude, le taux d'éradication bactérienne par germe et les effets indésirables ont été comparables entre les deux traitements.

Une étude multicentrique internationale (randomisée en double aveugle) a étudié l'efficacité et la tolérance du linézolide en comparaison avec l'oxacilline/dicloxacilline dans le traitement des infections compliquées de la peau et des tissus mous (Stevens et coll 2000). Comme dans l'étude précédente, l'aztréonam était associé en cas de suspicion de la présence d'un bacille Gram négatif. Les résultats obtenus montrent un taux de guérison clinique par germe chez les patients bactériologiquement évaluables et une tolérance comparable entre les deux bras thérapeutiques.

III.5.2.2. HORS-AMM.

Etant donné les limites de l'AMM, de nombreux cas dans la littérature relatent l'utilisation du linézolide dans des indications hors AMM. Ces utilisations se font le plus souvent dans un contexte particulier où le choix thérapeutique est extrêmement restreint : multirésistance de la bactérie responsable de l'infection, allergies à d'autres familles d'antibiotiques, échecs thérapeutiques...

Le linézolide a été utilisé plusieurs fois pour le traitement d'endocardites infectieuses à SARM ou à entérocoques. Si des échecs ont été rapportés (Ruiz et coll 2002, Tsiodras et coll 2001, Zimmer et coll 2003), plusieurs études rapportent le succès thérapeutique obtenu par le linézolide : Babcock *et al.* (Babcock et coll 2001) exposent le cas d'une endocardite à VRE traitée sans succès par du chloramphénicol et par l'association quinupristine-dalfopristine, mais ayant répondu favorablement à un traitement par linézolide (per os). De même, Andrade-Baiocchi *et al.* (Andrade-Baiocchi et coll 2003) ont été confrontés à une endocardite à *S. aureus* de sensibilité diminuée aux glycopeptides, qui ne répondait pas à de

fortes doses de vancomycine. Une réponse clinique favorable a été obtenue lors du début de l'utilisation du linézolide. Enfin pour les cas d'échecs thérapeutiques où le germe incriminé restait sensible au linézolide, il semble que des concentrations plasmatiques faibles puissent être responsables de la non-réponse au traitement par le linézolide. En effet, Sperber *et al.* rapportent le cas d'un patient traité pour une infection à SARM et ne répondant pas au traitement par linézolide (Sperber et coll 2003). Seule une augmentation de la posologie (900 mg IV toutes les 12 heures) a permis d'éradiquer le germe. La mesure des taux plasmatiques avant l'augmentation de la dose a permis de mettre en évidence une concentration plasmatique extrêmement faible en linézolide (Tableau V), ce qui explique l'échec observé avec la posologie classique (600 mg IV toutes les 12 heures).

	CONCENTRATIONS PLASMATIQUES (mg/L)		
	600 mg (per os)	600 mg IV	900 mg IV
PIC	1.73	3.15	9.14
VALLÉE	0.10	Trace	1.8

Tableau V. Faibles concentrations plasmatiques observées chez un patient traité par linézolide toutes les 12 heures (d'après Sperber et coll 2003).

Le linézolide a aussi été utilisé dans le traitement des infections ostéo-articulaires à SARM et VRE. Melzer *et al.* (Melzer et coll 2000) rapportent le succès d'un traitement par linézolide après échec d'autres antibiothérapies dans le cas d'un patient présentant une ostéomyélite et une septicémie persistante à SARM et à VRE. De même, une autre étude (Till et coll 2002)

démontre l'efficacité du linézolide dans le traitement d'une infection de prothèse de hanche associée à une ostéomyélite due à *Enterococcus faecium* résistant à la vancomycine.

APPORT DES ETUDES EXPERIMENTALES SUR L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DE NOUVELLES MOLECULES : CORRELATION *IN VITRO* – *IN VIVO*.

I. INTRODUCTION

Une substance antibiotique obéit à la définition suivante :

«Toute substance chimique produite par des micro-organismes ayant le pouvoir d'inhiber et même de détruire les bactéries et autres micro-organismes en solution diluée ».

De par sa définition, un antibiotique va avoir pour rôle principal de détruire et ceci, le plus rapidement possible, les bactéries présentes au site de l'infection. La caractérisation de son activité antibactérienne est donc un élément déterminant indispensable au bon usage de cette molécule. Deux aspects sont développés dans l'étude de l'activité d'un antibiotique :

- Les tests d'étude *in vitro* classiques utilisés en bactériologie vont principalement définir l'activité antibactérienne suivant des valeurs critiques qui identifient le spectre d'activité (antibiogramme) (Figure 22), les valeurs de Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et de Concentration Minimale Bactéricide (CMB)... Ces données, bien qu'indispensables, restent malgré tout limitées et ne permettent pas de prédire efficacement l'efficacité de l'antibiotique *in vivo*. En effet, ces valeurs et la simple catégorisation en sensible, intermédiaire ou résistant ne permettent pas de prédire l'activité *in vivo* avec toute la complexité de l'interaction hôte-bactérie. Pour pallier cette détermination statique de l'activité antibactérienne, une autre méthode (*in vitro*) intéressante est la technique des

vitesse de bactéricidie. Celle-ci présente l'avantage de pouvoir étudier l'évolution d'un inoculum bactérien au cours du temps et en fonction de différentes concentrations de l'antibiotique. Cependant, l'étude *in vitro* de l'activité d'un antibiotique avec ces différentes techniques reste limitée et ne constitue qu'une étape, indispensable mais insuffisante. En effet, le passage de l'*in vitro* à l'*in vivo* se révèle obligatoire pour valider une hypothèse ou continuer à explorer l'activité antibactérienne sur la base des données obtenues *in vitro*.

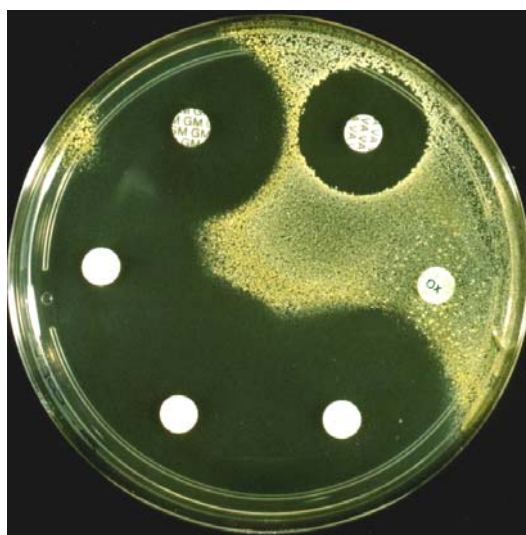


Figure 22. Antibiogramme d'une souche de *Staphylococcus aureus* résistant à l'oxacilline.

- Le modèle animal est bien souvent indispensable pour valider des résultats préliminaires *in vitro*. Les limites des techniques *in vitro* sont évidentes et, même si on tend à vouloir reproduire de plus en plus *in vitro* des conditions expérimentales comparables à l'évolution des concentrations *in vivo* (notamment pour des raisons éthiques), l'expérimentation animale reste encore nécessaire,

notamment dans les modèles ou on cherche à reproduire une situation physiopathologique.

II. TECHNIQUES D'ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE *IN VITRO*

II.1. L'ANTIBIOGRAMME

Le but de l'antibiogramme est de « prédire » l'efficacité clinique d'un antibiotique en classant la bactérie en sensible, intermédiaire ou résistante. Cependant, la corrélation entre la présence d'un mécanisme de résistance et le résultat clinique est extrêmement difficile à évaluer. En conséquence, un mécanisme de résistance doit être reconnu à la lecture de l'antibiogramme et l'interprétation reste indispensable. Cependant, cette technique simple reste limitée et peut ne pas détecter la présence d'un mécanisme de résistance particulier.

II.2. CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE (CMI)

Ce paramètre reproductible est largement utilisé et constitue la base de la détermination de l'activité antibactérienne d'une molécule. La CMI correspond à la plus faible concentration d'antibiotiques (exprimée en mg/L) pour laquelle il n'y a pas de croissance visible de la souche bactérienne étudiée (en conditions de culture standardisées) (Amsterdam 1996). Celle-ci peut-être déterminée en milieu liquide (bouillon de Mueller-Hinton) ou en milieu solide (gélose).

II.3. CINETIQUES DE BACTERICIDIE

Le principe est simple : un inoculum bactérien est mis en contact avec une concentration d'antibiotique donnée et un dénombrement bactérien est réalisé après différents temps de contact. Cette méthode permet d'approcher la dynamique de l'effet bactéricide en déterminant à différents temps la bactéricidie pour des concentrations d'antibiotique différentes (le plus souvent des valeurs multiples de la CMI).

III. ASSOCIATIONS D'ANTIBIOTIQUES.

III.1. INDICATIONS.

Les associations d'antibiotiques sont généralement utilisées en situation probabiliste dans le but d'élargir le spectre antibactérien (cas d'urgence ou traitement d'une infection mixte), de prévenir l'apparition de mutants-résistants ou encore d'obtenir une synergie. Dans ce dernier cas, il s'agit alors d'obtenir un effet plus intense grâce à l'association de deux antibiotiques pouvant renforcer mutuellement leur action et donner un effet supérieur à celui d'une dose majorée de chacun d'eux. C'est le but recherché dans les endocardites bactériennes où les succès sont significativement plus nombreux et les rechutes plus rares après traitement par une association (notamment au cours des endocardites à entérocoques, streptocoques et staphylocoques) (Soussy 1990).

III.2. INDIFFERENCE, SYNERGIE ET ANTAGONISME.

III.2.1. DEFINITIONS.

Brièvement, l'interaction de deux antibiotiques peut produire quatre effets principaux :

- **INDIFFERENCE** : l'activité d'un antibiotique n'a aucune influence sur l'activité de l'autre.
- **ADDITION** : l'effet de l'association est égal à la somme des effets produits par chacun des antibiotiques pris isolément.
- **SYNERGIE** : l'effet de l'association est supérieur à la somme des effets produits par chacun des antibiotiques pris isolément.
- **ANTAGONISME** : l'effet de l'association est inférieur à la somme des effets produits par chacun des antibiotiques pris isolément.

On peut également rajouter à cette liste la notion de DOMINANCE ou l'un des deux antibiotiques impose sa vitesse de bactéricidie à l'autre (Goessens et coll 1984, Drugeon et coll 1987).

III.2.2. SYNERGIES OU ANTAGONISMES DEJA DECRITS ENTRE MOLECULES OU CLASSES D'ANTIBIOTIQUES.

III.2.2.1. ASSOCIATIONS DEMONTRANT UNE SYNERGIE.

Les mécanismes expliquant la synergie entre deux antibiotiques ne sont pas toujours bien connus. De nombreuses études ont été réalisées afin de mettre à jour une synergie entre de très nombreuses molécules provenant de familles différentes. Parmi les antibiotiques utilisés en clinique, certains sont déjà des associations présentant un caractère synergique : l'association triméthoprim-sulfaméthoxazole, quinupristine-dalfopristine (association d'une streptogramine A et B)... Un certain nombre d'associations entre certaines classes définies sont le plus souvent synergiques. C'est le cas des β -lactamines + aminosides, des glycopeptides + aminosides, des β -lactamines + β -lactamines, des β -lactamines + inhibiteurs de β -lactamases, β -lactamines + fluoroquinolones... Toutes ces associations n'opèrent pas par le même mécanisme mais l'utilisation d'un agent agissant sur la paroi est souvent retrouvé (aminosides + β -lactamines ou glycopeptides) (Le et coll 2003).

III.2.2.1. ASSOCIATIONS DEMONTRANT UN ANTAGONISME.

De même que précédemment, certaines associations sont réputées antagonistes. C'est le cas des β -lactamines + chloramphénicol ou tétracyclines, rifampicine + chloramphénicol, macrolides + chloramphénicol, aminosides + chloramphénicol ou tétracyclines... Schématiquement, on peut donc dégager quelques règles où l'association est le plus souvent antagoniste :

- Association d'une β -lactamine et d'un antibiotique bactériostatique.
- Association d'inhibiteurs protéiques agissant au niveau de la sous-unité ribosomale 50S.
- Association d'un aminoside et d'un agent bactériostatique.
- Association entre elles de certaines β -lactamines.

III.2.3. MECANISME D'ACTION.

On peut considérer qu'il existe quatre mécanismes reconnus de la synergie entre deux antibiotiques (Eliopoulos et coll 1996) :

1. L'inhibition d'une même voie biochimique (triméthoprime-sulfaméthoxazole).
2. L'inhibition d'une (ou plusieurs) enzyme(s) bactérienne(s) par une molécule permettant à l'autre antibiotique d'être actif (acide clavulanique et β -lactamines).
3. L'association d'agents agissant sur la paroi bactérienne.
4. L'utilisation d'antibiotiques agissant sur la paroi afin de favoriser la pénétration d'un autre antibiotique (β -lactamines + aminosides).

Néanmoins, certaines associations synergiques ne rentrent pas dans ce cadre et le mécanisme d'action reste encore imparfaitement connu.

IV. LIMITES DES TECHNIQUES D'ETUDE *IN VITRO*

Ces études font appel à des techniques simples. Les résultats obtenus sont reproductibles et permettent de caractériser l'activité antibactérienne d'un antibiotique. Ces données fondamentales vont permettre au clinicien d'orienter son choix thérapeutique. Cependant, il apparaît évident que le succès d'un traitement antibiotique ne peut dépendre de quelques valeurs déterminées *in vitro*. En effet, l'action antimicrobienne va dépendre largement des mécanismes de défense de l'hôte, des relations pharmacocinétiques et pharmacodynamiques

(non prises en compte (ou peu) dans les études *in vitro*), de la sévérité du contexte clinique, du site de l'infection, ou encore de l'état de la bactérie au sein du site infectieux (phase de croissance, phase stationnaire, statut métabolique particulier...). De même, la CMI ne fournit des informations que sur une seule concentration de l'antibiotique et « en point final » (24 heures). Ce paramètre ne renseigne ni sur l'effet de concentrations d'antibiotiques qui varient au cours du temps, ni sur d'éventuels effets microbiologiques qui peuvent persister après l'exposition à la molécule (effet post-antibiotique). En conséquence, même si les données *in vitro* fournissent des informations importantes, le modèle animal va fournir le lien entre les études *in vitro* et les premiers résultats cliniques.

V. L'EXPERIMENTATION ANIMALE : DU *IN VITRO* A L'*IN VIVO*.

V.1. ETHIQUE.

Les modèles animaux constituent un outil précieux pour pouvoir répondre à des hypothèses invérifiables en clinique en raison de la multiplicité des variables mises en jeu et de problèmes éthiques, notamment lors du traitement d'infections sévères où la survie du patient est menacée. Dans le domaine de la thérapeutique, les interrogations sont nombreuses et l'expérimentation animale reste souvent la seule alternative pour pouvoir répondre à ces questions. Les données *in vitro*, bien qu'indispensables, restent trop éloignées de l'homme pour pouvoir être suffisantes. Néanmoins, une expérimentation animale ne peut être menée sans une réflexion préalable intense ayant abordé des questions simples :

- Est-il possible d'éviter le recours à l'expérimentation animale par l'utilisation d'une méthode substitutive ?
- Comment définir au mieux le protocole expérimental afin d'optimiser les conditions d'utilisation des animaux ?
- Comment réduire au minimum nécessaire le nombre d'animaux utilisés ?

Il existe de plus en plus de « comités d'éthique », dont le rôle est de vérifier que le compromis, défini par les « 3R » (**R**emplacer, **R**éduire, **R**affiner (Russell et Burth, 1959)) et les bonnes pratiques, sont effectivement respectés.

V.2. DE L'*IN VITRO* A L'*IN VIVO*.

Un certain nombre d'études ne peuvent être réalisées *in vitro*. En effet, les résultats d'expérimentation animale vont pouvoir fournir des données intéressantes sur des aspects de l'activité antibactérienne non mis en évidence *in vitro*. Par exemple :

- Etudes de toxicité.
- Pré-requis pour l'étude de nouvelles indications ou pour le développement d'essais cliniques.
- Etudes pharmacocinétiques.
- Etudes pharmacodynamiques.

Le développement d'une nouvelle molécule est un bon exemple de la chronologie et de la nécessité de ces différentes études. Une substance chimique destinée à devenir un antibiotique va devoir franchir des étapes successives avant d'obtenir son AMM, ce qui peut représenter une période de 10 à 15 ans. Indispensable à l'évaluation d'un nouvel antibiotique, les données microbiologiques (*in vitro*) vont permettre de juger de la pertinence des indications revendiquées en fonction de l'activité antibactérienne de la molécule (CMI, spectre d'activité antibactérien, sélection de mutants-résistants *in vitro*...). La seconde étape, obligatoire sur l'animal, va être déterminante car elle va conditionner le développement chez l'homme. Elle a deux buts principaux :

- Préciser le profil et les propriétés pharmacodynamiques du nouveau produit.
- Déterminer la toxicité aiguë et chronique.

Enfin, si les résultats sont probants, le développement pourra avoir lieu également en plusieurs étapes (phase I, II, III et IV (post-AMM)).

Ainsi, ces modèles animaux vont constituer un apport important dans l'évaluation de la toxicité et des aspects pharmacodynamiques de l'antibiotique. Deux types de modèles animaux existent :

- Modèles non discriminants : utilisés essentiellement dans la phase de pré-sélection, ces modèles vont permettre de déterminer l'activité *in vivo* par voie systémique et par voie orale.
- Modèles discriminants - Ces modèles vont servir de pré-requis pour les études cliniques et vont tendre à reproduire une infection spécifique : méningite, pneumopathie, endocardite, pyélonéphrite ou ostéomyélite expérimentales.

Ces modèles ont également pour rôle de confirmer l'intérêt de la molécule en cours d'évaluation. En effet, dans le cas contraire, le développement serait immédiatement arrêté.

V.3. ETUDES PHARMACOCINETIQUES ET PHARMACODYNAMIQUES – OPTIMISATION DE L'EFFICACITE THERAPEUTIQUE.

V.3.1. ASPECTS PHARMACOCINETIQUES ET PHARMACODYNAMIQUES :

CONCENTRATION- ET TEMPS-DEPENDANCE.

Les aminosides, les fluoroquinolones et les kétolides démontrent une activité antibactérienne concentration-dépendante alors que des concentrations plus élevées n'augmentent pas l'activité des β -lactamines, des macrolides ou des oxazolidinones (Andes et coll 1998, Craig 1997, Craig 2001, Craig 1996). La bactéricidie de ces dernières molécules est augmentée par un temps d'exposition plus long à l'antibiotique, ce qui les classe dans la catégorie des

antibiotiques temps-dépendant (ou non concentration-dépendant). Trois comportements différents d'un antibiotique ont été observés (Andes et coll 2002) :

- Le premier est caractérisé par une activité concentration-dépendante et par des effets microbiologiques prolongés. Des concentrations plus élevées augmentent l'intensité de la bactéricidie. L'optimisation de ce type de molécules passe par l'administration de fortes doses et l'intervalle entre chaque dose peut être allongé en raison d'un effet post-antibiotique important. C'est le cas des aminosides, des fluoroquinolones, des kétolides et de la daptomycine.
- Le second est caractérisé par une activité temps-dépendante et un effet post-antibiotique faible à modéré. Des concentrations plus élevées n'augmentent pas l'activité antibactérienne et l'optimisation s'effectue par le prolongement de la durée d'exposition à l'antibiotique. En conséquence, le temps passé au-dessus de la CMI ($T > CMI$) est le paramètre PK-PD le mieux corrélé à l'efficacité thérapeutique. C'est le cas des β -lactamines et des macrolides notamment.
- Enfin, la dernière classe comprend les molécules présentant un caractère temps-dépendant mais avec un effet post-antibiotique important. Même si des concentrations plus élevées n'augmentent pas la bactéricidie, elles sont responsables de l'inhibition prolongée de la recroissance bactérienne. Le paramètre AUC/CMI est alors le plus prédictif de l'efficacité du traitement. C'est le cas de l'azithromycine, des tétracyclines et de la clindamycine.

V.3.2. OPTIMISATION DE L'EFFICACITE THERAPEUTIQUE : CAS DU LINEZOLIDE.

Le linézolide, comme toute nouvelle molécule et bien qu'ayant obtenu son AMM, est au tout début de son histoire clinique. De nombreux aspects de son activité antibactérienne restent

encore à étudier. En effet, même si l'obtention de l'AMM est une démarche longue et délicate, celle-ci ne permet pas de répondre à toutes les questions. Le linézolide a reçu son AMM pour une administration en perfusion discontinue au rythme de deux injections de 600 mg par jour. Cependant, au regard des caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de cette molécule, on peut se demander si le rythme d'administration ou le mode d'administration du linézolide est optimal pour son efficacité antibactérienne. Le but des études animales va donc être de pouvoir répondre à toutes ces questions en étudiant les relations pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. Les données *in vitro* concernant le linézolide mettent en évidence son activité bactériostatique (ou lentement bactéricide) et le caractère temps-dépendant de son activité (Zurenko et coll 1996, Rybak et coll 1998). Pour d'autres molécules temps-dépendantes, des travaux ont été réalisés visant à étudier l'impact de la perfusion continue par rapport à la perfusion discontinue classique. En effet, pour ce type de molécules, le temps passé au-dessus de la CMI ($T > CMI$) semble être le paramètre le plus prédictif de l'efficacité *in vivo* (Carbon 1990). Le mode d'administration des β -lactamines (molécules temps-dépendantes) a été particulièrement étudié. Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que pour une dose identique, la perfusion continue de ceftazidime augmente le $T > CMI$ par rapport à la perfusion discontinue (David et coll 1989, Nicolau et coll 1996, Robaux et coll 2001). L'activité maximale en perfusion continue est observée pour des concentrations sériques à l'état d'équilibre correspondant à un multiple de la CMI. Pour la ceftazidime, il est maintenant reconnu que l'activité maximale est atteinte avec des concentrations sériques de l'ordre de 4 à 8 fois la CMI (Cappelletty et coll 1995, Xiong et coll 1995).

Pour les glycopeptides, la dynamique de bactéricidie apparaît plutôt temps-dépendante. Dans un modèle de péritonite expérimentale à staphylocoques et pneumocoques, Knudsen *et al.* montrent que le paramètre $T > CMI$ est prédictif de l'efficacité de ces molécules (Knudsen et

coll 1997, Knudsen et coll 2000). De même, Peetermans *et al.* arrivent à la même conclusion (pertinence du $T > CMI$) dans un modèle d'infection à staphylocoques chez la souris neutropénique (Peetermans et coll 1990).

Dans ce contexte, la perfusion continue pour l'administration du linézolide s'avère être une alternative pouvant éventuellement renforcer son activité antibactérienne en améliorant les aspects PK-PD. Dans un premier temps, seule l'expérimentation animale peut permettre de répondre à cette question. En effet, dans le cadre des études sur les infections sévères, les essais cliniques sont extrêmement difficiles à mettre en place et doivent reposer sur des données expérimentales reproductibles et validées.

V.3.3. MODE OPTIMAL D'ADMINISTRATION DU LINEZOLIDE : PERFUSION CONTINUE OU PERFUSION DISCONTINUE ?

L'augmentation des concentrations sériques (C_{max} et C_{min}) de linézolide au cours du temps suggère un phénomène d'accumulation important après l'injection de la première dose de la molécule (Jacqueline et coll 2002). Cette accumulation a été observée quel que soit le mode d'administration. Il ne s'agit pas d'un artefact ou d'un problème expérimental dû, par exemple, à une mauvaise simulation de la pharmacocinétique chez l'animal. Ce phénomène a été également observé dans d'autres modèles expérimentaux (Dailey et coll 2001, Oramas-Shirey et coll 2001) et en clinique (Gopal et coll 2001, Gee et coll 2001). De nombreuses études animales ont montré que l'efficacité des β -lactamines et des macrolides n'était pas corrélée avec le paramètre AUC/CMI (comme pour les aminosides et les fluoroquinolones) (Hyatt et coll 1995), mais par le pourcentage de temps où les concentrations sériques restent au-dessus de la CMI. Dans un modèle d'infection chez la souris neutropénique (Andes et coll 1998b), Andes *et al.* ont démontré une corrélation entre l'activité antibactérienne et le maintien des concentrations sériques en linézolide au-dessus de la CMI pour environ 40% du

temps entre deux injections. Il est évident que les paramètres requis pour obtenir une efficacité dans le modèle d'endocardite sont beaucoup plus contraignants. Notre étude montre clairement la supériorité de la perfusion continue en maintenant des concentrations sériques au-dessus de la CMI pour la totalité de l'intervalle entre deux perfusions, et ceci dès le premier jour de traitement. En effet, la perfusion continue permet d'obtenir une activité bactéricide dans le modèle d'endocardite à SARM alors que la perfusion discontinue et les tests *in vitro* ne prédisent qu'une activité bactériostatique du linézolide.

V.3.4. PERFUSION CONTINUE : QUELLES LIMITES ?

Même si la perfusion continue a montré sa supériorité dans notre modèle, certains aspects risquent de freiner ce type d'administration pour le linézolide.

- (i) Tout d'abord, cette molécule est administrable par voie I.V. ou per os et sans ajustement de la posologie. Ce switch possible d'une voie d'administration à l'autre présente un énorme avantage pour la molécule en permettant de réduire la durée d'hospitalisation (Siegel 2003, Willke et coll 2002). La perfusion continue pourrait donc constituer un frein à ce relais possible per os, mais pourrait néanmoins être utilisée, non pas systématiquement, mais dans le cas d'une infection sévère particulièrement difficile à traiter et nécessitant une activité optimale du linézolide. Néanmoins, une fois la phase initiale (la plus critique) passée, il semble possible d'imaginer un relais oral en fractionnant les doses ou par l'utilisation d'une forme à libération prolongée (visant à reproduire une sorte de « perfusion continue » par voie orale).
- (ii) L'AMM pour cette molécule a été délivrée pour une administration de 600 mg toutes les douze heures. L'administration du linézolide en perfusion continue

constituerait une nouvelle indication et nécessiterait donc la modification de l'AMM.

- (iii) En perfusion continue, le phénomène d'accumulation a pour conséquence l'obtention de concentrations sériques à l'état d'équilibre de l'ordre de 30 mg/L après 5 jours de traitement, ce qui représente environ une concentration de 30 à 50% plus élevé que la $C_{\max}$ obtenu en perfusion discontinue. Des cas de thrombocytopénies (Attassi et coll 2002, Waldrep et coll 2002) et de myélosuppression (Green et coll 2001) ont été rapportés chez des patients traités par linézolide. Même si cette toxicité semble corrélée à la durée du traitement (au-delà de 10-14 jours de traitement), il n'est pas exclu que des concentrations sériques élevées puissent avoir un impact sur la toxicité hématologique du linézolide.

Des études pharmacocinétiques et toxicologiques sont donc souhaitables pour éviter tout risque d'augmentation de la toxicité hématologique du linézolide. La perfusion continue pourrait se révéler être un moyen très efficace d'augmenter l'activité antibactérienne du linézolide, molécule temps-dépendante, dans des infections sévères où l'intensité de la bactéricidie constitue probablement un facteur pronostic important.

SYNTHESE

Le linézolide et la quinupristine-dalfopristine sont des nouveaux antibiotiques possédant une activité sur la plupart des bactéries à Gram positif posant de nombreux problèmes thérapeutiques. Ayant obtenu leurs AMM, ces molécules sont au tout début de leur utilisation clinique. Bien que de nombreuses études aient étudié l'efficacité de ces agents, autant *in vitro* que lors d'essais cliniques, les informations sur ces antibiotiques restent fragmentaires et le clinicien est souvent confronté à des données restreintes. En effet, beaucoup de travaux ont été publiés sur l'activité *in vitro* du linézolide et de la quinupristine-dalfopristine, mais en se contentant le plus souvent de mesures de CMI et peu d'autres méthodes d'évaluation de leurs activités *in vitro* ont été utilisées (vitesses de bactéricidie...). De plus, l'étude de l'activité du linézolide en association avec d'autres molécules antibactériennes que ce soit *in vitro* ou *in vivo* fait cruellement défaut. Enfin, l'aspect pharmacocinétique et pharmacodynamique de l'activité du linézolide est relativement peu développé avec un manque d'information sur le mode optimal d'administration ou sur les paramètres pharmacodynamiques influençant son activité antibactérienne.

Ainsi, la recherche expérimentale *in vitro* et *in vivo* (modèles animaux) permettrait donc de répondre efficacement aux divers aspects méconnus de l'activité de ces nouvelles molécules antibactériennes et de tester des hypothèses permettant de compléter utilement les données *in vitro* et cliniques déjà existantes.

OBJECTIFS DES TRAVAUX

L'émergence et la progression des bactéries multirésistantes à Gram-positif, notamment aux glycopeptides, constituent un phénomène préoccupant. Face à ce problème, la recherche pharmaceutique s'est investie dans la maîtrise des infections à cocci à Gram-positif en développant de nouvelles molécules. Le linézolide et la quinupristine-dalfopristine sont actuellement disponibles sur le marché français. Leur spectre d'action comprend essentiellement les cocci à Gram-positif et notamment deux bactéries souvent impliquées dans la survenue d'infections nosocomiales, les staphylocoques et les entérocoques. Bien qu'ayant obtenu l'AMM, les indications cliniques de ces molécules restent limitées et la tentation est grande pour le clinicien d'étendre l'utilisation de ces antibiotiques à des situations cliniques difficiles où la survie du patient est compromise, mais en dehors des indications initiales du produit (hors-AMM).

La recherche animale expérimentale s'avère précieuse pour étudier l'activité de l'agent antibactérien dans des conditions aussi proches que possible de la situation clinique. Ces études permettent de répondre à de nombreuses questions soulevées par le début de l'utilisation du produit en clinique, les études déjà réalisées pour l'obtention de l'AMM restant souvent limitées.

Dans le premier travail, l'objectif a été d'évaluer l'activité *in vivo* du linézolide dans un modèle d'endocardite expérimentale à *S. aureus* résistant à la méticilline. Les résultats obtenus ont été comparés à la molécule de référence pour le traitement des infections à SARM, la vancomycine. Le linézolide a été administré en perfusion discontinue biquotidienne en simulant la pharmacocinétique humaine afin de se rapprocher des conditions cliniques. Le but de cette première partie était donc d'étudier l'activité *in vivo* du

linézolide sur trois souches de SARM dans un modèle d'infection sévère. Face à l'activité homogène mais somme toute modérée du linézolide en perfusion discontinue ainsi qu'aux caractéristiques PK/PD de la molécule, l'administration en perfusion continue à débit constant a ensuite été évaluée sur ces trois même souches afin de voir si le mode d'administration pouvait avoir un impact sur l'activité *in vivo* du linézolide en modifiant les paramètres PK/PD.

Suite au premier travail, il semblait souhaitable d'associer au linézolide une autre molécule afin d'augmenter la vitesse de la bactéricidie *in vivo* et afin d'éviter l'apparition de mutants-résistants au linézolide et donc de protéger l'avenir de cette molécule (et d'une nouvelle famille d'antibiotiques). L'objectif a donc été de tester l'activité du linézolide en association avec trois molécules possédant des mécanismes d'action différents, en utilisant la méthode des vitesses de bactéricidie. Les antibiotiques retenus étaient la gentamicine, la vancomycine et la rifampicine.

La troisième étude a eu pour but de tester l'activité *in vitro* et *in vivo* de la quinupristine-dalfopristine en cherchant à évaluer l'impact de la présence ou de l'absence du gène de résistance *ermA* sur l'activité *in vivo* de la quinupristine-dalfopristine, seule ou en association avec la gentamicine.

Enfin, il n'y a pas toujours de corrélation démontrée entre la synergie ou l'antagonisme mis en évidence *in vitro*, et le résultat *in vivo* de l'association de deux antibiotiques. Dans le passé, des exemples tristement célèbres sont venus rappeler la nécessité d'études expérimentales préalables à la validation de l'utilisation de certains antibiotiques en association (Lepper et coll 1951). Face à l'antagonisme observé *in vitro* lors de l'association linézolide plus gentamicine, le but de cette étude a donc été de confirmer ou d'infirmer cet antagonisme en étudiant l'activité *in vivo* de l'association et en simulant la pharmacocinétique humaine des deux molécules chez l'animal.

ARTICLE I

Etude de l'Activité *In Vitro* et *In Vivo* du Linézolide dans le
Modèle d'Endocardite Expérimentale du Lapin sur Trois
Souches de *Staphylococcus aureus* Résistants à la Méricilline.

Publication : Jacqueline *et al.*, Antimicrob. Agents Chemother., 2002, **46**(12):3706-11.

1. PRESENTATION DU TRAVAIL.

Ce travail était centré sur la détermination de l'activité *in vivo* du linézolide sur des souches de SARM. Si quelques études *in vivo* avaient déjà été réalisées (essentiellement études pré-AMM), aucune n'avait été effectuée sur un modèle d'infection sévère discriminant. L'existence d'une activité bactériostatique ou bactéricide *in vitro* ne se traduit pas toujours par une efficacité *in vivo*. Ainsi cette étude devait pouvoir répondre à un certain nombre de questions :

- L'activité *in vitro* du linézolide est considérée comme bactériostatique sur les souches de SARM. Pour notre travail, nous avons sélectionné trois souches présentant des niveaux différents d'expression phénotypique de la résistance à la méticilline (classe II, III et IV). L'activité bactériostatique du linézolide était-elle confirmée (*in vitro*) sur ces souches et était-elle indifférente du niveau de résistance à la méticilline ?
- Bien qu'actif *in vitro* sur *S. aureus*, le linézolide possède-t-il une activité antibactérienne *in vivo* dans un modèle d'infection sévère particulièrement exigeant pour la molécule ? Cette activité a-t-elle une signification thérapeutique ?
- Cette activité était-elle homogène sur les trois souches de SARM étudiées ?
- Comment se comportait le linézolide par rapport à la molécule de référence pour le traitement des infections sévères à SARM ?
- Le mode d'administration choisi était-il le plus adapté aux caractéristiques de l'antibiotique ?

2. CHOIX DU MODELE.

Le modèle d'endocardite expérimentale du lapin est un modèle d'infection sévère, reproductible, discriminant et permettant une utilisation aisée de la voie intraveineuse pour l'administration des antibiotiques. Il est particulièrement adapté à l'étude des aspects pharmacocinétiques et pharmacodynamiques et à l'optimisation de l'efficacité thérapeutique. L'utilisation de ce modèle était donc pertinente pour évaluer l'activité *in vivo* du linézolide dans un modèle d'infection sévère à SARM permettant une extrapolation des résultats à l'homme dans des situations d'infections sévères, la simulation chez l'animal de la pharmacocinétique humaine de la molécule renforçant encore la pertinence du modèle.

3. CHOIX DES SOUCHES BACTERIENNES.

Le spectre d'activité du linézolide comprend essentiellement les cocci à Gram positif. Parmi les espèces concernées, les staphylocoques et les entérocoques occupent une place prépondérante à l'hôpital de par leur multirésistance et leur incidence dans les infections nosocomiales. De par la complexité du traitement des infections à SARM à l'hôpital (multirésistance et apparition de la résistance aux glycopeptides), l'évaluation de l'activité *in vivo* du linézolide a été réalisée sur des souches de SARM. La résistance à la méticilline peut-être de différents niveaux et être hétérogène ou homogène. Ces différences peuvent influencer la réponse à certains traitements antibiotiques (Drugeon et coll 1994). En conséquence, nous avons sélectionné trois souches de SARM présentant des niveaux différents d'expression phénotypique de la résistance à la méticilline afin de déterminer si celles-ci pouvaient avoir une influence sur l'activité *in vitro* et *in vivo* du linézolide.

4. CHOIX DE LA MOLECULE COMPARATIVE

Les glycopeptides (vancomycine et teicoplanine) sont restés pendant longtemps les seules molécules uniformément actives contre les souches de SARM. Bien que des souches de sensibilité diminuée soient apparues, les glycopeptides (et plus particulièrement la vancomycine) restent le traitement de référence des infections sévères à SARM. Dans ce contexte, le choix de la molécule comparative était évident et s'est porté sur la vancomycine.

5. MODE D'ADMINISTRATION DES ANTIBIOTIQUES.

La voie IV a été utilisée, aussi bien pour le linézolide que pour la vancomycine. La voie IV est bien entendue indispensable pour la simulation des pharmacocinétiques humaines chez l'animal, permettant l'ajustement en temps réel des concentrations sériques, grâce à l'asservissement des seringues électriques, dont la vitesse est programmée par informatique.

6. MISE AU POINT DE LA SIMULATION DE LA PHARMACOCINETIQUE HUMAINE DU LINEZOLIDE CHEZ L'ANIMAL.

Afin de déterminer les paramètres pharmacocinétiques spontanés du linézolide chez le lapin, les animaux ont tout d'abord reçu une injection unique de 10 mg/kg (correspondant à une dose de 600 mg chez l'homme). La molécule a été administrée par voie IV via la veine marginale externe de l'oreille. Des prélèvements sanguins ont été prélevés à différents temps (0, 2, 5, 10, 15 et 30 minutes et 1, 2, 4, 6 et 8 heures après le début de la perfusion) via un cathéter situé au niveau de l'artère de l'oreille controlatérale. Après centrifugation à 3000g pendant 10 minutes, le sérum a été recueilli et congelé immédiatement à -80°C pour dosages ultérieurs. Cette première étape a permis de mettre en évidence la demi-vie ($T_{1/2}$) extrêmement courte du linézolide chez le lapin et donc de confirmer la nécessité de la simulation de la pharmacocinétique humaine de la molécule pour pouvoir extrapoler à

l'homme les résultats obtenus (Figure 23). En effet, il apparaît que la demi-vie spontanée chez le lapin est de l'ordre de 30 minutes alors qu'elle est de plusieurs heures chez l'homme. En comparant les résultats obtenus avec les données pharmacocinétiques humaines, il a ensuite été possible d'établir un modèle de simulation monocompartimental générant chez l'animal un profil de concentrations plasmatiques similaire à celui observé chez l'homme après une administration de 600 mg de linézolide toutes les 12 heures. Les animaux recevaient donc via la veine marginale de l'oreille une perfusion à débit variable, contrôlée à tout moment par l'ordinateur selon les paramètres précédemment modélisés (Bugnon et coll 1998). Pour effectuer cette simulation, il a été nécessaire d'infuser aux animaux une dose totale de 70 mg/kg/12h afin de mimer la pharmacocinétique humaine après administration d'une dose de 10 mg/kg. Cette dose plus importante correspond donc à un rapport des clairances de l'ordre de 7 entre le lapin et l'homme. Afin de valider cette simulation, les concentrations en linézolide ont été déterminées chez 5 lapins après simulation lors de la première injection et au bout de 5 jours de traitement. Les résultats obtenus (Figure 24) se sont avérés conformes aux objectifs humains qui étaient visés et montrent un effet d'accumulation sérique important du linézolide entre la première injection et au dernier jour de traitement. Il est important de noter que cette accumulation a été également observée dans un travail de Dailey *et al.* (Dailey et coll 2001) dans le même modèle mais également lors de l'utilisation clinique du linézolide (Gopal Rao et coll 2001, Gee et coll 2001).

Ce phénomène d'accumulation a également été observé dans notre étude lors de l'administration du linézolide en perfusion continue aux deux posologies étudiées (70 et 140 mg/kg chez l'animal) (Figure 25).

La réussite de la simulation de la pharmacocinétique humaine du linézolide chez l'animal nous a permis de contourner le biais expérimental infligé par les différences inter-espèces dans la disposition du médicament, et ainsi d'envisager l'optimisation des schémas

posologiques, avec des résultats plus facilement extrapolables au traitement des infections sévères chez l'homme.

7. PRINCIPAUX RESULTATS.

Bien que démontrant une activité significative sur les trois souches de SARM étudiées, le linézolide en perfusion discontinue n'a montré qu'une activité modérée au bout d'un traitement de 5 jours ($<3\log_{10}$ UFC/g végétation). Sur la base des caractéristiques PK-PD de la molécule (principalement temps-dépendante), la perfusion continue a été étudiée dans le but d'obtenir un temps passé au-dessus de la CMI de l'ordre de 100%. Bien que non bactéricide *in vitro*, le linézolide administré en perfusion continue a démontré une activité bactéricide dans ce modèle expérimental sur les trois souches de SARM ($>4\log_{10}$ UFC/g végétation) et significativement supérieure à l'administration en perfusion discontinue (2 fois par jour). L'utilisation de doses plus importantes de linézolide (x2) en perfusion continue a permis d'obtenir une activité bactéricide après seulement 3 jours de traitement et une meilleure efficacité au bout de 5 jours pour deux des trois souches testées. Enfin, aucun mutant résistant au linézolide n'a pu être mis en évidence dans les végétations après 3 et 5 jours de traitement quelle que soit la dose utilisée.

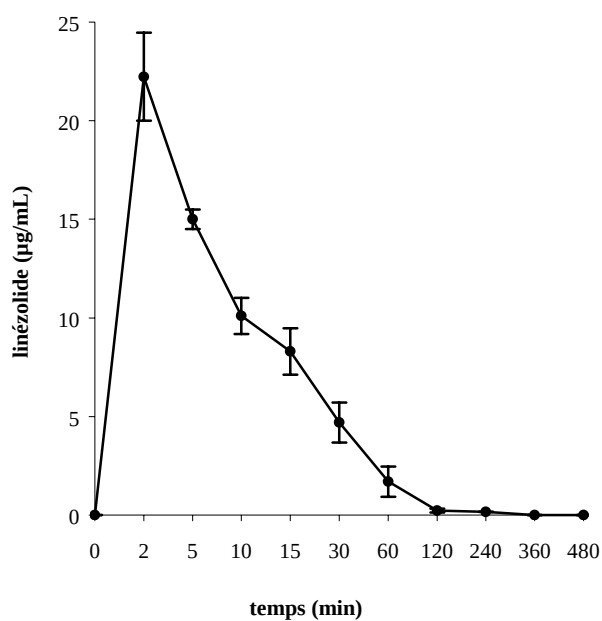


Figure 23. Cinétique spontanée du linézolide chez le lapin après injection IV d'une dose de 10 mg/kg.

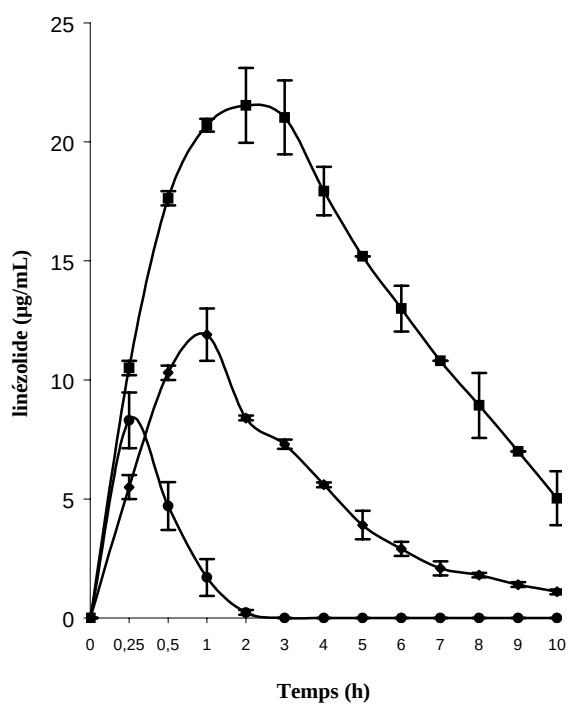
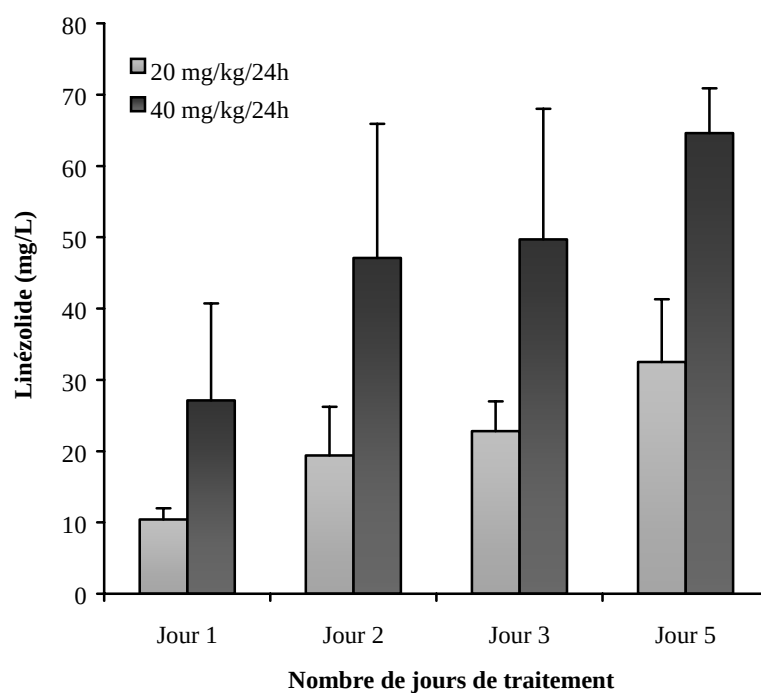


Figure 24. Cinétiques comparées du linézolide chez le lapin avec ou sans simulation. (●) : cinétique spontanée après injection d'une dose de 10 mg/kg ; Simulation de la pharmacocinétique humaine (10 mg/kg) : (◆) injection unique (■) administrations répétées (cinétiques réalisées au 5^{ème} jour de traitement).

Figure 25. Concentrations sériques de linézolide (mg/L) à l'état d'équilibre chez le lapin après administration continue à débit constant des posologies quotidiennes de 20 mg/kg et 40 mg/kg.



**In Vivo Efficacy of Continuous Infusion versus intermittent Dosing
of Linezolid Compared to Vancomycin in a Methicillin-Resistant
Staphylococcus aureus Rabbit Endocarditis Model**

Cédric Jacqueline, Eric Batard, Lucia Perez, David Boutoille, Antoine Hamel, Jocelyne Caillon, Marie-France Kergueris, Gilles Potel, and Denis Bugnon.

Laboratoire d'Antibiologie, (UPRES EA-1156)), Faculté de Médecine, 44035 Nantes, Cedex 01, France.

Running title: In vivo efficacy of linezolid continuous infusion

Corresponding author:

Dr Gilles Potel

Laboratoire d'Antibiologie, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes, Cedex 01, France

Tel/Fax: (33) 240-41-2854

e-mail: gpotel@sante.univ-nantes.fr

ABSTRACT

Linezolid is the first drug issued from oxazolidinones, a novel class of antimicrobial agents with potent activity on Gram-positive pathogens. A rabbit endocarditis model was used to compare the in vivo activity of different linezolid regimens mimicking intermittent dosing of 10 mg/kg every 12 h for 5 days or continuous (constant-rate) infusion of a daily dose of 20 mg/kg (for 5 days) or 40 mg/kg (for 3 and 5 days) versus intermittent dosing and continuous infusion of vancomycin (for 5 days). The in vivo activities of these regimens were tested on three strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. A human-like pharmacokinetic simulation was used for linezolid in order to improve the extrapolation of the results to human therapy. All linezolid regimens reduced *S. aureus* significantly in aortic valve vegetations as compared to control groups. Linezolid intermittent dosing had an in vivo bacteriostatic effect. Switching from intermittent dosing to continuous infusion (at the same dose) led to in vivo bactericidal activity, with a decrease of at least 3 log₁₀CFU/g of vegetation as compared to controls. After 5 days of treatment, continuous infusion of linezolid (corresponding to a daily dose of 40 mg/kg in humans) seemed to be at least as effective as vancomycin on the three strains. No resistant variant was isolated from vegetations during any of the treatments. These data suggest that continuous infusion of linezolid could be an appropriate alternative to glycopeptides for treatment of severe methicillin-resistant *S. aureus* infections.

INTRODUCTION

The increasing number of infections caused by resistant gram-positive bacteria has led to a search for new antimicrobial agents. Oxazolidinones, a novel class of synthetic antimicrobials, have shown potent activity on Gram-positive pathogens such as vancomycin-resistant enterococci, *Streptococcus pneumoniae*, coagulase-negative staphylococci and *S. aureus* (30). Linezolid, the first drug issued from this class, is active against Gram-positive bacteria and displays non-bactericidal, time-dependent activity in vitro on staphylococci (15, 23). Oxazolidinones are bacterial protein synthesis inhibitors and act at a very early stage by preventing the formation of the initiation complex (2, 24, 25). This mechanism of action is specific to this class, and no cross-resistance with other antimicrobial agents has been observed. Linezolid has been approved by the Food and Drug Administration and is indicated for the treatment of adult patients with Gram-positive infections (31). It can be administered intravenously or orally, and no dose adjustment is necessary when switching from intravenous to oral administration in man.

An experimental endocarditis model allows the PK/PD aspects of therapeutic efficacy to be studied, and human pharmacokinetic simulation improves analysis of in vivo activity and the extrapolation of results to human therapy (5). The present study used a rabbit endocarditis model to compare the in vivo activity of intermittent dosing vs continuous infusion of linezolid and vancomycin against three strains of *S. aureus* exhibiting different levels of methicillin resistance.

This work was presented in part at the 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy held in Toronto, Canada, from September 17 to 20, 2000, and at the 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy held in Chicago, IL, from December 16 to 19, 2001.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms

Three methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains were studied according to the type of phenotypic expression in methicillin resistance (26). Two were clinical strains (SA-1 and SA-2) isolated from blood cultures, and the other (SA-3) was the *S. aureus* Col reference strain.

Antibiotics

Linezolid and vancomycin were supplied respectively by Pharmacia Upjohn (Kalamazoo, MI) and Lilly Company (Saint-Cloud, France).

Medium

Mueller-Hinton (MH) broth (Sanofi Diagnostics Pasteur, Marne-la-Coquette, France), supplemented with calcium (25 mg/L) and magnesium (12.5 mg/L), was used for susceptibility tests and killing-curve experiments. Colony counts were determined using trypticase soy agar (TSA) plates (Difco) and MH plates (Difco) for time-kill experiments and population analysis, respectively.

In vitro studies

Determination of phenotypic classes in methicillin resistance

The determination of phenotypic classes was based on an agar disk diffusion method, as previously described (10). Briefly, four antibiotic disks (methicillin 2.5, 15, 100 µg and oxacillin 30 µg) and three incubation temperatures (30, 35 and 40°C) were used to allow for temperature-related variations of phenotypic expression. To confirm this determination, population analysis was performed from overnight cultures of MRSA strains grown in MH broth. Serial dilutions were plated for three different inocula (10^3 - 10^6 - 10^9 CFU/mL), using a spiral plater (Spiral System®, Saint-Nom-La-Breteche, France) on MH agar plates

containing methicillin concentrations ranging from 0.125 to 1024 $\mu\text{g/mL}$. Bacterial counts were performed after 48-h incubation at 37°C.

In vitro susceptibilities to antibiotics

The MICs of linezolid and vancomycin for the three strains were determined in cation-supplemented MH broth by the microdilution technique (1). Overnight MH broth cultures were used to prepare inocula of 10^5 CFU/mL. Microdilution MICs of oxacillin were performed in cation-supplemented MH broth containing 2% NaCl inoculated with 5.10^5 CFU/mL (16). Results were recorded 24h after incubation at 37°C. The MIC was defined as the lowest concentration of an antimicrobial agent preventing turbidity after 24-h incubation. Time-kill curves were performed in glass flasks containing MH broth (19), using an inoculum of 5.10^6 CFU/mL in the presence of linezolid or vancomycin at various concentrations (1, 4 and 8 times the MIC). One flask of inoculated cation-adjusted MH broth with no antibiotic served as the control. Surviving bacteria were counted after 0, 6, 24 and 48 h of incubation at 37°C by subculture of 50- μL serial dilutions of samples on TSA plates using a spiral plater. A bactericidal effect was defined as a $\geq 3\text{-log}_{10}$ CFU/mL decrease compared to the initial inoculum after 24-h incubation.

Pharmacokinetic studies

A first step consisted in investigating the parameters allowing simulation of the human serum kinetics of linezolid. Blood samples (0, 2, 5, 10, 15 and 30 min and 1, 2, 4, 6 and 8 h after an IV bolus) were taken from three healthy rabbits after administration of a linezolid bolus of 10 mg/kg in order to determine spontaneous drug kinetics. These data were processed and compared with those of human pharmacokinetics. A computer-controlled system was then used to obtain human kinetic profiles for linezolid in rabbits (5). Simulation was intended to provide pharmacokinetic parameters close to those observed in healthy volunteers after a single 600 mg bolus (c. 10 mg/kg): mean half-life ($T_{1/2}$) (4.4 ± 2.4 h), peak

concentration ($C_{\max}$) (12.9 ± 1.6 mg/L) and area under the curve (AUC) (80.2 ± 33.3 mg.h/L) (31). A total dose of 70 mg/kg needed to be infused into the rabbit over a 12-h period in order to simulate human serum kinetics after a 10 mg/kg dose. The infusion was delivered by a computer-controlled pump that allowed flow to be adjusted to a profile mathematically defined in time. To validate the simulation, serum concentrations of linezolid were determined in 5 rabbits after a single infusion and on the last day of treatment. In the second part of the study, the animals received linezolid as a continuous (constant-rate) IV infusion. The total daily dose used was that required to simulate the human kinetics of 10 mg/kg bid, i.e. 140 mg/kg/24 h.

Vancomycin was administered as a constant-rate IV infusion (100 mg/kg/24h) to obtain a serum steady-state concentration of around 20-25 mg/L in animals. The same dose was administered to animals intramuscularly (IM) twice a day (50 mg/kg bid) for intermittent dosing. Samples were collected at various steady-state time points for each antibiotic treatment. Serum assays were performed to determine peak and trough levels of vancomycin.

Endocarditis model

The animals used were female New Zealand white rabbits (weight: 2.0 to 2.5 kg) housed in individual cages with free access to food and water. The experimental endocarditis model was performed as previously described (11,21). To achieve valve injury, a polyethylene catheter was introduced into the left ventricle under general anesthesia (intramuscular ketamine 25 mg/kg). The catheter was left in place throughout the experimentation. After 24-h catheterization, each animal was inoculated intravenously with one mL of a bacterial solution (adjusted to 10^8 CFU/mL) of SA-1, SA-2 or SA-3 strains. Animals were randomly assigned to no treatment (controls), vancomycin intermittent dosing (50 mg/kg IM bid), vancomycin continuous infusion (100 mg/kg/day), or a linezolid regimen mimicking the following human doses: intermittent dosing (10 mg/kg/12 h for 5 days), or continuous

infusion (20 mg/kg/24 h for 5 days, or 40 mg/kg/24 h for 3 and 5 days). Treatment was started 24 h after inoculation, and antibiotics were administered to animals *via* the marginal ear vein. Animals were sacrificed using an intravenous bolus of thiopental at the beginning of the treatment period (controls) or at the end of the 3- or 5-day -regimen. Aortic valve vegetations were excised, placed immediately on ice, and then weighed, homogenized in 0.5 mL of saline buffer and plated on TSA plates using a spiral system. Dilutions at 10^{-1} , 10^{-2} and 10^{-4} were performed to eliminate potential carry-over effects (mainly for groups treated by continuous infusion). Viable counts after 24-h incubation at 37°C were expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD) $\log_{10}$ CFU per gram of vegetation. The lower detection limit for this method is one CFU per 50 μ L of undiluted vegetation homogenate. To determine whether linezolid regimens could induce the selection of *in vivo* resistant variants, undiluted vegetation homogenates were spread on agar plates containing linezolid at concentrations corresponding to 2- and 4-fold the MIC. Bacterial counts were performed after 48-h incubation at 37°C.

Antibiotic concentrations in serum

Blood samples were obtained from animals through a catheter positioned in the median artery of the ear contralateral to antibiotic infusion. Serum was frozen at -80°C until assay. The linezolid assay was done by high-performance liquid chromatography (lower detection limit: 0.1 mg/L, coefficient of variation <10%) using a method adapted from that of Peng *et al.* (20). Vancomycin concentrations were determined by immunoenzymatic assay (lower detection limit: 2.5 mg/l, coefficient of variation: 4.1 to 6.9%).

Statistics

Statistical analysis was performed with StatView[®] software (Abacus Concepts, Berkeley, CA). For each strain studied, analysis of variance was used to compare the effects between

the different groups, followed by a Scheffe's test to compare treated groups two by two. A $p \leq 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Susceptibility tests

The oxacillin MICs were 16, 128 and >1024 mg/L for SA-1, SA-2 and SA-3, respectively. The MICs for the three strains were 2 and 1 mg/L for linezolid and vancomycin, respectively. According to the determination of phenotypic classes in methicillin resistance (26), SA-1 and SA-2 exhibited heterogeneous low-level and high-level resistance respectively, and SA-3 exhibited homogeneous resistance.

Time-kill curves

Linezolid showed only modest time-dependent activity on the three strains. At 8 times the MIC, the decrease of the initial inoculum was close to 1 log after 24 h (Fig. 1a, 1c, 1e). Vancomycin displayed bactericidal activity (a 2 to 3-log decrease after 24h) on all strains (Fig. 1b, 1d, 1f).

Pharmacokinetic studies

The serum linezolid levels simulating a 10 mg/kg human dose are shown in Figure 2. Corresponding mean $C_{\max}$ (mg/L), AUC (mg.h/L) and $T_{1/2}$ (h) were 11.9 ± 1.1 , 76.3 ± 5.9 and 2.7 ± 0.1 , respectively, at the first dose and 21.5 ± 1.3 , 152.1 ± 9.2 , and 3.4 ± 0.7 at day 5. Vancomycin peak and trough levels (mg/L) for intermittent dosing were 38.8 ± 6.2 and 12.3 ± 2.9 , respectively. The serum concentrations obtained with linezolid and vancomycin for continuous regimens on different days are shown in Table 1.

Experimental endocarditis

In vivo results are shown in Table 2. For all strains, the linezolid intermittent regimen (ID) failed to exhibit a bactericidal effect versus controls, despite 5 days of treatment.

Nevertheless, linezolid treatment reduced bacterial counts in vegetations significantly for SA-1, SA-2 and SA-3. Continuous infusion of linezolid appeared to be more efficient, with a $\geq 3 \log_{10}$ CFU/g decrease of vegetations after five days for all regimens. Both vancomycin regimens (ID/CIV) displayed bactericidal activity on SA-2 and SA-3, but surprisingly not on SA-1, for which no decrease was observed despite 5 days of therapy. None of the regimens studied after 48-h incubation at 37°C showed *S. aureus* colonies on agar plates containing linezolid at 2 and 4 times the MIC.

DISCUSSION

The experimental *S. aureus* endocarditis model has been used extensively to test the in vivo activity of new drugs or new regimens. It is particularly suitable for PK/PD analysis and the optimization of therapeutic efficacy. Computer-controlled simulation of human kinetic profiles of linezolid in rabbits was used in the present study to improve analysis of the in vivo activity of this drug and the extrapolation of results to human therapy (5). Owing to the very short spontaneous half-life of the drug in rabbits (30 min, unpublished data), simulation was required to reach valid conclusions relative to human applications. A twice-daily 600-mg dose of linezolid is currently recommended in clinical practice for patients with infections due to MRSA (31). To our knowledge, no published experimental study has used the IV form of linezolid. Bioavailability is 100% with IV administration in rabbits, but only about 30% with the oral form (18).

The first part of this study evaluated the therapeutic efficacy of recommended intermittent dosing (ID) of linezolid for 5 days. Bacterial counts in aortic valve vegetations from rabbits treated with linezolid were significantly reduced for all strains, but the drug failed to exhibit bactericidal activity despite 5 days of treatment. Two previous studies investigated the efficacy of oral (p.o.) linezolid at different doses in an endocarditis model involving two *S. aureus* strains, one susceptible (18) and the other resistant (8) to methicillin. Linezolid (p.o.,

three times a day) displayed in vivo bactericidal activity for 50 and 75 mg/kg doses tid, but only the high-dose regimen (75 mg/kg tid) was as efficient as vancomycin in terms of surviving bacteria in vegetations. The total daily dose used ($50 \times 3 = 150$ mg/kg and $75 \times 3 = 225$ mg/kg) was close to that in our study ($70 \times 2 = 140$ mg/kg and $140 \times 2 = 280$ mg/kg), but drug distribution differed. It is likely that the oral route tid gave a kinetic profile close to that of continuous delivery. This may account (at least in part) for the good results observed, which were similar to ours with the continuous infusion regimen.

Analysis of the PK/PD aspects of this study probably explains the difference in the in vivo activity between the regimens used. In fact, trough levels of linezolid were under the MIC on the first day of dosing (ID) and close to twice the MIC on day five. Moreover, serum concentrations fell under 8 mg/l (i.e. 4 times the MIC) as early as the 3rd hour on day 1 and after the 8th hour on day 5. Thus, serum concentration was less than 4 times the MIC for about 75% of the time on day 1 and 33% on day 5. The accumulation of the drug between day 1 and day 5 has already been described by Dailey *et al.* (8) and in clinical use of linezolid in two patients with pancreatic abscess (13). For time-dependent antibiotics, the period above the MIC ($T > MIC$) is usually considered as a critical parameter for assessment of therapeutic efficacy (7). In particular, continuous infusion of β -lactams has been studied. In vivo and in vitro studies have shown that continuous infusion of ceftazidime improves the $T > MIC$ for the same daily dose, as compared to intermittent dosing (9, 17, 22). The maximal activity of continuous infusion was obtained for a serum steady-state concentration equal to a multiple of the MIC. For example, the activity of ceftazidime is now considered as optimal for a value 4-8 times the MIC (6, 29). Continuous infusion of linezolid was performed to investigate possible improvement of the in vivo effect and to obtain valid comparison with vancomycin. With the same total daily dose as that used for the ID regimen, the serum steady-state concentration increased from 10.4 ± 1.6 mg/L on day one to 32.5 ± 8.8 mg/L on

day five, confirming the accumulation previously described with the ID regimen. Thus, continuous infusion provided a $T > MIC = 100\%$ and a ratio between serum steady-state concentration and MIC of 5 to 16 over 5 days of treatment. Although linezolid was non-bactericidal in vitro, continuous infusion showed bactericidal activity in vivo. The endocarditis model is considered to require bactericidal drugs to achieve efficacy in vivo. However, other host factors (known or unknown) could be involved in the successful treatment of severe infections such as endocarditis and might intensify the in vivo activity of linezolid (4). Further studies are needed to identify and evaluate the possible impact of these factors as well as the penetration of linezolid within aortic vegetations. Moreover, an in vitro experiment (C.G. Gemmell, and C.W. Ford, 39th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. 1537, 1999) has shown that linezolid inhibits the expression of *S. aureus* virulence factors such as α -hemolysin, δ -hemolysin and coagulase. This reduction of bacterial virulence factor expression could increase the in vivo activity of linezolid.

To evaluate the effect of higher doses of linezolid, continuous infusion was performed in which the total dose was doubled for 3 and 5 days. Serum steady-state concentrations were increased, with ratios of 13.5, 25 and 32 for day 1, 3 and 5 respectively. The results indicate that this higher dose was beneficial, with a significant bactericidal effect as early as 3 days of treatment and an increase of bactericidal intensity on day 5.

No linezolid-resistant variants were isolated from vegetations during linezolid treatments. The administration route (intermittent dosing or continuous infusion) and the dosage used (20 or 40 mg/kg daily dose) did not appear to induce developmental resistance in surviving bacteria at the end of therapy. However, the treatment period (3 and 5 days) was probably too short to detect possible resistance induction, despite a steady-state serum concentration close to 25 times the MIC in the continuous infusion group. Zurenko *et al.* (30) reported a low spontaneous mutation frequency in vitro ($<8.10^{-11}$) in *S. aureus* at 2, 4 and 8 times the

MIC of linezolid; and rapid development of resistance was not observed. The length of therapy seems to be a more important factor for resistance development than the dose used. According to clinical reports, linezolid resistance develops mainly in enterococcus species (12), with only one observation concerning an *S. aureus* strain (27). Patients were treated for at least three weeks before linezolid resistance was reported. Despite the low level of mutation frequency in vitro and the absence of resistance development in our study, combination therapy should be investigated as a means of limiting the emergence of resistance in the clinical use of linezolid.

Recent studies have reported hematologic toxicity associated with linezolid therapy. Thrombocytopenia (3, 28) and myelosuppression (14) have been described and correlated with the length of treatment (>10-14 days). The manufacturer recommends that platelet counts be monitored in patients who have preexisting thrombocytopenia, those who are at increased risk of bleeding or are receiving other concomitant medications that may decrease platelet count, and those who have been receiving linezolid therapy for >2 weeks. These adverse events are reversible and hematologic parameters returned to normal after discontinuing linezolid therapy. To our knowledge, no data is available on the impact of high linezolid serum levels on drug toxicity. Although an enhancement of hematologic effects could be suspected with increased linezolid levels, studies are needed to specify the role of either the dose or the length of treatment on the hematologic toxicity of linezolid. Furthermore, human pharmacokinetic studies on the continuous infusion of linezolid could be of interest in order to compare the serum levels obtained in our model and in human and to specify the impact of this administration mode on the accumulation of linezolid in the serum over the course of therapy.

In our study, no benefit was observed with continuous infusion of vancomycin, as compared to intermittent dosing, against the three MRSA strains. The in vitro characteristics of the

three MRSA strains studied are similar (MIC, time-kill curves, etc.), which makes it difficult to explain the lack of in vivo activity of vancomycin on SA-1. Further studies are in progress to investigate the failure of vancomycin therapy against this strain.

CONCLUSION

Continuous infusion of linezolid produced bactericidal activity in vivo after 5 days of treatment, whereas in vitro tests had predicted only a bacteriostatic effect. Linezolid activity seems to depend mainly on (i) the time above the MIC and (ii) the ratio of serum steady-state concentration to the MIC.

These data suggest that the in vivo activity of linezolid could be improved by continuous infusion. Further studies are needed to investigate the potential clinical benefit of continuous infusion. This administration mode could be an appropriate alternative to glycopeptides for treatment of severe MRSA infections. Combination therapy should also be investigated as a means of increasing the early in vivo activity of linezolid and protecting the future of a promising new drug.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Anne-Françoise Miègeville and Virginie Le Mabecque for excellent technical assistance.

This work was supported by a grant from Pharmacia Upjohn, Kalamazoo, MI.

REFERENCES

1. **Amsterdam, D.** 1996. Susceptibility testing of antibiotics in liquid media. In *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 4th edition, (Lorian V, Ed.), p. 52-111, Williams & Wilkins Co., Baltimore.
2. **Aoki, H., L. Ke, S.M. Poppe, T.J. Poel, E.A. Weaver, R.C. Gadwood, R.C. Thomas, D.L. Shinabarger, and M.C. Ganoza.** 2002. Oxazolidinone antibiotics target the P site on *Escherichia coli* ribosomes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1080-1085.
3. **Attassi, K., E. Hershberger, R. Alam, and M.J. Zervos.** 2002. Thrombocytopenia associated with linezolid therapy. *Clinical infectious diseases.* 34:695-698.
4. **Bayer, A.S., D. Cheng, M.R. Yeaman, G.R. Corey, R.S. McClelland, L.J. Harrel, and V.G. Fowler.** 1998. In vitro resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein among clinical bacteremic isolates of *Staphylococcus aureus* correlates with an endovascular infectious source. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **42**:3169-3172.
5. **Bugnon, D., G. Potel, J. Caillon, D. Baron, H.B. Drugeon, P. Feigel, and M.F. Kergueris.** 1998. In vivo simulation of human pharmacokinetics in the rabbit. *Bull. Math. Biol.* **60**:545-567.
6. **Cappelletty, D.M., S.L. Kang, S.M. Palmer, and M.J. Rybak.** 1995. Pharmacodynamics of ceftazidime administered as continuous infusion or intermittent bolus alone and in combination with single daily dose amikacin against *Pseudomonas aeruginosa* in an in vitro infection model. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **33**:1797-1801.
7. **Carbon, C.** 1990. Impact of the antibiotic schedule on efficacy in experimental endocarditis. *Scan. J. Infect. Dis. Suppl.* **74**:163-172.
8. **Dailey, C.F., C.L. Dileto-Fang, L.V. Buchanan, M.P. Oramas-Shirey, D.H. Batts, C.W. Ford, and J.K. Gibson.** 2001. Efficacy of linezolid in treatment of experimental

endocarditis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents. Chemother. **45**:2304-2308.

9. **David, T.J., and J. Devlin.** 1989. Continuous infusion of ceftazidime in cystic fibrosis. Lancet i. 1454-1455.

10. **Drugeon, H.B., and V. Drocourt.** 1994. Méthode simple pour déterminer la classe d'expression de la résistance à la méticilline. Path. Biol. **42**:460-464.

11. **Durack, D.T., and P.B. Beeson.** 1972. Experimental bacterial endocarditis II. Survival of bacteria in endocardial vegetations. Br. J. Exp. Pathol. **53**:50-53.

12. **Gonzales, R.D., P.C. Schreckenberger, M.B. Graham, S. Kelkar, K. DenBesten, and J.P. Quinn.** 2001. Infections due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* resistant to linezolid. Lancet. **357**:1179.

13. **Gopal Rao, G., A. Steger and C.M. Tobin.** 2001. Linezolid levels in pancreatic secretions. J. Antimicrob. Chemother. **48**:931-932.

14. **Green, S.L., J.C. Maddox, and E.D. Huttenbach.** 2001. Linezolid and reversible myelosuppression. JAMA. 285:1291.

15. **Kaatz, G.W., and S.M. Seo.** 1996. In vitro activities of oxazolidinone compounds U100592 and U100766 against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob. Agents Chemother. **40**:799-801.

16. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 1997. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 4th ed. Document M7-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA.

17. **Nicolau, D.P., C.H. Nightingale, M.A. Banevicius, Q. FU, and R. Quintiliani.** 1996. Serum bactericidal activity of ceftazidime: continuous infusion versus intermittent injections. Antimicrob. Agents. Chemother. **40**:61-64.

18. **Oramas-Shirey, M.P., L.V. Buchanan, C.L. Dileto-Fang, C.F. Dailey, C.W. Ford, D.H. Batts, and J.K. Gibson.** 2001. Efficacy of linezolid in a staphylococcal endocarditis rabbit model. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**:349-352.
19. **Pearson, R.D., R.T. Steigbigel, H.T. Davis, and S.W. Chapmann.** 1980. Method for reliable determination of minimal lethal antibiotic concentrations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **18**. 699-708.
21. **Perlman, B.B., and L.R. Freedman.** 1971. Experimental endocarditis. II : Staphylococcal infection of the aortic valve following placement of a polyethylene catheter in the left side of the heart. *Yale Journal of Biology and Medicine.* **44**:206-213.
22. **Robaux, M.A., L. Dube, J. Caillon, D. Bugnon, M.F. Kergueris, D. Navas, P. Le Conte, D. Baron, and G. Potel.** 2001. In vivo efficacy of continuous infusion versus intermittent dosing of ceftazidime alone or in combination with amikacin relative to human kinetic profiles in a *Pseudomonas aeruginosa* rabbit endocarditis model. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**:617, 622.
23. **Rybak, M.J., D.M. Cappelletty, T. Moldovan, J.R. Aeschlimann, and G.W. Kaatz.** 1998. Comparative in vitro activities and postantibiotic effects of the oxazolidinone compounds eperezolid (PNU-100592) and linezolid (PNU-100766) versus vancomycin against *Staphylococcus aureus*, coagulase-negative staphylococci, *Enterococcus faecalis*, and *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:721-724.
24. **Shinabarger, D.L., K.R. Marotti, R.W. Murray, A.H. Lin, E.P. Melchior, S.M. Swaney, D.S. Dunyak, W.F. Demyan, and J.M. Buysse.** 1997. Mechanism of action of oxazolidinones: effects of linezolid and eperezolid on translation reactions. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:2132-2136.

25. **Swaney, S.M., H. Aoki, M.C. Ganoza, and D.L. Shinabarger.** 1998. The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein synthesis in bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:3251-3255.
26. **Tomasz, A., S. Nachman, and H. Leaf.** 1991. Stable classes of phenotypic expression in methicillin resistant clinical isolates of staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:124-129.
27. **Tsiodras, S., H.S. Gold, G. Sakoulas, G.M. Eliopoulos, C. Wennersten, L. Venkataraman, and R.C. Moellering Jr.** 2001. Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* **358**:207-208.
28. **Waldrep, T.W., and D.J. Skiest.** 2002. Linezolid-induced anemia and thrombocytopenia. *Pharmacotherapy.* **22**:109-112.
29. **Xiong, Y.Q., J. Caillon, X.Y. Zhou, G. Potel, D. Bugnon, P. Le Conte, F. Le Gallou, R. Le Floch, D. Baron, and H. Drugeon.** 1995. Treatment of experimental rabbit infective endocarditis due to a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with high-dose ceftazidime alone and combined with amikacin or sulbactam or both. *J. Antimicrob. Chemother.* **35**:697-706.
30. **Zurenko, G.E., B.H. Yagi, R.D. Schaadt, J.W. Allison, J.O. Kilburn, S.E. Glickman, and D.K. Hutchinson et al.** 1996. In vitro activities of U-100592 and U-100766, novel oxazolidinone antibacterial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:839-845.
31. **ZYVOX (linezolid) Advisory Committee Brochure.** 2000. Pharmacia and Upjohn. <http://www.fda.gov/>

Figure 1. Killing curves of linezolid (a, c and e) and vancomycin (b, d, and f) against SA-1, SA-2 and SA-3. ●, control; □, 1xMIC; △, 4xMIC; ◇, 8xMIC.

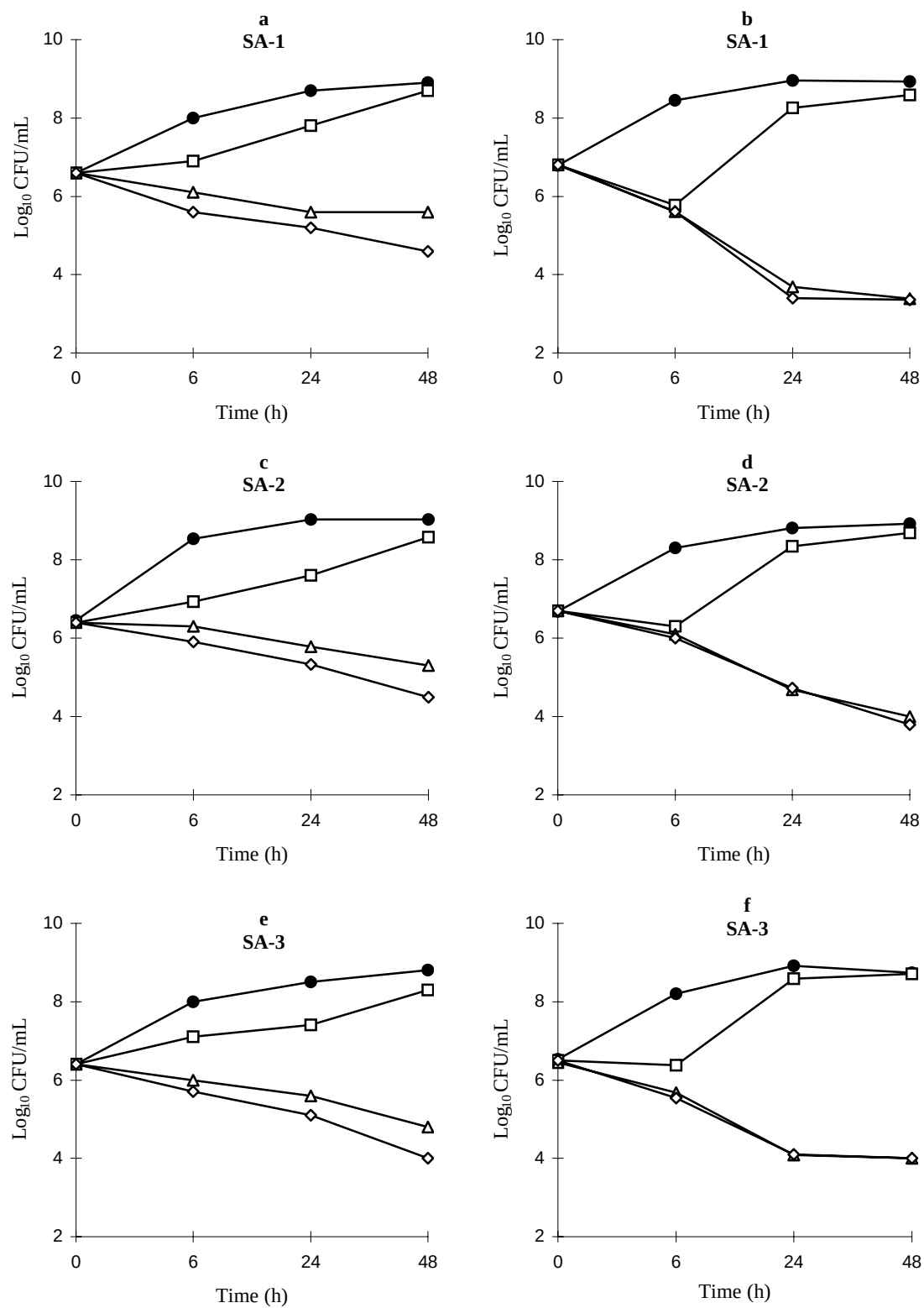


Figure 2. Serum concentrations of linezolid (mg/L) simulating a 10 mg/kg human dose: after the first dose (●) and at day 5 (■). Error bars represent standard deviations.

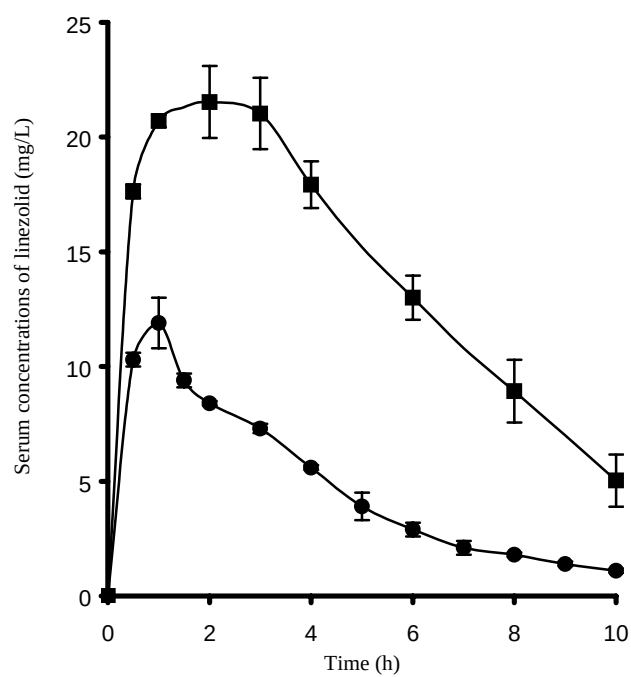


Table 1. Mean (standard deviation) serum concentrations (mg/L) after continuous infusion of linezolid or vancomycin.

Continuous infusion regimens			
Day	Linezolid CIV _{20mg/kg} ^a	Linezolid CIV _{40mg/kg} ^b	Vancomycin CIV
Day 1 (mg/L)	10.4 (1.6)	27.1 (13.6)	nd
Day 2 (mg/L)	19.4 (6.8)	47.1 (18.8)	22.3 (4.2)
Day 3 (mg/L)	22.8 (4.2)	49.7 (18.3)	nd
Day 5 (mg/L)	32.5 (8.8)	64.6 (6.3)	25.1 (3.7)

nd, not done.

^a Human simulated (daily) dose

^b Twice the recommended human dose

Table 2. Bacterial titers in vegetations (mean $\pm$ SD). ID: intermittent dosing simulating a human 10 mg/kg bid dose of linezolid or vancomycin IM 50 mg/kg bid; CIV: continuous (constant-rate) infusion simulating a human 20 or 40 mg/kg daily dose of linezolid or a human 30 mg/kg daily dose of vancomycin.

Regimen	Mean $\pm$ SD log ₁₀ CFU/g of vegetations (number of animals)		
	Strain SA-1	Strain SA-2	Strain SA-3
Controls	8.8 $\pm$ 0.8 (14)	9.0 $\pm$ 0.3 (8)	9.1 $\pm$ 0.7 (9)
Linezolid ID-5 days	6.7 $\pm$ 1.3 (9) ^a	7.3 $\pm$ 0.7 (9) ^a	6.4 $\pm$ 1.0 (8) ^a
Vancomycin ID-5 days	8.8 $\pm$ 0.6 (5)	2.9 $\pm$ 0.8 (5) ^{bc}	3.6 $\pm$ 1.2 (5) ^b
Linezolid CIV ₂₀ -5 days	2.5 $\pm$ 0.2 (5) ^{bc}	4.8 $\pm$ 1.8 (6) ^{bc}	4.5 $\pm$ 1.7 (6) ^b
Linezolid CIV ₄₀ -3 days	4.6 $\pm$ 2.1 (5) ^b	4.4 $\pm$ 1.5 (6) ^{bc}	5.8 $\pm$ 2.4 (6) ^a
Linezolid CIV ₄₀ -5 days	3.7 $\pm$ 1.1 (5) ^{bc}	2.5 $\pm$ 0.3 (5) ^{bc}	2.7 $\pm$ 0.5 (5) ^{bc}
Vancomycin CIV ₃₀ -5 days	8.5 $\pm$ 0.6 (5)	2.8 $\pm$ 0.9 (5) ^{bc}	4.0 $\pm$ 0.9 (5) ^b

^a p<0.05 *versus* controls.

^b p<0.001 *versus* controls.

^c p<0.005 *versus* linezolid ID-5 days.

ARTICLE II

Etude de l'Activité *In Vitro* du Linézolide Seul ou en Association avec la Gentamicine, la Vancomycine ou la Rifampicine sur des Souches de *Staphylococcus aureus* Résistants à la Méricilline.

Publication : Jacqueline *et al.*, J. Antimicrob. Chemother., 2003, 51(4) : 857-64.

1. PRESENTATION DU TRAVAIL.

Une activité bactéricide (intense) étant recherchée dans le traitement des infections sévères, l'utilisation du linézolide en monothérapie dans ce type d'infection reste problématique et une association est alors *a priori* souhaitable. Nos résultats obtenus *in vivo* avec la perfusion discontinue de linézolide ont montré certes une activité antibactérienne significative, mais néanmoins assez modeste ($\approx 2 \log_{10}$ CFU/g Vég.). Dans ce contexte, une association semble être indispensable pour espérer pouvoir stériliser le foyer infectieux après 5 jours de traitement dans ce modèle. Le choix de la molécule à associer avec le linézolide restait à définir. Ce travail avait donc pour but d'étudier *in vitro* par la méthode des vitesses de bactéricidie l'activité antibactérienne du linézolide en association avec trois antibiotiques présentant des mécanismes d'action différents.

2. CHOIX DES ANTIBIOTIQUES TESTES EN ASSOCIATION AVEC LE LINEZOLIDE.

Les oxazolidinones sont des inhibiteurs de la synthèse protéique (Livermore 2003). Le linézolide partage donc son mécanisme d'action avec de nombreuses molécules telles que le chloramphénicol, la clindamycine, les macrolides, les tétracyclines... Ces antibiotiques autorisent le début de la traduction de l'ARNm mais inhibent la phase d'élongation peptidique (Livermore 2003). Le linézolide se différencie de ces derniers en agissant à un stade très précoce du cycle ribosomal ce qui lui confère une absence de résistance croisée avec les autres inhibiteurs de la synthèse protéique.

Lors de l'utilisation du linézolide pour le traitement des infections sévères à SARM, c'est probablement en se basant sur l'antibiogramme que les prescripteurs décideront d'utiliser une association. Parmi les antibiotiques les plus régulièrement actifs *in vitro* figurent les aminosides, et notamment la gentamicine. Il est donc probable que l'association linézolide et gentamicine sera une association privilégiée par les cliniciens. Linézolide et gentamicine

sont tous deux des inhibiteurs de la synthèse protéique. Cependant, contrairement au linézolide qui montre une activité bactériostatique, les aminosides sont les seuls inhibiteurs protéiques qui exhibent une activité fortement bactéricide en provoquant la synthèse de protéines défectueuses conduisant à la désorganisation de la membrane et à la lyse cellulaire (Stratton 1996). L'association du linézolide et d'un aminoside pourrait donc se révéler intéressante dans la perspective d'augmenter la phase de bactéricidie précoce de l'association et donc de renforcer l'activité du linézolide seul, temps-dépendante.

D'autres associations méritaient également d'être étudiées comme l'association du linézolide avec la vancomycine et la rifampicine. Ces antibiotiques possèdent des mécanismes d'action différents et sont régulièrement actifs sur les souches de SARM :

- La vancomycine est un glycopeptide tricyclique de poids moléculaire élevé, qui, en se fixant étroitement par cinq liaisons hydrogènes à la terminaison D-alanyl-D-alanine, inhibe la transpeptidation, altère la synthèse de la paroi bactérienne et modifie la perméabilité de la membrane cytoplasmique.
- La rifampicine agit sur la transcription en inhibant l'ARN polymérase bactérienne ADN-dépendante, en se fixant sur l'une des cinq sous-unités de l'enzyme : la sous-unité β .

Le choix des partenaires en association avec le linézolide s'est donc porté sur trois molécules régulièrement actives sur les souches de SARM et présentant trois mécanismes d'action différents (synthèse protéique, paroi et transcription).

3. CHOIX DE LA TECHNIQUE D'ETUDE DE L'ACTIVITE IN VITRO DES ASSOCIATIONS INCLUANT LE LINEZOLIDE.

Différentes méthodes permettent d'étudier l'activité d'une association d'antibiotiques, mais essentiellement deux techniques sont couramment utilisées dans la littérature.

3.a. METHODE DE L'ECHIQUIER ET CALCUL D'UN FIC INDEX.

La méthode de l'échiquier est une technique très couramment utilisée dans l'évaluation des associations d'antibiotiques, certainement en raison de sa simplicité et de l'utilisation possible de microplaques rendant possible un grand nombre de combinaisons. Des dilutions successives des deux antibiotiques sont associées deux à deux en utilisant soit des tubes en verre ou le plus souvent des microplaques. La méthode du calcul du FIC index (synergie : $FIC \leq 0.5$ et antagonisme : $FIC > 2.0$) (Soussy 1990) présente cependant plusieurs limites : manque de reproductibilité (Rand et coll 1993), évaluation des résultats de l'association en un unique point, limitation des informations à des concentrations inhibitrices, pas de renseignement sur l'effet bactéricide de l'association (Eliopoulos et coll 1996).

3.b. METHODE DES VITESSES DE BACTERICIDIE.

Contrairement à la technique de l'échiquier, les vitesses de bactéricidie mesurent l'activité bactéricide de l'association testée. Cette méthode fournit une « image » dynamique des interactions entre les deux antibiotiques au cours du temps (classiquement 0, 3, 6 et 24 heures d'incubation) en opposition à l'échiquier, qui n'est généralement lu qu'une fois après 18 à 24 heures d'incubation (Eliopoulos et coll 1996). Cependant, cette technique s'avère être très consommatrice de temps et limite donc le nombre possible de combinaisons testées. Les concentrations étudiées doivent donc être méticuleusement choisies et doivent correspondre à des concentrations atteignables en clinique au site de l'infection. Enfin, il faut s'affranchir du phénomène de carry-over pouvant aboutir à une surestimation de l'activité antibactérienne.

La méthode des vitesses de bactéricidie permet donc d'évaluer au cours du temps l'activité bactéricide de l'antibiotique seul et en association. Pour cette raison, cette technique est

probablement plus représentative de la situation clinique où une antibiothérapie bactéricide est largement souhaitable. Cette dernière méthode a donc été privilégiée pour l'étude des interactions régissant le linézolide en association avec la gentamicine, la vancomycine et la rifampicine.

4. RESULTATS *IN VITRO* DES ASSOCIATIONS INCLUANT LE LINEZOLIDE.

La bactéricidie engendrée par la gentamicine *in vitro* sur les souches de *S. aureus* étudiées est rapide et intense ($>3\log_{10}$ UFC/mL en 6 heures). L'addition de linézolide a pour conséquence de diminuer l'activité de l'aminoside essentiellement sur la phase de bactéricidie précoce. En effet, des concentrations croissantes de linézolide (de 1 à 8 fois la CMI) inhibent totalement l'action de la gentamicine. De plus, il ne s'agit pas d'un effet « molécule » mais plutôt d'une façon prévisible d'un effet « classe ». L'antagonisme observé *in vitro* avec la gentamicine touche aussi bien la nétilmicine que la tobramycine ou l'amikacine (données personnelles). De même que pour la gentamicine, l'association linézolide + vancomycine apparaît également antagoniste *in vitro* en diminuant la bactéricidie d'un facteur 100 à 1000 (par rapport à l'activité de la vancomycine seule), à l'exception de la souche hGISA. Enfin, le linézolide associée à la rifampicine semble être l'association la plus intéressante *in vitro* en permettant l'inhibition de la sélection des mutants-résistants à la rifampicine.

***In Vitro* Activity of Linezolid Alone and in Combination with
Gentamicin, Vancomycin or Rifampin Against Methicillin-Resistant
Staphylococcus aureus by Time-Kill Curve Methods**

Cédric Jacqueline¹, Jocelyne Caillon¹, Virginie Le Mabecque¹, Anne-Françoise Miègeville¹, Pierre-Yves Donnio², Denis Bugnon¹ and Gilles Potel^{1*}.

¹ *Laboratoire d'Antibiologie (UPRES EA-1156), UER de Médecine, Nantes, France.*

² *Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Pontchaillou, Rennes, France.*

Keywords: Oxazolidinones, *in vitro* susceptibility study, drug combination interactions

*Corresponding author:

Dr Gilles Potel

Laboratoire d'Antibiologie, UER de Médecine, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes, Cedex 01, France

Tel/Fax: (33) 240-41-2854

e-mail: gpotel@sante.univ-nantes.fr

ABSTRACT

The *in vitro* activity of linezolid, the first drug issued from the novel class of oxazolidinones, was studied alone and in combination with three antibiotics acting on different cellular targets. Oxazolidinones are bacterial protein synthesis inhibitors that act at a very early stage by preventing the formation of the initiation complex. Combinations of linezolid with gentamicin, vancomycin or rifampin were evaluated against four methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains, using killing-curves in conjunction with scanning electron microscopy experiments. Time-kill curves were performed over 24 h using an inoculum of 5.10^6 - 10^7 cfu/ml. Linezolid was studied at concentrations of one, four and eight times the MIC, with partner drugs at eight times the MIC. Addition of linezolid resulted in a decrease of antibacterial activity for gentamicin and vancomycin, and linezolid was antagonistic to the early bactericidal activity of gentamicin. Linezolid, in combination with rifampin, showed an additive interaction for susceptible strains and inhibited rifampin-resistant variants. Linezolid plus rifampin appeared to be the most active combination against MRSA strains in time-kill experiments.

INTRODUCTION

The large number of infections caused by Gram-positive bacteria resistant to many commonly used antibiotics constitutes a major challenge for clinicians and microbiologists. *Staphylococcus aureus* remains a major nosocomial pathogen in human infections, and the recent appearance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains with reduced susceptibility to glycopeptides¹ has emphasized the need for new active drugs. Oxazolidinones are a novel class of synthetic antimicrobials with potent activity on Gram-positive pathogens such as Enterococci (including vancomycin-resistant strains), *Streptococcus pneumoniae*, coagulase-negative Staphylococci and *S. aureus*, including methicillin-resistant strains.² Linezolid, the first drug issued from this class, is active against Gram-positive bacteria and displays nonbactericidal, time-dependent activity *in vitro* on Staphylococci.^{3,4} Oxazolidinones are bacterial protein synthesis inhibitors and act at a very early stage by preventing the formation of the initiation complex.⁵⁻⁷ This mechanism of action is specific to this class, and no cross-resistance with other antimicrobial agents has been observed. Linezolid has been approved by U.S. and European agencies and is indicated for the treatment of infections in adult patients caused by Gram-positive pathogens.⁸

Few reports have discussed the *in vitro* activity of combinations including linezolid.^{9,10} Studies are needed to assess the activity of combinations including linezolid against multiresistant Gram-positive bacteria. The present work investigated the *in vitro* activity of linezolid alone and in combination with gentamicin, vancomycin or rifampin in order to determine the most active therapy against MRSA strains. In addition, scanning electron microscopy was performed to compare bacterial morphological alterations due to the different combinations. (This work was presented in part at the 42nd Interscience

Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Diego, Cal., 27 to 30 September 2002).

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains

The four MRSA strains studied were all isolated from blood cultures. One was a heterogeneous glycopeptide-intermediate strain (hGISA).

Antibiotics

Linezolid (Pharmacia Upjohn, Kalamazoo, Mich.), vancomycin (Lilly, Saint Cloud, France), gentamicin (Schering Plough, Herouville Saint Clair, France), and rifampin and teicoplanin (Aventis, Paris, France) were all provided by the manufacturers.

Medium

Mueller-Hinton broth (Sanofi Diagnostics Pasteur, Marne-la-Coquette, France) supplemented with calcium (25 mg/liter) and magnesium (12.5 mg/liter) was used for susceptibility tests and killing-curve experiments. Colony counts were determined with Mueller-Hinton (MH) plates (Difco) for time-kill experiments.

Susceptibility testing

MICs for the four strains were determined in cation-supplemented MH broth using the microdilution technique.^{11,12} Overnight MH broth cultures were used to prepare inocula of 10^5 cfu/ml. The MIC was defined as the lowest concentration of an antimicrobial agent that prevented turbidity after 24 h of incubation.

Time-kill curves

Killing experiments were performed to evaluate the antibacterial activity of combinations of antibiotics including linezolid against four MRSA strains. Linezolid was studied at one, four and eight times the MIC in combination with partner drugs at concentrations of eight times the MIC. Time-kill curves were performed in glass flasks containing MH broth,

using an inoculum of $5 \cdot 10^6$ - 10^7 cfu/ml in the presence of a single antibiotic or an association of antibiotics.¹³ A flask of inoculated cation-adjusted MH broth with no antibiotic served as control. Tests were performed in triplicate. Surviving bacteria were counted after 0, 3, 6 and 24 h of incubation at 37°C by subculturing 50- μ L serial dilutions (10^{-1} , 10^{-2} and 10^{-4} in order to eliminate potential carryover effect) of samples (in 0.9% sodium chloride) on MH plates using a spiral plater (Spiral System, Interscience, Saint-Nom-La-Bretèche, France). A bactericidal effect was defined as a ≥ 3 -log₁₀ cfu/ml decrease compared to the initial inoculum after 24 h of incubation. Synergism was defined as a decrease of ≥ 2 -log₁₀ cfu/ml between the combination and the most active single agent. Antagonism was defined as an increase in the colony count of ≥ 2 -log₁₀ cfu/ml with the combination compared to the count obtained with the most active single agent.¹⁴

Scanning electron microscopy

Bacteria (overnight bacterial culture diluted to obtain 10^7 cfu/mL) were cultured for 24 h in MH broth containing linezolid alone (at eight times the MIC) or in combination with gentamicin, vancomycin or rifampin (at eight times the MIC). Then, MH broth was centrifuged (3,000 g, 15 min, 4°C) before the pellets were mounted on membrane filters (Anodisc, Whatman[®] International Ltd, Maidstone, England). After one hour, the filters were gently washed three times for 10 min in phosphate-buffered saline (PBS). Bacteria were fixed with 0.25% glutaraldehyde for 30 min before being washed several times in PBS. The cells were dehydrated through a graded ethanol series, and alcohol-freon substitution was performed. Before examination under a scanning electron microscope (JEOL 6400F), specimens were coated with 100 Å of a gold-palladium mix in an ion sputter (JEOL JFC 1100).

RESULTS

Susceptibility tests

The MICs for *S. aureus* strains are summarized in Table 1. All strains were susceptible to linezolid. The hGISA strain showed increased MICs for vancomycin and teicoplanin. The other strains were susceptible to glycopeptides.

Time-kill Curves

The time-kill curves of linezolid plus gentamicin against the four strains are shown in Figure 1. Gentamicin alone was the most effective drug against the three gentamicin-susceptible strains, with bactericidal activity ($\geq 3\text{-log}_{10}$ cfu/ml decrease) as early as 6 h. For the gentamicin-resistant hGISA strain, only a 1-log_{10} cfu/ml decrease was observed at 6 h, followed by regrowth. For all strains, linezolid, when added to gentamicin, was dominant,¹⁵ imposing its slowly antibacterial effect and inhibiting the early bactericidal activity of gentamicin, particularly over the first 6 h. During this interval, inhibition of the bactericidal activity of gentamicin was dependent on the linezolid concentration. Though decreased in intensity, gentamicin killing occurred at 24 h. Thus, the addition of linezolid to gentamicin was antagonistic, except with the hGISA strain for which linezolid inhibited bacterial regrowth at 24 h.

Vancomycin, a time-dependent antibiotic, exhibited antibacterial activity (a 2.3 to 3.5 $\log_{10}$ cfu/ml decrease) within 24 h against NA8, BCB8 and P9 strains (Figure 2). As with gentamicin, addition of linezolid decreased the killing rate 100- to 1,000-fold (except for the hGISA strain) compared to that obtained by vancomycin alone. Vancomycin activity was decreased on the hGISA strain (only a 1-log_{10} cfu/ml decrease in 24 h). Linezolid alone (at eight times the MIC) seemed to be more effective on the hGISA strain compared to the results obtained with linezolid alone on NA8, BCB8 and P9 strains. For these three

strains, the decrease in the initial inoculum was less than or equal to 1 log₁₀ cfu/mL after 24 hours while it was close to 2 log₁₀ on the hGISA strain.

Regrowth of rifampin-resistant mutants occurred for all strains incubated with rifampin alone at eight times the MIC (Figure 3). The addition of linezolid prevented the selection of resistant mutants at 24 h, and a slight synergy was observed at 24 h on P9 strain.

Scanning electron microscopy

MRSA strains with linezolid alone or combined with gentamicin, vancomycin or rifampin were photographed by electron microscopy to compare morphological alterations (Figure 4). For each combination, the most representative photograph was chosen, even if normally appearing organisms were also observed. Linezolid alone (at eight times the MIC) exhibited moderate alterations on all strains studied. No cell destruction was observed, but only abnormal forms (Figure 4b). However, gentamicin (at eight times the MIC) had a profound effect on the morphological structure of bacteria, and bacterial lysis was observed for most of the cells (Figure 4c). The combination of both agents showed abnormal forms without separation of the central septum, and no bacterial lysis was observed (Figure 4d).

Vancomycin had an effect on the morphological structure of the cell, probably because of alteration of the cell wall, and inhibited cell division (Figure 4e). These effects did not seem to occur with the combination (Figure 4f), and the bacterial cells observed were similar to those with linezolid alone.

For rifampin alone or in combination with linezolid (Figures 4g and 4h), two types of cells were observed after 24 h of incubation: some showing only minor morphological alterations, and others that had undergone bacterial lysis. Thus, no differences were apparent between rifampin alone and in combination with linezolid.

DISCUSSION

Linezolid, a new drug with potent activity on Gram-positive pathogens such as MRSA, displays nonbactericidal, time-dependent activity *in vitro* on Staphylococci.^{2,4} In clinical settings, linezolid may be combined with other antimicrobial agents in order to increase the bactericidal activity of therapy, prevent the emergence of drug-resistant subpopulations and provide complementary spectrum.¹⁶ Zurenko *et al.*,² in *in vitro* studies, found a low spontaneous mutation frequency ($<8.10^{-11}$) in *S. aureus* at two, four and eight times the MIC of linezolid, without rapid development of resistance. Clinical reports indicate that linezolid resistance is observed mainly in *Enterococcus* species.¹⁷ Only one report has concerned an *S. aureus* strain,¹⁸ and in all cases patients were treated for at least three weeks before linezolid resistance occurred. Thus, the study of combinations including linezolid would seem particularly important to ensure the future effectiveness of this novel class of oxazolidinones.

In the present study, time-kill experiments were used to assess the potent activity of combinations. This technique, which measures bactericidal activity, appears to be more relevant than the checkerboard technique for clinical situations in which bactericidal therapy is desirable.¹⁹ Moreover, killing-curves provide a dynamic picture of antimicrobial action and interaction over time, as opposed to the checkerboard, which is usually applied only once (after 24 h of incubation).¹⁶ A starting inoculum of 5.10^6 to 10^7 cfu/ml was chosen as representative of those observed in severe clinical infections. The companion agents were tested at 8-fold the MIC in all cases although gentamicin and rifampin concentrations (for the hGISA strain) were not clinically achievable levels. However, rifampin concentration was deliberately limited to 64 mg/L and these concentrations were tested in order to obtain a valid comparison between the different strains.

Linezolid and gentamicin are both ribosome-targeted compounds, but do not act at the same point in the ribosome cycle. Linezolid inhibits bacterial protein synthesis through a mechanism of action different from that of other antimicrobial agents. This drug binds to a site on the bacterial 23S ribosomal RNA of the 50S subunit and prevents the formation of a functional 70S initiation complex. In the same way, gentamicin disrupts normal protein synthesis by irreversible binding to the ribosome. In time-kill curves, the combination appears to be antagonistic, mainly for the early bactericidal activity of gentamicin. Linezolid is active upstream from other ribosome-targeted antibiotics (such as gentamicin) at a very early stage in the bacterial translation process. The formation of an initiation complex seems to be crucial for the bactericidal activity of aminoglycosides.²⁰ By preventing the formation of a functional 70S initiation complex, linezolid could block the critical site of gentamicin action and inhibit its *in vitro* bactericidal activity. Another possibility is that linezolid inhibits the active transport mechanisms required for energy-dependent uptake of aminoglycosides in bacterial cells, as previously described for tetracycline and chloramphenicol.²¹ Despite antagonism was observed in the first six hours, the combination seemed to suppress the emergence of gentamicin-resistant organisms as observed on the hGISA strain (Figure 1d). This effect appeared to be similar to those observed when clindamycin is combined with aminoglycosides.²² Utilizing the time-kill curves technique, Zinner *et al.* have demonstrated an antagonism (on the early killing effect) for amikacin and gentamicin in combination with clindamycin,²³ despite this combination has been shown to be synergistic using the checkerboard technique against certain Enterobacteriaceae and *P. aeruginosa* strains.²⁴ However, the clinical significance of these observations remains to be established. These data supports the need of *in vivo* investigations to validate the interaction observed *in vitro* between linezolid and aminoglycoside.

Vancomycin is a cell-wall synthesis inhibitor, which means that bacteria must be in growth phase to be subject to its bactericidal activity.²⁵ Linezolid is a bacteriostatic agent, and its action on the ribosome inhibits bacterial growth. Consequently, the bactericidal activity of vancomycin could be partially inhibited by linezolid in a concentration-dependent manner such as that described above for gentamicin. Of particular interest was our finding of enhanced killing with linezolid on the hGISA strain. This enhanced effect has been reported on another GISA strain in an *in vitro* pharmacodynamic model.¹⁰ Nonetheless, further study would be beneficial in order to confirm these results on more GISA strains.

High-level resistant mutant selection limits the use of rifampin as a single drug. Moreover, regrowth of rifampin-resistant subpopulations always occurred in our study when this antibiotic was used alone. For all strains, linezolid combined with rifampin inhibited the regrowth of rifampin-resistant mutants. Moreover, an improvement of the antibacterial activity was observed with the combination compared to the most active single agent (i.e linezolid). It was particularly important on the P9 strain with an increase close to 2 log₁₀ cfu/ml compared to linezolid alone. Linezolid targets the formation of the initiation complex composed of 30S and 50S ribosome units, mRNA and N-formylmethionyl-tRNA. Rifampin, by binding to DNA-directed RNA polymerase, prevents elongation of the RNA chain and stops bacterial growth.²⁶ When the two drugs are combined, rifampin normally acts before linezolid in the ribosome cycle and might prevent linezolid action. Consequently, the antibacterial activity observed in time-kill curves during the first 6 h was probably the result of rifampin alone. Due to the appearance of *in vitro* resistant variants, the antibacterial activity of the combination over the 6- to 24-h period is probably due to the action of linezolid alone. Linezolid takes over from rifampin on RNA polymerase-mutated bacteria by acting later in the ribosome cycle.

Jones *et al.* have investigated the activity of a new oxazolidinone, AZD2563, alone and in combination with gentamicin or vancomycin against staphylococci.²⁷ Linezolid was used as a control. As in our study, no enhanced activity was observed with the addition of gentamicin or vancomycin to the oxazolidinones (AZD2563 and linezolid). No antagonism was noted in this study, probably because lower concentrations were used (a quarter MIC versus eight times the MIC in our work). This study seemed to be well correlated with our observations.

Parallel electron microscopy (qualitative) experiments were performed to confirm the interactions observed with time-killing curves. The combination of gentamicin and linezolid appeared to be clearly antagonistic, with a lack of bacterial lysis (compared to gentamicin alone). The effect on bacteria treated by linezolid plus vancomycin seemed to be similar to that with linezolid alone, which tends to confirm that linezolid partially inhibits the antibacterial activity of vancomycin (Figures 4e and 4f). No difference in morphological alteration was observed in electron microscopy when bacteria were treated by rifampin alone or in combination with linezolid. Thus, electron microscopy observations seemed to be well correlated with the interactions observed in time-kill experiments.

In summary, linezolid plus rifampin seemed to be the most active combination against MRSA strains in time-kill experiments. In clinical practice, antagonism is the most disadvantageous interaction possible with an antimicrobial combination. However, *in vivo* antagonism has rarely been documented in the literature,²⁸ as compared to the large number of reports of *in vitro* antagonism. For example, rifampin plus pefloxacin is usually antagonistic *in vitro*,²⁹ but this interaction is not observed *in vivo*.³⁰ Nevertheless, a recent study has reported that the combination of linezolid and vancomycin was less effective than vancomycin alone in an experimental endocarditis model due to MRSA.³¹ These data

seem to confirm the interactions observed in our study. Consequently, *in vivo* studies are needed to validate the *in vitro* observations reported here with time-kill experiments. Finally, the good activity of linezolid on the hGISA strain suggests that this antibiotic would be a reasonable therapeutic choice for patients with limited possibilities of benefiting from other treatment.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from Pharmacia Upjohn, Kalamazoo, Mich.

REFERENCES

1. Hiramatsu, K., Hanaki, H., Ino, T., Yabuta, K., Oguri, T. & Tenover, F.C. (1997). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **40**, 135-6.
2. Zurenko, G.E., Yagi, B.H., Schaadt, R.D., Allison, J.W., Kilburn, J.O, Glickman, S.E. *et al.* (1996). *In vitro* activities of U-100592 and U-100766, novel oxazolidinone antibacterial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**, 839-45.
3. Kaatz, G.W. & Seo, S.M. (1996). *In vitro* activities of oxazolidinone compounds U100592 and U100766 against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**, 799-801.
4. Rybak, M.J., Cappelletty, D.M., Moldovan, T., Aeschlimann, J.R. & Kaatz, G.W. (1998). Comparative *in vitro* activities and postantibiotic effects of the oxazolidinone compounds eperezolid (PNU-100592) and linezolid (PNU-100766) versus vancomycin against *Staphylococcus aureus*, coagulase-negative Staphylococci, *Enterococcus faecalis*, and *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**, 721-4.
5. Aoki, H., Ke, L., Poppe, S.M., Poel, T.J., Weaver, E.A., Gadwood, R.C. *et al.* (2002). Oxazolidinone antibiotics target the P site on *Escherichia coli* ribosomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**, 1080-5.
6. Shinabarger, D.L., Marotti, K.R., Murray, R.W., Lin, A.H., Melchior, E.P., Swaney, S.M. *et al.* (1997). Mechanism of action of oxazolidinones: effects of linezolid and eperezolid on translation reactions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**, 2132-6.
7. Swaney, S.M., Aoki, H., Ganoza, M.C. & Shinabarger, D.L. (1998). The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein synthesis in bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**, 3251-5.

8. Pharmacia and Upjohn. (2000). Zyvox's Approved Label. [Online.] <http://www.fda.gov/cder/foi/label/2000/21130lbl.pdf> (8 October 2002, date last accessed).
9. Grif, K., Manfred, M.P., Pfaller, K., Miglioli, P.A. & Allerberger, F. (2001). *In vitro* activity of fosfomycin in combination with various antistaphylococcal substances. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **48**, 209-17.
10. Allen, G.P., Cha, R. & Rybak, M.J. (2002). *In vitro* activities of quinupristin-dalfopristin and cefepime, alone and in combination with various antimicrobials, against multidrug-resistant Staphylococci and Enterococci in an *in vitro* pharmacodynamic model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**, 2606-12.
11. Amsterdam, D. (1996). Susceptibility testing of antibiotics in liquid media. In *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 4th edn (Lorian, V. Eds), pp. 52-111. Williams & Wilkins Co., Baltimore.
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1997). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Fourth Edition: Approved Standard M7-A4*. NCCLS, Villanova, PA, USA.
13. Pearson, R.D., Steigbigel, R.T., Davis, H.T. & Chapmann, S.W. (1980). Method for reliable determination of minimal lethal antibiotic concentrations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **18**, 699-708.
14. Lorian, V. (1991). Laboratory methods used to assess the activity of antimicrobial combinations. In *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 3rd edn (Lorian, V. Eds), pp. 434-44. Williams & Wilkins Co., Baltimore.
15. Drugeon, H.B., Dellamonica, P. & Caillon, J. (1987). Synergie, addition, indifference, antagonisme et dominance. Dominance et association d'antibiotiques. *Pathologie Biologie* **35**, 495-500.

16. Eliopoulos, G.M. & Moellering, Jr., R.C. (1991). Antimicrobial combinations. In *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 3rd edn (Lorian, V. Eds), pp. 432-92. Williams & Wilkins Co., Baltimore.
17. Gonzales, R.D., Schreckenberger, P.C., Graham, M.B., Kelkar, S., DenBesten, K. & Quinn, J.P. (2001). Infections due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* resistant to linezolid. *Lancet* **357**, 1179.
18. Tsiodras, S., Gold, H.S., Sakoulas, G., Eliopoulos, G.M., Wennersten, C., Venkataraman, L. *et al.* (2001). Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **358**, 207-8.
19. Climo, M.W., Patron, R.L. & Archer, G.L. (1999). Combinations of vancomycin and β -lactams are synergistic against Staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 1747-53.
20. Rahal, J.J. (1978). Antibiotic combinations: the clinical relevance of synergy and antagonism. In *Medicine* (Baltimore) **57**, 179-95.
21. Bryan, L.E. & Van den Elzen, H.M. (1976). Streptomycin accumulation in susceptible and resistant strains of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **9**, 928-38.
22. Eliopoulos, G.M. & Moellering, Jr., R.C. (1996). Antimicrobial combinations. In *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 4th edn (Lorian, V. Eds), pp. 330-96. Williams & Wilkins Co., Baltimore.
23. Zinner, S.H., Provonchee, R.B., Elias, K.S. & Peter, G. (1976). Effect of clindamycin on the *in vitro* activity of amikacin and gentamicin against Gram-negative bacilli. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **9**, 661-4.

24. Farrar, W.E., O'Dell, N.M. & Krause, J.M. (1967). Use of penicillinase-resistant penicillins to increase the susceptibility of Gram-negative bacteria to antibiotics. *Annals of Internal Medicine* **67**, 733-43.
25. Amsterdam, D. (1991). Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. In *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 3rd edn (Lorian, V. Eds), pp. 53-119. Williams & Wilkins Co., Baltimore.
26. Stratton, C.W. (1996). Mechanisms of action for antimicrobial agents: general principles and mechanisms for selected classes of antibiotics. In *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 4th edn (Lorian, V. Eds), pp. 579-603. Williams & Wilkins Co., Baltimore.
27. Jones, R.N., Andereg, T.R. & Deshpande, L.M. (2002). AZD2563, a new oxazolidinone: bactericidal activity and synergy studies combined with gentamicin or vancomycin against staphylococci and streptococcal strains. *Diagnostic Microbiology and Infections Disease* **43**, 87-90.
28. Lepper, M.H. & Dowling, H.F. (1951). Treatment of pneumococcic meningitis with penicillin compared with penicillin plus aureomycin: Studies including observations on an apparent antagonism between penicillin and aureomycin. *Archives of Internal Medicine* **88**, 489-94.
29. Fass, R.J., & Helsel, V.L. (1987). *In vitro* antistaphylococcal activity of pefloxacin alone and in combination with other antistaphylococcal drugs. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **31**, 1457-60.
30. Dworkin, R., Modin, G., Kunz, S., Rich, R., Zak, O. & Sande, M. (1990). Comparative efficacies of ciprofloxacin, pefloxacin, and vancomycin in combination with rifampin in a rat model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* chronic osteomyelitis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **34**, 1014-6.

31. Chiang, F. & Climo, M. (2002). Efficacy of linezolid alone and in combination with vancomycin for the treatment of experimental endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). In *Program and Abstracts of the 42nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Diego, Cal., 2002*. Abstract B-276, p.33. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.

Table 1. Minimal inhibitory concentrations (mg/liter) of study drugs for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains.

Minimal inhibitory concentration (mg/liter)				
Antibiotic	NA8	BCB8	P9	hGISA
Linezolid	2	2	2	1
Vancomycin	1	1	1	4
Teicoplanin	0.5	0.5	0.5	12
Gentamicin	0.5	0.25	0.125	32
Rifampin	0.008	0.008	0.015	>32

Figure 1. Antibacterial activity of linezolid (LNZ) alone and in combination with gentamicin (GEN) against NA8 (a), BCB8 (b), P9 (c) and hGISA (d) strains. Control (open circles), LNZ at eight times the MIC (solid circles), GEN at eight times the MIC (open triangles), LNZ (one time the MIC) and GEN (eight times the MIC) (solid triangles), LNZ (four times the MIC) and GEN (eight times the MIC) (open diamonds), LNZ (eight times the MIC) and GEN (eight times the MIC) (solid diamonds). Error bars represent standard deviations.

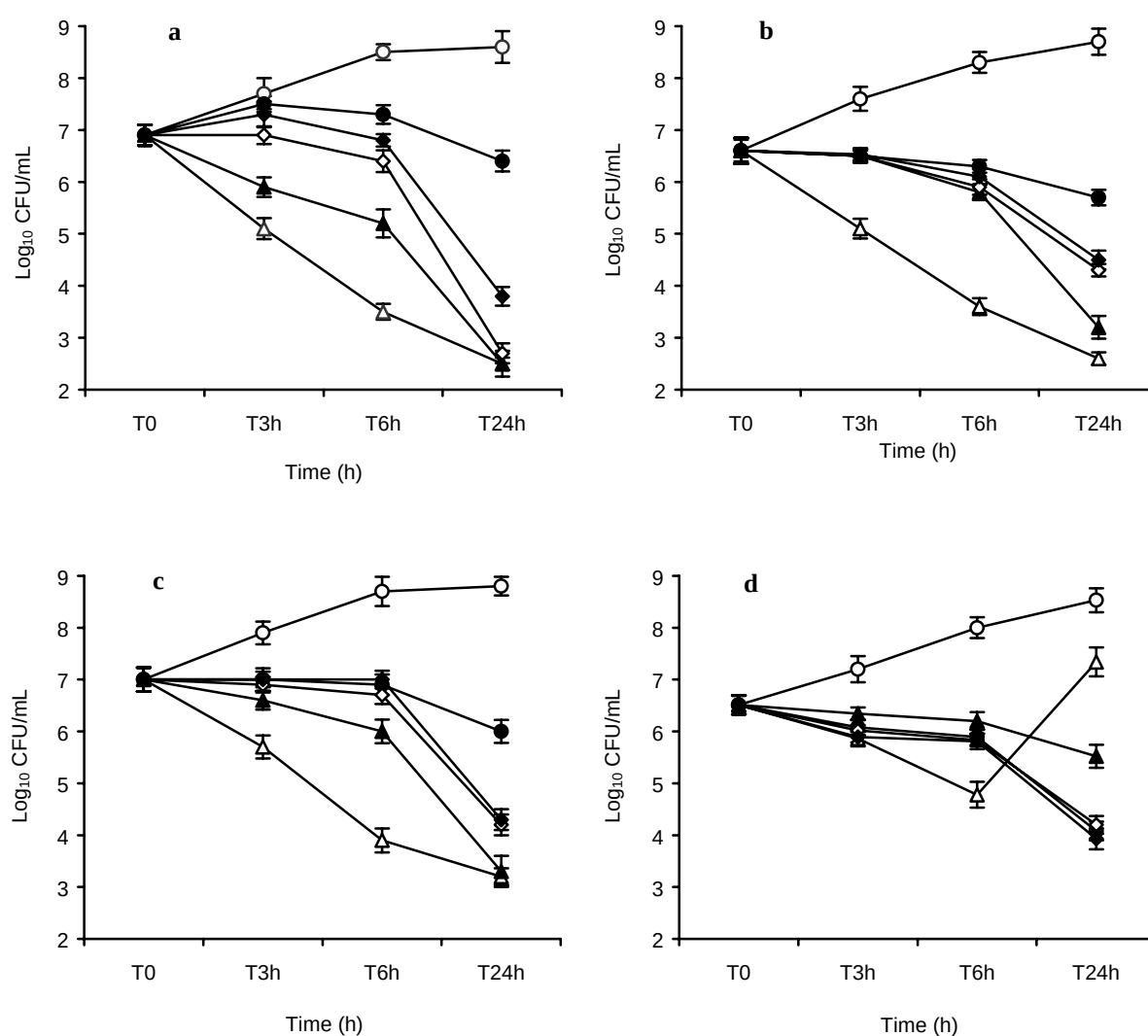


Figure 2. Antibacterial activity of linezolid (LNZ) alone and in combination with vancomycin (VAN) against NA8 (a), BCB8 (b), P9 (c) and hGISA (d) strains. Control (open circles), LNZ at eight times the MIC (solid circles), VAN at eight times the MIC (open triangles), LNZ (one time the MIC) and VAN (eight times the MIC) (solid triangles), LNZ (four times the MIC) and VAN (eight times the MIC) (open diamonds), LNZ (eight times the MIC) and VAN (eight times the MIC) (solid diamonds). Error bars represent standard deviations.

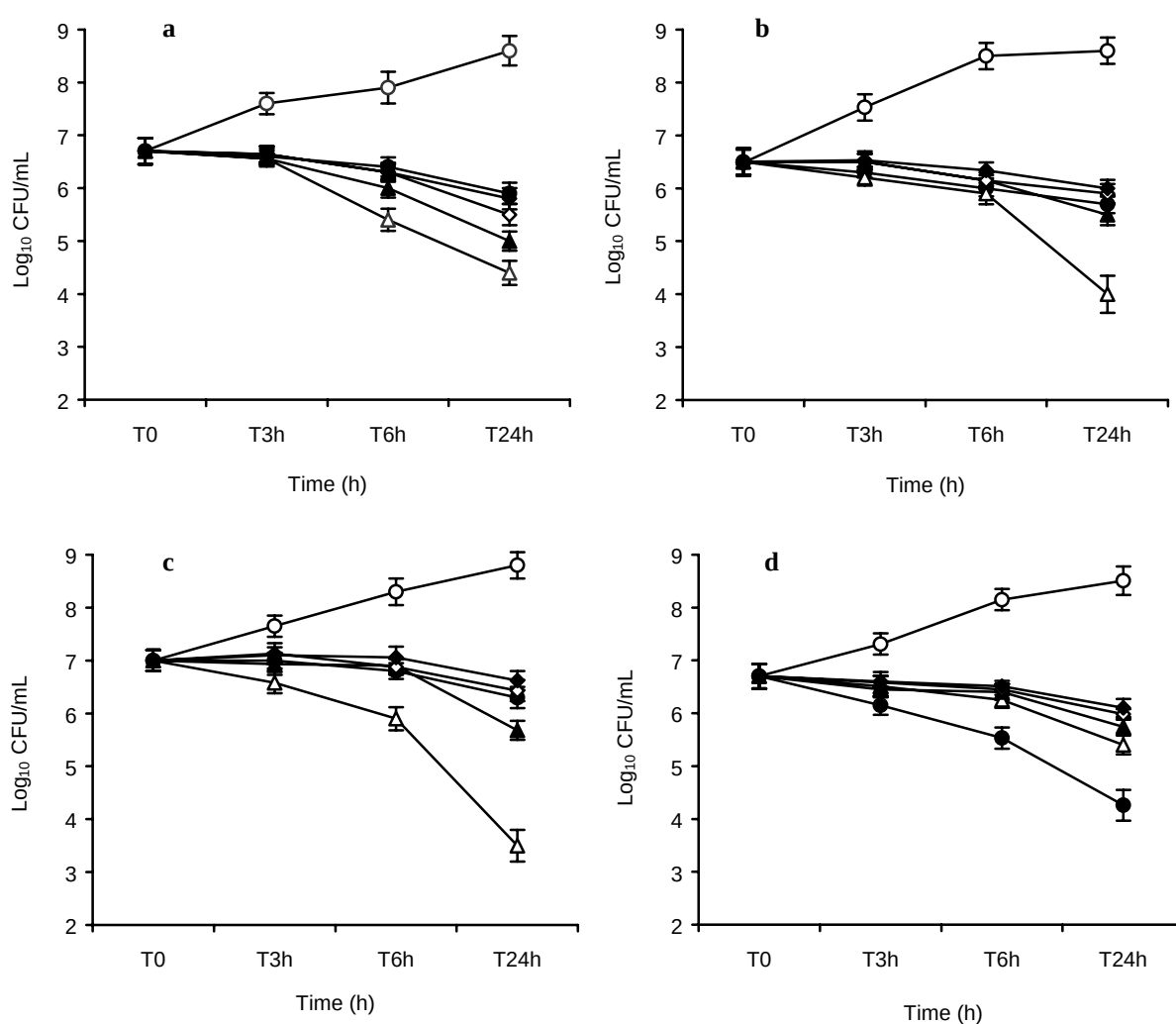


Figure 3. Antibacterial activity of linezolid (LNZ) alone and in combination with rifampin (RIF) against NA8 (a), BCB8 (b), P9 (c) and hGISA (d) strains. Control (open circles), LNZ at eight times the MIC (solid circles), RIF at eight times the MIC (open triangles), LNZ (one time the MIC) and RIF (eight times the MIC) (solid triangles), LNZ (four times the MIC) and RIF (eight times the MIC) (open diamonds), LNZ (eight times the MIC) and RIF (eight times the MIC) (solid diamonds). Error bars represent standard deviations.

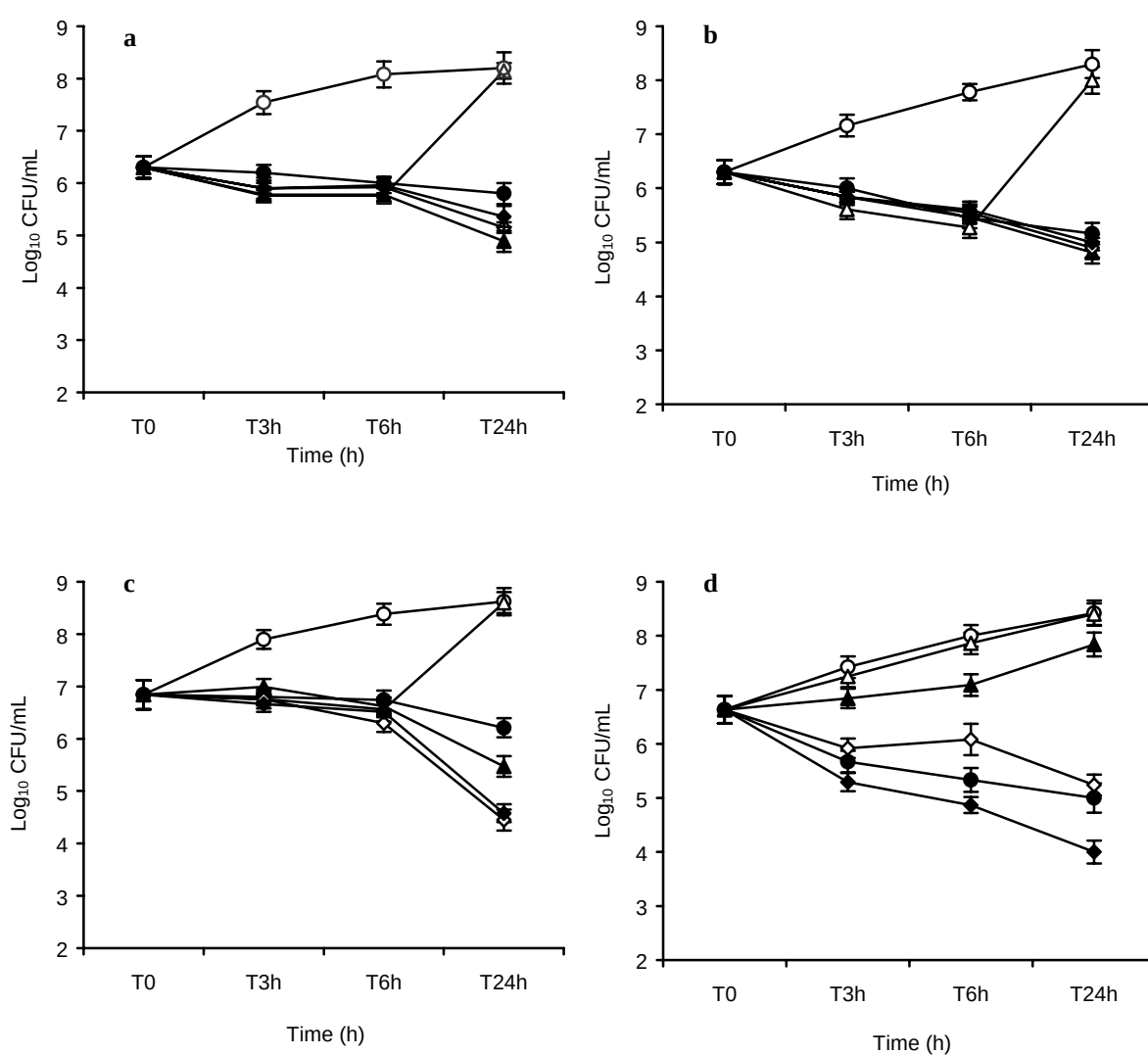
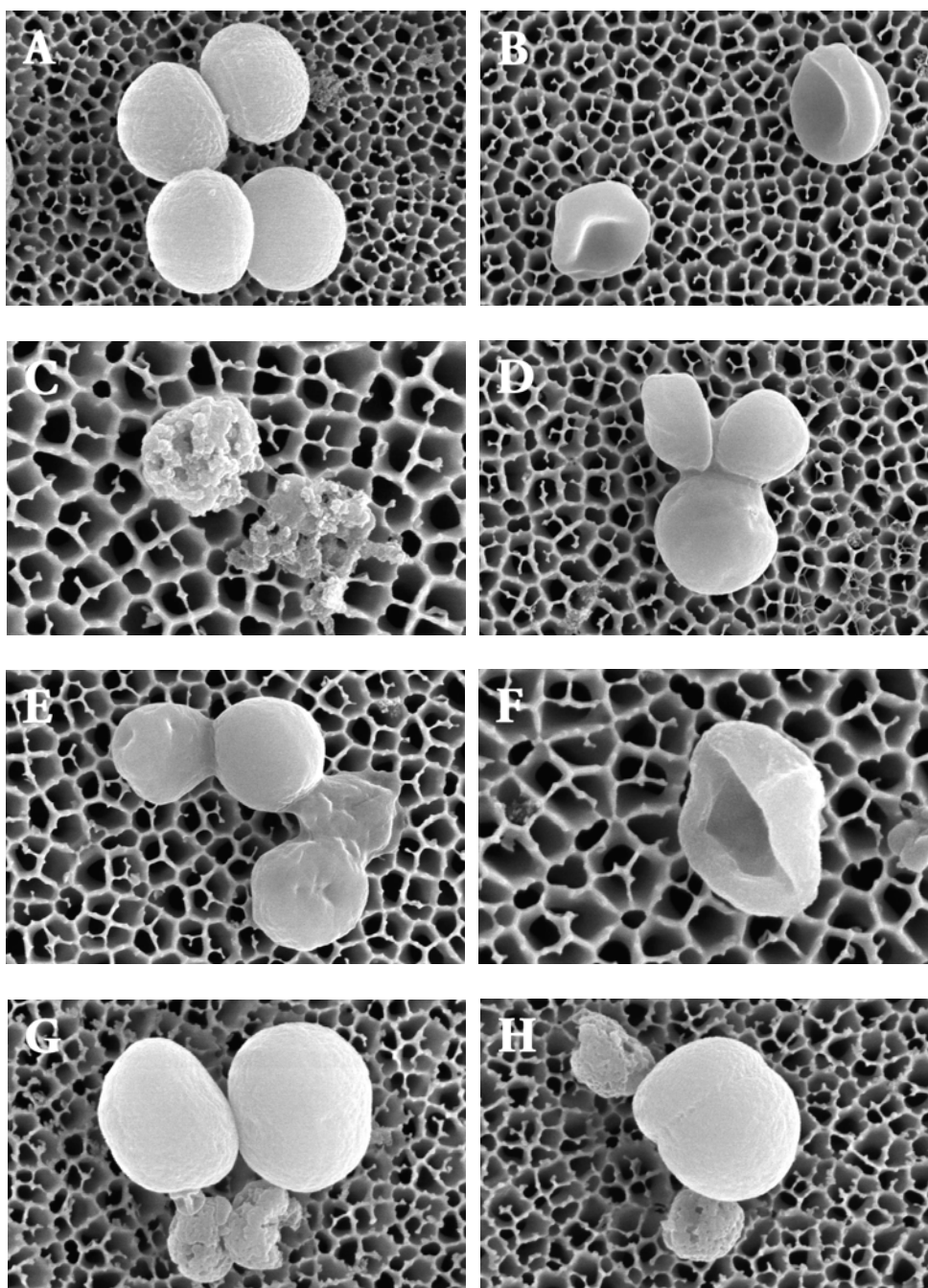


Figure 4. Scanning electron micrographs of BCB8 strain exposed to linezolid (LNZ) alone and in combination with gentamicin (GEN), vancomycin (VAN) and rifampin (RIF) at eight times the MIC. (a) Control, (b) LNZ, (c) GEN, (d) LNZ and GEN, (e) VAN, (f) LNZ and VAN, (g) RIF, (h) LNZ and RIF.



ARTICLE III

Etude de l'Impact de la Présence du Gène *ermA* sur l'Activité *In Vivo* du Synercid Seul ou en Association avec la Gentamicine sur *S. aureus* résistant à la méticilline.

Publication : Batard *et al.*, Antimicrob. Agents Chemother., 2002, **46**(7):2174-8.

1. PRESENTATION DU TRAVAIL.

Chez *S. aureus*, le principal mécanisme de résistance aux streptogramines B consiste en la modification de cible par diméthylation du résidu adénine A2058 de l'ARNr 23S, catalysée par les enzymes du groupe Erm (erythromycin resistance methylase). Ces enzymes sont codées chez *S. aureus* par les gènes *ermA*, *ermB* et/ou *ermC*. Cette résistance est croisée entre macrolides, lincomycines et streptogramines B (MLS_B). L'expression de la résistance peut être inductible ou constitutive (Roberts et coll 1999).

La quinupristine-dalfopristine apparaît bactéricide sur les souches de *S. aureus* sensibles aux streptogramines A et B aussi bien *in vitro* que dans des modèles expérimentaux d'endocardite aortique (Fantin et coll 1995, Entenza et coll 1995). En revanche, le phénotype MLS_B (constitutif) fait perdre à la molécule son activité bactéricide dans ces mêmes modèles.

Les aminosides sont des inhibiteurs de la synthèse protéique et provoquent des erreurs de traduction et un arrêt prématuré de l'élongation (Mingeot-leclercq et coll 1999). Les données *in vitro* sur l'association quinupristine-dalfopristine et gentamicine sur *S. aureus* sont peu importantes et contradictoires (Fass 1991, Kang and coll 1997). En conséquence, les objectifs de ce travail étaient les suivants :

- (i) Evaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'interaction entre la quinupristine-dalfopristine et la gentamicine sur deux souches de SARM de sensibilité connue aux streptogramines et aux aminosides.
- (ii) Comparer les antibiotiques, seuls ou en association, en termes de bactéricidie et de sélection de mutants-résistants.
- (iii) Comparer les différents régimes thérapeutiques par rapport à la molécule de référence des infections à SARM, la vancomycine.

2. RESULTATS.

Dans cette étude, les résultats obtenus *in vivo* avec la quinupristine-dalfopristine montrent une efficacité chez les animaux infectés par la souche exprimant le gène *ermA* ($-3.5 \log_{10}$ UFC/g de végétation). Ces résultats diffèrent de ceux obtenus par Fantin *et al.* (Fantin et coll 1995) où la quinupristine-dalfopristine était partiellement ou totalement inefficace sur des souches de SARM MLS_B (résistance constitutive). Plusieurs facteurs peuvent être avancés pour expliquer ces différences d'activité *in vivo* sur différentes souches de SARM MLS_B :

- (i) Le mécanisme de résistance à la quinupristine (nature du gène *erm*, association éventuelle à un gène *msr* ou *vgb*...).
- (ii) Les facteurs de virulence.
- (iii) Intervention de facteurs de l'hôte qui pourraient être impliqués dans la physiopathologie de l'endocardite infectieuse et dans la réponse au traitement (Dhawan et coll 1999).

Si la différence essentielle entre les deux souches étudiées est la présence ou l'absence du gène *ermA*, il est évident que d'autres gènes diffèrent entre les deux souches (gènes de virulence par exemple). Ces variations génétiques possibles rendent difficile la corrélation directe entre la présence ou l'absence du gène *ermA* et les résultats obtenus *in vivo*. La solution idéale consisterait en l'utilisation de souches isogéniques ne différant que par l'existence ou non du gène de résistance.

L'association quinupristine-dalfopristine + gentamicine n'apparaît pas plus bactéricide que la quinupristine-dalfopristine seule dans ce modèle d'endocardite du lapin, quel que soit la durée de traitement (24 ou 96 h). Cependant, la forte bactéricidie induite *in vivo* par chacun de ces antibiotiques rend difficile la mise en évidence de la supériorité de l'association par rapport à chacune des monothérapies.

L'un des buts de l'utilisation d'une association d'antibiotiques est de diminuer le risque de sélection de souches résistantes en cours de traitement. En effet, une mutation de la région de régulation du gène *erm* peut provoquer son inactivation et être responsable de l'apparition d'un clone constitutivement résistant aux MLS_B et de l'échec de l'antibiothérapie (Leclercq et coll 1991). Dans notre étude, l'incubation des homogénats de végétation sur des géloses contenant de la quinupristine-dalfopristine n'a permis d'isoler aucune souche de *Staphylococcus aureus*. Cependant, le modèle d'endocardite du lapin est probablement peu adapté à la détection *in vivo* de mutants-résistants (inoculum bactérien, durée de traitement...).

Combination of Quinupristin-Dalfopristin and Gentamicin

Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*:

Experimental Rabbit Endocarditis Study

E. BATARD¹, C. JACQUELINE¹, D. BOUTOILLE¹, A. HAMEL¹, H.B. DRUGEON¹, N. ASSERAY¹, R. LECLERCQ², J. CAILLON¹, G. POTEL^{1*}, AND D. BUGNON¹.

¹ *Laboratoire d'Antibiologie, Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes, France.*

² *Laboratoire de Bactériologie, Centre Hospitalier Universitaire Côte-de-Nacre, Caen, France.*

*Corresponding author:

Dr Gilles Potel

Laboratoire d'Antibiologie, UER de Médecine, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes, Cedex 01, France

Tel/Fax: (33) 240-41-2854

e-mail: gpotel@sante.univ-nantes.fr

ABSTRACT

The combination of quinupristin-dalfopristin (Q-D) and gentamicin was tested against two strains of gentamicin- and dalfopristin-susceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). One strain was susceptible to macrolides, lincosamides and streptogramin B type antibiotics (MLS_B), and the other was constitutively resistant to these antibiotics by virtue of the *ermA* gene. The checkerboard method and time-kill curves showed that the combination of Q-D and gentamicin was indifferent. A rabbit endocarditis model simulated the pharmacokinetics achieved in humans receiving intravenous injections of Q-D (7.5 mg/kg t.i.d.) and gentamicin (3 mg/kg once-daily). For the MLS_B-susceptible strain, a four-day regimen reduced mean bacterial titers (MBT) in vegetations from 8.5 ± 0.8 log CFU/g (control group), to 4.1 ± 2.6 (gentamicin), 3.0 ± 0.9 (Q-D), and 2.6 ± 0.5 (Q-D plus gentamicin). For the MLS_B constitutively resistant strain, a four-day regimen reduced MBT in vegetations from 8.7 ± 0.9 log CFU/g (control group), to 5.0 ± 2.2 (gentamicin), 5.2 ± 2.2 (Q-D), and 5.1 ± 2.4 (Q-D plus gentamicin). The differences between control and treatment groups were significant for both strains ($p < 0.0001$), although there was no significant difference between treatment groups. No resistant variant was isolated from vegetations, and no significant difference in MBT was observed in vegetations of treatment groups after one-day regimens. This experimental study found no additive benefit in combining Q-D and gentamicin against dalfopristin- and gentamicin-susceptible MRSA.

INTRODUCTION

Infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) are usually treated by glycopeptides, especially vancomycin (23). The emergence of glycopeptide-intermediate MRSA in Japan, Europe and North America constitutes a risk of clinical failure of glycopeptide therapy, and studies of experimental infections in animals have confirmed this apparent risk (4,8). Thus, it would seem essential to evaluate new antistaphylococcal drugs and regimens.

Quinupristin and dalfopristin are water-soluble injectable streptogramin B (S_B) and A (S_A) antibiotics respectively, whose combination in a 30 :70 ratio (w:w) acts synergistically on gram-positive bacteria (5,14). Streptogramins inhibit protein synthesis by binding to the ribosomal 50S subunit, and resistance concerns mainly the S_B type (9, 20). The most frequent mechanism of quinupristin resistance encountered in recent years is target modification by methylation of an adenine residue in 23S rRNA, encoded in *S. aureus* by *ermA*, *ermB* or *ermC* genes. Constitutively expressed *erm* genes confer *in vitro* cross-resistance on macrolides, lincosamides and S_B . Some strains harbor inducible *erm* genes, whose expression is triggered only by 14- and 15-membered macrolides (18). The *msrA* gene is believed to encode for an efflux system, and *vgb* and *vgbB* genes for a hydrolase that inactivates streptogramin B type antibiotics (22). Recently, mutations in the L22 ribosomal protein have been associated with resistance to quinupristin in *S. aureus* (B. Malbruny , A. Canu, B. Bozdogan, V. Zarrouk, B. Fantin and R. Leclercq, Abstr. 40th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. 1928, 2000). Constitutive resistance to quinupristin has led to a relative loss of the bactericidal effect of quinupristin-dalfopristin in *S. aureus* rat and rabbit experimental endocarditis models (13, 15).

Previous experimental studies showed a potential benefit in combining Q-D with other antibiotics such as β -lactams and rifampin against MRSA (26, 28). Gentamicin, like other

aminoglycosides, is considered to exert its antibacterial effect via inhibition of protein synthesis after binding to the 30S ribosomal subunit (21). It is usually recommended in association in the first days of treatment of serious *Staphylococcus aureus* infections. However, the combination of gentamicin and Q-D was only studied *in vitro*, exhibiting conflicting results including possible antagonism (16, 17).

This study tested the combination of quinupristin-dalfopristin with gentamicin both *in vitro* and *in vivo* on dalfopristin- and gentamicin- susceptible *S. aureus* strains with varying susceptibilities to quinupristin.

Materials and methods

Microorganisms

Two strains of gentamicin-susceptible MRSA were used. Strain NA8 was a kind gift from Roland Bismuth, Paris, France, and strain BCB8 was isolated from a blood culture. Strain NA8 is susceptible to macrolides, lincosamides and streptogramins (MLS_B-S phenotype), whereas strain BCB8 is constitutively resistant to macrolides, lincosamides and streptogramin type B (MLS_B-CR phenotype). Both strains were resistant to kanamycin and tobramycin, suggesting the production of an ANT(4') modifying enzyme.

Antibiotics and media

Gentamicin and quinupristin-dalfopristin were provided respectively by Schering-Plough (Hérouville-Saint-Clair, France), and Aventis (Paris, France). Unless otherwise stated, bacteria were grown overnight at 37°C either in cation-supplemented Mueller-Hinton broth (Sanofi Diagnostic Pasteur, Marne-la-Coquette, France) or on Mueller-Hinton agar (Difco, Becton-Dickinson France SA, Le Pont de Claix, France).

Search for quinupristin resistance determinants

Quinupristin resistance determinants were searched for by polymerase chain reaction (PCR). Genomic DNA was extracted from culture using the QIAGEN DNeasy tissue kit®.

The sequence of primers for *ermA*, *ermB*, *ermC* and *msrA/B* is shown in table 1. The 50- μ l reaction mixture for PCR contained 10 ng of total bacterial DNA, 20 pmol (each) oligodeoxynucleotide, 200 μ M dNTPs, 2 mM MgCl₂, 1X PCR buffer, and 1 U Taq DNA polymerase (Eurobio). PCR experiments were carried out in a Perkin-Elmer 4600 thermal cycler with a denaturation step (94°C, 5 min), followed by 35 amplification cycles (30 sec of denaturation at 94 °C, 45 sec of annealing at 47 °C and 1 min of elongation at 72°C) and a final elongation step (72°C for 10 min). PCR products were separated by electrophoresis through 2% agarose gel under a 100 V gradient.

In vitro susceptibilities to antibiotics

MICs for quinupristin, dalfopristin, quinupristin-dalfopristin and gentamicin were determined by the agar dilution method (1).

Checkerboard method

Interactions between quinupristin-dalfopristin and gentamicin were assessed using the checkerboard method in 96-well microtiter plates (Nalge Nunc International, Denmark), using an inoculum of 10^6 CFU/mL. Plates were incubated for 18 h at 37°C. Fractional inhibitory concentration (FIC) indices were interpreted as follows: ≤ 0.5 for synergy, > 4 for antagonism, >0.5 and ≤ 4 for indifference (1).

Time-kill curves

Time-kill curves were plotted using an inoculum of 5.10^6 CFU/mL, in glass tubes containing Mueller-Hinton broth and gentamicin and/or quinupristin-dalfopristin at concentrations equal to their MICs. Control tubes contained no antibiotics. After 0, 2, 6 and 24 h of incubation at 37°C, viable counts were determined by subculturing 50- μ L serial dilutions of samples on agar plates using a spiral plater (Spiral Système®, Saint-Nom-la-Bretèche, France). Colonies were counted after 48-h incubation at 37°C. Antibiotic carry-over was ruled out after the plating of a 100 CFU/mL suspension in the

presence or absence of antibiotics. The lower limit of detection for the spiral plater was $2 \log_{10}$ CFU/mL. Synergy was defined as a $\geq 2\text{-}\log_{10}$ decrease in CFU/mL between the combination (Q-D and gentamicin) and its most active constituent after 24 h. Antagonism was defined as a $\geq 2\text{-}\log_{10}$ CFU/mL increase in CFU/mL between the combination and its most active constituent. The interaction was otherwise qualified as indifferent.

Experimental staphylococcal endocarditis

New Zealand white rabbits (weight : 2.0 to 2.7 kg) were used in an aortic endocarditis model, as previously described (12). A polyethylene catheter was inserted into the left ventricle via the carotid artery and left in place throughout the experiment. One milliliter of an overnight bacterial culture (diluted in saline serum 9 g/L to obtain 10^6 CFU/mL) was inoculated into the ear vein 48 h after catheterization.

Twenty-four hours after inoculation, the animals were randomly assigned to Q-D, gentamicin, Q-D and gentamicin, or no treatment (control group). Antibiotics were administered for 1 or 4 days in order to obtain serum concentrations close to those observed in humans after 1-h intravenous (IV) perfusions of 7.5 mg/kg of Q-D t.i.d. and 3 mg/kg once-a-day of gentamicin. For this purpose, Q-D was administered by intramuscular injection of 30 mg/kg t.i.d. (14, 15). The total daily dose of gentamicin (16.6 mg/kg) was infused IV at changing flow rates controlled by a computer dedicated to human pharmacokinetic simulations (6,7).

Rabbits were sacrificed by IV injection of thiopental 24 h after inoculation in the control group and at the end of the last day of treatment in the other groups. Vegetations were excised, immediately placed on ice, weighed, homogenized in 0.5 mL of saline, and plated on Mueller-Hinton agar after serial dilutions. Viable counts after 48-h incubation at 37°C were expressed as means $\pm$ standard deviations (SD) of $\log_{10}$ CFU per gram of vegetation.

The lower limit of detection for this method is one CFU per 100 µl of undiluted vegetation homogenate.

In order to detect *in vivo* selection of resistant variants during treatment, undiluted vegetation homogenates were also plated on agar containing gentamicin or Q-D at a concentration corresponding to 16 times the MIC.

Determination of antibiotic concentrations in serum and pharmacokinetic analysis

Antibiotic concentrations in serum were determined in three healthy rabbits. Samples were drawn (i) 30 min (peak) and 23.5 h (trough) after the start of the first injection for gentamicin, and (ii) 15, 30, 45, 60, 120, 240 and 360 min after the first injection for quinupristin and dalfopristin. For streptogramin assays, one-milliliter blood samples were immediately placed in tubes containing 0.25 mL of 0.25 N hydrochloric acid, then gently stirred and centrifuged (10 min at 1,500 x g). The upper phase was immediately stored at – 80°C. Gentamicin concentrations were assessed by immunoenzymatic assays (EMIT®, Behring). The lower limit of detection for gentamicin was 0.3 mg/L.

Quinupristin, dalfopristin and Q-D concentrations were determined by a microbiological assay based on the bactericidal synergy between quinupristin and dalfopristin. The bactericidal activities of pH-neutralized serum samples against *Micrococcus luteus* DRUG 320 were assessed and compared with a standard curve constructed in rabbit serum. Dalfopristin was added to sera at a final bacteriostatic concentration of 2 mg/L for determination of quinupristin activity; and quinupristin was added at a final bacteriostatic concentration of 2 mg/L for determination of dalfopristin activity. No antibiotic was added for determination of Q-D activity. After 4-h incubation at 37°C, surviving bacteria were counted by plating 3 µL of diluted samples on Mueller-Hinton agar containing activated charcoal (10 g/L) to prevent the antibiotic carry-over. Lower limits of detection were 0.09

mg/L for quinupristin, 0.06 mg/L for dalfopristin, and 0.23 mg/L for Q-D. The coefficient of variation of the assay was 16%.

Pharmacokinetic data were analyzed by regression to determine the terminal slope and beta half-lives. Areas under the curve (AUC) of serum concentrations were determined by the trapezoidal method, with extrapolation from the last point toward infinity.

Statistics

Statistical analysis was performed using StatView® software (Abacus Concepts). Mean bacterial titers in vegetations were globally compared by analysis of variance (ANOVA). A Scheffe's test was used to compare mean titers two by two. $P \leq 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Susceptibility tests

MICs are shown in Table 2. Although strains NA8 and BCB8 showed quite different susceptibilities to quinupristin, their MICs for Q-D were similar. Both strains revealed susceptibility to dalfopristin and gentamicin.

Search for quinupristin resistance determinants

PCR identified the *ermA* gene in strain BCB8. No other genes encoding resistance to quinupristin were detected in the two strains.

Checkerboard

FIC indices of the combination of quinupristin-dalfopristin and gentamicin for strains NA8 and BCB8 were respectively 1.0 and 1.2. Therefore, the combination between the tested antibiotics was interpreted as indifferent on both strains.

Time-kill curves

Time-kill curves for strains NA8 and BCB8 are shown in figures 1 and 2. At a concentration of 0.5 mg/L, Q-D proved more bactericidal against quinupristin-susceptible *S. aureus* NA8: the initial inoculum was reduced by 3.0 log CFU/mL for NA8 and 1.8 log CFU/mL for BCB8 after 24-h incubation. No antagonism or synergism was observed between Q-D and gentamicin.

Serum antibiotic levels

Gentamicin peak and trough mean serum concentrations were respectively 15.8 ± 1.2 mg/L and 1.2 ± 0.1 mg/L. The pharmacokinetics of quinupristin, dalfopristin and quinupristin-dalfopristin are shown in table 3.

Experimental endocarditis

Activities of 4-day regimens are reported in table 4. For both strains, gentamicin, quinupristin-dalfopristin and the combination of both drugs provided significant bactericidal effects. There was no significant difference in either strain between the mean bacterial titers in vegetations induced by these 3 regimens. Although quinupristin-dalfopristin seemed somewhat less effective against quinupristin-resistant BCB8 than against quinupristin-susceptible NA8, this regimen reduced the mean bacterial titer by 3.5 log CFU/g of vegetation for the quinupristin-resistant strain.

No increase in bactericidal effect was apparent for the combination of gentamicin and quinupristin-dalfopristin versus either antibiotic alone. However, to determine whether bactericidal activity was accelerated by the combination, the treatment groups were compared at the end of the first day of therapy (table 5). The results showed that gentamicin, quinupristin-dalfopristin and the combination of both drugs reduced mean bacterial titers significantly in vegetations, except for gentamicin against *S. aureus* BCB8.

Incubation of vegetations in agar plates containing gentamicin or quinupristin-dalfopristin (depending on the regimen administered to the animal before sacrifice) yielded no *S. aureus* colony.

DISCUSSION

It has been reported that MLS_B-CR and MLS_B-S *S. aureus* strains, in the absence of resistance to dalfopristin, showed indistinguishable quinupristin-dalfopristin MICs, despite a lack of *in vitro* bactericidal activity against certain MLS_B-CR strains (15, 19). Moreover, in experimental (rabbit and rat) endocarditis studies, Q-D exerted constant bactericidal activity against MLS_B-S *S. aureus* strains (13, 15, 26). *In vivo* efficacy of Q-D against MLS_B-CR strains is more difficult to interpret. The lack of bactericidal activity of Q-D in rat endocarditis studies may be due to lower doses than those recommended for treatment of severe infections in humans, and was restored by increasing the total daily dose of dalfopristin in order to maintain a dalfopristin serum concentration of 2 mg/L for 12 h a day (13). With the same rabbit endocarditis model that we subsequently used, Fantin et al. observed variable results on the same MLS_B-CR strain, with a maximal reduction in vegetation bacterial titers of 2.9 log UFC/g (15, 28, J. Pavie, V. Zarrouk, A. Lefort, L. Garry, R. Leclercq, C. Carbon and B. Fantin, Abstr. 40th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother, abstr. 1006, 2000). In our model, Q-D proved bactericidal on the MLS_B-CR *S. aureus* strain by the end of the first day of treatment, showing a mean reduction of the bacterial titer in vegetations of 3.4 log CFU/g. These data seem therefore to question the presumed global lack of efficacy of Q-D on MLS_B-CR *S. aureus* in severe infections. Many differences between study strains could explain the diversity of *in vivo* responses to Q-D. Inter-strain differences in susceptibility of *S. aureus* to platelet factors,

as Thrombin-induced Platelet Microbicidal Protein-1, could explain variability in *in vivo* efficacy of Q-D, as previously reported with oxacillin and vancomycin (10,11).

According to international guidelines, gentamicin was administered in our study by simulating a human IV regimen of a once-daily dose of 3 mg/kg/day (23). A previous study showed that this regimen was bactericidal against *S. aureus* NA8 after 48 h (3). Our data indicate that the *in vivo* activity of gentamicin administered as a once-daily dose was bactericidal against NA8 at the end of the first day of treatment, but required 4 days of treatment to be effective on BCB8. Sande and Courtney showed that gentamicin, in a three-daily-dose regimen yielding mean peak concentrations of 5.0 mg/L, had no bactericidal activity in a rabbit experimental staphylococcal endocarditis model after 3 and 5 days of treatment (24). Nevertheless we can not exclude the possibility of the synergy between Q-D and a multiple regimen of gentamicin.

The combination of quinupristin-dalfopristin and gentamicin proved no more beneficial than quinupristin-dalfopristin or gentamicin alone on *S. aureus* in this study, either in terms of *in vitro* and *in vivo* bactericidal activity or *in vivo* selection of a resistant variant. This lack of benefit may have been due to the high potency of the monotherapies, each of which reduced mean bacterial titers in vegetations by ≥ 3.5 log CFU/g after a four-day regimen and selected no resistant variant. However, we have possibly under-estimated the selection of such variant clones, by using high antibiotic concentrations in solid media (i.e., 16-fold the MIC). Furthermore we did not search variant clones showing resistance or increased resistance specifically to quinupristin or to dalfopristin. Such resistant variants were not selected in previous experimental endocarditis studies using *S. aureus* strains susceptible to dalfopristin, but have been isolated when one dalfopristin-resistant strain was used (15, 27). Moreover, the combination of another antibiotic with Q-D might help prevent the emergence of constitutive resistant mutants during treatment of infections caused by MLS_B

inducible resistant (MLS_B-IR) *S. aureus* strains. This situation has been a matter of concern for Q-D as for other non-*erm*-inducing MLS antibiotics, by analogy with clindamycin which is thought to select MLS_B-CR mutants from MLS_B-inducible strains (18). Because of the low *in vitro* frequency of mutation from MLS_B-inducible resistance to constitutive resistance ($\approx 10^{-7} - 10^{-8}$), this hypothesis needs to be tested using experimental models yielding larger inocula than the rabbit endocarditis model (18).

Serum concentrations of streptogramins were determined with a new bioassay based on the measure of the bactericidal activity of the serum, but not on its bacteriostatic activity as performed in previous microbiological methods (13). These new assays use one unique test strain without streptogramin-resistance mechanism, which prevents the instability of formerly used strains (13). In order to measure the concentration of one compound, the other one was added at a high concentration, allowing to control the synergy between quinupristin and dalfopristin. Conversely, for the global assay of Q-D, concentrations of separate compounds in test sera were not controlled, whereas control sera had a fixed 30:70 (w:w) Q/D ratio. Although the bacteriostatic activity of Q-D against *Staphylococcus aureus* - as assessed by MIC - is similar for a Q/D ratio ranging from 90:10 to 10:90, no data about the influence of the Q/D ratio on its *in vitro* bactericidal activity has been published (5). In our work, the sum of separate compounds exceeded the global assay when the Q/D ratio was inferior to 0.6 (data not shown). The global Q-D assay should therefore be considered as a functional one. Even if its result is expressed as a mass concentration, it almost represents the amount of Q-D in a 30 :70 (w : w) ratio which has the same bactericidal activity as the test serum.

In conclusion, our experiments showed no additive benefit from the combination of quinupristin-dalfopristin and gentamicin against dalfopristin- and gentamicin-susceptible *S. aureus*, whether susceptible or resistant to quinupristin. Contrary to previous studies,

quinupristin-dalfopristin showed *in vivo* bactericidal activity against the quinupristin-resistant strain. Further investigations are needed to determine the role of quinupristin-dalfopristin, with regard to vancomycin, in the management of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections.

Acknowledgements

The authors are grateful to Anne-Françoise Miègeville and Virginie Le Mabecque for technical assistance.

Eric Batard was the recipient of a grant from the Direction Régionale des Affaires Sanitaires et Sociales des Pays de la Loire (France).

This work was supported by Aventis Laboratories, France.

REFERENCES

1. Acar J.F., F.W. Goldstein. 1996. Disk susceptibility test, p. 1-51. In V. Lorian (ed.), Antibiotics in laboratory medicine, 4th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.
2. Angot P., M. Vergnaud, M. Auzou, R. Leclercq and Observatoire de Normandie du Pneumocoque. 2000. Macrolide resistance phenotypes and genotypes in French clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis ; 19 : 755-758.
3. Asseray N., J. Caillon, N. Roux, C. Jacqueline, R. Bismuth, M.F. Kergueris, G. Potel, D. Bugnon. *In vivo* impact of different aminoglycoside-resistant phenotypes in a rabbit *Staphylococcus aureus* endocarditis infection model. Antimicrob. Agents Chemother., in press, AAC 618-01.
4. Backo M., E. Gaenger, A. Burkart, Y.L. Chai, A.S. Bayer. 1999. Treatment of experimental staphylococcal endocarditis due to a strain with reduced susceptibility in vitro to vancomycin : efficacy of ampicillin-sulbactam. Antimicrob. Agents Chemother. 43 : 2565-2568.
5. Bouanchaud D.H. 1992. In-vitro and in-vivo synergic activity and fractional inhibitory concentration (FIC) of the components of a semisynthetic streptogramin, RP 59500. J. Antimicrob. Chemother. 30, suppl. A : 95-99.
6. Bugnon D., G. Potel, Y.A. Xiong, J. Caillon, M.F. Kergueris, P. Le Comte, D. Baron, H. Drugeon. 1996. *In vivo* antibacterial effects of simulated human serum profiles of once-daily versus thrice-daily dosing of amikacin in a *Serratia marcescens* endocarditis experimental model. Antimicrob. Agents Chemother. 40 : 1164-1169.
7. Bugnon D., G. Potel, J. Caillon, D. Baron, H.B. Drugeon, P. Feigel, M.F. Kergueris. 1998. *In vivo* simulation of human pharmacokinetics in the rabbit. Bull. Math. Biol. 60 : 545-567.

8. Climo M.W., T.L. Patron, G.L. Archer. 1999. Combinations of vancomycin and β -lactams are synergistic against *Staphylococci* with reduced susceptibilities to vancomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43 : 1747-1753.
9. Cocito C., M. Di Giambattista, E. Nyssen, P. Vannuffel. 1997. Inhibition of protein synthesis by streptogramins and related antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 39, suppl A : 7-13.
10. Dhawan VK, Yeaman MR, Bayer AS. 1999. Influence of in vitro susceptibility phenotype against Thrombin-Induced Platelet Microbicidal Protein on treatment and prophylaxis outcomes of experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis. *J. Infect. Dis.* 180 : 1561-1568.
11. Dhawan VK, Bayer AS, Yeaman MR. 2000. Thrombin-Induced Platelet Microbicidal Protein susceptibility phenotype influences the outcome of oxacillin prophylaxis and therapy of experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44 : 3206-3209.
12. Durack D., P. Beeson. Experimental endocarditis I. 1972. Colonization of a sterile vegetation. *Br. J. Exp. Pathol.* 53 :44-49.
13. Entenza J.M., H. Drugeon, M.P. Glauser, P. Moreillon. 1995. Treatment of experimental endocarditis due to erythromycin-susceptible or -resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with RP 59500. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39 : 1419-1424.
14. Fantin B., R. Leclercq, M. Ottoviani, J.M. Vallois, B. Mazière, J. Duval, J.J. Pocidalo, C. Carbon. 1994. In vivo activities and penetration of the two components of the streptogramin RP 59500 in cardiac vegetations of experimental endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38 :432-437.

15. Fantin B., R. Leclercq, Y. Merlé, L. Saint-Julien, C. Veyrat , J. Duval , C. Carbon. 1995. Critical influence of resistance to streptogramin B-type antibiotics on activity of RP59500 (quinupristin-dalfopristin) in experimental endocarditis due to *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 39 : 400-405.
16. Fass R.J. 1991. In vitro activity of RP 59500, a semisynthetic injectable pristnamycin, against Staphylococci, Streptococci, and Enterococci. Antimicrob. Agents Chemother. 35 : 553-559.
17. Kang S.L., M.J. Rybak. 1997. *In vitro* bactericidal activity of quinupristin/dalfopristin alone and in combination against resistant strains of *Enterococcus species* and *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob. Chemother. 39, suppl. A : 33-39.
18. Leclercq R., P. Courvalin. 1991. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. Antimicrob. Agents Chemother. 35 : 1267-1272.
19. Leclercq R., L. Nantas, C.J. Soussy, J. Duval. 1992. Activity of RP 59500, a new parenteral semisynthetic streptogramin, against staphylococci with various mechanisms of resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin antibiotics. J. Antimicrob. Chemother. 30, suppl.A : 67-75.
20. Lina G., A. Quaglia, M.E. Reverdy, R. Leclercq, F. Vandensech, J. Etienne. 1999. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins among staphylococci. Antimicrob. Agents Chemother. 43 : 1062-1066.
21. Mingeot-Leclercq P., Y. Glupczynski, P.M. Tulkens. 1999. Aminoglycosides: activity and resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 43 : 727-737.
22. Roberts M.C., J. Sutcliffe, P. Courvalin, L. Bogo Jensen, J. Rood , H. Seppala. 1999. Nomenclature for macrolide-lincosamide-stretogramin B resistance determinants. Antimicrob. Agents Chemother. 43 : 2823-2830.

23. Rubinstein E., C. Carbon and the Endocarditis working group of the International Society of Chemotherapy. 1998. Staphylococcal endocarditis – recommendations for therapy. *Clinical Microbiol. Infect.* 4, suppl 3 : 3S27-3S33.
24. Sande M.A., K.B. Courtney. 1976. Nafcillin-gentamicin synergism in experimental staphylococcal endocarditis. *J. Lab. Clin. Med.* 88 : 118-124.
25. Sutcliffe J., T. Grebe, A. Tait-Kamradt, L. Wondrack. 1996. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40 : 2562-2566.
26. Vouillamoz J., J.M. Entenza, C. Féger, M.P. Glauser, P. Moreillon. 2000. Quinupristin-dalfopristin combined with β -lactams for treatment of experimental endocarditis due to *Staphylococcus aureus* constitutively resistant to macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44 : 1789-1795.
27. Zarrouk V., B. Bozdogan, R. Leclercq, L. Garry, C. Carbon, B. Fantin. 2000. Influence of resistance to streptogramin A type-antibiotics on the activity of quinupristin-dalfopristin *in vitro* and in experimental endocarditis due to *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44 : 1168-1173.
28. Zarrouk V., B. Bozdogan, R. Leclercq, L. Garry, C. Féger, C. Carbon, B. Fantin. 2001. Activities of the combination of quinupristin-dalfopristin with rifampin *in vitro* and in experimental endocarditis due to *Staphylococcus aureus* strains with various phenotypes of resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 : 1244-1248.

Table 1. Sequences of primers for genes encoding resistance to quinupristin.

Gene	Primers (ref. 25)	Predicted length	Positive control strain (ref. 2)
<i>ErmA</i>	5'-TCTAAAAAGCATGTAAAAGAA-3' 5'-CTTCGATAGTTTATTAATATTAGT-3'	645 bp	<i>S. aureus</i> HM1051
<i>ErmB</i>	5'-GAAAAGGTACTCAACCAAATA-3' 5'-AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC-3'	639 bp	<i>S. pneumoniae</i> HM28
<i>ErmC</i>	5'-TCAAAACATAATATAGATAAA-3' 5'-GCTAATATTGTTTAAATCGTCAAT-3'	642 bp	<i>S. aureus</i> HM1054R
<i>msrA/B</i>	5'-CAAATGGTGTAGGTAAGACAACT-3' 5'-ATCATGTGATGTAAACAAAAT-3'	399 bp	<i>S.epidermidis</i> HM1053

Table 2. Agar dilution minimal inhibitory concentrations (MIC) of quinupristin, dalfopristin, quinupristin-dalfopristin and gentamicin for *S. aureus* strains NA8 and BCB8.

	MIC (mg/L)				
	Oxacillin	Quinupristin	Dalfopristin	Quinupristin-dalfopristin	Gentamicin
<i>S. aureus</i> NA8	64	1	1	0.50	0.25
<i>S. aureus</i> BCB8	16	128	2	0.50	0.25

Table 3. Pharmacokinetic serum parameters of quinupristin, dalfopristin and quinupristin-dalfopristin in 3 healthy rabbits after a single intramuscular injection of quinupristin-dalfopristin (30 mg/kg): mean values $\pm$ SD of peak concentrations ($C_{\max}$), areas under the curve (AUC), and β elimination half-lives. Peak concentrations were observed 15 min after injection for dalfopristin, and 30 min after injection for quinupristin and quinupristin-dalfopristin.

Drug	$C_{\max}$ (mg.l ⁻¹)	AUC (h.mg.l ⁻¹)	β Half-life (h)
Quinupristin	1.5 $\pm$ 0.4	4.0 $\pm$ 2.3	1.5 $\pm$ 1.5
Dalfopristin	6.9 $\pm$ 0.5	6.8 $\pm$ 3.3	0.7 $\pm$ 0.3
Quinupristin-dalfopristin	5.4 $\pm$ 1.8	6.0 $\pm$ 2.6	0.6 $\pm$ 0.3

Table 4. Activity of 4-day regimens. Mean bacterial titers in vegetations $\pm$ SD of untreated (control) and treated rabbits.

Regimen	Log ₁₀ CFU/g of vegetation (No. of animals) with strain:	
	<i>S. aureus</i> NA8	<i>S. aureus</i> BCB8
Controls	8.5 $\pm$ 0.8 (9)	8.7 $\pm$ 0.9 (13)
Gentamicin	4.1 $\pm$ 2.6 (8) ^a	5.0 $\pm$ 2.2 (8) ^a
Quinupristin-dalfopristin (Q-D)	3.0 $\pm$ 0.9 (6) ^a	5.2 $\pm$ 2.2 (7) ^a
Gentamicin + Q-D	2.6 $\pm$ 0.5 (6) ^a	5.1 $\pm$ 2.4 (12) ^a

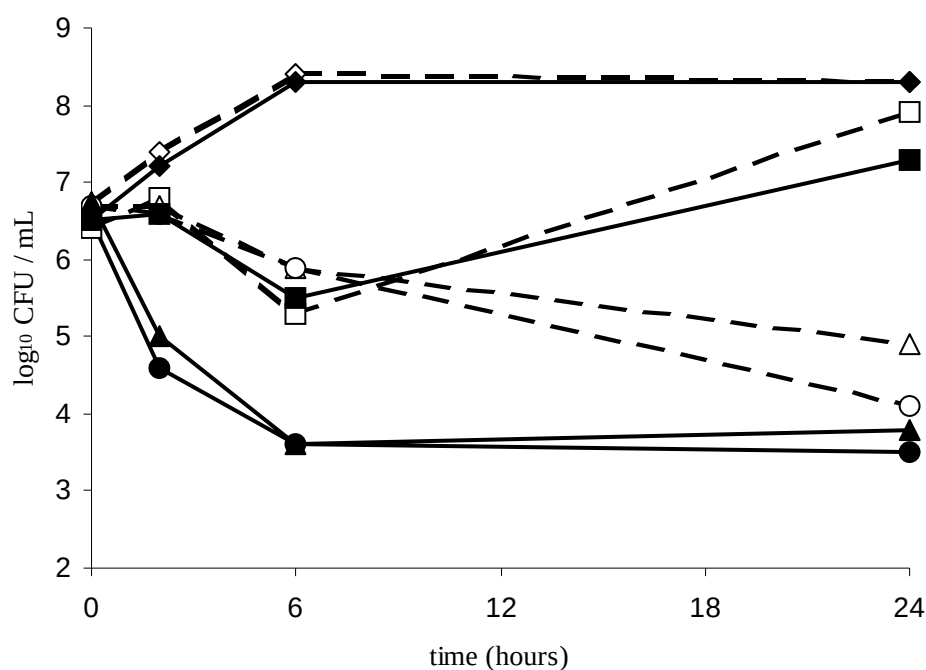
^a p < 0.0001 versus controls, Scheffe's test after ANOVA

Table 5. Activity of 1-day regimens. Mean bacterial titers in vegetations $\pm$ SD of untreated (control) and treated rabbits.

Regimen	Log ₁₀ CFU/g of vegetation (No. of animals) with strain:	
	<i>S. aureus</i> NA8	<i>S. aureus</i> BCB8
Controls	8.5 $\pm$ 0.8 (9)	8.7 $\pm$ 0.9 (13)
Gentamicin	4.2 $\pm$ 1.3 (6) ^a	7.2 $\pm$ 2.0 (5)
Quinupristin-dalfopristin (Q-D)	4.0 $\pm$ 1.1 (8) ^a	5.3 $\pm$ 1.7 (7) ^b
Gentamicin + Q-D	3.8 $\pm$ 0.4 (4) ^a	5.5 $\pm$ 2.8 (8) ^b

^a :p < 0.001; ^b :p<0.01 versus controls, Scheffe's test after ANOVA

FIGURE . Time kill curves for *S. aureus* NA8 and *S. aureus* BCB8. Results are shown for the following groups : controls (diamonds), gentamicin at 0,25 mg/L (squares), quinupristin-dalfopristin at 0,5 mg/L (triangles), and gentamicin at 0,25 mg/L in combination with quinupristin-dalfopristin at 0,5 mg/L (circles). Strain NA8 (solid lines), strain BCB8 (dashed lines).



ARTICLE IV

Etude de l'Activité *In Vivo* de l'Association Linézolide plus Gentamicine sur *Staphylococcus aureus* Résistants à la Méricilline : l'Antagonisme Observé *In Vitro* n'est pas Corrélié avec un Antagonisme *In Vivo*.

Publication : Article soumis à Int. J. Antimicrob. Agents ; **Jacqueline *et al.***



1. PRESENTATION DU TRAVAIL

L'étude *in vitro* des associations incluant le linézolide a permis de mettre en évidence un antagonisme d'une part avec la gentamicine (essentiellement sur la phase de bactéricidie précoce de l'aminoside) ainsi qu'avec la vancomycine (Jacqueline et coll 2003). Une étude (Chiang et coll 2003), utilisant le modèle d'endocardite expérimentale du lapin, a démontré la corrélation entre cet antagonisme *in vitro* et l'efficacité moindre de l'association linézolide-vancomycine *in vivo* sur une souche clinique de *S. aureus* de résistance homogène à la méticilline (Tableau VI). En effet, ce travail montre que l'activité du linézolide en association avec la vancomycine est moins importante que l'activité de la vancomycine seule. De même, une étude récente (Dailey et coll 2003), utilisant le même modèle expérimental, s'est intéressée à l'association linézolide-rifampicine sur une souche de *S. aureus* sensible à la méticilline. Il apparaît que la rifampicine, même si elle ne produit pas d'effet synergique *in vivo* dans cette association, n'antagonise pas l'activité du linézolide (Tableau VII) comme précédemment démontré avec d'autres antibiotiques comme la lévofloxacine (Chambers et coll 1999) et la vancomycine (Tofte et coll 1981, Watanakunakorn et coll 1981).

Les interactions décrites *in vitro* (synergie, antagonisme ou indifférence) ne sont pas toujours vérifiées *in vivo*, que ce soit dans les modèles animaux expérimentaux ou en pratique clinique. De nombreux paramètres complémentaires sont mis en jeu *in vivo* qui diffèrent des conditions simplistes du tube à essai où la bactérie est directement en contact avec l'antibiotique dans des conditions optimales :

- Pharmacocinétiques des deux antibiotiques de l'association (mode d'administration, paramètres pharmacocinétiques,...)
- Facteurs de l'hôte.

- Site infectieux (pénétration, diffusion,...)

A l'hôpital, le clinicien va être confronté au choix de la molécule à associer avec le linézolide. Les aminosides, de par leur bactéricidie intense et rapide, pourraient être souvent privilégiés comme partenaire du linézolide dans les infections sévères à SARM. Confronté aux résultats *in vitro* (antagonisme), le modèle expérimental s'avère donc indispensable pour confirmer ou infirmer les interactions observées.

2. RESULTATS.

L'étude a été réalisée sur deux souches de SARM sensibles à la gentamicine. Les deux antibiotiques ont été administrés en perfusion discontinue en simulant chez l'animal la pharmacocinétique humaine du linézolide (simulation correspondant à l'administration IV de 10 mg/kg/12h) et de la gentamicine (3 mg/kg/24h).

A la fin du traitement d'une durée de trois jours, l'association linézolide-gentamicine s'est révélée extrêmement efficace sur les deux souches étudiées en montrant une activité bactéricide avec une diminution d'au moins 4 log₁₀ UFC/g de végétation. Pour les deux souches, l'association apparaît plus efficace que la gentamicine seule (mais différence significative pour la souche NA8 seulement) et permet de stériliser totalement les végétations. L'antagonisme observé *in vitro* à l'aide des vitesses de bactéricidie n'est donc pas corrélé *in vivo* dans le modèle d'endocardite expérimentale.

Tableau VI. Activité du linézolide seul ou en association avec la vancomycine dans un modèle d'endocardite expérimentale à *S. aureus* (d'après Chiang et coll 2003).

Traitement	log₁₀ UFC/g végétation ± Déviation standard (nb d'animaux)
Témoins	10.2 ± 0.7 (8)
Linézolide	7.8 ± 1.0 (8)
Vancomycine	3.3 ± 3.0 (8)
Linézolide + Vancomycine	6.6 ± 1.0 (8)

Tableau VII. Activité du linézolide seul ou en association avec la rifampicine dans un modèle d'endocardite expérimentale à *S. aureus* (d'après Dailey et coll 2003).

Traitement	log₁₀ UFC/g végétation ± Déviation standard (nb d'animaux)
Témoins	8.7 ± 0.7 (6)
Linézolide	
25 mg/kg	8.1 ± 1.0 (4)
50 mg/kg	4.8 ± 2.0 (7)
75 mg/kg	3.2 ± 0.6 (7)
Rifampicine	4.0 ± 2.3 (8)
Linézolide + Rifampicine	
25 mg/kg	3.4 ± 1.7 (7)
50 mg/kg	3.4 ± 1.5 (7)
75 mg/kg	3.5 ± 1.2 (8)

2. OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE.

Les résultats obtenus *in vivo* dans ce travail s'opposent aux observations réalisées *in vitro*. Les interactions entre les deux antibiotiques vont être beaucoup plus complexes et soumises à variation permanente dans notre modèle. Ainsi, la pharmacocinétique, la vitesse de pénétration et la localisation respective des deux molécules au sein de la végétation aortique peuvent influencer le résultat de l'association.

In vitro, nous avons comparé l'activité de cette association en pré-incubant pendant 90 minutes (en bouillon MH) une souche de SARM (BCB8) avec le linézolide ou la gentamicine et en ajoutant ensuite le second partenaire de l'association. Au bout de 24 heures d'incubation totale, les bactéries survivantes sont centrifugées et fixées sur des filtres avant examen au MEB. Les photographies obtenues sont colligées sur la Figure 26. Cette technique ne permet pas d'exprimer, par exemple, le pourcentage de bactéries d'un certain type morphologique par rapport à un phénotype normal. En revanche, la MEB permet d'observer les altérations morphologiques des bactéries exposées à différents antibiotiques ou à une association. Les photos A, B et C correspondent à une pré-incubation (90 minutes) avec le linézolide. On remarque rapidement l'absence de lyse bactérienne : aucune bactérie n'a été détruite par l'association linézolide plus gentamicine dans ces conditions expérimentales. De plus, les bactéries présentent une morphologie très proche des résultats obtenus lorsque l'on expose BCB8 au linézolide seul (photo 2). En pré-incubant BCB8 avec la gentamicine, on observe majoritairement une lyse bactérienne intense : la plupart des bactéries sont totalement détruites, même si quelques bactéries présentent des formes non lysées (photo F), mais de façon minoritaire. Cette lyse est observée également lorsque BCB8 est mis en contact avec la gentamicine seule (photo 3).

Même s'il faut rester prudent avec ce type d'observations, ces résultats semblent montrer que l'ordre dans lequel le linézolide et la gentamicine sont mis en contact avec la bactérie lors de l'association peut influencer l'altération morphologique de la bactérie. Autrement dit, la séquence de contact (linézolide puis gentamicine ou gentamicine puis linézolide) entre la bactérie et les deux molécules semble avoir un impact sur le résultat final de l'association. Néanmoins, le temps de pré-incubation est ici assez long et probablement largement surestimé par rapport à la situation *in vivo*. Il serait intéressant de réduire ce temps afin de déterminer si un délai très court peut également influencer l'activité antibactérienne de l'association.

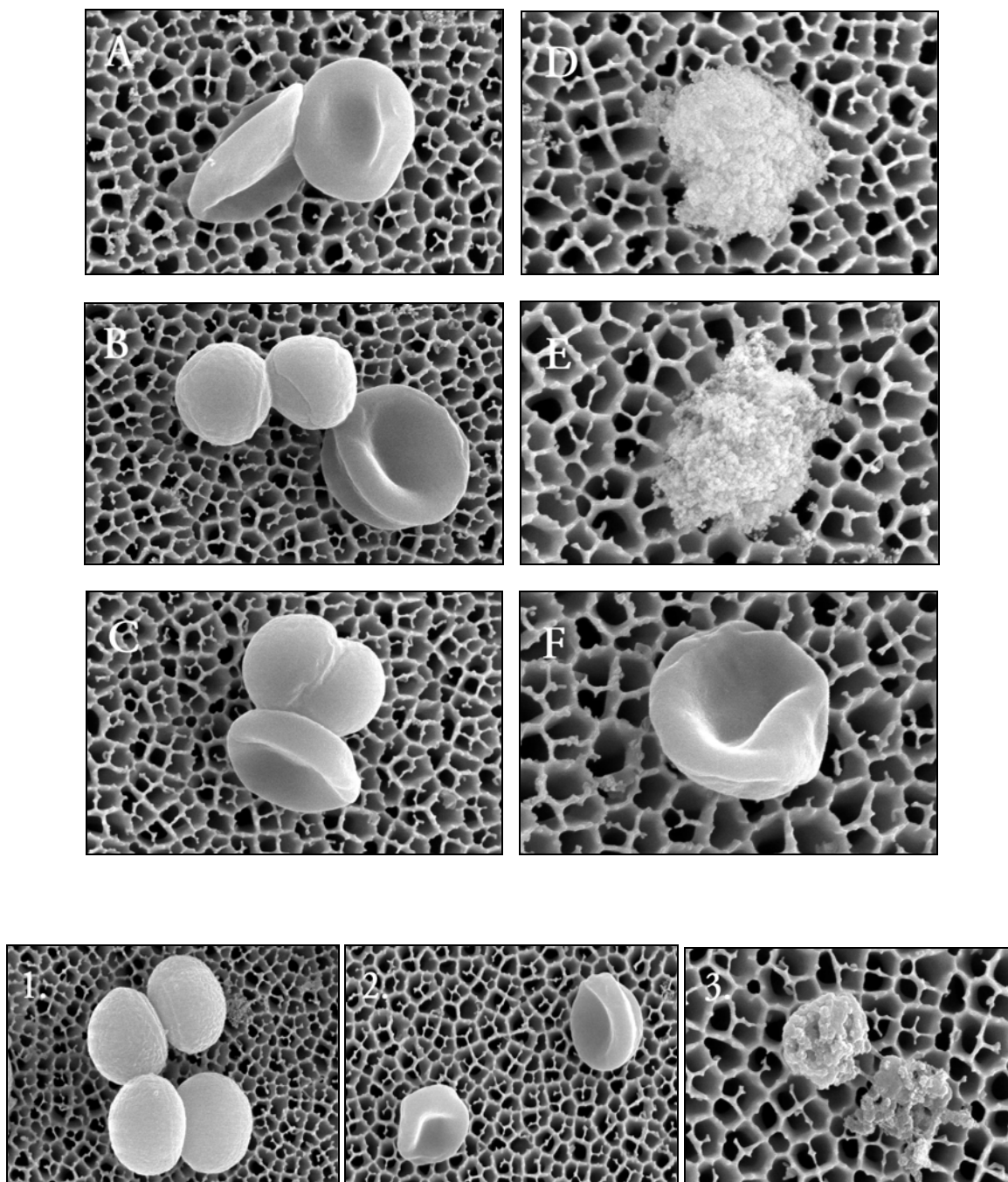


Figure 26. Photographies en MEB de la souche BCB8 pré-exposée au linézolide (A, B et C) ou à la gentamicine (D, E et F) pendant 90 minutes suivie de l'incorporation du second antibiotique partenaire (incubation totale de 24 heures à 37°C). 1 : Souche BCB8 non exposée à un antibiotique (témoin) ; 2 : Souche BCB8 exposée au linézolide seul ; 3 : Souche BCB8 exposée à la gentamicine uniquement.

CONCLUSIONS - PERSPECTIVES

Au cours de ce travail, nous nous sommes attachés à caractériser et à optimiser l'activité antibactérienne de deux nouvelles molécules antistaphylococques en nous intéressant plus particulièrement au linézolide. Nous avons suivi deux voies principales :

1. Caractérisation et optimisation de l'activité du linézolide *in vitro* et *in vivo*.
2. Activité de différentes associations incluant le linézolide et la quinupristine-dalfopristine *in vitro* et *in vivo*.

Le fil conducteur de ce travail est la corrélation des données préalablement acquises *in vitro* à l'aide du modèle d'endocardite expérimentale du lapin. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence la supériorité de l'administration en perfusion continue par rapport à la perfusion discontinue, mode d'administration actuellement retenu pour le linézolide (2 fois par jour). De plus, la simulation chez l'animal de la pharmacocinétique humaine de cette nouvelle molécule nous a permis de nous affranchir en partie des problèmes d'extrapolation des résultats à la clinique humaine. Dans le contexte d'infections sévères à SARM, les associations d'antibiotiques se révèlent le plus souvent indispensables. Nous avons dans un premier temps exploré l'activité antibactérienne de différentes molécules en combinaison avec le linézolide ou la quinupristine-dalfopristine à l'aide de différentes méthodes d'études *in vitro*. Celles-ci nous ont permis de statuer sur les interactions régissant ces associations d'antibiotiques et par la suite de déterminer quelle association méritait d'être étudiée *in vivo* dans le modèle animal expérimental. L'association quinupristine-dalfopristine + gentamicine apparaît indifférente *in vitro* et cette absence d'interaction est confirmée *in vivo* où l'addition de gentamicine n'améliore pas l'activité *in vivo* de la quinupristine-dalfopristine, que ce soit en terme d'activité antibactérienne ou de sélection de mutants-résistants. En utilisant la technique des vitesses de bactéricidie, un

antagonisme est observé lorsqu'on associe le linézolide avec la vancomycine et la gentamicine, principalement sur la phase de bactéricidie précoce de l'aminoside. Toujours *in vitro*, l'association linézolide-rifampicine apparaissait comme la bithérapie la plus active sur les quatre souches de SARM étudiées.

Enfin, l'intérêt de la corrélation *in vitro* / *in vivo* est particulièrement souligné par l'interaction linézolide-gentamicine. En effet, cette association a démontré son efficacité *in vivo* sur deux souches de SARM alors qu'elle était apparue antagoniste *in vitro*.

A partir de l'ensemble de ces données, plusieurs pistes mériteraient d'être explorées :

- Si les caractéristiques PK-PD du linézolide peuvent en partie expliquer la supériorité de l'administration en perfusion continue, des études restent nécessaires afin de mieux appréhender les paramètres responsables de cette activité accrue. En effet, si le paramètre $T > C_{MI}$ semble particulièrement prédictif de l'efficacité du linézolide, il reste encore à définir le ratio [concentration/ C_{MI}] optimum et on peut se demander si une administration fractionnée en trois fois par jour au lieu de deux pourrait égaler l'efficacité de la perfusion continue, qui simule en fait un fractionnement à l'infini.
- Il existe de nombreuses techniques d'étude *in vitro* en milieu liquide et en milieu gélosé permettant de juger la valeur d'une association d'antibiotiques. Les résultats peuvent être difficiles à interpréter et des discordances sont notées d'une technique à l'autre. La détermination *in vitro* de l'interaction entre deux molécules antibactériennes reste encore difficile à corréler avec les résultats dans les modèles animaux expérimentaux ou en clinique, comme démontré pour l'association linézolide + gentamicine. En conséquence, il serait intéressant

d'étudier les raisons impliquées dans ces différences de résultats afin d'améliorer la prédictivité des tests.

- Un antibiotique est considéré comme bactéricide quand il est capable de diminuer l'inoculum bactérien de 3 log₁₀ UFC en 24 heures. De ce point de vue, l'activité du linézolide est considérée comme bactériostatique *in vitro*. Néanmoins, le linézolide administré en perfusion continue (à débit constant) exhibe une activité « bactéricide » *in vivo* sur les trois souches de SARM testées. Si cette amélioration de l'efficacité antibactérienne peut être en partie expliquée par l'augmentation du paramètre T>MIC, d'autres facteurs mériteraient d'être étudiés :

- Des co-facteurs de l'hôte (connus ou inconnus) impliqués dans la bactéricidie pourraient jouer un rôle dans le succès du traitement des infections sévères (endocardites). Les t-PMP (Thrombin-induced Platelet Microbicidal Protein) et HNP (Human Neutrophil Defensin) sont des peptides cationiques antibactériens possédant une activité *in vitro* sur de nombreux pathogènes comme *Staphylococcus aureus* (Xiong et coll 1999). L'étude de ces facteurs de l'hôte et de leurs influences pourraient être une voie intéressante de travail dans le but de mieux comprendre l'interaction entre l'antibiotique, la bactérie et l'hôte.
- *In vitro*, le linézolide semble capable d'inhiber l'expression de certains facteurs de virulence de *S. aureus* comme l' α -hémolysine, δ -hémolysine et la coagulase, impliquées dans le processus infectieux (Gemmell et coll 2002). L'inhibition *in vivo* de ces facteurs de virulence pourrait être étudiée dans le but de déterminer l'impact de cette inhibition sur l'activité antibactérienne du linézolide.

- La dernière étude en cours, non encore soumise à publication, s'est intéressée à l'activité du linézolide en association avec l'imipénème sur des souches de SARM. *In vitro*, cette association apparaît synergique mais semble requérir de faibles concentrations d'imipénème (de l'ordre de 1/16 à 1/128xCMI) et des concentrations proches de la CMI pour le linézolide. Afin de confirmer la synergie *in vivo*, nous avons testé cette association en administrant le linézolide en perfusion discontinue (simulation de 10 mg/kg/12h) et l'imipénème en perfusion continue, à débit constant, afin d'atteindre une concentration sérique à l'état d'équilibre d'environ CMI/32 (imipénème) pour chacune des deux souches de SARM étudiées. Après 5 jours de traitement, l'administration en association du linézolide et de l'imipénème apparaît synergique sur les deux souches de SARM et semble confirmer les observations réalisées *in vitro*. Ce travail ouvre de nombreuses perspectives :
 - Après avoir confirmé *in vivo* les résultats obtenus *in vitro*, il est nécessaire de vérifier si la synergie est conservée en utilisant d'une part, une administration en perfusion discontinue du carbapénème (mode d'administration usuel) et d'autre part, en administrant les posologies d'imipénème recommandées en pratique clinique pour le traitement des infections sévères.
 - D'un point de vue plus fondamental, la recherche du mécanisme d'action impliqué dans la synergie entre les deux antibiotiques reste une perspective attractive et nécessaire afin de mieux comprendre les interactions entre les deux molécules.
- Enfin, l'utilisation d'autres modèles animaux expérimentaux (comme le modèle de pneumonie expérimentale) pourrait apporter une meilleure compréhension de

l'activité *in vivo* des nouvelles molécules antibactériennes en ciblant d'autres physiopathologies et en utilisant les particularités PK/PD de ces molécules, comme par exemple l'excellente diffusion du linézolide dans le tissu pulmonaire (Conte et coll 2002).

REFERENCES

A

- ✚ **Amsterdam, D.** 1996. Susceptibility testing of antibiotics in liquid media. In *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 4th edn (Lorian, V. Eds), pp. 52-111. Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- ✚ **Andes, D., and W.A. Craig.** 1998. *In vivo* activities of amoxicillin and amoxicillin-clavulanate against *Streptococcus pneumoniae*: application to breakpoint determination. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:2375-9.
- ✚ **Andes, D., M.L. van Ogtrop, and W.A. Craig.** 1998. Pharmacodynamic activity of a new oxazolidinone, linezolid, in an animal infection model. In Program and Abstract of the 38th ICAAC, San Diego, CA, 1998. Abstract **A-9**, p.3. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.
- ✚ **Andes, D., and W.A. Craig.** 2002. Animal model pharmacokinetics and pharmacodynamics: a critical review. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **19**:261-8.
- ✚ **Andrade-Baiocchi, S., M.C. Tognim, O.C. Baiocchi, and H.S. Sader.** 2003. Endocarditis due to glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus*: case report and strain characterization. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **45**:149-52.
- ✚ **Aoki, H., L. Ke, S.M. Poppe, T.J. Poel, E.A. Weaver, R.C. Gadwood, et al.** 2002. Oxazolidinone antibiotics target the P site on *Escherichia coli* ribosomes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1080-5.
- ✚ **Archer, G., and D.M. Niemeyer.** 1994. Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in staphylococci. *Trends in Microbiology.* **2**:343-7.

- ✚ **Attassi, K., E. Hershberger, R. Alam, and M.J. Zervos.** 2002. Thrombocytopenia associated with linezolid therapy. *Clin. Infect. Dis.* **34**:695-698.
- ✚ **Aubry-Damon, H., P. Legrand, C. Brun-Buisson, A. Astier, C.J. Soussy, and R. Leclercq.** 1997. Reemergence of gentamicin-susceptible strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Roles of an infection control program and changes in aminoglycoside use. *Clin. Infect. Dis.* **25**:647-53.

B

- ✚ **Babcock, H.M., D.J. Ritchie, E. Christiansen, R. Starlin, R. Little, and S. Stanley.** 2001. Successful treatment of vancomycin-resistant *Enterococcus* endocarditis with oral linezolid. *Clin. Infect. Dis.* **32**:1373-5.
- ✚ **Berger-Bachi, B.** 1999. Genetic basis of methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus*. *Cell. Mol. Life Sci.* **56**:764-70.
- ✚ **Bergogne-Bérézin, E.** 2003. 10^e symposium international sur les staphylocoques et les infections staphylococciques. *Antibiotiques.* **5**:115-9.
- ✚ **Boo, T.W., R. Hone, G. Sheehan, and M. Walsh.** 2003. Isolation of linezolid-resistant *Enterococcus faecalis*. *J. Hosp. Infect.* **53**:321-4.
- ✚ **Bouza, E., and P. Muñoz.** 2001. Linezolid: pharmacokinetic characteristics and clinical studies. *Clin. Microb. Infect.* **7**(Suppl.):75-82.
- ✚ **Brun-Buisson, Ch.** 1998. Les *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline : évolution et épidémiologie, impact clinique, prévention. *Path. Biol.* **46**:227-34.
- ✚ **Bugnon, D., G. Potel, J. Caillon, D. Baron, H.B. Drugeon, P. Feigel, and M.F. Kergueris.** 1998. *In vivo* simulation of human pharmacokinetics in the rabbit. *Bull. Math. Biol.* **60**:545-567.

C

- ✚ **Cappelletty, D.M., S.L. Kang, S.M. Palmer, and M.J. Rybak.** 1995. Pharmacodynamics of ceftazidime administered as continuous infusion or intermittent bolus alone and in combination with single daily dose amikacin against *Pseudomonas aeruginosa* in an *in vitro* infection model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:1797-1801.
- ✚ **Carbon, C.** 1990. Impact of the antibiotic schedule on efficacy in experimental endocarditis. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* **74**:163-72.
- ✚ **Centers for Disease Control and Prevention.** 2002. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*-Pennsylvania, 2002. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **51**:902.
- ✚ **Chambers, H.F., Q.X. Liu, L.L. Chow, and C. Hackbarth.** 1999. Efficacy of levofloxacin for experimental aortic-valve endocarditis in rabbits infected with viridans group streptococcus or *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:2742-6.
- ✚ **Chang, S. et al.** 2003. Infection with VRSA containing the *vanA* resistance gene. *N. Engl. J. Med.* **348**:1342-7.
- ✚ **Chesneau, O., A. Morvan, and N.E. Sohl.** 2000. Retrospective screening for heterogeneous vancomycin resistance in diverse *Staphylococcus aureus* clones disseminated in French hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**:887-90.
- ✚ **Chiang, F., and M. Climo.** 2002. Efficacy of linezolid alone and in combination with vancomycin for the treatment of experimental endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). In Program and Abstracts of the 42nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Diego, Cal.,

2002. Abstract **B-276**, p.33. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.

✚ **Cho, Y., M. Kim, C.S. Lee, and H. Youn.** 2002. The *in vitro* activity of LB11058, a new parenteral cephalosporin with activity against multiresistant Gram positive bacteria. In *Program and Abstracts of the 42nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Diego, Cal., 2002*. Abstract **F-330**, p.173. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.

✚ **Cocito, C., M. Di Giambattista, E. Nyssen, and P. Vannuffel.** 1997. Inhibition of protein synthesis by streptogramins and related antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* **39**(Suppl. A):7-13.

✚ **Collins, L.A., G.M. Eliopoulos, C.B. Wennerstern, M.J. Ferraro, and R.C., Jr. Moellering.** 1993. *In vitro* activity of ramoplanin against vancomycin-resistant Gram-positive organisms. *Antimicrobial. Agents Chemother.* **37**:1364-6

✚ **Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie,** Communiqué 2002.

✚ **Conte, J.E. Jr, J.A. Golden, J. Kipps, and E. Zurlinden.** 2002. Intrapulmonary pharmacokinetics of linezolid. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1475-80.

✚ **Craig, W.A., and S. Gudmundsson.** 1996. Postantibiotic effect. In: Lorian, V., Editor. *Antibiotics in laboratory Medicine*. Baltimore: Williams and Wilkins, 296:329.

✚ **Craig, W.A.** 1997. Postantibiotic effects and the dosing of macrolides, azalides, and streptogramins. In: Zinner, S.H., Young, L.S., Acar, J.F., Neu, H.C., Editors. *Expanding indications for the new macrolides, azalides and streptogramins*. New York, USA: Marcel Dekker, 1997:27-38.

✚ **Craig, W.A.** 2001. Dose the dose matter. *Clin. Infect. Dis.* **22**(Suppl.3):233-7.

✚ **Critchley. A.L., R.S. Blosser, S.B. Porter, J.S. Loutit, M.E. Jones, C. Thornsberry, J.A. Karlowski, and D.F. Sahm.** 2002. Activity of oritavancin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* collected from blood specimens in the U.S. *In Program and Abstracts of the 42nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Diego, Cal., 2002.* Abstract **E-1452**, p.162. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.

D

✚ **Dailey, C.F., C.L. Dileto-Fang, L.V. Buchanan, M.P. Oramas-Shirey, D.H. Batts, C.W. Ford, and J.K. Gibson.** 2001. Efficacy of linezolid in treatment of experimental endocarditis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **45**:2304-2308.

✚ **Dailey, C.F., P.J. Pagano, L.V. Buchanan, J.A. Paquette, J.V. Haas, and J.K. Gibson.** 2003. Efficacy of linezolid plus rifampin in an experimental model of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:2655-8.

✚ **David, T.J., and J. Devlin.** 1989. Continuous infusion of ceftazidime in cystic fibrosis. *Lancet.* **24**:1454-1455.

✚ **Dhawan, V.K., M.R. Yeaman, and A.S. Bayer.** 1999. Influence of *in vitro* susceptibility phenotype against thrombin-induced platelet microbicidal protein on treatment and prophylaxis outcomes of experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis. *J. Infect. Dis.* **180**:1561-8.

✚ **Drugeon, H.B., P. Dellamonica, and J. Caillon.** 1987. Synergy, addition, indifference, antagonism and dominance. Dominance and antibiotic combination. *Pathol. Biol.* **35**:495-500.

✚ **Drugeon, H.B., and V. Drocourt.** 1994. Méthode simple pour déterminer la classe d'expression de la résistance à la méticilline. *Path. Biol.* **42**:460-4.

E

✚ **Eliopoulos, G.M., and R.C., Jr., Moellering.** 1996. Antimicrobial combinations. In *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 4th edn (Lorian, V. Eds), p. 330-96. Williams & Wilkins Co., Baltimore.

✚ **Entenza, J.M., H.B. Drugeon, M.P. Glauser, and P. Moreillon.** 1995. Treatment of experimental endocarditis due to erythromycin-susceptible or –resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with RP59500. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1419-24.

✚ **European Antimicrobial Resistance Surveillance System.** 2000. *EARSS Newsletter* **2**:1-8.

✚ **Eustice, D.C., P.A. Feldman, and A.M. Slee.** 1988. Mechanism of action of DuP 721: inhibition of an early event during initiation of protein synthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**:1218-22.

F

✚ **Fantin, B., and C. Carbon.** 1992. *In vivo* antibiotic synergism: contribution of animals models. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:907-12.

-  **Fantin, B., R. Leclercq, Y. Merlé, L. Saint-Julien, C. Veyrat, J. Duval, and C. Carbon.** 1995. Critical influence of resistance to streptogramin B-type antibiotics on activity of RP59500 (quinupristin-dalfopristin) in experimental endocarditis due to *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:400-5.
-  **Fantin, B.** 2002. Les nouveaux antistaphylococciques. *Ann. Fr. Anesth. Réanim.* **21**:424-30.
-  **Fass, R.J.** 1991. *In vitro* activity of RP 59500, a semisynthetic injectable pristinamycin, against Staphylococci, Streptococci, and Enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:553-559.
-  **Fines, M., and R. Leclercq.** 2000. Activity of linezolid against Gram-positive cocci possessing genes conferring resistance to protein synthesis inhibitors. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**:797-802.
-  **Ford, C.W., J.C. Hamel, D. Stapert, J.K. Moerman, D.K. Hutchinson, M.R. Barbachyn, et al.** 1997. Oxazolidinones: new antibacterial agents. *Trends Microb.* **5**:196-200.
-  **Fridkin, S.A.** 2001. Vancomycin-intermediate and-resistant *Staphylococcus aureus*: what the infectious disease specialist needs to know. *Clin. Infect. Dis.* **32**:108-15.

G

-  **Gadwood, R. and Shinabarger, D.** 2000. Progress in oxazolidinone antibacterials. *Annu. Rep. Med. Chem.* **35**:135-44.

- ✚ **Gee, T., R. Ellis, G. Marshall, J. Andrews, J. Ashby, and R. Wise.** 2001. Pharmacokinetics and tissue penetration of linezolid following multiple oral doses. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1843-6.
- ✚ **Gemmell, C.G., and C.W. Ford.** 2002. Virulence factor expression by Gram-positive cocci exposed to subinhibitory concentrations of linezolid. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**:665-72.
- ✚ **Gonzales, R.D., P.C. Schreckenberger, M.B. Graham, S. Kelkar, K. DenBesten, and J.P. Quinn.** 2001. Infections due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* resistant to linezolid. *Lancet.* **357**:1179.
- ✚ **Goessens, W.H.F., P. Fontjine, and M.F. Michel.** 1984. Responses of tolerant and non tolerant *Staphylococcus aureus* strains to methicillin treatment in an experimental infection in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **26**:829-32.
- ✚ **Goossens, H., D. Jabes, R. Rossi, C. Lammens, G. Privitera, and P. Courvalin.** 2003. European survey of vancomycin-resistant enterococci in at-risk hospital wards and *in vitro* susceptibility testing of ramoplanin against these isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **51** (Suppl. 3):iii5-iii12.
- ✚ **Gopal Rao, G., A. Steger and C.M. Tobin.** 2001. Linezolid levels in pancreatic secretions. *J. Antimicrob. Chemother.* **48**:931-932.
- ✚ **Green, S.L., J.C. Maddox, and E.D. Huttenbach.** 2001. Linezolid and reversible myelosuppression. *JAMA.* **285**:1291.

H

- ✚ **Hiramatsu, K., H. Hanaki, T. Ino, K. Yabuta, T. Oguri, and F.C. Tenover.** 1997. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. J. Antimicrob. Chemother. **40**:135-6.
- ✚ **Hiramatsu, K., N. Aritaka, H. Hanaki. et al.** 1997. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. Lancet. **350**:1670-3.
- ✚ **Hiramatsu, K., K. Ito, and H. Hanaki.** 1999. Mechanisms of methicillin and vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. Balliere's Clinical Infectious Diseases. **5**:221-42.
- ✚ **Hyatt, J.M., P.S. McKinnon, G.S. Zimmer, and J.J. Schentag.** 1995. The importance of pharmacokinetic/pharmacologic surrogate markers of outcome. Focus on antibacterial agents. Clin. Pharmacokinet. **28**:143-60.

I - J

- ✚ **Jacqueline, C., E. Batard, L. Perez, D. Bouteille, A. Hamel, J. Caillon, M.F. Kergueris, G. Potel, and D. Bugnon.** 2002. *In vivo* efficacy of continuous infusion versus intermittent dosing of linezolid compared to vancomycin in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* rabbit endocarditis model. Antimicrob. Agents. Chemother. **46**:3706-11.
- ✚ **Jacqueline, C., J. Caillon, V. Le Mabecque, A.F. Miegville, P.Y. Donnio, D. Bugnon, and G. Potel.** 2003. *In vitro* activity of linezolid alone and in combination with gentamicin, vancomycin or rifampicin against methicillin-resistant

Staphylococcus aureus by time-kill curve method. J. Antimicrob. Chemother. **51**:857-64.

K

✚ **Kaatz, G.W., S.M. Seo, N.J. Dorman, and S.A. Lerner.** 1990. Emergence of teicoplanin resistance during therapy of *Staphylococcus aureus* endocarditis. J. Infect. Dis. **162**:103-13.

✚ **Kaatz, G.W., and S.M. Seo.** 1996. *In vitro* activities of oxazolidinone compounds U100592 and U100766 against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob. Agents Chemother. **40**:799-801.

✚ **Kang, S.L., and M.J. Rybak.** 1997. *In vitro* bactericidal activity of quinupristin-dalfopristin alone and in combination against resistant strains of *Enterococcus* species and *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob. Chemother. **39**(Suppl A):33-9.

✚ **Kauffman, C.A.** 2003. Therapeutic and preventative options for the management of vancomycin-resistant enterococcal infections. J. Antimicrob. Chemother. **51**(Suppl 3):III23-III30.

✚ **Khurshid, M.A.** 2000. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. MMWR. **48**:1165-7.

✚ **Knudsen, J.D., K. Fursted, F. Espersen, et al.** 1997. Activities of vancomycin and teicoplanin against penicillin-resistant pneumococci *in vitro* and *in vivo* and correlation to pharmacokinetic parameters in the mouse peritonitis model. Antimicrob. Agents Chemother. **41**:1910-5.

✚ **Knudsen, J.D., K. Fursted, S. Raber, et al.** 2000. Pharmacodynamics of glycopeptides in the mouse peritonitis model of *Streptococcus pneumoniae* or *Staphylococcus aureus* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:1247-54.

✚ **Kurazono, M., K. Yamada, Y. Hirai, K. Katsumata, T. Ida, M. Yonezawa, and K. Ubukata.** 2002. CP5609, a novel parenteral carbapenem: *in vitro* activities against methicillin-resistant *S. aureus*, penicillin-resistant *S. pneumoniae*, and b-lactamase negative ampicillin-resistant *H. influenzae*. In *Program and Abstracts of the 42nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Diego, Cal., 2002*. Abstract **F-320**, p.171. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.

✚ **Kuwahara-Arai, K., K. Okuma, H. Hanaki, and K. Hiramatsu.** 2002. Evaluation of *in vitro* antibacterial activity of GAR-936 against community-acquired MRSA (C-MRSA) and hospital-acquired MRSA (H-MRSA) including strains resistant to vancomycin (VRSA or VISA).). In *Program and Abstracts of the 42nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Diego, Cal., 2002*. Abstract **E-1137**, p.159. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA

L

✚ **Le, T., and A.S. Bayer.** 2003. Combination antibiotic therapy for infective endocarditis. *Clin. Infect. Dis.* **36**:615-21.

✚ **Leclercq, R. and P. Courvalin.** 1991. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:1267-72.

- ✚ **Leclercq, R.** 2002. Les coques à Gram-positif multirésistants aux antibiotiques : intérêt du linézolide. *Médecine et Maladies Infectieuses*. **32**:449-59.
- ✚ **Leclercq, R.** 2002. Résistance des staphylocoques aux antibiotiques. *Ann. Fr. Anesth. Réanim.* **21**:375-83.
- ✚ **Lefort, A., J. Pavie, L. Garry, F. Chau, and B. Fantin.** 2002. Activity of dalvabancin (BI-397) *in vitro* and in experimental endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) susceptible or intermediate to glycopeptides (GISA). In *Program and Abstracts of the 42nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Diego, Cal., 2002*. Abstract **B-278**, p.33. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.
- ✚ **Lepelletier, D., and H. Richet.** 2001. Surveillance et contrôle des infections à *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline dans les hôpitaux français. *Bull. Epidemiol. Hebdom.* **24**:1-6.
- ✚ **Lepper, M.H., and H.F. Dowling.** 1951. Treatment of pneumococcic meningitis with penicillin compared with penicillin plus aureomycin: Studies including observations on an apparent antagonism between penicillin and aureomycin. *Arch. Intern. Med.* **88**:489-94.
- ✚ **Levy, S.** 1998. Multidrug resistance – a sign of the times. *N. Engl. J. Med.* **338**:1376-8.
- ✚ **Li, J.Z., R.J. Willke, B.E. Rittenhouse, and M.J. Rybak.** 2003. Effect of linezolid versus vancomycin on length of hospital stay in patients with complicated skin and soft tissue infections caused by known or suspected methicillin-resistant staphylococci: results from a randomized clinical trial. *Surg. Infect.* **4**:57-70.
- ✚ **L'infection nosocomiale sous surveillance** – Prévalence 2001, incidence et signalement des infections nosocomiales. Ministère délégué à la santé. 5 Mars 2002.

- ✚ **Livermore, D.M.** 2003. Linezolid *in vitro*: mechanism and antibacterial spectrum. J. Antimicrob. Chemother. **51**(Suppl. S2):ii9-ii16.
- ✚ **Lowy, F.D.** 1998. *Staphylococcus aureus* infection. N. Engl. J. Med. **339**:520-32.
- ✚ **Lui, C., and H.F. Chambers.** 2003. *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin: epidemiology, clinical significance, and critical assessment of diagnostic methods. Antimicrob. Agents Chemother. **47**:3040-5

M

- ✚ **Mainardi, J.L., D.M. Shlaes, R.V. Goering, J.H. Shlaes, J.F. Acar, and F.W. Goldstein.** 1995. Decreased teicoplanin susceptibility of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. J. Infect. Dis. **171**:1646-50.
- ✚ **Melzer, M., D. Goldsmith, and W. Gransden.** 2000. Successful treatment of vertebral osteomyelitis with linezolid in a patient receiving hemodialysis and with persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus* bacteremias. Clin. Infect. Dis. **31**:208-9.
- ✚ **Mingeot-leclercq, P., Y. Glupczynski, and P.M. Tulkens.** 1999. Aminoglycosides: activity and resistance. Antimicrob. Agents. Chemother. **43**:727-37.
- ✚ **Montecalvo, M.A.** 2003. Ramoplanin: a novel antimicrobial agent with the potential to prevent vancomycin-resistant enterococcal infection in high-risk patients. J. Antimicrob. Chemother. **51**(Suppl.S3):iii31-iii35].
- ✚ **Murray, B.E.** 2000. Vancomycin-resistant enterococcal infections. N. Engl. J. Med. **342**:710-21.
- ✚ **Mutnick, A.H., V. Enne, and R.N. Jones.** 2003. Linezolid resistance since 2001: SENTRY antimicrobial surveillance program. Ann. Pharmacother. **37**:769-74.

N

- ✚ Nagura, J., T. Sugano, A. Yamamoto, Y. Takase, S. Sakakibara, H. Takata, K. Matsumoto, *et al.* 2002. CP5609, a novel parenteral carbapenem: efficacy on experimental endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In *Program and Abstracts of the 42nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Diego, Cal., 2002*. Abstract **F-321**, p.171. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.
- ✚ **National Nosocomial Infections Surveillance.** 1999. System report, data summary from January 1990-May 1999, issued June 1999. *Am. J. Infect. Control.* **27**:520-32.
- ✚ Nicolau, D.P., C.H. Nightingale, M.A. Banevicius, Q. FU, and R. Quintiliani. 1996. Serum bactericidal activity of ceftazidime: continuous infusion versus intermittent injections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:61-64.
- ✚ Noble, W.C., Z. Virani, and R.G. Cree. 1992. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microb. Letters.* **93**:195-8.

O - P

- ✚ **[Online Réf1]** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bookres.fcgi/mcb/ch4f36.gif> (25 Septembre 2003, date last accessed).
- ✚ **[Online Réf2]** <http://www.hybridmedicalanimation.com/media/ribosome.jpg> (25 Septembre 2003, date last accessed).

- ✚ **Oramas-Shirey, M.P., L.V. Buchanan, C.L. Dileto-Fang, C.F. Dailey, C.W. Ford, D.H. Batts, and J.K. Gibson.** 2001. Efficacy of linezolid in a staphylococcal endocarditis rabbit model. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**:349-352.
- ✚ **Peetermans, W.E., J.J. Hoogeterp, A.M. Hazekamp-vanDokkum, et al.** 1990. Antistaphylococcal activities of teicoplanin and vancomycin *in vitro* and in experimental infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:1869-74.
- ✚ **Pierre, J., and L. Gutmann.** 1988. Bases biochimiques et génétiques de la résistance aux bêta-lactamines chez les staphylocoques. *La lettre de l'infectiologue.* **19**:734-8.
- ✚ **Pina, P., C. Marlière, F. Vandenesch, J.P. Bedos, J. Etienne, and P.Y. Allouch.** 2000. An outbreak of *Staphylococcus aureus* strains with reduced susceptibility to glycopeptides in a french general hospital. *Clin Infect. Dis.* **31**:1306-8.
- ✚ **Prystowsky, J., F. Siddiqui, J. Chosay, D.L. Shinabarger, J. Millichap, L.R. Peterson. et al.** 2001. Resistance to linezolid: characterization of mutations in rRNA and comparison of their occurrence in vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:2154-6.

Q - R

- ✚ **Rand, H.K., H.J. Houck, P. Brown, and D. Bennett.** 1993. Reproducibility of the microdilution checkerboard method for antibiotic synergy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:613-5.
- ✚ **Reverdy, M.E., S. Jarraud, S. Bobin-Dubreux, E. Burel, P. Girardo, G. Lina, et al.** 2001. Incidence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to glycopeptides in two french hospitals. *Clin. Microbiol. Infect.* **7**:327-32.

- ✚ **Reynolds, P.E., and E.A. Sommer.** 1990. Comparison of the target site and mechanisms of action of glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics. *Drugs Exp. Clin. Res.* **16**:385-9.
- ✚ **Rice, L.B.** 2001. Emergence of vancomycin-resistant Enterococci. *Emerg. Infect. Dis.* **7**:183-7.
- ✚ **Richter, S.S., D.E. Kealey, C.T. Murray, K.P. Heilmann, S.L. Coffman, and G.V. Doern.** 2003. The *in vitro* activity of daptomycin against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* species. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**:123-7.
- ✚ **Robaux, M.A., L. Dube, J. Caillon, D. Bugnon, M.F. Kergueris, D. Navas, P. Le Conte, D. Baron, and G. Potel.** 2001. *In vivo* efficacy of continuous infusion versus intermittent dosing of ceftazidime alone or in combination with amikacin relative to human kinetic profiles in a *Pseudomonas aeruginosa* rabbit endocarditis model. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**:617-622.
- ✚ **Roberts, M.C., J. Sutcliffe, P. Courvalin, L. Bogo Jensen, J. Rood, and H. Seppala.** 1999. Nomenclature for macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:2823-30.
- ✚ **Rodriguez-Avial, I., C. Rodriguez-Avial, E. Culebras, J.J. Picazo.** 2003. Distribution of tetracycline resistance genes tet(M), tet(O), tet(L) and tet(K) in blood isolates of viridans group streptococci harbouring erm(B) and mef(A) genes. Susceptibility to quinupristin/dalfopristin and linezolid. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **21**:536-41.
- ✚ **Rotun, S.S, V. McMath, D.J. Schoonamker, et al.** 1999. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin isolated from a patient with fatal bacteremia. *Emerg. Infect. Dis.* **5**:147-9.

- ✚ **Rubinstein, E., S.K. Cammarata, T.H. Oliphant, R.G. Wunderink, and the Linezolid Nosocomial Pneumonia Study Group.** 2001. Linezolid (PNU-100766) versus vancomycin in the treatment of hospitalized patients with nosocomial pneumonia: a randomized, double-blind, multicenter study. *Clin. Infect. Dis.* **32**:402-12.
- ✚ **Ruiz, M.E., I.C. Guerrero, and C.U. Tuazon.** 2002. Endocarditis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Treatment failure with linezolid. *Clin. Infect. Dis.* **35**:1018-20.
- ✚ **Rybak, M.J., D.M. Cappelletty, T. Moldovan, J.R. Aeschlimann, and G.W. Kaatz.** 1998. Comparative *in vitro* activities and postantibiotic effects of the oxazolidinone compounds eperezolid (PNU-100592) and linezolid (PNU-100766) versus vancomycin against *Staphylococcus aureus*, coagulase-negative Staphylococci, *Enterococcus faecalis*, and *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:721-4.

S

- ✚ **Shinabarger, D.L., K.R. Marotti, R.W. Murray, A.H. Lin, E.P. Melchior, S.M. Swaney, et al.** 1997. Mechanism of action of oxazolidinones: effects of linezolid and eperezolid on translation reactions. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:2132-6.
- ✚ **Siegel, R.E.** 2003. Linezolid to decrease length of stay in the hospital for patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin. Infect. Dis.* **36**:124.
- ✚ **Sieradzki, K., R.B. Roberts, S.W. Haber, and A. Tomasz.** 1999. The development of vancomycin resistance in a patient with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *N. Engl. J. Med.* **40**:517-23.

- ✚ Sievert, D.M. 2002. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin. MMWR. 51:565-7.
- ✚ Slatter, J.G., D.J. Stalker, K.L. Feenstra, I.R. Welshman, J.B. Bruss, J.P. Sams *et al.* 2001. Pharmacokinetics, metabolism, and excretion of linezolid following an oral dose of (14) C linezolid to healthy human subjects. Drug. Metab. Dispos. **29**:1136-45.
- ✚ Slee, A.M., M.A. Wuonola, R.J. McRipley, I. Zajac, M.J. Zawada, P. Bartholomew, *et al.* 1987. Oxazolidinones, a new class of synthetic antibacterial agents: *in vitro* and *in vivo* activities of Dup 105 and DuP 721. Antimicrob. Agents Chemother. **31**:1791-7.
- ✚ Smith, T.L., M.L. Pearson, K.R. Wilcox, *et al.* 1999. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. N. Engl. J. Med. **340**:493-501.
- ✚ Soussy, C.J. 1990. Associations d'antibiotiques. *Ds Bactéricidie*, aspects théoriques et thérapeutiques. pp.173-82. Editions Maloine.
- ✚ Sperber, S.J., J.F. Levine, and P.A. Grohs. 2003. Persistent MRSA bacteremia in a patient with low linezolid levels. Clin. Infect. Dis. **36**:675-6.
- ✚ Stevens, D.L., L.G. Smith, J.B. Bruss, M.A. McConnell-Martin, S.E. Duvall, W.M. Todd, B. Hafkin for the linezolid Skin and Soft Tissue Infections Study Group. 2000. Randomized comparison of linezolid (PNU-100766) versus oxacillin-dicloxacillin for treatment of complicated skin and soft tissue infections. Antimicrob. Agents Chemother. **44**:3408-13.
- ✚ Stratton, C.W. 1996. Mechanism of action for antimicrobial agents: general principles and mechanisms for selected classes of antibiotics. In *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 4th edition, (Lorian V, Ed.), p. 579-603, Williams & Wilkins Co., Baltimore.

✚ Swaney, S.M., H. Aoki, M.C. Ganoza, and D.L. Shinabarger. 1998. The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein synthesis in bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:3251-5.

T

✚ Thornsberry, C. 1996. Emerging resistance in clinically important gram-positive cocci. *West. J. Med.* **164**:28-32.

✚ Till, M., R.L. Wixson, and P.E. Pertel. 2002. Linezolid treatment for osteomyelitis due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Clin. Infect. Dis.* **34**:1412-4.

✚ Tofte, R.W., and J. Solliday. 1981. *Staphylococcus aureus* infection of dialysis shunt: absence of synergy with vancomycin and rifampin. *South. Med. J.* **74**:612-5.

✚ Tomasz, A., S. Nachman, and H. Leaf. 1991. Stable classes of phenotypic expression in methicillin resistant clinical isolates of staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:124-9.

✚ Tsiodras, S., H.S. Gold, G. Sakoulas, G.M. Eliopoulos, C. Wennersten, L. Venkataraman, *et al.* 2001. Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* **358**:207-8.

U - V - W

✚ Waldrep, T.W., and D.J. Skiect. 2002. Linezolid-induced anemia and thrombocytopenia. *Pharmacotherapy.* **22**:109-112.

- ✚ **Watanakunakorn, C., and J.C. Gueriero.** 1981. Interaction between vancomycin and rifampin against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **19**:1089-91.
- ✚ **Willke, R.J., H.A. Glick, J.Z. Li, and B.E. Rittenhouse.** 2002. Effects of linezolid on hospital length of stay compared with vancomycin in treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus* infections. An application of multivariate survival analysis. *Int. J. Technol. Assess. Health Care.* **18**:540-54.
- ✚ **Wilson, P., J.A. Andrews, R. Charlesworth, R. Walesby, M. Singer, D.J. Farrell, and M. Robbins.** 2003. Linezolid resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**:186-188.
- ✚ **Wise, R.** 2003. Introduction: treatment of Gram-positive infections. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**(suppl. S2): ii5-ii7; Données issues de EARSS Newsletter.
- ✚ **Wong, S.S., T.K. Ng, W.C. Yam, D.N. Tsang, P.C. Woo, S.K. Fung, and K.Y. Yuen.** 2000. Bacteremia due to *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **36**:261-8.
- ✚ **Woodford, N.** 2001. Epidemiology of the genetic elements responsible for acquired glycopeptide resistance in enterococci. *Microb. Drug Resist.* **7**:229-36.

X

- ✚ **Xiong, L., P. Kloss, S. Douthwaite, N.M. Andersen, S. Swaney, D.L. Shinabarger, and A.S. Mankin.** 2000. Oxazolidinone resistance mutations in 23S rRNA of *Escherichia coli* reveal the central region of domain V as the primary site of drug action. *J. Bacteriol.* **182**:5325-31.

✚ **Xiong, Y.Q., J. Caillon, X.Y. Zhou, G. Potel, D. Bugnon, P. Le Conte, F. Le Gallou, R. Le Floch, D. Baron, and H. Drugeon.** 1995. Treatment of experimental rabbit infective endocarditis due to a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with high-dose ceftazidime alone and combined with amikacin or sulbactam or both. J. Antimicrob. Chemother. **35**:697-706.

✚ **Xiong, Y.Q., M.R. Yeaman, and A.S. Bayer.** 1999. In vitro antibacterial activities of platelet microbicidal protein and neutrophil defensin against *Staphylococcus aureus* are influenced by antibiotics differing in mechanism of action. Antimicrob. Agents Chemother. **43**:1111-7.

Y - Z

✚ **Zabransky, R.J.** 2002. Linezolid: the first of a new class of antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Newsletter. **24**:25-9.

✚ **Zhanel, G.G., M. Walters, A. Noreddin, L.M. Vercaigne, A. Wierzbowski, J.M. Embil, A.S. Gin, S. Douthwaite, and D.J. Hoban.** 2002. The ketolides: a critical review. Drugs. **62**:1771-804.

✚ **Zimmer, S.M., A.M. Caliendo, M.C. Thigpen, and J. Somani.** 2003. Failure of linezolid treatment for enterococcal endocarditis. Clin. Infect. Dis. **37**:29-30.

✚ **Zurenko, G.E., B.H. Yagi, R.D. Schaadt, J.W. Allison, J.O. Kilburn, D.K. Glickman, D.K. Hutchinson, et al.** 1996. *In vitro* activities of U-100592 and U-100766, novel oxazolidinone antibacterial agents. Antimicrob. Agents Chemother. **40**:839-45.

 **Zurenko, G.E., J.K. Gibson, D.L. Shinabarger, P.A. Aristoff, C.W. Ford, and W.G. Tarpley.** 2001. Oxazolidinones : a new classes of antibacterials. *Curr. Opin. Pharmacol.* **1**:470-6.

LISTE DES FIGURES

- Figure 1.....**Affichage publicitaire pour sensibiliser le public au problème de la résistance bactérienne {p12}.
- Figure 2.....**Structure de *Staphylococcus aureus* {p14}.
- Figure 3.....**Evolution de la résistance à l'oxacilline chez *Staphylococcus aureus* à l'hôpital Henri-Mondor de 1969 à 1996 {p17}.
- Figure 4.....**Taux de prévalence des souches de SARM en Europe {p17}.
- Figure 5.....**Analyse des populations selon la classe d'expression de la résistance à la méticilline {p20}.
- Figure 6.....**Analyse de population de souches sensibles (VSSA), présentant une hétéro-résistance (hVISA), de résistance intermédiaire (VISA) et résistante (VRSA) à la vancomycine {p24}.
- Figure 7.....**Mécanisme de résistance à la vancomycine chez l'entérocoque {p17}.
- Figure 8.....**Anomalies morphologiques d'une souche de SARM résistante à la vancomycine {p30}.
- Figure 9.....**Cibles d'action des antibiotiques {p32}.
- Figure 10.....**Structure chimique de la quinupristine (gauche) et de la dalfopristine (droite) {p35}.
- Figure 11.....**Structure chimique comparée des composés télithromycine et érythromycine {p35}.
- Figure 12.....**Structure chimique de la daptomycine (lipopeptide) {p38}.

- Figure 13**.....Structure chimique de l'evernimicine {p38}.
- Figure 14**.....Structure des oxazolidinones {p41}.
- Figure 15**.....Structure du linézolide {p41}.
- Figure 16**.....Relations structure-activité conduisant au développement de nouvelles molécules {p41}.
- Figure 17**.....(A). Mécanismes de la phase d'initiation de la synthèse protéique bactérienne mettant en jeu les différents acteurs du processus (sous-unités ribosomales, ARN_m, facteurs d'initiation...). (B). Représentation tridimensionnelle du complexe ribosomal {p44}.
- Figure 18**.....Représentation schématique du mécanisme d'action des oxazolidinones {p45}.
- Figure 19**.....Localisation des mutations conférant la résistance au linézolide au niveau de l'ARNr 23S chez *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* {p46}.
- Figure 20**.....Activité *in vitro* du linézolide sur une souche de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline {p49}.
- Figure 21**.....Concentrations sériques de linézolide à l'état d'équilibre après administrations répétées per os ou I.V. de 600 mg x 2/j chez le volontaire sain (n=16) {p53}.
- Figure 22**.....Antibiogramme d'une souche de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline {p59}.
- Figure 23**.....Cinétique spontanée du linézolide chez le lapin après injection IV d'une dose de 10 mg/kg {p81}.

Figure 24.....Cinétiques comparées chez le lapin du linézolide avec ou sans simulation {p81}.

Figure 25.....Concentrations sériques de linézolide (mg/L) chez le lapin après administration continue des posologies quotidiennes de 20 mg/kg et 40 mg/kg {p82}.

Figure 26.....Photographies en MEB de la souche BCB8 pré-exposée au linézolide (A, B et C) ou à la gentamicine (D, E et F) pendant 90 minutes suivies de l'incorporation du second antibiotique partenaire {p120}.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.....CMI aux principaux antibiotiques de la souche de *S. aureus* résistante à la vancomycine {p23}.

Tableau II.....Classement des souches de *Staphylococcus aureus* suivant leur sensibilité à la vancomycine {p23}.

Tableau III.....CMI du linézolide aux bactéries à Gram positif {p48}.

Tableau IVa.....Paramètres pharmacocinétiques chez le volontaire sain après administration per os ou I.V. d'une dose unique ou de doses multiples (à l'état d'équilibre) de linézolide {p52}.

Tableau IVb.....Caractéristiques pharmacocinétiques du linézolide {p53}.

Tableau V.....Faibles concentrations plasmatiques observées chez un patient traité par linézolide toutes les 12 heures {p56}.

Tableau VI.....Activités du linézolide seul ou en association avec la vancomycine dans un modèle d'endocardite expérimentale à *S. aureus* {p117}.

Tableau VII.....Activités du linézolide seul ou en association avec la rifampicine dans un modèle d'endocardite expérimentale à *S. aureus* {p117}.

TITRE : EVALUATION EXPERIMENTALE DES NOUVEAUX ANTISTAPHYLOCOCCIQUES : CORRELATION IN VITRO – IN VIVO

RESUME :

Les bactéries à Gram positif sont au cœur des préoccupations actuelles en raison de leur multirésistance aux antibiotiques. La fréquence encore élevée des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline (SARM) à l'hôpital, l'émergence de souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides et la récente apparition de souches résistantes à la vancomycine (CMI >32mg/L) n'ont fait que renforcer le besoin de nouvelles molécules antistaphylococciques insensibles à ces mécanismes de résistance. Deux molécules récentes, le linézolide et la quinupristine-dalfopriline, sont actuellement disponibles sur le marché. A l'aide du modèle d'endocardite expérimentale du lapin, nous avons montré que l'administration en perfusion continue (à débit constant) du linézolide était supérieure au mode d'administration recommandé pour cette molécule (administration IV de 600 mg 2 fois par jour) sur trois souches de SARM. La quinupristine-dalfopriline a démontré une activité bactéricide sur deux souches de SARM (*ermA*- and *ermA*+) dans ce même modèle ; L'addition de gentamicine n'a pas permis d'augmenter l'efficacité antibactérienne, que ce soit en terme de réduction de la charge bactérienne dans la végétation ou de prévention de la sélection de mutants-résistants. L'étude *in vitro* des associations incluant le linézolide a permis de mettre en évidence un antagonisme avec la vancomycine et la gentamicine, essentiellement sur la phase de bactéricidie précoce de l'aminoside. Une indifférence a été observée avec le linézolide en association avec la rifampicine. Face à l'antagonisme observé *in vitro* pour la gentamicine, cette association a été étudiée *in vivo* sur deux souches de SARM sensibles à cet antibiotique. Contrairement aux résultats *in vitro*, l'association linézolide + gentamicine a démontré une activité bactéricide (>4 log₁₀ UFC/g végétation) sur ces souches et apparaît capable de stériliser les végétations aortiques après trois jours de traitement.

TITLE: EXPERIMENTAL ASSESSMENT OF NEW ANTI-STAPHYLOCOCCAL AGENTS: IN VITRO – IN VIVO CORRELATION

ABSTRACT:

Gram-positive bacteria resistant to almost all of the available antibacterials have been identified. The incidence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) remains very high in hospitals. Moreover, the emergence of MRSA strains with reduced susceptibility to glycopeptides and the recent appearance of vancomycin resistant strains (MIC >32mg/L) have emphasized the need for new active drugs. Two new anti-staphylococcal agents, linezolid and quinupristin-dalfopristin, are now available. Using the rabbit endocarditis experimental model, we showed that linezolid continuous infusion (at a constant rate) exhibit a bactericidal activity on three MRSA strains whereas intermittent dosing (twice a day) did not. Quinupristin-dalfopristin showed a bactericidal activity on two MRSA strains (*ermA*- and *ermA*+) in the same experimental model. Antibacterial activity in aortic vegetations and prevention of resistant variants were not increased by the addition of gentamicin. *In vitro* studies of combinations including linezolid showed an antagonism with vancomycin and gentamicin, mainly on the early bactericidal activity of the aminoglycoside. Linezolid, in combination with rifampin, exhibited an additive interaction. In reason of *in vitro* antagonism, we compared the *in vivo* activity of linezolid alone and in combination with gentamicin against two gentamicin-susceptible MRSA strains. In contrast to *in vitro* observations, linezolid + gentamicin appeared highly efficacious with a decrease of at least 4 log₁₀ CFU/g of vegetation. Moreover, the combination was able to sterilize the aortic vegetations after a 3-day treatment.

DISCIPLINE : Sciences de la Vie et de la Santé.

MOTS-CLES : ANTIBIOTHERAPIE, *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, ENDOCARDITE, PHARMACOCINETIQUE, PHARMACODYNAMIE, ASSOCIATIONS D'ANTIBIOTIQUES.

UFR Médecine, Université de Nantes.

Laboratoire d'Antibiologie Clinique et Expérimentale (UPRES EA 1156), Faculté de Médecine, Nantes.