

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

APPORT DE L'EXPERIMENTATION AU TRAITEMENT
DES INFECTIONS GRAVES PAR LES COCCI A GRAM
POSITIF :CORRELATIONS *IN VITRO* - *IN VIVO*.

THESE DE DOCTORAT

Ecole doctorale Chimie Biologie

Sciences de la Vie de de la Santé
Thérapeutique

présentée et soutenue publiquement par

Eric BATARD

le 21 octobre 2005, devant le jury ci-dessous

Président	M. Gilles Potel, PU, Université de Nantes
Rapporteurs	M. Pascal Chavanet, PU, Université de Bourgogne M. Bruno Fantin, PU, Université de Paris VII
Examineurs	M. Henri Drugeon, PU, Université de Nantes Mme Jocelyne Caillon, MCU, Université de Nantes
Directeur de thèse	M. le Pr Henri Drugeon
Co-directeur de thèse	Mme Jocelyne Caillon

TABLE DES MATIÈRES

1. Introduction.....	4
1.1 Les modèles animaux d'infection dans l'histoire de la médecine	4
1.2 Influence des données expérimentales dans les recommandations thérapeutiques	5
1.3 Présentation des travaux.....	6
2 Influence du CO ₂ sur l'activité <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> de la télithromycine vis-à-vis de <i>S. pneumoniae</i>	7
2. 1 Introduction	7
2.1.1 Antibiothérapie des infections pneumococciques : l'exemple des pneumopathies.....	7
2.1.2 La télithromycine, chef de file des kétolides.....	8
2.1.3 Difficultés de la mesure des CMI pour le pneumocoque.....	8
2.2 Article Influence of Carbon Dioxide on the MIC of Telithromycin for <i>S. pneumoniae</i> : an <i>In vitro-In vivo</i> Study.	10
2.2 Article Influence of Carbon Dioxide on the MIC of Telithromycin for <i>S. pneumoniae</i> : an <i>In vitro-In vivo</i> Study.	11
2.3 Discussion	15
2.3.1 Épidémiologie de la résistance aux macrolides et apparentés en France	15
2.3.2 Influence du CO ₂ sur la CMI de la télithromycine vis-à-vis du pneumocoque.....	15
2.3.3 Influence sur la catégorisation du pneumocoque vis-à-vis de la télithromycine	16
2.3.4 Mécanisme de l'influence du CO ₂ sur la CMI de la télithromycine.....	16
2.3.5 Activité <i>in vivo</i> de la télithromycine sur les souches dont la CMI augmente sous CO ₂	18
2.4 Conclusion	20
3 Activité <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> de la teicoplanine vis-à-vis de <i>S. epidermidis</i>	21
3.1 Introduction	21
3.1.1 Les glycopeptides	22
3.1.2 Résistance de <i>S. epidermidis</i> aux glycopeptides.....	22
3.1.3 Influence du milieu de culture sur la CMI de la teicoplanine	24
3.1.4 Objectifs de cette étude	25
3.2 Projet d'article	26
3.3 Discussion	29
3.3.1 Relation entre CMI et activité <i>in vivo</i> des glycopeptides chez le staphylocoque dans la littérature.....	30
3.3.2 Facteurs susceptibles d'expliquer la variabilité de l'activité <i>in vivo</i> de la teicoplanine	32
3.4 Conclusion	39
4 Etude de l'association de la quinupristine-dalfopristine et de la gentamicine sur <i>S. aureus</i>	39
4.1 Introduction	39
4.1.1 Épidémiologie des résistances de <i>S. aureus</i>	40
4.1.2 La quinupristine-dalfopristine	42
4.1.3 Associations d'antibiotiques	43
4.2 ARTICLE Combination of Quinupristin-Dalfopristin and Gentamicin against	45
4.3 Discussion.....	51
4.3.1 Association de la quinupristine-dalfopristine et de la gentamicine.....	51
4.3.2 L'étude <i>in vitro</i> des associations d'antibiotiques	53
4.3.3 Etude <i>in vivo</i> des associations	56
4.3.4 Corrélation entre interactions <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	58
4.4 Conclusion	59
5. Discussion générale et conclusion	61
5.1 Pour résumer les travaux présentés.....	61
5.2 Les modèles d'infection expérimentale dans l'évaluation des antibiotiques.....	62
5.3 La singularité du couple antibiotique-bactérie	62

5.3.1	Virulence, pharmacocinétique et pharmacodynamique	62
5.3.2	Influence de la réponse inflammatoire et immunitaire.....	63
5.4	Conclusion	63
6.	Annexes	65
6.1	Influence de la fraction de CO ₂ sur la CMI de la télithromycine vis-à-vis de 40 souches de pneumocoque.....	65
6.2	Etude de l'influence du pH sur la CMI de la télithromycine du pneumocoque.....	67
6.3	Corrélation entre la CMI et la DE ₅₀ de la télithromycine vis-à-vis du pneumocoque.....	68
6.4	Influence du fournisseur du milieu de Mueller-Hinton sur la CMI des glycopeptides pour <i>S. epidermidis</i>	69
6.5	Poster n°1768, 15th European Congress on Clinical Microbiology and Infectious Diseases.....	73
6.6	La résistance à la méticilline influence-t-elle l'activité de la teicoplanine sur <i>S. epidermidis</i> ?	74
6.7	Corrélation entre CMI et activité <i>in vivo</i> de la teicoplanine et de la vancomycine vis-à-vis de 5 souches de <i>S. aureus</i>	76
6.8	Bactéricidie <i>in vitro</i> de la teicoplanine sur <i>S. epidermidis</i>	78
6.9	Association de quinupristine-dalfopristine et de gentamicine en cinétique de bactéricidie sur <i>S. aureus</i> : étude complémentaire.....	80
6.10	Activité de la vancomycine dans le modèle d'endocardite de lapin sur les souches de <i>S. aureus</i> NA8 et BCB8.....	83
6.11	Influence des concentrations sur l'interaction <i>in vitro</i> entre le linézolide et la gentamicine vis-à-vis de <i>S. aureus</i>	84
6.12	Comparaison de la survie des souris non traitées infectées par <i>S. epidermidis</i> et <i>S. pneumoniae</i>	87
7.	Références	88

1. Introduction

Cette thèse porte sur l'étude de l'activité anti-bactérienne des antibiotiques, et de la corrélation entre ces activités évaluées *in vitro* et *in vivo*. A l'heure où l'Homme explore son propre génôme et celui des bactéries avec lesquelles il cohabite cahin-caha, à l'heure où certains prétendent concevoir de nouveaux antibiotiques en contrôlant à la fois leur mode d'action sur la bactérie et les possibilités futures d'adaptation de celle-ci aux nouvelles molécules, à l'heure où l'expérimentation animale est mise en cause sur le plan éthique, la mesure de Concentrations Minimales Inhibitrices et le test des antibiotiques dans des modèles animaux pourraient paraître désuets et inutiles (Poehlsgaard 2003). Par les observations que nous avons faites, et par les travaux que nous citons pour les discuter, nous plaidons pour une évaluation globale des thérapeutiques anti-infectieuses, basée non seulement sur les acquisitions les plus récentes de la biologie moléculaire, dont la littérature regorge actuellement, mais aussi sur les méthodologies plus anciennes que nous avons utilisées.

1.1 LES MODELES ANIMAUX D'INFECTION DANS L'HISTOIRE DE LA MEDECINE

L'histoire des infections expérimentales précède l'ère des antibiotiques. L'expérimentation animale a en effet apporté une contribution majeure au débat portant sur l'existence de micro-organismes pathogènes et des maladies contagieuses. Ainsi, lors de l'épidémie de Marseille de 1720, Antoine Deidier injectait à des chiens de la bile de victimes de la peste pour essayer d'en reproduire les symptômes, afin d'en démontrer la nature contagieuse (Contrepois 1999). Avec le développement de la culture des bactéries, cette démarche aboutira 150 ans plus tard aux postulats de Koch, qui permettent d'établir la relation entre un micro-organisme et une maladie spécifique.

En amont même de l'isolement de micro-organismes suspects d'être pathogènes, des modèles animaux permettent de décrire la physiopathologie de certaines maladies infectieuses. Ainsi Rosenbach réalise-t-il en 1878 le premier modèle d'endocardite aortique expérimentale de lapin, en montrant que la production de la maladie nécessite une lésion mécanique de la valve aortique à l'aide d'un stylet septique (Contrepois 1999).

L'utilisation de modèles animaux d'infections se développe encore au XX^{ème} siècle avec la recherche de traitements anti-infectieux. En 1911, Ehrlich et Hata montrent la bonne efficacité de l'arsphénamide dans la syphilis expérimentale du lapin (Bryskier 1999). En 1935, la sulphonamidochrisoïdine démontre son activité dans un modèle d'infection murine à pneumocoque, alors que ce composé n'a pas d'activité *in vitro* contre ce germe (Bryskier 1999). Cette démonstration donne naissance à la première classe de substances anti-bactériennes, les sulfamides.

Au cours de la deuxième moitié du XX^{ème} siècle, plus de 1000 modèles d'infection expérimentale seront développés pour l'évaluation des agents anti-infectieux (Bryskier 1999).

L'étude chez l'animal de toute nouvelle molécule, avant son utilisation chez l'Homme, reste de mise (Sandercock 2002). Ceci n'était certainement pas possible dans les premières années de l'ère antibiotique, quand la mortalité de certaines maladies infectieuses, des méningites par exemple, était si forte (Swartz 2004). Le cas de l'auréomycine dans le traitement de la méningite pneumococcique illustre bien ce fait. Cet antibiotique est disponible à la fin des années 1940. Une utilisation anecdotique suggère une relative efficacité en monothérapie dans la méningite pneumococcique, dont la mortalité reste

d'environ 30% quand elle est traitée par pénicilline (Lepper 1951). Dans ce contexte, il semble compréhensible que les médecins de l'époque aient voulu tester d'emblée en clinique l'association pénicilline + auréomycine, sans attendre la réalisation d'études expérimentales. Malheureusement, la mortalité des patients traités au cours d'un essai par l'association se révélera deux fois supérieure à celle des patients traités par pénicilline seule (Lepper 1951). L'expérimentation préalable chez l'animal aurait peut-être conclu à un antagonisme entre les deux antibiotiques, mais les modèles de méningite expérimentale n'ont été mis au point que 20 ans plus tard.

Rétrospectivement, toujours dans le cadre des méningites bactériennes, l'expérimentation animale, si elle avait été réalisée à temps, aurait également probablement incité à ne pas utiliser la céphalotine, qui s'est avérée totalement inefficace chez l'Homme (Zak 1999).

1.2 INFLUENCE DES DONNEES EXPERIMENTALES DANS LES RECOMMANDATIONS THERAPEUTIQUES

Depuis une quinzaine d'années, l'évolution de la médecine a été marquée par le développement de la publication par des sociétés savantes ou des organismes publics de recommandations de prise en charge de diverses pathologies, et en particulier de pathologies infectieuses. Les études expérimentales animales occupent une place non négligeable dans l'argumentaire de ces recommandations. Nous en donnerons deux exemples.

La Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF) a actualisé en 2000 ses recommandations pour l'antibiothérapie des pneumopathies (Révision de la IV^{ème} conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse de la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF) 2000). Malgré la fréquence des souches de pneumocoque de sensibilité diminuée à la pénicilline (PSDP), elle justifie le maintien de l'utilisation de l'amoxicilline à la dose de 3 grammes/jour pour les pneumonies pneumococciques (pour des CMI de la pénicilline < 4 mg/L) par 3 arguments, dont aucun ne semble suffisant isolément :

la comparaison des concentrations sériques obtenues avec 3 grammes d'amoxicilline par jour et des CMI des souches françaises ;

3 études cliniques d'observation, rapportant le pronostic d'une cinquantaine de cas de pneumonies à PSDP et traitées par amoxicilline à des doses dépassant parfois 3 grammes/jour ;

une étude expérimentale utilisant un modèle de pneumonie du lapin, avec simulation d'un traitement par amoxicilline 3 grammes/jour sur deux souches de pneumocoque ayant des CMI de la pénicilline de 0.01 et 4 mg/L.

Un deuxième exemple est tiré des récentes recommandations de la British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC) pour le traitement des endocardites. Pour les endocardites dues à un staphylocoque résistant à la méticilline, il est ainsi recommandé d'utiliser de la vancomycine, associée à de la rifampicine, de la gentamicine ou de l'acide fusidique. Deux des trois des références justifiant ces associations portent uniquement sur des données expérimentales animales (Elliott 2004).

Les études expérimentales doivent permettre de sélectionner les régimes thérapeutiques applicables en clinique. Quand on peut recruter dans un délai raisonnable un nombre suffisant de patients, homogènes quant à leur présentation clinique et quant à la sensibilité des bactéries isolées, les données obtenues

expérimentalement doivent être confirmées par la réalisation d'essais thérapeutiques contrôlés. Ainsi a-t-il été démontré, quasi-simultanément au début des années 1980, que l'association pénicilline + streptomycine était plus bactéricide dans l'endocardite expérimentale streptococcique, et que l'association d'un aminoside à la pénicilline en clinique permettait de réduire de moitié la durée de traitement de ces infections chez l'Homme (Zak 1999).

1.3 PRESENTATION DES TRAVAUX

Cette thèse a pour objet d'illustrer l'intérêt de l'étude expérimentale des agents antibactériens. Elle comporte trois travaux indépendants, dont le point commun est d'analyser la relation entre les activités *in vitro* et *in vivo* des antibiotiques.

Le premier travail porte sur la relation entre d'une part la modalité de mesure de la Concentration Minimale Inhibitrice de la télithromycine vis-à-vis de *Streptococcus pneumoniae*, et d'autre part l'activité de cet antibiotique dans le modèle de sepsis/péritonite de souris. Il a été réalisé en 2002 et 2003, soit un an après l'obtention de l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) en Europe du Kétek®. Il portait du constat préliminaire que, pour certaines souches, la CMI de la télithromycine augmente significativement quand elle est mesurée sous CO₂ par rapport à une mesure faite en air ambiant. Ceci aboutissait à la catégorisation de certaines souches comme sensibles si la CMI était mesurée en air ambiant, et intermédiaire ou résistante si celle-ci était mesurée en CO₂. La question qui se posait alors était de savoir quelle atmosphère d'incubation lors de la mesure de la CMI prédisait le mieux l'activité *in vivo* de la télithromycine.

Le deuxième travail porte sur l'activité de la teicoplanine vis-à-vis de *Staphylococcus epidermidis*, et procède d'une problématique similaire au travail précédent. Il a en effet été constaté que la marque commerciale du milieu de culture pouvait influencer la CMI de la teicoplanine vis-à-vis de *S. epidermidis*. Ainsi, dans un travail préliminaire, plus du quart des souches testées étaient catégorisées sensibles à la teicoplanine si la CMI était mesurée en bouillon Difco, et intermédiaires voire résistantes si la CMI était mesurée en bouillon Biorad. La question qui se posait était alors de savoir si l'un des milieux de culture était mieux corrélé à l'activité *in vivo* que l'autre. Ces travaux ont été réalisés une quinzaine d'années après la commercialisation de la teicoplanine en France (1988), alors que l'augmentation des résistances chez les staphylocoques isolés dans les hôpitaux diminue le nombre de molécules disponibles pour la thérapeutique.

Le troisième travail est consacré à l'association de la quinupristine-dalfopristine et de la gentamicine vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*. Il vise en particulier à évaluer l'intérêt de cette association sur les souches résistantes à la quinupristine et sensibles à la gentamicine. Ces expérimentations ont été menées pendant l'année 2000, c'est-à-dire l'année de l'obtention de l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) en France du Synercid®. Il s'agissait à cette époque d'évaluer des régimes thérapeutiques bactéricides visant les *S. aureus* résistants à la méticilline, trois ans après la description de la première souche de *S. aureus* intermédiaire à la vancomycine.

2 INFLUENCE DU CO₂ SUR L'ACTIVITE *IN VITRO* ET *IN VIVO* DE LA TELITHROMYCINE VIS-A-VIS DE *S. PNEUMONIAE*.

2. 1 INTRODUCTION

2.1.1 Antibiothérapie des infections pneumococciques : l'exemple des pneumopathies

L'incidence des pneumonies pneumococciques a été estimée en France à 130 000 cas par an, dont environ 6 000 décès par an (Gaillat 1998). En tant que bactérie la plus fréquemment en cause dans les pneumonies communautaires, *S. pneumoniae* est généralement inclus dans le spectre des régimes antibiotiques recommandés par les sociétés savantes pour le traitement de ce type d'infection (Révision de la IVème conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse de la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française 2000, Mandell 2003). Par exemple, pour la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française, seule une pneumonie d'allure atypique, sans signe de gravité, survenant chez un sujet jeune peut être traitée par un antibiotique inconstamment actif sur le pneumocoque.

Les études épidémiologiques montrent une augmentation de la proportion de souches de pneumocoques de sensibilité diminuée à la pénicilline (PSDP, définis par une CMI pénicilline ≥ 0.1 mg/L). Ainsi, alors que la première souche de PSDP a été détectée en France en 1979, les Observatoires Régionaux du pneumocoque indiquent que 55% des pneumocoques isolés en 2001 d'hémocultures, de LCR et de pus d'oreille, ont une sensibilité diminuée à la pénicilline (Vergnaud 2003). Ce phénomène semble encore évolutif. En effet, sur ce même type de prélèvements, la proportion de PSDP est passée de 1999 à 2001 de 58% à 71% chez l'enfant, et de 38% à 46% chez l'adulte. Sur cette même période, la proportion de souches résistantes à la pénicilline dans le LCR est passée de 13.4% à 18.9% chez l'enfant, et de 9.6% à 14.1% chez l'adulte (Vergnaud 2003, Laurans 2001). L'amoxicilline à la dose de 3 g/jour pourrait être insuffisante pour le traitement des pneumonies dues à des souches dont la CMI de la pénicilline est ≥ 4 mg/L (Révision de la IVème conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse de la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française 2000). La fréquence de ces souches chez les adultes a été récemment estimée en France à 0.9%, et était considérée en 2000 comme trop faible pour justifier une modification de l'antibiothérapie probabiliste des pneumonies communautaires (Vergnaud 2003).

Deux autres classes d'antibiotiques récemment développées peuvent assurer la suppléance des β -lactamines dans le traitement probabiliste des pneumonies communautaires. Les quinolones anti-pneumococciques font craindre la sélection de mutations et la dissémination de souches mutantes résistantes aux quinolones (Mandell 2003). Les kétolides représentent l'autre alternative aux β -lactamines.

2.1.2 La télithromycine, chef de file des kétolides

Les kétolides forment une classe d'antibiotiques nouvellement commercialisée. Le premier kétolide, la télithromycine, a été obtenu par substitution d'un sucre de l'érythromycine A (un L-cladinose) par une fonction cétonique. La télithromycine agit comme les macrolides, en se fixant aux domaines II et V de l'ARN ribosomal 23S, avec une affinité 10 fois plus forte que l'érythromycine, et en inhibant la formation de la sous-unité 50S du ribosome (Ackermann 2003). La synthèse protéique est ainsi inhibée. Un autre kétolide est en voie de développement, la cethromycine (ABT-773).

L'intérêt des kétolides réside principalement dans leur échappement aux mécanismes de résistance des pneumocoques aux macrolides.

La résistance du pneumocoque aux macrolides et apparentés est médiée par plusieurs mécanismes (Leclercq 2002) :

la modification de la cible

par méthylation de l'adénine 2058 de l'ARNr 23S, codée par le gène *erm(B)*. La régulation de l'expression du gène *erm(B)* n'est pas aussi bien connue chez le pneumocoque que chez *S. aureus*. On considère cependant qu'elle est induite par les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, mais pas par les streptogramines A ni par les kétolides ;

par mutation des gènes de l'ARNr 23S (impliquant les domaines V et II) ou des protéines ribosomales L4 et L22 ;

un mécanisme d'efflux, codé par le gène *mef(A)*, qui confère une résistance aux macrolides à 14 et 15 atomes uniquement.

En France, le mécanisme prédominant de résistance aux macrolides chez le pneumocoque est le gène *erm(B)* (Bingen 2003, Angot 2000, Decousser 2004). Ainsi, Bingen et coll détectent le gène *erm(B)* chez 89% de 186 souches de PSDP isolées chez des enfants (Bingen 2003). La fréquence du gène *erm(B)* chez les souches résistantes à l'érythromycine est de 100% dans deux études françaises récentes (Angot 2000, Decousser 2004). Globalement, la fréquence du gène *mef(A)* est très faible en France (0 à 3% selon les études) (Bingen 2003, Angot 2000, Decousser 2004).

2.1.3 Difficultés de la mesure des CMI pour le pneumocoque

La méthodologie de mesure des Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) d'un antibiotique a été développée dès les années 1940 (Wheat 2005). De multiples facteurs responsables d'une mauvaise reproductibilité ont été identifiés (milieu de culture, durée de pré-incubation, densité ou nombre de bactéries exposé à l'antibiotique, ...). Pour pallier ce problème, la méthodologie de mesure de la CMI a été standardisée par diverses sociétés savantes, telle la Société Française de Microbiologie (SFM), la British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC) ou le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, anciennement NCCLS).

En ce qui concerne le pneumocoque, il existait jusqu'à peu une incertitude sur les conditions d'incubation du pneumocoque dans les tests de sensibilité aux antibiotiques. Ainsi, les recommandations du NCCLS incluait il y a quelques années une incubation en CO₂ pour l'antibiogramme, et en air ambiant pour la

mesure de CMI par microdilution en milieu liquide (Fasola 1997). En 2005, le CLSI préconise le CO₂ pour les méthodes de diffusion en gélose et dilution en liquide, mais la BSAC continue de recommander l'air ambiant pour les méthodes en milieu liquide, et le CO₂ pour les méthodes en milieu solide (BSAC 2005).

Le choix de l'atmosphère d'incubation n'est pas neutre à ce sujet, et présente deux types de conséquences. Premièrement, 2 à 7 % des souches de pneumocoque nécessitent une incubation en CO₂ pour obtenir une pousse satisfaisante (Lonks 1993, Flanagan 1998, Hamilton-Miller 2001). Deuxièmement, des études antérieures ont montré des différences d'activité des macrolides et apparentés sur le pneumocoque selon l'atmosphère d'incubation.

Ainsi, Fasola et coll montrent qu'en microdilution, la CMI₅₀ de la clindamycine de 58 souches résistantes à la clindamycine passe de 1 mg/L en air ambiant à ≥ 32 mg/L en CO₂ (Fasola 1997). En revanche, l'augmentation de la CMI₅₀ ne dépasse pas 2 dilutions si la CMI est mesurée par dilution en gélose, et pour les souches sensibles à la clindamycine (Fasola 1997). Parallèlement, l'incubation en CO₂ augmente également la CMI₅₀ de l'érythromycine d'une à deux dilutions.

A la différence de Fasola et coll, Visalli et coll montrent une forte augmentation sous CO₂ de la CMI₅₀ de la clindamycine en dilution en gélose (plus de 9 dilutions, de 0.125 à > 64 mg/L) pour les souches résistantes à l'érythromycine, alors que cette augmentation se limite à 1 à 3 dilutions pour les souches sensibles, et pour 5 macrolides (Visalli 1997).

Johnson et coll montrent que sur 17 souches sensibles à l'érythromycine, la CMI₅₀ de l'érythromycine et de l'azithromycine augmente sous CO₂ respectivement de 0 et 3 dilutions (Johnson MM 1999). Les moyennes géométriques des CMI augmentent plus nettement, de 0.11 à 0.97 mg/L pour l'érythromycine, et de 0.004 à 0.120 mg/l pour l'azithromycine. Une autre étude, portant sur 50 souches de pneumocoque, montre une augmentation sous CO₂ de la CMI₉₀ particulièrement marquée pour la roxythromycine (de 0.5 à 6.0 mg/L) (Johnson J 1999).

Plus récemment, Walsh et coll ont montré que la CMI₅₀ de la télithromycine augmentait sous CO₂ de 2 dilutions pour 100 souches de pneumocoque (Walsh 2004).

Ces données suggèrent donc que la CMI des macrolides et apparentés vis-à-vis du pneumocoque augmente si elle est mesurée en CO₂ plutôt qu'en air ambiant. Ce phénomène semble particulièrement marqué pour la clindamycine vis-à-vis des souches résistantes à la clindamycine, c'est-à-dire probablement vis-à-vis des souches porteuses du gène *erm(B)* (Fasola 1997, Visalli 1997).

Néanmoins, ces données n'ont été publiées qu'à l'échelle d'un groupe de souches, sous la forme de CMI₅₀, de CMI₉₀ ou de moyenne. Existe-t-il des différences d'une souche à l'autre, certaines souches ne modifiant pas leur CMI sous CO₂, et d'autres la modifiant nettement ?

Si les souches peuvent être classées selon leur sensibilité à un effet CO₂, peut-on expliquer ces différences par la présence ou l'absence des gènes de résistance aux macrolides et apparentés, à savoir *mef(A)* et *erm(B)* ?

Ensuite, la télithromycine est-elle concernée par ce supposé effet CO₂ ? Si oui, l'activité *in vivo* de la télithromycine est-elle conservée ou diminuée chez les souches dont la CMI de la télithromycine augmente sous CO₂ ?

Nous avons tenté de répondre à ces questions par une série d'expériences qui sont rapportées dans l'article suivant

.

2.2 ARTICLE INFLUENCE OF CARBON DIOXIDE ON THE MIC OF
TELITHROMYCIN FORS. *PNEUMONIAE*: AN *IN VITRO-*IN VIVO** STUDY.

Eric Batard, Marie Emmanuelle Juvin, Cédric Jacqueline, Denis Bugnon,
Jocelyne Caillon, Gilles Potel, and Henri B. Drugeon

Antimicrob Agents Chemother 2005 ; 49 : 464-466.

Influence of Carbon Dioxide on the Minimum Inhibitory Concentration of *Streptococcus pneumoniae* to Erythromycin and Telithromycin

Eric Batard,^{1*} Marie Emmanuelle
Jocelyne Caillon,^{1,2} Gilles

*Laboratoire d'Antibiologie, Faculté de Médecine,
Centre Hospitalier de la Croix-Rouge, 69631
Lyon, France*

Received 24 April 2004/Returned for modification 12 May 2004/Accepted 10 June 2004

Incubation in CO₂ resulted in higher (≥ 3 doubling times) MICs of erythromycin and telithromycin in ambient air for 31.2% of 346 *Streptococcus pneumoniae* strains. MICs of telithromycin in CO₂ was not correlated with loss of its activity.

Incubation in CO₂ has been reported to result in higher MICs of macrolides, clindamycin, and telithromycin for *Streptococcus pneumoniae* than those found in ambient air (6, 9, 11, 15, 16). Conversely, susceptibility testing of other antibiotics, namely β -lactams, evernimicin, and linezolid, does not appear to be affected by the presence or absence of CO₂ (3, 7, 8). This study reports the influence of CO₂ on the MICs of erythromycin and telithromycin against *ermB*-positive *S. pneumoniae*.

MICs of erythromycin and telithromycin in ambient air and CO₂. MICs of erythromycin and telithromycin were determined by using the agar dilution method for 675 clinical strains of *S. pneumoniae* (13). Plates were incubated for 16 h at 37°C

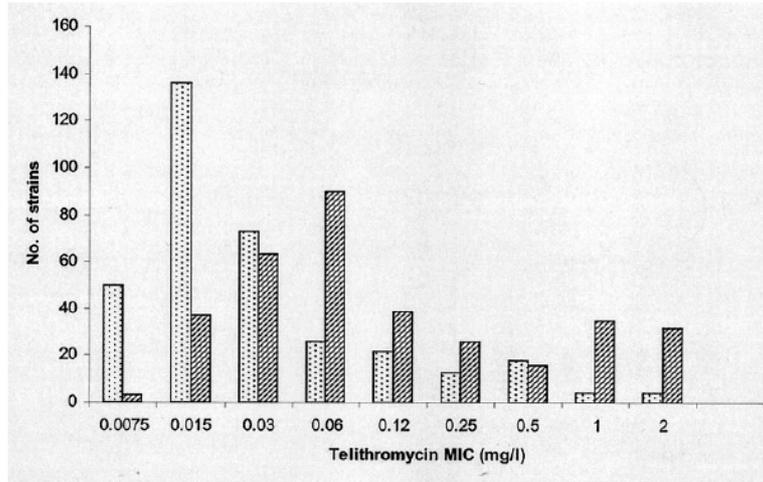


FIG. 1. Distribution of telithromycin MICs measured in ambient air (light bars) and in 5% CO₂ (dark bars) for 346 *emB*-positive strains of *S. pneumoniae*.

log₂ dilution for 31 strains in ambient air (range, 0.0 to 2.0) and for 36 strains in CO₂ (range, 0.0 to 1.2). The 10 determinations of the MIC were within ≤3 doubling dilutions for 29 strains in ambient air and for 32 strains in CO₂. The mean CO₂/AA ratios ranged from 0.5 to 2.0 doubling dilutions in Group A and from 1.9 to 6.2 doubling dilutions in Group B. The SD of the CO₂/AA ratio was ≤1 log₂ dilutions for 36 out of 40 strains (range, 0.0 to 1.8).

Experimental murine sepsis/peritonitis model. Among the 40 erythromycin-resistant strains tested in the reproducibility assay, 8 strains were selected for in vivo experiments: 3 strains

for which the telithromycin MIC was ≤0.5 mg/liter in ambient air and >0.5 mg/liter in CO₂ (strains C05SP06, C08SP13, and C04SP28); 2 strains for which the MICs were ≤0.5 mg/liter in both atmospheres (strains C01SP07 and C22SP03); and 3 strains for which the MICs were >0.5 mg/liter in both atmospheres (C28SP22, C18SP04, and C19SP10). The inoculum was obtained as follows. Bacterial suspensions were prepared from 16-h cultures at 37°C in ambient air on 5% sheep blood agar plates. The inoculum was adjusted to 6 MacFarlands and then was diluted at equal parts with a 10% mucin saline solution (M-2378; Sigma, St. Quentin-Fallavier, France). To quan-

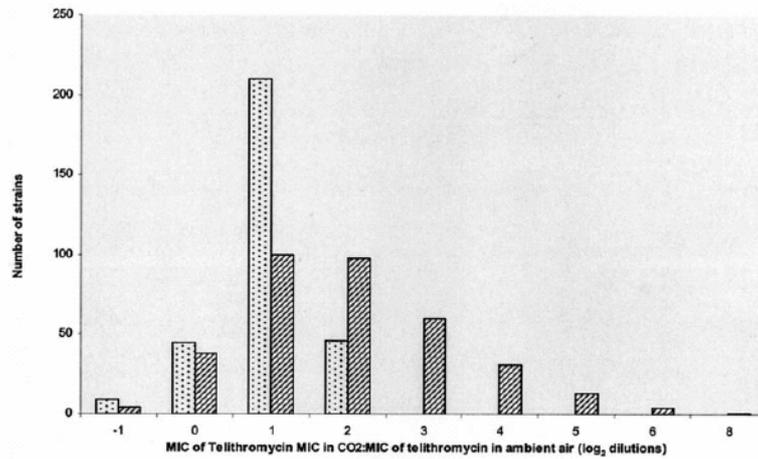


FIG. 2. Distribution of the CO₂/AA ratio for 346 *emB*-positive strains of *S. pneumoniae* (dark bars) and for 310 erythromycin-susceptible or *mefA*-positive strains (light bars).

TABLE 1. MICs and ED₅₀s determined in this study

Strain	Agar dilution MIC		CO ₂ /AA ratio	Microdilution MIC	ED ₅₀
	Ambient air	5% CO ₂			
C01SP07	0.01 ± 0.7	0.05 ± 0.5	1.5 ± 0.7	0.015	0.6
C22SP03	0.04 ± 0.5	0.12 ± 0.7	1.2 ± 0.8	0.03	0.6
C05SP06	0.04 ± 1.1	0.50 ± 1.2	3.5 ± 0.7	0.03	0.6
C08SP13	0.06 ± 1.4	0.93 ± 0.8	4.0 ± 0.9	0.5	0.3
C04SP28	0.03 ± 0.4	0.78 ± 1.2	4.4 ± 1.2	0.06	0.9
C28SP22	1.62 ± 0.5	3.53 ± 0.0	1.3 ± 0.5	2	17.1
C18SP04	0.93 ± 0.3	3.31 ± 0.3	2.0 ± 0.5	1	18.8
C19SP10	1.00 ± 0.0	3.31 ± 0.3	1.9 ± 0.3	1	12.5

tify the inoculum, 50 µl of the final suspension was plated on sheep blood agar plates after appropriate dilutions, and colonies were counted after a 24-h incubation on sheep blood agar at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Female 28- to 30-g Swiss mice (Elevage Janvier SA, Le Genest St. Isle, France) were kept in cages with free access to food and water. Mice were injected intraperitoneally with 0.7 ml of a fresh suspension. Telithromycin was administered subcutaneously at increasing concentrations (volume, 0.5 ml) immediately and 4 h after inoculation. For each strain, 10 mice were inoculated at each telithromycin dose level, which ranged from 0.01 to 100 mg/kg of body weight, expressed as a single dose. Mice were observed for 6 days and then were sacrificed. This protocol was approved by the University of Nantes experimental therapeutic unit. The median effective dose (ED₅₀) was calculated as previously described by Reed and Muench (14). Mean ED₅₀s were compared using the Mann-Whitney test. The mean inoculum was 10⁷ CFU per mouse (range, 3 × 10⁶ to 5 × 10⁷ CFU per mouse). All nontreated control mice died within 48 h after inoculation. ED₅₀s of the five strains susceptible to telithromycin (geometric mean telithromycin MIC, ≤0.5 mg/liter in ambient air) were almost identical (mean ED₅₀, 0.6 ± 0.2 mg/kg), regardless of whether the MIC determined in CO₂ was below or above 0.5 mg/liter (Table 1). Conversely, telithromycin ED₅₀s were higher for the three strains for which the geometric mean telithromycin MIC was >0.5 mg/liter in ambient air (mean ED₅₀, 16.1 ± 3.3 mg/kg; *P* < 0.05).

This study demonstrates that for 346 *ermB*-positive strains of *S. pneumoniae*, the telithromycin MICs are higher in CO₂ than in ambient air. Although the telithromycin MICs for 2.3% of strains were >0.5 mg/liter in ambient air, this proportion increased to 21.5% in CO₂. It should be noted that CO₂ does not influence the telithromycin MIC in the same way for all strains of *S. pneumoniae*, as the MICs for 31.5 and 40.7% of the 346 *ermB*-positive strains increased to ≥3 and ≤1 doubling dilution, respectively. It therefore seems possible to use the magnitude of the increase in MICs in CO₂ to classify strains of *ermB*-positive pneumococci. Our results with the murine peritonitis/septicemia model suggest that telithromycin remains effective against strains that are susceptible in ambient air (MICs ≤ 0.06 mg/liter), regardless of whether the MIC in CO₂ remains low (≤0.12 mg/liter) or increases to intermediate values (≥0.5 mg/liter).

As has already been suggested for macrolides by other stud-

ies, these data support the hypothesis that it may be relevant to determine different breakpoints depending on whether the telithromycin susceptibility test is performed in ambient air or in CO₂ (6, 9, 15). The British Society for Antimicrobial Chemotherapy, the NCCLS, and the French Society of Microbiology recommend that agar dilution be performed in CO₂ for *S. pneumoniae* (1, 4, 12, 13). The French Society of Microbiology has added to its 2003 recommendations that resistance to telithromycin in CO₂ should be confirmed in ambient air (12).

We are grateful to Anne-Françoise Miègeville and Virginie Le Mace for technical assistance.

This work was supported in part by Aventis Laboratories, Paris, France.

REFERENCES

- Andrews, J. M. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.* 48(Suppl. S1):5-16.
- Beumer-Melchior, P., M. E. Juvin, S. Tassin, A. Bryskier, G. C. Schito, and H. B. Drugeon. 2000. In vitro activity of the new ketolide telithromycin compared with those of macrolides against *Streptococcus pneumoniae*: influences of resistance mechanisms and methodological factors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:2999-3002.
- Brueggemann, A. B., K. C. Kugler, and G. V. Doern. 1997. In vitro activity of BAY 12-8039, a novel 8-methoxyquinolone, compared to activities of six fluoroquinolones against *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:1594-1597.
- British Society for Antimicrobial Chemotherapy. 4 May 2003, posting date. Disc diffusion method for antimicrobial susceptibility testing. Version 2.1. [Online.] <http://www.bsac.org.uk/uploads/may%202003susceptibility1.pdf>.
- Chomarot, M., L. Chollet, M. Peyret, and J. P. Flandrois. 1997. Influence of atmospheric conditions during incubation on the susceptibilities of *Streptococcus pneumoniae* isolates to five β-lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 40:599-601.
- Fasola, E. L., S. Bajaksouzian, P. C. Appelbaum, and M. R. Jacobs. 1997. Variation in erythromycin and clindamycin susceptibilities of *Streptococcus pneumoniae* by four test methods. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:129-134.
- Hamilton-Miller, J. M. T., and S. Shah. 1999. Susceptibility testing of linezolid by two standard methods. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18:225-227.
- Hamilton-Miller, J. M. T., S. Shah, and D. Loebenberg. 2001. Susceptibility of pneumococci to evernimicin: effect of CO₂ and different methodologies. *Clin. Microbiol. Infect.* 7:339-340.
- Johnson, J., S. Bouchillon, and D. Pontani. 1999. The effect of carbon dioxide on susceptibility testing of azithromycin, clarithromycin and roxithromycin against clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* by broth microdilution and the Etest: Artemis Project—first-phase study. *Clin. Microbiol. Infect.* 5:327-330.
- Johnson, M. M., S. L. Hill, and L. J. V. Piddock. 1999. Effect of carbon dioxide on testing of susceptibilities of respiratory tract pathogens to macrolide and azalide antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1862-1865.
- Lonks, J. R., and A. A. Medeiros. 1993. High rate of erythromycin and clarithromycin resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolates from blood cultures from Providence, Rhode Island. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:1742-1745.
- Members of the SFM Antibiogram Committee. 2003. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie report 2003. *Int. J. Antimicrob. Agents* 21:364-391.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2003. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, sixth ed. Approved standard M7-A6. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- Reed, L. J., and H. Muench. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* 27:493-497.
- Visalli, M. A., M. R. Jacobs, and P. C. Appelbaum. 1997. Susceptibility of penicillin-susceptible and -resistant pneumococci to dirithromycin compared with susceptibilities to erythromycin, azithromycin, clarithromycin, roxithromycin, and clindamycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:1867-1870.
- Walsh, F., F. Carnegy, J. Willcock, and S. Amyes. 2004. Comparative *in vitro* activity of telithromycin against macrolide-resistant and -susceptible *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* and *Haemophilus influenzae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 53:793-796.

2.3 DISCUSSION

Dans les lignes suivantes, je développerai les données issues de cette étude.

2.3.1 *Epidémiologie de la résistance aux macrolides et apparentés en France*

Les 675 souches de cette étude proviennent d'un réseau de 30 laboratoires hospitaliers de France métropolitaine (Drugeon 2003 bis). Au cours de la période novembre 2000 – avril 2001, les 5 premières souches de pneumocoque du mois, cliniquement significatives et non redondantes ont été testées phénotypiquement et génotypiquement pour la résistance aux macrolides et apparentés. Les données obtenues sont comparables aux données antérieures en ce qui concerne la fréquence de la résistance à l'érythromycine chez le pneumocoque en France, 47.4% des souches étant sensibles à l'érythromycine. Une vaste majorité (98.3%) des pneumocoques non sensibles à l'érythromycine est porteuse du gène *erm(B)*. Avec une CMI₅₀ et une CMI₉₀ respectivement de 0.015 et 0.25 mg/L, cette étude produit pour la télithromycine des données très comparables à celles publiées par Bingen en 2003 (Bingen 2003).

2.3.2 *Influence du CO₂ sur la CMI de la télithromycine vis-à-vis du pneumocoque*

Pour les 324 souches sensibles à l'érythromycine ou porteuses du gène *mef(A)*, le rapport CO₂ / AA de la CMI de la télithromycine est $\leq 2 \log_2$ (Drugeon 2003). Pour 346 souches porteuses du gène *erm(B)*, le rapport CO₂ / AA de la CMI de la télithromycine est $\leq 2 \log_2$ pour 68.5% des souches, et $\geq 3 \log_2$ pour 31.5% des souches. Les moyennes géométriques du rapport CO₂ / AA sont de 3,96 pour les souches *erm(B)*-positives (IC 95%, 3.57 – 4.39), et de 1.92 pour les souches *erm(B)*-négatives (IC 95%, 1.83 – 2.02). La différence entre les deux groupes est hautement significative (test de Mann-Whitney, $p < 0.0001$).

Pour compléter ces données, nous avons recherché une relation entre la fraction de CO₂ et la CMI de la télithromycine vis-à-vis des 40 souches sélectionnées pour les mesures de reproductibilité (annexe 6.1). Nous avons montré que pour les souches du groupe B, la CMI moyenne de la télithromycine augmente significativement quand la fraction de CO₂ utilisée lors de la détermination de la CMI augmente. Une telle relation n'a pas été mise en évidence pour les souches du groupe A. Ce lien quantitatif entre fraction de CO₂ et CMI de la télithromycine, pour certaines souches de pneumocoque, conforte la réalité d'une influence de CO₂ sur la CMI de la télithromycine.

La reproductibilité du rapport CO₂ / AA de la CMI de la télithromycine, étudiée sur 40 souches porteuses de *erm(B)*, s'est avérée assez satisfaisante, puisque, sur 10 mesures consécutives, l'écart-type du rapport CO₂ / air ambiant est $\leq 1 \log_2$ pour 36 souches sur 40, et $\leq 0.5 \log_2$ pour 20 souches sur 40. Exprimée autrement, la reproductibilité de ce rapport peut également être indiquée en nombre de mesures (sur 10) donnant un rapport $\geq 3 \log_2$. Parmi 40 souches, ce nombre est ≤ 2 pour 23 souches (c'est-à-dire que sur 10 mesures, au maximum 2 ont donné un rapport ≥ 3), et ≥ 8 pour 9 souches (c'est-à-dire que sur 10 mesures, au minimum 8 ont donné un

rapport ≥ 3). Pour les 8 dernières souches, le nombre de mesures ayant donné un rapport ≥ 3 était compris entre 3 et 7. Autrement dit, sur 40 souches testées 10 fois, 9 ont un rapport CO₂ / AA régulièrement ≥ 3 dilutions, 23 ont un rapport CO₂ / AA régulièrement < 3 dilutions, et 8 ont un rapport CO₂ / AA variable.

La CMI de la télithromycine augmente donc d'une façon importante (c'est-à-dire d'au moins 3 dilutions) chez environ 30% des pneumocoques *erm(B)*-positifs. Ce phénomène est reproductible dans environ la moitié des cas, et n'est pas observé sur les souches sensibles à l'érythromycine.

2.3.3 Influence sur la catégorisation du pneumocoque vis-à-vis de la télithromycine

Les concentrations critiques retenues par l'European Agency for the Evaluation of Medicinal Products et par le Comité de l'Antibiogramme de la SFM (CASFM) pour la télithromycine sont ≤ 0.5 et > 2 mg/L. La proportion de souches de pneumocoque *erm(B)*-positif sensibles à la télithromycine passe donc dans notre étude de 97.7% si la CMI est mesurée en air ambiant, à 78.5% si celle-ci est mesurée en CO₂. La différence entre ces deux chiffres est cliniquement significative, quand on veut évaluer l'intérêt de la télithromycine dans le traitement probabiliste des infections pneumococciques en France.

Deux études précédentes suggéraient des changements de catégorisation des pneumocoques vis-à-vis des macrolides et lincosamides, mais aucune n'avait comparé systématiquement deux atmosphères d'incubation (air ambiant et CO₂) pour une même méthode de mesure (Johnson J 1999, Fasola 1997).

L'influence du CO₂ sur la catégorisation du pneumocoque vis-à-vis de la télithromycine semble plus marquée sur nos souches collectées en France que sur les souches collectées par Walsh au Royaume-Uni (Walsh 2004). En effet, cet auteur montre que la proportion de souches non sensibles à la télithromycine (selon les critères du CA-SFM) passe sur 100 souches de 2% en air ambiant à 7% en CO₂, alors dans notre série, cette proportion passe de 2.3 % à 21.5% des souches *erm(B)*-positives. Cette différence est probablement à mettre sur le compte des mécanismes de résistance aux macrolides et apparentés différents en France et au Royaume-Uni, puisque parmi les 100 souches de pneumocoque testées par Walsh et coll, 13 portaient le gène *mef(A)* et seulement 8 le gène *erm(B)*.

2.3.4 Mécanisme de l'influence du CO₂ sur la CMI de la télithromycine

Le mécanisme de ce phénomène n'a pas été élucidé. Plusieurs hypothèses ont été avancées.

L'hypothèse la plus ancienne attribue à l'acidification du milieu de culture par le CO₂ la diminution de l'activité de l'antibiotique. Ainsi, plusieurs auteurs ont rapporté que le pH de la gélose diminuait d'environ 0.4 après 24 heures d'incubation en CO₂, alors qu'il diminuait de 0.1 à -0.2 après incubation en air ambiant (Fasola 1997, Johnson J 1999, Brueggemann 1997). Néanmoins, aucune étude n'a montré que l'augmentation des CMI sous CO₂ disparaissait quand les géloses étaient tamponnées pour garder un pH ≥ 7.3 . Nous contribuons à ce débat en rapportant en annexe 6.2 des expérimentations comparant l'effet du CO₂ et l'effet du pH sur la CMI

de la télithromycine vis-à-vis de 45 souches de pneumocoque. Ces données montrent que le tamponnement des géloses à un pH 7.3 n'annule pas l'influence du CO₂ sur la CMI, et que les CMI de la télithromycine augmentent moins quand elles sont mesurées en air ambiant sur gélose tamponnée à pH 6.8 qu'en CO₂ sur gélose standard. Nous en concluons que l'abaissement du pH des géloses secondaire à l'incubation en CO₂ n'explique pas totalement l'augmentation des CMI de ces antibiotiques.

Une autre hypothèse attribue l'augmentation de la CMI au fait que le CO₂ favorise la croissance du pneumocoque, au point que certaines souches, dites capnophiles, ne poussent pas ou que très peu en air ambiant. Selon les études, 2 à 7 % des isolats cliniques de pneumocoque sont capnophiles (Flanaghan 1998, Hamilton-Miller 2001, Lonks 1993). Ces chiffres correspondent à la proportion de 3% que nous avons observée (Drugeon 2003).

L'hypothèse d'un gain de croissance sous CO₂ suppose une même influence du CO₂ sur la CMI de diverses classes d'antibiotiques pour le pneumocoque. Pourtant, ce phénomène a été surtout documenté pour les macrolides et apparentés. De fait, les études consacrées aux autres antibiotiques, si elles ont parfois montré une influence du CO₂ sur la CMI de souches pneumococciques vis-à-vis d'antibiotiques d'autres classes, ne semblent avoir produit des rapports CO₂ / AA aussi importants que ceux constatés par exemple avec la clindamycine. Ainsi, le CO₂ n'augmente pas la CMI de plusieurs quinolones de plus de 2 log₂ dilutions (Brueggemann 1997, Bolstrom 2002). Un résultat comparable est obtenu avec 5 β-lactamines sur 37 souches par Chomarat et coll : sur 185 rapports CO₂ / AA, seuls 2 sont > 2 log₂ (Chomarat 1997). Enfin, Hamilton-Miller et coll ne trouvent pas d'effet significatif du CO₂ sur la CMI du linézolide et de l'évernimycine vis-à-vis du pneumocoque (Hamilton-Miller 1999, Hamilton-Miller 2001).

L'influence du CO₂ sur l'activité des antibiotiques vis-à-vis du pneumocoque semble donc surtout marquée pour les macrolides et apparentés. Plus précisément, nous avons vu que le phénomène semblait particulièrement marqué chez les souches résistantes à la clindamycine, dont le gène *erm(B)* code la résistance. Cette étude est la première à établir une relation claire entre le gène *erm(B)* et l'influence du CO₂ sur la CMI d'un antibiotique apparenté aux macrolides. Il a été supposé que le CO₂ induisait la production de méthylase chez les souches dont la CMI de la télithromycine augmente sous CO₂. Leclercq et coll, par des études de conjugaison menée à partir d'une souche dont la CMI de la télithromycine est influencée par le CO₂, ont montré que cette influence du CO₂ sur la CMI n'était pas transmise avec le gène *erm(B)* (Leclercq 2003). Ce phénomène ne semble donc pas lié directement au gène *erm(B)* et à sa séquence régulatrice.

Enfin, il faut noter que ces diverses hypothèses ne s'excluent pas. Ainsi, une étude suggère que la proportion de souches résistantes à l'érythromycine est de 22% (2 sur 9) parmi les souches capnophiles, et de 2% (2 sur 123) parmi les souches non capnophiles (Lonks 1993). Une relation entre la résistance aux macrolides, la capnophilie et l'augmentation de la CMI des macrolides sous CO₂ devient alors envisageable. A notre connaissance, ces données n'ont été ni confirmées, ni infirmées par la suite.

2.3.5 Activité *in vivo* de la télithromycine sur les souches dont la CMI augmente sous CO₂

Une fois qu'il est démontré que l'incubation en CO₂ augmente la CMI de certaines souches de pneumocoque, et parfois un changement de catégorisation en terme de sensibilité, nous avons voulu savoir comment agit la télithromycine *in vivo* sur les souches dont la CMI augmente sous CO₂.

2.3.5.1 Modalités de l'expérimentation *in vivo*

Plusieurs modèles d'infection pneumococcique pouvaient être envisagés dans cette situation, et en particulier le sepsis/péritonite de souris, la pneumonie de souris, et la pneumonie de lapin. Le sepsis/péritonite de souris est un modèle décrit dès 1905 (Frimodt-Moller 1993). La virulence particulière du pneumocoque dans ce modèle a servi longtemps comme test diagnostique quand l'identification bactériologique n'arrivait pas à trancher entre *S. pneumoniae* et *S. mitis*. Ce modèle a été utilisé rapidement dans l'évaluation expérimentale des antibiotiques, avec le Prontosil en 1935, et la pénicilline G en 1950 (Frimodt-Moller 1993). Du fait de sa simplicité, il permet l'étude d'un plus grand nombre de souches que ne permettraient des modèles complexes.

Le principal problème que nous avons rencontré au début de ces manipulations a porté sur la sélection de souches de virulence comparable. La dose assurant une survie de 50 % des souris (DE₅₀) est le paramètre habituellement utilisé pour mesurer l'activité *in vivo* des antibiotiques. Elle est influencée par l'activité de l'antibiotique, mais aussi par la virulence de la souche. Or il existe une interaction entre virulence et résistance chez le pneumocoque : il a ainsi été démontré que les pneumocoques sont d'autant moins virulents dans le modèle de sepsis/péritonite de souris que leur CMI de la pénicilline est élevée (Azoulay-Dupuis 2000). Dès lors, deux solutions se présentent pour prendre en compte l'influence de la virulence : la première consiste à évaluer la virulence de chaque souche, généralement par mesure de la dose léthale minimale assurant une mortalité totale (DL₁₀₀), et d'utiliser dans l'étude d'activité de l'antibiotique un inoculum dépendant de la DL₁₀₀, le plus souvent de type 100 fois la DL₁₀₀. L'inconvénient de cette méthode est que la DL₁₀₀ peut varier jusqu'à 7 log₁₀ d'une souche de pneumocoque à l'autre, et expose au risque d'un effet inoculum *in vivo* (Azoulay-Dupuis 2000). L'autre solution consiste à sélectionner des souches de virulence comparable. Il est démontré que la virulence chez la souris est liée au sérotype : les sérotypes 1, 3 et 4 sont beaucoup plus virulents que les sérotypes 9, 14, 19, 23 (Bédos 1991). Par ailleurs il est également démontré que la résistance aux antibiotiques est associée aux sérotypes 9, 14, 19, 23 (Maugein 2003, Geslin 1998). Pour évaluer la relation entre résistance à un antibiotique donné et activité de celui-ci chez la souris sur des souches de virulence comparable, une solution est donc de sélectionner des sérotypes caractérisés par une virulence homogène et des profils variables de sensibilité à l'antibiotique étudié. L'équipe du Statens Serum Institut de Copenhague utilise ainsi les sérogroupes 6A, 6B, 9V, 14 et 19A, avec l'adjonction de mucine intrapéritonale, qui augmente la virulence de ces souches (Knudsen 1995, Knudsen 1997, Den Hollander 1998). Nous avons retenu cette méthodologie, en notant pour notre part que le sérotype 14 offrait une virulence particulièrement homogène.

2.3.5.2 Analyse des résultats

La question à laquelle l'étude animale devait aider à répondre était celle-ci : quelle est l'activité *in vivo* de la télithromycine sur les souches ayant des CMI basses en air ambiant et des CMI élevées sous CO₂ ?

Le premier niveau de réponse est le suivant. Les CMI étant mesurées en air ambiant, les DE₅₀ des souches intermédiaires (CMI > 0.5 mg/L) semblent 10 fois supérieures aux DE₅₀ des souches sensibles à la télithromycine (CMI ≤ 0.5 mg/L). Les souches sensibles en air ambiant et dont les CMI dépassent 0.5 mg/L en CO₂ sont aussi sensibles *in vivo* à la télithromycine que les souches dont la CMI n'augmente pas sous CO₂.

Par ailleurs, les CMI étant mesurées en CO₂, les souches dont les CMI sont entre 0.5 et 2 mg/L (classe intermédiaire) sont aussi sensibles *in vivo* que les souches dont les CMI sont ≤ 0.5 mg/L.

Autrement dit, une diminution d'activité *in vivo* de la télithromycine semble associée aux classes intermédiaire et résistante si la CMI est mesurée en air ambiant, et à la seule classe résistante si la CMI est mesurée en CO₂.

2.3.5.3 Relation entre CMI et DE₅₀ de la télithromycine vis-à-vis du pneumocoque

La réponse à la question précédente présupposait que l'activité *in vivo* de la télithromycine est différente sur les souches ayant une CMI basse et sur les souches ayant une CMI élevée, autrement dit qu'il existe une relation entre CMI et DE₅₀. Ceci a été bien démontré pour la pénicilline vis-à-vis du pneumocoque par Knudsen dans le modèle de sepsis/péritonite de souris, et par Moine dans le modèle de pneumonie murine (Knudsen 1995, Moine 1997).

Une analyse complémentaire rapportée en annexe 6.3 confirme qu'il existe une corrélation statistiquement significative entre le log CMI et la DE₅₀ de la télithromycine pour les 8 souches étudiées, quand la CMI est mesurée en air ambiant. Cette corrélation est à la limite de la significativité quand la CMI est mesurée en CO₂ (annexe 6.3). Il faut cependant noter que cette analyse n'était pas l'objectif initial des manipulations. De ce fait, les souches n'ont pas été choisies pour représenter un continuum de valeurs de CMI, ce qui est souhaitable dans les analyses de corrélation. Cette étude de corrélation aurait plus de puissance si elle prenait en compte des souches dont les CMI étaient comprises entre 0.1 et 1 mg/L en air ambiant, et entre 1 et 3 mg/L en CO₂.

L'absence de ces points ne permet pas de savoir si la relation entre le log CMI et la DE₅₀ est linéaire, comme Knudsen et coll et Moine et coll l'ont montré pour la pénicilline, ou s'il existe un seuil de CMI à partir duquel la DE₅₀ augmente (Knudsen 1995, Moine 1997). L'allure générale de la courbe représentant la DE₅₀ en fonction de la CMI mesurée en CO₂ suggère une telle forme biphasique, par exemple exponentielle. L'aspect général de la courbe quand la CMI est mesurée en air ambiant est plus difficile à envisager.

Une meilleure connaissance de la nature exacte de cette relation entre CMI et DE₅₀, à la fois en air ambiant et en CO₂, pourrait contribuer à établir une relation entre concentrations critiques en air ambiant et concentrations critiques en CO₂.

2.4 CONCLUSION

L'ensemble de ces travaux a permis de montrer que certaines souches de pneumocoque porteuses du gène *erm(B)* présentent une augmentation franche de leur CMI de la télithromycine quand celle-ci est mesurée sous CO₂. Ce phénomène est assez fréquent pour faire diminuer drastiquement la proportion de souches sensibles à la télithromycine en France, si le test de sensibilité est effectué en CO₂. Nous avons montré qu'il s'agit d'un phénomène reproductible, et d'autant plus marqué que la concentration de CO₂ est élevée. La cause de l'élévation de la CMI sous CO₂ n'est probablement pas univoque, et l'acidification de la gélose ne semble pas expliquer l'intégralité du phénomène.

Quoiqu'il en soit, l'activité de la télithromycine est conservée dans notre modèle animal sur les souches dont la CMI est basse en air ambiant (en zone de sensibilité), et est intermédiaire en CO₂. Ce travail a connu une application rapide. En effet, il a incité, entre autres arguments, le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie à recommander en 2004 de vérifier en air ambiant les souches apparaissant résistantes en CO₂ à la télithromycine. Allant plus loin, le communiqué 2005 du CA-SFM recommande même de ne plus tester le pneumocoque en CO₂, mais en air ambiant, et ce pour tous les antibiotiques (CASFM 2005).

Au delà du choix de la méthode des tests de sensibilité, il reste des questions à ce sujet. Faut-il donner des concentrations critiques spécifiques à une incubation en CO₂ pour les 2 à 7 % de souches capnophiles de pneumocoque, qui ne peuvent être testées qu'en CO₂? Ce phénomène est-il limité à la télithromycine, ou concerne-t-il également la céthromycine, autre kétolide en cours de développement? Qu'en est-il d'*Haemophilus influenzae*, autre cible des kétolides, qu'il est également parfois difficile de cultiver sans CO₂?

Toutes ces questions montrent que l'influence du CO₂ sur la sensibilité de certaines bactéries aux kétolides n'est pas encore bien connue, et que de nombreux travaux restent à faire.

3 ACTIVITE *IN VITRO* ET *IN VIVO* DE LA TEICOPLANINE VIS-A-VIS DE *S. EPIDERMIDIS*

3.1 INTRODUCTION

En France, les staphylocoques à coagulase négative (SCN) sont la cause de 8 à 29 % des bactériémies diagnostiquées à l'hôpital (Bertrand 2002, Decousser 2003, Boisson 2002, Branger 2001). Selon ces études françaises, les SCN représentent, en ordre de fréquence, la première, la deuxième ou la troisième bactérie isolée d'hémoculture à l'hôpital (Bertrand 2002, Decousser 2003, Boisson 2002). A titre d'exemple, l'incidence des bactériémies à SCN au CHU de Besançon a été estimée à 0,51 cas pour 1000 jours d'hospitalisation (Bertrand 2002). *S. epidermidis* est le plus fréquent des SCN isolés à l'hôpital, représentant 68 à 75% des souches dans des études récentes françaises (Leclercq 2003 bis, Elouennass 2004, Boisson 2002). Les bactériémies à SCN sont nosocomiales dans 84 % des cas ; elles sont plus souvent nosocomiales que les bactériémies dues aux autres espèces bactériennes, et sont deux fois plus souvent diagnostiquées chez des patients hospitalisés en réanimation (Bertrand 2002). Ceci explique probablement en partie qu'en France, le taux de résistance à la méticilline soit élevé, compris entre 46% et 68% des souches isolées (Decousser 2003, Elouennass 2004, Leclercq 2003). De ce fait, l'antibiothérapie des infections par SCN repose souvent sur un glycopeptide, c'est-à-dire sur la vancomycine ou la teicoplanine.

3.1.1 Les glycopeptides

Deux glycopeptides sont actuellement commercialisés en France. La vancomycine a été isolée dans les années 1950, par extraction d'un streptomycète indonésien, *Amycolatopsis orientalis*. Il s'agissait à l'époque de trouver une parade à la résistance de *S. aureus* à la pénicilline. L'apparition des pénicillines M, et des problèmes de tolérance d'une vancomycine initialement mal purifiée, ont limité initialement l'utilisation de cet antibiotique. L'apparition de staphylocoques résistants à la méticilline dans les années 1960 a relancé l'intérêt de cet antibiotique. A la fin des années 1970, la teicoplanine était extraite d'*Actinoplanes teichomyceticus* dans les laboratoires Lepetit, apportant les promesses d'une bonne tolérance clinique et d'une pharmacocinétique permettant une injection unique par jour.

La teicoplanine partage avec la vancomycine un squelette heptapeptidique. La principale différence de structure entre les deux molécules est un acide gras de 10 atomes de carbones, que contient la teicoplanine mais pas la vancomycine. Ainsi la teicoplanine est-elle précisément un lipoglycopeptide, et la vancomycine un glycopeptide (Kahne 2005).

D'une façon générale, on considère que les glycopeptides, en se fixant sur le dipeptide D-ala-D-ala des monomères de muréine, inhibent l'assemblage de ces monomères au sein du peptidoglycane en freinant deux activités enzymatiques, à savoir les activités transpeptidase et transglycosylase (Hiramatsu 2001). En réalité, les lipoglycopeptides en général, et la teicoplanine en particulier, ont probablement un deuxième site de fixation, par le biais de leur acide gras qui se lie au lipide II de la membrane cytoplasmique (Kahne 2005). Ainsi, les lipoglycopeptides s'ancrent sur la membrane cytoplasmique, alors que les glycopeptides, dont la vancomycine, sont répartis plus largement dans le peptidoglycane (Kahne 2005). Ces différences de localisation sont rendues responsables de propriétés différentes de ces deux classes de molécules. Ainsi est-il montré que les glycopeptides inhibent préférentiellement les réactions de transpeptidation, et que les lipoglycopeptides inhibent plus la transglycosylation (Kahne 2005).

3.1.2 Résistance de *S. epidermidis* aux glycopeptides

3.1.2.1 Définitions

La résistance de *S. spp.* aux glycopeptides ne connaît pas de définition consensuelle internationale. En France, les concentrations critiques sont ≤ 4 et > 8 mg/L pour la teicoplanine et la vancomycine (CASFM 2005). La diminution de sensibilité aux glycopeptides de *S. aureus* est dépistée par antibiogramme ou par ensemencement de $6 \cdot 10^6$ ufc sur une gélose de Mueller-Hinton additionnée de 5 mg/L de teicoplanine. Si l'un de ces tests de dépistage est positif, il doit être confirmé par mesure de la CMI par dilution en gélose MH (CASFM 2004). Le CASFM ne précise pas s'il faut ou non pratiquer un test de dépistage de la diminution de la sensibilité à la teicoplanine chez les staphylocoques à coagulase négative, comme cela est recommandé pour *S. aureus* (CASFM 2005).

Le CLSI a retenu les mêmes concentrations critiques que le CA-SFM (≤ 4 et ≥ 32 mg/L) (Cosgrove 2004). Le BSAC donne un unique breakpoint pour la vancomycine

et la teicoplanine : les souches sont classées sensibles si leur CMI est ≤ 4 mg/L, et résistantes si leur CMI est > 4 mg/L. Aucune méthode de dépistage n'est recommandée (BSAC 2005).

L'hétérorésistance à la vancomycine a principalement été décrite chez *S. aureus* (hVISA, pour heterogeneous Vancomycin Intermediate *S. aureus*). Elle est définie à partir d'une analyse de population (CASFM 2005, BSAC 2005, Cosgrove 2004). Une souche est classée hVISA si sa CMI de vancomycine est normale et si elle présente une sous-population (par exemple, au moins 1 ufc sur 10^6) croissant sur une gélose contenant de la vancomycine à une concentration > 4 mg/L (Liu 2003). Le consensus fait défaut sur les modalités de réalisation de l'analyse de population, et en particulier sur l'inoculum utilisé. La même méthodologie peut être appliquée à la teicoplanine.

3.1.2.2 Epidémiologie

Fait remarquable, il n'a pas été décrit de souches épidémiques de staphylocoques résistantes à la vancomycine pendant les 30 années qui ont suivi la commercialisation de cet antibiotique (Biavasco 2000). La teicoplanine a été commercialisée en France en 1988. Cependant, dès 1983, des souches de *S. epidermidis* ayant une CMI de la teicoplanine > 4 mg/L étaient décrites, et les premières souches de *S. haemolyticus* résistantes à la teicoplanine étaient décrites en 1986 (Baviasco 2000). En 1989, le taux de staphylocoques à coagulase négative de sensibilité diminuée à la teicoplanine était de 23% dans un hôpital parisien (Goldstein 1990). Nous reviendrons plus tard sur l'émergence de souches de *S. aureus* de sensibilité diminuée aux glycopeptides.

Les études épidémiologiques françaises récentes indiquent des taux variables de staphylocoques coagulase négative de sensibilité diminuée à la teicoplanine, probablement en partie parce que la méthode de mesure de la CMI varie d'une étude à l'autre. La situation est par exemple bien décrite au CHU de Besançon, où 22 à 33 % des souches de SCN ne sont pas sensibles à la teicoplanine (Bertrand 2002, Boisson 2002, Bertin 2004). A l'opposé, seules 7 % des souches isolées dans un réseau d'hôpitaux non universitaires sont intermédiaires ou résistantes à cet antibiotique (Decusser 2003). Fait marquant, toutes ces études concordent sur la sensibilité de toutes les souches à la vancomycine. Dans une étude européenne, le taux de souches de *S. epidermidis* de sensibilité diminuée à la teicoplanine (CMI ≥ 8 mg/L) a été récemment estimé à 17% pour la France, ce qui place ce pays parmi les pays à fort taux de résistance en Europe (Schito 1999). Une autre étude récente indique que 11% des souches européennes de *S. epidermidis* ont une sensibilité diminuée à la teicoplanine (Fluit 2004).

La particularité de la sensibilité de *S. epidermidis* à la teicoplanine a été illustrée par l'étude rétrospective de 5 souches isolées entre 1925 et 1962 (Sieradzki 1998).

Quatre de ces 5 souches présentaient un profil de sensibilité hétérogène à la teicoplanine. Ce constat, pour des souches isolées avant la découverte de la teicoplanine, et pour deux d'entre elles avant même la découverte de la vancomycine, indique que cette hétérogénéité de sensibilité à la teicoplanine pourrait être en réalité une caractéristique intrinsèque d'espèce (Sieradzki 1998).

3.1.2.3 Mécanisme de résistance de *S. epidermidis* aux glycopeptides

Le mécanisme de résistance de *S. epidermidis* aux glycopeptides, et singulièrement à la teicoplanine, n'est pas clairement connu. Il n'est pas associé à des plasmides ou à des transposons d'une façon générale, et pas aux gènes de la famille *van* décrits chez *Enterococcus spp.* et *S. aureus* en particulier (Biavasco 2000). Pour résumer, plusieurs données font penser qu'il existe une surproduction du peptidoglycane, responsable d'une augmentation du nombre de sites de fixation des glycopeptides (c'est-à-dire des dimères D-ala-d-ala) dans l'épaisseur du peptidoglycane, à distance de leurs cibles situées à la surface de la membrane cytoplasmique, et que sont les transglycosylases et les transpeptidases (Biavasco 2000, Woodford 2005). Il s'agirait ainsi d'un mécanisme très proche de celui qui est décrit chez les souches de *S. aureus* intermédiaires aux glycopeptides (Hiramatsu 2001).

3.1.3 Influence du milieu de culture sur la CMI de la teicoplanine

La difficulté de la mesure de la CMI de la teicoplanine chez les SCN a été soulignée dès la fin des années 1980, et a été attribuée à l'influence de facteurs multiples, tels l'inoculum, la durée d'incubation, le type de gélose, l'addition de sang ou de serum (Biavasco 2000, Kennedy 1996). On connaît également l'influence de la gélose (Mueller-Hinton versus BHIA) dans les tests de dépistage des *S. aureus* intermédiaires aux glycopeptides (Bernard 2004). Notons que l'influence du milieu de culture sur la CMI a également été décrite pour les macrolides, mais aussi pour les tétracyclines et le triméthopime (Siebor 1993).

L'importance des conditions de mesure de la CMI s'est encore accrue quand il est apparu que la CMI de la teicoplanine vis-à-vis de *S. epidermidis* variait selon le fournisseur même du milieu de culture utilisé (annexe 6.4). En particulier, les CMI de la teicoplanine se révèlent significativement plus élevées quand elles sont mesurées en milieu Biorad que quand elles le sont en milieu Difco, et ceci aussi bien en milieu liquide qu'en milieu solide (annexe 6.4). En conséquence, certaines souches sont classées dans des catégories différentes de sensibilité à la teicoplanine selon la marque du milieu de culture. Ainsi, 20% des *S. epidermidis* résistants à la méticilline isolés en 2001 à l'Hôpital Laënnec de Nantes étaient de sensibilité diminuée à la teicoplanine si la CMI était mesurée sur une gélose Difco, alors que ce chiffre était de 68% avec des géloses Biorad.

Des données comparables ont été récemment rapportées chez *S. aureus*. Martin a comparé la CMI de la teicoplanine pour 36 souches de *S. aureus*, mesurée par E-test sur des géloses BHI provenant de 5 fournisseurs différents (Martin 2004). Il a observé une différence significative entre ces milieux, la CMI moyenne variant de 3.3 mg/L sur gélose Biorad à 6.6 mg/L sur gélose AES, et montant à 9.7 mg/L sur gélose AES pré-coulée.

3.1.4 Objectifs de cette étude

L'existence de souches de *S. epidermidis* apparaissant sensibles en milieu Difco et intermédiaires en milieu Biorad pose le problème de savoir si un milieu de culture est mieux corrélé que l'autre à l'activité *in vivo* de la teicoplanine. Nous avons voulu dès lors déterminer l'activité de la teicoplanine, dans un modèle animal, sur les souches qui apparaissent, selon le milieu utilisé pour mesurer la CMI, sensibles ou intermédiaires à cet antibiotique. Pour répondre à cet objectif, il nous fallait établir une relation entre la CMI de la teicoplanine et son activité *in vivo*, et ce pour chaque milieu de culture utilisé pour la mesure de la CMI. Nous avons utilisé le modèle de sepsis/péritonite de souris. D'une façon inattendue, nous n'avons pas pu établir une telle relation dans ce modèle. Nous avons alors travaillé à valider notre modèle animal avec un autre antibiotique, en l'occurrence la ciprofloxacine. Ces résultats nous ont paru assez originaux pour être publiés. Cependant, pour des raisons contractuelles, ce travail n'a pas pu être soumis pour publication. Nous reproduisons ci-après un projet d'article rédigé au format d'une note pour Antimicrobial Agents and Chemotherapy. La rédaction a été orientée vers la relation entre CMI et activité *in vivo*. La discussion, nécessairement courte pour ce type d'article, est reprise et complétée dans le chapitre suivant.

Ces données ont été en partie présentées au 15th European Congress on Clinical Microbiology and Infectious Diseases à Copenhague en avril 2005 (annexe 6.5).

3.2 PROJET D'ARTICLE

RELATION BETWEEN MIC AND *IN VIVO* EFFICACY OF TEICOPLANIN AND CIPROFLOXACIN AGAINST *S. EPIDERMIDIS*.

Eric Batard, Cédric Jacqueline, Jocelyne Caillon, Gilles Potel, Henri Drugeon

Recent european data indicates that 11 % of hospital strains of *S. epidermidis* have a decreased susceptibility to teicoplanin (i.e. of a MIC of teicoplanin > 4 mg/L) (1). Some authors have suggested that *in vitro* susceptibility tests of teicoplanin are poorly predictive of clinical efficacy in coagulase negative staphylococcal infections (2,3). Furthermore, the relation between the MIC of teicoplanin against *S. epidermidis* and activity of teicoplanin in experimental infections has been poorly documented. We assessed the activity of teicoplanin against 9 strains of *S. epidermidis* in the mouse sepsis/peritonitis model.

Methods

For *in vitro* experimentations, teicoplanin and ciprofloxacin were obtained respectively from Aventis Laboratories, Paris, France (batch), and from Bayer, Puteaux, France (batch). For *in vivo* experimentations, clinical use drugs were commercially purchased. Mueller-Hinton agar was purchased from Biorad, Marne-la-Coquette, France.

Nine clinical strains of *S. epidermidis* were selected and stored at -80°C . MICs of teicoplanin and ciprofloxacin were determined using the agar dilution method as described by the French Society for Microbiology (4).

Female 20-gram Swiss mice (Elevage Janvier SA, Le Genest St Isle, France) were kept in cages with free access to food and water. Neutropenia was induced by intraperitoneal injection of 150 mg/kg of cyclophosphamide on days 5, 3 and 1 before inoculation, as previously described (5). Bacterial suspensions were sub-cultured on agar 4 consecutive days after thawing. The inoculum was adjusted and diluted with a 10% mucin saline solution (M-2378, Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) in order to obtain 2×10^7 ufc/mL. To quantify the inoculum, 50 μl of the final suspension was plated on trypticase soy agar plates after appropriate dilutions, and colonies were counted after a 48-h incubation at 37°C . Mice were injected intraperitoneally with 0.7 mL of a fresh suspension. Antibiotics were administered subcutaneously at increasing concentrations (volume 0.5 mL), immediately and 4 h after inoculation. For each strain, 6 mice were inoculated at each dose level, which ranged from 0.01 to 100 mg/kg for teicoplanin and from 0.1 to 50 mg/kg for ciprofloxacin. A control group was treated with sodium chloride 9 g/L. Mice were observed for 6 days and then sacrificed. This protocol was approved by the University of Nantes experimental therapeutic unit. The median effective dose (ED_{50}), defined as the dose which prevented 50 % of death at day 6, was calculated as previously described by Reed and Muench (6). Correlation between log MIC and ED_{50} was tested using Spearman's non parametric test (GraphPad Prism version 4.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California, USA). For that purpose, ED_{50} s > 50 and > 100 mg/kg were considered equal to respectively 50 and 100 mg/kg.

Results

MICs and ED₅₀s of teicoplanin and ciprofloxacin are reported in the table. The mean inoculum size was $2.7 \pm 2.2 \cdot 10^7$ CFU per mouse. Mortality in control groups was 97 % (confidence interval 95%, 90 – 99%). ED₅₀s are reported in the table. There was a significant correlation between log MICs and ED₅₀ for ciprofloxacin (Spearman $r = 0.91$, $p = 0.001$), but not for teicoplanin (Spearman $r = -0.03$, $p=0.94$) (figure).

Discussion

Our data show two main results. First, we found no correlation between MIC and ED₅₀ for teicoplanin against *S. epidermidis*, for MICs ranging from 0.25 to 16 mg/L. Second, we observed a great variability of ED₅₀s among strains with identical MICs. For example, although MICs of teicoplanin were identical (4 mg/L) on strains 7026, 7089 and 5056, their ED₅₀s ranged from 1.5 to > 100 mg/kg. This observation might suggest that strain 5056 is less virulent than strains 7089 and 7026. Indeed, in order to avoid an *in vivo* inoculum effect, we chose a unique inoculum for all strains. In order to take into account this limitation, we tested the same strains with another antibiotic, namely ciprofloxacin. The good correlation between MIC and ED₅₀ for ciprofloxacin suggests that virulence does not interact with antibiotic activity in our model.

There is very few experimental published data about the relation between MIC and *in vivo* activity against *S. epidermidis*. A lack of correlation between the MIC and efficacy in another animal experimental model had been suggested for teicoplanin and for other cell wall inhibitors (vancomycin, daptomycin, oxacillin and cefamandole) against coagulase negative staphylococci (7). To our knowledge, no data about the *in vivo* efficacy of any other classes of antibiotics against *S. epidermidis* have been published. Inversely, the relationship between the MIC and *in vivo* activity has been documented for beta-lactams against *S. pneumoniae*, *S. aureus* and various gram negative bacilli (8,9).

Conclusion

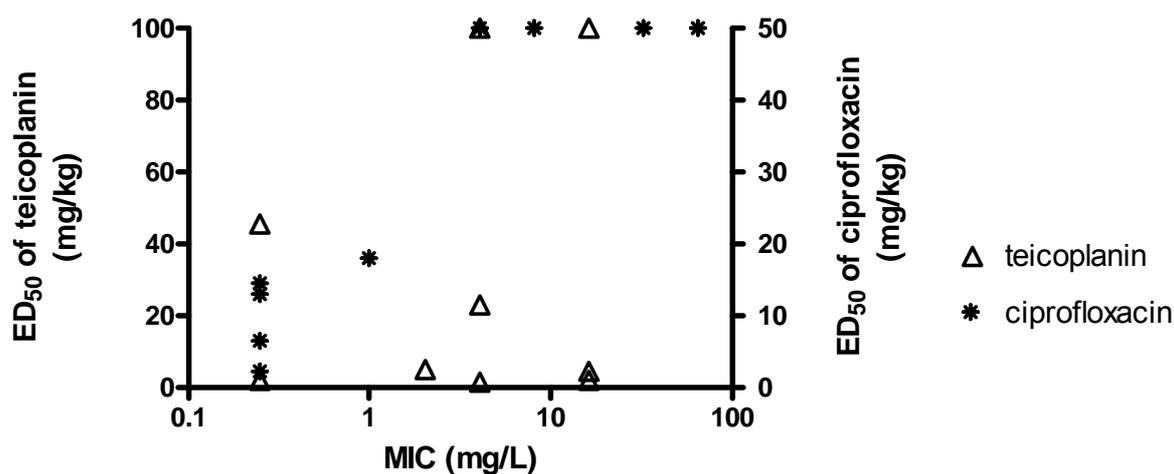
Our data suggest a lack of correlation between the Minimal Inhibitory Concentration of teicoplanin against *S. epidermidis* and efficacy in the mouse sepsis/peritonitis model. Furthermore, an elevated MIC of teicoplanin (as high as 16 mg/L) does not predict a loss of efficacy in this model. Further experimental and clinical studies are needed to determine the impact of elevated MICs of teicoplanin against *S. epidermidis*.

This work has been funded by Aventis, Paris, France.

Table. MICs (mg/L) and ED₅₀s (mg/kg) of teicoplanin and ciprofloxacin against 9 strains of *S. epidermidis*.

Strain	Teicoplanin		Ciprofloxacin	
	MIC	ED ₅₀	MIC	ED ₅₀
5056	4	1,5	32	> 50
5331	2	5,3	64	> 50
7026	4	23,2	1	18
7089	4	> 100	0,25	6,6
7302	16	> 100	0,25	13,1
7318	0,25	2,3	0,25	2,3
7371	16	1,9	8	> 50
7418	16	4,8	4	> 50
7453	0,25	45,6	0,25	14,5

Figure.



REFERENCES

- Fluit AC, Schmitz FJ, Verhoef J et coll. Daptomycin *in vitro* susceptibility in European Gram-positive clinical isolates. Intern J Antimicrob Agents 2004 ; 24 : 59-66
- Chomarat M, Espinouse D, Flandrois JP. Coagulase-negative staphylococci emerging during teicoplanin therapy and determination of their sensitivity. J Antimicrob Chemother 1991 ; 27 : 475-480.
- O'Connell B, Browne PV, Cafferkey MT et coll. Coagulase-negative staphylococcal bacteraemia treated with teicoplanin. J Antimicrob Chemother 1993 ; 31 : 438-9.
- CASFM 2004. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Communiqué 2004. <http://www.sfm-asso.fr/nouv/general.php?pa=5>, accessed on 15/06/2005.
- Goldstein BP, Candiani G, Arain TM et coll. Antimicrobial Activity of MDL 63,246, a New Semisynthetic Glycopeptide Antibiotic. Antimicrob Agents Chemother 1995 ; 39 : 1580-8.
- Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am J Hyg 1938 ; 27 : 493-497.
- Fasching CE, Peterson LR, Moody JA et coll. Treatment evaluation of experimental staphylococcal infections : comparison of β -lactam, lipopeptide, and glycopeptide antimicrobial therapy. J Lab Clin Med 1990 ; 116 : 697-706.
- Knudsen JD, Frimodt-Moller N, Espersen F. Experimental *S. pneumoniae* Infection in Mice for Studying Correlation of *In vitro* and *In vivo* Activities of Penicillin against Pneumococci with Various Susceptibilities to Penicillin. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 1253-8.
- Tsuchiya K, Kondo M, Kida M et coll. Cefmenoxime (SCE-1365), a Novel Broad-Spectrum Cephalosporin: *In vitro* and *In vivo* Antibacterial Activities. Antimicrob Agents Chemother 1981; 19 : 56-65.

3.3 DISCUSSION

L'existence d'une relation entre l'efficacité clinique et l'activité *in vitro* de la teicoplanine sur les SCN, évaluée par diffusion en gélose ou par mesure de la CMI a été discutée au début des années 1990 (Chomarat 1991, Jones 1992, O'Connell 1993). Aucune étude clinique n'a à notre connaissance tranché ce débat. Il est peu probable que cela arrive un jour, même si une étude portant sur un grand nombre de patients est réalisée. En effet, la complexité des situations cliniques habituellement associées à une infection à SCN, due en particulier à la présence d'une immunodépression et/ou d'un corps étranger, rendrait difficile l'interprétation des données. L'approche expérimentale animale apparaît alors comme un moyen privilégié d'étudier la relation entre activité *in vitro* et efficacité *in vivo* de cet antibiotique. Or les expérimentations que nous avons menées suggèrent que l'activité *in vivo* de la teicoplanine sur *S. epidermidis* ne peut pas être prédite par sa CMI.

L'activité *in vivo* de la teicoplanine apparaît en effet éminemment variable. Ainsi, pour une même CMI de la teicoplanine à 4 mg/L, trois souches ont une DE₅₀ qui varie d'un facteur 1 à 100. Un constat similaire peut être fait pour des CMI plus basses (de 0.25 mg/L) et plus hautes (de 16 mg/L).

De plus, nous n'avons pas pu mettre en évidence de corrélation entre la CMI et la DE₅₀ de la teicoplanine vis-à-vis de *S. epidermidis*, alors que ces paramètres sont statistiquement corrélées pour la ciprofloxacine vis-à-vis des mêmes souches. Cette absence de corrélation ne peut probablement pas être attribuée à la seule variabilité d'activité de la teicoplanine pour une CMI donnée. En effet, les 3 valeurs les plus élevées de DE₅₀ de la teicoplanine (≥ 45.6 mg/kg) – qu'on pourrait qualifier de points

aberrants - sont associées à des CMI variables (0.25, 4 et 16 mg/L), et ne sont pas limitées aux CMI les plus basses. Inversement, les valeurs les plus basses de la DE₅₀ (≤ 5,3 mg/kg) correspondent à des CMI également réparties de 0.25 à 16 mg/L, et ne sont pas limitées aux CMI les plus élevées.

3.3.1 Relation entre CMI et activité *in vivo* des glycopeptides chez le staphylocoque dans la littérature

Ce n'est pas la première fois qu'une mauvaise corrélation *in vitro* – *in vivo* est mise en évidence pour la teicoplanine. Knudsen et coll ont en effet rapporté l'activité de la teicoplanine et de la vancomycine dans le sepsis/péritonite de souris à pneumocoque. Les CMI de la teicoplanine pour les 10 souches de pneumocoque ne se sont avérées corrélées aux DE₅₀ que si la CMI était mesurée dans un mélange de sang de souris et de mouton. Avec 4 autres modalités de mesure de la CMI, il n'était pas noté de corrélation significative entre CMI et DE₅₀ (Knudsen 1997). De quelles données disposons-nous à propos du staphylocoque ?

3.3.1.1 staphylocoques à coagulase négative

A notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée dans le but d'évaluer la relation entre CMI et activité *in vivo* de la teicoplanine vis-à-vis de *S. epidermidis*. Le modèle de sepsis/péritonite de souris a bien été utilisé pour tester la teicoplanine sur des souches de SCN, mais dans chaque étude une seule souche était testée (Tornay 1991, Goldstein 1995, Candiani 1999).

Une seule étude a rapporté l'activité de la teicoplanine sur plusieurs souches de *S. epidermidis* dans un modèle expérimental, sans cependant étudier explicitement la relation activité *in vitro* / activité *in vivo*. Fasching et coll. étudient trois souches de staphylocoque coagulase négative dans un modèle d'infection de chambre sous-cutanée du lapin (Fasching 1990). Dans cette étude, la teicoplanine semble le moins active *in vivo* sur la souche dont la CMI est la plus basse (tableau 1). Cette absence de corrélation entre CMI et activité *in vivo* est également retrouvée pour d'autres inhibiteurs de la paroi cellulaire (vancomycine, daptomycine, oxacilline et céfamandole).

Tableau 1. CMI et activité *in vivo* de la teicoplanine vis-à-vis de 3 souches de staphylocoque à coagulase négative (Fasching 1990).

Souche	CNS 2841	CNS 1594	CNS 3017
CMI	16	4	0.5
Titre bactérien contrôle	8.9	8.9	9.1
Titre bactérien teicoplanine	5.3	3.5	8.2
Δtitre bactérien	3.6	5.4	0.9

Titre bactérien en log ufc/mL.

Δ titre bactérien = Titre bactérien teicoplanine - Titre bactérien contrôle.

3.3.1.2 *S. aureus*

L'intérêt suscité depuis quelques années par les souches de *S. aureus* intermédiaires aux glycopeptides permet d'obtenir quelques indications sur la relation CMI – activité *in vivo* de la teicoplanine sur *S. aureus*.

Domenech et coll ont étudié la bactéricidie intrapéritonéale induite, dans le modèle de sepsis/péritonite de souris, par la vancomycine et la teicoplanine sur 4 souches de *S. aureus* dont les CMI de la vancomycine varient de 1 à 8 mg/L, et dont les CMI de la teicoplanine s'étalent de 0.5 à 8 mg/L (Domenech 2005). Une corrélation significative est démontrée entre la CMI de la vancomycine et la bactéricidie intrapéritonéale au bout de 24 heures. Ce modèle ne prend cependant pas en compte la mortalité (qui varie, selon la souche, de 21 à 62% à 24 heures chez les souris non traitées), et diffère donc sensiblement de celui que nous avons utilisé.

Le modèle le plus souvent utilisé pour tester *S. aureus* est en réalité l'endocardite du lapin. A notre connaissance, une seule équipe a comparé une souche de GISA à sa souche mère sensible aux glycopeptides. Dans ses travaux est notée une diminution d'activité *in vivo* de la teicoplanine sur la souche GISA, alors que constat n'est pas fait pour la vancomycine ni pour la dalbavancine (Pavie 2003, Lefort 2004).

Asseray et coll ont étudié avec ce même modèle l'activité de la teicoplanine sur 5 souches dont la CMI varie de 0.25 à 8 mg/L (Asseray 2005). Une analyse post-hoc rapportée dans l'annexe 6.7 ne montre pas de corrélation significative entre le \log_2 CMI et le taux de bactéricidie *in vivo*. Le même constat est fait pour la vancomycine, alors que les CMI de la vancomycine varient de 0.5 à 4 mg/L (cf annexe 6.7). Il s'agit à notre connaissance de l'étude qui a étudié sur le plus grand nombre de souches de *S. aureus* l'activité de la vancomycine dans ce modèle.

Pour conclure, nos données concordent avec une étude antérieure pour suggérer l'absence de corrélation entre activités *in vitro* et *in vivo* de la teicoplanine vis-à-vis de *S. epidermidis*. Les données de la littérature divergent quant à l'existence ou à l'absence d'une telle corrélation pour *S. aureus*.

3.3.2 Facteurs susceptibles d'expliquer la variabilité de l'activité *in vivo* de la teicoplanine

De multiples facteurs influencent la corrélation entre les tests de sensibilité *in vitro* et l'activité *in vivo* des antibiotiques (Johnson CJ 1996). Ces facteurs sont liés au test de sensibilité, à la bactérie, à l'antibiotique, à l'hôte, au type d'infection, clinique ou expérimentale, et certains relèvent d'une interaction entre la bactérie, l'antibiotique et l'hôte. Nous discuterons par la suite, sans rechercher l'exhaustivité, de certains facteurs susceptibles d'expliquer l'absence de corrélation entre la CMI et la DE₅₀ de la teicoplanine vis-à-vis de *S. epidermidis* dans notre modèle.

3.3.2.1 Virulence globale des souches

La DE₅₀ est fondée sur la mesure de la mortalité, et peut donc être influencée par des paramètres autres que l'activité de l'antibiotique. Ainsi, une différence de virulence entre les souches apparaît susceptible d'expliquer, au moins partiellement, une différence entre les DE₅₀ de la teicoplanine de ces souches. Ce concept a incité certains auteurs à utiliser, pour chaque souche, un inoculum adapté à la virulence de la souche, en l'occurrence un multiple de la dose léthale médiane (DL₅₀), qui doit donc être mesurée dans une manipulation préliminaire (Candiani 1999, Ford 1996). Cependant, peu de données sont disponibles sur une supposée variabilité de la virulence entre les souches de staphylocoque à coagulase négative. En ce qui concerne la virulence de *S. epidermidis* chez la souris, nous ne connaissons pas de données comparant la DL₅₀ de plusieurs souches que dans une étude utilisant une inoculation intraveineuse, et non intrapéritonéale (Herndon 2000). Pour 11 souches de *S. epidermidis*, la DL₅₀ varie modestement, de 1.5 à 5.2 10⁹ ufc / souris. Dans une autre étude, utilisant le sepsis/péritonite de souris, la DL₅₀ de 3 souches de SCN (un *S. saprophyticus*, un *S. haemolyticus* et un *S. epidermidis*) varie assez peu, de 2,7.10⁷ à 8.10⁷ ufc/gramme de poids corporel (Molnar 1992). Nous n'avons pas mesuré la DL₅₀ de nos souches. En revanche, nous avons observé que les durées médianes de survie des souris des groupes contrôle varient de 1 à 3 jours selon la souche, ce qui est largement inférieur à la durée totale de surveillance des souris, qui est de 6 jours. Les mortalités des groupes contrôle de chaque souche, comparée par test du logrank, ne sont pas statistiquement différentes (p = 0.27). En l'absence de mesure directe de la virulence, nous n'avons donc pas d'argument en faveur d'une différence de virulence entre nos souches. Par ailleurs, nous n'avons pas retrouvé cette variabilité inter-souche des DE₅₀ avec la ciprofloxacine, pourtant mesurée sur les mêmes souches. En effet, les DE₅₀ de la ciprofloxacine semblent groupées, autour de 10 mg/kg pour les CMI basses (de 0.25 mg/L), et ≥ 50 mg/kg pour les CMI ≥ 4 mg/L. Il apparaît alors peu probable qu'une simple différence de virulence entre les souches explique une telle hétérogénéité des DE₅₀ de la teicoplanine, et une telle homogénéité des DE₅₀ de la ciprofloxacine.

3.3.2.2 Hypothèse d'une interaction toxique entre l'hôte, la bactérie et l'antibiotique

Une interaction plus complexe, entre l'hôte, la bactérie et l'antibiotique permettrait de prendre en compte cette différence d'activité de la teicoplanine et de la ciprofloxacine. Dans cette hypothèse, certains antibiotiques provoqueraient la libération par certaines souches bactériennes d'une substance toxique pour l'hôte, influençant potentiellement la mortalité et donc la DE₅₀ de l'antibiotique testé. Cet effet pourrait dépendre à la fois de l'antibiotique et de la souche bactérienne.

Des données concordantes avec cette hypothèse ont par exemple été publiées dans des modèles expérimentaux de méningite pneumococcique. En effet, il a été montré (i) que certains sérotypes de pneumocoque sont associés à une mortalité plus importante chez l'homme et à des lésions encéphalique particulières chez l'animal, (ii) que certains antibiotiques inhibiteurs de la synthèse protéique pourraient être associés à des lésions neuronales moins sévères que la ceftriaxone (Bottcher 2004, Ostergaard 2004). Cependant, il n'a pas été à notre connaissance démontré que l'effet éventuellement délétère de la ceftriaxone pouvait être souche-dépendant. De plus, aucune donnée de ce type n'a été rapportée à notre connaissance au sujet de *S. epidermidis*, et encore moins au sujet de son interaction avec la teicoplanine.

3.3.2.3 Tolérance aux glycopeptides

La tolérance se définit comme une diminution de l'activité bactéricide d'un antibiotique vis-à-vis d'une bactérie dont la CMI est restée inchangée (Handwerger 1986, Gutmann 1990). Ce concept de tolérance a été introduit pour la première fois par Alexander Tomasz en 1970, pour la pénicilline G, la fosfomycine et la D-cyclosérine, sur une souche de pneumocoque (Tomasz 1970). La première description de ce phénomène chez *S. spp* date de 1974, au sujet d'une souche de *S. aureus* tolérante à l'oxacilline (Best 1974). En 1979 et 1980, deux études cliniques rétrospectives suggéraient que le pronostic d'infections graves à *S. aureus* traitées par pénicilline M était moins bon, y compris en terme de mortalité, si la souche en cause était tolérante aux pénicillines M (Rajashekaraiyah 1980, Denny 1979). Dans les mêmes années cependant, les critères de définition de la tolérance étaient discutés (Handwerger 1986). Les travaux de Sabath sur *S. aureus* (1977) avaient amené certains auteurs à définir la tolérance à partir d'un rapport CMB / CMI > 8 ou > 16 (Sabath 1977). La mesure de la CMB a cependant été critiquée pour sa mauvaise reproductibilité (Sherris 1986). La diminution paradoxale de l'activité de certains antibiotiques à très hautes concentrations ou effet Eagle, qui semble par exemple assez fréquent pour les pénicillines M sur *S. aureus*, a conduit Goessens à proposer de définir la tolérance à partir d'un pourcentage de tolérance (Goessens 1982). Malgré les riches travaux de cette équipe, cette définition n'a pas été utilisée par d'autres équipes de recherche. Le critère qui a la préférence du découvreur de la tolérance, et des auteurs de travaux récents sur la tolérance de *S. aureus* pour les glycopeptides, repose sur la vitesse de bactéricidie en milieu liquide, à une concentration donnée et à un temps donné (Handwerger 1986, May 1998, Sakoulas 2004).

Cette absence de consensus dans la définition de la tolérance a manifestement freiné les travaux cliniques consacrés à l'influence de la tolérance sur le pronostic des infections staphylococciques. Presque 30 ans après la description du premier cas de *S. aureus* tolérant à la vancomycine, une étude a récemment suggéré que le taux de bactéricidie induit par 20 mg/L de vancomycine en 72 heures est corrélé à l'évolution clinique et bactériologique des patients infectés par *S. aureus* et traités par vancomycine (Gopal 1976, Sakoulas 2004).

La fréquence de la tolérance des SCN aux glycopeptides est mal connue. Deux revues récentes ont des discours opposés à ce sujet. En 1998, Raad et coll indiquent – en ne référant que deux communications de congrès - que la proportion de souches cliniques de *S. epidermidis* tolérantes à la vancomycine a augmenté entre les années 1980 et les années 1990, et que ce phénomène est lié à des échecs de la vancomycine en cas de neutropénie (Raad 1998). Deux ans plus tard, Biavasco écrit que la bonne activité bactéricide de la teicoplanine contre les souches sensibles de SCN a été largement documentée, et que la plupart des isolats ont un rapport CMB/CMI ≤ 2 (Baviasco 2000). Une analyse des références qu'utilise Biavasco ne nous a permis de retrouver que 2 études

rapportant le rapport CMB / CMI pour la teicoplanine, et permettant donc d'évaluer la fréquence des souches tolérantes à la teicoplanine. Ces deux études concluent qu'aucune souche n'est tolérante à la teicoplanine, parmi les 10 et 428 souches testées (Tuazon 1984, Biavasco 1992). A l'inverse, une autre étude conclue que 5 souches de *S. epidermidis* parmi 50 sont tolérantes à la vancomycine (Watanakunakorn 1985). Fait marquant, les deux études qui concluent à l'absence de souche tolérante aux glycopeptides utilisent des microméthodes en milieu liquide, alors que l'étude qui montre l'existence de souches tolérantes utilise une macrométhode en milieu liquide. Cette discordance entre macrométhode et microméthode pour la mesure des CMB vis-à-vis de *S. aureus* a également été décrite pour les β -lactamines et la vancomycine (Bismuth 1990, Batard 2001).

L'influence de la tolérance à la cloxacilline et aux glycopeptides sur leur activité *in vivo* a été étudiée chez l'animal par Voorn, Goessens et coll. Les travaux de Voorn sont basés sur une souche clinique de *S. aureus* sensible à la méticilline et tolérante à la méticilline, à la vancocycine et à la teicoplanine, et sur une souche dérivée de celle-ci et non tolérante à ces trois antibiotiques (Voorn 1991, Voorn 1994, Voorn 1994 bis). Dans le modèle d'endocardite de rat, la cloxacilline à faible dose perd son activité sur la souche tolérante, et la récupère si la dose administrée est augmentée ou si elle est administrée en perfusion continue (Voorn 1991, Voorn 1994 bis). Une relation entre tolérance de la cloxacilline et activité dans le modèle d'infection de cuisse de la souris a également été établie (Goessens 1984). En revanche, la teicoplanine, comme la vancomycine, a une activité comparable sur les deux souches dans l'endocardite expérimentale du rat (Voorn 1994 bis). Nous n'avons pas connaissance de travail similaire consacré à la tolérance aux glycopeptides chez les SCN.

Nous avons mesuré la bactéricidie *in vitro* induite par teicoplanine en milieu liquide sur les 9 souches testées *in vivo* (annexe 6.8). Dans les conditions *in vitro* que nous avons choisies (concentration fixe de teicoplanine à 20 mg/L, durée d'exposition de 24 heures), nous n'avons pas trouvé de corrélation entre le taux de bactéricidie *in vitro* et l'activité *in vivo*. Il n'est pas exclu qu'en multipliant les conditions d'expérimentation *in vitro* (choix de la concentration de teicoplanine, durée d'exposition par exemple) on finisse par trouver des taux de bactéricidie corrélés aux DE₅₀. On connaît cependant le risque de conclure faussement à une association positive entre deux paramètres quand cette association est testée de nombreuses fois.

Pour conclure, les données de la littérature et nos données expérimentales ne nous permettent pas de corréliser la tolérance à la teicoplanine chez *S. epidermidis* et une moindre efficacité dans le modèle animal.

3.3.2.4 Production de biofilm

Un biofilm bactérien est une communauté structurée de cellules bactériennes entourées d'une matrice polymérique auto-produite (nommé *slime* ou glycocalyx), et adhérant à une surface inerte ou vivante (Costerton 1999). La formation du biofilm est considérée comme le principal facteur de la virulence de *S. epidermidis* en pathologie humaine, et comme une cause d'échec du traitement des infections dues à ce germe (von Eiff 2002). On peut même considérer qu'il n'y a pas d'infection bactérienne sans adhésion ni colonisation d'une surface (Lorian 1988). La physiopathologie de la formation des biofilms de *S. epidermidis* est complexe. Retenons qu'elle comprend une phase d'attachement, à un polymère ou aux protéines de la matrice extracellulaire, et une phase d'accumulation (von Eiff 2002). Chacune de ces phases fait intervenir plusieurs molécules. La plus étudiée en est peut-être la PIA (Polysaccharid Intercellular Adhesin), qui intervient dans la phase d'accumulation, et dont la synthèse est régulée par l'opéron *icaADBC* (von Eiff 2002). La capacité des bactéries à former un biofilm ne concerne pas de la même façon toutes les souches de la même espèce,

comme le montrent des travaux utilisant des tests phénotypiques d'adhésion et des études génotypiques portant par exemple sur les gènes *ica* (Christiensen 1982, Arciola 2001). La résistance des biofilms à l'activité bactéricide des antibiotiques, qu'il a été proposé de dénommer *recalcitrance* en anglais, est décrite depuis les années 1980, mais reste mal comprise (Gristina 1989, Lewis 2001, Mah 2001). La *recalcitrance* des biofilms de *S. epidermidis* semble varier selon l'antibiotique considéré. La littérature est assez riche d'études consacrées à la comparaison de l'activité bactéricide des antibiotiques cultivées en milieu liquide et en biofilm. Malheureusement, l'utilisation par chaque équipe d'un modèle particulier de biofilm *in vitro* complique la synthèse de ces données. Les mécanismes habituellement avancés de la *recalcitrance* des biofilms aux antibiotiques sont une faible vitesse de croissance des bactéries, l'effet-barrière de la matrice polymérique entourant les bactéries du biofilm, un effet inoculum et l'antagonisation des antibiotiques par une carence nutritionnelle et/ou l'accumulation des déchets bactériens (Costerton 1999, König 2001). En ce qui concerne *S. epidermidis*, l'influence de chacun de ces mécanismes semble surtout vraie pour les glycopeptides (König 2001).

Trois études ont à notre connaissance comparé *in vitro* l'activité bactéricide sur biofilm de la teicoplanine et de la ciprofloxacine vis-à-vis de *S. epidermidis*. Selon l'étude, la teicoplanine apparaît plus, moins ou autant active que la ciprofloxacine (Widmer 1990, Blaser 1995, Hamilton-Miller 1997). Aucune de ces études n'utilise cependant le même modèle de biofilm et les mêmes concentrations d'antibiotique. D'une façon générale, la teicoplanine perd au moins une partie de son activité bactéricide sur les biofilms à chaque fois qu'elle est testée (Widmer 1990, Pascual 1994, Hamilton-Miller 1997, Schwank 1998, König 2001, Monzon 2002). En revanche, l'efficacité de la ciprofloxacine sur *S. epidermidis* en biofilm varie d'une étude à l'autre, passant d'une activité très faible à une activité semblable à celle obtenue en milieu liquide (Widmer 1990, Blaser 1995, Hamilton-Miller 1997). Les capacités d'adhésion de *S. epidermidis* étant variables d'une souche à l'autre, il semble raisonnable de supposer que l'activité *in vitro* des antibiotiques est plus faible sur les souches plus adhérentes ou plus productrices de slime. Les données disponibles à ce sujet et concernant la ciprofloxacine et la teicoplanine ne confortent cependant pas cette hypothèse (Pascual 1994, Hamilton-Miller 1997, Schwank 1998).

Peu de données sont disponibles chez l'animal. A notre connaissance, le seul modèle utilisé pour étudier l'influence de la formation de biofilm de *S. epidermidis* sur l'activité des antibiotiques est le modèle d'infection de corps étranger sous-cutané du cobaye. Celui-ci a permis de montrer que la teicoplanine est un peu plus active *in vivo* sur une souche non adhérente que sur une souche adhérente isogénique (Schwank 1998). Dans le même modèle, la ciprofloxacine et la teicoplanine ont toutes deux une activité faible ou nulle (Widmer 1990, Blaser 1995).

Au delà du phénomène de *recalcitrance* des biofilms aux antibiotiques, une autre interaction entre biofilm et antibiotique a été récemment proposée. Cargill et Upton ont récemment suggéré que de faibles concentrations de vancomycine augmentent la densité du biofilm de certaines souches de *S. epidermidis* (Cargill 2005). Ces observations nécessitent d'être confirmées par d'autres équipes, et le cas échéant, d'être appliquées à d'autres antibiotiques.

Pour en revenir à notre problématique, la question se pose d'une relation entre la formation de biofilm, la *recalcitrance* aux antibiotiques, et l'activité de ces antibiotiques dans le sepsis/péritonite de souris. Nous n'avons comparé ni la capacité de nos souches à former du slime, ni l'activité de la teicoplanine et de la ciprofloxacine sur les bactéries cultivées en biofilm, ni la capacité de faibles

concentrations de ces antibiotiques d'augmenter la densité du biofilm de nos souches, mais il s'agit là de voies qui pourraient être intéressantes à explorer.

3.3.2.5 Polymorphisme du régulon *agr*

L'opéron *agr* (*accessory gene regulator*) est un régulon global qui contrôle plusieurs facteurs de virulence de *S. aureus*, dont l'expression d'exotoxines, d'exoprotéines et d'adhésines. L'opéron *agr* induit en particulier l'expression d'hémolysines et de protéases (Moise-Broder 2004). Il régule également la formation de biofilm chez *S. epidermidis* (Vuong 2003). Il existe un polymorphisme de l'opéron *agr*, classé en 4 groupes (I à IV). Le groupe III a été corrélé au caractère communautaire de la résistance à la méticilline, le groupe II au caractère intermédiaire aux glycopeptides, et le groupe IV à la production d'exfoliatine (Moise-Broder 2004). Une étude récente a montré que le groupe II était un facteur indépendant d'échec clinico-bactériologique de traitement par vancomycine dans des infections à *S. aureus* (Moise-Broder 2004). Il faut cependant noter qu'une telle corrélation n'a pas été testée pour les infections à SCN. Nous n'avons pas étudié le polymorphisme d'*agr* chez nos souches de *S. epidermidis*.

3.3.2.6 Sensibilité à la méticilline

Les glycopeptides ont la réputation d'être moins actifs que les pénicillines M dans les infections à *S. aureus* sensibles à la méticilline. Une étude rétrospective espagnole a ainsi montré que la mortalité des pneumonies bactériémiques à *S. aureus* est augmentée chez les patients traités par vancomycine par rapport aux patients traités par cloxacilline (Gonzalez 1999). *In vitro*, la vancomycine apparaît en effet moins bactéricide que la nafcilline (Small 1990). Cependant, des données dans l'endocardite de rat indiquent que la vancomycine, si elle est administrée à dose suffisante, semble aussi efficace que la cloxacilline (Cantoni 1990).

Nous n'avons pas connaissance de telles données chez les staphylocoques à coagulase négative. Nous avons évalué la relation entre CMI et activité *in vivo* de la teicoplanine d'une part sur les souches sensibles à la méticilline, et d'autre part sur les souches résistantes à la méticilline (annexe 6.6). Nous retrouvons, dans chacun des sous-groupes, une variabilité importante de la DE₅₀ de la teicoplanine pour les mêmes CMI. Nous constatons également l'absence de corrélation significative entre CMI et DE₅₀, bien que le nombre de souches soit faible pour chaque sous-groupe. Pour conclure, nous n'avons pas d'argument pour confirmer l'influence de sensibilité à la méticilline sur la relation CMI – DE₅₀ de la teicoplanine (annexe 6.6).

3.3.2.7 Une approche pharmacocinétique/pharmacodynamique du problème

La corrélation entre activité *in vitro* et activité *in vivo* a été beaucoup étudiée par l'utilisation de paramètres intégrant la pharmacodynamie *in vitro* (essentiellement la CMI) et la pharmacocinétique, principalement avec le modèle d'infection de cuisse de souris, mais aussi avec le modèle de sepsis/péritonite de souris. Parmi les paramètres pharmacocinétique / pharmacodynamique (PK-PD) les plus utilisés

figurent le rapport AUC/CMI (aire sous la courbe de la concentration sérique / CMI de la souche), le rapport Cmax / CMI et le temps T > CMI (temps pendant lequel la concentration sérique dépasse la CMI) (Mouton 2003).

Nous n'avons pas connaissance d'étude rapportant, dans le même modèle d'infection expérimentale, la corrélation entre paramètres PK-PD et activité *in vivo* de la ciprofloxacine et de la teicoplanine vis-à-vis de *S. epidermidis*.

Dans les travaux basés sur le modèle d'infection de cuisse de souris neutropénique, l'activité *in vivo* des fluoroquinolones en général, et de la ciprofloxacine en particulier, est corrélée aux rapports AUC/CMI et Cmax/CMI, et non pas au T>CMI (Andes 2002, Andes 2003, Scaglione 2003). Le même constat a été fait pour la vancomycine et la daptomycine, dans ce même modèle avec *S. aureus* (Craig 2003, Louie 2001, Safdar 2004).

A notre connaissance, la teicoplanine n'a pas été évaluée dans le modèle. En revanche, Knudsen et coll ont montré que ce sont le rapport Cmax / CMI et le T > CMI (pour des concentrations de la molécule non liée aux protéines sanguines) qui expliquent le mieux l'activité *in vivo* de la teicoplanine dans le sepsis/péritonite de souris à pneumocoque (Knudsen 2000). Il n'est donc pas exclu que le paramètre T>CMI ait une influence sur l'activité de la teicoplanine dans le modèle de sepsis/péritonite de souris à *S. epidermidis*.

Nous n'avons pas fait de mesure de la pharmacocinétique de la teicoplanine chez nos souris. L'analyse de la littérature montre cependant que les demi-vies de la teicoplanine et de la ciprofloxacine diffèrent chez la souris, puisqu'elles sont respectivement de 150 minutes et de 41 minutes (Knudsen 1997, Scaglione 2003).

Notre modèle comporte une injection lors de l'inoculation et une autre injection 4 heures plus tard. Pour des raisons de virulence des souches, c'est-à-dire de mortalité du groupe contrôle, le critère de jugement est la mortalité après 6 jours, soit bien longtemps après que les antibiotiques aient été éliminés par la souris. La fenêtre d'activité de l'antibiotique dans ce modèle est donc brève, de quelques heures sur une durée expérimentale de plusieurs jours. Ce modèle favorise donc probablement les antibiotiques dont l'activité bactéricide est d'une part rapide, et d'autre part concentration-dépendante. Or ces caractéristiques s'appliquent *in vitro* et *in vivo* précisément aux quinolones (Craig 1998). A l'inverse, l'activité bactéricide de la teicoplanine est-elle lente *in vitro*, et son activité *in vivo* comporte-t-elle probablement au moins une composante temps-dépendante (Knudsen 1997, Odenholt 2003).

Pour conclure, il est possible que, dans le modèle que nous avons utilisé, avec en particulier ses caractéristiques temporelles, les différences pharmacocinétiques et pharmacodynamiques entre teicoplanine et ciprofloxacine expliquent que la CMI et la DE₅₀ soient corrélées pour la ciprofloxacine mais pas pour la teicoplanine. Autrement dit, de ce point de vue, le modèle que nous avons choisi pourrait être mieux adapté à la ciprofloxacine qu'à la teicoplanine. Cette hypothèse mériterait d'être confirmée par une analyse des facteurs PK-PD corrélés à l'activité *in vivo* de la teicoplanine sur *S. epidermidis* dans ce modèle.

Pour obtenir une corrélation entre CMI et activité *in vivo* de la teicoplanine, il deviendrait alors envisageable de modifier le modèle en favorisant le paramètre T>CMI, par exemple en administrant un traitement plus long par rapport à la période d'observation des souris. Une autre solution consisterait à prendre comme critère de jugement un paramètre moins tardif, par rapport à l'inoculation et au traitement, que la mortalité au 6^{ème} jour. La prise en compte d'une mortalité plus précoce ne semble pas possible, car la mortalité maximale des souris du groupe contrôle n'est pas atteinte avant le 4^{ème} jour. Une solution consisterait à mesurer la bactéricidie

intrapéritonéale obtenue après 1 jour de traitement, comme Domenech et coll l'ont fait avec *S. aureus* (Domenech 2005).

3.4 CONCLUSION

La variabilité de l'activité *in vivo* de la teicoplanine semble donc contraster avec une activité relativement homogène de la ciprofloxacine sur *S. epidermidis*. La relation entre CMI et activité *in vivo* d'un antibiotique ne semble donc pas un phénomène constant, applicable à tous les antibiotiques et à tous les genres bactériens. L'histoire de la teicoplanine est marquée par la recommandation de doses croissantes depuis sa commercialisation à la fin des années 1980. La dose d'entretien utilisée initialement, à savoir 3 mg/kg/jour, s'est en effet avérée inefficace pour le traitement d'infections staphylococciques sévères (Calain 1987). Le doublement de cette dose journalière (6 mg/kg/jour en dose d'entretien) n'a cependant pas évité des échecs en cas d'endocardite (Gilbert 1991). En l'absence de données publiées concernant l'utilisation de posologies supérieures, la teicoplanine ne fait pas actuellement partie des molécules recommandées pour le traitement des endocardites à staphylocoque (Elliott 2004, Rubinstein 1999). Au delà de l'utilisation de doses insuffisantes en clinique, l'absence de corrélation entre activités *in vitro* et *in vivo* que nous avons constatée chez l'animal est-elle une autre explication des échecs cliniques de la teicoplanine ? Pour répondre à cette question, il faut savoir si ce manque de corrélation est le fait de la teicoplanine, de *S. epidermidis*, des deux, et /ou du modèle utilisé. Il faudrait tester d'autres espèces bactériennes, et en premier lieu *S. aureus*. Cet effet existe-t-il pour toute la classe des glycopeptides, ou est-il limité à la teicoplanine ? Qu'en est-il des autres classes d'antibiotiques vis-à-vis de *S. epidermidis* ? Observe-t-on cet effet dans d'autres modèles d'infection ? Nous avons vu que les données sont rares pour répondre à toutes ces questions. On peut cependant penser qu'une meilleure connaissance des propriétés anti-bactériennes de la teicoplanine, qui passe en particulier par la réponse aux questions que nous posons, permettrait de mieux utiliser cet antibiotique en clinique.

4 ETUDE DE L'ASSOCIATION DE LA QUINUPRISTINE-DALFOPRISTINE ET DE LA GENTAMICINE SUR *S. AUREUS*

4.1 INTRODUCTION

Dans 4 études françaises basées sur un isolement à l'hôpital à partir d'hémocultures, *S. aureus* est la cause de 15 à 23% des bactériémies (Van der Meer-Marquet 2004, Decousser 2003, Boisson 2002, Branger 2001). Bertrand estime à 150 le nombre annuel d'infections profondes ou bactériémiques à *S. aureus* résistant à la méticilline pour la région Franche-Comté, qui comprend un peu moins d'un million d'habitants (Bertrand 2004). L'incidence annuelle des bactériémies à *S. aureus* serait de l'ordre de quelques dizaines par million d'habitants (Van der Meer-Marquet 2004, Bertrand 2004). La mortalité des bactériémies à *S. aureus* varie énormément d'une étude à l'autre, de 0 à 83% des cas pour les souches résistantes à la méticilline, et de 4 à 52% pour les souches sensibles à cet antibiotique (Cosgrove 2003).

4.1.1 Epidémiologie des résistances de *S. aureus*

4.1.1.1 Résistance à la méticilline

Le taux de résistance à la méticilline chez *S. aureus* dans les hôpitaux français a été estimé au cours des dernières années entre 29% et 38% (The Microbiology Surveillance Network of Northern France 2002, Ducki 2004, Leclercq 2003 bis). Des disparités importantes sont observées entre les types de services hospitaliers, les services de soins aigus ayant des taux plus faibles, et les services de rééducation fonctionnelle et de long séjour les taux les plus élevés (The Microbiology Surveillance Network of Northern France 2002, Ducki 2004).

La première souche de *S. aureus* résistante à la méticilline a été décrite en 1961, deux ans après l'introduction de cet antibiotique (Chambers 1988). Les premières épidémies hospitalières de SARM sont décrites à la fin des années 1960 (Brun-Buisson 1998). Les données les plus récentes suggèrent que le taux global de résistance à la méticilline continue de croître dans certains hôpitaux français : il passe par exemple de 35.6% en 1996 à 41.0% en 2000 dans le réseau C-CLIN Nord, et de 28.1% à 31.7% pour la période 2001 - 2003 dans un réseau lorrain (The Microbiology Surveillance Network of Northern France 2002, Ducki 2004).

L'épidémiologie du SARM diffère entre les divers types de service hospitalier (Bertrand 2004). Les taux de résistance à la méticilline les plus élevés sont trouvés dans les services de Moyen et de Long séjour et de Rééducation Fonctionnelle (Bertrand 2004). Dans un réseau d'hôpitaux de Franche-Comté, l'incidence des patients infectés/colonisés à SARM semble cependant décroître entre 1999 et 2003 dans ces mêmes services, alors qu'elle semble croître dans les services publics de médecine (Bertrand 2004).

4.1.1.2 Résistance aux aminosides

La résistance de *S. aureus* aux aminosides est médiée par 3 enzymes (Mingeot-Leclercq 1999). Les enzymes APH(3'), ANT(4') et APH(2')-AAC(6') induisent respectivement une résistance à la kanamycine, à la kanamycine et la tobramycine, et à kanamycine, tobramycine et gentamicine. Les autres aminosides sont aussi modifiés par ces enzymes, telle la nétilmycine par APH(2')-AAC(6') , et l'amikacine par les 3 enzymes, cependant que leur activité bactériostatique est préservée (Asseray 2002). La gentamicine apparaît ainsi comme l'aminoside le plus souvent bactéricide sur *S. aureus*.

La fréquence de la résistance à la gentamicine parmi les SARM a augmenté au cours des années 1970 et 1980, pour atteindre des taux de 90 % vers 1990 (Lelièvre 1999, Aubry-Damon 1997, Lemaître 1998, Bertrand 2000, The Microbiology Surveillance Network of Northern France 2002). Depuis le début des années 1990, la tendance s'est inversée, avec des fréquences de résistance à la gentamicine chez les SARM de 50 – 60% dans les années 1995 – 1998 (Aubry Damon 1997, Lelièvre 1999 , Lemaître 1998), de 20% sur une étude multicentrique de 1999 – 2000 (Leclercq 2003 bis), et aussi basse que 4 % à Besançon en 2002 (Bertrand 2004 bis). Cette augmentation de la fréquence des souches sensibles à la gentamicine ne semble pas liée à une diminution de la prescription d'aminosides, mais pourrait être liée à la dissémination de clones sensibles croissant plus rapidement que les clones résistants à la gentamicine (Bertrand 2004 bis).

4.1.1.3 Etat de la sensibilité aux glycopeptides

La sensibilité de *S. aureus* aux glycopeptides a fait l'objet de nombreux travaux récents, initiés par la description de souches intermédiaires à la teicoplanine dès 1990, et stimulés par la description d'une première souche clinique intermédiaire à la vancomycine en 1997, et des deux premières souches résistantes à la vancomycine en 2002 (Kaatz 1990, Mainardi 1995, Hiramatsu 1997, Chang 2003, Bozdogan 2003).

Le mécanisme de la sensibilité intermédiaire aux glycopeptides chez *S. aureus* ne relève pas d'un gène unique. Il s'agit principalement d'une augmentation du nombre de sites de fixation des glycopeptides, à savoir les résidus D-ala-D-ala présents dans le peptidoglycane, et caractérisée sur le plan morphologique par un épaississement de la paroi des VISA (Hiramatsu 2001). Les gènes *van* n'ont pas été retrouvés chez les VISA. En revanche, c'est le gène *van(A)* qui a été rendu responsable de la résistance vraie de *S. aureus* aux glycopeptides chez les trois souches décrites à ce jour (Chang 2003, Bozdogan 2003, Woodford 2005).

Nous avons vu plus haut les critères définissant les souches intermédiaires et résistantes aux glycopeptides chez *S. aureus*. Le stade hVISA semble être la phase qui précède le développement de la résistance intermédiaire (GISA) (Hiramatsu 2001). De plus, l'existence de souches de *S. aureus* intermédiaires à la teicoplanine a été décrite avant la première souche VISA (Mainardi 1995, Kaatz 1990). La plupart des souches intermédiaires à la teicoplanine et sensibles à la vancomycine sont en réalité des hVISA (Hiramatsu 2001).

En France, la première souche VISA a été isolée à Limoges en 1995 (Ploy 1998). Deux « épidémies » de GISA ont été publiées en 2000 (Guérin 2000, Pina 2000), mais ces études étaient basées sur des modalités de dépistage et de confirmation qui ne correspondent pas aux dernières recommandations du CA-SFM (CASFM 2005).

En dehors de ces situations, la prévalence des VISA parmi les SARM a été évaluée dans plusieurs études épidémiologiques françaises, difficiles à comparer car utilisant elles aussi des méthodes variables pour dépister et confirmer la diminution de sensibilité aux glycopeptides, et ne correspondant pas aux dernières recommandations du CASFM (CASFM 2005). Dans la plupart des études, la méthode de dépistage est positive pour environ 10% des souches (Reverdy 2001, Decousser 2003, Mallaval 2004, Cartolano 2004). Ce dépistage ne conduit que très rarement au diagnostic de sensibilité diminuée aux glycopeptides. En effet, pour les études mesurant les CMI par dilution en gélose, la CMI de la vancomycine n'est jamais > 4 mg/L, et la CMI de la teicoplanine est > 4 mg/L pour 0 à 1.4% des souches (Cartolano 2004, Reverdy 2001, Carricajo 2001, Decousser 2003).

La prévalence de la résistance hétérogène en France est elle aussi mal connue. Sur 25 souches représentatives des souches hospitalières françaises adressées au Centre National de Référence entre 1987 et 1997, une seule souche sur 25 connaît une pousse sur gélose BHIA additionnée de 4 mg/L de vancomycine à une fréquence constamment $\geq 10^{-6}$ (Chesneau 2000). Si une analyse de population est effectuée sur les souches pour lesquelles la méthode de dépistage du CASFM est positive, la résistance hétérogène à la vancomycine semble confirmée dans la plupart des cas (Decousser 2003).

Signalons enfin qu'aucune souche de *S. aureus* résistante à la vancomycine n'a été isolée en France, les 3 cas décrits à ce jour venant des Etats-Unis (Woodford 2005).

4.1.2 La quinupristine-dalfopristine

Les streptogramines sont des composés isolés de *Streptomyces pristinaspiralis*. La famille des streptogramines comprend plusieurs classes d'antibiotiques, incluant les mikamycines, les pristinamycines, les oestreomycines et les virginiamycines. La PYOSTACINE®, pristinamycine orale et topique, a été commercialisée en France en 1972.

Les streptogramines sont divisées en deux groupes. Les streptogramines A (S_A) sont des peptolides cycliques polyinsaturés et comprennent la virginiamycine M et la pristinamycine IIA, tandis que les streptogramines B (S_B) sont des hexadepsipeptides cycliques telles la virginiamycine S et la pristinamycine IA (Cocito 1997). Les pristinamycines ont isolément une activité bactériostatique. Cependant, l'association de composés du groupe A et du groupe B produit habituellement une synergie bactéricide.

La quinupristine et la dalfopristine sont des dérivés hydrosolubles respectivement des pristinamycines IA and IIA. Le Synercid®, produit de leur association dans un rapport pondéral 30:70, a été commercialisé en France en 2000.

Bien que leur nature chimique diffère de celle des macrolides et des lincosamides, les streptogramines sont groupés avec ces antibiotiques pour leur mode d'action commun d'inhibition de la synthèse protéique par fixation sur le ribosome bactérien. Il est actuellement admis que les streptogramines inhibent la traduction protéique, en agissant sur le centre peptidyl-transférase (CPT) de la sous-unité 50S ribosomale. Les S_A inhibent la phase d'élongation en empêchant la liaison des amino-acyl-tRNA et peptidyl-tRNA respectivement aux sites A et P du CPT, tandis que les S_B inhibent la formation du lien peptidique et induisent le détachement du peptide incomplet du ribosome (Cocito 1997). En cristallographie, la quinupristine se fixe sur le rRNA 23S à l'entrée du tunnel ribosomal, tandis que la dalfopristine se fixe dans le Centre peptidyl-transferase (Harms 2004).

Plusieurs gènes de résistance aux macrolides, lincomycines et streptogramines (MLS) ont été décrits chez *S. aureus* (Roberts 1999, Leclercq 2002 bis). Les phénotypes de résistance associés sont indiqués dans le tableau 2. Plus récemment, des mutations responsables de résistance ont été décrites chez *S. aureus*, sur les gènes de l'ARN ribosomal 23S, et des protéines ribosomales L4 et L22 (Prunier 2002, Prunier 2003).

Tableau 2. Les gènes de résistance aux MLS chez *S. aureus*

Gène	Mécanisme	Résistance
erm(A) , erm(B) , erm(C)	Modification de cible	M ₁₄ et M ₁₅ en cas d'expression inductible MLS _B en cas d'expression constitutive
msr(A)	Efflux	M ₁₄ , M ₁₅ , S _B
mef(A)	Efflux	M
vga(A) et vga(B)	Efflux	S _A
vga(Av)	Efflux	LS _A
vgb(A) et vgb(B)	Enzyme	S _B
lnu(A)	Enzyme	L
vat(A) , vat(B) , vat(C)	Enzyme	S _A
mph(C)	Enzyme	M

Légende : M macrolides, M₁₄ et M₁₅, macrolides à 14 et 15 atomes, L lincomycines, S_A streptogramine A, S_B streptogramine B.

En France, environ 50 à 60 % des souches hospitalières de *S. aureus* sont sensibles à l'érythromycine, et environ 30% sont résistantes aux lincomycines (c'est-à-dire généralement résistantes constitutives aux MLS_B) (Lina 1999, Leclercq 2003 bis). Les résistances sont plus fréquentes parmi les SARM, puisqu'entre 20 et 30 % des SARM sont sensibles à l'érythromycine, et 60 à 80 % sont résistantes à la clindamycine (Leclercq 2003 bis). Il a été récemment décrit au CHU de Besançon une augmentation de la fréquence des SARM sensibles à l'érythromycine, de 7% à 32%, entre 1999 et 2002 (Bertrand 2004 bis). Nous n'avons pas connaissance de la description d'une telle tendance sur d'autres sites. Dans une étude française, le gène *erm(A)* est le principal médiateur de la résistance aux MLS chez *S. aureus*. Il est en effet trouvé chez 92% des SARM résistants à au moins un composé MLS, alors que les gènes *erm(C)* et *vat(B)* sont trouvés chez respectivement 7 % et 11% des souches (Lina 1999).

La résistance aux S_B, médiée par les gènes *erm*, ne diminue pas sensiblement l'activité bactériostatique de la QD (Clarebout 2004). La persistance d'une synergie entre quinupristine et dalfopristine sur les souches résistantes à la quinupristine est attribuée à l'augmentation, par la dalfopristine, de l'affinité de la quinupristine pour le ribosome (Clarebout 2004). La CMI de la QD des souches de *S. aureus* résistantes constitutives aux MLS_B n'augmente ainsi que d'une dilution par rapport aux souches sensibles à la quinupristine (Clarebout 2004). Dans une étude récente, les CMI₅₀ et CMI₉₀ de la QD étaient de 0.5 mg/L pour 87 souches françaises de SARM (Decousser 2003). En revanche, la résistance à la quinupristine fait perdre à la QD son activité bactéricide sur la plupart des souches de *S. aureus* (Fuchs 2000, Clarebout 2004).

4.1.3 Associations d'antibiotiques

4.1.3.1 Généralités

L'association de plusieurs antibiotiques répond à plusieurs objectifs thérapeutiques. Elle permet, en cas d'antibiothérapie empirique, l'obtention d'un large spectre anti-bactérien, quand le germe en cause est inconnu, ou quand la nature polymicrobienne de l'infection est suspectée. Quand l'infection est due à une bactérie identifiée, elle vise (i) à obtenir ou augmenter l'effet anti-bactérien (bactéricidie ou bactériostase), (ii) et à diminuer le risque d'émergence de mutants résistants (Eliopoulos 1988).

Les associations d'antibiotiques font courir deux risques. Le risque le mieux documenté est, pour le patient traité, la majoration de la toxicité, comme cela a été décrit avec la toxicité rénale et cochléaire de l'association de vancomycine aux aminosides (Domart 1997). Le risque moins bien documenté concerne l'existence d'antagonismes entre antibiotiques, principalement décrits dans les années 1950 et 1960 entre la pénicilline et d'autres composés bactériostatiques, tels la tétracycline et

le chloramphénicol, pour le traitement de méningites pneumococciques (Johansen 2000).

Outre les études cliniques, l'étude des associations d'antibiotiques repose habituellement sur 3 types de méthodes : (i) la méthode de l'échiquier ; (ii) les vitesses de bactéricidie *in vitro* ; (iii) les modèles animaux. D'autres approches ont été proposées, mais ne sont guère utilisées en pratique (Odds 2003). Dérivant de la mesure des CMI, la méthode de l'échiquier évalue l'effet bactériostatique des associations d'antibiotiques, pour plusieurs concentrations de chaque antibiotique. L'analyse des résultats est généralement basée sur l'index FIC (Fractional Inhibitory Concentration), dont la valeur permet de définir l'interaction antibiotique, avec cependant des divergences dans son interprétation (Odds 2003). L'étude des courbes de bactéricidie produites par les antibiotiques seuls et en association permet une approche quantitative de la bactéricidie. Des critères ont pu être proposés pour définir les situations de synergie, d'antagonisme et d'indifférence (ou additivité) entre deux antibiotiques dont l'un au moins n'est pas bactéricide. En revanche il n'a pas été établi de critères permettant d'interpréter les courbes réalisées avec deux antibiotiques bactéricides (Eliopoulos 1996). La comparaison des résultats obtenus avec l'échiquier et la cinétique de bactéricidie se heurte d'emblée à une différence de classification des interactions. Alors qu'il est usuel de déterminer 4 classes d'interaction à partir du FIC index (synergie, antagonisme, indifférence, additivité), la cinétique de bactéricidie ne propose que 3 classes d'interaction, l'indifférence étant assimilée à l'additivité. Les associations d'antibiotiques ont été étudiées dans plusieurs modèles animaux : par exemple, des modèles d'endocardite, d'ostéomyélite et de méningite ont été utilisés pour étudier diverses associations anti-staphylococciques (Fantin 1992). L'évaluation de l'interaction est généralement basée sur la comparaison statistique de l'effet de l'association à l'effet de chacune des monothérapies, permettant une analogie avec la synergie, l'antagonisme et l'indifférence définies en courbe de bactéricidie. Le concept d'une additivité *in vivo* a également été proposé (Fantin 1992).

Les mécanismes moléculaires des interactions entre antibiotiques sont imparfaitement connus, et ne semblent pas permettre de prévoir l'effet d'une association sur une bactérie donnée (Eliopoulos 1996). L'expérimentation *in vitro* et *in vivo* apparaît ainsi importante.

4.1.3.2. Association de la quinupristine-dalfopristine et de la gentamicine sur *S. aureus*

L'association de gentamicine à la vancomycine est recommandée dans le traitement d'infections graves par SARM que sont les endocardites (Rubinstein 1999, Elliott 2004). L'apparition récente de souches de sensibilité diminuée à la vancomycine a relancé la nécessité de développer des alternatives à la vancomycine dans cette situation. Les données épidémiologiques récentes indiquent l'intérêt potentiel de l'utilisation de la quinupristine-dalfopristine dans le traitement des infections graves par SARM. La question de l'intérêt de l'association de la QD et de la gentamicine dans les infections graves à SARM se pose donc.

Sur le plan moléculaire, les aminosides, comme la quinupristine et la dalfopristine, inhibent la synthèse protéique. La gentamicine se fixe sur une séquence conservée du rRNA proche du site de reconnaissance du codon-anti-codon, dans le site amino-acyl-tRNA (site A) de la sous-unité 30S du ribosome bactérien (Yoshizawa 1998). La liaison de l'aminoside stabilise l'interaction tRNA-mRNA dans le site A, inhibant le processus de contrôle de la traduction, ce qui aboutit in fine à des erreurs de traduction et à un arrêt prématuré de l'élongation (Yoshiwaza 1998, Mingeot-Leclercq 1999). A notre connaissance, la proximité des sites d'action de la gentamicine, de la dalfopristine et de la quinupristine ne permet pas de préjuger l'existence d'une interaction entre ces 3 antibiotiques, et la nature de celle-ci.

L'activité anti-bactérienne de l'association de la QD et de la gentamicine vis-à-vis de *S. aureus* est peu documentée. A notre connaissance, 3 études *in vitro* ont été publiées, et aucune donnée n'était disponible en 1999 sur l'effet de cette association dans un modèle animal d'infection. Ce constat nous a poussé à étudier l'interaction de la QD avec la gentamicine sur deux souches de SARM, *in vitro* et dans le modèle d'endocardite de lapin.

4.2 ARTICLE COMBINATION OF QUINUPRISTIN-DALFOPRISTIN AND GENTAMICIN AGAINST Methicillin-Resistant *S. aureus*: Experimental Rabbit Endocarditis Study.

Eric Batard, Cedric Jacqueline, David Boutoille, Antoine Hamel, Henri B. Drugeon, Nathalie Asseray, Roland Leclercq, Jocelyne Caillon, Gilles Potel, and Denis Bugnon

Antimicrob Agents Chemother 2002 ; 46 : 2174-78.

Combination of Quinupristin-Dalfopristin and Gentamicin against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Experimental Rabbit Endocarditis Study

Eric Batard,¹ Cedric Jacqueline,¹ David Boutoile,¹ Antoine Hamel,¹ Henri B. Drugeon,¹ Nathalie Asseray,¹ Roland Leclercq,² Jocelyne Caillon,¹ Gilles Potel,^{1*} and Denis Bugnon¹

Laboratoire d'Antibiologie, Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes,¹ and Laboratoire de Bactériologie, Centre Hospitalier Universitaire Côte-de-Nacre, Caen,² France

Received 28 September 2001/Returned for modification 29 January 2002/Accepted 10 April 2002

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 of body weight three times a day) and gentamicin (3 mg/kg once daily). For the MLS_B-susceptible strain, a 4-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 log CFU/g (Q-D plus gentamicin). For the strain constitutively resistant to MLS_B, a 4-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 log CFU/g (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 in vegetations of treatment groups after 1-day regimens was observed. This experimental study found no additive benefit in combining Q-D and gentamicin against dalfopristin- and gentamicin-susceptible MRSA.

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 seems essential to evaluate new antistaphylococcal drugs and regimens.

Quinupristin and dalfopristin are water-soluble injectable streptogramin B (S_B) and S_A antibiotics, respectively, whose combination in a 30:70 (wt/wt) ratio acts synergistically on gram-positive bacteria (5, 14). Streptogramins inhibit protein synthesis by binding to the ribosomal 50S subunit, and resistance is a concern mainly for 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 the *ermA*, *ermB*, or *ermC* gene. Constitutively expressed *erm* genes confer in vitro cross-resistance to macrolides, lincosamides, and S_B. Some strains harbor inducible *erm* genes, whose expression is triggered only by 14- and 15-member macrolides (18). The *msrA* gene is believed to encode an efflux system, and *vgb* and *vgbB* genes encode a hydrolase that inactivates S_B type antibiotics (22). Recently, mutations in the L22 ribosomal protein

have been associated with resistance to quinupristin in *S. aureus* (B. Malbrun, 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 (Q-D) 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). Its use, in association with other antibiotics, in the first days of treatment of serious *S. aureus* infections is usually recommended. However, the combination of gentamicin and Q-D was only studied in vitro, and conflicting results, including possible antagonism, were obtained (16, 17).

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

(This work was presented in part at the 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Toronto, Canada, 17 to 20 September 2000.)

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,

* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire d'antibiologie, Faculté de médecine, 1 rue Gaston-Veill, 44035 Nantes Cedex 01, France. Phone and fax: 33 240 412 854. E-mail: gpotel@sante.univ-nantes.fr.

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

Gene(s)	Primer sequence (25) (5'-3')	Predicted length (bp)	Positive control strain (2)
<i>emA</i>	TCTAAAAGCATGTAAAAGAA CTTCGATAGTTTATTAATATTAGT	645	<i>S. aureus</i> HM1051
<i>emB</i>	GAAAAGGTACTIONCAACCAATA AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC	639	<i>Streptococcus pneumoniae</i> HM28
<i>emC</i>	TCAAAAACATAATATAGATAAA GCTAATATTGTTTAAATCGTCAAT	642	<i>S. aureus</i> HM1054R
<i>msrAB</i>	CAAATGGTGTAGGTAAGACAAC ATCATGTGATGTAAACAAAAT	399	<i>Staphylococcus epidermidis</i> HM1053

lincosamides, and streptogramins (MLS_S-S phenotype), whereas strain BC88 is constitutively resistant to macrolides, lincosamides, and S_B (MLS_B-CR phenotype). Both strains were resistant to kanamycin and tobramycin, suggesting the production of an ANI(4') modifying enzyme.

Antibiotics and media. Gentamicin and Q-D were provided, respectively, by Schering-Plough (Hérrouville-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 PCR. Genomic DNA was extracted from culture using the Qiagen DNeasy tissue kit. The sequences of primers for *emA*, *emB*, *emC*, and *msrAB* are 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 deoxynucleoside triphosphates, 2 mM MgCl₂, 1 \times PCR buffer, and 1 U of *Taq* DNA polymerase (Eurobio). PCR experiments were carried out in a Perkin-Elmer 4600 thermal cycler with a denaturation step (94°C for 5 min), followed by 35 amplification cycles (30 s of denaturation at 94°C, 45 s 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 a 2% agarose gel under a 100-V gradient.

In vitro susceptibilities to antibiotics. MICs of quinupristin, dalfopristin, Q-D, and gentamicin were determined by the agar dilution method (1).

Checkerboard method. Interactions between Q-D and gentamicin were assessed by the checkerboard method in 96-well microtiter plates (Nalge Nunc International, Roskilde, Denmark), with an inoculum of 10⁶ CFU/ml. Plates were incubated for 18 h at 37°C. Fractional inhibitory concentration indices were interpreted as follows: ≤ 0.5 , synergy; > 0.5 , antagonism; > 0.5 and ≤ 4 , indifference (1).

Time-kill curves. Time-kill curves were plotted on the basis of results obtained with an inoculum of 5×10^6 CFU/ml in glass tubes containing Mueller-Hinton broth and gentamicin and/or Q-D 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 with a spiral plater (Spiral Système, Saint-Nom-la-Bretèche, France). Colonies were counted after 48-h of incubation at 37°C. Antibiotic carryover 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 log₁₀ CFU/ml. Synergy was defined as a decrease of ≥ 2 log₁₀ CFU/ml between the combination (Q-D and gentamicin) and its most active constituent after 24 h. Antagonism was defined as an increase of ≥ 2 log₁₀ CFU/ml between the combination and its most active constituent. The interaction was otherwise considered 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 at 9 g/liter to obtain 10⁶ CFU/ml) was inoculated into the ear vein 48 h after catheterization.

Twenty-four hours after inoculation, the animals were randomly assigned to groups receiving 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 (i.v.) perfusions of 7.5 mg of Q-D/kg of body weight three times a day (t.i.d.) and 3 mg

of gentamicin/kg once a day. 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 i.v. at changing flow rates controlled by a computer dedicated to human pharmacokinetic simulations (6, 7).

Rabbits were sacrificed by i.v. 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 a 48-h incubation at 37°C were expressed as means \pm standard deviations (SD) of log₁₀ CFU per gram of vegetation. The lower limit of detection for this method is 1 CFU per 100 μ l of undiluted vegetation homogenate.

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 from three healthy rabbits were determined. Samples were drawn (i) 30 min (peak) and 23.5 h (trough) after the first injection of gentamicin and (ii) 15, 30, 45, 60, 120, 240, and 360 min after the first injection of Q-D. For streptogramin assays, 1-ml blood samples were immediately placed in tubes containing 0.25 ml of 0.25 N hydrochloric acid and then gently stirred and centrifuged (10 min at 1,500 \times 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/liter.

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 on the basis of results for rabbit serum. Dalfopristin was added to sera at a final bacteriostatic concentration of 2 mg/liter for determination of quinupristin activity, and quinupristin was added at a final bacteriostatic concentration of 2 mg/liter for determination of dalfopristin activity. No antibiotic was added for determination of Q-D activity. After a 4-h incubation at 37°C, surviving bacteria were counted by plating 3 μ l of diluted samples on Mueller-Hinton agar containing activated charcoal (10 g/liter) to prevent antibiotic carryover. Lower limits of detection were 0.09 mg/liter for quinupristin, 0.06 mg/liter for dalfopristin, and 0.23 mg/liter for Q-D. The coefficient of variation of the assay was 16%.

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

TABLE 2. Agar dilution MICs of quinupristin, dalfopristin, Q-D, and gentamicin for *S. aureus* strains NA8 and BC88

Strain	MIC (mg/liter) of:				
	Oxacillin	Quinupristin	Dalfopristin	Q-D	Gentamicin
NA8	64	1	1	0.50	0.25
BC88	16	128	2	0.50	0.25

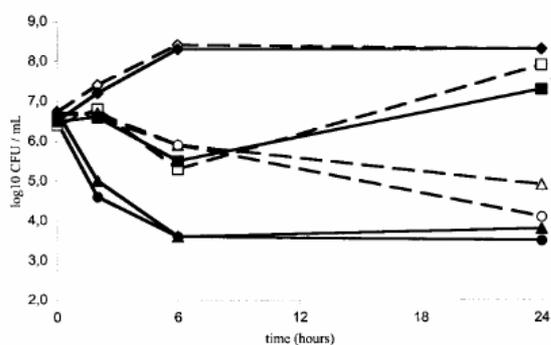


FIG. 1. Time-kill curves for *S. aureus* NA8 and BCB8. Results are shown for the control group (diamonds) and groups of rabbits given gentamicin at 0.25 mg/liter (squares), Q-D at 0.5 mg/liter (triangles), or gentamicin at 0.25 mg/liter in combination with Q-D at 0.5 mg/liter (circles). Solid lines, strain NA8; dashed lines, strain BCB8.

Statistics. Statistical analysis was performed using StatView software (Abacus Concepts). Mean bacterial titers in vegetations were globally compared by analysis of variance (ANOVA). Scheffe's test was used to compare mean titers two by two. A *P* value ≤ 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, the MICs of Q-D for them 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. Fractional inhibitory concentration indices of Q-D and gentamicin for strains NA8 and BCB8 were, respectively, 1.0 and 1.2. Therefore, the combination of the tested antibiotics was interpreted as indifferent for both strains.

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

Serum antibiotic levels. Peak and trough mean serum gentamicin concentrations were, respectively, 15.8 ± 1.2 and $1.2 \pm$

TABLE 3. Pharmacokinetic serum parameters of quinupristin, dalfopristin, and Q-D in three healthy rabbits after a single intramuscular injection of Q-D (30 mg/kg)^a

Drug	C_{max} (mg · liter ⁻¹)	AUC (h · mg · liter ⁻¹)	β half-life (h)
Quinupristin	1.5 ± 0.4	4.0 ± 2.3	1.5 ± 1.5
Dalfopristin	6.9 ± 0.5	6.8 ± 3.3	0.7 ± 0.3
Q-D	5.4 ± 1.8	6.0 ± 2.6	0.6 ± 0.3

^a Mean values \pm SD of peak concentrations (C_{max}), areas under the curve (AUC), and β half-lives are shown. Peak concentrations were observed 15 min after injection for dalfopristin and 30 min after injection for quinupristin and Q-D.

TABLE 4. Activity of drugs in 4-day regimens^b

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

^a *P* < 0.0001 versus controls by Scheffe's test after ANOVA.

^b Values are mean bacterial titers in vegetations \pm SD.

0.1 mg/liter. The pharmacokinetics of quinupristin, dalfopristin, and Q-D are shown in Table 3.

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

No increase in bactericidal effect for the combination of gentamicin and Q-D versus either antibiotic alone was apparent. 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, Q-D, 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 Q-D (depending on the regimen for the animal before sacrifice) yielded no *S. aureus* colony.

DISCUSSION

It has been reported that Q-D MICs for MLS_B-CR and MLS_B-S *S. aureus* strains, in the absence of resistance to dalfopristin, were indistinguishable, 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

TABLE 5. Activity of drugs in 1-day regimens^a

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

^a *P* < 0.001 versus controls.

^b *P* < 0.01 versus controls.

^c Values are mean bacterial titers in vegetations \pm SD. Statistical significance was determined by Scheffe's test after ANOVA.

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; activity was restored by increasing the total daily dose of dalfofpristin in order to maintain a serum dalfofpristin concentration of 2 mg/liter for 12 h a day (13). With the same rabbit endocarditis model that we subsequently used, Fantin et al. observed variable results for the same MLS_B-CR strain, with a maximal reduction in vegetation bacterial titers of 2.9 log CFU/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 for the MLS_B-CR *S. aureus* strain by the end of the first day of treatment: there was a mean reduction of the bacterial titer in vegetations of 3.4 log CFU/g. These data seem therefore to call into question the presumed global lack of efficacy of Q-D against MLS_B-CR *S. aureus* in severe infections. Many differences between study strains could explain the diversity of in vivo responses to Q-D. Interstrain differences in susceptibility of *S. aureus* to platelet factors, such as thrombin-induced platelet microbicidal protein 1, could explain variability in the in vivo efficacy of Q-D, as previously reported for oxacillin and vancomycin (10, 11).

According to international guidelines, gentamicin was administered in our study by simulating a human i.v. regimen of a once-daily dose of 3 mg/kg (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 against BCB8. Sande and Courtney showed that gentamicin, in a t.i.d. regimen yielding a mean peak concentration of 5.0 mg/liter, had no bactericidal activity in a rabbit experimental staphylococcal endocarditis model after 3 and 5 days of treatment (24). Nevertheless we cannot exclude the possibility of synergy between Q-D and a multiple-dose regimen of gentamicin.

The combination of Q-D and gentamicin proved no more beneficial than Q-D or gentamicin alone against *S. aureus* in this study in terms of either 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 4-day regimen and selected no resistant variant. However, we have possibly underestimated the selection of such variant clones by using high antibiotic concentrations in solid media (i.e., 16 times the MIC). Furthermore we did not search variant clones showing resistance or increased resistance specifically to quinupristin or to dalfofpristin. Such resistant variants were not selected in previous experimental endocarditis studies using *S. aureus* strains susceptible to dalfofpristin but have been isolated when one dalfofpristin-resistant strain was used (15, 27). Moreover, the combination of another antibiotic with Q-D might help prevent the emergence of constitutively resistant mutants during treatment of infections caused by *S. aureus* strains with inducible resistance to MLS_B (MLS_B-IR). This situation has been a matter of concern for Q-D and for other non-*erm*-inducing MLS antibiotics, by analogy with clindamycin, which is thought to select MLS_B-CR mutants from MLS_B-IR strains (18). Be-

cause of the low in vitro frequency of mutation from inducible to constitutive MLS_B resistance ($\approx 10^{-7}$ to 10^{-8}), this hypothesis needs to be tested by using experimental models yielding larger inocula than the rabbit endocarditis model (18).

Serum streptogramin concentrations were determined with a new bioassay based on the measurement of the bactericidal activity of the serum, but not its bacteriostatic activity, as in microbiological methods developed previously (13). This new assay uses one unique test strain without a streptogramin resistance mechanism, which prevents the instability due to formerly used strains (13). To measure the concentration of one compound, the other one was added at a high concentration, allowing for control of the synergy between quinupristin and dalfofpristin. 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 (wt/wt) ratio of quinupristin to dalfofpristin (Q/D ratio). Although the bacteriostatic activities of Q-D against *S. aureus*, as assessed by determining MICs, are similar for Q/D ratios ranging from 90:10 to 10:90, no data about the influence of the Q/D ratio on Q-D in vitro bactericidal activity have been published (5). In our work, the sum of activities for separate compounds exceeded the activity from the global assay when the Q/D ratio was less than 0.6 (data not shown). The global Q-D assay should therefore be considered a functional one. Even if its result is expressed as a mass concentration, it yields nearly the amount of Q-D in serum with a 30:70 (wt/wt) Q/D ratio which has the same bactericidal activity as the test serum.

In conclusion, our experiments showed no additive benefit from the combination of Q-D and gentamicin against dalfofpristin- and gentamicin-susceptible *S. aureus*, whether susceptible or resistant to quinupristin. Contrary to previous studies, Q-D showed in vivo bactericidal activity against the quinupristin-resistant strain. Further investigations are needed to determine the role of Q-D, with regard to vancomycin, in the management of MRSA infections.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Anne-Françoise Miègeville and Virginie Le Mabeque 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., and 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, and D. Bugnon. 2002. Different aminoglycoside-resistant phenotypes in a rabbit *Staphylococcus aureus* endocarditis infection model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:1591-1593.
4. Backo, M., E. Gaenger, A. Burkart, Y. L. Chai, and 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, and 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. Felgel, and 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, and 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, and P. Vannuffel. 1997. Inhibition of protein synthesis by streptogramins and related antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 39(Suppl. A):7–13.
 10. 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.* 180:1561–1568.
 11. Dhawan, V. K., A. S. Bayer, and M. R. Yeaman. 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., and P. Beeson. 1972. Experimental endocarditis. I. Colonization of a sterile vegetation. *Br. J. Exp. Pathol.* 53:44–49.
 13. Entenza, J. M., H. Drugeon, M. P. Glauser, and 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. Pociđalo, and 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. Merté, 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.* 39:400–405.
 16. 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.
 17. 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):33–39.
 18. Leclercq, R., and 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, and 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, and 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, and P. M. Tulkens. 1999. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:727–737.
 22. Roberts, M. C., J. Sutcliffe, P. Courvalin, L. B. Jensen, J. Rood, and H. Seppala. 1999. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin 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. *Clin. Microbiol. Infect.* 4(Suppl. 3):3S27–3S33.
 24. Sande, M. A., and 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, and 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, and 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. Zarrrouk, V., B. Bozdogan, R. Leclercq, L. Garry, C. Carbon, and 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. Zarrrouk, V., B. Bozdogan, R. Leclercq, L. Garry, C. Féger, C. Carbon, and 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.

4.3 DISCUSSION

4.3.1 Association de la quinupristine-dalfopristine et de la gentamicine

L'analyse de la littérature montre que l'interaction entre la QD et la gentamicine a peu été étudiée, et encore ne l'a-t-elle été qu'*in vitro*. Nous comparons par la suite nos résultats à ce qui a été publié par ailleurs.

4.3.1.1 Etudes *in vitro*

4.3.1.1.1 Méthode de l'échiquier

Avec des FIC index à 1.0 et 1.2 pour des concentrations testées de 0.03 à 8 mg/L de QD et de 0.015 à 4 mg/L de gentamicine, nos résultats sont comparables à ceux obtenus par Kang & Rybak avec deux souches sensibles à la gentamicine et à la QD, qui mesuraient des FIC index à 1.3 et 2.0 (Kang 1997). Les auteurs considèrent que ces valeurs témoignent d'une indifférence entre les 2 drogues, mais d'autres auteurs parleraient d'un antagonisme pour la souche ayant un FIC index à 2 (Eliopoulos 1996).

4.3.1.1.2 Vitesse de bactéricidie

Hormis notre travail, trois études ont évalué l'interaction entre QD et gentamicine vis-à-vis de *S. aureus* par des cinétiques de bactéricidie (Fass 1991, Kang 1997, Fuchs 2001). Ces trois études portent en tout sur 10 souches de *S. aureus* sensibles à la gentamicine, dont 7 sont résistantes constitutives aux MLS_B. Les concentrations utilisées sont de 2 à 8 mg/L de QD et de 4 à 8 mg/L de gentamicine. Aucune de ces souches ne présentent d'antagonisme ou de synergie, si l'on définit ces interactions par une différence ≥ 2 log ufc/mL par rapport à chacun des antibiotiques seuls. Néanmoins, chaque étude trouve que la bactéricidie induite au bout de 24 heures par l'association QD + gentamicine est supérieure à celle produite par la QD seule, d'un peu plus d'un log ufc/mL pour les études utilisant les concentrations de 4 et 5 mg/L de gentamicine, et jusqu'entre 3.4 à 5.4 log ufc/mL pour l'étude utilisant 8 mg/L de gentamicine.

Comme ces études, nous ne trouvons ni synergie, ni antagonisme entre QD et gentamicine, ceci pour des concentrations de 1 et 4 fois la CMI, soit pour la gentamicine de 0.25 et 1 mg/L (annexe 6.9). Cependant, contrairement à ce qui a été publié par ailleurs, nous ne trouvons pas de supériorité de l'association de QD + gentamicine sur la QD seule. Cette différence pourrait tenir au fait que nous avons utilisé des concentrations de gentamicine bien inférieures à celles publiées par ailleurs. Dans ces études, les concentrations élevées de gentamicine produisaient une bactéricidie intense (de plus de 4 log ufc/mL) sur la plupart des souches testées, avec des concentrations bactériennes à la limite des seuils de détection au bout de 24 heures. Il apparaissait dès lors impossible de montrer une synergie vraie avec un autre antibiotique. Tout au plus était-il alors possible de montrer l'inhibition de l'effet

de la gentamicine par la QD, ce qui a été constaté pour une souche (Fass 1991). Notre étude est la seule à avoir utilisé une dose bactériostatique de gentamicine sur des souches sensibles à cet antibiotique, ce qui nous mettait en situation de mettre en évidence une synergie avec la QD. Nous n'avons pas constaté un tel phénomène.

Pour conclure, ces données disparates issues des études de bactéricidie *in vitro* ne montrent pas de synergie ni d'antagonisme entre QD et gentamicine vis-à-vis de *S. aureus*. Néanmoins, l'adjonction à la QD de gentamicine à une forte concentration augmente la bactéricidie induite par la QD seule pour les souches sensibles à la gentamicine.

4.3.1.2 Modèle animal

Notre modèle d'endocardite du lapin avec concentrations sériques humanisées mène à des constats similaires à ceux obtenus *in vitro*. En effet, il n'est pas observé de différence significative entre la bithérapie et chacune des monothérapies, que le traitement dure aussi 24 heures de traitement ou 4 jours. De plus, l'association QD + gentamicine ne s'avère pas plus bactéricide *in vivo* que la QD seule.

L'association de la gentamicine à la QD pouvait a priori améliorer la bactéricidie *in vivo* sur les souches résistantes constitutives aux MLS_B. Cette hypothèse semblait d'autant plus raisonnable qu'il avait été démontré que la QD est peu bactéricide *in vivo* sur de telles souches (Entenza 1995, Fantin 1995). La démonstration était en particulier faite qu'un traitement par QD induit une bactéricidie intravalvulaire environ deux fois moindre sur une souche résistante constitutive aux MLS_B que sur une souche isogénique sensible aux MLS (Fantin 1995). Nous avons donc été un peu surpris de constater que, vis-à-vis de notre souche résistante constitutive aux MLS_B, la QD a une activité bactéricide *in vivo* comparable à celle induite par la gentamicine, mais aussi par la vancomycine (annexe 6.10). Avec le même modèle que Fantin et coll, et des modalités d'expérimentation probablement très proches, nous observons une variabilité assez franche de l'activité bactéricide de la QD sur des souches résistantes constitutives aux MLS_B. En effet, si l'on compare en valeur absolue les taux de bactéricidie au sein de la végétation, la diminution du titre bactérien valvulaire après 4 jours de traitement est aussi faible que $-1.5 \log \text{ ufc/g}$ pour la souche HM1054R testée par Fantin et coll, et aussi forte que $-3.4 \log \text{ ufc/g}$ pour la souche BCB8 que nous avons testée (Fantin 1995). Ces données sont à rapprocher de la variabilité du taux de bactéricidie exercée *in vitro* par la QD sur diverses souches de *S. aureus* résistantes constitutives aux MLS_B. Sur 7 souches porteuses du gène *erm(A)*, Clarebout et coll montrent en effet que le taux de bactéricidie induit par la QD à 18 heures varie selon la souche de -1.8 à $-3.1 \log \text{ ufc/mL}$ (Clarebout 2004). Il est possible que cette variabilité de la sensibilité à l'activité bactéricide de la QD résulte de différences d'expression du gène *erm(A)* entre les souches, éventuellement secondaires à des différences de structure de l'atténuateur du gène. De nombreuses autres hypothèses, incluant une interaction entre l'antibiotique, la bactérie et/ou l'hôte, sont envisageables. Cependant, quelle que soit son explication, ce type d'analyse incite à ne pas utiliser un nombre restreint de souches dans les modèles d'infection expérimentale.

Une autre analyse trouve cependant une cohérence entre les travaux publiés sur l'activité de la QD sur les souches résistantes constitutives à la quinupristine. Tous

les travaux publiés sur la question montrent en effet que les taux de bactéricidie *in situ* sur des souches résistantes à la quinupristine sont inférieurs d'un ou deux log ufc/g à ceux obtenus sur des souches sensibles à la quinupristine.

4.3.2 *L'étude in vitro des associations d'antibiotiques*

Les méthodologies utilisées pour analyser *in vitro* l'activité anti-bactérienne des associations d'antibiotiques sont diverses et parfois mal utilisées (Eliopoulos 1988, Odds 2003). L'analyse d'une association peut ainsi donner des renseignements contradictoires selon la méthodologie employée. A partir de notre expérience avec la gentamicine, nous allons illustrer la complexité de l'étude des associations d'antibiotiques.

4.3.2.1 Durée d'exposition et concentration des antibiotiques

Par exemple, nous avons comparé l'interprétation qui peut être faite de l'analyse de courbes de bactéricidie concernant l'association QD + gentamicine, en fonction du temps d'exposition et de la concentration d'antibiotique (annexe 6.9). Ainsi, la comparaison de la gentamicine et de l'association QD + gentamicine produit des résultats variables, passant de la supériorité de la gentamicine à son infériorité, en passant par l'équivalence.

Un autre exemple est tiré de l'échiquier dynamique de l'association linézolide et gentamicine, dans lequel de multiples concentrations d'antibiotiques ont été testées sur une souche de *S. aureus* (annexe 6.11). L'interprétation en est multiple. Ainsi peut-on conclure, selon les concentrations considérées, que l'adjonction de linézolide augmente discrètement ou diminue l'activité anti-bactérienne de la gentamicine, et que l'adjonction de gentamicine au linézolide induit pour certaines concentrations l'apparition d'une bactéricidie. Il devient alors difficile de conclure simplement sur la nature de l'interaction gentamicine – linézolide.

Enfin, au delà de l'influence des concentrations d'antibiotiques en valeur absolue, il a été montré que le type d'interaction dépend également du rapport entre les concentrations des antibiotiques testés (Desbiolles 2001). Ces données suggèrent de tester systématiquement plusieurs rapports de concentrations lors des tests in vitro.

Le choix des concentrations des antibiotiques et du temps d'exposition des bactéries aux antibiotiques peut donc influencer fortement l'interaction entre deux antibiotiques. Il n'existe pas de donnée pour indiquer qu'une concentration, ou un temps d'exposition doit être préféré pour analyser l'interaction entre deux antibiotiques. Il semble donc prudent de tester plusieurs concentrations, plusieurs rapports de concentrations et plusieurs temps d'exposition aux antibiotiques dans l'évaluation des associations.

4.3.2.2 Nombre de souches testées

Les études d'associations antibiotiques portent généralement sur peu de souches, ou portent sur quelques souches différant entre elles par un mécanisme de résistance à un des antibiotiques. Les auteurs ayant étudié un nombre plus important de souches rapportent une variabilité inter-souche des interactions entre antibiotiques. Nous en donnerons deux exemples.

Sur 50 souches de SARM, la méthode de l'échiquier indique que l'interaction entre la vancomycine et de la lévofloxacine est une synergie pour une dizaine de souches, une additivité pour une trentaine de souches et une indifférence pour une dizaine de souches (Drago 2005). Des données comparables ont été observées en cinétique de bactéricidie (Drago 2005).

Les données de Fuchs donnent des résultats comparables à propos des associations comprenant la QD en cinétique de bactéricidie. Sur 10 souches de *S. aureus*, l'interaction entre QD et vancomycine est un antagonisme pour 5 souches, et une indifférence pour 5 souches (Fuchs 2001).

Cette variation inter-souche des interactions entre deux antibiotiques n'est pas très surprenante, mais appelle à plusieurs commentaires :

elle relativise les explications moléculaires simples de l'interaction entre deux antibiotiques ;

elle relativise la valeur des études portant sur un nombre restreint de souches ;

dans les études portant sur plusieurs souches, elle incite à présenter les résultats souche par souche, et non sous forme de moyenne des résultats obtenus sur plusieurs souches (Grohs 2003).

4.3.2.3 Analyses symétrique et non symétrique d'une association

L'interaction entre deux antibiotiques peut être analysée en cinétique de bactéricidie selon deux approches.

La première approche, que l'on pourrait qualifier de symétrique, considère les deux antibiotiques comme égaux, et compare l'association à chaque antibiotique. C'est l'approche classique, qui ne considère une interaction comme significative que si l'association augmente (ou diminue) le titre bactérien de plus de 2 log ufc/mL par rapport à chacun des deux antibiotiques testés seuls. Cette approche est adaptée pour les associations combinant des antibiotiques pouvant être utilisés seuls : c'est le cas par exemple de l'association QD + vancomycine vis-à-vis de *S. aureus*.

La deuxième approche, que l'on pourrait qualifier de non symétrique, ne compare que les régimes thérapeutiques dont l'utilisation clinique est pertinente. Ainsi, les aminosides ne sont jamais utilisés en monothérapie en clinique, par crainte de l'émergence de souches résistantes. La comparaison d'un aminoside seul à son association à un autre antibiotique ne présente donc pas d'intérêt pour le clinicien. Par exemple, l'étude de l'association gentamicine et QD n'a d'intérêt que pour savoir si l'association est plus, autant ou moins bactéricide que la QD seule. A ce sujet, contrairement à ce que montrait la littérature (cf supra), nous n'avons pas trouvé de gain de bactéricidie significatif à l'ajout de gentamicine à la QD sur les deux souches que nous avons testées en vitesse de bactéricidie.

L'association de la gentamicine et du linézolide illustre l'intérêt d'une analyse non symétrique des associations (annexe 6.11). Nous avons vu plus haut la complexité

de l'interaction entre ces deux antibiotiques. Plus simplement, l'analyse peut être limitée à la question suivante : l'adjonction de gentamicine modifie-t-elle l'activité antibactérienne du linézolide ? La réponse apparaît alors assez simple : pour de faibles concentrations de linézolide, l'adjonction de gentamicine induit une bactéricidie, et ce d'autant plus que la concentration de gentamicine est élevée ; cet effet disparaît pour de plus fortes concentrations de linézolide.

4.3.3 Etude *in vivo* des associations

4.3.3.1 Antagonismes *in vivo*

S'il est aussi difficile d'interpréter les tests *in vitro* des associations d'antibiotiques, faut-il continuer à les tester ? Les études cliniques qui ont suggéré l'existence d'antagonisme entre antibiotiques ont maintenant 40 ans et plus. Il faut cependant noter qu'au cours des 5 dernières années, au moins 3 cas d'antagonisme entre antibiotiques, dans 3 modèles d'infection expérimentale différents, ont été publiés. Ainsi, dans le modèle d'endocardite expérimentale du lapin, Chambers et coll ont-ils montré que l'adjonction de rifampicine diminue significativement l'effet bactéricide dans la végétation induit par la lévofloxacine seule sur deux souches de *S. aureus* (Chambers 1999). Ostergaard et coll, utilisant un modèle de méningite du lapin à *S. aureus*, suggèrent un antagonisme entre méticilline et acide fusidique, au moins dans les premières heures du traitement (Ostergaard 2003). Enfin citerai-je l'existence d'un antagonisme entre l'érythromycine et la pénicilline vis-à-vis du pneumocoque, dans les modèles de sepsis/péritonite et de pneumonie de souris (Johansen 2000, Fischer 2005).

L'existence d'associations antagonistes dans des modèles d'infection *in vivo* semble donc confirmée. Leur signification en clinique humaine reste cependant à définir. Un point troublant concerne l'association de la pénicilline et de l'érythromycine : contrairement aux données expérimentales qui suggèrent un antagonisme, plusieurs études cliniques rétrospectives récemment publiées suggèrent qu'une bithérapie contenant un β -lactamine et un macrolide est associée à une mortalité plus basse que les β -lactamines seules dans les pneumonies pneumococciques bactériémiques (Johansen 2000, Fischer 2005, Pflouffe 2004). Cette association pourrait cependant n'être bénéfique qu'à cause de l'élargissement du spectre antibiotique aux bactéries intracellulaires, et non à cause d'une synergie antipneumococcique.

Les modalités expérimentales de l'étude *in vivo* d'une association d'antibiotique ont, comme dans les études *in vitro*, toute leur importance pour la validité de leurs résultats. Par analogie avec les remarques faites sur les études *in vitro*, au moins deux paramètres entrent en compte, à savoir le nombre de souches étudiées et la modalité d'administration des antibiotiques.

4.3.3.2 Influence du nombre de souches testées

L'interaction entre deux antibiotiques semblant variable, au moins *in vitro*, d'une souche à l'autre, qu'en est-il *in vivo* ? La plupart des études *in vivo* d'associations d'antibiotiques ont porté sur un nombre restreint de souches. De nombreuses études

portent sur une seule souche. Quand plusieurs souches sont testées, elles diffèrent dans la plupart des cas, dont notre étude, par leur sensibilité vis-à-vis d'un des antibiotiques testés (Asseray 2002, Zarrouk 2001, Pavie 2002).

Peu d'études ont porté sur plusieurs souches comparables en terme de sensibilité *in vitro*. Parmi les études donnant des résultats concordants entre au moins deux souches, citons l'association d'imipénème et de linézolide, qui se révèle synergique dans l'endocardite de lapin vis-à-vis de deux souches de *S. aureus*, et l'association de vancomycine et de nafcilline dans le même modèle vis-à-vis de deux souches de VISA (Jacqueline 2005, Climo 1999).

D'autres études ont conclu à des différences d'interaction d'une souche à l'autre. Jacqueline et coll ont testé l'association linézolide + gentamicine sur 2 souches de SARM sensibles à la gentamicine et au linézolide, et ont obtenu des résultats divergents d'une souche à l'autre (Jacqueline 2004). Une synergie significative est en effet observée sur une souche, tandis que l'association peut être qualifiée d'indifférente sur l'autre souche. Cette différence pourrait être attribuée à une différence d'activité de la gentamicine sur les deux souches. En effet, la gentamicine seule induit une bactéricidie *in situ* de 2.5 log ufc/g sur une souche, et de 4.4 log ufc/g sur l'autre souche. Etant donné le seuil de détection des bactéries dans le modèle d'endocardite de lapin (1.7 log ufc/g pour une végétation de 20 mg), il apparaissait peu probable de montrer une supériorité de l'association linézolide+gentamicine par rapport à la gentamicine seule pour la souche sur laquelle la gentamicine semble plus bactéricide *in vivo*.

Un autre exemple concerne l'association pénicilline + érythromycine vis-à-vis du pneumocoque. Cette association est testée sur deux souches dans le modèle de pneumonie murine par Fischer coll (Fischer 2005). A la dose de 6 mg/kg pour chaque antibiotique, il est montré une inhibition de la pénicilline par l'érythromycine pour une souche et pas pour l'autre. La même association avait été étudiée dans le modèle de sepsis/péritonite de souris, sur 4 souches pour lesquelles un antagonisme était documenté *in vitro*, et dans des conditions expérimentales manifestement destinées à détecter un antagonisme et non une synergie entre pénicilline et érythromycine (Johansen 2000). Malgré ces précautions, le modèle animal montrait un antagonisme pour 2 souches, une synergie pour 1 souche, et une indifférence pour la dernière souche.

4.3.3.3 Modalité d'administration des antibiotiques

L'étude de l'association de la pénicilline et de l'érythromycine dans la pneumonie murine par Fischer et coll donne des résultats différents selon la dose d'érythromycine utilisée. A la dose de 6 mg/kg, l'érythromycine inhibe la bactéricidie *in situ* induite par la pénicilline sur la souche D39. Cette interaction disparaît à la dose de 30 mg/kg (Fischer 2005). Ce constat incite à préférer la simulation des pharmacocinétiques humaines dans les modèles expérimentaux.

Au delà de la dose, le délai entre l'administration des deux antibiotiques peut influencer sur l'analyse de l'interaction entre deux antibiotiques, comme cela a été montré pour l'association minocycline + nétilmicine vis-à-vis de *S. aureus* (Goto 1999).

4.3.4 Corrélation entre interactions *in vitro* et *in vivo*

Les données rapportées plus haut suggèrent que l'interaction entre deux antibiotiques vis-à-vis d'une bactérie peut varier d'une souche à l'autre. L'étude de plusieurs souches s'impose donc. Par rapport aux études *in vivo*, les études *in vitro* ont l'intérêt d'une plus grande faisabilité, et permettent donc l'étude de plus nombreuses souches. La question se pose donc de savoir s'il existe une concordance entre les données *in vitro* et *in vivo* des associations d'antibiotiques.

4.3.4.1 Association QD + gentamicine vis-à-vis de *S. aureus*

Pour résumer les données disponibles sur l'association QD + gentamicine vis-à-vis de *S. aureus* :

les FIC index plaident pour une indifférence (Kang 1997);

les cinétiques de bactéricidie ne montrent pas de synergie ni d'antagonisme, quoique l'association de QD et de gentamicine à forte concentration soit plus bactéricide que la QD seule pour les souches sensibles à la gentamicine (Kang 1997, Fass 1991, Fuchs 2001);

nos données animales suggèrent l'absence d'interaction entre QD et gentamicine, l'association QD + gentamicine ne semblant pas plus bactéricide que la QD seule.

Il semble donc exister une bonne corrélation entre la méthode de l'échiquier, les cinétiques de bactéricidie et le modèle animal, pour une quinzaine de souches testées *in vitro*, et pour deux souches testées *in vivo*.

4.3.4.2 Quelques exemples d'autres associations

L'association de linézolide et de gentamicine a été étudiée à la fois *in vitro* et *in vivo* par Cédric Jacqueline sur 2 souches de *S. aureus* sensibles à ces deux antibiotiques (Jacqueline 2003, Jacqueline 2004). L'association se révèle *in vivo* supérieure au linézolide seul pour les deux souches, même si une synergie (définie par une supériorité statistiquement significative de l'association sur chacune des monothérapies) n'est démontrée que pour une des deux souches. Or, les premières

données publiées concluaient, sinon à un antagonisme stricto sensu, du moins à l'inhibition de l'action de la gentamicine par le linézolide. La richesse des données *in vitro* fournies par l'auteur montre que des conclusions différentes peuvent être tirées si l'on compare l'association au linézolide seul, pour des concentrations faibles de linézolide (cf supra).

L'association de QD et de vancomycine vis-à-vis de *S. aureus* donne des résultats relativement concordants. Les courbes de bactéricidie à faible concentration (1 mg/L) montrent que l'association est plus bactéricidie que chacune des deux drogues seules. Ces résultats ne sont pas retrouvés pour de plus fortes concentrations. Cette synergie *in vitro* est retrouvée *in vivo* sur les deux souches testées (Pavie 2002).

L'étude de l'association de QD et de rifampicine, réalisée *in vitro* avec une seule concentration, ne retrouve pas d'interaction significative vis-à-vis de deux souches de *S. aureus* sensibles à la quinupristine et à la dalfopristine (Zarrouk 2001). Pourtant, une synergie significative est démontrée pour ces deux souches *in vivo*.

Il ne semble donc pas exister de relation claire et constante entre les données *in vitro* et les données *in vivo* relatives à l'interaction entre deux antibiotiques donnés vis-à-vis d'une bactérie donnée. Ceci incite à tester *in vivo* toutes les associations d'antibiotiques envisagées en clinique.

En plus des causes de la mauvaise corrélation entre les activités *in vitro* et *in vivo* des antibiotiques en monothérapie, une des principales explications de la mauvaise corrélation entre les études *in vitro* et *in vivo* de certaines associations concerne probablement des différences de concentrations des antibiotiques. La plupart des études *in vitro* utilisent en effet des concentrations fixes pendant une durée de 18 à 24 heures, alors que les concentrations dans le serum et probablement aussi dans le foyer infectieux varient au cours du nyctémère. De plus, la diffusion des antibiotiques dans le foyer infectieux peuvent être différentes. Ce point entre probablement en compte dans l'interaction entre quinupristine-dalfopristine et rifampicine vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*. En effet, du fait de la moins bonne diffusion de la dalfopristine au centre de la végétation, les rapports entre les concentrations de la quinupristine, de la dalfopristine et de la rifampicine sont probablement différents des mêmes rapports observés *in vitro* (Fantin 1994). Ces différences de concentrations relatives pourraient expliquer la différence d'interaction observée entre le bouillon *in vitro* et la végétation endocarditique.

4.4 CONCLUSION

La fréquence des résistances aux antibiotiques et le nombre de patients immunodéprimés continuant globalement de croître, l'étude des associations antibiotiques reste un sujet d'actualité.

A partir de l'étude de l'association de la quinupristine-dalfopristine et de la gentamicine, nous avons illustré le fait que l'étude des associations antibiotiques n'est pas univoque.

L'approche expérimentale animale est particulièrement utile pour la mise en évidence de synergies bactéricides. Citons à titre d'exemple le très bel effet anti-staphylococcique de l'association du linézolide et des carbapénèmes, démontré d'abord *in vitro* puis dans un modèle d'infection expérimentale (Jacqueline 2005).

D'un autre côté, l'étude clinique des associations antibiotiques reste indispensable, au moins pour les infections assez fréquentes et accessibles à ce type d'essai, et avec des limites que nous avons discuté plus haut au sujet de l'association d'une β -lactamine et d'un macrolide dans la pneumonie pneumococcique.

Une meilleure connaissance des associations antibiotiques ne peut venir que d'un échange permanent des connaissances dans les domaines de l'expérimentation et de la clinique.

5. DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

5.1 POUR RESUMER LES TRAVAUX PRESENTES

Les données présentées dans cette thèse illustrent la difficulté de mesurer l'activité des antibiotiques *in vitro*, *in vivo* dans des modèles d'infection expérimentale, et de corréler ces activités *in vivo* et *in vitro*.

Ainsi la CMI de la télithromycine, comme celle d'autres antibiotiques du groupe macrolide-lincosamides, augmente elle significativement quand elle est mesurée en CO₂ plutôt qu'en air ambiant. Qui plus est, ce phénomène ne concerne pas toutes les souches de pneumocoque, mais certaines souches porteuses du gène *erm*(B). Les recommandations restrictives édictées par divers organismes pour la mesure de la CMI ont permis de diminuer la variabilité de la mesure de ce paramètre. Cependant, la démonstration que la CMI de la teicoplanine n'est pas identique si le milieu de Mueller-Hinton est fourni par le laboratoire Biorad ou par le laboratoire Difco, rappelle que la vigilance est de mise, y compris au sujet du fournisseur de milieu de culture.

De même a-t-on vu que l'analyse de l'interaction *in vitro* entre deux antibiotiques pouvait aboutir à des conclusions différentes, selon le nombre de souches testées et selon les conditions d'expérimentation choisies.

Les modèles d'infection expérimentale peuvent également produire des résultats différents d'une souche à l'autre et d'une expérimentation à l'autre. Nous avons ainsi vu que la résistance constitutive à la quinupristine pouvait, selon la souche, l'expérimentateur et le type d'analyse, être associée ou non à une activité significative de la quinupristine-dalfopristine sur *S. aureus* dans le modèle d'endocardite de lapin. De la même façon, avons-nous rappelé qu'une étude portant sur une seule association, pouvait, dans le même modèle, conclure pour trois souches différentes à un antagonisme, à une synergie et à une indifférence (Johansen 2000).

Nous avons également observé, dans le modèle de sepsis/péritonite de souris, et comme cela a été déjà amplement décrit pour d'autres antibiotiques et d'autres bactéries, une corrélation significative entre la CMI de la télithromycine et sa DE₅₀ vis-à-vis du pneumocoque. La même observation a été faite pour la ciprofloxacine vis-à-vis de *S. epidermidis*. En revanche, cette corrélation n'a pas été établie pour la teicoplanine vis-à-vis de *S. epidermidis*.

Ceci démontre qu'un modèle d'une pratique aussi simple que le sepsis/péritonite de souris n'est pas nécessairement adapté à tous les couples bactérie-antibiotique. De plus, bien que la complexité du modèle d'endocardite de lapin ne permette pas de tester de nombreuses souches, il peut être risqué de tirer des conclusions définitives à partir de l'étude d'une seule souche.

Nous avons discuté des diverses raisons qui font que les études *in vitro* et les modèles d'infection expérimentale peuvent aboutir à des conclusions diamétralement opposées. Nous avons également souligné que des expérimentations *in vitro* et *in vivo* concordantes pouvaient fournir des indications en contradiction avec la pratique clinique, comme l'association d'une β -lactamine et d'un macrolide dans les pneumonies pneumococciques. Nous pensons d'ailleurs que la variabilité est

globalement la seule constante en clinique, tant de point de vue du diagnostic, que du pronostic et du traitement, et que la médecine est autant un Art qu'une Science.

Néanmoins, le but de l'expérimentation, et en particulier de l'utilisation de modèles animaux d'infection, reste de diminuer la part d'incertitude, pour ce qui nous intéresse ici, dans le traitement des infections.

5.2 LES MODELES D'INFECTION EXPERIMENTALE DANS L'EVALUATION DES ANTIBIOTIQUES

Des dizaines de modèles d'infection expérimentale ont été élaborés depuis 100 ans. Pour le pneumocoque, citons parmi les modèles les plus utilisés et les plus intéressants le sepsis/péritonite, l'infection de cuisse et la pneumonie chez la souris, la pneumonie du lapin et la méningite du lapin. Pour *S. epidermidis*, les modèles les plus souvent utilisés sont l'endocardite de rat ou de lapin et le sepsis/péritonite de souris. Exception notable dans le domaine de l'expérimentation animale, le modèle d'infection de cuisse n'a pas été utilisé avec *S. epidermidis*.

Les travaux que nous avons présentés ont utilisé deux modèles d'infection expérimentale, à savoir le sepsis/péritonite de souris et l'endocardite de lapin. En quoi ces modèles permettent-ils de répondre aux besoins actuels de l'évaluation des antibiotiques ?

Le sepsis/péritonite de souris présente l'avantage d'être simple de réalisation et peu onéreux. Il permet ainsi l'étude de nombreux couples bactérie-antibiotique. Il est souvent utilisé pour comparer l'activité de plusieurs antibiotiques, et permet l'analyse des déterminants PK-PD de la relation bactérie – antibiotique (Frimodt-Moller 1999). Il a été vanté pour son utilité dans l'étude des associations d'antibiotiques, mais est assez peu utilisé dans ce but (Frimodt-Moller 1999).

Le modèle d'endocardite de lapin, ou de rat, est moins simple et plus cher que le précédent. Il oblige de ce fait à l'étude d'un nombre limité de souches, mais il permet l'humanisation des concentrations sériques des antibiotiques. De ce fait, il est particulièrement intéressant dans l'évaluation de l'impact des résistances aux antibiotiques, et dans l'étude des associations.

5.3 LA SINGULARITE DU COUPLE ANTIBIOTIQUE-BACTERIE

: comparaison du sepsis à pneumocoque et du sepsis à *S. epidermidis*

5.3.1 Virulence, pharmacocinétique et pharmacodynamique

Nos données suggèrent que le sepsis/péritonite de souris est adapté à l'étude de la ciprofloxacine plus qu'à celle de la teicoplanine, pour *S. epidermidis*. Nous avons discuté plus haut des différences entre ces deux antibiotiques susceptibles d'expliquer cet état de fait. Des différences entre les bactéries étudiées pourraient également entrer en compte, en particulier la différence de virulence.

Nous savons que le pneumocoque est beaucoup plus virulent que *S. epidermidis* dans notre modèle. Pour obtenir une mortalité quasi-complète au 6^{ème} jour avec *S. epidermidis*, nous avons dû en effet immuno-déprimer les souris avec du cyclophosphamide, alors que ce traitement n'a pas été nécessaire pour l'infection à

pneumocoque. Malgré cette modification du protocole, les souris non traitées meurent moins vite quand elles sont infectées par *S. epidermidis* qu'avec *S. pneumoniae* (annexe 6.12). Nous avons déjà supposé que notre protocole était plus adapté aux antibiotiques actifs rapidement et selon un mode concentration-dépendant. Si tout se passe pendant les premières heures post-inoculation, nous avançons l'hypothèse supplémentaire que notre protocole est plus adapté à l'étude des antibiotiques actifs rapidement et selon un mode concentration dépendant, sur les bactéries les plus rapidement létales. Autrement dit, la survie au 6^{ème} jour pourrait être principalement déterminée par l'interaction entre l'antibiotique, la bactérie et la souris pendant les premières heures de l'expérience.

Pour valider cette hypothèse avec *S. epidermidis*, on peut envisager d'agir sur la virulence des bactéries, et d'utiliser d'autres antibiotiques ayant des propriétés PK-PD différentes, ou administrés selon des modalités différentes.

5.3.2 Influence de la réponse inflammatoire et immunitaire

Une autre différence entre les sepsis/péritonite à *S. epidermidis* et à pneumocoque concerne l'influence de la réponse inflammatoire et de la réponse immunitaire. Nous avons dû immunodéprimer nos souris pour obtenir une virulence suffisante des souches de *S. epidermidis*. Or le rôle des leucocytes dans le transport des antibiotiques au foyer infectieux a été décrit, en particulier pour les macrolides (Veber 1995). La teicoplanine a une bonne pénétration intracellulaire, comparable à celle de la ciprofloxacine à forte concentration (Van der Auwera 1988, Van Bambeke 2004). A notre connaissance, l'activité bactéricide intracellulaire de la teicoplanine et de la ciprofloxacine vis-à-vis de *S. epidermidis* n'a pas été comparée. Notons par ailleurs qu'une pénétration intracellulaire satisfaisante ne permet pas de préjuger de l'activité bactéricide intra-cellulaire, comme l'ont montré Van Bambeke et coll pour l'oritavancine vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* et de *S. aureus* (Van Bambeke 2004).

De plus, il n'est pas impossible que l'immunodépression par cyclophosphamide modifie la pharmacocinétique sérique des antibiotiques. Cette hypothèse vient en particulier du constat par Veber et coll que la demi-vie de l'azithromycine chez la souris semble diminuer chez les souris traitées par cyclophosphamide, passant de 8.7 heures chez les souris immunocompétentes à 2 heures chez les souris immunodéprimées (Veber 1995). Nous n'avons pas connaissance de données comparables chez la souris concernant la teicoplanine et la ciprofloxacine.

Enfin, ce constat est à rapprocher de l'hypothèse faite par Craig, à partir d'expérimentation sur un inhibiteur de la déformylase vis-à-vis du pneumocoque, que les paramètres PK-PD pourraient varier selon que la souris est leucopénique ou non (Craig 2003).

Pour résumer, tous ces éléments plaident pour la possibilité que la leucopénie interfère avec l'activité anti-staphylococcique de la teicoplanine chez la souris, que cette interférence soit différente pour la ciprofloxacine, et qu'elle constitue ainsi une des explications de la mauvaise corrélation entre CMI et DE₅₀ de la teicoplanine dans ce modèle.

Quoiqu'il en soit, ces constats et ces hypothèses soulignent le fait qu'on ne peut pas utiliser les mêmes protocoles, voire les mêmes modèles animaux pour tester n'importe quel antibiotique sur n'importe quelle espèce bactérienne.

5.4 CONCLUSION

Nous avons vu que chacun des trois travaux faits au cours de cette thèse soulevait de nouvelles questions spécifiques. Nous avons également constaté la récurrence

du problème de la pharmacodynamie *in vivo* des antibiotiques, et en particulier de la relation entre la CMI d'un antibiotique et son activité *in vivo*. De nombreux facteurs sont susceptibles de perturber cette relation, probablement liés aux multiples interactions entre l'antibiotique, l'animal et la bactérie. Une meilleure connaissance de tous ces facteurs impliqués dans l'activité des antibiotiques *in vivo* permettra à l'avenir de mieux adapter nos modèles d'infection aux problèmes qu'ils sont supposés aider à résoudre, et finalement de mieux utiliser les antibiotiques en clinique.

6. ANNEXES

6.1 INFLUENCE DE LA FRACTION DE CO₂ SUR LA CMI DE LA TELITHROMYCINE VIS-A-VIS DE 40 SOUCHES DE PNEUMOCOQUE.

Objectif

Chercher l'existence d'une relation quantitative entre la fraction de CO₂ et la CMI de la télithromycine vis-à-vis de 40 souches de pneumocoque.

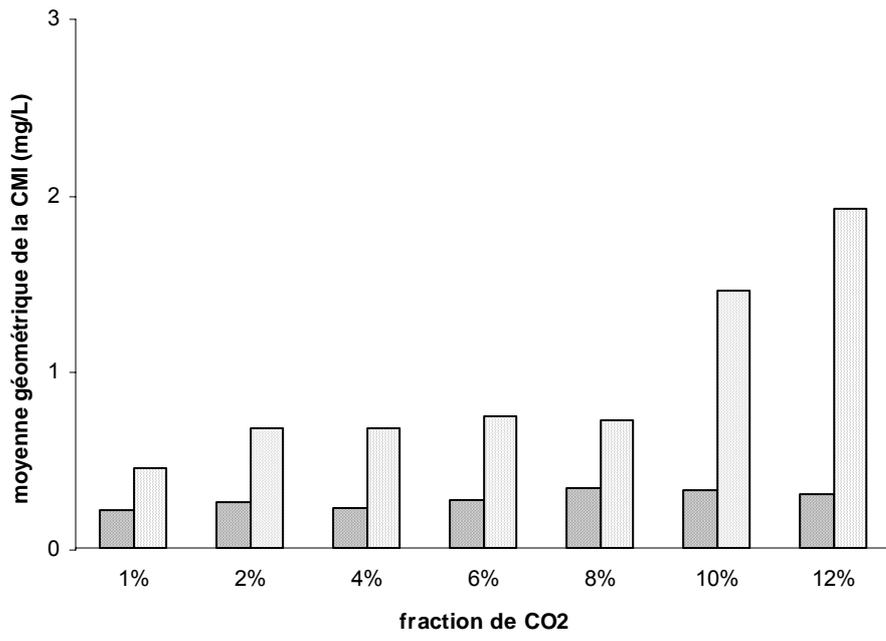
Méthodes

Les 40 souches ont été sélectionnées à partir de leur rapport CO₂ / AA de la CMI de la télithromycine comme décrit dans l'article « Influence of carbon dioxide on the MIC of telithromycin for *S. pneumoniae* : an *in vitro-in vivo* study. » Il s'agit des souches utilisées pour les études de reproductibilité, séparées en deux groupes A et B. La CMI de la télithromycine a été mesurée par la méthode de dilution en gélose selon les recommandations du CA-SFM, avec des concentrations croissantes de CO₂, de 1 à 12%. Pour chaque groupe, une corrélation entre fraction de CO₂ et CMI de la télithromycine a été recherchée par la méthode de corrélation des rangs de Spearman.

Résultats

La moyenne géométrique des CMI de la télithromycine a été représentée pour chaque fraction de CO₂ sur la figure 1. Pour le groupe B, la moyenne géométrique des CMI augmente de 0.46 mg/L (1% CO₂) à 1.93 mg/L (12% CO₂). Il existe pour le groupe B une corrélation significative entre fraction de CO₂ et CMI de la télithromycine ($p < 0.001$). Pour le groupe A, la moyenne géométrique de la CMI varie à peine, de 0.23 à 0.31 mg/L. Le test des rangs de Spearman ne trouve pas de corrélation significative.

Figure 1. Relation entre moyenne géométrique de la CMI de la télithromycine et fraction de CO₂ pour 40 souches de pneumocoque. Barres sombres, souches du groupe A ; barres claires, souches du groupe B.



6.2 ETUDE DE L'INFLUENCE DU PH SUR LA CMI DE LA TELITHROMYCINE DU PNEUMOCOQUE.

Objectif

Etudier les effets respectifs du pH et de l'incubation en CO₂ sur la CMI de la télithromycine vis-à-vis du pneumocoque.

Méthodes

La CMI de la télithromycine a été mesurée pour 45 souches cliniques de pneumocoque, par dilution en gélose. Le pH de la gélose de Mueller-Hinton a été modifié et tamponné par adjonction de HCl et de phosphate de sodium. Les CMI ont été mesurées après incubation en air ambiant et en CO₂ 5%. L'effet sur la CMI de l'atmosphère d'incubation en gélose standard (non tamponnée) et en gélose tamponnée à pH 7.3 a été mesuré par la différence des CMI (en log₂ dilutions). L'effet du pH a été mesuré par la différence des CMI obtenues en air ambiant sur des géloses tamponnées à pH 7.3 et à pH 6.8.

Résultats

Sur des géloses standard (pH 7.3), le rapport moyen CO₂ / AA est de 3.2 log₂ dilutions. Ce même rapport moyen est de 3.0 log₂ dilutions sur des géloses tamponnées à pH 7.3. Le tamponnement de la gélose ne semble donc pas modifier nettement le rapport CO₂ / AA. De plus, en air ambiant, la différence moyenne entre la CMI en gélose standard (pH 7.3) et la gélose tamponnée à pH 6.8 est de - 1.6 log₂ dilution. Cet écart est significativement différent de l'écart obtenu entre CO₂ et air ambiant sur gélose standard (pH 7.3) (moyennes comparées par test t apparié, p < 0.001).

6.3 CORRELATION ENTRE LA CMI ET LA DE₅₀ DE LA TELITHROMYCINE VIS-A-VIS DU PNEUMOCOQUE

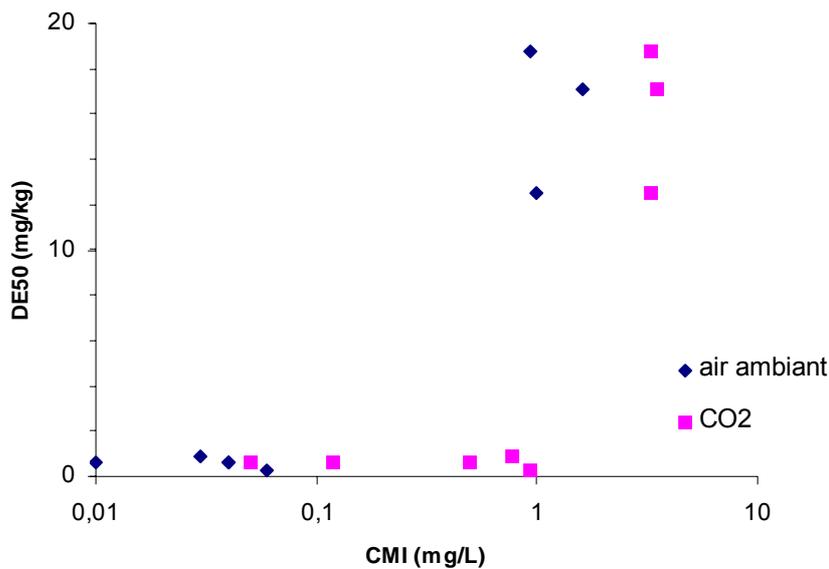
Méthode

La corrélation entre le log CMI et la DE₅₀ (mesurée selon la méthode de Reed et Muench) a été étudiée par le test de corrélation des rangs de Spearman, grâce au logiciel GraphPad Prism, GraphPad, San Diego, Californie.

Résultat

Il existe une corrélation significative entre le log CMI et la DE₅₀ quand la CMI est mesurée en air ambiant ($r = 0,94$, $p = 0,0005$). Quand la CMI est mesurée en CO₂, la corrélation est à la limite de la significativité ($r = 0,64$, $p = 0,0962$).

Figure. Relation entre la CMI et la DE₅₀ de la télithromycine vis-à-vis de 8 souches de pneumocoque, selon que la CMI est mesurée en air ambiant ou en CO₂.



6.4 INFLUENCE DU FOURNISSEUR DU MILIEU DE MUELLER-HINTON SUR LA CMI DES GLYCOPEPTIDES POUR *S. EPIDERMIDIS*.

6.4.1 Méthodes

Toutes les souches de *S. epidermidis* isolées à l'Hôpital Guillaume-et-René-Laënnec du CHU de Nantes sont conservées depuis 1990. Cinquante souches ont été tirées au sort pour les années 1990, 1992, 1994, 1996, 1998 et 2000. Toutes les souches de *S. epidermidis* résistantes à la méticilline isolées en 2001 ont également été incluses.

Pour les souches isolées avant 2001, la CMI de la teicoplanine a été mesurée deux fois par microdilution en milieu liquide selon les recommandations du NCCLS (désormais nommé CLSI), en utilisant un bouillon de Mueller-Hinton de marque Biorad et un bouillon de marque Difco. La CMI de la vancomycine a été mesurée selon les mêmes modalités.

Pour toutes les souches de 2001, les CMI de la teicoplanine et de la vancomycine ont également été mesurées par dilution en gélose, une fois avec gélose de Mueller-Hinton de marque Difco, et une fois avec une gélose de marque Biorad.

Les souches ont été catégorisées vis-à-vis de la teicoplanine selon les concentrations critiques retenues par le CA-SFM en 2004, à savoir comme sensible si la CMI était ≤ 4 mg/L, et résistante si la CMI était > 16 mg/L.

Pour chaque antibiotique et chaque méthode de mesure de la CMI, les \log_2 des CMI des deux marques commerciales ont été comparés par un test t apparié bilatéral. Les proportions ont été comparées par test du Chi-deux. Les analyses ont été effectuées avec le logiciel GraphPad Prism 4.0, GraphPad Software, San Diego, Californie.

6.4.2 Résultats

6.4.2.1 Concentrations Minimales Inhibitrices

6.4.2.1.1 Analyse globale

Pour les 300 souches isolées entre 1990 et 2000, la CMI de la teicoplanine est significativement plus élevée en bouillon Biorad qu'en bouillon Difco, en moyenne de $0.74 \log_2$ dilution, ce qui est hautement significatif (tableau 1). Un constat similaire est fait avec la vancomycine, la différence étant de $0.40 \log_2$ dilution ((tableau 1).

Tableau 1.

Moyenne géométrique des CMI de la teicoplanine et de la vancomycine, mesurées en milieu liquide avec des bouillons de marque Difco et de marque Biorad, pour 300 souches collectées entre 1990 et 2000.

	Teicoplanine		Vancomycine	
	Difco	Biorad	Difco	Biorad
Moyenne géométrique (IC 95%)	2.36 (2.64-2.96)	4.42 (3.88-5.04)	1.46 (1.39-1.53)	1.92 (1.84-2.00)
Différence moyenne (\log_2) (IC 95%)	0.74 (0.63-0.85)		0.40 (0.34-0.46)	
p	< 0.0001		< 0.0001	

Sur l'année 2001, 194 souches de *S. epidermidis* résistantes à la méticilline ont été isolées. Les CMI mesurées en milieu liquide et en milieu solide sont indiquées en

fonction du fournisseur des milieux de culture (tableaux 2 et 3), et apparaissent significativement plus élevées avec les milieux Biorad qu'avec les milieux Difco.

Tableau 2.

Moyenne géométrique des CMI de la teicoplanine et de la vancomycine, mesurées en milieu liquide avec des bouillons de marque Difco et de marque Biorad, pour 194 souches collectées en 2001.

	Teicoplanine		Vancomycine	
	Difco	Biorad	Difco	Biorad
Moyenne géométrique (IC 95%)	2.12 (1.91-2.34)	4.21 (3.70-4.79)	1.58 (1.50-1.66)	1.96 (1.90-2.02)
Différence moyenne (\log_2) (IC 95%)	0.99 (0.88-1.10)		0.31 (0.24-0.38)	
p	< 0.0001		< 0.0001	

Tableau 3.

Comparaison des \log_2 CMI de la teicoplanine et de la vancomycine, mesurées en milieu solide avec des géloses de marque Difco et de marque Biorad, pour 194 souches collectées en 2001.

	Teicoplanine		Vancomycine	
	Difco	Biorad	Difco	Biorad
Moyenne géométrique (IC 95%)	2.82 (2.50-3.18)	7.45 (6.64-8.35)	2.03 (1.98-2.08)	3.63 (3.50-3.77)
Différence moyenne (\log_2) (IC 95%)	1.40 (1.31-1.49)		0.84 (0.79-0.89)	
p	< 0.0001		< 0.0001	

6.4.2.1.2 Analyse par sous-groupes

Pour chaque méthode et chaque antibiotique, ont été indiqués dans le tableau 4 le nombre de souches ayant une différence CMI en milieu Difco - CMI en milieu Biorad < -1 , ainsi que les valeurs minimales et maximales de cette différence.

Pour résumer, la proportion de souches dont la CMI de la teicoplanine en milieu Difco est inférieure de plus d'une \log_2 dilution à la CMI mesurée en milieu Biorad est : pour les années 1990 – 2000, 14% pour la dilution en bouillon ; pour les SERM de l'année 2001, 23% pour la dilution en bouillon et 41% pour la dilution en gélose.

Selon la méthode utilisée et l'antibiotique testé, 0 à 7 souches ont une différence de plus de 2 \log_2 dilutions entre le milieu Biorad et le milieu Difco.

Tableau 4.

Nombre de souches ayant une différence CMI en milieu Difco - CMI en milieu Biorad < -1 \log_2 dilution (valeur minimale, valeur maximale).

	n total	Liquide		Gélose	
		Teicoplanine	Vancomycine	Teicoplanine	Vancomycine
1990 – 2000	300	42 (-4, 1)	0 (-1, 1)	-	-
SERM 2001	194	45 (-3, 2)	1 (-2, 1)	80 (-3, 1)	1 (-2, 0)

6.4.2.2 Catégorisation des souches vis-à-vis de la teicoplanine

Pour les 300 souches isolées de 1990 à 2000, le nombre de souches sensible / intermédiaires / résistantes à la teicoplanine passe respectivement de 234 / 61 / 5 en bouillon Difco à 153 / 131 / 16 en bouillon Biorad. Ces répartitions sont statistiquement différentes ($p < 0.0001$). Autrement dit, la proportion de souches sensibles à la teicoplanine passe de 78% en bouillon Difco à 51% en bouillon Biorad. Si l'on regroupe les souches intermédiaires et résistantes en une catégorie « Sensibilité diminuée » (SD), on note 217 souches concordantes entre les deux milieux, 82 souches sensibles en Difco et de SD en Biorad, et 1 souche SD en Difco et sensible en Biorad.

Pour les 194 souches isolées en 2001, on observe qu'en milieu liquide, le nombre de souches sensible / intermédiaires / résistantes à la teicoplanine passe respectivement de 170 / 24 / 0 en bouillon Difco à 129 / 62 / 3 en bouillon Biorad. Ces répartitions sont statistiquement différentes ($p < 0.0001$). La proportion de souches sensibles à la teicoplanine est de 88% en Difco à 66% en Biorad. En milieu solide, le nombre de souches sensible / intermédiaires / résistantes à la teicoplanine passe respectivement de 156 / 38 / 0 sur gélose Difco à 62 / 126 / 6 sur gélose Biorad. Ces répartitions sont statistiquement différentes ($p < 0.0001$). La proportion de souches sensibles à la teicoplanine est ainsi de 80% en Difco à 32% en Biorad. Si l'on regroupe les souches intermédiaires et résistantes en une catégorie « Sensibilité diminuée » (SD), on note 100 souches concordantes entre les deux milieux et 94 souches sensibles en Difco et de SD en Biorad.

Sur les 494 testées en milieu liquide, il apparaît donc que la proportion de souches sensibles à la teicoplanine passe de 82% en bouillon Difco à 44% en bouillon Biorad.

6.5 POSTER N°1768, 15TH EUROPEAN CONGRESS ON CLINICAL
MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES.

Copenhagen, 2- 5 avril 2005.

6.6 LA RESISTANCE A LA METICILLINE INFLUENCE-T-ELLE L'ACTIVITE DE LA TEICOPLANINE SUR *S. EPIDERMIDIS* ?

6.6.1 Méthodes

La CMI de la méticilline a été mesurée en dilution en gélose selon les recommandations du CA-SFM. Le CA-SFM n'indique pas les concentrations critiques pour la méticilline. Les souches ont été classés comme sensibles à la méticilline ($CMI \leq 4$ mg/L) ou de sensibilité diminuée ($CMI > 4$ mg/L) selon les recommandations de la BSAC. La corrélation entre la CMI et la DE_{50} de la teicoplanine a été analysée d'une part parmi les souches sensibles à la méticilline, et d'autre part pour les souches de sensibilité diminuée, par la méthode de corrélation des rangs de Spearman (GraphPad Prism 4.0, GraphPad Software, San Diego).

6.6.2 Résultats

Les CMI de la méticilline sont indiquées dans le tableau. Il n'y a pas de corrélation significative entre la CMI et la DE_{50} de la teicoplanine, aussi bien parmi les souches sensibles à la méticilline ($r = 0.44$, $p = 0.75$) que parmi les souches de sensibilité diminuée à la méticilline ($r = 0.11$, $p = 0.95$) (figures 1 et 2).

Tableau. CMI de la méticilline de 9 souches de *S. epidermidis*.

souche	CMI méticilline (mg/L)
7453	4
7318	2
7026	2
7418	64
7371	64
5331	64
5056	64
7089	1
7302	64

Figure 1. Corrélation entre CMI et DE_{50} de la teicoplanine vis-à-vis de 4 souches sensibles à la méticilline.

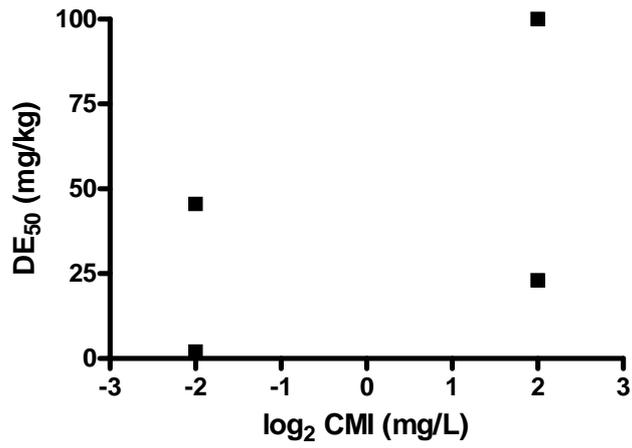
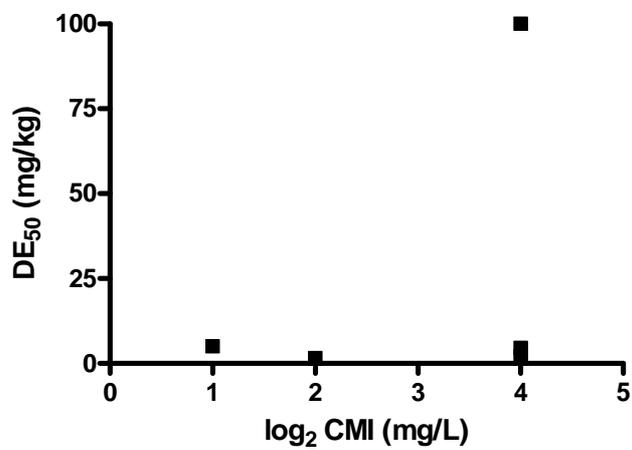


Figure 2. Corrélation entre CMI et DE₅₀ de la teicoplanine vis-à-vis de 5 souches de sensibilité diminuée à la métilcilline.



6.7 CORRELATION ENTRE CMI ET ACTIVITE *IN VIVO* DE LA TEICOPLANINE ET DE LA VANCOMYCINE VIS-A-VIS DE 5 SOUCHES DE *S. AUREUS*

6.7.1 Introduction

L'étude de l'activité *in vivo* des glycopeptides sur plusieurs souches de *S. aureus* avait pour objectif initial l'analyse de l'association de la vancomycine et de la gentamicine en fonction du phénotype et du gène de résistance aux aminosides (Asseray 2002). Aucune étude antérieure n'avait testé l'action d'un glycopeptide sur plusieurs souches de *S. aureus*. Constatant l'absence de relation entre CMI et activité *in vivo* pour la vancomycine, l'étude a été élargie à d'autres souches et à la teicoplanine (Asseray 2005).

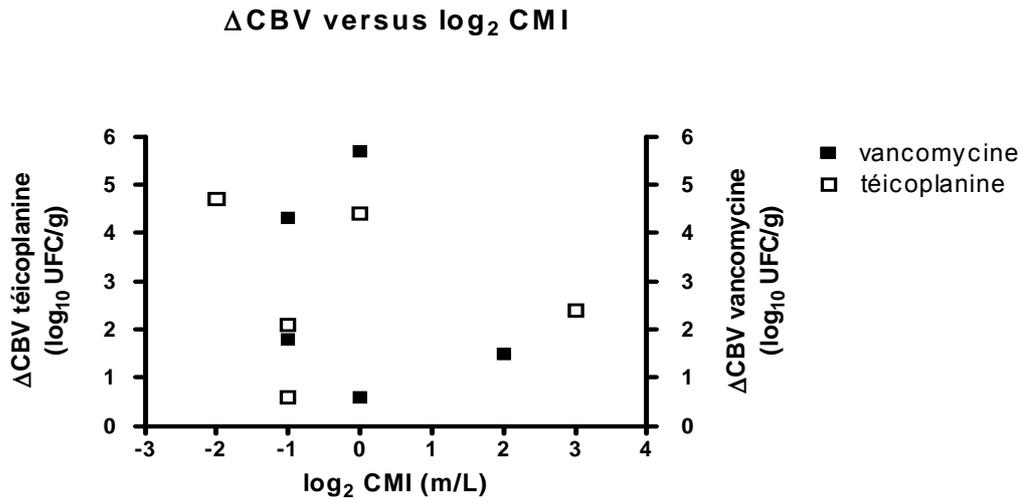
6.7.2 Méthodes

Nous avons extrait de l'article publié par Asseray et coll les données suivantes : d'une part les CMI de la teicoplanine et de la vancomycine de 5 souches ; d'autre part les mesures d'activité de ces deux antibiotiques dans le modèle d'endocardite de lapin. L'activité *in vivo* est mesurée par la différence de concentration bactérienne valvulaire moyenne (Δ CBV), calculée entre les lapins du groupe contrôle (début de traitement) et les lapins du groupe traité (fin de traitement), et exprimée en log ufc / gramme de végétation. Une corrélation entre le \log_2 CMI et la Δ CBV a été recherchée selon la méthode de corrélation des rangs de Spearman (GraphPad Prism version 4.00, GraphPad Software, San Diego, Californie).

6.7.3 Résultats

La relation entre CMI et activité *in vivo* de la vancomycine est représentée sur la figure. Aucune corrélation significative n'a été trouvée, pour la vancomycine ($r = -0.37$, $p = 0.52$) comme pour la téicoplanine ($r = -0.15$, $p = 0.78$).

Figure. Relation entre le \log_2 CMI et l'activité *in vivo* (Δ CBV) de la téicoplanine et de la vancomycine vis-à-vis de 5 souches de *S. aureus*.



6.8 BACTERICIDIE *IN VITRO* DE LA TEICOPLANINE SUR *S. EPIDERMIDIS*

6.8.1 Objectif

Mesurer la bactéricidie induite *in vitro* par la teicoplanine sur 9 souches de *S. epidermidis*, et rechercher une corrélation entre le taux de bactéricidie et l'activité *in vivo* de cet antibiotique.

6.8.2 Méthodes

Les 9 souches étudiées *in vivo* ont été exposées pendant 24 heures à la teicoplanine à la concentration de 20 mg/L, dans un volume final de 10 mL de bouillon de Mueller-Hinton. Un tube contrôle, sans antibiotique, était utilisé pour chaque souche.

L'inoculum initial était ajusté à 7 log ufc/mL. Au bout de 24 heures, les tubes étaient prélevés pour ensemencement sur gélose Trypticase-Soja et incubation pendant 48 heures pour numération des colonies. Les résultats sont présentés sous forme de taux de bactéricidie (Δ CB, pour variation du Compte Bactérien), correspondant au titre bactérien au temps 0 diminué du titre bactérien après 24 heures d'exposition à téicoplanine.

Une corrélation entre Δ CB et DE_{50} dans sepsis/péritonite de souris a été recherchée par la méthode de corrélation des rangs de Spearman (GraphPad Prism, GraphPad, San Diego, Californie).

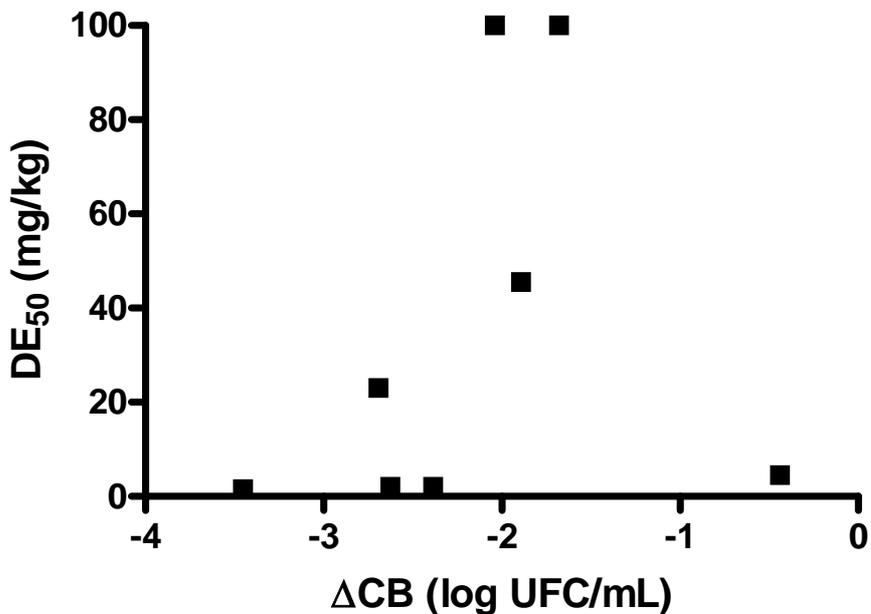
6.8.3 Résultats

Les Δ CB sont indiqués dans le tableau et sur la figure. Il n'y a pas de corrélation statistiquement significative entre la DE_{50} et le Δ CB (r de Spearman = 0.57, p = 0.15).

Tableau. Activité *in vivo* (DE_{50} en mg/kg) et *in vitro* (CMI en mg/L, taux de bactéricidie noté Δ CB en log ufc/mL) de la teicoplanine sur 9 souches de *S. epidermidis*.

souche	DE_{50}	CMI	Δ CB
7453	45,6	0,25	-1,89
7089	100	4	-2,04
5056	1,5	4	-3,45
7371	1,9	16	-2,38
7418	4,8	16	-0,43
5331	5,3	2	ND
7026	23,2	4	-2,69
7318	2,3	0,25	-2,62
7302	100	16	-1,67

Figure. Activité *in vivo* (DE_{50} en mg/kg) et *in vitro* (taux de bactéricidie noté Δ CB en log ufc/mL) de la teicoplanine sur 8 souches de *S. epidermidis*.



6.9 ASSOCIATION DE QUINUPRISTINE-DALFOPRISTINE ET DE GENTAMICINE EN CINETIQUE DE BACTERICIDIE SUR *S. AUREUS* : ETUDE COMPLEMENTAIRE

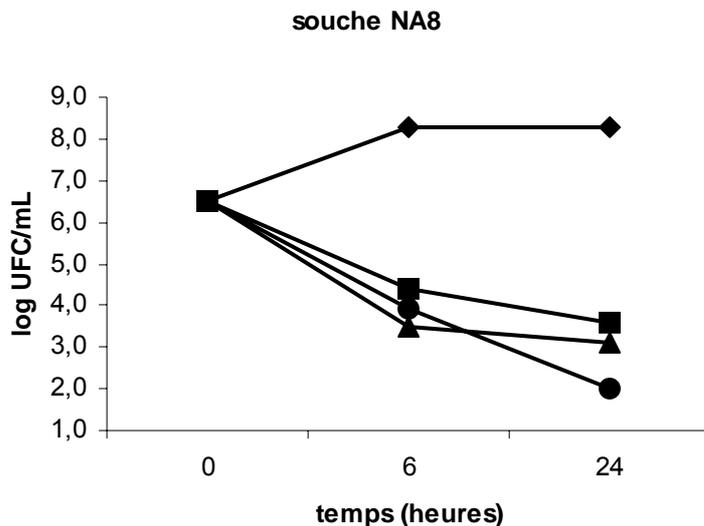
6.9.1 Méthodes

Les courbes de bactéricidie ont été complétées pour les souches NA8 et BCB8 pour des concentrations de gentamicine et de QD de 4 fois la CMI, soit respectivement 1 et 2 mg/L, selon les mêmes modalités par ailleurs que celles décrites dans l'article. Les concentrations bactériennes obtenues avec l'association ont été comparées avec celles obtenues avec chacun des antibiotiques isolément, aux temps 6 heures et 24 heures. Une différence ≥ 2 log ufc/mL a été retenue comme significative.

6.9.2 Résultats

Les résultats obtenus avec des concentrations de 4 fois la CMI sont indiqués dans le tableau et représentés sur la figure. Pour les deux concentrations et les deux temps, d'exposition, la bactéricidie induite par la QD et l'association ne semblent pas différentes. En revanche, la comparaison de la gentamicine et de l'association produit des résultats variables selon la concentration et le temps d'exposition : l'association et la gentamicine induisent une bactéricidie comparable dans la plupart de cas, mais par deux fois la gentamicine semble moins bactéricide que l'association, alors que le constat inverse semble s'imposer dans un autre cas. Dans aucun cas, il n'est noté de synergie ou d'antagonisme vrai, c'est-à-dire de situation dans laquelle l'association est significativement (d'au moins de 2 log ufc/mL) différente des deux antibiotiques.

Figure. Bactéricidie en milieu liquide induite par la quinupristine-dalfopristine (triangles), la gentamicine (carrés), et l'association quinupristine-dalfopristine + gentamicine (disques), sur les souches de *S. aureus* NA8 et BCB8, à la concentration de 4 fois la CMI (tubes contrôles, losanges).



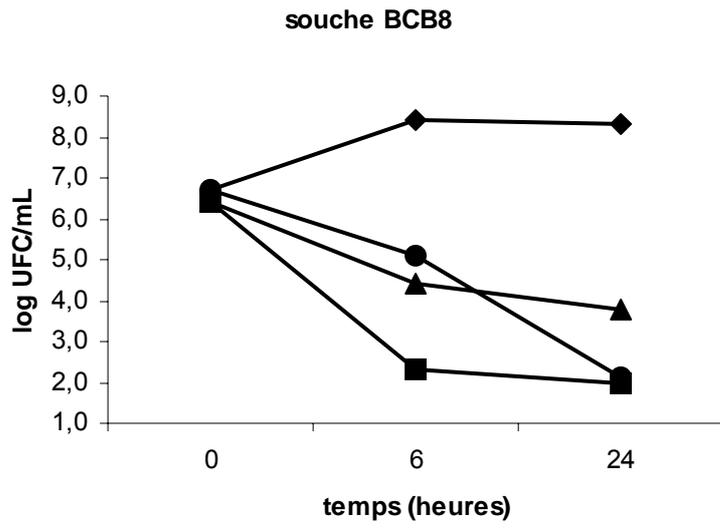


Tableau. Comparaison de l'association QD + gentamicine à la QD seule, et à la gentamicine seule sur deux souches de *S. aureus*.

	Souche NA8		Souche BCB8	
	QD versus A	G versus A	QD versus A	G versus A
1 x CMI				
H6	QD=A	G=A	QD=A	G=A
H24	QD=A	G<A	QD=A	G<A
4 x CMI				
H6	QD=A	G=A	QD=A	G>A
H24	QD=A	G=A	QD=A	G=A

G = gentamicine, QD = quinupristine-dalfopristine, A = association (quinupristine-dalfopristine + gentamicine). G<A signifie que la bactéricidie induite par la gentamicine seule est inférieure (d'au moins 2 log ufc/mL) à la bactéricidie induite par l'association. G = A signifie qu'il y a une différence < 2 log ufc/mL entre G et A. G > A signifie que la bactéricidie induite par la gentamicine seule est supérieure (d'au moins 2 log ufc/mL) à la bactéricidie induite par l'association.

6.10 ACTIVITE DE LA VANCOMYCINE DANS LE MODELE D'ENDOCARDITE DE LAPIN SUR LES SOUCHES DE *S. AUREUS* NA8 ET BCB8.

6.10.1 Méthodes

La CMI de la vancomycine a été mesurée par dilution en gélose selon les recommandations du CA-SFM. Le modèle d'endocardite aortique de lapin est décrit dans l'article (chapitre 4.2). La vancomycine a été administrée en perfusion continue pendant 4 jours, à la dose de 100 mg/kg/jour. Cette dose permet d'obtenir une concentration sérique de vancomycine de 22.3 ± 8.7 mg/L à l'état stable (Asseray 2002).

6.10.2 Résultats

La CMI de la vancomycine est de 1 mg/L pour les deux souches. Les densités bactériennes valvulaires des lapins du groupe contrôle et du groupe vancomycine sont rapportées dans le tableau.

Tableau. Activité de la vancomycine dans le modèle d'endocardite de lapin sur 2 souches de *S. aureus*. Densités Bactériennes Valvulaires (DBV) moyennes exprimées en \log_{10} ufc/g de végétation \pm écart-type (nombre de lapins).

	DBV (log ufc/g)	
	Souche NA8	Souche BCB8
Témoin	8.5 ± 0.8 (9)	8.7 ± 0.9 (13)
Vancomycine	8.5 ± 0.5 (5)	4.5 ± 1.9 * (5)

* significativement différent du témoin ($p < 0.01$)

6.11 INFLUENCE DES CONCENTRATIONS SUR L'INTERACTION *IN VITRO* ENTRE LE LINEZOLIDE ET LA GENTAMICINE VIS-A-VIS DE *S. AUREUS*.

Ces données expérimentales non publiées ont été aimablement communiquées par Cédric Jacqueline (EA 3826). Leur place dans cette thèse est justifiée par l'interprétation que nous en avons faite, et qui illustre la complexité de l'analyse de l'interaction entre deux antibiotiques.

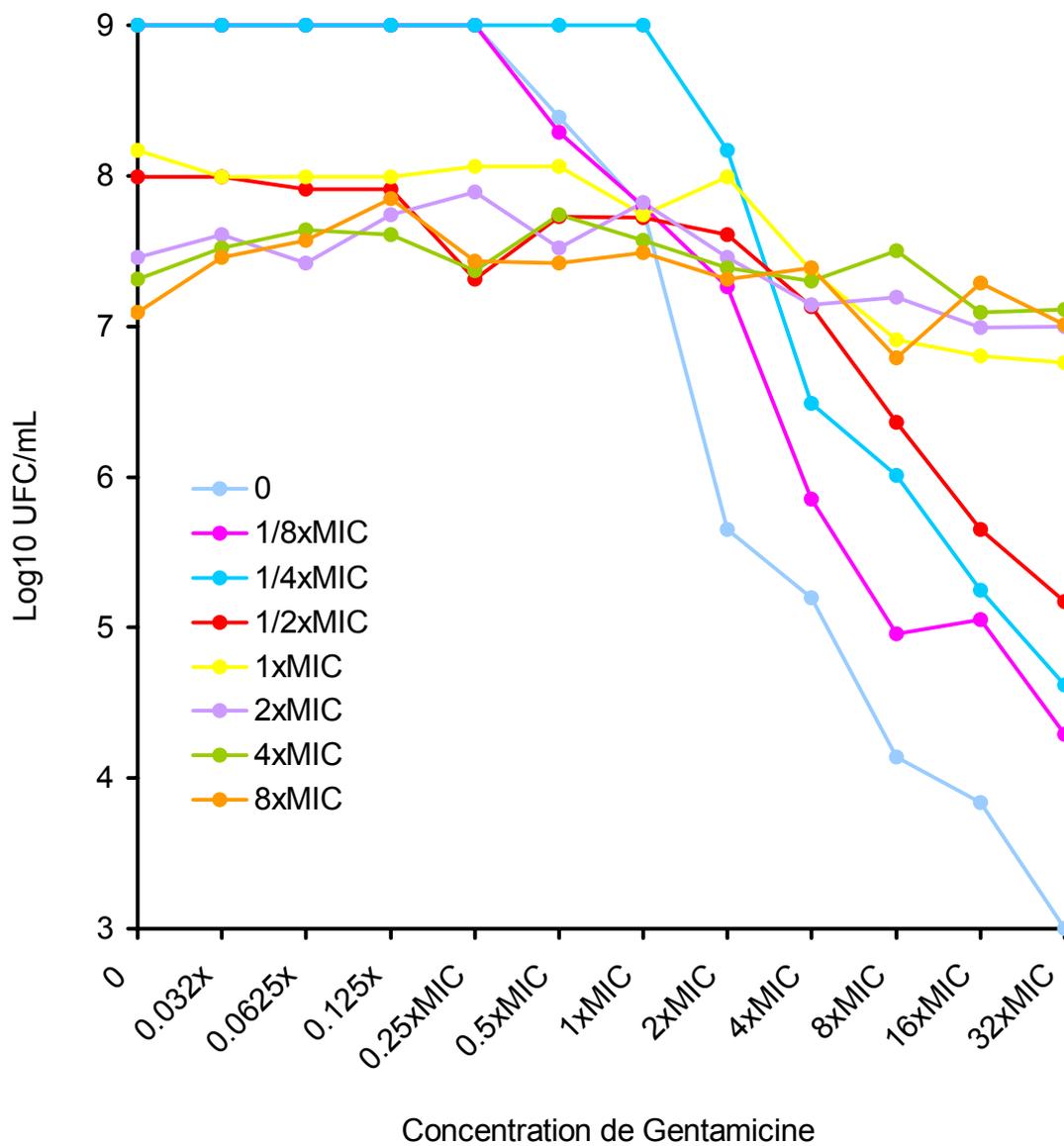
6.11.1 Méthodes

Une microméthode de bactéricidie en milieu liquide a été utilisée sur la souche SARM BCB8. Une microplaque de 96 puits (Nalge Nunc International, Roskilde, Denmark) est utilisée selon la méthodologie déjà décrite (Jacqueline 2005). Les puits sont remplis avec 200 μ L de bouillon de Mueller-Hinton contenant de la gentamicine et du linézolide à concentrations croissant selon une raison géométrique égale à 2, de 0.03 à 32 fois la CMI pour la gentamicine, et de 0.125 à 8 fois la CMI pour le linézolide. Les puits sont ensemencés pour obtenir un inoculum final de $5 \cdot 10^6$ à 10^7 ufc/mL. Après 24 heures d'incubation, le contenu des puits est dilué et ensemencé sur gélose de Mueller-Hinton pour numération des colonies. Les résultats sont exprimés en log ufc/mL.

6.11.2 Résultats

Les résultats sont représentés sur la figure. Chaque courbe correspond à une concentration de linézolide. Ces données peuvent être interprétées en répondant à deux questions.

Figure. Bactéricidie en milieu liquide obtenue après 24 heures d'exposition d'une souche de *S. aureus* à des concentrations variables de linézolide et de gentamicine.



Chaque ligne correspond à une concentration de linézolide, variant de 0 à 8 fois la CMI.

Ces données peuvent être interprétées en répondant à deux questions.

Premièrement, l'adjonction de linézolide modifie-t-elle l'activité de la gentamicine ?
Pour des concentrations de gentamicine $\leq 0.5 \times \text{CMI}$, l'adjonction de linézolide ($\geq 0.5 \times \text{CMI}$) diminue discrètement (d'environ 1 log ufc/mL) la densité bactérienne, sans produire cependant de bactéricidie.

Pour des concentrations de gentamicine $\geq 4 \times \text{CMI}$, le linézolide inhibe l'action de la gentamicine, et ce d'une façon d'autant plus marquée que la concentration de linézolide augmente.

Deuxièmement, l'adjonction de gentamicine modifie-t-elle l'activité du linézolide ?
Pour des faibles de concentrations de linézolide (de 0.125 à 0.5 x CMI), la densité bactérienne diminue quand on ajoute de la gentamicine à doses croissantes, allant jusqu'à produire un effet bactéricide.

Cet effet disparaît pour des concentrations plus importantes de linézolide (de 1 à 8 x CMI).

Selon les concentrations de gentamicine et de linézolide prises en compte, on peut donc conclure :

que le linézolide inhibe la bactéricidie induite par la gentamicine (avec de fortes concentrations des deux antibiotiques) ;

que la gentamicine à forte concentration induit une bactéricidie en association au linézolide à faible concentration.

6.12 COMPARAISON DE LA SURVIE DES SOURIS NON TRAITEES INFECTEES PAR *S. EPIDERMIDIS* ET *S. PNEUMONIAE*

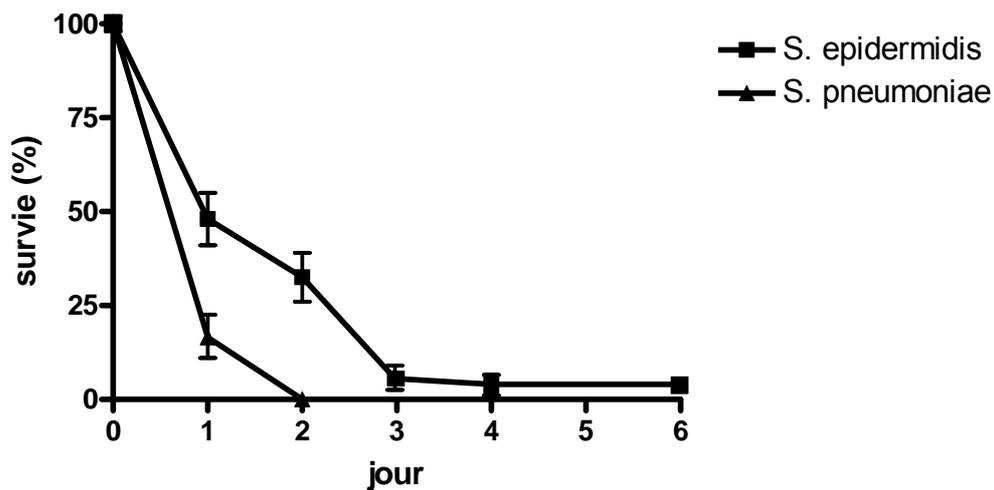
Méthode

La mortalité des souris des groupes contrôles, toutes souches confondues, a été comparée selon la bactérie inoculée, à savoir *S. epidermidis* et *S. pneumoniae*. Pour cela, les courbes de survie ont été comparées par test du Logrank (GraphPad Prism 4.00, GraphPad Softwares, San Diego, Californie).

Résultats

La durée médiane de survie est de 1 jour dans les deux groupes. Néanmoins, les souris infectées par *S. pneumoniae* meurent plus vite que celles infectées par *S. epidermidis* (figure, $p < 0.0001$).

Figure. Survie des souris non traitées infectées par *S. epidermidis* et *S. pneumoniae*



7. Références

Ackermann 2003. Ackermann G, Rodloff AC. Drugs of the 21st century: telithromycin (HMR 3647)—the first ketolide. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51:497-511.

Andes 2002. Andes D, Craig WA. Pharmacodynamics of the New Fluoroquinolone Gatifloxacin in Murine Thigh and Lung Infection Models. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1665-70.

Andes 2003. Andes D, Craig WA. Pharmacodynamics of the New Des-F(6)-Quinolone Garenoxacin in a Murine Thigh Infection Model. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47 : 3937-41.

Angot 2000. Angot P, Vergnaud M, Auzou M et coll. Macrolide Resistance Phenotypes and Genotypes in French Clinical Isolates of *S. pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19:755-8.

Arciola 2001. Arciola RC, Baldassarri L, Montanaro L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol* 2001 ; 39 : 2151-2156.

Asseray 2002. Asseray N, Caillon J, Roux N et coll. Different aminoglycoside-resistant phenotypes in a rabbit *S. aureus* endocarditis infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2002 ; 46 : 1591-3.

Asseray 2005. Asseray N, Jacqueline C, Le Mabecque V et coll. Activity of Glycopeptides against *S. aureus* Infection in a Rabbit Endocarditis Model: MICs Do Not Predict *In vivo* Efficacy. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 ; 49 : 857-9.

Aubry-Damon 1997. Aubry-Damon H, Legrand P, Brin-Buisson P et coll. Reemergence of Gentamicin-Susceptible Strains of Methicillin-Resistant *S. aureus*: Roles of an Infection Control Program and Changes in Aminoglycoside Use. *Clin Infect Dis* 1997 ; 25 : 647-53.

Azoulay-Dupuis 2000. Azoulay-Dupuis E, Rieux V, Muffat-Joly M et coll. Relationship between Capsular Type, Penicillin Susceptibility, and Virulence of Human *S. pneumoniae* Isolates in Mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1575-77.

Batard 2001. Batard E. Contribution à l'étude de l'activité bactéricide de la vancomycine, *in vitro* et *vivo*. A propos de deux souches de *S. aureus*. Thèse médecine, Nantes, 2001.

Bédos 1991. Bédos JP, Rolin O, Bouanchaud DH et coll. Relation entre virulence et résistance aux antibiotiques des pneumocoques. *Pathol Biol* 1991 ; 39 : 984-90.

Bernard 2004. Bernard L, Vaudaux P, Rohner P et coll. Comparative analysis and validation of different assays for glycopeptide susceptibility among methicillin-resistant *S. aureus* strains. *J Microbiol Methods* 2004; 57: 231-9.

Bertin 2004. Bertin M, Muller A, Bertrand X et coll. Relationship between glycopeptide use and decreased susceptibility to teicoplanin in isolates of coagulase-negative staphylococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004 ; 23 : 375-9

Bertrand 2000. Bertrand X, Thouverez M, Talon D. Antibiotic susceptibility and genotypic characterization of methicillin-resistant *S. aureus* strains in eastern France. *J Hosp Infect* 2000 ; 46 : 280-7.

Bertrand 2002. Bertrand X, Lallemand S, Thouverez S et coll. Bactériémies liées aux staphylocoques à coagulase négative : incidence, niveau de résistance à la teicoplanine et épidémiologie moléculaire. *Pathol Biol* 2002 ; 50 : 552-9.

Bertrand 2004. Bertrand X, Claude B, Chantelat P et coll. Surveillance régionale de l'évolution de *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) : quels résultats pour quels enseignements ? *Méd Mal Infect* 2004 ; 34 : 264–269.

Bertrand 2004 bis. Bertrand X, Muller A, Thouverez M, Talon D. Retour vers la sensibilité aux antibiotiques des souches de *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) : relation entre génotype et antibiotype. *Pathol Biol* 2004 ; 52 : 480-5.

Best 1974. Best GK, Best NH, Koval AV. Evidence for participation of autolysins in bactericidal action of oxacillin on *S. aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1974; 6 : 825-830.

Biavasco 1992. Biavasco F, Lupidi R, Varaldo PE. *In vitro* activities of three semisynthetic amide derivatives of teicoplanin, MDL 62208, MDL 62211, and MDL 62873. *Antimicrobial Agents Chemother* 1992 ; 36:331–338.

Biavasco 2000. Biavasco F, Vignaroli C, Varaldo PE. Glycopeptide Resistance in Coagulase-Negative Staphylococci. *Eur J Clin Microbiol* 2000; 19 : 403-417.

Bingen 2003. Bingen E, Doit C, Loukil C et coll. Activity of Telithromycin against Penicillin-Resistant *S. pneumoniae* Isolates Recovered from French Children with Invasive and Noninvasive Infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:2345-7.

Bismuth 1990. Bismuth R, Caillon J. staphylocoques. *In Courvalin P, Drugeon H, Flandrois JP, Goldstein F. Bactéricidie. Maloine, Paris, 1990.*

Blaser 1995. Blaser J, Vergères P, Widmer AF et coll. *In vivo* verification of *in vitro* model of antibiotic treatment of device-related infection. *Antimicrob Agents Chemother* 1995 ; 39 :1134-1139.

Boisson 2002. Boisson K, Thouverez M, Talon D et coll. Characterisation of Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Blood Infections: Incidence, Susceptibility to Glycopeptides, and Molecular Epidemiology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21 : 660-5.

Bolstrom 2002. Bolmstrom A, Karlsson A. Influence of CO₂ incubation on quinolone activity against *S. pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 42:65-9.

Bottcher 2004. Bottcher T, Ren H, Goiny M et coll. Clindamycin is neuroprotective in experimental *S. pneumoniae* meningitis compared with ceftriaxone. J Neurochem 2004; 91:1450-60.

Bozdogan 2003. Bozdogan B, Esel D, Whitener C, Browne FA, Appelbaum PC. Antibacterial susceptibility of a vancomycin-resistant *S. aureus* strain isolated at the Hershey Medical Center. J Antimicrob Chemother 2003; 52:864–8.

Branger 2001. Branger B, Bussy-Malgrange V, Carbonne A et coll. Bactériémies nosocomiales en France : résultats des données de surveillance des centres de coordination de la lutte contre les infections nosocomiales (C.CLIN). Bull Epidémiol Hebd 2001 ; 50.

Bryskier 1999. Bryskier A. Evolution de la chimiothérapie antibactérienne. In Bryskier A. Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques, pp 35-53, Ellipses, Paris, 1999.

Brueggemann 1997. Brueggemann AB, Kugler KC, Doern GV. *In vitro* activity of BAY 12-8039, a novel 8-methoxyquinolone, compared to activities of six fluoroquinolones against *S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis*. Antimicrob. Agents Chemother. 1997; 41:1594–1597.

Brun-Buisson 1998. Brun-Buisson C. Les *S. aureus* résistants à la méthicilline : évolution et épidémiologie, impact clinique, prévention. Pathol Biol 1998 ; 46 : 227-34.

BSAC 2003. Disc diffusion method for antimicrobial susceptibility testing. Version 2.1.4 mai 2003. [Online.] <http://www.bsac.org.uk/uploads/may%202003susceptibility1.pdf>. Accédé le 10 mai 2003.

BSAC 2005. BSAC Disc Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing. http://bsac.test.tmg.co.uk/_db/_documents/version_4_january_2005_final_NH_april_2.pdf, accédé le 2/06/05.

Calain 1987. Calain P, Krause KH, Vaudaux P et coll. Early termination of a prospective, randomised trial comparing teicoplanin and flucloxacillin for treating severe staphylococcal infections. J Infect Dis 1987; 155:187–91.

Candiani 1999. Candiani G, Abbondi M, Borgonovi M et coll. In-vitro and in-vivo antibacterial activity of BI-397, a new semi-synthetic glycopeptide antibiotic. J Antimicrob Chemother 1999 ; 44 : 179-92.

Cantoni 1990. Cantoni L, Glauser MP, Bille J. Comparative Efficacy of Daptomycin, Vancomycin, and Cloxacillin for the Treatment of *S. aureus* Endocarditis in Rats and Role of Test Conditions in This Determination. Antimicrob Agents Chemother 1990 ; 34 : 2348-53.

Cargill 2005. Cargill JS, Upton M. Low levels of vancomycin increase the density of *S. epidermidis* biofilms. 15th European Congress on Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Copenhagen, 2-5 avril 2005, poster P1641.

Carricajo 2001. Carricajo A, Mallaval FO, Fonsale N, Vautrin AC, Aubert G. Recherche des souches de *Staphylococcus aureus* de sensibilité diminuée aux glycopeptides dans un hôpital universitaire (juin 1999–février 2000). *Méd Mal Infect* 2001; 31: 683–684.

Cartolano 2004. Cartolano GL, Cheron M, Benabib D et coll. Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) with reduced susceptibility to glycopeptides (GISA) in 63 French general hospitals. *Clin Microb Infect* 2004 ; 10 : 448-51.

CASFM 2004. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Communiqué 2004. <http://www.sfm-asso.fr/nouv/general.php?pa=5>, accédé le 15/06/2005.

CASFM 2005. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Communiqué 2005. <http://www.sfm-asso.fr/nouv/general.php?pa=2>, accédé le 15/06/2005.

Chambers 1988. Chambers HF. Methicillin-resistant *Staphylococci*. *Clin Microbiol Rev* 1988 ; 1 : 173-86.

Chambers 1999. Chambers HF, Liu XQ, Chow LL et coll. Efficacy of Levofloxacin for Experimental Aortic-Valve Endocarditis in Rabbits Infected with Viridans Group *S. or S. aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43 : 2742-6.

Chang 2003. Chang S, Sievert DM, Hageman JC, et al. Infection with vancomycin resistant *S. aureus* containing the *vanA* resistance gene. *N Engl J Med* 2003; 348:1342–7.

Chesneau 2000. Chesneau O, Morvan A, El Sohl N. Retrospective screening for heterogeneous vancomycin resistance in diverse *S. aureus* clones disseminated in French hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45: 887-90.

Chomarat 1991. Chomarat M, Espinouse D, Flandrois JP. Coagulase-negative staphylococci emerging during teicoplanin therapy and determination of their sensitivity. *J Antimicrob Chemother* 1991 ; 27 : 475-480.

Chomarat 1997. Chomarat M, Chollet L, Peyret M et coll. Influence of atmospheric conditions during incubation on the susceptibilities of *S. pneumoniae* isolates to five b-lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 1997; 40:599–601.

Christensen 1982. Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL et al. Adherence of slime-producing strains of *S. epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun* 1982 ;37 :318-316.

Clarebout 2004. Clarebout G, Nativelle E, Bozdogan B et coll. Bactericidal activity of quinupristin-dalfopristin against strains of *S. aureus* with the MLSB phenotype of

resistance according to the *erm* gene type. Int J Antimicrob Agents 2004 ; 24 : 444-9.

Climo 1999. Climo MW, Patron RL, Archer GL. Combinations of vancomycin and β -lactams are synergistic against Staphylococci with reduced susceptibility to vancomycin. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43 : 1747-53.

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

Contrepois 1999. Contrepois A, Moulin AM. Early history of animal models of infection. In Zak O, Sande MA. Handbook of animal models of infection, pp 3-8. Academic Press, Londres, 1999.

Cosgrove 2003. Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN et coll. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *S. aureus* bacteremia : a meta-analysis. Clin Infect Dis 2003; 36 : 53-9.

Cosgrove 2004. Cosgrove SE, Carroll KC, Perl TM. *S. aureus* with Reduced Susceptibility to Vancomycin. Clin Infect Dis 2004; 39:539-45.

Costerton 1999. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms : a common cause of persistent infections. Science 1999 ; 284 : 1318-1322.

Craig 1998. Craig WA. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Parameters: Rationale for Antibacterial Dosing of Mice and Men. Clin Infect Dis 1998 ; 26 : 1-12.

Craig 2003. Basic pharmacodynamics of antibacterials with clinical applications to the use of β -lactams, glycopeptides and linezolid. Infect Dis Clin North Am 2003 ; 17 : 479-501.

Decousser 2003. Decousser JW, Pina P, Delalande C et coll. Frequency of isolation and antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infections : a French prospective national survey. J Antimicrob Chemother 2003 ; 51 : 1213-22.

Decousser 2004. Decousser JW, Pina P, Viguier F et coll. Invasive *S. pneumoniae* in France: Antimicrobial Resistance, Serotype, and Molecular Epidemiology Findings from a Monthly National Study in 2000 to 2002. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48:3636-9.

Desbiolles 2001. Fractional maximal effect method for in vitro synergy between amoxicillin and ceftriaxone and between vancomycin and ceftriaxone against *Enterococcus faecalis* and penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2001 ; 45 : 3328-33.

Den Hollander 1998. Den Hollander JG, Knudsen JD, Mouton JW et coll. Comparison of Pharmacodynamics of Azithromycin and Erythromycin *In vitro* and *In vivo*. Antimicrob Agents Chemother 1998 ; 42 : 377-82.

Denny 1979. Denny AE, Peterson LR, Gerding DA et al. Serious staphylococcal infections with strains tolerant to bactericidal antibiotics. Arch Intern Med 1979 ; 139 :1026-1031.

Domart 1997. Domart Y. Thérapeutique des infections à *S. aureus* résistant à la méticilline (SAMR). Med Mal Infect 1997 ; 27, spécial : 241-51.

Domenech 2004. Domenech A, Ribes S, Cabellos C et coll. A mouse peritonitis model for the study of glycopeptide efficacy in GISA infections. *Microb Drug Resist* 2004 ;10:346-53 .

Drago 2005. Drago L, Nicola L, De Vecchi E et coll. Evaluation of synergy between glycopeptides, levofloxacin and beta-lactams against methicillin-resistant *S. aureus*. 15th European Congress on Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Copenhagen, 2-5 avril 2005, poster P1215.

Drugeon 2003. Drugeon HB, Juvin M, Batard E et coll. Influence of CO₂ on telithromycin MICs when *S. pneumoniae* isolates are resistant to macrolides by methylase production. 43rd ICAAC Abstracts, American Society for Microbiology, september 2003, page 100.

Drugeon 2003 bis. Drugeon HB, Juvin ME, Bensalah A et coll. Épidémiologie de la résistance aux antibiotiques des pathogènes respiratoires en France en 2000-2001 ; apport de la télithromycine. Méd Mal Infect 2003 ; 33 : 104-9.

Ducki 2004. Ducki S, Blech MF. Surveillance des bactéries multirésistantes en Lorraine : étude d'incidence multicentrique de trois ans. Méd Mal Infect 2004 ; 34 : 70-75.

Eliopoulos 1988. Eliopoulos GM, Eliopoulos CT. Antibiotic combinations : should they be tested ? Clin Microb Rev 1988 ; 1 : 139-56.

Eliopoulos 1996. Eliopoulos GM, Moellering Jr RC. 1996. Antimicrobial combinations, p 330-396. In Lorian V (Ed.). Antibiotics in laboratory medicine, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 4^{ème} édition.

Elliott 2004. Elliott TSJ, Foweraker J, Gould FK et coll. Guidelines for the antibiotic treatment of endocarditis in adults: report of the Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. J Antimicrob Chemother 2004 ; 54 : 971-81.

Elouennass 2004. Elouennass M, Foissaud V, Trueba F et coll. Étude sur sept ans des isolats d'hémocultures dans un service d'hématologie clinique. Med Mal Infect 2004 ; 34 : 62-9.

Entenza 1995. Entenza JM, Drugeon H, Glauser MP, Moreillon P. Treatment of experimental endocarditis due to erythromycin-susceptible or -resistant methicillin-resistant *S. aureus* with RP 59500. Antimicrob Agents Chemother 1995 ; 39 : 1419-1424.

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

Fantin 1994. Fantin B, Leclercq R, Ottoviani M et coll. *In vivo* activities and penetration of the two components of RP59500 in cardiac vegetations of experimental endocarditis. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38: 432-437.

Fantin 1995. Fantin B, Leclercq R, Merlé Y, Saint-Julien L, Veyrat C, Duval J, Carbon C. 1995. Critical influence of resistance to streptogramin B-type antibiotics on activity of RP59500 (quinupristin-dalfopristin) in experimental endocarditis due to *S. aureus*. Antimicrob Agents Chemother 39 : 400-405.

Fasching 1990. Fasching CE, Peterson LR, Moody JA et coll. Treatment evaluation of experimental staphylococcal infections : comparison of β -lactam, lipopeptide, and glycopeptide antimicrobial therapy. J Lab Clin Med 1990 ; 116 : 697-706.

- Fasola 1997. Fasola EL, Bajaksouzian S, Appelbaum PC et coll. Variation in Erythromycin and Clindamycin Susceptibilities of *S. pneumoniae* by Four Test Methods. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41: 129-134.
- Fass 1991. Fass RJ. *In vitro* activity of RP 59500, a semisynthetic injectable pristinamycin, against Staphylococci, Streptococci, and Enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1991 ; 35 : 553-559.
- Fischer 2005. Fischer RL, Frimodt-Moller N. Interaction between penicillin and erythromycin treatment on *S. pneumoniae* in a murine pneumonia model. 15th European Congress on Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Copenhagen, 2-5 avril 2005, poster P1747.
- Flanagan 1998. Flanagan PG, Paull A. Carbon dioxide requirements of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother* 1998; 48 : 669-670.
- Fluit 2004. Fluit AC, Schmitz FJ, Verhoef J et coll. Daptomycin *in vitro* susceptibility in European Gram-positive clinical isolates. *Intern J Antimicrob Agents* 2004 ; 24 : 59-66.
- Ford 1996. Ford CW, Hamel JC, Wilson DM et coll. *In vivo* Activities of U-100592 and U-100766, Novel Oxazolidinone Antimicrobial Agents, against Experimental Bacterial Infections. *Antimicrob Agents Chemother* 1996 ; 40 : 1508-13.
- Frimodt-Moller 1993. Frimodt-Moller N. The mouse peritonitis model: present and future use. *J Antimicrob Chemother* 1993; 31, suppl. D, 55-60.
- Fuchs 2000. Fuchs PC, Barry AL, Brown SD. Bactericidal Activity of Quinupristin-Dalfopristin against *S. aureus*: Clindamycin Susceptibility as a Surrogate Indicator. *Antimicrob Agents Chemother* 2000 ; 44 : 2880-2.
- Fuchs 2001. Fuchs PC, Barry AL, Brown SD. Interactions of quinupristin-dalfopristin with eight other antibiotics as measured by time-kill studies with 10 strains of *S. aureus* for which quinupristin-dalfopristin alone was not bactericidal. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45 : 2662-5.
- Gaillat 1998. Gaillat J. Epidémiologie des infections systémiques à *S. pneumoniae*. *Presse Méd* 1998 ; 27, suppl. : S9-S16.
- Geslin 1998. Geslin P, Frémaux A, Sissia G et coll. *S. pneumoniae* : sérotypes, souches invasives et résistantes aux antibiotiques. Situation actuelle. *Presse Med* 1998 ; 27, suppl 1 : 21-27.
- Gilbert 1991. Gilbert DN, Wood CA, Kimvrough RC et coll. Failure of treatment with teicoplanin at 6 milligrams/kilogram/day in patients with *S. aureus* intravascular infection. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 79-87.

Goessens 1982. Goessens WHF, Fontjine P, Michel MF. Factors influencing detection of tolerance in *S. aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1982 ; 22 : 364-368.

Goessens 1984. Goessens WHF, Fontjine P, van Raffe M et coll. Tolerance percentage as a criterion for the detection of tolerant *S. aureus* strains. Antimicrob Agents Chemother 1984 ;25 :575-578.

Goldstein 1990. Goldstein FW, Coutrot A, Sieffer A et coll. Percentages and distribution of teicoplanin- and vancomycin-resistant strains among coagulase-negative Staphylococci. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34: 899-900.

Goldstein 1995. Goldstein BP, Candiani G, Arain TM et coll. Antimicrobial Activity of MDL 63,246, a New Semisynthetic Glycopeptide Antibiotic. Antimicrob Agents Chemother 1995 ; 39 : 1580-8.

Gonzalez 1999. Gonzalez C, Rubio M, Romero-Vivas J et coll. Bacteremic Pneumonia Due to *S. aureus*: A Comparison of Disease Caused by Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Organisms. Clin Infect Dis 1999 ; 29 : 1171-7.

Gopal 1976. Gopal V, Bisno AL, Sierblatt FJ. Failure of vancomycin treatment in *S. aureus* endocarditis. *In vivo* and *in vitro* observations. JAMA 1976; 236 :1604 – 606.

Goto 1999. Goto Y, Hiramatsu K, Nasu M. Improved efficacy with nonsimultaneous administration of netilmicin and minocycline against methicillin-resistant *S. aureus* in *in vitro* and *in vivo* models. Int J Antimicrob Agents 1999 ; 11 : 39-46.

Gristina 1989. Gristina AG, Jennings RA, Naylor PT et al. Comparative *in vitro* antibiotic resistance of surface-colonizing coagulas-negative staphylococci. Antimicrob Agents Chemother 1989 ; 33 :813-816.

Grohs 2003. Grohs P, Kitzis MD, Gutmann L. *In vitro* Bactericidal Activities of Linezolid in Combination with Vancomycin, Gentamicin, Ciprofloxacin, Fusidic Acid, and Rifampin against *S. aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47 : 418-20.

Guérin 2000. Guerin F, Buu-Hoi A, Mainardi JL et al. Outbreak of methicillin-resistant *S. aureus* with reduced susceptibility to glycopeptides in a Parisian hospital. J Clin Microbiol 2000; 38: 2985–2988.

Gutmann 1990. Gutmann L, Pierre J. Tolérance aux beta-lactamines. In Courvalin P, Drugeon H, Flandrois JP, Goldstein F. Bactéricidie. Paris ; Maloine : 1990. p 183-186.

Hamilton-Miller 1997. Hamilton-Miller JMT, Shah S. Activity of quinupristin/dalfopristin against *S. epidermidis* in biofilms: a comparison with ciprofloxacin. J Antimicrob Chemother 1997 ; 39, suppl. A : 103-108.

Hamilton-Miller 1999. Hamilton-Miller JMT, Shah S. Susceptibility testing of linezolid by two standard methods. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1999 ; 18:225–227.

Hamilton-Miller 2001. Hamilton-Miller JMT, Shah S, Loebenberg D. Susceptibility of pneumococci to evernimicin : effect of CO₂ and different methodologies. Clin Microbiol. Infect. 2001 ; 7 : 339-340.

Handwerger 1986. Handwerger S, Tomasz A. Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. Rev Infect Dis 1986 ; 7 : 368-386.

Harms 2004. Harms JM, Schlünzen F, Fucini P et coll. Alteration at the peptidyl transferase centre of the ribosome induced by the synergistic action of the streptogramins dalfofpristin and quinupristin. BMC Biology 2004; 2:4 (<http://www.biomedcentral.com/1741-7007/2/4>)

Herndon 2000. Herndon BL, Bialkowska–Hobrzanska H, Dall L. Molecular characterization and LD50 identify virulent isolates of *S. epidermidis* from adult sepsis. Diagn Microbiol Infect Dis 2000 ; 36 : 75–80.

Hiramatsu 1997. Hiramatsu K, Hanaki T, Ino T et coll. Methicillin-resistant *S. aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. J Antimicrob Chemother 1997; 40: 135-6.

Hiramatsu 2001. Hiramatsu K. Vancomycin-resistant *S. aureus*: a new model of antibiotic resistance. Lancet Infect Dis 2001 ; 1 : 147-55.

Jacqueline 2003. Jacqueline C, Caillon J, Le Mabecque V et coll. *In vitro* activity of linezolid alone and in combination with gentamicin, vancomycin or rifampicin against methicillin-resistant *S. aureus* by time-kill methods. J Antimicrob Chemother 2003; 51 : 857-864.

Jacqueline 2004. Jacqueline C, Asseray N, Batard E et coll. *In vivo* efficacy of linezolid in combination with gentamicin for the treatment of experimental endocarditis due to methicillin-resistant *S. aureus*. Int J Antimicrob Agents 2004 ; 24 : 393-6.

Jacqueline 2005. Jacqueline C, Navas D, Batard E et coll. *In vitro* and *In vivo* Synergistic Activities of Linezolid Combined with Subinhibitory Concentrations of Imipenem against Methicillin-Resistant *S. aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2005 ; 49 : 45-51.

Johansen 2000. Johansen HK, Jensen TG, Dessau RB et coll. Antagonism between penicillin and erythromycin against *S. pneumoniae* *in vitro* and *in vivo*. J Antimicrob Chemother 2000; 46 : 973-80

Johnson CJ 1996. Johnson CJ. *In vitro* testing: correlations of bacterial susceptibility, body fluid levels, and effectiveness of antibacterial therapy. In Lorian V. Antibiotics in laboratory medicine, 4ème éd, 1996, Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, USA.

Johnson J 1999. Johnson J, Bouchillon S, Pontani D. The effect of carbon dioxide on susceptibility testing of azithromycin, clarithromycin and roxithromycin against clinical isolates of *S. pneumoniae* and *S. pyogenes* by broth microdilution and the Etest : Artemis Project – first-phase study. Clin. Microbiol. Infect. 1999; 5 : 327-330.

Johnson MM 1999. Johnson MM, Hill SL, Piddock LJV. Effect of Carbon Dioxide on Testing of Susceptibilities of Respiratory Tract Pathogens to Macrolide and Azalide Antimicrobial Agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999; 43 : 1862-1865.

Jones 1992. Jones RN. Coagulase-negative staphylococci emerging during teicoplanin therapy and problems in the determination of their sensitivity. *J Antimicrob Chemother* 1992 ; 29 : 725-6.

Kaatz 1990. Kaatz GW, Seo SM, Dorman NJ et coll. Emergence of teicoplanin resistance during therapy of *S. aureus* endocarditis. *J Infect Dis* 1990; 162: 103-8.

Kahne 2005. Kahne D, Leimkuhler, Lu W et coll. Glycopeptide and Lipoglycopeptide Antibiotics. *Chem. Rev.* 2005, 105, 425-448.

Kang 1997. Kang SL, Rybak MJ. *In vitro* bactericidal activity of quinupristin/dalfopristin alone and in combination against resistant strains of *Enterococcus species* and *S. aureus*. *J Antimicrob Chemother* 1997 ; 39, suppl A : 33-39.

Kennedy 1996. Kennedy HF, Seal DV. Influence of inoculum, medium and serum on the *in vitro* susceptibility of coagulase-negative staphylococci to teicoplanin and vancomycin. *J Antimicrob Chemother* 1996; 37: 1103-9.

Knudsen 1995. Knudsen JD, Frimodt-Moller N, Espersen F. Experimental *S. pneumoniae* Infection in Mice for Studying Correlation of *In vitro* and *In vivo* Activities of Penicillin against Pneumococci with Various Susceptibilities to Penicillin. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1253-8.

Knudsen 1997. Knudsen JD, Fursted K, Frimodt-Moller N et coll. Comparison of the effect of cefepime with four cephalosporins against pneumococci with various susceptibilities to penicillin, *in vitro* and in the mouse peritonitis model. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40: 679-86.

Konig 2001. Konig C, Schwank S, Blaser J. Factors Compromising Antibiotic Activity Against Biofilms of *S. epidermidis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001 ; 20 : 20-6.

Laurans 2001. Laurans G, Murbach V, Cattier B et coll. Observatoires régionaux du pneumocoque : Surveillance de la sensibilité aux antibiotiques des pneumocoques isolés en situation pathogène en France en 1999. *BEH* 2001; n°33.

Leclercq 2002. Leclercq R, Courvalin P. Resistance to macrolides and related antibiotics in *S. pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46 : 2727-34.

Leclercq 2002 bis. Leclercq R. Mechanisms of Resistance to Macrolides and Lincosamides: Nature of the Resistance Elements and Their Clinical Implications. *Clin Infect Dis* 2002 ; 34 : 482-92.

Leclercq 2003. Leclercq R, Drugeon H, Coquemont M. Increased MICs of Telithromycin in the Presence of CO₂ against Strains of *S. pneumoniae* with *erm(B)*:

Analysis of Causative Factors. Abstract: C1-2122, 43rd ICAAC Abstracts, American Society for Microbiology, September, 2003, abstract C1-2122, p 100.

Leclercq 2003 bis. Leclercq R, Soussy CJ, Weber P et coll. Activité *in vitro* de la pristinamycine vis-à-vis des staphylocoques isolés dans les hôpitaux français en 1999–2000. *Pathol Biol* 2003 ; 51 : 400-4.

Lefort 2004. Lefort A, Pavie J, Garry L et coll. Activities of Dalbavancin *In vitro* and in a Rabbit Model of Experimental Endocarditis Due to *S. aureus* with or without Reduced Susceptibility to Vancomycin and Teicoplanin. *Antimicrob Agents Chemother* 2004 ; 48 : 1061-4.

Lelièvre 1999. Lelièvre H, Lina G, Jones ME et coll. Emergence and Spread in French Hospitals of Methicillin-Resistant *S. aureus* with Increasing Susceptibility to Gentamicin and Other Antibiotics. *J Clin Microbiol* 1999;37:3452-7.

Lemaître 1998. Lemaître N, Sougakoff W, Masmoudi A, Fievet MH, Bismuth R, Jarlier V. Characterization of Gentamicin-Susceptible Strains of Methicillin-Resistant *S. aureus* Involved in Nosocomial Spread. *J Clin Microbiol* 1998 ; 36 : 81-5.

Lepper 1951. Lepper MH, Dowling HF. Treatment of pneumococcal meningitis with penicillin compared with penicillin plus aureomycin. *AMA Archives of internal medicine* 1951 ; 88 : 489-94.

Lewis 2001. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2001 ; 45 : 999-1007.

Lina 1999. Lina G, Quaglia A, Reverdy ME et coll. Distribution of Genes Encoding Resistance to Macrolides, Lincosamides, and Streptogramins among Staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43 : 1062-6.

Liu 2003. Liu C, Chambers HF. *S. aureus* with Heterogeneous Resistance to Vancomycin: Epidemiology, Clinical Significance, and Critical Assessment of Diagnostic Methods. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3040-5.

Lonks 1993. Lonks JR, Medeiros AA. High rate of erythromycin and clarithromycin resistance among *S. pneumoniae* isolates from blood cultures from Providence, R.I. *Antimicrob Agents Chemother* 1993 ; 37 : 1742-1745.

Lorian 1988. Lorian V. Differences between *in vitro* and *in vivo* studies. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32: 1600-1.

Louie 2001. Louie A, Kaw P, Liu W et coll. Pharmacodynamics of Daptomycin in a Murine Thigh Model of *S. aureus* Infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2001 ; 45 : 845 – 851.

Mah 2001. Mah TFC, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 2001; 9: 34-9.

Mainardi 1995. Mainardi JL, Shlaes DM, Goering RV et coll. Decreased teicoplanin susceptibility of methicillin-resistant strains of *S. aureus*. *J Infect Dis* 1995: 171 : 1646-50.

Mallaval 2004. Mallaval FO, Carricajo A, Delavenna F et coll. Detection of an outbreak of methicillin resistant *S. aureus* with reduced susceptibility to glycopeptides in a French hospital. Clin Microb Infect 2004 ; 10 : 459-61.

Mandell 2003. Mandell LA, Bartlett JG, Dowell SF et coll. Update of practice guidelines for the management of community-acquired pneumonia in immunocompetent adults. Clin Infect Dis 2003 ; 37 : 1405-1433.

Martin 2004. Martin C. Hétérogénéité des milieux géloses cœur – cerveau (BHI) : effets sur la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) à la vancomycine et à la teicoplanine des souches de *S. aureus*. Pathol Biol 2004 ; 52 : 450-454.

Maugein 2003. Maugein J, Guillemot D, Dupont MJ et coll. Clinical and microbiological epidemiology of *S. pneumoniae* in eight french counties. Clin Microbiol Infect 2003; 9: 280-8.

May 1998. May J, Shannon K, King A et coll. Glycopeptide tolerance in *S. aureus*. J Antimicrob Chemother 1998 ; 42 : 189-197.

Mingeot-Leclercq 1999. Mingeot-Leclercq P, Glupczynski Y, Tulkens PM. 1999. Aminoglycosides : activity and resistance. Antimicrob Agents Chemother 43 : 727-737.

Moine 1997. Moine P, Mazoit JX, Bédos JP et coll. Correlation Between *In vitro* and *In vivo* Activity of Amoxicillin Against *S. pneumoniae* in a Murine Pneumonia Model. J Pharmacol Exp Ther 1997 ; 280 : 310-5.

Moise-Broder 2004. Moise-Broder P, Sakoulas G, Eliopoulos GM et coll. Accessory Gene Regulator Group II Polymorphism in Methicillin-Resistant *S. aureus* Is Predictive of Failure of Vancomycin Therapy. Clin Infect Dis 2004 ; 38 : 1700-5.

Molnar 1992. Molnar C, Hevessy Z, Pappne Falusi E et coll. [Study of the virulence of coagulase-negative staphylococci in experimental infections.] Orv Hetil 1992 ; 133 : 1685-8.

Monzon 2002. Monzon M , Oteiza C, Leiva J et coll. Biofilm testing of *S. epidermidis* clinical isolates: low performance of vancomycin in relation to other antibiotics. Diagn Microbiol Infect Dis 2002 ; 44 : 319-24.

Mouton 2003. Mouton JW. Impact of pharmacodynamics on breakpoint selection for susceptibility testing. Infect Dis Clin North Am 2003 ; 17 : 579-98.

O'Connell 1993. O'Connell B, Browne PV, Cafferkey MT et coll. Coagulase-negative staphylococcal bacteraemia treated with teicoplanin. J Antimicrob Chemother 1993 ; 31 : 438-9.

Odds 2003. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. J Antimicrob Chemother 2003 ; 52 : 1.

- Odenholt 2003. Odenholt I, Lowdin E, Cars O. *In vitro* studies of the pharmacodynamics of teicoplanin against *S. aureus*, *S. epidermidis* and *Enterococcus faecium*. Clin Microbiol Infect 2003; 9 : 930-7.
- Ostergaard 2003. Ostergaard C, Yieng-Cow RV, Knudsen JD et coll. Evaluation of fusidic acid in therapy of experimental *S. aureus* meningitis. J Antimicrob Chemother 2003; 51: 1301-5.
- Ostergaard 2004. Ostergaard C, Brandt C, Konradsen HB et coll. Differences in survival, brain damage, and cerebrospinal fluid cytokine kinetics due to meningitis caused by 3 different *S. pneumoniae* serotypes: evaluation in humans and in 2 experimental models. J Infect Dis. 2004; 190:1212-20.
- Pascual 1994. Pascual A, Ramirez de Arellano E, Perea EJ. Activity of glycopeptides in combination with amikacin or rifampicin against *S. epidermidis* biofilms on plastic catheters. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994 ; 13 : 515-517.
- Pavie 2002. Pavie J, Lefort A, Zarrouk V et coll. Efficacies of Quinupristin-Dalfopristin Combined with Vancomycin *In vitro* and in Experimental Endocarditis Due to Methicillin-Resistant *S. aureus* in Relation to Cross-Resistance to Macrolides, Lincosamides, and Streptogramin B Type Antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46 : 3061-4.
- Pavie 2003. Pavie J, Lefort A, Ploy MC et coll. Influence of Reduced Susceptibility to Glycopeptides on Activities of Vancomycin and Teicoplanin against *S. aureus* in Experimental Endocarditis. Antimicrob Agents Chemother 2003 ; 47 : 2018-21.
- Pflouffe 2004. Pflouffe JF, Martin DR. Re-evaluation of the therapy of severe pneumonia caused by *S. pneumoniae*. Infect Dis Clin North Am 2004 ; 18 : 963-974.
- Pina 2000. Pina P, Marliere C, Vandenesch F et coll. An Outbreak of *S. aureus* Strains with Reduced Susceptibility to Glycopeptides in a French General Hospital. Clin Infect Dis 2000 ; 31:1306-1308.
- Ploy 1998. Ploy MC, Grelaud C, Martin C et coll. First clinical isolate of vancomycin-intermediate *S. aureus* in a French hospital. Lancet 1998; 351: 1212.
- Poehlsgaard 2003. Poehlsgaard J, Douthwaite S. Macrolide antibiotic interaction and resistance on the bacterial ribosome. Curr Opin Investig Drugs 2003 ; 4 : 140-8.
- Prunier 2002. Prunier AL, Malbruny B, Tandé et coll. Clinical Isolates of *S. aureus* with Ribosomal Mutations Conferring Resistance to Macrolides. Antimicrob Agents Chemother 2002 ; 46 : 3054-6.
- Prunier 2003. Prunier AL, Malbruny B, Laurans M et coll. High Rate of Macrolide Resistance in *S. aureus* Strains from Patients with Cystic Fibrosis Reveals High Proportions of Hypermutable Strains. J Infect Dis 2003; 187 :1709-16.
- Raad 1998. Raad I, Alrahwani A et Rolston K. *S. epidermidis*: Emerging Resistance and Need for Alternative Agents. Clin Infect Dis 1998 ; 26 : 1182-7.

Rajashekaraiah 1980. Rajashekaraiah KR, Rice T, Rao VS et coll. Clinical significance of tolerant strains of *S. aureus* in patients with endocarditis. *Ann Intern Med* 1980 ; 93 : 796-801.

Reverdy 2001. Reverdy ME, Jarraud S, Bobin-Dubreux S et al. Incidence of *S. aureus* with reduced susceptibility to glycopeptides in two French hospitals. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7: 267–272.

Révision de la IV^{ème} conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse de la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF) 2000. Révision de la IV^{ème} conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse de la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF). *Méd Mal Infect* 2000 ; 30 : 566-80.

Roberts 1999. Roberts MC, Sutcliffe J, Courvalin P et coll. Nomenclature for Macrolide and Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B Resistance Determinants. *Antimicrob Agents Chemother* 1999 ; 43 :2823-30.

Rubinstein 1999. Rubinstein E, Carbon C and the Endocarditis Working Group of the International Society of Chemotherapy. Staphylococcal endocarditis – recommendations for therapy. *Clin Microbiol Infect* 1999; 4 : 3S27-3S33.

Sabath 1977. Sabath LD, Wheeler N, Laverdiere M et coll. A new type of penicillin resistance of *S. aureus*. *Lancet* 1977 ; i : 443-447.

Safdar 2004. Safdar N, Andes D, Craig WA. *In vivo* Pharmacodynamic Activity of Daptomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 2004 ; 48 : 63-68.

Sakoulas 2004. Sakoulas G, Moise-Broder PA, Schentag J et coll. Relationship of MIC and Bactericidal Activity to Efficacy of Vancomycin for Treatment of Methicillin-Resistant *S. aureus* Bacteremia. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2398-402.

Sandercock 2002. Sandercock P, Roberts I. Systematic reviews of animal experiments. *Lancet* 2002 ; 360 : 586.

Scaglione 2003. Scaglione F, Mouton JW, Mattina R et coll. Pharmacodynamics of levofloxacin and ciprofloxacin in a murine pneumonia model : peak/concentration/MIC versus area under the curve/MIC ratios. *Antimicrob Agents Chemother* 2003 ; 47 : 2749-55.

Schwank 1998. Schwank S, Rajacic Z, Zimmerli Z et al. Impact of bacterial biofilm formation on *in vitro* and *in vivo* activities of antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1998 ; 42 : 895-898.

Schito 1999. Schito GC, Auckenthaler R, Marchese A et coll. European survey of glycopeptide susceptibility in *S. spp*. *Clin Microbiol Infect*. 1999;5 :547-553.

Sherris 1986. Sherris JC. Problems in *in vitro* determination of antibiotic tolerance in clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 30: 633-7.

Siebor 1993. Siebor E, Kazmierczak A. Factors influencing the activity of macrolide antibiotics *in vitro* (pp 197-203). In Bryskier A, Butzler JP, Neu HC, Tulkens PM, éd. Macrolides. Chemistry, pharmacology and clinical uses. Arnette Blacwell, Paris, 1993.

Sieradzki 1998. Sieradzki K, Villari P, Tomasz A. Decreased Susceptibilities to Teicoplanin and Vancomycin among Coagulase-Negative Methicillin-Resistant Clinical Isolates of Staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 100-7.

Small 1990. Small PM, Chambers HF. Vancomycin for *S. aureus* Endocarditis in Intravenous Drug Users. *Antimicrob Agents Chemother* 1990 ; 34 : 1227-31.

Swartz MN 2004. Bacterial meningitis – a view of the past 90 years. *N Engl J Med* 2004 ; 351 : 1826-1828.

The Microbiology Surveillance Network of Northern France 2002. The Microbiology Surveillance Network of Northern France. Surveillance of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) and Enterobacteriaceae producing extended spectrum β -lactamase (ESBLE) in Northern France: a five-year multicentre incidence study. *J Hosp Inf* 2002; 52: 107-113

Tomasz 1970. Tomasz A, Albino A, Zanati E. Multiple antibiotic resistance in a bacterium with suppressed autolytic system. *Nature* 1970 ; 227 : 138-140.

Tornay 1991. Tornay HL, Balistreri FJ, Kenny MT et coll. Comparative therapeutic efficacy of teicoplanin and vancomycin in normal and neutropenic mice infected with *S. haemolyticus*. *J Antimicrob Chemother* 1991 ; 28 : 261-9.

Tuazon 1984. Tuazon CU, Miller H: Comparative *in vitro* activities of teichomycin and vancomycin alone and in combination with rifampin and aminoglycosides against staphylococci and enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1984; 25:411–412.

Van Bambeke 2004. Cellular pharmacokinetics and pharmacodynamics of the glycopeptide antibiotic oritavancin (LY333328) in a model of J774 mouse macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* 2004 ; 48 : 2853-60.

Van der Auwera 1988. Intraphagocytic penetration of antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1988 ; 22 : 185-192.

Van der Meer-Marquet 2004. Van der Meer-Marquet N, Domelier AS, Girard N et coll. Epidemiology and typing of *S. aureus* strains isolated from bloodstream infections. *J Clin Microbiol* 2004 ; 42 : 5650-7.

Veber 1995. Veber B, Pocardalo JJ. Le cas particulier des azalides : l'antibiodiapédèse. *Pathol Biol* 1995 ; 43 : 524-528.

Vergnaud 2003. Vergnaud M, Bourdon S, Brun M et coll. Observatoires régionaux du pneumocoque : analyse de la résistance aux antibiotiques et des sérotypes de *S. pneumoniae* en 2001. *Bull Epiémiol Hebd* 2003 ; n°37 : 173-176.

Visalli 1997. Visalli MA, Jacobs MR, Appelbaum PC. Susceptibility of Penicillin-Susceptible and -Resistant Pneumococci to Dirithromycin Compared with Susceptibilities to Erythromycin, Azithromycin, Clarithromycin, Roxithromycin, and Clindamycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997; 41 : 1867-1870.

Von Eiff 2002. Von Eiff C, Peters G, Heilmann C. Pathogenesis of infections due to coagulase negative Staphylococci. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 677-85.

Voorn 1991. Voorn GP, Thompson J, Goessens WHF et coll. Role of tolerance in cloxacillin treatment of experimental *S. aureus* endocarditis. *J Infect Dis* 1991 ; 163 :640-643.

Voorn 1994. Voorn GP, Kuyvenhoven J, Goessens WHF et coll. Role of tolerance in treatment and prophylaxis of experimental *S. aureus* endocarditis with vancomycin, teicoplanin and daptomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 1994 ; 38 : 487-493.

Voorn 1994 bis. Voorn GP, Thomsom J, Goessens WHF et coll. Paradoxical dose effect of continuously administered cloxacillin in treatment of tolerant *S. aureus* endocarditis. *J Antimicrob Chemother* 1994 ; 33 : 585-593.

Walsh 2004. Walsh F, Carnegy FF, Willcock J et coll. Comparative *in vitro* activity of telithromycin against macrolide-resistant and -susceptible *S. pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* and *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother* 2004 ; 53 : 793-6.

Watanakunakorn 1985. Watanakunakorn C. Antibiotic tolerance of *S. epidermidis*. *Scand J Infect Dis* 1985 ; 17 : 59-61.

Wheat 2005. Wheat PF. History and Development of Antimicrobial Susceptibility Testing Methodology. http://bsac.test.tmg.co.uk/_db/_documents/Chapter_one.pdf , 2/06/05.

Widmer 1990. Widmer AF, Frei R, Rajacic Z et coll. Correlation between *in vivo* and *in vitro* efficacy of antimicrobial agents against foreign body infections. *J Infect Dis* 1990; 162: 96-102.

Woodford 2005. Woodford N. Biological counterstrike: resistance mechanisms of gram-positive cocci. *Clin Microbiol Infect* 2005 ; 11 (Suppl 3) : S2-S21.

Vuong 2003. Vuong C, Gerke C, Somerville GA et coll. Quorum-sensing control of biofilm factors in *S. epidermidis*. *J Infect Dis* 2003 ;188 :706-18.

Yoshizawa 1998. Yoshizawa S, Fourmy D, Puglisi JD. Structural origins of gentamicin antibiotic action. *EMBO J* 1998; 17:6437-48.

Zak 1999. Zak O, Sande M, O'Reilly T. Introduction : The role of animal models in the evaluation of new antibiotics. *In* Zak O, Sande MA. *Handbook of animal models of infection*, pp xxi – xxiv. Academic Press, Londres, 1999.

Zarrouk 2001. Zarrouk V, Bozdogan B, Leclercq R et coll. Activities of the Combination of Quinupristin-Dalfopristin with Rifampin *In vitro* and in Experimental Endocarditis Due to *S. aureus* Strains with Various Phenotypes of Resistance to Macrolide-Lincosamide- Streptogramin Antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45 : 1244-8.

APPORT DE L'EXPERIMENTATION *IN VITRO* ET *IN VIVO* AU TRAITEMENT DES INFECTIONS GRAVES PAR LES COCCI A GRAM POSITIF.

RESUME

Trois travaux distincts ont été réalisés. Premièrement, nous avons montré que la CMI de la télithromycine augmente si elle est mesurée en CO₂ pour certaines souches de pneumocoque. Cet antibiotique reste actif dans le sepsis de souris sur les souches sensibles en air ambiant et intermédiaires en CO₂. Deuxièmement, nous n'avons pas trouvé de corrélation entre CMI et activité de la teicoplanine dans le sepsis de souris vis-à-vis de 9 souches de *S. epidermidis*, alors que nous avons montré une telle corrélation pour la ciprofloxacine vis-à-vis des mêmes souches. Troisièmement, nous n'avons pas constaté de synergie entre quinupristine-dalfopristine et gentamicine vis-à-vis de deux souches de *S. aureus*, aussi bien *in vitro* que dans l'endocardite expérimentale de lapin. A partir de ces expérimentations est discutée la complexité de la relation entre activités *in vitro* et *in vivo* des antibiotiques.

MOTS-CLES

Concentration Minimale Inhibitrice, Infection expérimentale, Corrélation, *S. pneumoniae*, *S. epidermidis*, *S. aureus*.

CONTRIBUTION OF *IN VITRO* AND *IN VIVO* EXPERIMENTATION TO THE TREATMENT OF SEVERE INFECTIONS DUE TO GRAM POSITIVE COCCI.

SUMMARY

Three distinct experimentations were led. First, we showed that the MIC of telithromycin for some strains of pneumococcus is higher when measured in CO₂ than in ambient air. Telithromycin remains active in the murine sepsis against strains which are susceptible in ambient air and intermediate in CO₂. Second, we did not find a correlation between the MIC and *in vivo* activity of teicoplanin against 9 strains of *S. epidermidis*, whereas we found such a correlation for ciprofloxacin against the same strains. Third, we have found no synergy between quinupristin-dalfopristin and gentamicin against *S. aureus*, *in vitro* and in the rabbit endocarditis model. From this data, we discuss the complexity of the relation between *in vitro* and *in vivo* activities of antibiotics.

KEY WORDS

Minimal Inhibitory Concentration, Experimental infection, Correlation, *S. pneumoniae*, *S. epidermidis*, *S. aureus*.

BATARD Eric

Service des Urgences, CHU de Nantes
44093 Nantes CEDEX 1