

UNIVERSITE DE NANTES  
FACULTE DE MEDECINE

TRAITEMENT DES INFECTIONS  
A STAPHYLOCOQUE DORE  
PAR AMINOSIDES ET GLYCOPEPTIDES :  
MIEUX PREDIRE LE SUCCES OU L'ECHEC.  
APPROCHE EXPERIMENTALE ET *IN VITRO*.

Thèse de Doctorat

Ecole doctorale  
Discipline  
Spécialité

Chimie Biologie  
Biologie Médecine Santé  
Antibiothérapie

Présentée et soutenue publiquement par

Nathalie ASSERAY – MADANI

Le 11 juillet 2006 devant le jury ci dessous

Président  
Rapporteurs

Examineurs  
Directeurs de thèse

Pr JOLY - GUILLOU Marie - Laure  
Pr SOTTO Albert  
Pr DRUGEON Henri - Bernard  
Pr POTEL Gilles  
Dr CAILLON Jocelyne

**Traitement des infections  
à Staphylocoque doré  
par aminosides et glycopeptides :  
Mieux prédire le succès ou l'échec.  
Approche expérimentale et *in vitro*.**

## Sommaire

---

<b>Introduction</b>	p.1
<b>Chapitre I : Les défis posés aujourd'hui par les infections à <i>S.aureus</i></b>	p.2
<b>Partie 1 : Les enjeux cliniques</b>	p.2
<b>Partie 2 : Enjeux thérapeutiques et acquisition de résistances</b>	p.8
<b>Partie 3 : Recommandations et pratiques de traitement dans les infections staphylococciques</b>	
A – Rationnel de décision d'une antibiothérapie antistaphylococcique	p.19
B – Recommandations de traitement	p.22
C – Quelques exemples d'analyse des pratiques	p.23
<b>Partie 4 : Les questions soulevées</b>	p.25
<b>Chapitre II : Activité antistaphylococcique des aminosides seuls et en association Impact des mécanismes de résistances</b>	p.27
<b>Partie 1 : Méthode d'évaluation de l'activité des antibiotiques</b>	p.27
* Evaluation <i>in vitro</i>	p.27
* Evaluation <i>in vivo</i>	p.28
<b>Partie 2 : Impact des mécanismes de résistances sur l'activité antistaphylococcique des aminosides</b>	p.33
A – Mode d'action des aminosides	p.33
B – Mécanisme de résistance des staphylocoques	p.34
C – Objectifs de l'étude	p.38
D – Résultats	p.38
E – Conclusion : validation de la lecture interprétative de l'antibiogramme	p.42
<b>Partie 3 : A propos de l'effet <i>in vivo</i> des aminosides en association</b>	p.47

<b>Chapitre III : Etude de la variabilité de l'activité antistaphylococcique des Glycopeptides</b>	p.55
<b>Partie 1 : Activité <i>in vivo</i> des glycopeptides, prédictivité des tests <i>in vitro</i></b>	p.56
A – Méthodologie	p.56
* Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité des glycopeptides	p.56
* Evaluation <i>in vivo</i> de l'activité des glycopeptides	p.57
B – Résultats	p.59
* Résultats de l'évaluation <i>in vitro</i>	p.59
* Résultats de l'évaluation <i>in vivo</i>	p.62
* Résultats pharmacocinétiques	p.63
C – Discussion	p.64
<b>Partie 2 : Approche des mécanismes d'échappement de SA 8 aux glycopeptides</b>	p.72
A – Caractérisation des souches	p.72
* Polymorphisme de restriction	p.72
* Amplification du gène <i>mec A</i> et de sa cassette	p.73
B – Etude des facteurs de l'hôte, recherche d'une interaction avec le couple bactérie-antibiotique	p.74
* Mesure de la bactéricidie de la vancomycine dans le plasma humain	p.74
* Activité de la vancomycine dans un modèle d'infection de caillots de fibrine	p.77
* Discussion	p.78
C – Etude des facteurs bactériens modifiant l'action de l'antibiotique	p.80
* Recherche de la tolérance de <i>S.aureus</i> vis-à-vis de la vancomycine	p.80
* Détermination du type <i>agr</i>	p.84
<b>Partie 3 : Perspectives</b>	p.87
<b>Conclusion</b>	p.90
<b>Références bibliographiques</b>	p.91
<b>Tableaux et Figures</b>	p.103
<b>Lexique et Définitions majeures</b>	p.105

## Introduction

---

Pour répondre aux défis posés par les infections à Staphylocoques dorés, tant par leur fréquence et leur gravité que par les difficultés thérapeutiques qu'elles soulèvent, les stratégies de traitement reposent actuellement sur l'utilisation de quelques molécules, notamment les **aminosides** et les **glycopeptides**. Cependant leur utilisation se heurte à certains obstacles : échecs thérapeutiques, développement de mécanismes de résistance, antagonisme de certaines associations...etc.

La perte d'efficacité thérapeutique d'une molécule ou d'une association est difficile à prévoir sur la base des résultats bactériologiques de routine. Les tests pratiqués habituellement comprennent un antibiogramme et des CMI, basées sur l'activité bactériostatique des antibiotiques. L'utilisation de ces paramètres en thérapeutique reste difficile. La lecture de l'antibiogramme et son interprétation dépend des mécanismes de résistances bactériens connus, et nécessite d'être validée par d'autres données concordantes (études cliniques, résultats expérimentaux). Ces travaux de recherche se sont appuyés sur les résultats obtenus *in vivo* dans le modèle d'endocardite du lapin, pour mieux explorer les mécanismes de résistance ou d'échappement des souches vis à vis de ces molécules.

L'activité antistaphylococcique des aminosides sera d'abord abordée. La lecture interprétative de l'antibiogramme actuellement recommandée sera discutée à la lumière des résultats expérimentaux. La même démarche sera appliquée à l'évaluation des associations, avec la vancomycine et le linezolide. L'activité antibactérienne des glycopeptides *in vivo* et *in vitro* sera abordée ensuite, en constatant l'échappement *in vivo* de certaines souches de *S.aureus* à ces molécules, et en approchant les mécanismes de cet échappement. Ces travaux soulèvent la question de la prédictibilité de l'effet thérapeutique des antibiotiques étudiés, de l'interprétation des tests *in vitro*, de la meilleure façon d'améliorer la décision clinique de traitement au moment de l'identification d'un pathogène.

## Chapitre I

### Les défis posés aujourd'hui par les infections à *Staphylococcus aureus*

---

#### Partie 1

##### Les enjeux cliniques

Les infections à *Staphylococcus aureus* (SA) sont fréquentes, les tableaux cliniques sont variés dans leur présentation et dans leur gravité.

Le pronostic de ces infections est sévère, grevé d'une mortalité élevée, en particulier lorsqu'elles sont bactériémiques. Ainsi en 1941, juste avant l'avènement des antibiotiques, on pouvait constater 82% de décès parmi 122 patients hospitalisés (Archer, N Engl J Med, 2001). A l'heure actuelle, si on considère les patients hospitalisés en unités de soins intensifs, il semble que ces infections soient associées à une mortalité d'au moins 20% (Blot, Arch Intern Med, 2002).

La fréquence des infections staphylococciques tend à augmenter (Lowy, N Engl J Med 1998). Les populations les plus susceptibles de contracter ces infections s'accroissent : grand âge, diabète, plaies chroniques, traitement immunosuppresseurs dans le cadre de néoplasie ou de transplantation, VIH etc.... Parallèlement, les thérapeutiques nécessitant l'implantation de matériel étranger, temporaire ou définitif, sont de plus en plus nombreuses (cathétérisme intraveineux, sites de perfusion implantables, sondes d'électrostimulations cardiaques ou neurologiques, prothèses ostéo-articulaires, matériels d'ostéosynthèse osseuse, prothèses valvulaires et vasculaires) et présentent le risque d'inoculer une infection, le plus souvent à staphylocoques.

Les défis posés aux cliniciens par ces infections tiennent à leur fréquence, leur gravité, leurs circonstances de survenue (infections contractées à l'occasion d'une hospitalisation, lors des soins ou d'une intervention chirurgicale, concernant un matériel implanté...).

Nous présentons ici quelques données éclairant les situations cliniques les plus difficiles.

### **Les bactériémies**

SA est le pathogène le plus fréquemment responsable de bactériémies, en particulier en milieu hospitalier (RAISIN, rapport InVS, 2002). Certains ont pu évaluer l'incidence globale des bactériémies à SA en milieu hospitalier à 1.18 pour 1000 admissions, dont 47% d'acquisition communautaire (Jensen, Arch intern med, 2002). La mortalité globale de ces patients était de 34%. En unités de soins intensifs, cette incidence s'élève à 3.8 cas pour 1000 admissions, avec une mortalité encore plus élevée dans cette population, allant de 23.7 à 63.8% (Blot, Arch intern med, 2002). Cependant, les taux de mortalité attribuable étaient beaucoup plus bas, respectivement de 1.3 et 23.4% en fonction du caractère sensible ou résistant à la méticilline des souches identifiées.

Parmi les facteurs associés à un pronostic défavorable de l'infection (mortalité attribuable, morbidité) il faut retenir l'existence de foyers secondaires difficiles à traiter (localisations neuro-méningées, ostéo-articulaires, endocardiques), l'importance des choix thérapeutiques, en particulier de la posologie de l'antibiotique ou la persistance de la bactériémie (Jensen, Arch intern med, 2002) (Fowler, Arch intern med, 2003).

### **Les endocardites**

L'incidence globale annuelle des endocardites est mesurée, en fonction des endroits et des méthodes, entre 15 et 160 cas par million d'habitants par an. Les staphylocoques sont devenus les pathogènes le plus fréquemment rencontrés dans les endocardites, en particulier du fait de la fréquence des endocardites sur matériel. Ils sont la cause de plus de la moitié des endocardites sur valve prothétique, dont 10 à 25% de SA. Pour les endocardites sur valves natives, SA est impliqué dans 20 à 40% des cas (Delahaye, Rev Prat, 1998) (Mylonakis, N Engl J Med 2001) (Mainardi, Rev Prat, 1998).

La mortalité associée globalement à cette pathologie reste élevée, d'environ 20%. Celle-ci varie en fonction des étiologies et semble plus élevée, de 30 à 60%, pour

les endocardites staphylococciques (Delahaye, Rev Prat, 1998 ; Mylonakis, N Engl J Med 2001). Dans un travail de surveillance fait au Danemark sur 260 patients (Roder, Arch intern med, 1999), la mortalité globale des endocardites staphylococciques était chiffrée à 46%. Les complications le plus fréquemment rencontrées étaient une insuffisance cardiaque (53%) et une atteinte neurologique centrale (35%).

Elles sont une complication fréquente des bactériémies à SA, qui, pour certains doit être systématiquement recherchée afin d'optimiser l'antibiothérapie et d'améliorer le pronostic.

### **Les infections ostéo-articulaires (IOA)**

SA est le principal pathogène impliqué dans ces infections. Il concerne les arthrites, ostéites et ostéomyélites (de contiguïté ou hématogène), les spondylodiscites, et les infections sur matériel prothétique. Il peut être également impliqué dans les infections post-traumatiques, ainsi que les complications septiques des ostéo-arthropathies diabétiques ou artéritiques.

Dans l'étude française EPICAL (Lortat-Jacob, JNl 2001), concernant des infections osseuses sur prothèse, sur os diaphysaire solide et des pseudarthroses septiques, SA était identifié dans 34.6% des prélèvements (dont presque la moitié étaient des SA résistants à la méticilline soit 14.8%).

Pour ce qui est des infections de prothèses articulaires (en particulier hanche et genou), leur prévalence est généralement évaluée à 1.5-2.5% pour les arthroplasties primaires, et supérieure à 3% pour les révisions, avec une mortalité qui semble varier entre 1 et 3%. SA en est la cause la plus fréquente, retrouvé dans 22 à 25% des infections de prothèse de hanche et 31 à 40% des infections de prothèse de genou (Lentino, Clin Infect Dis, 2003) (Huten, Infections à staphylocoques sur prothèse, 2001).

La fréquence de SA dans ces infections, est en partie expliquée par sa capacité d'adhérence aux composants de la matrice osseuse. C'est le rôle des adhésines, molécules présentes à la surface de la paroi bactérienne, capables de lier certaines protéines de l'hôte, telle la fibronectine ou le collagène (Lew, N Engl J Med, 1997).

### **Les infections sur cathéter**

L'utilisation du cathétérisme intraveineux central ou périphérique s'est généralisée en milieu hospitalier. On compte de 25 à 100% des patients en unités de soins intensifs porteurs d'un cathéter veineux central. Les dispositifs intraveineux (par cathétérisme ou chambre implantable) sont également de plus en plus utilisés chez les malades externes lors de soins au domicile (chimiothérapie ou antibiothérapie parentérale par exemple).

L'incidence des infections sur ces voies d'abord se situe entre 5 et 20%. Parmi ces infections, on compte de 1 à 3 bactériémies/100 cathéters, ce chiffre étant plus élevé pour les cathéters veineux centraux (Veyssier, Infections Nosocomiales, 1998) (Nitenberg, Infections à staphylocoques sur prothèse, 2001).

Les staphylocoques sont en cause dans 50 à 70% des cas. Le taux de mortalité globale a pu être évalué à 14% (Mermel, Clin Infect Dis, 2001), dont un décès sur 5 attribuable à l'infection de cathéter. Pour ce qui est des infections sur cathéter à SA, le taux de mortalité attribuable est significativement plus élevé (8.2%).

### **D'autres infections sur matériel**

Dans leur ensemble, les infections sur matériel sont nombreuses, représentant presque la moitié des infections nosocomiales (Darouiche, N Engl J Med, 2004). Les bactéries le plus fréquemment responsables de ces infections sont les staphylocoques. Elles sont responsables d'une morbi-mortalité importante, ainsi que de surcoûts (tableau I).

Parmi ces infections, les plus graves sont les infections sur matériel endovasculaire, en particulier les valves prothétiques et les dispositifs d'assistance ventriculaire.

La présence ubiquitaire de SA, ses capacités d'adhésion au matériel étranger, sa capacité de croissance en biofilm, rendent compte de sa fréquence dans ce type d'infection. Certaines protéines de surface, en particulier les adhésines liant le fibrinogène (clumping factor A ou B) ou la fibronectine (fibronectin-binding-protein A ou B) ont démontré leur importance pour la colonisation des matériels implantés (Moreillon, Infection à staphylocoque sur prothèse, 2001) (Lowy, N Engl J Med, 1998).

**Tableau I** : Fréquence et coûts des infections sur matériel aux US.

Type de chirurgie Type de matériel	Nombre total annuel aux US	Taux moyen d'infection %	Projection du nombre annuel d'infection	Coût estimé du traitement médico- chirurgical US \$ / épisode
<b>Cardio-vasculaire</b>				
Valve mécanique	85 000	4	3 400	50 000
Prothèse vasculaire	450 000	4	16 000	40 000
Pacemaker et Défibrillateurs implantables	300 000	4	12 000	35 000
Assistance ventriculaire	700	40	280	50 000
<b>Orthopédique</b>				
Prothèse articulaire	600 000	2	12 000	30 000
Matériel d'ostéosynthèse	2 000 000	5	100 000	15 000
<b>Neurochirurgie</b>				
Dérivation ventriculaire	40 000	6	2 400	50 000
<b>Chirurgie plastique</b>				
Implants mammaires	130 000	2	2 600	20 000
<b>Urologique</b>				
Implants péniens	15 000	3	450	35 000

(D'après Darouiche, N Engl J Med, 2004)

## **La place de SA dans les infections nosocomiales : quelques autres exemples**

- Les infections urinaires se placent au premier plan des infections nosocomiales (environ 40%), elles compliquent dans une majorité de cas la présence d'une sonde uréthro-vésicale. Elles se compliquent dans moins d'un tiers des cas d'une infection parenchymateuse, et d'une bactériémie dans moins de 5% des cas (Veyssier, Infections nosocomiales, 1998). SA est imputé dans 3 à 8% des cas (SPILF, Infections Urinaires Nosocomiales, 2002).
- Les pneumonies nosocomiales viennent au deuxième ou troisième rang. Le facteur de risque d'acquisition majeur est la ventilation invasive. Le taux de mortalité attribuable des pneumonies acquises en réanimation sous ventilation, est mesuré entre 25 et 30% (Fagon, Am J Med, 1993). SA est retrouvé dans environ 30% des cas (Vincent, JAMA, 1995), plus fréquemment dans les pneumonies tardives que précoces.
- Les infections de site opératoire représentent également 25 à 30% des infections nosocomiales, tous sites confondus. Les staphylocoques sont responsables de 35% de celles-ci, et atteignent plus des deux tiers en chirurgie cardiaque et orthopédique (SFHH, Gestion préopératoire du risque infectieux, 2004).

## Partie 2

### Enjeux thérapeutiques et acquisition de résistances aux antibiotiques

Depuis l'apparition des traitements antibiotiques, l'évolution de la sensibilité de SA aux différents antistaphylococciques utilisés, a posé, et continue de poser, un certain nombre de défis thérapeutiques.

#### Les résistances aux Bêta-lactamines

Alors que la Pénicilline G était utilisée depuis 1941, le premier mécanisme de résistance aux bêta-lactamines a été décrit en 1944. Il s'agit de l'acquisition d'une pénicillinase plasmidique. Celle-ci concerne actuellement plus de 90% des SA.

A partir de 1959, une pénicilline « résistante aux bêta-lactamases » est disponible : la méticilline.

Dès 1961, on décrit les premières souches de SA résistantes à la méticilline en Grande-Bretagne. Ces SARM (*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline) présentent un mécanisme de résistance par modification de cible. Les protéines liant la pénicilline (PLP), sont des protéines de surfaces impliquées dans la synthèse du peptidoglycane, qui sont différentes chez les SARM. Ils ont acquis une PLP additionnelle, dite PLP 2a. Le support génétique de cette PLP, le gène *mecA*, est chromosomique, inséré dans une large séquence dénommée : staphylococcal cassette chromosome *mec* (*scc mec*). La structure de cette séquence est variable, et au moins quatre types de *scc mec* ont été décrits parmi les SARM (Oliveira, AAC, 2002).

La résistance à la méticilline est croisée avec une diminution de sensibilité vis-à-vis de l'ensemble des bêta-lactamines (Chambers, Clin Microb R, 1988) (Lyon, Microbiol Rev, 1987).

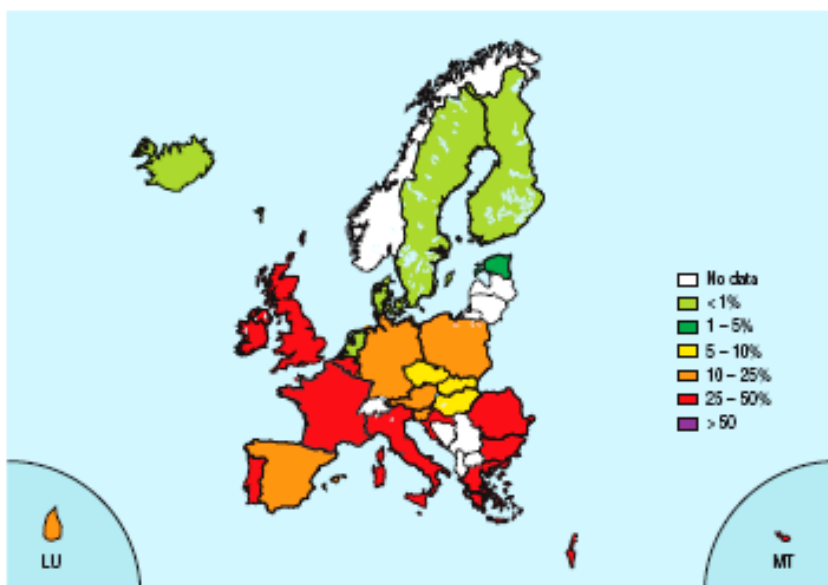
Depuis leur apparition ces souches se transmettent le plus souvent en milieu hospitalier, leur diffusion est clonale, interhumaine, associée aux soins. La transmission de ces SARM est ciblée par la campagne nationale de lutte contre les Bactéries Multi Résistantes (BMR). La colonisation des patients par ces souches de SA particulièrement résistantes semble dépendre à la fois d'une

transmission croisée lors des soins et d'une sélection par l'utilisation d'antibiotiques (Schentag, CID, 1998).

### Quelques données épidémiologiques récentes

Le réseau de surveillance européen (EARSS) montre une répartition inhomogène des souches de SARM d'un pays à l'autre. La mesure de la prévalence des SARM au sein de l'espèce SA (Tiemersma and EARSS, Emerg Inf Dis, 2004) durant les années 1999 à 2002 dessine la carte suivante en Europe (figure 1). On voit clairement la France parmi les zones de plus forte prévalence (>25%).

**Figure 1** : Prévalence des SARM en Europe 1999-2002



(D'après Tiemersma and EARSS, Emerg Inf Dis, 2004)

La répartition de ces souches sur le territoire français est appréhendée par les surveillances des réseaux locaux, coordonnés au sein du Réseau d'Alerte d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales (RAISIN). Sur la base de leurs résultats (tableau II), on confirme à la fois une forte prévalence bactériologique de la résistance à la méticilline parmi les SA et de fortes incidences de portage clinique de ces souches.

**Tableau II** : Fréquence des SARM en France, en milieu hospitalier

	Année	Nombre d'hôpitaux (n)	% de SARM au sein de l'espèce	Incidence /1000 journées d'hospitalisation
<b>CCLIN Paris-Nord</b>				
Hors AP-HP	1999	95	39	0.92
AP-HP	1999	44	35	0.88
<b>CCLIN Est</b>				
Champagne-Ardenne	1999	16	34	0.63
Franc-Comtois	1999	30	30	0.72
<b>Sud-ouest</b>	1998	36	41	0.92
<b>Sud-est</b>	1999	126	26	0.84

(D'après Jarlier and RAISIN, BEH, 2004)

La répartition de ces souches dans les unités d'hospitalisation varie nettement en fonction du type d'activité. Classiquement, leur fréquence était prépondérante dans les services de réanimation. Néanmoins les programmes de prévention ont permis une telle diminution, que la prévalence de la résistance à la méticilline dans ces unités rejoint les chiffres de prévalence hospitalière globale. Par contre la répartition des cas de portage de SARM montre actuellement une plus grande fréquence dans les services de médecine et de soins de suite. (Jarlier, RAISIN, BEH, 2004).

En milieu communautaire, des épidémies de SARM ont été récemment rapportées aux Etats-Unis (Kazakova, N Engl J Med, 2005) (Miller, N Engl J Med, 2005) (Fridkin, N Engl J Med, 2005). Ces souches particulières causent plus fréquemment des infections cutanées et des tissus mous, plus rarement des pneumonies ou d'autres formes invasives avec bactériémie. Elles sont le plus souvent porteuse du gène cassette *scc mec* de type IV et produisent une toxine : la leucocidine de Panton et Valentine (LPV). Les chiffres de surveillance français montrent une prévalence de ces souches de moins de 1% parmi les SARM (ONERBA, ECC-RICAI, 2004).

Par ailleurs, certains travaux ont montré que les souches de SARM identifiées en dehors de l'hôpital étaient à rapprocher de souches nosocomiales (Charlebois,

CID, 2004). D'ailleurs le facteur de risque principalement associé au portage de ces souches était un séjour à l'hôpital (dans les 12 mois précédents) ou en unité de long séjour. Le phénotype de résistance de ces souches de SARM isolées en dehors de l'hôpital est comparable à celui des souches nosocomiales en ce qui concerne les résistances associées, en particulier aux fluoroquinolones et aux macrolides (cf infra). Ceci permet de les différencier des souches de SARM communautaire, dont le phénotype de résistance se limite à la méticilline.

### **Impact clinique de la résistance à la méticilline**

Les conséquences cliniques de la résistance à la méticilline chez SA restent débattues. Lors d'une infection bactériémique à SA, la méticillino-résistance pourrait être associée à une surmortalité significative (Blot, Arch intern med, 2002). Cependant, l'ajustement aux facteurs de co-morbidité, ainsi qu'à la gravité ou aux différences de traitement, peut modifier cette impression épidémiologique (Fowler, Arch intern med, 2003) (Soriano, CID, 2000). Quoi qu'il en soit, les choix thérapeutiques sont réduits et les voies d'abord de l'antibiothérapie sont modifiées (recours plus souvent nécessaire à l'IV). Les décisions thérapeutiques sont donc plus complexes.

Pour ce qui est des conséquences pronostiques de l'acquisition communautaire ou nosocomiale de l'infection (bactériémies dans ces études), les conclusions semblent plutôt en faveur d'une surmortalité significative pour les infections communautaires à SA (Fowler, Arch intern med, 2003) (Jensen, Arch intern med, 2002). Pour comprendre ces résultats, il est probablement nécessaire de tenir compte de la virulence des souches, autant que de la résistance de celles-ci aux antibiotiques.

### **Les résistances associées**

Les résistances aux bêta-lactamines ne sont pas isolées, elles s'associent classiquement à des résistances aux macrolides, fluoroquinolones et aminosides (tableau III). Ces associations fréquentes entre les phénotypes de résistances, posent une difficulté supplémentaire dans les décisions thérapeutiques.

Pour les fluoroquinolones, il s'agit d'une résistance touchant toutes les molécules de cette famille, et qui repose sur un mécanisme chromosomique, par modification de cible.

Pour l'érythromycine, lorsque cette résistance est constitutive (phénotype MLSb) elle croise avec l'ensemble des macrolides, les lincosamines (clindamycine) et la streptogramine B (avec diminution de la sensibilité aux synergistines).

La résistance aux aminosides chez SA est un cas particulier, puisqu'il s'agit de résistances dissociées entre les molécules de cette famille. Elle repose sur un mécanisme enzymatique, porté par un plasmide, le phénotype de résistance étant généré par le spectre de l'enzyme produite par la bactérie.

**Tableau III** : Evolution de la sensibilité des SARM aux antibiotiques

Evolution 1994-2002 de la sensibilité des SARM aux antibiotiques autres que les bêta-lactamines (prévalence en % des souches sensibles parmi les SARM).						
Antibiotique	Réseau	1994	1996	1998	2000	2002
Gentamicine	A	15	39	67	73	80
	B			63	77	85
Tobramycine	A	2	5	10	12	19
	B			6	7	12
Rifampicine	A	25	52	74	78	82
	B			68	82	86
Erythromycine	A	10	29	41	45	43
	B			29	36	38
Fluoroquinolone	A	5	7	5	5	7
	B			6	5	6

A : CCLIN Paris-Nord, Réseau AP-HP  
 B : CCLIN Paris-Nord, Réseau hors AP-HP

(D'après Jarlier and RAISIN, BEH, 2004)

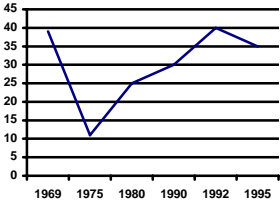
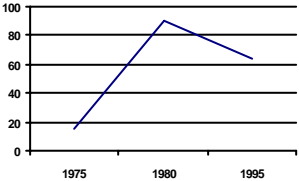
Ces résultats de surveillance montrent nettement un phénomène récent : on peut noter depuis la fin des années 90, un retour vers une plus grande fréquence de sensibilité des SARM à certains antibiotiques. Ainsi, la rifampicine, la gentamicine

et à un moindre degré, les macrolides, sont moins touchés par la multi-résistance des SARM. Au contraire, les fluoroquinolones restent inefficaces de façon presque systématique sur ces souches.

En observant plus précisément l'évolution de la sensibilité des SARM aux aminosides (tableau IV), on constate que près de 90% des SARM étaient résistants à tous les aminosides (phénotype KTG) jusqu'au milieu des années 90. On a vu ensuite émerger des souches de SARM sensibles à la gentamicine (GS-SARM de phénotype K ou KT). On constatait parallèlement dans ces travaux, une stabilité voire une diminution de la résistance à la méticilline chez SA.

La diffusion de ces souches de SARM sensibles à la gentamicine, a été probablement facilitée par la diminution de la consommation de gentamicine, au profit de l'amikacine. Certains travaux ont également mis en évidence une plus grande capacité de croissance de ces souches (notion de «fitness» bactérien), ce qui leur assurerait un avantage physiologique sur les souches résistantes à la gentamicine (Laurent, JAC, 2001).

**Tableau IV** : Fréquence des souches de SARM sensibles à la gentamicine

Auteur (référence)	H. Aubry-Damon, (CID, 1997)	H. Lelievre, (JCM, 1999)	N. Lemaitre, (JCM, 1998)
Site	Hôpital Henri Mondor	Groupe Pitié-Salpêtrière	Réseau d'hôpitaux français (7)
Evolution de la résistance à la méticilline	 <p data-bbox="507 701 788 734">% au sein de l'espèce</p>	La fréquence de la résistance à la méticilline chez SA est passée de 18% en 1975 à 41% en 1991.	Fréquence des souches de résistance hétérogène à la méticilline chez les SARM Genta-S
Evolution de la résistance des SARM aux aminosides	 <p data-bbox="507 1066 807 1144">% résistance à la genta parmi les SARM</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La fréquence de la résistance à la gentamicine chez SARM est passée de 27% en 1975 à 99% en 1991, avant de diminuer</li> <li>- La fréquence de la sensibilité à la genta chez SARM en 1996 est de 90% (long séjour) à 45% (court séjour)</li> </ul>	Les souches MRSA sensibles à la gentamicine sont passées de 7.4% en 1992 à 47-95% en 1998
Commentaires	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Evolution expliquée par l'implantation des mesures d'hygiène pour la diminution des SARM</li> <li>- La diffusion de souches Genta-S est associée à la diminution de la consommation de cette molécule.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- L'antibiotype et la PFGE permettent une classification en trois clones.</li> <li>- La consommation de gentamicine diminue dans les services où les clones GS-MRSA diffusent.</li> </ul>	Les souches GS-MRSA ont perdu le gène de résistance aux aminosides <i>aac(6')-aph(2'')</i>

## Le nécessaire recours aux glycopeptides

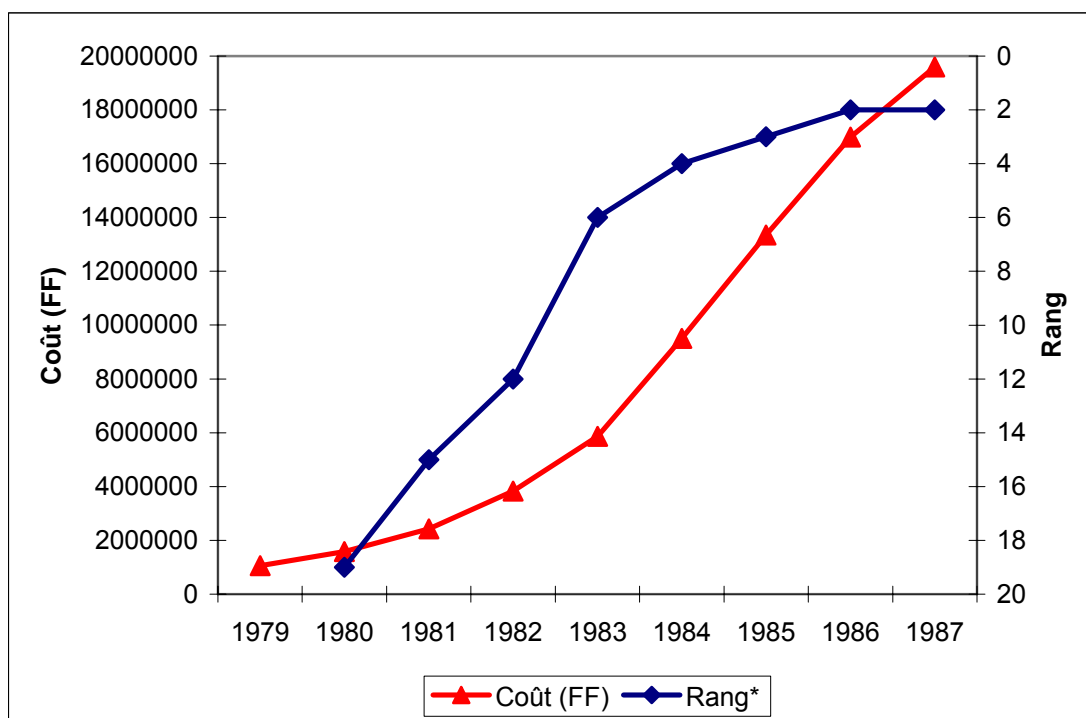
La vancomycine est utilisée depuis 1956 (Griffith, JAC, 1984), premier antibiotique de cette famille, elle en est toujours le chef de file. Bien qu'elle soit peu utilisée au départ car très toxique, son usage est largement répandu dans les années 70 et 80 du fait de la dissémination des souches de staphylocoques résistants aux bêta-lactamines.

En 1985, Adolf Karchmer (Karchmer, Am J Med, 1985) écrivait

«Methicillin-resistant *S.aureus* are uniformly susceptible to vancomycin (...). It is clear that beta-lactams antibiotics, including cephalosporins, are not effective antimicrobials for treating severe infection due to methicillin resistant *S.aureus* and that vancomycin is the antibiotic of choice».

Ceci conduit à une consommation importante de cet antibiotique, qui prend alors une place majeure au sein des dépenses de pharmacie (figure 2).

**Figure 2** : Evolution de la consommation de vancomycine à l'AP-HP (Paris)



\*Rang dans la liste des dépenses pharmaceutiques de l'AP-HP

(D'après Leclercq, Med Thérap, 1997)

Actuellement l'usage de ces molécules est plus discuté. En effet une telle consommation n'est pas exempte d'effet écologique, avec risque d'apparition de résistances. Ainsi certains proposent (Darouiche, N Engl J Med, 2004) pour la partie médicale du traitement des infections de matériel :

- «Do not use vancomycin in patients infected by methicillin-susceptible staphylococci, because this treatment is suboptimal.
- Provide empirical coverage against methicillin-resistant staphylococci for infections with an unidentified microbiologic cause»

Ces conseils laissent néanmoins une très large place aux glycopeptides, en particulier à la phase précoce du traitement, avant que le résultat d'une possible documentation bactériologique ne soit connu du clinicien.

### **Apparition de résistances aux glycopeptides**

La première souche de SARM de sensibilité diminuée à la vancomycine (CMI à 8mg/L) est identifiée au Japon en 1996 (Hiramatsu, JAC, 1997). Il s'agit d'une infection de site opératoire chez un enfant de 4 mois, récidivant après deux cures de vancomycine (plus de 30 jours de traitement au total). En outre, certaines observations montrent que des souches résistantes ou intermédiaires à la teicoplanine existaient déjà auparavant (Vedel, Eur J Clin Mic Inf Dis, 1990).

Sur les recommandations du NCCLS, on définit plusieurs niveaux de résistance en fonction des CMI de la vancomycine :

- Souches VRSA (vancomycin-resistant-*Staphylococcus aureus*) pour des CMI supérieures ou égales à 32 mg/L
- Souches VISA (vancomycin-intermediate-*Staphylococcus aureus*) pour des CMI entre 8-16 mg/L,
- Souches hVISA (hetero-VISA) dont la sensibilité paraît conservée, mais qui contiennent des sous-populations dont la sensibilité est intermédiaire (Geisel, Eur J Clin Mic Inf Dis, 2001). Il faut noter que ces souches sont le plus souvent intermédiaires ou résistantes à la teicoplanine.

En France, les recommandations du comité de l'antibiogramme fixent des limites différentes, en particulier pour la définition des souches intermédiaires. En effet, la concentration critique inférieure est  $\leq 4$  mg/L, seules les souches dont la CMI ne

dépasse pas cette limite sont considérées comme sensibles. La concentration critique supérieure est > 16mg/L, au-dessus de cette limite les souches sont donc considérées comme résistantes (CASFM, Communiqué 2005).

Ces souches ont été identifiées dans la plupart des régions, y compris en France (Chesneau, JAC, 2000). Il semble qu'elles soient le plus souvent dérivées d'un clone de SARM déjà épidémique, et que leur apparition soit associée à un usage de la vancomycine en traitement de longue durée, avec des concentrations faibles.

Le mécanisme de résistance actuellement reconnu est une hyperproduction du peptidoglycane (Hiramatsu, Lancet Inf Dis, 2001), conduisant à une présence en grand nombre de monomère de muréine avec des terminaisons Dala-Dala libres, et donc à un excès de récepteurs pour la fixation des glycopeptides. La vancomycine serait ainsi «trappée» au sein de la paroi bactérienne. Actuellement, aucun support génétique n'est identifié pour ce mécanisme de résistance.

Récemment des souches de haut niveau de résistance à la vancomycine (VRSA) ont été identifiées avec un mécanisme de résistance différent, exprimant le gène *van A* d'une souche d'*Enterococcus faecium* (Périchon, AAC, 2004). Ce gène est un opéron, support génétique de la résistance d'*E.faecium* aux glycopeptides. Dans cette espèce, le mécanisme de résistance repose sur la production de précurseurs du peptidoglycane se terminant par un D-lactate à la place de la D-alanine, dont l'affinité pour les glycopeptides est moindre (Schentag, CID, 1998) (Leclercq, MMI, 2002).

### **Les nouveaux anti-staphylococciques**

Face à ce développement de résistances, et à leurs conséquences thérapeutiques, un certain nombre de nouvelles molécules antistaphylococciques ont fait l'objet d'un développement industriel, allant, pour certaines, jusqu'à la mise sur le marché.

#### Synergistines :

Les dernières molécules de cette famille, apparentée aux macrolides et caractérisée par l'association de deux streptogramines (A et B), sont représentées par l'association quinipristine-dalfopristine. Cette association est synergique et

bactéricide sur des souches de SA, quel que soit leur niveau de résistance aux bêta-lactamines ou aux glycopeptides. Elle a montré son efficacité clinique dans un certain nombre de situations infectieuses à SARM, le comparateur étant la vancomycine (Pechere, JAC, 1999). Son efficacité semble cependant altérée par la présence de certains mécanismes de résistances aux macrolides (Batard, AAC, 2002).

#### Oxazolidinones :

Il s'agit d'une nouvelle famille d'antibiotiques, dont la cible est le ribosome et dont le spectre comprend exclusivement les cocci à Gram positif. La première molécule de cette famille, actuellement disponible, est le linézolide. Celui-ci a montré son efficacité sur des souches de SARM, quel que soit leur niveau de résistance aux bêta-lactamines, aux glycopeptides ou à d'autres antibiotiques, en particulier ceux partageant la même cible. Son activité *in vitro* est bactériostatique (Leclercq, MMI, 2002). Sur la base d'études cliniques, il est actuellement proposé pour le traitement d'infections à SARM de localisation respiratoire basse et cutanée.

#### Autres :

Parallèlement, au sein de familles d'antibiotiques déjà bien connues, de nouvelles molécules actives contre les SARM sont développées. Nous ne disposons pas encore de leur utilisation en pratique clinique, mais des essais cliniques de Phase III sont en cours. On peut particulièrement citer :

Les glycylo-cyclines, qui sont dérivés des tétracyclines, comme la tigécycline

Les antibiotiques peptidiques, apparentés aux glycopeptides, comme la daptomycine

On trouve également parmi les céphalosporines et les fluoroquinolones, des molécules proposées pour leur efficacité vis à vis des SARM.

## Partie 3

### Recommandations et pratiques de traitement dans les infections staphylococciques

#### A - Rationnel de décision d'une antibiothérapie antistaphylococcique

Pour la prescription des antibiotiques, le choix de la dose et du rythme d'administration est déterminant. Il conditionne l'efficacité clinique et bactériologique de l'antibiothérapie. Sur la base d'études cliniques, et surtout expérimentales, certains **paramètres pharmacodynamiques** ont été définis, prédictifs de l'efficacité de différentes familles de molécules antibiotiques

- Les rapports « concentration sur CMI » et « AUC (aire sous la courbe) sur CMI » : Un des tous premiers paramètres pharmacodynamiques décrit, et validé cliniquement, est le ratio pic/CMI (Moore, JID, 1987). Dans ce travail concernant la gentamicine, un rapport d'au moins 10 était prédictif d'une amélioration clinique. Ceci est également démontré pour l'ensemble de cette classe thérapeutique, ces antibiotiques sont considérés comme concentration-dépendants (Mehrotra, Int Care Med, 2004) (Craig, CID, 2001).
- Temps au-dessus de la CMI ( $\tau$ ) : Le temps durant lequel les concentrations sériques de l'antibiotique sont au-dessus de la CMI est plus déterminant de l'efficacité du traitement pour les bêta-lactamines et les glycopeptides, que le rapport pic/CMI. Ainsi pour les pénicillines et céphalosporines, il semble que ce temps au-dessus de la CMI doit être de 40 à 50% de l'intervalle entre deux doses afin d'obtenir une efficacité au site de l'infection. Ces molécules sont dites temps-dépendantes. Ceci n'exclut cependant pas la nécessité d'obtenir un seuil de concentration suffisamment élevé au-dessus de la CMI (6 à 10 fois la CMI selon les auteurs et les modèles expérimentaux), en particulier lors de situations infectieuses difficiles à traiter telles l'endocardite ou la méningite.

D'autres molécules anti-staphylococciques sont également temps-dépendantes, comme les macrolides et la clindamycine (Cremieux, AAC, 1992) (Mehrotra, Int Care Med, 2004) (Craig, CID, 2001) (Duffull, AAC, 1994).

- Cas particulier des fluoroquinolones : Pour cette famille d'antibiotiques, le rapport AUC/CMI a été reconnu comme prédictif de l'efficacité (Craig, CID, 2001) (Schentag, CID, 2001). Ceci soulève cependant certaines critiques, car ce paramètre n'est pas associé à un mode d'administration particulier, il peut être équivalent avec des régimes thérapeutiques différents, voire discordants. Certains résultats suggèrent que le temps au-dessus de la CMI serait prédictif de l'efficacité des fluoroquinolones dans les infections staphylococciques (Sanchez-Recio, JAC, 2000).
- Concentrations prévenant la sélection de résistance (MPC : Mutation Prévention Concentration) : Des travaux plus récents se sont attachés à déterminer quelles concentrations, et donc quelles posologies pouvaient au mieux prévenir l'apparition de résistances bactériennes (Craig, CID, 2001) (Craig, CID, 1998). Ces concentrations permettent de définir la « fenêtre de sélection » d'une molécule, qui correspond à la zone entre la CMI et la MPC (Croisier, AAC, 2004). Ces concentrations semblent varier en fonction des micro-organismes et des antibiotiques testés. Nous ne disposons pas actuellement de données spécifiques concernant les staphylocoques.

Le choix du mode d'administration et de la dose est donc dépendant de ces paramètres. On peut ainsi proposer **les schémas d'administration** suivants pour la vancomycine et les aminosides.

- Administration de la vancomycine : perfusion intraveineuse continue, avec concentration en plateau suffisamment élevée. Celle-ci peut être précédée d'une dose de charge, en particulier en cas de signes de gravité (sepsis sévère ou état de choc septique) ou d'autres causes d'augmentation du volume de diffusion. (Cremieux, AAC, 1992)

(Mehrotra, Int Care Med, 2004) (James, AAC, 1996). Le suivi thérapeutique (surveillance des concentrations sériques pour adaptation des posologies) est recommandé.

- Administration des aminosides : la totalité de la dose quotidienne est administrée en une seule perfusion (DUJ) (Mehrotra, Int Care Med, 2004) (Blaser, Eur J Antimicrobiol. Infect Dis, 1995). L'objectif est d'obtenir une concentration la plus haute possible (en tenant compte du volume de diffusion) afin d'assurer une meilleure efficacité, suivie d'une concentration à la vallée la plus basse possible, afin de réduire la néphrotoxicité de ces molécules (Rybak, AAC, 1999).

La capacité de **diffusion** et les concentrations dans les sites infectés de la (des) molécule(s) entrent aussi en ligne de compte dans la décision thérapeutique. Ainsi certains tissus sont d'un accès plus difficile et donnent lieu à des infections plus difficiles à traiter (exemples : liquide céphalo-rachidien, os, végétations d'endocardite, prostate...). Les concentrations tissulaires des antibiotiques, ainsi que leur répartition au sein de ces tissus sont difficiles à mesurer. Par un radio-marquage, certains ont pu mesurer la diffusion et la répartition de certaines molécules dans deux modèles : la végétation d'endocardite et la prothèse articulaire. Dans ces situations, la concentration en antibiotique est variable d'une molécule à l'autre, la répartition de l'antibiotique est hétérogène pour certaines molécules (comme la teicoplanine) (Cremieux, JID, 1989) (Mghir, AAC, 1998).

L'efficacité clinique de l'antibiothérapie dépend aussi de la **précocité** de l'administration du traitement, et de l'**adéquation** du spectre des molécules choisies avec le(s) micro-organisme(s) identifié(s). Ainsi, en cas d'infection sévère, le risque de mortalité serait 4 fois plus élevé lorsque l'antibiothérapie initiale est inadéquate (Kollef, Chest, 1999). De même, le retard de l'antibiothérapie est un facteur de mauvais pronostic mesuré sur la mortalité et la durée de séjour (Ibrahim, Chest, 2000) (Iregui, Chest, 2002). Dans les études s'intéressant spécifiquement aux bactériémies à *Staphylococcus aureus*, les résultats sont discordants concernant l'impact d'une antibiothérapie inadaptée. Dans le cas

particulier d'une absence d'utilisation de la vancomycine lors d'une bactériémie à SARM, il s'agit peut-être d'un facteur de mauvais pronostic, mais ceci n'a été vérifié que pour des retards de plus de 40 H (Roghman, Arch. Int Med, 2000) (Lodise, CID, 2003).

## **B - Recommandations de traitement**

Certaines propositions d'antibiothérapie anti-staphylococcique sont ici rapportées. Des situations infectieuses particulières par leur gravité ou la fréquence de *S.aureus* ont été choisies.

Dans l'**endocardite staphylococcique**, les recommandations insistent surtout sur l'utilisation des pénicillines résistantes aux bêta-lactamases (groupe M), et de la vancomycine pour les souches résistantes aux bêta-lactamines et pour les patients allergiques. L'association avec un aminoside est proposée, en privilégiant la gentamicine, notamment pour le traitement des endocardites sur prothèses ou celui des endocardites du cœur droit ou dans les situations requérant l'utilisation de la vancomycine (Elliott, JAC, 2004) (Graham, JAC, 2002) (Baddour, Circulation, 2005).

Pour le traitement des **infections de cathéter**, lorsqu'une souche de *S.aureus* est identifiée, les recommandations de l'IDSA (Infectious Diseases Society of America) sont les suivantes (Mermel, CID, 2001) :

- « B-Lactam antibiotics should be first choice for parenteral treatment of *S. aureus* bacteremia when the isolate is susceptible;
- for patients with penicillin allergy without anaphylaxis or angioedema, first-generation cephalosporins, such as cefazolin, can be used without allergic response in 90%;
- for patients with serious allergy to  $\beta$ -lactams and for those with methicillin-resistant *S. aureus*, vancomycin is the drug of choice (A-II)
- Vancomycin should not be used when infection with  $\beta$ -lactam-susceptible *S. aureus* is diagnosed; excessive vancomycin use selects

vancomycin-resistant organisms; vancomycin has higher failure rates than do either oxacillin or nafcillin, and it results in slower clearance of bacteremia among patients with *S.aureus* endocarditis (D-III) ».

L'antibiothérapie probabiliste des **états septiques graves** a été abordée lors d'une conférence d'experts (SFAR, Conférence d'experts, 2004). Les infections pour lesquelles *S.aureus* est d'emblée suspecté sont surtout les endocardites et les infections sur cathéters. Les molécules recommandées rejoignent les propositions précédentes avec association systématique d'un aminoside (gentamicine ou nétilmicine). En effet les aminosides trouvent principalement leurs indications dans le traitement des états septiques graves, en particulier l'état de choc septique, et des infections endovasculaires.

Pour le traitement des **infections respiratoires basses** nosocomiales, l'ATS (American Thoracic Society) distingue dans ses recommandations, celles associées à un risque d'acquisition de bactéries résistantes aux antibiotiques. Dans ces cas, l'antibiothérapie doit prendre en compte le SARM comme étiologie possible, et comprendre la vancomycine ou le linézolide (ATS, AJRCCM, 2005).

### **C - Quelques exemples d'analyse des pratiques**

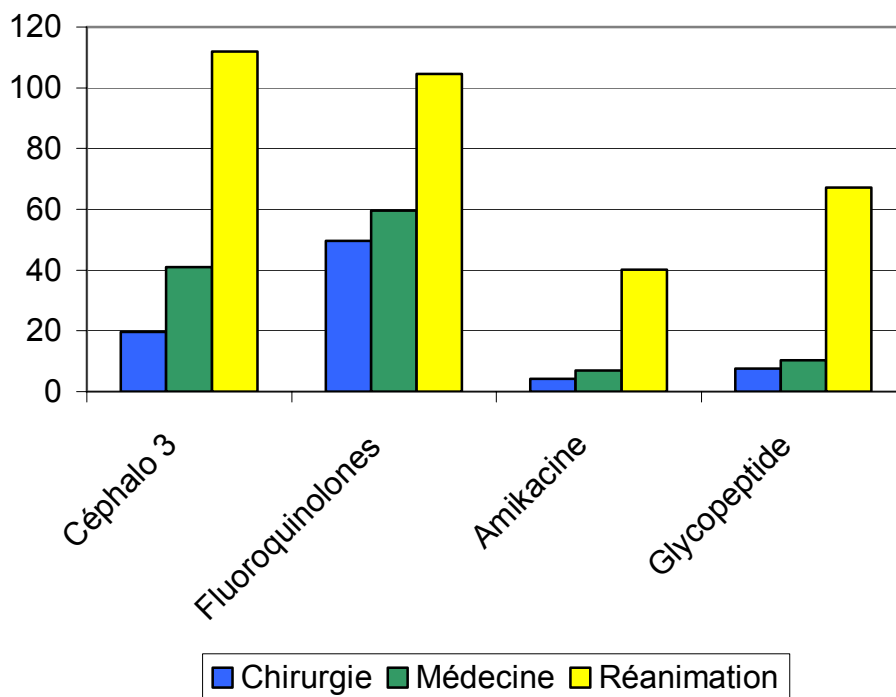
Sur la base de ces recommandations, formulées par les sociétés savantes de différentes spécialités, certains travaux s'attachent à évaluer les pratiques d'utilisation des antibiotiques. Plusieurs approches sont possibles.

Certaines méthodes d'évaluation sont **quantitatives**, mesurant la quantité d'antibiotique consommé (par famille ou molécule). Ainsi, certains chiffres précédemment cités (Leclercq, Med Thérap, 1997) montraient un accroissement de la consommation de vancomycine, durant une période où l'utilisation de cette molécule était encouragée, face à des taux croissants de SARM.

On peut également quantifier le nombre de prescriptions ou de patients traités. Ainsi, sur une mesure de prévalence (faite à l'occasion de l'enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales en 2001), le nombre de prescriptions d'antibiotiques est plus important dans les services de réanimation. Pour les

glycopeptides, très concernés dans le traitement des infections sévères à SARM, leur usage est largement dominant dans ces services (Aubry-Damon, BEH, 2004) (figure 3).

**Figure 3** : Prévalence des traitements antibiotiques (pour 1000 patients hospitalisés)



(D'après Aubry-Damon, BEH, 2004)

Une autre approche pour l'évaluation de l'usage des antibiotiques, est de **comparer les prescriptions aux recommandations en vigueur**. Ainsi, dans un précédent travail (Asseray, Med Mal Inf, 2002), 262 prescriptions, concernant 180 patients, ont été analysées. Le choix des molécules était inadéquat pour 29% des prescriptions initiales, et seules 36,7% de l'ensemble des prescriptions avait un score de conformité maximal. Dans cette étude, les molécules les plus utilisées étaient les bêta-lactamines (42% des prescriptions) et les fluoroquinolones (23%). Les erreurs de posologies concernaient principalement les aminosides et les glycopeptides, ainsi que l'imipénème. Là encore, les services les plus consommateurs de ces médicaments étaient les unités de réanimation (prévalence de période sur 7 jours : 55% de patients traités).

## Partie 4

### Les questions soulevées

Lors de la prise en charge d'une infection supposée staphylococcique, le clinicien se trouve donc confronté à certaines réalités qui rendent difficiles les décisions thérapeutiques :

- La gravité de ces infections reste d'actualité malgré l'avènement des antibiotiques, le pronostic vital ou fonctionnel est fréquemment engagé.
- La fréquence des résistances acquises aux bêta-lactamines ainsi qu'à d'autres familles d'antibiotiques réduit les choix thérapeutiques possibles.
- En situation septique grave, la précocité d'une antibiothérapie adéquate conditionne le pronostic. La décision de traitement doit donc être éclairée et ne peut être différée. On ne peut pas toujours attendre les résultats bactériologiques, et en particulier l'antibiogramme.
- L'usage des molécules classiquement actives sur l'ensemble des staphylocoques (comme les glycopeptides) doit être raisonné quantitativement et qualitativement, afin de limiter les risques de sélection.

Certaines questions restent posées :

- Quelle est l'efficacité des traitements probabilistes s'appuyant sur l'association de glycopeptide et d'aminoside ?
- Comment utiliser les résultats des tests *in vitro*, en particulier la mesure des CMI, pour choisir le meilleur traitement ?
- D'autres facteurs interviennent-ils dans l'effet des antibiotiques ?

Les objectifs des travaux de recherche menés dans le cadre de cette thèse ont donc été définis sur cette base.

- Mesure de l'activité antistaphylococcique des aminosides *in vivo*, corrélation avec les résultats obtenus *in vitro*, et validation de la lecture interprétative de l'antibiogramme.

- Mesure de l'activité antistaphylococcique *in vivo* des associations aminosides-vancomycine et aminosides-linezolid.
- Approche de l'activité anti-bactérienne des glycopeptides *in vivo* et *in vitro*.

Ainsi l'impact *in vivo* des phénotypes de résistance de *S.aureus* aux aminosides, fera l'objet du deuxième chapitre. Les méthodes de détermination *in vitro* des phénotypes de résistance aux aminosides ainsi que les caractéristiques du modèle utilisé pour l'évaluation *in vivo* y sont décrites. Les résultats permettant de mieux prédire l'effet antistaphylococcique des aminosides sont rapportés dans cette partie. Les associations d'aminoside avec les glycopeptides et le linézolide y figurent également.

La variabilité de l'activité des glycopeptides, détectée sur les résultats des premiers travaux, fera l'objet du troisième chapitre. L'étude des mécanismes d'échappement de certaines souches à l'activité *in vivo* des glycopeptides y est rapportée.

## Chapitre II

Activité antistaphylococcique des aminosides seuls et en association.  
Impact des mécanismes de résistance.

---

Avant de décrire les mécanismes de résistance de *S.aureus* aux aminosides, les méthodes d'évaluation de l'activité des antibiotiques utilisées dans ces travaux seront détaillées. Nous avons utilisé des méthodes de mesure *in vitro* de l'effet des antibiotiques, et le modèle d'endocardite du lapin pour l'évaluation *in vivo*. Ce modèle d'infection sévère a permis d'étudier l'impact de chaque phénotype de résistance de *S.aureus* sur l'activité de la gentamicine et de l'amikacine.

### Partie 1

#### Méthodes d'évaluation de l'activité des antibiotiques

##### Evaluation *in vitro*

L'activité des antibiotiques *in vitro* est approchée de deux manières, la bactériostase et la bactéricidie.

**La bactériostase** se définit par l'inhibition de la croissance bactérienne. Elle est mesurée dans des conditions standardisées : milieu de culture de composition constante (Müller - Hinton), pH constant (7.2), température constante. Ces conditions sont définies par l'EUCAST et le CA SFM. Pour mesurer l'activité bactériostatique des molécules étudiées dans ce travail, les méthodes habituelles de l'antibiogramme et des CMI ont été appliquées.

- **Antibiogramme** : méthode des disques en diffusion gélosée, avec lecture des diamètres et confrontation aux diamètres critiques selon les recommandations du CA SFM (CA SFM, communiqué, 2005).

- **CMI** : Concentration minimale inhibant la croissance de la souche, mesurée après 24H d'incubation. Deux méthodes ont été utilisées, dilution en milieu liquide (microméthode) et diffusion en milieu gélosé (bandelette E-test).

Ces deux paramètres, dont la reproductibilité est reconnue, sont largement utilisés en bactériologie de routine afin de rendre aux cliniciens un résultat potentiellement prédictif, de l'efficacité thérapeutique de chaque antibiotique, sur la bactérie identifiée comme cause de l'infection.

**La bactéricidie** se définit par une diminution quantitative des bactéries survivantes en contact avec l'antibiotique (mortalité bactérienne). Elle est au mieux mesurée par la méthode des cinétiques de bactéricidie ou courbes de mortalité bactérienne en fonction du temps (time-kill curves). Un inoculum bactérien calibré, mis en suspension, est exposé à une ou des concentrations d'antibiotique(s) définies. Les bactéries survivantes sont ensuite dénombrées à des temps déterminés au cours de l'expérimentation. Le dénombrement des bactéries survivantes a été fait par ensemencement sur gélose de 50µl du bouillon de culture bactérienne, pur et après dilution au 1/100 et au 1/10000. Ceci porte la limite inférieure de détection de la méthode à  $1.3 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$  (soit 20 UFC/mL) (Bactéricidie, Courvalin et col., 1990).

### Evaluation *in vivo*

C'est le modèle d'**endocardite du lapin** qui a été utilisé pour les expérimentations *in vivo* dans l'ensemble des travaux exposés dans cette thèse (Perlman, Yale J Biol Med, 1971). Le déroulement de l'expérimentation se décompose comme suit sur cinq jours, pour l'évaluation d'une durée de traitement de 2 jours.

**JO** : Introduction d'un cathéter en polyéthylène dans le ventricule gauche par ponction carotidienne. L'objectif est de léser la valve aortique afin de créer secondairement une endocardite sur cette valve. Cette intervention est réalisée sous anesthésie par kétamine (injection intramusculaire).

**J1** : Injection de 1ml d'un inoculum bactérien par voie intraveineuse périphérique (veine marginale de l'oreille).

**J2** :

1. Répartition au hasard des animaux dans les différents groupes, témoins et traitements antibiotiques.
2. Euthanasie des animaux témoins par injection de Thiopental<sup>®</sup>, thoracotomie, cardiectomie et prélèvement des végétations. Celles-ci sont ensuite pesées, puis broyées dans 0.5 mL de sérum physiologique. Plusieurs dilutions de cette suspension sontensemencées sur des géloses (à l'aide d'un ensemenceur en spirale), puis incubées 24 à 48H. Le nombre de colonies est dénombré, puis rapporté en nombre d'UFC par gramme de végétation.
3. L'antibiothérapie est débutée pour les groupes d'animaux traités. Les antibiotiques sont administrés par perfusion intraveineuse. La vitesse des pousse-seringues électriques est gérée par un logiciel permettant d'humaniser la pharmacocinétique des antibiotiques chez le lapin (Bugnon, Bull Math Biol, 1998). Cette méthode a déjà été utilisée au sein de notre équipe, en particulier pour évaluer *in vivo* l'activité des aminosides (Dubé, AAC, 2003).

**J3** : Poursuite des traitements intraveineux, renouvellement du contenu en antibiotique des seringues, selon les concentrations définies.

**J4** : Euthanasie des animaux traités. Prélèvements et traitement des végétations d'endocardite comme décrit pour les animaux témoins. La lecture des numérations bactérienne est faite 24 à 48H plus tard.

Parallèlement au prélèvement des végétations d'endocardite, des biopsies tissulaires ont été effectuées chez certains animaux. Celles-ci ont concerné le rein, la rate et le foie, d'animaux infectés par deux des souches étudiées. Ces biopsies ont subi le même traitement que les végétations d'endocardite. Les numérations bactériennes ont été établies de la même façon.

## Mise au point du modèle d'endocardite staphylococcique

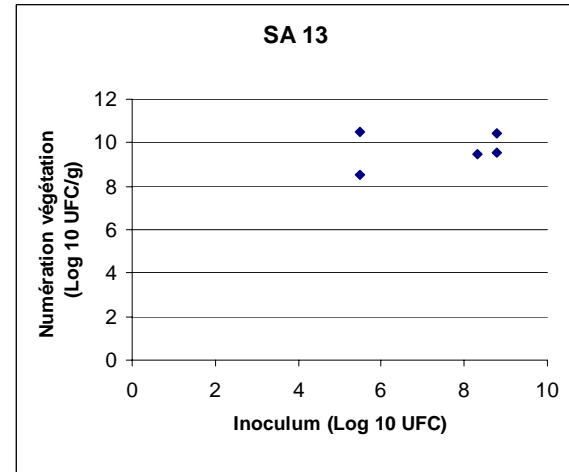
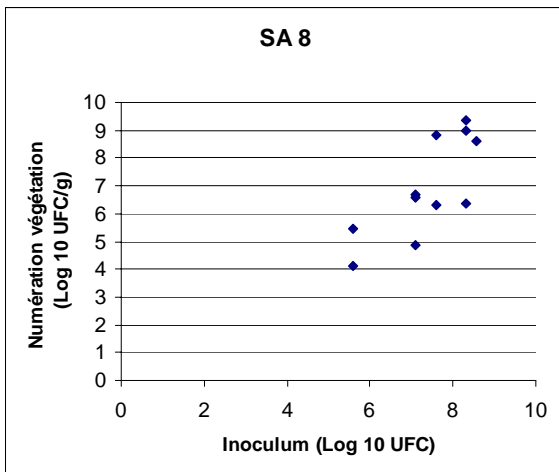
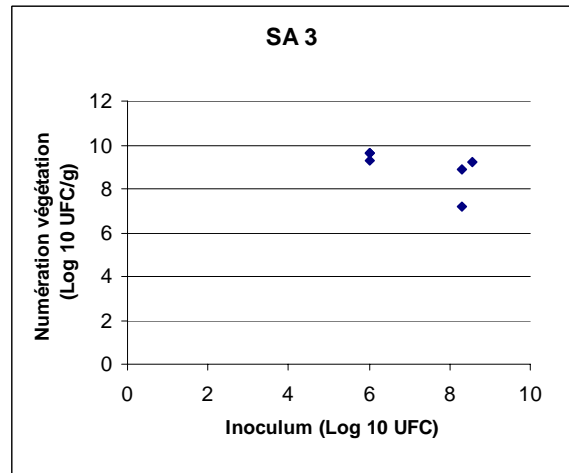
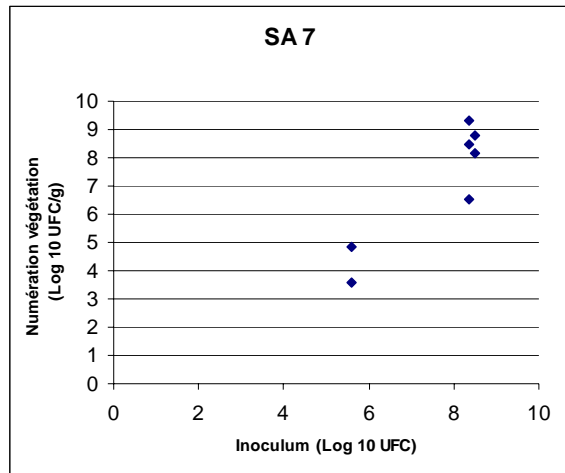
### **Calibrage de l'inoculum**

La densité bactérienne nécessaire pour induire une endocardite, et n'entraînant pas le décès des animaux dès les premières 24H, a été déterminée en testant plusieurs inoculum pour chaque souche étudiée (figure 4). A J1 l'injection était faite avec de  $10^6$  à  $10^9$  bactéries.

Pour deux des souches étudiées (SA 7 et SA 8) la numération bactérienne sur les végétations est dépendante de la taille de l'inoculum. Pour l'ensemble de ces quatre souches, et avec tous les inoculum testés, aucun décès n'est survenu dans les 24H suivant l'inoculation.

Sur la base de ces résultats, un inoculum de 0.8 Mac Farland (correspondant à environ 8 Log<sub>10</sub> UFC) a été utilisé pour les travaux ultérieurs sur ce modèle d'endocardite staphylococcique du lapin.

**Figure 4 :** Numérations bactériennes dans les végétations des animaux témoins en fonction de la taille de l'inoculum



### Un modèle d'infection sévère avec lésions tissulaires multiples

Les résultats des numérations bactériennes faites sur les tissus n'ont pas été publiés. Pour les animaux témoins, ils sont rapportés dans le tableau V. On montre ainsi que l'infection est d'emblée (24H après l'inoculation) systémique, avec atteinte de plusieurs viscères.

**Tableau V** : Numérations bactériennes sur les tissus, animaux témoins.

Souches	Tissus	Numérations bactériennes Log10 UFC/g (n)
SA 8	Rein	5.1 (2)
	Rate	5.4 (2)
	Foie	4.7 (2)
SA 13	Rein	6.2 (2)
	Rate	5.0 (2)
	Foie	5.9 (2)

Ceci permet de caractériser le modèle animal utilisé. Il s'agit d'une endocardite créée sur un cathéter, c'est-à-dire d'une infection endovasculaire sur matériel. Ce modèle est également un modèle d'infection staphylococcique sévère avec atteintes tissulaires multiples. L'évaluation de l'effet *in vivo* des antibiotiques a donc été faite dans des conditions septiques particulièrement difficiles, comparables aux situations cliniques d'infections difficiles à traiter.

## Partie 2

### Impact des mécanismes de résistance sur l'activité antistaphylococcique des aminosides

Les données épidémiologiques décrites montrent que plus de 30% des souches de *S.aureus* identifiées à l'hôpital sont résistantes à la méticilline (Cf tableau II) et présentent des résistances associées, en particulier aux aminosides. Les recommandations de traitement pour les infections à SARM reposent principalement sur les glycopeptides (la vancomycine le plus souvent). Lorsqu'une association est nécessaire, l'utilisation d'un aminoside est souvent privilégiée du fait de leur pouvoir bactéricide intense et rapide.

Pour évaluer la pertinence des recommandations thérapeutiques et discerner le meilleur choix du partenaire aminoside de l'antibiothérapie d'une infection à SARM, nous avons étudié *in vivo* l'impact des mécanismes de résistance aux aminosides.

#### A - Mode d'action des aminosides

L'activité anti-bactérienne des aminosides se décompose en plusieurs phases : une accumulation intracellulaire (en trois phases) précède la fixation sur la cible (Casin, Med Thérap, 1997).

- La première étape de la **pénétration intracellulaire** se fait par diffusion passive au travers du peptidoglycane. Elle est rapide et non spécifique. Les deux étapes suivantes (EDP I et II) sont des transports actifs à travers la membrane cytoplasmique. Ils nécessitent un apport d'énergie, et donc la présence d'ATP et d'une chaîne respiratoire. EDP I permet une lente accumulation dans le cytoplasme. La fixation progressive de la molécule sur sa cible entraîne une accélération du transfert de l'antibiotique au travers de la membrane cytoplasmique, EDP II est donc une phase d'accumulation rapide. Ces deux phases de transports actifs repose sur l'existence d'un gradient électrique transmembranaire, qui

est modifié par certains paramètres biochimiques de l'environnement bactérien, tel le pH, la présence d'O<sub>2</sub>...

- La phase d'accumulation rapide permet la saturation des **récepteurs ribosomaux** de ces molécules. Elles se fixent sur l'ARN 16S de la sous-unité 30S du ribosome bactérien, interférant dans la synthèse protéique au niveau du site A (site accepteur de l'ARNt). Il y a donc inhibition de la synthèse au stade d'initiation et d'élongation, avec synthèse de protéines non fonctionnelles, voire létales.

## B - Mécanisme de résistance des staphylocoques

L'inactivation enzymatique est le mécanisme prépondérant de résistance des staphylocoques aux aminosides. Le support est le plus souvent l'acquisition de matériel génétique plasmidique ou transposable. L'enzyme modifie la structure de l'aminoside et empêche sa fixation sur la cible, et inhibe donc la phase EDPII nécessaire à l'effet bactéricide de ces molécules (Casin, Med Thérap, 1997).

Enzymes modifiant les aminosides produites par *S. aureus*, classification et mode d'action. (Bismuth, Thèse, 1989) (Bismuth, L'antibiogramme, 1985).

Les enzymes modifiant les aminosides (EMAs) sont dénommées en fonction de la réaction chimique qu'elles catalysent :

- AAC = Amino-acyl-transférase (acétylation d'un groupement aminé)
- APH = Amino-phospho-transférase (phosphorylation d'un groupement hydroxyle)
- ANT (ou AAD) = Amino-nucléotidyl-transférase (adénylation d'un groupement hydroxyle)

*S.aureus* résiste aux aminosides par production de 5 enzymes connues.

- ANT (6') I : modifie la streptomycine
- ANT (9') I : modifie la spectinomycine
- APH (3') : modifie les aminosides contenant un groupe hydroxyle en position 3' (kanamycine, néomycine, et à un moindre degré, amikacine et isépamicine)
- ANT (4') : modifie les aminosides contenant un groupe hydroxyle en position 4' (kanamycine, tobramycine, amikacine, isépamicine)
- AAC (6')-APH(2'') : cette enzyme est bi-fonctionnelle car elle porte deux sites d'activité. L'extrémité NH<sub>2</sub> possède l'activité AAC (6') qui modifie la kanamycine, la tobramycine ainsi que la nétilmicine, l'amikacine, l'isépamicine et la gentamicine. L'extrémité COOH, possède l'activité APH (2'') qui modifie la kanamycine, la gentamicine, la tobramycine et la nétilmicine.

## Phénotypes de résistance et proposition de la lecture interprétative de l'antibiogramme

Pour l'amikacine (modifiée par ces trois enzymes) et la nétilmicine (modifiée par l'enzyme bi-fonctionnelle), la modification enzymatique ne se traduit pas par une altération de l'effet bactériostatique. Les CMI et les diamètres mesurés sur l'antibiogramme en diffusion gélosée ne permettent pas de détecter une résistance. Au contraire, pour la kanamycine, la tobramycine et la gentamicine, la modification enzymatique se traduit par une perte d'activité mesurable sur l'antibiogramme et les CMI. La résistance à ces dernières molécules est donc facilement détectable. Les phénotypes de résistance rencontrés chez *S.aureus*, sont définis sur la base des CMI et de l'antibiogramme standard en diffusion gélosée pour ces trois aminosides.

On décrit ainsi 3 phénotypes, associés à la production de chacune des 3 principales enzymes précédemment décrites.

- Phénotype K : Résistance à la kanamycine, correspond à la production d'une APH(3')III.
- Phénotype KT : Résistance à la kanamycine et à la tobramycine, correspond à la production d'une ANT(4').
- Phénotype KTG : Résistance à la kanamycine, la tobramycine, et la gentamicine, correspond à la production d'une enzyme bi-fonctionnelle.

De précédents travaux se sont attachés à évaluer *in vitro*, l'impact des enzymes sur l'activité bactéricide des aminosides qui restaient « apparemment » actifs sur l'antibiogramme (Bismuth, Thèse, 1989) (communications lors des 28<sup>ème</sup> (1988) et 29<sup>ème</sup> (1989) ICAAC).

Dans ces travaux, l'activité bactéricide des aminosides a été mesurée sur des souches de *S.aureus* dont le contenu plasmidique en EMAs avait au préalable été déterminé par hybridation. Cette évaluation a été faite selon la méthode des cinétiques de bactéricidie.

- Amikacine : activité bactéricide altérée pour chacun de ces trois phénotypes
- Nétilmicine : activité bactéricide altérée pour le phénotype KTG.

Ces résultats ont conduit le comité de l'antibiogramme à proposer une interprétation de l'antibiogramme de *S.aureus* aux aminosides. Ceci s'intègre dans le cadre de la lecture interprétative, qui est défini comme suit (extrait de CA SFM, communiqué, 2005) : « La lecture interprétative de l'antibiogramme, fondée sur la connaissance des phénotypes de résistance conduit dans certains cas à transformer un résultat initialement catégorisé S en résultat I ou R en raison d'un risque d'échec thérapeutique. (...) Ceci requiert au préalable l'identification correcte de la souche bactérienne et une méthode d'antibiogramme standardisée. L'identification formelle du (ou des) mécanisme(s) de résistance impliqué(s) impose la mise en place de techniques spécifiques. »

**Tableau VI** : Lecture et interprétation de l'antibiogramme des staphylocoques vis-à-vis des aminosides

Molécule	Charge du disque	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)		Interprétation
		S	R	S	R	
Kanamycine	30 UI	≤ 8	> 16	≥ 17	< 15	Interprétation valable pour : Néomycine, Framycétine, Paromomycine, <b>Amikacine</b> , <b>Isépamicine</b>
Gentamicine	10 UI (15µg)	≤ 1	> 1	≥ 20	< 20	Interprétation valable pour la <b>Nétilmicine</b> . Les souches résistantes à la Gentamicine sont résistantes à l'ensemble des aminosides (sauf Streptomycine)
Tobramycine	10µg	≤ 1	> 1	≥ 20	< 20	

Repris d'après : « Tableau X – Concentrations, diamètres critiques et règles de lecture interprétative pour *Staphylococcus* spp » (CA SFM, communiqué, 2005).

Ainsi l'interprétation se fait de la façon suivante : la kanamycine, la tobramycine et la gentamicine sont testées sur l'antibiogramme standardisé, et la sensibilité à l'amikacine et à la nétilmicine sont interprétées sur la base de ces résultats. Cependant, il n'existait aucune donnée permettant de déterminer si l'effet thérapeutique des aminosides *in vivo* était mieux prédit par les CMI (et l'antibiogramme) ou par les vitesses de bactéricidie.

### **C - Objectifs de l'étude**

Dans ce contexte épidémiologique, la question de la résistance des SARM à l'amikacine et à la gentamicine prend toute son importance. La résistance à la kanamycine doit-elle être considérée comme prédictive d'un échec clinique de l'amikacine lors du traitement d'une infection à SA ? Sur ces souches genta-S, plus fréquemment rencontrées, y a-t-il un bénéfice à recommander l'usage de la gentamicine ?

Le but de ce travail est donc de déterminer l'impact des phénotypes de résistances déterminés *in vitro* sur l'effet *in vivo* des aminosides, dans le modèle d'endocardite du lapin. Cette étude a fait l'objet d'une publication sous le titre « Different Aminoglycoside-Resistant Phenotypes in a Rabbit *Staphylococcus aureus* Endocarditis Infection Model » (Asseray, AAC, 2002).

### **D - Résultats**

#### *In vitro*

Quatre souches de *S.aureus*, dont le contenu plasmidique codant pour les enzymes modifiant les aminosides avait été préalablement déterminé par hybridation ont été étudiées (Bismuth, thèse, 1989). L'une ne portait pas d'enzyme modifiant les aminosides, et présentait un phénotype sauvage, sensible aux aminosides : S-SA (SA 3). Les trois autres étaient productrices d'une enzyme et présentaient respectivement les profils de résistance K, KT et KTG : K-SA (SA 7) productrice de APH(3'), KT-SA (SA 8) productrice de ANT(4'), et KTG-SA (SA 13) productrice de AAC(6')-APH(2'').

Les résultats des antibiogrammes et des CMI, rapportés dans le tableau VII, confirment ces phénotypes de résistance.

**Tableau VII** : Antibiogrammes (diamètre d'inhibition mesuré en mm) et CMI (en mg/l) des quatre souches étudiées vis-à-vis des aminosides

		S-SA (SA 3)	K-SA (SA 7)	KT-SA (SA 8)	KTG-SA (SA 13)
Kanamycine	Diamètre	27	6	14	6
	S/I/R	S	R	R	R
Amikacine	Diamètre	26	24	23	21
	CMI	1	1	8	8
	S/I/R	S	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>
	Interprétation	S	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>
Tobramycine	Diamètre	26	25	06	06
	CMI	0.5	0.25	16	64
	S/I/R	S	S	R	R
Gentamicine	Diamètre	27	26	22	06
	CMI	0.5	0.25	0.5	64
	S/I/R	S	S	S	R
Nétilmicine	Diamètre	32	30	26	25
	CMI	0.125	0.064	0.125	0.5
	S/I/R	S	S	S	<b>S</b>
	Interprétation	S	S	S	<b>R</b>

S/I/R : Sensible ; Intermédiaire ; Résistant

Interprétation selon les critères du CA SFM

## In vivo

Les résultats de l'étude *in vivo* sont rapportés dans le tableau VIII. Ils montrent pour les différents phénotypes étudiés que :

- dans les groupes traités par l'amikacine, une diminution significative du comptage bactérien dans les végétations, par rapport aux animaux témoins est observée seulement pour la souche S-SA (SA 3), sensible à tous les aminosides, c'est à dire ne produisant aucune enzyme.

- dans les groupes traités par la gentamicine, la diminution par rapport aux groupes témoins est significative sur toutes les souches, excepté KTG-SA (SA 13), productrice de l'enzyme bifonctionnelle. Aucun traitement n'est efficace sur cette souche.

- pour la souche S-SA (SA 3), l'amikacine et la gentamicine sont actives, et il existe une différence significative entre ces deux molécules, en faveur de la gentamicine.

- Les pourcentages d'animaux survivants ont été comparés entre les groupes gentamicine et amikacine pour la souche KT-SA (SA 8). Tous les animaux traités par amikacine sont morts (6/6), contre seulement 25% (2/8) dans le groupe gentamicine.

**Tableau VIII** : Effet *in vivo* des aminosides sur différents phénotypes de résistance de *S.aureus*.

Traitements	Numérations bactériennes dans les végétations (Log10 CFU/g $\pm$ SD) (n)			
	S-SA	K-SA	KT-SA	KTG-SA
Témoins	9.2 $\pm$ 0.5 (7)	7.9 $\pm$ 1.1 (7)	8.0 $\pm$ 1.4 (6)	9.7 $\pm$ 0.4 (5)
Gentamicine	2.4 $\pm$ 0.4 (5) <sup>a</sup>	3.3 $\pm$ 0.5 (5) <sup>c</sup>	4.6 $\pm$ 1.3 (8) <sup>d</sup>	9.7 $\pm$ 1.2 (5)
Amikacine	5.5 $\pm$ 0.4 (5) <sup>b</sup>	8.4 $\pm$ 1.3 (5)	NI	9.3 $\pm$ 1 (4)
Nétilmicine	ND	ND	ND	9.5 $\pm$ 1 (5)

Test de Sheffe :

a : p<0.0001 *versus* témoins et amikacine

b : p<0.0001 *versus* témoins et gentamicine

c : p=0.0009 *versus* control et p=0.0004 *versus* amikacine

d : p=0.03 *versus* control

n : nombre d'animaux par groupe

### Apports de résultats complémentaires (concernant la mortalité per-protocole)

La mortalité des animaux au cours du protocole expérimental a été relativement importante, ce qui est en rapport avec la sévérité du modèle infectieux utilisé dans ce travail. Les taux de mortalité en cours de protocole, après inoculation de trois des quatre souches, sont rapportés dans le tableau IX. Quelque soit la souche inoculée, aucun des animaux témoins n'est décédé dans les 24H suivant l'inoculation. Parmi les groupes d'animaux traités, pour la souche S-SA (SA 3), aucun décès n'était à déplorer. Pour les trois autres souches, le nombre d'animaux décédés en cours de traitement montre la gravité de l'infection induite dans ce modèle. Le taux de mortalité ne constituait pas le critère de jugement principal. Néanmoins pour une des souches, KT-SA (SA 8), la totalité des animaux traités par amikacine, sont décédés avant la fin du protocole, c'est donc sur ce critère que nous avons conclu à l'inefficacité de ce traitement.

**Tableau IX** : Nombre d'animaux décédés en cours de protocole

Souches	Traitement	<u>Nombre d'animaux décédés</u> <u>Nombre d'animaux vivants</u>
K-SA (SA 7)	Amikacine	0/5
	Gentamicine	1/5
	Vancomycine	0/8
	Vanco + Amika	1/9
	Vanco + Genta	2/6
KT-SA (SA 8)	Amikacine	6/0
	Gentamicine	2/8
	Vancomycine	2/6
	Vanco + Amika	1/7
	Vanco + Genta	1/4
KTG-SA (SA 13)	Amikacine	0/4
	Gentamicine	1/5
	Vancomycine	1/4
	Vanco + Amika	2/3
	Vanco + Genta	0/4

## **D - Conclusion : Validation de la lecture interprétative de l'antibiogramme**

On a donc pu affirmer, sur cette base, qu'il existe une corrélation entre la perte d'activité bactéricide (observée en cinétique de bactéricidie) et l'absence d'effet *in vivo*. Ces résultats ont été obtenus dans des conditions expérimentales particulières :

- Ce modèle mime une infection staphylococcique endovasculaire sévère, correspondant aux situations septiques les plus difficiles à traiter en pratique clinique
- Il permet également d'humaniser les pharmacocinétiques des molécules administrées (Bugnon, Bull Math, 1998), en suivant pour les aminosides la recommandation d'utilisation en dose unique journalière.

L'extrapolation de ces résultats à l'homme est donc possible. On peut considérer que l'inefficacité des aminosides constatée dans ce modèle expérimental est prédictive d'échec clinique. Ceci permet donc de valider la lecture interprétative de l'antibiogramme. Il s'agissait d'une étape nécessaire. L'activité *in vitro* (bactériostatique et/ou bactéricide) d'un antibiotique ne prédit pas nécessairement son effet *in vivo*.

# Different Aminoglycoside-Resistant Phenotypes in a Rabbit *Staphylococcus aureus* Endocarditis Infection Model

N. Asseray,<sup>1</sup> J. Caillon,<sup>1</sup> N. Roux,<sup>1</sup> C. Jacqueline,<sup>1</sup> R. Bismuth,<sup>2</sup> M. F. Kergueris,<sup>3</sup>  
G. Potel,<sup>1\*</sup> and D. Bugnon<sup>1</sup>

Laboratoire d'Antibiologie,<sup>1</sup> and Laboratoire de Toxicologie,<sup>3</sup> UER de Médecine, Nantes, and  
Service de Bactériologie, Hospital Pitié Salpêtrière, Paris,<sup>3</sup> France

ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY,  
May 2002, p. 1591–15939 Vol. 46, No. 5

## Different Aminoglycoside-Resistant Phenotypes in a Rabbit *Staphylococcus aureus* Endocarditis Infection Model

N. Asseray,<sup>1</sup> J. Caillon,<sup>1</sup> N. Roux,<sup>1</sup> C. Jacqueline,<sup>1</sup> R. Bismuth,<sup>2</sup> M. F. Kergueris,<sup>3</sup>  
G. Potel,<sup>1\*</sup> and D. Bugnon<sup>1</sup>

Laboratoire d'Antibiologie<sup>1</sup> and Laboratoire de Toxicologie,<sup>3</sup> UER de Médecine, Nantes, and  
Service de Bactériologie, Hospital Pitié Salpêtrière, Paris,<sup>3</sup> France

Received 26 June 2001/Returned for modification 18 November 2001/Accepted 25 January 2002

**The impact of different types of enzymatic resistance on the in vivo antibacterial activity of aminoglycosides (amikacin, gentamicin, and netilmicin) was studied in the rabbit endocarditis model with four strains of *Staphylococcus aureus*. Animals were treated in a manner simulating the administration of a single daily human dose. Amikacin had no effect on the three kanamycin-resistant strains despite apparent susceptibility in the disk diffusion test. Gentamicin appears to be the preferable aminoglycoside for treatment of staphylococcal infections.**

More than 40% of the *Staphylococcus aureus* strains isolated in hospitals are resistant to methicillin and show associated resistance to other antibiotics, especially aminoglycosides (8, 9, 11). The treatment of methicillin-resistant *S. aureus* infections is based principally on glycopeptides (mainly vancomycin). When combination therapy is required, aminoglycosides are used because of their rapid and intense killing power (16, 17, 21). Enzymatic inactivation is the major mechanism of *S. aureus* resistance to aminoglycosides (15, 19). Three types of enzymes, APH(3'), ANT(4'), and APH(2')-AAC(6') are involved, respectively, in resistance to kanamycin (K<sup>r</sup>), kanamycin and tobramycin (KT<sup>r</sup>), and kanamycin, tobramycin, and gentamicin (KTG<sup>r</sup>) (1, 12). Other aminoglycosides are also modified by these enzymes; namely, netilmicin is modified by APH(2')-AAC(6') and amikacin is modified by all three enzymes, whereas their bacteriostatic activity against *S. aureus* is preserved (1, 2; R. Bismuth, J. R. Pirault, H. Drugeon, and P. Courvalin, 29th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. 705, 1989).

The purpose of this in vivo study in a rabbit *S. aureus* endocarditis infection model was to assess the impact of these enzymes on the antibacterial activity of amikacin and gentamicin, alone or in combination with a cell wall-active antibiotic (such as vancomycin), and to determine whether a disk diffusion test can indicate the most suitable aminoglycoside with which to combat a staphylococcal infection.

Four *S. aureus* strains were studied; they were isolated from different clinical samples kindly supplied by R. Bismuth. Two of them were methicillin resistant (MecA<sup>+</sup>), and the other two were methicillin susceptible (MecA<sup>-</sup>). A previous hybridization study (R. Bismuth, unpublished data) showed that the plasmid content of these strains coded for enzymes modifying aminoglycosides. One carried no enzyme and displayed a susceptible wild-type phenotype (S-SA, methicillin resistant). The

other three produced an enzyme: APH(3')-producing K-SA (methicillin susceptible), ANT(4')-producing KT-SA (methicillin resistant), and AAC(6')-APH(2')-producing KTG-SA (methicillin susceptible). Disk diffusion tests were performed in accordance with the standard agar plate method recommended by a committee of the French Society for Microbiology (5). Mueller-Hinton media, in which calcium (50 mg/liter) and magnesium (25 mg/liter) had been adjusted, were seeded with a 10<sup>6</sup>-CFU/ml suspension and read after a 24-h incubation at 37°C. The MIC was determined by microdilution in liquid medium (6) after a 24-h incubation at 37°C. Strains were rated as susceptible, intermediate, or resistant with respect to zone diameters and critical concentrations (5). The same method was used to determine the MIC of vancomycin for each strain.

Aortic endocarditis (14) was induced in female New Zealand rabbits by insertion of a polyethylene catheter into the left ventricle, followed 24 h later by intravenous inoculation of 10<sup>8</sup> CFU of each *S. aureus* strain. Twenty-four hours after inoculation, control animals were sacrificed and treatments for a 48-h period were begun. Five treatments were studied: gentamicin (Shering-Plough Laboratories, Levallois-Perret, France), amikacin (Bristol-Myers Squibb Laboratories, Paris-La Défense, France), vancomycin (Lilly Laboratories, St-Cloud, France), and the combinations gentamicin-vancomycin and amikacin-vancomycin. Netilmicin (Shering-Plough Laboratories, Paris, France) was only modified by the bifunctional enzyme and was thus tested only on the KTG-SA strain in order to validate the results observed with gentamicin on this strain. Aminoglycosides were administered to rabbits in a single daily dose, in agreement with current recommendations concerning the best dosage regimen for these drugs (7, 10, 12, 18), simulating the kinetics of a human dosage of amikacin of 15 mg/kg/day, of gentamicin of 3 mg/kg/day, or of netilmicin of 6 mg/kg/day, by using a computerized system of automatic syringes managed by software to adapt the infusion rate. Vancomycin was administered at a constant intravenous infusion rate in order to simulate a total human dose of about 30 mg/kg, allowing the achievement of a steady-state concentration of around 25 mg/liter of serum. After sacrifice, thoracotomy, and cardiectomy,

\* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire d'Antibiologie Clinique et Expérimentale, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, 44000 Nantes, France. Phone: (33) 2 40 41 28 54. Fax: (33) 2 40 41 28 54. E-mail: gpotel@sante.univ-nantes.fr.

TABLE 1. Results of in vitro tests for each of the four strains studied

Strain	Diam (mm), MIC (mg/liter), susceptibility <sup>a</sup>				Vancomycin MIC (mg/liter)
	Amikacin	Tobramycin	Gentamicin	Netilmicin	
S-SA	26, 1, S	26, 0.5, S	27, 0.5, S	32, 0.125, S	1
K-SA	24, 1, S	25, 0.25, S	26, 0.25, S	30, 0.064, S	0.5
KT-SA	23, 8, S	6, 16, R	22, 0.5, S	26, 0.125, S	0.5
KTG-SA	21, 8, S	6, 64, R	6, 64, R	25, 0.5, S	1

<sup>a</sup> S, susceptible; R, resistant.

endocarditis vegetations were removed, pulverized, stored in ice, and ultimately ground in a 0.5-ml volume of a saline solution. The homogenate obtained was then spread on Tryptcase-soja agar plates in pure form or after a 1:100 or 1:1,000 dilution by using a Spiral seeder (Interscience). After a 24-h incubation at 37°C, colonies were counted and the results were expressed in log<sub>10</sub> CFU per gram of vegetation. The sensitivity limit of this method was one colony for 50 µl seeded.

Assays of aminoglycoside concentrations in serum were performed at the peak (30 min after the start of infusion) and trough (24 h after administration) points. The immunoenzymatic method performed with a COBAS MIRA unit used EMIT reagents (Behring Diagnostics Inc., Cupertino, Calif.) for amikacin (detection threshold, 1 mg/liter; coefficient of variation, 3.9%) and gentamicin (detection threshold, 0.3 mg/liter; coefficient of variation, 2.7 to 6.7%) and TDx/TDxFLx reagent (Abbott) for netilmicin (detection threshold, 0.85 mg/liter; coefficient of variation, 2.7 to 3.1%). Vancomycin assays were performed at the time of sacrifice (steady state) by the same method with EMIT reagents (detection threshold, 2.5 mg/liter; coefficient of variation, 4.1 to 6.9%).

The main judgment criterion was the number of surviving bacteria in vegetations (expressed in log<sub>10</sub> CFU per gram). The efficacy of the different therapeutic regimens for each strain was first determined by analysis of variance (ANOVA). Pairwise comparison by Scheffe's test was then performed when ANOVA showed a significant difference (Statview; Abacus Concepts, Berkeley, Calif.). For the group infected with KT-SA, a Fisher exact test allowed comparison of the rates of surviving animals.

The results of the disk diffusion tests and the MICs for the four strains are shown in Table 1. All four strains were susceptible to amikacin and netilmicin. Table 2 shows the results of experimental endocarditis due to the four strains expressed as the mean log<sub>10</sub> CFU per gram of vegetation ± the standard deviation. In groups treated with amikacin, a significant decrease in the bacterial count in vegetations, compared to control animals, was observed only for S-SA strains sensitive to all antibiotics, i.e., those not producing an enzyme. In groups treated with gentamicin, the decrease compared to the controls was significant for all of the strains except KTG-SA (which produced the bifunctional enzyme). No treatment was effective against this strain. Amikacin and gentamicin were active against S-SA, with the latter producing a significant difference. A comparison of the percentages of surviving animals infected with the KT-SA strain showed that all six of the animals treated with amikacin had died versus only 25% (two of eight) of the gentamicin-treated group ( $P = 0.0009$ ; Fisher exact test). No

synergy was exhibited when vancomycin was combined with gentamicin or amikacin. Vancomycin alone was active in vivo only against the S-SA and K-SA strains.

The results of antibiotic assays for the peak and trough concentrations of aminoglycosides and the steady-state concentration of vancomycin confirm that the objectives set were reached. The peak and trough concentrations in serum, respectively, were as follows: amikacin,  $49.5 \pm 1.6$  and  $1.2 \pm 0.5$  mg/liter; gentamicin,  $15.8 \pm 1.2$  and  $1.2 \pm 0.2$  mg/liter; netilmicin,  $45.7 \pm 4.3$  and  $0.3 \pm 0.1$  mg/liter. The steady state concentration of vancomycin in serum was  $22.3 + 8.7$  mg/liter. Under our experimental conditions, the apparent aminoglycoside elimination half-times and concentration peaks were close to those observed in humans (4).

Studies on the resistance of *S. aureus* to aminoglycosides have defined the enzymatic mechanisms involved and characterized the enzymes in terms of molecular structure, substrate spectrum, and epidemiology (3, 8, 11, 15, 19, 20). The presence of enzymes has been correlated with different resistance phenotypes defined by MICs (13). However, the impact of the enzymatic modification of aminoglycosides on their killing effect both in vitro and in vivo has rarely been investigated, particularly for amikacin and netilmicin. A reduction of the bactericidal activity of these antibiotics in vitro in the presence of an enzyme and a loss of synergy during associations with vancomycin or oxacillin have been reported, including the strains used in this study (2; R. Bismuth, F. Verme, H. Drugeon, and P. Courvalin, 28th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. 1331, 1988). These two studies used the time-kill curve method to evaluate the early bactericidal effect of aminoglycosides on *S. aureus*. They indicated that the killing effect of amikacin and netilmicin is reduced in the presence of enzymes that modify aminoglycosides but dissociated from the bacteriostatic activity shown in disk diffusion tests. This dissociation led these authors to propose an interpretive reading of the tests (1, 2; Bismuth et al., 29th ICAAC). They suggested that enzyme-induced modifications compromise the

TABLE 2. Results obtained in vivo after 48-h treatment of the four strains studied

Regimen	Mean log CFU/g of vegetation ± SD (no. of rabbits)			
	S-SA	K-SA	KT-SA	KTG-SA
Control	9.2 ± 0.5 (7)	7.9 ± 1.1 (7)	8.0 ± 1.4 (6)	9.7 ± 0.4 (5)
Gentamicin	2.4 ± 0.4 (5) <sup>a</sup>	3.3 ± 0.5 (5) <sup>c</sup>	4.6 ± 1.3 (8) <sup>d</sup>	9.7 ± 1.2 (5)
Amikacin	5.5 ± 0.4 (5) <sup>b</sup>	8.4 ± 1.3 (5)	NI <sup>i</sup> (6)	9.3 ± 1.0 (4)
Netilmicin	ND <sup>j</sup>	ND	ND	9.5 ± 1.0 (6)
Vancomycin	3.3 ± 1.5 (5) <sup>e</sup>	3.5 ± 1.5 (8) <sup>e</sup>	6.6 ± 1.6 (6) <sup>h</sup>	8.9 ± 1 (4) <sup>h</sup>
Vancomycin + gentamicin	3.0 ± 0.9 (7) <sup>e</sup>	3.1 ± 0.8 (6) <sup>e</sup>	4.7 ± 1.9 (7) <sup>f</sup>	9.1 ± 0.6 (3) <sup>e</sup>
Vancomycin + amikacin	2.6 ± 0.8 (4) <sup>e</sup>	4.1 ± 1.5 (9) <sup>e</sup>	7.7 ± 0.8 (4) <sup>e</sup>	8.4 ± 0.9 (3) <sup>e</sup>

<sup>a</sup>  $P < 0.0001$  versus control and amikacin (Scheffe's test after ANOVA).

<sup>b</sup>  $P < 0.0001$  versus control and gentamicin.

<sup>c</sup>  $P = 0.0009$  versus control and  $P = 0.0004$  versus amikacin.

<sup>d</sup>  $P = 0.03$  versus control.

<sup>e</sup> No difference between vancomycin alone and each combination.

<sup>f</sup> No difference between gentamicin alone and each combination.

<sup>g</sup>  $P < 0.05$  versus control.

<sup>h</sup> No difference versus control.

<sup>i</sup> ND, not done.

<sup>j</sup> NI, not interpretable (all of the animals in this group died).

therapeutic effect during clinical applications, even though studies indicate that bacteria are just as sensitive to the antibiotic. Our *in vivo* results obtained with amikacin and netilmicin, which confirm that the loss of bactericidal activity *in vitro* corresponds to that *in vivo*, tend to validate this line of reasoning. The loss of kanamycin activity observed in disk diffusion tests was predictive of a loss of amikacin efficacy *in vivo*, despite the apparent susceptibility of bacteria to this aminoglycoside. The absence of gentamicin activity in disk diffusion tests was predictive of resistance to gentamicin, amikacin, and netilmicin.

In the present study, the human pharmacokinetics of aminoglycosides was simulated in the rabbit (18). Thus, the results obtained are more predictive of the efficacy of treatments used in severe septicemic *S. aureus* infection. Based on the results of this study, a clinical indication of amikacin in the context of an acute infection with *S. aureus* cannot be maintained, despite the apparent sensitivity shown in disk diffusion tests. Conversely, gentamicin can provide a real therapeutic benefit against strains with a  $K^r$  or  $KT^r$  phenotype. Moreover, the greater *in vivo* efficacy of gentamicin against the strain with a sensitive phenotype seems to confirm that this aminoglycoside is preferable for the treatment of staphylococcal infections. To our knowledge, this is the first *in vivo* evidence of the validity of the interpretation proposed by Bismuth et al. (1; Bismuth et al., 29th ICAAC). However, the resistance of strains with a  $KTG^r$  phenotype to gentamicin precludes the use of an aminoglycoside against infections with these strains.

#### REFERENCES

1. Bismuth, R. 1985. Cocci à Gram positif et aminosides, p. 29–39. In P. Courvalin, F. Goldstein, A. Philippon, and J. Sirot (ed.), *L'Antibiogramme*. MPC-Vigot, Paris, France.
2. Bismuth, R., and J. Caillon. 1990. Staphylocoques, p. 187–212. In P. Courvalin, H. B. Drugeon, J. P. Flandrois, and F. Goldstein, (ed.), *Bactéricidie*. Maloine, Paris, France.
3. Bongaerts, G. P. A., and J. S. Vliegthart. 1988. Effect of aminoglycoside concentration on reaction rates of aminoglycoside-modifying enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**:740–746.
4. Bugnon, D., G. Potel, J. Caillon, D. Baron, H. B. Drugeon, M. F. Kergeris, and P. Feigel. 1998. *In vivo* simulation of human pharmacokinetics in the rabbit. *Bull. Math. Biol.* **60**:545–567.
5. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. 1999. Communiqué 1999. *Pathol. Biol.* **45**:I–XII.
6. Courvalin, P., F. Goldstein, A. Philippon, and J. Sirot. 1985. Fiches techniques. Préparation d'une gamme d'antibiotique, Détermination de la concentration minimale inhibitrice en milieu liquide, p. 189–192. In P. Courvalin et al. (ed.), *L'antibiogramme*. MPC-Vigot, Paris, France.
7. Cremieux, A. C., and C. Carbon. 1992. Pharmacokinetic and pharmacodynamic requirements for antibiotic therapy of experimental endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:2069–2074.
8. Lelièvre, H., G. Lina, M. E. Jones, C. Olive, F. Forey, M. Roussel-Delvallez, M. H. Nicolas-Chanoine, et al. 1999. Emergence and spread in French hospitals of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with increasing susceptibility to gentamicin and other antibiotics. *J. Clin. Microbiol.* **37**:3452–3457.
9. Lemaitre, N., W. Sougakoff, A. Masmoudi, M. H. Fievet, R. Bismuth, and V. Jarlier. 1998. Characterization of gentamicin-susceptible strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* involved in nosocomial spread. *J. Clin. Microbiol.* **36**:81–85.
10. Moore, R. D., and P. S. Lietman. 1987. Clinical response to aminoglycoside therapy: importance of the ratio of peak concentration to minimal inhibitory concentrations. *J. Infect. Dis.* **155**:93–99.
11. Mulligan, M., K. Murray-Leisure, B. Ribner, H. Standiford, J. John, J. Korvick, C. Kauffman, and V. Yu. 1993. Methicillin-resistant *S. aureus*: a consensus review of microbiology, pathogenesis, and epidemiology, with implications for prevention and management. *Am. J. Med.* **94**:313–328.
12. Munckhof, W., L. Grayson, and J. Turnidge. 1996. A meta-analysis of studies on the safety and efficacy of aminoglycosides given either once daily or as divided doses. *J. Antimicrob. Chemother.* **37**:645–663.
13. Ounissi, H., E. Derlot, C. Carlier, and P. Courvalin. 1990. Gene homogeneity for aminoglycoside-modifying enzymes in gram-positive cocci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:2164–2168.
14. Perlman, B., and L. Freedman. 1971. Experimental endocarditis II. Staphylococcal infection of the aortic valve following placement of a polyethylene catheter in the left side of the heart. *Yale J. Biol. Med.* **44**:206–213.
15. Phillips, I., A. King, and K. Shannon. 1986. Prevalence and mechanisms of aminoglycoside resistance. a ten-year study. *Am. J. Med.* **80**:48–55.
16. Salauze, D., and J. Davies. 1990. Mécanismes moléculaires de la bactéricidie: aminosides, p. 23–34. In P. Courvalin, H. B. Drugeon, J. P. Flandrois, and F. Goldstein (ed.), *Bactéricidie*. Maloine, Paris, France.
17. Shanson, D. 1998. New guidelines for antibiotic treatment of streptococcal, enterococcal and staphylococcal endocarditis. *J. Antimicrob. Chemother.* **42**:292–296.
18. Tam, V., P. McKinnon, D. Levine, S. Brandel, and M. Rybak. 2000. Once-daily aminoglycoside in the treatment of *Enterococcus faecalis* endocarditis: case report and review. *Pharmacotherapy* **20**:1116–1119.
19. Ubukata, K., N. Yamashita, A. Gotoh, and M. Konno. 1984. Purification and characterization of aminoglycoside-modifying enzymes from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **25**:754–759.
20. Vanhoof, R., E. Hannecart-Pokorni, and J. Content. 1998. Nomenclature of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:483.
21. Wilson, W., A. Karchmer, A. Dajani, K. Taubert, A. Bayer, D. Kaye, et al. 1995. Antibiotic treatment of adults with infective endocarditis due to streptococci, enterococci, staphylococci, and HACEK microorganisms. *JAMA* **274**:1706–1713.

## Partie 3

### A propos de l'effet *in vivo* des aminosides en association

#### Association avec la vancomycine

Au-delà de l'activité propre des aminosides, la question de leur effet en association avec d'autres antibiotiques reste posée. Sur les recommandations précédemment citées, la vancomycine est le plus souvent proposées en association avec la gentamicine pour le traitement d'infections documentées ou supposées à SARM. L'impact des phénotypes de résistances aux aminosides sur une éventuelle synergie devait donc être exploré. Pour répondre à cet objectif, la vancomycine a été testée dans le même modèle, sur les mêmes souches de *S.aureus* (Asseray, AAC, 2002). Cet antibiotique a été administré chez le lapin en respectant les recommandations d'usage en thérapeutique (concernant le mode d'administration et les concentrations plasmatiques visées).

Dans les résultats de cette étude, aucune synergie n'a été mise en évidence. Les numérations bactériennes sur les végétations des animaux traités en bithérapie ne sont pas significativement plus basses qu'en monothérapie (en comparant à chaque fois avec la monothérapie la plus performante). Cependant les comptes bactériens obtenus sous monothérapie par gentamicine (mise à part la souche SA-KTG ou SA 13) étaient proches de la limite inférieure de détection de cette méthode, qui correspond à la stérilité des milieux de cultures après 48H d'incubation. Cette limite dépend du poids de la végétation (la sensibilité de la méthode augmente avec le poids). Elle peut être calculée à 2 Log<sub>10</sub> UFC/g pour une végétation de 10mg. Ceci montre à quel point il est mal aisé de mettre en évidence une synergie dans ce modèle. La réponse, ou l'absence de réponse, à cet objectif dans ces résultats doit donc être interprétée avec prudence.

## Association avec le linézolide

Ce nouvel antibiotique, première molécule d'une nouvelle famille (Oxazolidinones), dont le spectre comprend essentiellement les cocci à Gram positif, est proposé pour le traitement des infections broncho-pulmonaire ou cutanées, à SARM ou entérocoque vanco-R (Leclercq, MMI, 2002). Il a au préalable été testé *in vitro* par la méthode des cinétiques de bactéricidie, vis à vis de souches SARM, en association avec plusieurs autres molécules, dont la gentamicine (Jacqueline, JAC, 2003). Dans ce travail, il existait un antagonisme avec effet dominant du linézolide, inhibant la bactéricidie précoce de la gentamicine. Un autre antagonisme était décrit dans les résultats de ce travail, avec la vancomycine. A cette étape de recherche, établir des propositions de traitement en association pour cette nouvelle molécule nécessitait de confirmer *in vivo* ces antagonismes.

Ce travail de recherche a été mené *in vivo* sur le même modèle d'endocardite staphylococcique de lapin. Deux souches ont été étudiées, parmi les quatre de l'étude faite *in vitro*, dont une issue de l'étude précédente (SA 8 ou NA 8). Les résultats montrent une synergie entre le linézolide et la gentamicine (traitement de 3 jours) sur cette dernière. En effet, les résultats obtenus avec la monothérapie de gentamicine sont comparables à ceux du précédent travail, et ceux obtenus avec l'association atteignent la limite inférieure de détection de la méthode. Pour l'autre souche testée (P9), bien que les résultats de l'association soient excellents dans ce modèle, on ne peut mettre en évidence une différence avec le groupe traité par gentamicine seule. Cependant la qualité des résultats obtenus avec cette bithérapie (100% de végétations stériles avec l'association, sur les deux souches testées), nous éclaire sur l'intérêt en thérapeutique clinique de cette association (Jacqueline, Int J Antimicrob agents, 2004).

Dans ce travail, la perte de bactéricidie de la gentamicine associée au linézolide n'était pas corrélée à une diminution d'activité *in vivo*, il y a au contraire une probable synergie. Ces travaux confirment la difficulté d'interprétation des tests évaluant *in vitro* l'activité des antibiotiques. Dans ce cas, la modélisation expérimentale était de nouveau une étape nécessaire pour pouvoir formuler des

recommandations d'usage clinique. Ce type de travail est donc à intégrer dans l'évaluation des nouvelles molécules au moment de leur entrée dans les recommandations thérapeutiques. Les antibiotiques dont l'usage est déjà ancien sont également concernés, afin de mieux définir leurs indications en fonction des phénotypes de résistances détectés *in vitro*, et de définir les associations thérapeutiques les plus efficaces.

In vivo efficacy of linezolid in combination with gentamicin  
for the treatment of experimental endocarditis due to  
methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Cedric Jacqueline, Nathalie Asseray, Eric Batard, Virginie Le Mabeccque,  
Marie-France Kergueris, Laurent Dube, Denis Bugnon, Gilles Potel, Jocelyne Caillon

Laboratoire d'Antibiologie (UPRES EA-1156), UER de Médecine, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes Cedex 01,  
France

International Journal of Antimicrobial Agents 24 (2004) 393–396

Short Communication

# In vivo efficacy of linezolid in combination with gentamicin for the treatment of experimental endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Cedric Jacqueline, Nathalie Asseray, Eric Batard, Virginie Le Mabecque, Marie-France Kergueris, Laurent Dube, Denis Bugnon, Gilles Potel\*, Jocelyne Caillon

Laboratoire d'Antibiologie (UPRES EA-1156), UER de Médecine, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes Cedex 01, France

Received 4 February 2004; accepted 4 March 2004

## Abstract

Indifference or even antagonism has mainly been reported with combinations including linezolid. The presence of in vitro antagonism is not always correlated with in vivo failure. The purpose of this study was to evaluate the in vivo activity of linezolid combined with gentamicin using a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) endocarditis experimental model. A human-like pharmacokinetic simulation was used for linezolid and gentamicin to improve the extrapolation of the results to human therapy. Contrary to the antagonism previously described in vitro, linezolid combined with gentamicin exhibited bactericidal activity on the two strains with a decrease of at least  $4 \log_{10}$  cfu/g of vegetation compared with controls. These data suggest that linezolid plus gentamicin could be an appropriate combination for the treatment of severe MRSA infections.

© 2004 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

**Keywords:** Oxazolidinones; Animal models; Antibiotic combinations; *S. aureus*

## 1. Introduction

Oxazolidinones are a novel class of synthetic antimicrobial agents chemically unrelated to any commercially available antibiotics. Linezolid, the first drug issued from this class, is active against Gram-positive bacteria and displays non-bactericidal, time-dependent activity in vitro on staphylococci [1]. Linezolid binds to the 50S subunit of the prokaryotic ribosome and prevents the formation of the initiation complex for protein synthesis [2]. The drug's antibacterial spectrum includes difficult pathogens such as vancomycin-resistant enterococci, *Streptococcus pneumoniae*, coagulase-negative staphylococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [1].

Antimicrobial combination therapy must often be used in severe infections to provide broad-spectrum coverage, to decrease the emergence of resistant strains and to increase the antibacterial activity of an antimicrobial agent used alone

[3]. Moreover, the use of synergistic antibiotic combinations is an appealing way to optimize therapy for infective endocarditis, especially when the causative pathogen is resistant (such as MRSA) [4]. In a previous in vitro study using the time-kill curves method [5], antagonism was observed with the linezolid-gentamicin combination, mainly on the early bactericidal activity of the aminoglycoside. The linkage between the presence of in vitro synergism or antagonism and in vivo correlation or enhanced clinical outcome is not easy to highlight. In vivo antagonism has rarely been documented in the literature [6], compared with the large number of reports of in vitro antagonism. The experimental endocarditis model allows accurate evaluation of treatments with one drug versus combination therapy regimens, with respect to bacterial killing and/or clearance from target tissues [4].

The present study used a rabbit endocarditis model to evaluate the in vivo activity of linezolid combined with gentamicin against two strains of MRSA. A human pharmacokinetic simulation was used for both antibiotics to improve the analysis of in vivo activity and the extrapolation of results to human therapy.

\* Corresponding author. Tel.: +33 240 41 2854; fax: +33 240 41 2854.  
E-mail address: gpotel@sante.univ-nantes.fr (G. Potel).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strains

Two methicillin-resistant *S. aureus* strains were studied. Both strains (NA8 and P9) were clinical strains isolated from blood cultures.

### 2.2. Antibiotics

Linezolid and gentamicin were supplied by Pharmacia Upjohn (Kalamazoo, Mich.) and Schering-Plough laboratories (Paris, France), respectively.

### 2.3. MICs determination

MICs were performed in Mueller-Hinton (MH) broth, in which calcium (50 mg/L) and magnesium (25 mg/L) had been adjusted, using the microdilution technique [7]. The MIC was defined as the lowest concentration of an antimicrobial agent preventing turbidity after 24 h incubation at 37 °C.

### 2.4. Animals

In vivo studies were carried out with New Zealand white rabbits (CEGAV, St. Mars d'Egrenne, France) weighing approximately 2.0–2.5 kg. All the animal studies were carried out in accordance with the scientific procedures act (animals) 1986 and the Code of Practice for the Housing and Care of Animals used in Scientific Procedures 1989. The experimental protocol was approved by the Unité de Thérapeutique Expérimentale of the Medicine School of Nantes.

### 2.5. Endocarditis model

Aortic endocarditis [8] was induced in rabbits by insertion of a polyethylene catheter into the left ventricle, followed 24 h later by intravenous inoculation of  $10^8$  cfu of *S. aureus*. 24 h after infection, treatments for a 3-day period were begun. Experiments were limited to 3–5 days for ethical reasons. Animals were randomly assigned to no treatment (controls), linezolid regimen mimicking the human dose of 10 mg/kg/12 h (intermittent dosing), gentamicin regimen mimicking the once-daily human dose of 3 mg/kg (intermittent dosing), or the combination of linezolid plus gentamicin. In France, gentamicin is usually administered 3–4 mg/24 h divided into two doses. After sacrifice, aortic valve vegetations were excised and placed immediately on ice. The samples were then weighed, homogenized in 0.5 mL of saline buffer and plated on MH agar plates using a spiral system. Dilutions at  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ , and  $10^{-4}$  were performed to eliminate potential carry-over effects. Viable counts after 24 h incubation at 37 °C were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (S.D.)  $\log_{10}$  cfu/g of vegetation. The lower detection limit for this method is 1 cfu/50  $\mu$ L

of undiluted vegetation homogenate. To determine whether linezolid and gentamicin regimens could induce the selection of in vivo resistant variants, undiluted vegetation homogenates were spread on agar plates containing linezolid or gentamicin at concentrations corresponding to  $4 \times$  MIC. Bacterial counts were performed after 24 and 48 h incubation at 37 °C.

### 2.6. Pharmacokinetic studies

Blood samples for pharmacokinetic analysis were obtained from animals through a catheter positioned in the median artery of the ear contralateral to drug infusion. The linezolid assay was performed by HPLC (lower detection limit: 0.1 mg/L; coefficient of variation: <10%) using a method adapted from that of Peng et al. [9]. Gentamicin was assayed by an immunoenzymatic method in homogeneous phase (Emit<sup>®</sup> 2000 Gentamicin Test, Dade Behring, Paris la Défense, France), with a detection threshold of 0.3 mg/L in biological samples. The intra-assay coefficient of variation was between 1.7 and 3.2% and the inter-assay coefficient was between 3.7 and 4.3%.

### 2.7. Statistics

Statistical analysis was performed with StatView<sup>®</sup> software (Abacus Concepts, Berkeley, CA). For each strain studied, analysis of variance was used to compare the effects between the different groups, followed by a Scheffe's test to compare treated groups two by two. A *P* value  $\leq 0.05$  was considered significant.

## 3. Results

### 3.1. MICs

The MICs for *S. aureus* strains are summarized in Table 1. Both strains were susceptible to linezolid and gentamicin.

### 3.2. Experimental endocarditis and therapeutic efficacy

In vivo results are shown in Table 2. Although linezolid treatment reduced bacterial counts significantly for NA8 and P9 strains, the drug failed to exhibit a 2-log drop versus controls after 3 days of treatment. Gentamicin alone displayed

Table 1  
MICs of study drugs for MRSA strains

Antibiotic	MIC (mg/L)	
	NA8	P9
Linezolid	2	2
Vancomycin	1	1
Gentamicin	0.5	0.125

Table 2  
Outcome of experimental endocarditis caused by MRSA expressed as log<sub>10</sub> cfu/g of vegetation after 3-day treatment

Regimen	Mean ± S.D. log <sub>10</sub> cfu/g of vegetation (no. of sterile vegetations/total no. of vegetations)	
	Strain NA8	Strain P9
Control	9.1 ± 0.7 (0/9)	8.9 ± 0.6 (0/9)
Linezolid	7.2 ± 1.1 (0/8) <sup>a</sup>	7.5 ± 0.4 (0/8) <sup>a</sup>
Gentamicin	4.7 ± 1.3 (0/6) <sup>a</sup>	3.1 ± 0.8 (2/5) <sup>a</sup>
Linezolid + gentamicin	≤2.4 ± 0.1 (5/5) <sup>a,b</sup>	≤2.6 ± 0.2 (5/5) <sup>a</sup>

The lowest detection limit is 1 cfu per 50 µg/l homogenate.

<sup>a</sup> *P* < 0.005 vs. controls.

<sup>b</sup> *P* < 0.005 vs. gentamicin.

a high antibacterial activity against both strains. Linezolid combined with gentamicin appeared highly efficacious with a decrease of at least 4 log<sub>10</sub> cfu/g of vegetation. For the NA8 strain, the combination appeared more efficient than single therapies. The number of sterile vegetations was greater with the combination than with gentamicin alone for both strains. None of the regimens studied after 48 h incubation at 37 °C showed *S. aureus* colonies on MH agar plates containing linezolid or gentamicin at 4× MIC.

### 3.3. Pharmacokinetic data

After administration of a linezolid dose simulating a 10 mg/kg dose in humans, the mean peak concentration, area under the curve, and half-life were 11.9 ± 1.1 mg/L, 76.3 ± 5.9 mg h/L, and 2.7 ± 0.1 h, respectively, after administration of a single dose and 18.2 ± 1.1 mg/L, 128.8 ± 7.7 mg h/L, and 3.1 ± 0.3 h, respectively, at day 3. Mean peak concentration, area under the curve and half-life were 22.4 ± 6.8 mg/L, 64.0 ± 17.4 mg h/L and 2.0 ± 0.5 h, respectively, for a gentamicin dose mimicking the once-daily human dose of 3 mg/kg.

## 4. Discussion

Linezolid plays an important role in treating infections due to Gram-positive bacteria, including resistant strains such as vancomycin-resistant enterococci, methicillin-resistant *S. aureus*, and penicillin-resistant pneumococci [1]. Nevertheless, a treatment failure of *S. aureus* endocarditis treated with linezolid alone has recently been reported, presumably due to low serum drug levels [10]. Additionally, resistant strains, observed mainly in *Enterococcus* species, have been described [11]. Although the great majority of reported linezolid-resistant bacterial infections occurred in patients treated by linezolid, nosocomial transmission remains a possibility [12]. Combination therapies including linezolid could be useful (i) to protect the future of linezolid and of a new class of antimicrobial agents; (ii) to increase

the early in vivo activity of the drug. Consequently, studies are needed to determine the in vitro and in vivo activity of linezolid combined with partner drugs.

Aminoglycosides are bactericidal agents possessing rapid lethal activity on susceptible MRSA strains both in vitro and in vivo [13,14]. Despite aminoglycoside resistance among clinical MRSA isolates being widespread, gentamicin remains active against most MRSA strains in European countries [15] due to the emergence of new epidemic MRSA strains (gentamicin-susceptible) since the early 1990s [16]. Aminoglycosides could be used in combination with linezolid because of their rapid and intense killing power [13]. Using an endocarditis model, Asseray et al. [14] have demonstrated that gentamicin is the best aminoglycoside for the treatment of MRSA infections (except gentamicin-resistant strains). Consequently, the combination of linezolid and gentamicin could be of great interest in the treatment of severe MRSA infections. However, the in vitro results (i.e. antagonism) should prompt careful use of gentamicin in combination with linezolid [5].

A recent experimental study [17] showed an in vivo antagonism with the combination linezolid plus vancomycin in an MRSA endocarditis experimental model. This had previously been forecast by in vitro by time-kill curves experiments [5,18]. Consequently, animal models were required to discern if the antagonism between linezolid and gentamicin also occurred in vivo. Human pharmacokinetics of linezolid and gentamicin were simulated in the rabbits to obtain more predictive results of the activity of the combination in severe MRSA infections. In this study, linezolid combined with gentamicin appeared highly active even though antagonism was observed in vitro. The pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects of the in vivo experiments could probably explain the difference observed between the in vitro and in vivo activities. (i) The concentrations of linezolid and gentamicin added to the vegetation changed over time whereas the concentrations of both antibiotics were constant in the time-kill curve study. (ii) Different patterns of distribution could be observed in cardiac vegetations for linezolid and gentamicin (i.e. homogeneous- or heterogeneous distribution), as previously described for the penetration of the injectable streptogramin (quinupristin–dalfopristin), throughout the vegetation in an endocarditis study [19]. Fantin et al. demonstrated that one component was homogeneously distributed in the vegetation whereas the other showed a decreasing gradient of concentration between the periphery and the core leading to different ratios between both agents throughout the vegetation. (iii) The pharmacokinetic parameters and the administration mode of linezolid and gentamicin could play a major role in the in vivo activity of the combination. In fact, the half-life (2.0 ± 0.5 h versus 3.1 ± 0.3 h for gentamicin and linezolid, respectively) and the administration (one bolus versus twice daily perfusion) allowed a large variation of the respective concentrations of both antibiotics in the cardiac vegetation. Further studies are

needed to explain the differences of activity between in vitro and in vivo experiments.

Although previous in vitro results suggest an antagonism, the combination linezolid plus gentamicin appears highly active against the two MRSA strains in our model of experimental infective endocarditis. Consequently, linezolid combined with gentamicin could be of clinical interest for the treatment of severe MRSA infections requiring combination antimicrobial therapy.

### Acknowledgements

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

### References

- [1] Zurenko GE, Yagi BH, Schaadt RD, et al. In vitro activities of U-100592 and U-100766, novel oxazolidinone antibacterial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:839–45.
- [2] Aoki H, Ke L, Poppe SM, et al. Oxazolidinone antibiotics target the P site on *Escherichia coli* ribosomes. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1080–5.
- [3] Eliopoulos GM, Moellering RC. Antimicrobial combinations. In: Lorian V, editor. *Antibiotics in laboratory medicine*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1996. p. 330–96.
- [4] Le T, Bayer AS. Combination antibiotic therapy for infective endocarditis. *Clin Infect Dis* 2003;36:615–21.
- [5] Jacqueline C, Caillon J, Le Mabeque V, et al. In vitro activity of linezolid alone and in combination with gentamicin, vancomycin or rifampicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by time-kill curve methods. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:857–64.
- [6] Lepper MH, Dowling HF. Treatment of pneumococcal meningitis with penicillin compared with penicillin plus aureomycin: studies including observations on an apparent antagonism between penicillin and aureomycin. *Arch Intern Med* 1951;88:489–94.
- [7] National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. NCCLS Document M7-A4. Villanova, PA: NCCLS; 1997.
- [8] Perlman BB, Freedman LR. Experimental endocarditis. Part 5 II. Staphylococcal infection of the aortic valve following placement of a polyethylene catheter in the left side of the heart. *Yale J Biol Med* 1971;44:206–13.
- [9] Peng GW, Stryd RP, Murata S, et al. Determination of linezolid in plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal* 1999;20:65–73.
- [10] Ruiz ME, Guerrero IC, Tuazon CU. Endocarditis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: treatment failure with linezolid. *J Antimicrob Chemother* 2002;35:1018–20.
- [11] Bassetti M, Farrel PA, Callan DA, Topal JE, Dembry LM. Emergence of linezolid-resistant *Enterococcus faecium* during treatment of enterococcal infections. *Int J Antimicrob Agents* 2003;21:593–4.
- [12] Rahim S, Pillai SK, Gold HS, Venkataraman L, Inghim K, Press RA. Linezolid-resistant, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infection in patients without prior exposure to linezolid. *Clin Infect Dis* 2003;36:146–8.
- [13] Salauze D, Davies J. Mécanismes moléculaires de la bactéricidie: aminosides. In: Courvalin P, Drugeon HB, Flandrois JP, Goldstein F (Eds.), *Bactéricidie*. Paris: Maloine; 1990. p. 23–34.
- [14] Asseray N, Caillon J, Roux N, et al. Different aminoglycoside-resistant phenotypes in a rabbit *Staphylococcus aureus* endocarditis infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1591–3.
- [15] Schmitz FJ, Fluit AC, Gondolf M, et al. The prevalence of aminoglycoside resistance and corresponding resistance genes in clinical isolates of staphylococci from 19 European hospitals. *J Antimicrob Chemother* 1999;43:253–9.
- [16] Lelièvre H, Lina G, Jones ME, et al. Emergence and spread in French hospitals of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with increasing susceptibility to gentamicin and other antibiotics. *J Clin Microbiol* 1999;37:3452–7.
- [17] Chiang FY, Climo M. Efficacy of linezolid alone or in combination with vancomycin for treatment of experimental endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3002–4.
- [18] Grohs P, Kitzis MD, Gutmann L. In vitro bactericidal activities of linezolid in combination with vancomycin, gentamicin, ciprofloxacin, fusidic acid, and rifampin against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:418–20.
- [19] Fantin B, Leclercq R, Ottaviani M, et al. In vivo activities and penetration of the two components of the streptogramin RP 59500 in cardiac vegetations of experimental endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:432–7.

## Chapitre III

### Etude de la variabilité de l'activité antistaphylococcique des glycopeptides

---

Les glycopeptides représentent actuellement le traitement de référence des infections à MRSA, en particulier des infections septicémiques sévères et des endocardites, et sont proposées en première intention lorsque l'infection est présumée à staphylocoque, avant que l'antibiogramme soit connu. Ces antibiotiques, actifs sur la paroi bactérienne par inhibition de la constitution du peptidoglycane, sont fréquemment utilisés. Les résultats de l'étude concernant les associations de vancomycine et d'aminosides avaient mis en évidence une variabilité d'activité de la vancomycine sur les souches de *S.aureus* étudiées (figure 5). Celle-ci paraissait surprenante, et posait la question de la réalité de l'efficacité clinique de cette molécule, ainsi que de la teicoplanine.

Cette variabilité *in vitro*, semblait pouvoir être mise en parallèle avec des échecs thérapeutiques décrits dans la littérature (SMALL, AAC, 1990) (GOPAL, JAMA, 1976). Dans ces situations cliniques d'infections sévères telles que l'endocardite, les souches étaient apparemment sensibles, n'expliquant pas l'inefficacité du traitement. On constatait par ailleurs l'émergence de souches de *Staphylococcus aureus* de sensibilité diminuée aux glycopeptides (CHESNEAU, JAC, 2000) (VEDEL, EJCMID, 1990) (GEISEL, EJCMID, 2001) (HIRAMATSU, JAC, 1997). Nous n'avions alors aucune donnée permettant de déterminer l'impact clinique de cette perte de sensibilité. Les données expérimentales disponibles sur ce sujet ne permettaient pas de répondre, les travaux étudiant l'activité antistaphylococcique des glycopeptides, en particulier sur les modèles d'endocardite étant nombreux mais difficilement comparables.

Ceci nous a conduit à poursuivre l'étude des glycopeptides, en confrontant les résultats observés *in vivo* à la mesure de la bactéricidie *in vitro*, en évaluant une deuxième molécule de la même famille (teicoplanine), et en étudiant une souche supplémentaire, de sensibilité diminuée aux glycopeptides. Ce travail a été publié sous le titre « Activity

of glycopeptides against *Staphylococcus aureus* infection in a rabbit endocarditis model : MICs do not predict *in vivo* efficacy » (Asseray, AAC, 2005).

## Partie 1

### **Activité *in vivo* des glycopeptides, prédictivité des tests *in vitro***

#### **A - Méthodologie**

Cinq souches ont donc été étudiées, deux souches de SA sensibles à la méticilline, deux souches de SA résistantes à la méticilline, et une souche de sensibilité diminuée aux glycopeptides, hGISA.

#### **Evaluation *in vitro* de l'activité des glycopeptides**

- La mesure des CMI de ces cinq souches à la vancomycine et à la teicoplanine a été faite en milieu liquide (type Mueller-Hinton) et en milieu solide, avec des inoculum variant de 6 à 10 Log UFC/mL, afin de rechercher l'existence d'un effet inoculum.
- L'étude de l'activité bactéricide a été réalisée sur toutes les souches de *S.aureus* par la méthode des cinétiques de bactériodie. Celles-ci ont été faites avec un inoculum de  $10^6$  UFC/mL environ, en présence de 0, 1, 4, 8 et 20 mg/L de vancomycine ou de teicoplanine. Les numérations bactériennes ont été mesurées à 0, 6, 24 et 48H.
- Une analyse de population a également été effectuée sur les quatre souches sensibles aux glycopeptides avec un inoculum de  $10^6$  CFU/ml environ. Chaque souche a été mise en contact avec diverses concentrations de vancomycine, le nombre de bactéries survivantes était dénombré après 24 heures de culture.

### Evaluation *in vivo* de l'activité des glycopeptides

Les cinq souches de SA ont été étudiées *in vivo* dans le modèle d'endocardite staphylococcique du lapin, selon le protocole décrit dans les précédents chapitres.

### **Choix du mode d'administration et de la posologie des antibiotiques étudiés**

Les glycopeptides ont été évalués *in vivo* en choisissant un mode d'administration et une posologie qui permettent d'atteindre les concentrations sériques recommandées en thérapeutique clinique, et pour lesquelles les deux molécules (teicoplanine et vancomycine) soient comparables sans qu'il y ait d'avantage pharmacocinétique.

Le **mode d'administration** par voie intra-veineuse continue a été fondé sur le caractère temps-dépendant de ces deux molécules (Duffull, AAC, 1994) (Chambers, AAC, 1990). L'administration d'un bolus avant la perfusion continue a été conditionnée par la demi-vie de chaque molécule. En effet, le temps nécessaire pour atteindre le steady-state est approximativement de 5 demi-vies. Pour la vancomycine, le plateau était atteint rapidement de manière spontanée, alors que pour la teicoplanine, l'administration d'un bolus d'environ 15% de la dose a été nécessaire.

**Tableau X** : Paramètres pharmacocinétiques connus pour la vancomycine et la teicoplanine (Yao, AAC, 1990) (Chambers, AAC, 1990) (Jehl, Antibiotiques, 2003)

Paramètres mesurés	Chez l'homme		Chez le lapin	
Demi-vie (T <sub>1/2</sub> )	Vancomycine	Teicoplanine	Vancomycine	Teicoplanine
	6 à 10 Heures	≈ 100 Heures	30 à 45 mn	4 à 8 Heures
Concentrations après injection	Dose (IV)	Concentration (mg/l)	Dose (IV)	Concentration (mg/l)
de vancomycine	1g bolus (1 H) puis 2g (24H)	20 à 25 au plateau	150 mg/kg (24H)	14.3 +/- 2.2 (3H après arrêt de la perfusion)
de teicoplanine	6 mg/kg	12 C min	30 mg/kg (24H)	14.6 +/- 4.3 (24H après arrêt de la perfusion)
			36 mg/kg	26 +/- 11 (12H après l'injection)

En se basant sur les paramètres pharmacocinétiques connus, les **posologies** de chacune de ces molécules ont été définies pour le lapin.

- Pour la vancomycine une dose de 100 mg/kg/jour a été administrée en perfusion continue. Sur les animaux de l'étude précédente, la concentration en plateau mesurée au terme du protocole (soit après 48H d'administration) était de 22.3 +/- 8.7 mg/l (moyenne +/- déviation standard).
- Pour la teicoplanine un bolus de 3 mg/kg était injecté sur 30mn, suivi d'une perfusion continue de 18 mg/kg/j.

Pour la **durée de traitement**, une durée courte de 48H a été choisie. Il s'agissait d'évaluer l'effet précoce *in vivo* de ces molécules, tenant compte de ce que la précocité de l'efficacité du traitement est un facteur conditionnant le pronostic clinique des infections graves.

L'évolution des concentrations sériques d'antibiotiques au cours des deux jours de traitement a été suivie par dosages immunoenzymatiques effectués à différents temps : 45mn, H2, H4, H8, H12, H16, H24, H36, H48.

## **B - Résultats**

### **Résultats de l'évaluation *in vitro***

Les CMI de la vancomycine et de la teicoplanine des quatre souches de *S.aureus* (SA 3, 7, 8 et 13) sont entre 0.5 et 1 mg/L, ce qui confirme leur sensibilité aux glycopeptides. La mesure des CMI en milieu gélosé avec différents inoculum ne montre pas de variation de celles-ci, permettant d'éliminer un effet inoculum de ces souches sur l'effet de la vancomycine. La CMI de la souche hGISA confirme sa moindre sensibilité aux glycopeptides.

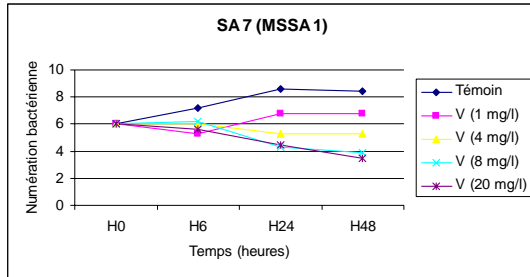
Les cinétiques de bactériodie pour la teicoplanine et la vancomycine sont présentées dans la figure 6. L'analyse de ces courbes montre que, pour la vancomycine, l'activité est comparable pour les 4 souches sensibles aux glycopeptides, mais il y a une nette diminution de l'activité bactéricide pour la souche hGISA.

Pour la teicoplanine l'activité bactéricide est moindre pour les deux souches résistantes à la méticilline, en comparaison avec les deux souches sensibles, cette diminution d'activité est encore plus importante pour la souche hGISA.

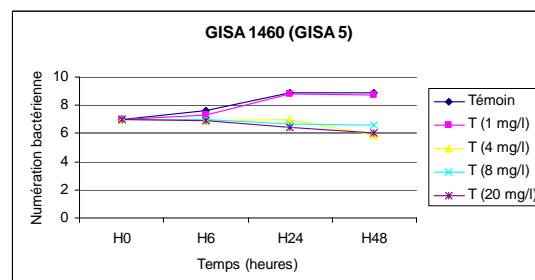
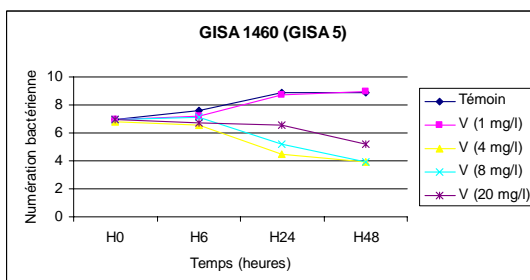
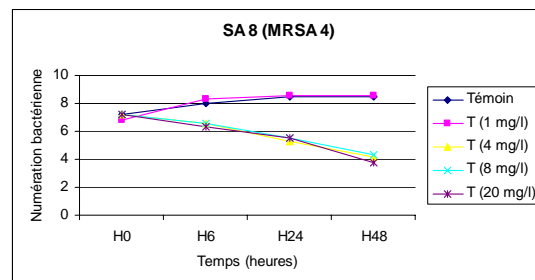
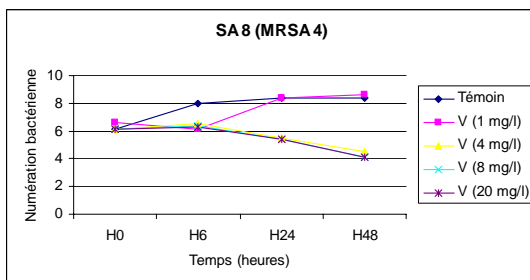
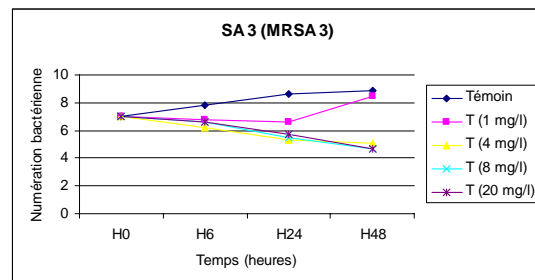
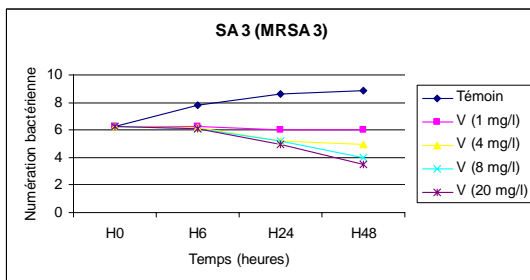
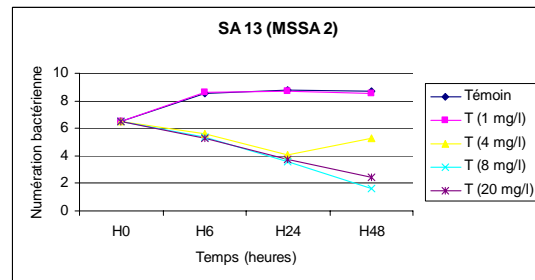
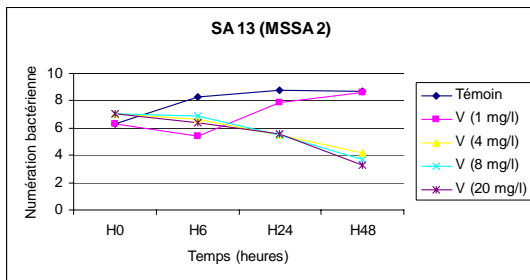
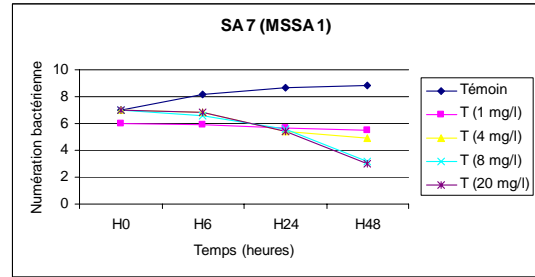
Les résultats de l'analyse de population sur les quatre souches apparemment sensibles aux glycopeptides ne montre pas d'altération de l'activité de la vancomycine. Ces résultats (figure 7) ne montrent pas de perte de sensibilité.

**Figure 6** : Cinétiques de bactéricidie, avec diverses concentrations de glycopeptides (numération bactérienne en Log10 UFC/mL)

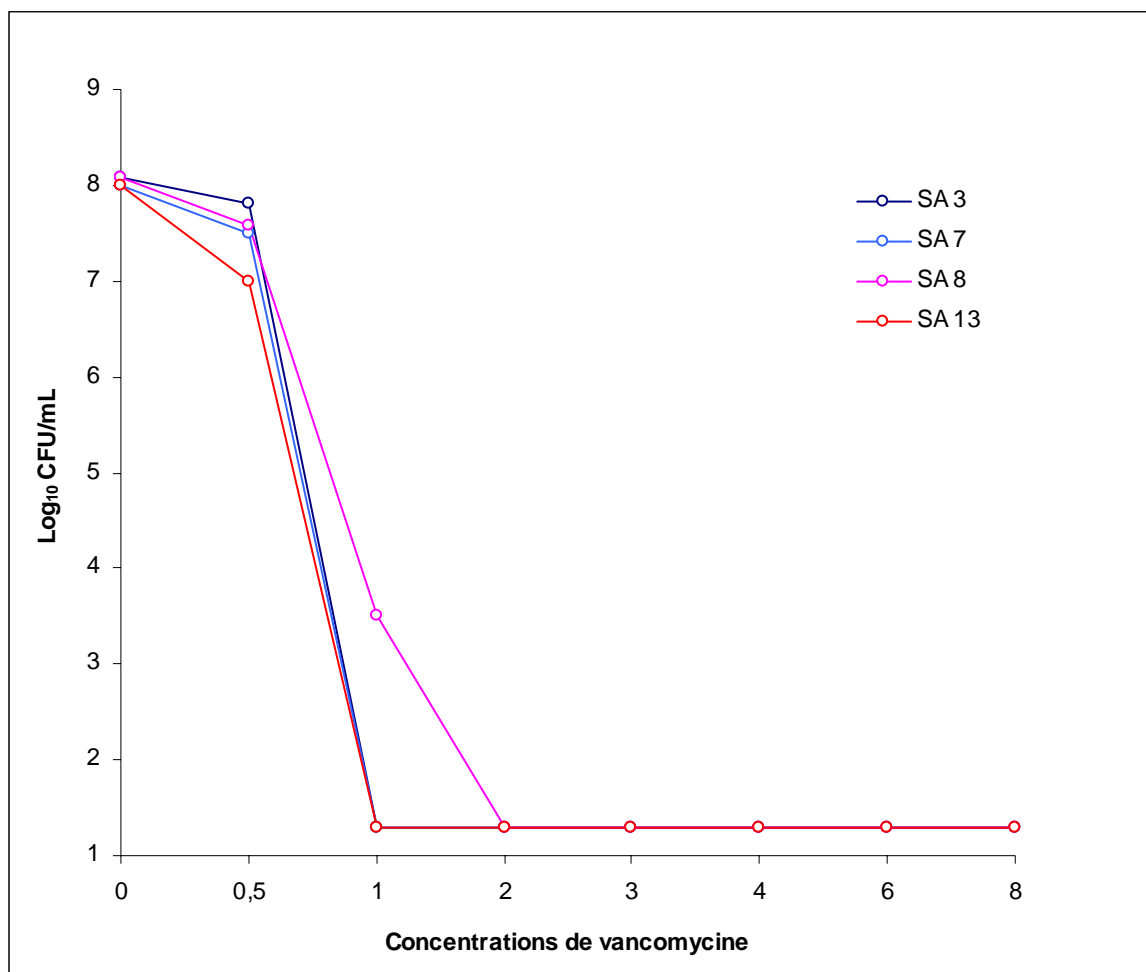
**Figure 6 – A** : avec la vancomycine



**Figure 6 – B** : avec la teicoplanine



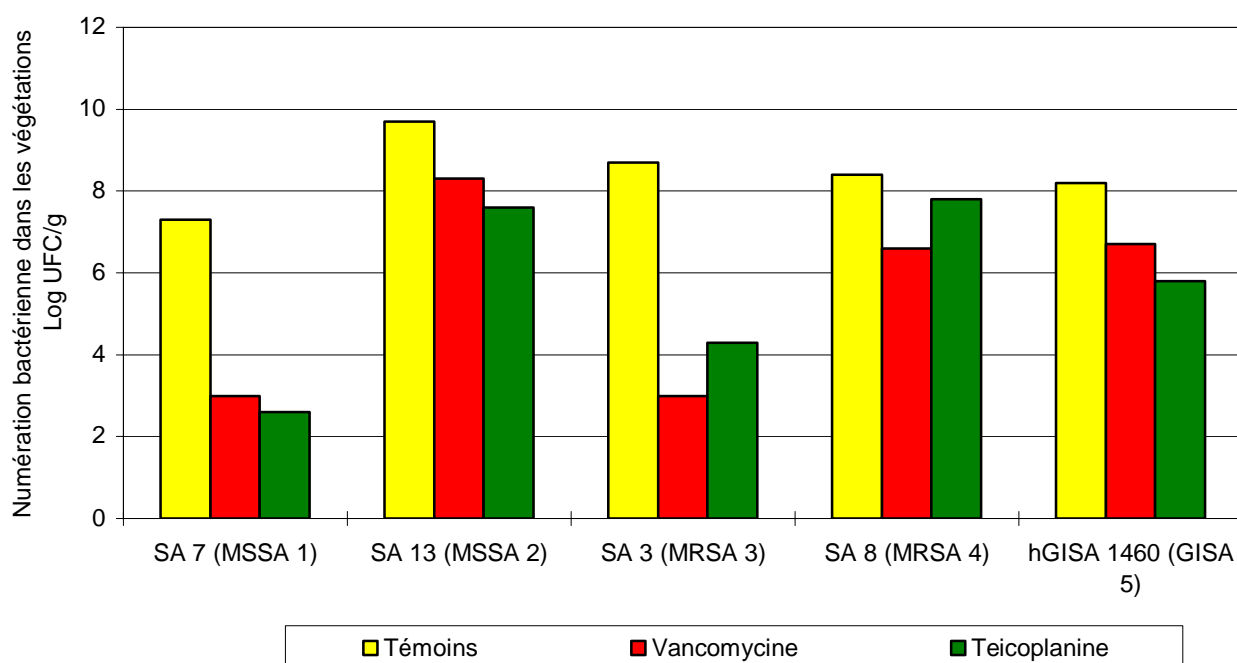
**Figure 7** : Analyse de population (nombre de bactéries survivantes après 24H d'exposition à la vancomycine)



## Résultats de l'évaluation *in vivo*

Les deux glycopeptides n'ont montré d'efficacité que sur deux des souches étudiées, SA 7 et SA 3. Pour la souche SA 13, il existe une petite différence, significative, avec le groupe témoin. Pour les deux autres souches, SA 8 et la souche hGISA, il n'y a pas de différence significative entre les animaux contrôle et les animaux traités. Pour aucune de ces cinq souches, une différence d'effet entre les deux molécules, vancomycine et teicoplanine, n'a été montrée (figure 8).

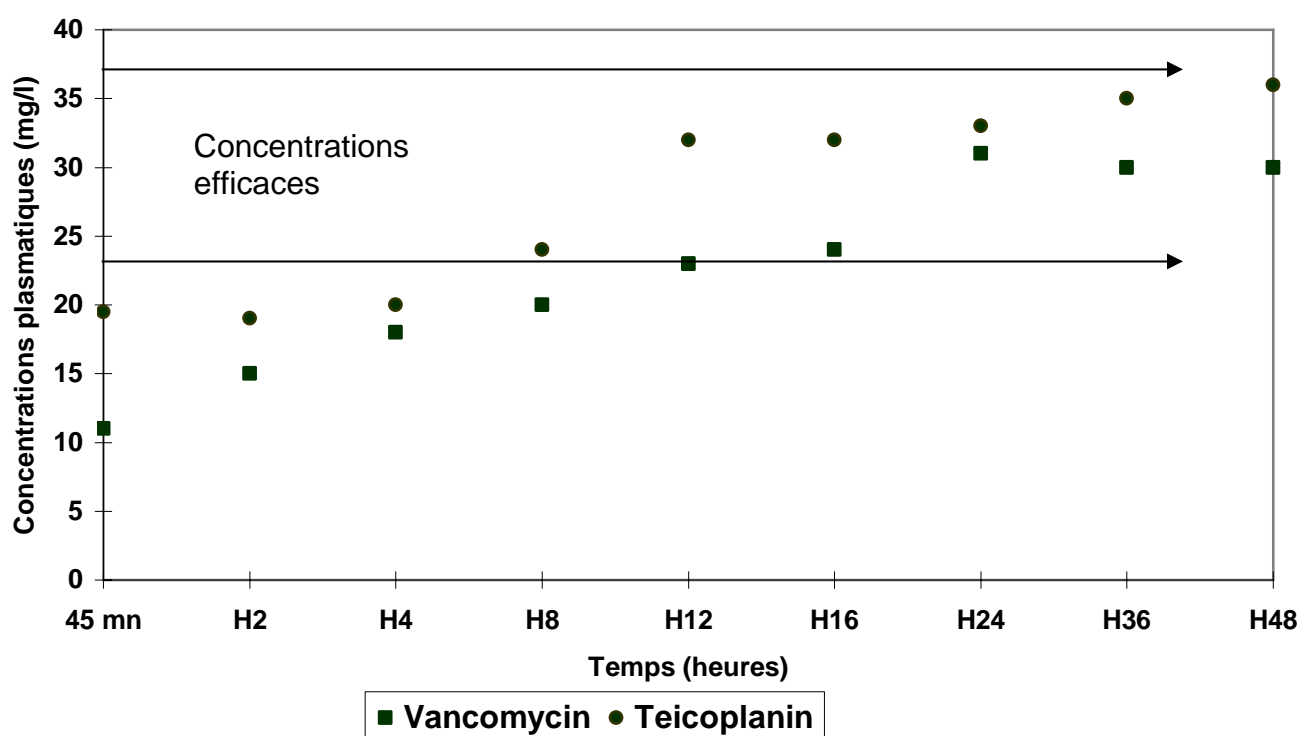
**Figure 8** : Activité *in vivo* des glycopeptides dans le modèle d'endocardite du lapin



## Résultats pharmacocinétiques

Le suivi des concentrations des molécules administrées a montré que des concentrations efficaces (soit de 15 à 20 mg/l) étaient atteintes dès la 4<sup>ème</sup> heure. Ensuite, les concentrations se sont maintenues entre 20 et 35 mg/L (figure 9). Ceci remplit largement l'objectif de 20mg/L, concentration efficace fixée en pratique clinique pour l'usage de la vancomycine dans l'endocardite.

**Figure 9** : Pharmacocinétique des glycopeptides en perfusion continue dans le modèle d'endocardite du lapin



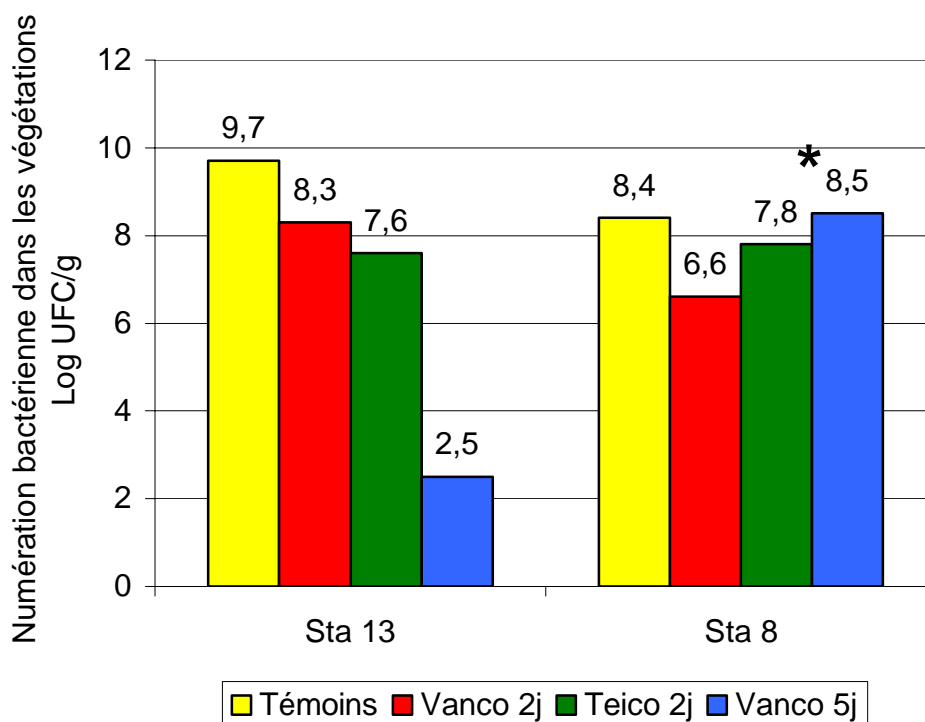
## C - Discussion

Les résultats obtenus sur la souche hGISA montrent que la détection *in vitro* d'une perte de sensibilité aux glycopeptides s'accompagne d'une perte d'effet *in vivo*. Ceci avait déjà été rapporté dans un modèle comparable d'endocardite de lapin, dans un travail concernant deux souches isogéniques différant par leur sensibilité aux glycopeptides (Pavie, AAC, 2003).

Pour les quatre autres souches, l'existence d'une activité bactériostatique et bactéricide mesurée *in vitro* en conditions standardisée ne prédit pas d'effet précoce *in vivo*. L'activité des glycopeptides dans ce modèle apparaît variable d'une souche à l'autre.

Deux des souches de ce travail ont fait l'objet par la suite d'autres études utilisant le même modèle expérimental : SA 8 et SA 13, certains de ces résultats ont été publiés (Jacqueline, AAC, 2002). Au cours de ces travaux, les traitements par vancomycine ont été poursuivis sur 5 jours, on constatait une efficacité de la vancomycine en 5 jours sur la souche de SA 13, correspondant à un effet retard. Au contraire, pour le SA 8, l'absence d'efficacité est confirmée après 3 jours supplémentaires de traitement (figure 10). Sur ces résultats, on peut dégager deux phénomènes différents : le retard d'efficacité anti-bactérienne *in vivo* des glycopeptides sur SA 13, et l'échappement de la souche SA 8 aux glycopeptides.

**Figure 10** : Influence d'un traitement par 5 jours de vancomycine



\* Résultats publiés (Jacqueline, AAC, 2002)

Cette variabilité d'activité des glycopeptides est probablement à rapprocher des échecs cliniques connus. Certains auteurs ont ainsi décrit des échecs ou des retards thérapeutiques sous vancomycine, en particulier dans le traitement d'endocardites staphylococciques (Gopal, JAMA, 1976) (Small, AAC, 1990) (Levine, Ann. Int. Med., 1991), mais aussi dans le traitement d'infections respiratoires basses (Moise, Int J AA, 2000). Dans une étude plus récente (Chang, Medicine, 2003) concernant des bactériémies, la vancomycine démontrait ses piètres capacités thérapeutiques. En effet sur les souches sensibles à la fois aux bêta-lactamines et aux glycopeptides, l'efficacité de la nafcilline était supérieure pour prévenir les échecs thérapeutiques (persistance de la bactériémie ou récurrence). C'est pour cette raison que les recommandations de l'IDSA pour la prise en charge des cathéters infectés (Mermel, CID, 2001), met le prescripteur en garde contre le risque d'échec lors de l'utilisation de la vancomycine. Dans ces

travaux, l'absence d'effet thérapeutique n'était pas parallèle à une augmentation des CMI.

Parmi les publications citées (Gopal, JAMA, 1976), on rapporte cependant une observation au cours de laquelle la persistance de *S.aureus* dans les hémocultures lors du traitement d'une endocardite par la vancomycine, était associée à une perte d'activité bactéricide. Celle-ci n'était mise en évidence que pour de faibles concentrations de vancomycine, inférieures à 8mg/l (cinétiques de bactéricidie). Cette perte de l'effet bactéricide mesuré sur les courbes de bactéricidie a également été décrite comme un phénomène de tolérance de *S.aureus* aux glycopeptides (May, JAC, 1998). Dans le travail présenté ici, la méthode de cinétique de bactéricidie n'a pas permis de détecter une diminution de la bactéricidie pour les concentrations de 8 et 20mg/L. L'effet bactéricide *in vitro* est nettement moindre, voire nul, pour les concentrations de 4 et 1 mg/L, sans que ceci soit prédictif de la perte d'efficacité *in vivo*. Nous avons également constaté un meilleur effet des molécules sur les souches meti-S comparées aux souches meti-R, ceci avait déjà été décrit sur des travaux antérieurs (Caillon, Path Biol, 1989), sans corrélation avec les résultats *in vivo*.

Il semble donc que la mesure de la bactériostase en conditions standard, et les cinétique de bactéricidies effectuées selon la méthode décrite, ne soient pas un outil prédictif de l'effet *in vivo* des glycopeptides. Finalement, aucun paramètre n'a permis *in vitro* de prédire la perte d'efficacité *in vivo*.

D'autres travaux de recherche se sont attachés à mettre en évidence un lien entre perte d'activité *in vitro* (bactériostase et bactéricidie) et efficacité clinique de la vancomycine. Dans un premier travail, la mesure des CMI avec analyse de population (Schwaber, Emerg.Inf.Dis., 2003) ne montrait pas d'association entre une moindre sensibilité et la mortalité ou la durée de séjour. Par contre, dans une autre étude (Sakoulas, JCM, 2004), la diminution de la bactéricidie mesurée *in vitro*, ainsi que l'élévation des CMI au dessus de 1mg/L, s'accompagnait d'un moindre taux de succès thérapeutique.

Ces résultats paraissent donc discordants et ne permettent pas plus de répondre à la question concernant les paramètres prédictifs de l'inefficacité de la vancomycine. Ils soulèvent plusieurs autres questions, comme le choix des concentrations critiques

permettant de définir la sensibilité des souches (meilleur effet clinique de la vancomycine pour les souches ayant des CMI inférieures à 1mg/L ?), ou les critères définissant *in vitro* la bactéricidie optimale (concentrations d'antibiotique efficaces, durée d'observation, seuil de diminution des numérations bactériennes).

Activity of Glycopeptides against *Staphylococcus aureus*  
Infection in a Rabbit Endocarditis Model: MICs Do Not  
Predict In Vivo Efficacy

Nathalie Asseray, Cedric Jacqueline, Virginie Le Mabecque, Eric Batard,  
Denis Bugnon, Gilles Potel, and Jocelyne Caillon\*

Laboratoire Antibiotologie, UPRES EA 3826, Nantes, France

ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY,  
May 2002, p. 1591–1593 Vol. 46, No. 5

## Activity of Glycopeptides against *Staphylococcus aureus* Infection in a Rabbit Endocarditis Model: MICs Do Not Predict In Vivo Efficacy

Nathalie Asseray, Cedric Jacqueline, Virginie Le Mabeccque, Eric Batard,  
Denis Bugnon, Gilles Potel, and Jocelyne Caillon\*

Laboratoire Antibiotologie, UPRES EA 3826, Nantes, France

Received 16 June 2004/Returned for modification 25 July 2004/Accepted 27 September 2004

**The in vivo efficacy of vancomycin and teicoplanin against five *Staphylococcus aureus* strains with different susceptibilities to them and methicillin was studied. Rabbits were allocated at random to groups for endocarditis induction with one of these five strains and then treated for 2 days with vancomycin or teicoplanin. Each treated group was compared with a control group infected with the same strain. Vancomycin and teicoplanin showed similar activities. Low MICs did not predict better in vivo results.**

Glycopeptides constitute the drugs of reference for treating infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains, particularly severe septicemia or endocarditis (18). Two factors limit the clinical usefulness of glycopeptides. First, *S. aureus* strains with reduced susceptibility to glycopeptides have emerged. The first vancomycin-resistant strain was identified in Japan (11), and since then vancomycin resistance has been documented in Europe (3, 6, 20). Second, treatment failures despite in vitro susceptibility have been reported, most notably for patients with endocarditis and other severe infections (7, 19). Furthermore, new agents have been introduced recently for the treatment of staphylococcal infections. These facts warrant a reappraisal of the role for glycopeptides in the first-line treatment of severe *S. aureus* infections.

The objective of the study reported here was to evaluate the in vivo efficacy of glycopeptides in animals with severe staphylococcal infections due to strains with various patterns of susceptibility to methicillin and glycopeptides.

We studied five *S. aureus* strains, of which two strains were susceptible to both methicillin and glycopeptides (methicillin-susceptible *S. aureus* [MSSA] strains MSSA 1 and MSSA 2), two strains were resistant to methicillin but susceptible to glycopeptides (MRSA 3 and MRSA 4), and one strain was resistant to methicillin and exhibited heterogeneous reduced susceptibility to glycopeptides (glycopeptide-intermediate *S. aureus* [GISA] strain GISA 5). The four glycopeptide-susceptible strains were isolated from blood cultures, and the GISA strain was isolated from sputum of a cystic fibrosis patient. The *mecA* gene was detected by PCR in strains MRSA 3, MRSA 4, and GISA 5. MICs of vancomycin (Dakota pharm, Le Plessis-Robinson, France) and teicoplanin (Aventis, Paris, France) were determined by using the broth and agar dilution methods, with inoculum sizes ranging from  $10^6$  to  $10^9$  CFU/ml to look for a potential inoculum effect. Bactericidal activity was assessed based on the determination of minimal bactericidal concentrations (MBCs) by microdilution method and on the killing kinetics with an inoculum of  $10^7$  CFU/ml and 0, 1, 4, 8, and 20 mg

of vancomycin or teicoplanin/liter; bacteria were counted after 0, 6, 24, and 48 h.

The rabbit aortic valve endocarditis model was used for the in vivo studies (16). Endocarditis of the aortic valve and left ventricle was induced by introduction of a polyethylene catheter followed 24 h later by an intravenous injection of  $10^8$  CFU of *S. aureus*. For each *S. aureus* strain, there were three groups, namely, vancomycin, teicoplanin, and control, for a total of 15 groups of animals. On day 3, the controls were killed, and the animals in the two other groups were started on a 48-h course of vancomycin or teicoplanin. Vancomycin was given as a continuous infusion in a dose of 100 mg/kg of body weight/day so that the steady-state serum level was equivalent to the usual target in humans (at least 20 mg/liter). Teicoplanin was given as an intravenous infusion in a dose of 18 mg/kg/day in order to produce steady-state serum levels similar to that of vancomycin. Because teicoplanin has a long half-life, a bolus of 3 mg/kg was given before the continuous infusion. Serum assays of vancomycin and teicoplanin were performed during treatment with an immunoenzymetric method. The treated animals were killed on day 5.

The aortic vegetations were harvested, weighed, and used for quantitative cultures on agar for 24 h at 37°C. Bacterial counts were expressed as  $\log_{10}$  CFU per gram of vegetation.

**Statistics.** The primary evaluation criterion was the bacterial count in vegetation cultures ( $\log_{10}$  CFU per gram of vegetation). The mean  $\pm$  standard deviation count was determined for each group of animals. Analysis of variance (ANOVA) was used first to evaluate counts for each *S. aureus* strain. When ANOVA showed a significant difference, Scheffe's test was used for pairwise comparisons. All statistical tests were run on Statview (Abacus Concepts, Berkeley, Calif.).

Vancomycin and teicoplanin had MICs and MBCs (Table 1)

TABLE 1. MICs and MBCs of the five studied strains

Drug	MIC/MBC (mg/liter) for:				
	MSSA 1	MSSA 2	MRSA 3	MRSA 4	GISA 5
Vancomycin	0.5/0.5	1/1	1/1	0.5/1	4/8
Teicoplanin	0.25/0.25	0.5/1	1/1	0.5/1	8/12

\* Corresponding author. Mailing address: Lab. Antibiotologie Clinique et Experimentale, UPRES EA 3826, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes, France. Phone: (33) 2 40 41 28 54. Fax: (33) 2 40 41 28 54. E-mail: jcaillon@chu-nantes.fr.

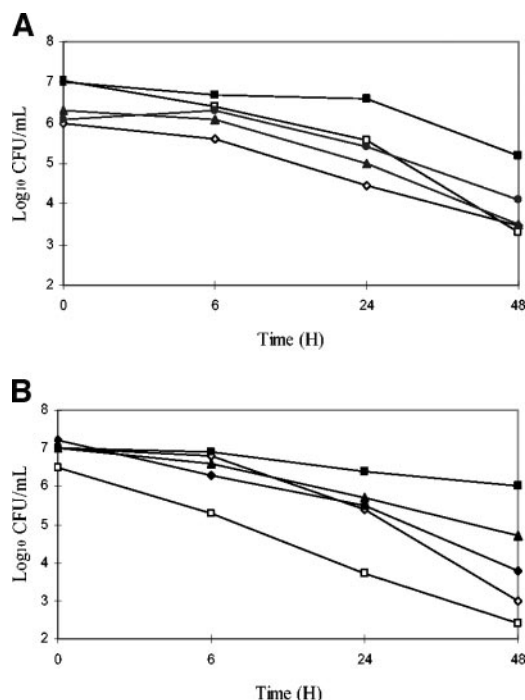


FIG. 1. Kill curves of vancomycin (A) and teicoplanin (B) at 20 mg/liter.  $\diamond$ , MSSA 1;  $\square$ , MSSA 2;  $\blacktriangle$ , MRSA 3;  $\bullet$ , MRSA 4; and  $\blacksquare$ , GISA 5.

ranging from 0.25 to 1 mg/liter for MSSA 1, MSSA 2, MRSA 3, and MRSA 4, indicating good in vitro susceptibility of these four strains to glycopeptides (NCCLS recommendations). No inoculum effect was found. For GISA 5, the MICs of vancomycin and teicoplanin were 4 and 8 mg/liter, respectively, confirming the reduced susceptibility of this strain to glycopeptides. Killing curves showed that vancomycin exhibited similar activities against all four glycopeptide-susceptible strains, whatever the concentrations used, contrasting with a marked decrease in bactericidal activity against the GISA 5 strain (Fig. 1A). With teicoplanin at the same concentrations, bactericidal activity against the two MRSA strains was decreased compared to that against the two MSSA strains, and an even greater decrease was noted with the GISA 5 strain (Fig. 1B).

The in vivo study (Table 2) showed that the two glycopeptides were active against only two of the five strains, namely, MSSA 1 and MRSA 3. With MSSA 2, a small but significant difference was noted compared to the control group. With MRSA 4 and GISA 5, no significant differences were found with the control group. For none of these five strains was a significant difference in activity noted between vancomycin and

teicoplanin. Levels of both glycopeptides in serum reached 20 mg/liter after 4 h and 30 mg/liter after 24 h.

The variability in glycopeptide activity noted in the rabbit endocarditis model is probably relevant to published reports of failed glycopeptide therapy in humans with staphylococcal infections. In these patients (7, 19), the absence of a therapeutic effect was not correlated with MIC elevation. Other agents or combinations of agents have been introduced recently for the treatment of staphylococcal infections, including those due to MRSA strains. Studies of the same rabbit model have shown early and reproducible activity of these new agents against several *S. aureus* strains, some of which were MRSA strains (1, 12).

The two glycopeptides used in our study were similar to each other regarding activity against the five *S. aureus* strains tested. Steady-state serum teicoplanin levels were far greater than 10 times the MIC for susceptible strains. This condition would be expected to ensure optimal efficacy, according to relevant data in the literature (2, 10, 14). The poor diffusion of teicoplanin within vegetations (4) and the high rate of protein binding (2) do not seem to have noticeably affected the level of activity against *S. aureus* in comparison with vancomycin.

Our in vivo data show that a low MIC does not always predict a better response to glycopeptides over the first 2 days of treatment. Early in vivo effects do not seem to be influenced by in vitro parameters.

Tolerance, defined as a loss of bactericidal activity (7, 13, 21), has been reported. We found no evidence of tolerance, as the in vitro bactericidal effect of vancomycin on the glycopeptide-susceptible strains was unimpaired. In contrast, the high MIC for the GISA 5 strain, classified as having intermediate susceptibility to glycopeptides, was strongly correlated with the loss of bactericidal activity in vitro and in vivo. This finding is in agreement with a study comparing two isogenic *S. aureus* strains with different glycopeptide susceptibility patterns in an endocarditis model (15).

Although the treatment period was brief (48 h) and the antibiotics had slow killing kinetics, we found noticeable differences in activity across strains that were not predicted by the in vitro data. The source of these differences must therefore be sought elsewhere than in the intrinsic in vitro activity of the antibiotics. Host-related factors can influence in vivo activity. Studies have investigated the bactericidal effects of endogenous peptides produced by neutrophils or platelets that seem to act by causing lysis of the bacterial wall (23, 24). Their activity may be influenced by exposure to some antibiotics, most notably those with effects on the bacterial wall, such as penicillins and vancomycin (22). Conceivably, an interaction

TABLE 2. In vivo results after 48-h treatment of the five studied strains

Regimen	Mean log <sub>10</sub> CFU/g of vegetation $\pm$ SD (no. of rabbits)				
	MSSA 1	MSSA 2	MRSA 3	MRSA 4	GISA 5
Controls	7.3 $\pm$ 1.7 (6)	9.7 $\pm$ 0.9 (5)	8.7 $\pm$ 0.9 (5)	8.4 $\pm$ 1.4 (8)	8.2 $\pm$ 1.1 (4)
Vancomycin	3.0 $\pm$ 1.3 (7) <sup>a</sup>	8.3 $\pm$ 1.5 (5)	3.0 $\pm$ 0.9 (4) <sup>a</sup>	6.6 $\pm$ 1.6 (6)	6.7 $\pm$ 1.9 (6)
Teicoplanin	2.6 $\pm$ 0.2 (4) <sup>a</sup>	7.6 $\pm$ 0.5 (5) <sup>a</sup>	4.3 $\pm$ 1.6 (7) <sup>a</sup>	7.8 $\pm$ 0.8 (5)	5.8 $\pm$ 1.9 (6)

<sup>a</sup> The *P* value versus results from control rabbits was < 0.05 by Scheffe's test after ANOVA.

between these peptides and the glycopeptides located within endocarditis vegetations may explain these findings.

Decreased susceptibility of *S. aureus* strains to vancomycin may be related to a change in the bacterial target. Studies have documented thickening of the bacterial cell wall that traps the vancomycin molecules (5, 8, 9, 17). However, these findings were obtained *in vitro*. To date, there are no *in vivo* data on cell wall thickness and structure of bacteria located within sites of infection.

In conclusion, for patients with severe infections requiring immediately effective antibiotic treatment, the possibility that glycopeptides may have limited activity should be borne in mind when selecting antistaphylococcal agents. Given the variability in the *in vivo* activities of glycopeptides, even against strains with *in vitro* susceptibility, the place for new antistaphylococcal agents, or new combinations of antistaphylococcal agents, with proven early and consistent efficacy needs to be determined.

#### REFERENCES

1. Batard, E., C. Jacqueline, D. Boutoille, A. Hamel, H. B. Drugeon, N. Asseray, R. Leclercq, J. Caillon, G. Potel, and D. Bugnon. 2002. Combination of quinupristin-dalfopristin and gentamicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: experimental rabbit endocarditis study. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:2174–2178.
2. Chambers, H., and S. Kennedy. 1990. Effects of dosage, peak and trough concentrations in serum, protein binding, and bactericidal rate on efficacy of teicoplanin in a rabbit model of endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:510–514.
3. Chesneau, O., A. Morvan, and N. E. Solh. 2000. Retrospective screening for heterogeneous vancomycin resistance in diverse *Staphylococcus aureus* clones disseminated in French hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**:887–890.
4. Cremieux, A. C., B. Maziere, J. M. Vallois, M. Ottoviani, A. Azancoi, H. Raffoui, A. Bouvet, J. J. Pocardalo, and C. Carbon. 1989. Evaluation of antibiotic diffusion into cardiac vegetations by quantitative autoradiography. *J. Infect. Dis.* **159**:938–944.
5. Cui, L., H. Murakami, K. Kuwahara-Arai, H. Hanaki, and K. Hiramatsu. 2000. Contribution of a thickened cell wall and its glutamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2276–2285.
6. Geisel, R., F. J. Schmitz, A. C. Fluit, and H. Labischinski. 2001. Emergence, mechanism and clinical implications of reduced glycopeptide susceptibility in *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **20**:685–697.
7. Gopal, V., A. Bisno, and J. Silverblatt. 1976. Failure of treatment in *Staphylococcus aureus* endocarditis. *In vivo* and *in vitro* observations. *JAMA* **236**:1604–1606.
8. Hanaki, H., K. Kuwahara-Arai, S. Boyle-Vavra, R. Daum, H. Labischinski, and K. Hiramatsu. 1998. Activated cell wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. *J. Antimicrob. Chemother.* **42**:199–209.
9. Hanaki, H., H. Labischinski, Y. Inaba, N. Kondo, H. Murakami, and K. Hiramatsu. 1998. Increase in glutamine-non-amidated mucopeptides in the peptidoglycan of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain Mu50. *J. Antimicrob. Chemother.* **42**:315–320.
10. Harding, I., A. McGowan, L. White, E. Darley, and V. Reed. 2000. Teicoplanin therapy for *Staphylococcus aureus* septicemiae: relationship between pre-dose serum concentration and outcome. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**:835–841.
11. Hiramatsu, K., et al. 1997. Methicillin-resistant *S. aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.* **40**:135–136.
12. Jacqueline, C., J. Caillon, V. Le Mabecque, A. F. Miegville, D. Bugnon, and G. Potel. 2003. Linezolid combined with imipenem: *in vivo* synergy in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* rabbit endocarditis model. Program Abstr. 43rd Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstract no. B-1093.
13. May, J., K. Shannon, A. King, and G. French. 1998. Glycopeptide tolerance in *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **42**:189–197.
14. McGrath, B. J., S. L. Kang, G. W. Kaatz, and M. J. Rybak. 1994. Bactericidal activities of teicoplanin, vancomycin, and gentamicin alone and in combination against *Staphylococcus aureus* in an *in vitro* pharmacodynamic model of endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:2034–2040.
15. Pavie, J., A. Lefort, M. C. Ploy, L. Massias, F. Chau, L. Garry, F. Denis, and B. Fantin. 2003. Influence of reduced susceptibility to glycopeptides on activities of vancomycin and teicoplanin against *Staphylococcus aureus* in experimental endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:2018–2021.
16. Perlman, B., and L. Freedman. 1971. Experimental endocarditis II. Staphylococcal infection of the aortic valve following placement of a polyethylene catheter in the left side of the heart. *Yale J. Biol. Med.* **44**:206–213.
17. Reipert, A., K. Ehlert, T. Kast, and G. Bierbaum. 2003. Morphological and genetic differences in two isogenic *Staphylococcus aureus* strains with decreased susceptibilities to vancomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:568–576.
18. Rodriguez, A., M. Vicente, and T. Olay. 1987. Single and combination antibiotic therapy for experimental endocarditis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**:1444–1445.
19. Small, P., and F. Chambers. 1990. Vancomycin for *Staphylococcus aureus* endocarditis in intravenous drug users. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:1227–1231.
20. Vedel, G., M. Leruez, F. Lemann, E. Hraoui, and D. Ratovohery. 1990. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci with decreased sensitivity to glycopeptides as assessed by determination of MICs. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **9**:820–822.
21. Voorn, G. P., J. Kuyvenhoven, W. H. F. Goessens, W. C. Schmal-Bauer, P. H. M. Broeders, J. Thompson, and M. F. Michel. 1994. Role of tolerance in treatment and prophylaxis of experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis with vancomycin, teicoplanin, and daptomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:487–493.
22. Xiong, Y., M. Yeaman, and A. Bayer. 1999. *In vitro* antibacterial activities of platelet microbicidal protein and neutrophil defensin against *Staphylococcus aureus* are influenced by antibiotics differing in mechanism of action. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1111–1117.
23. Yeaman, M. R. 1997. The role of platelets in antimicrobial host defense. *Clin. Infect. Dis.* **25**:951–970.
24. Yeaman, M. R., A. S. Bayer, S. P. Koo, W. Foss, and P. M. Sullam. 1998. Platelet microbicidal proteins and neutrophil defensin disrupt the *Staphylococcus aureus* cytoplasmic membrane by distinct mechanisms of action. *J. Clin. Investig.* **101**:178–187.

## Partie 2

### **Approche des mécanismes d'échappement de la souche SA 8 aux glycopeptides**

La variabilité de l'activité *in vivo* des glycopeptides, et l'absence de test prédictifs de cet échappement ont conduit à soulever plusieurs hypothèses. L'existence de facteurs de l'hôte interagissant avec le couple Bactérie-Antibiotique a été évoquée. Considérant la physiopathologie de l'endocardite, l'existence de facteurs associés au plasma ou au caillot fibrino-plaquettaire pouvait être envisagée. Avant d'envisager chacune de ces hypothèses, les souches ont été caractérisées sur le plan moléculaire.

Pour chaque hypothèse posée, nous avons développé de manière synthétique, les objectifs, les méthodes utilisées et les résultats.

#### **A - Caractérisation des souches**

Le contenu génétique des quatre souches de SA sensibles aux glycopeptides a été étudié de plusieurs manières. Dans un premier temps, les profils de restriction ont été déterminés, afin de juger de la proximité génétique des 4 souches. Ensuite le gène *mec A* de résistance à la méticilline a été recherché par PCR, ainsi que le typage de sa cassette d'insertion *scc mec*.

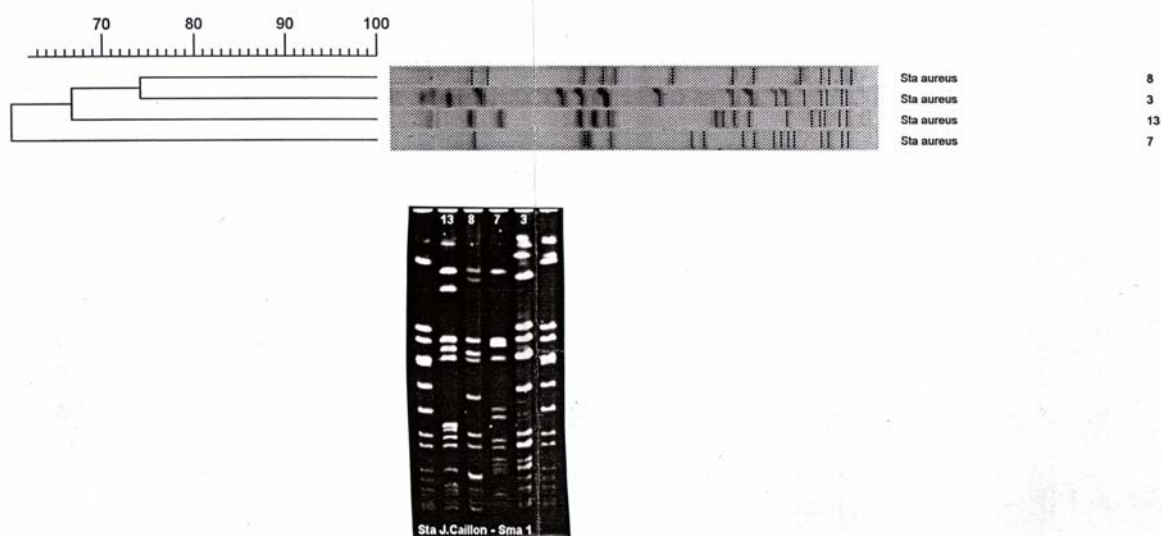
#### **Etude génomique par macrorestriction (polymorphisme de restriction)**

Après extraction, l'ADN des souches de SA 3, 7, 8, et 13, a été découpé par l'enzyme *Sma I*. Après cette étape de restriction, les fragments ont subi une électrophorèse en champ pulsé, et leur migration a été comparée à un marqueur de taille (souche NCTC 8325, après restriction par la même enzyme). Le résultat est présenté figure 11.

La comparaison des profils de restriction de ces souches témoigne surtout de leur diversité génétique, elles sont clairement toutes très différentes.

L'interprétation des résultats de tests comparatifs concernant ces souches est difficile du fait de cet éloignement génétique.

**Figure 11** : Electrophorèse en champ pulsé (PFGE), reproduction du gel, dendrogramme



### Amplification du gène *mecA* et de sa cassette

La présence du gène *mecA* de résistance à la méticilline a été confirmée par PCR. Les types structuraux de l'élément *mec* (*scc mec*), porteur de ce gène, ont également été déterminés par PCR multiplex, basée sur les descriptions des principaux types de cassette *mec*, avec amplification de 8 loci (Oliveira, AAC, 2002).

On a pu constater sur les résultats (tableau XI) que les souches sensibles à la méticilline, étaient porteuses d'une cassette *scc* en l'absence du gène *mecA*, celle-ci était du même type que les souches méti-R de notre étude. Les quatre souches sont ainsi porteuses d'une cassette de classe IV.

Ce phénomène a déjà été rapporté (Corkill, JAC, 2004). Parmi les souches d'infection staphylococcique rencontrées dans une population particulière (toxicomanes), la diffusion de souches clonales sensibles à la méticilline et porteuses de fragments de l'élément *mec* a été décrite.

**Tableau XI** : Présence du gène *mecA* et typage *scc mec*

Souches	PCR <i>mecA</i>	Type <i>scc</i>
SA 3	Positive	IV
SA 8	Positive	IV
SA 7	Négative	IV
SA 13	Négative	IV

## **B - Etude des facteurs de l'hôte, recherche d'une interaction avec le couple Bactérie-Antibiotique**

L'inefficacité de la vancomycine a été constatée sur les numérations bactériennes des végétations d'endocardite. Dans cette situation infectieuse, les mécanismes de défenses immunitaires interviennent peu, en dehors des facteurs plasmatiques, et surtout des facteurs associés aux plaquettes et à leur activation. Deux étapes de recherche ont donc été proposées :

- Approcher de manière globale l'effet de facteurs plasmatiques sur la bactéricidie. Des cinétiques de bactéricidie ont été effectuées, sur différents milieux de cultures, en particulier le plasma humain.
- Approcher de manière globale l'effet de facteurs associés au caillot fibrino-cruorique. La méthode utilisée était le modèle d'infection de caillots de fibrine.

### **Mesure de la bactéricidie de la vancomycine dans le plasma humain**

#### Méthodologie :

- Les milieux de cultures suivant ont été utilisés :
  - o Plasma frais congelé (PC) issu du centre de transfusion sanguine (EFS)
  - o Plasma fraîchement prélevé (PF)
  - o Bouillon de Mueller-Hinton (MH)

- Les souches étudiées étaient SA 8 et SA 3, deux souches meti-R, de sensibilité apparemment conservée aux glycopeptides.
- Des concentrations de vancomycine de 8 et 20mg/l ont été testées

Les cinétiques de bactéricidie ont été faites selon le protocole décrit chapitre 2. Les souches ont été mises en suspension dans les milieux de culture, en présence de vancomycine. Les dénombrements bactériens ont été effectués à 0, 6 et 24H.

### Résultats :

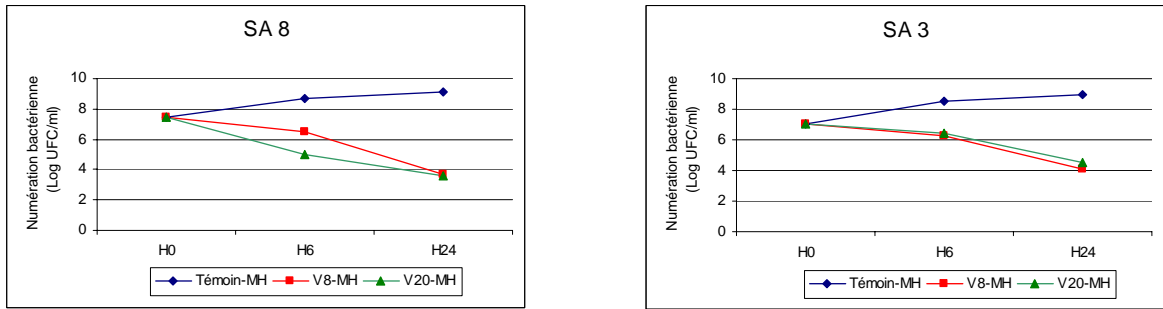
Sur les résultats de ces cinétiques de bactéricidie (figure 12), on n'observe pas de différence de bactéricidie entre un milieu de culture standardisé et du plasma congelé. Par contre, sur le plasma fraîchement prélevé (PF), la survie bactérienne semble globalement plus faible. Il est difficile de visualiser sur ces courbes une réelle augmentation de l'effet bactéricidie de l'antibiotique dans ce milieu car la croissance bactérienne sur milieu MH est nettement supérieure à celle mesurée sur plasma fraîchement prélevé (comparaison des tubes témoin MH et Plasma).

La mortalité bactérienne (différence entre le dénombrement des bactéries survivantes en présence de vancomycine et en milieu témoin de même nature) est exprimée pour éviter tout biais d'interprétation dans la comparaison entre les milieux.

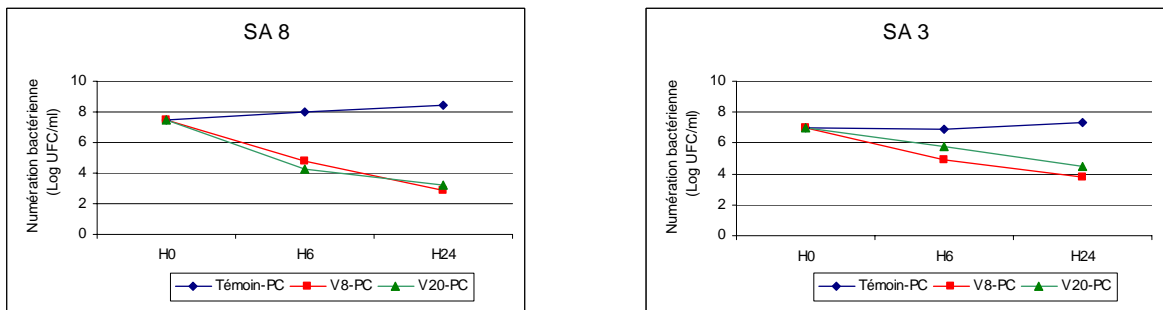
Nos résultats montrent qu'il n'y a pas de modification de l'effet de bactéricide de la vancomycine sur la souche SA 8 lorsque le milieu de culture est un plasma humain alors que sur la souche SA 3, un meilleur effet bactéricide de la vancomycine en milieu standard peut être observé.

**Figure 12 : Cinétiques de bactéricidie sur plasma humain**

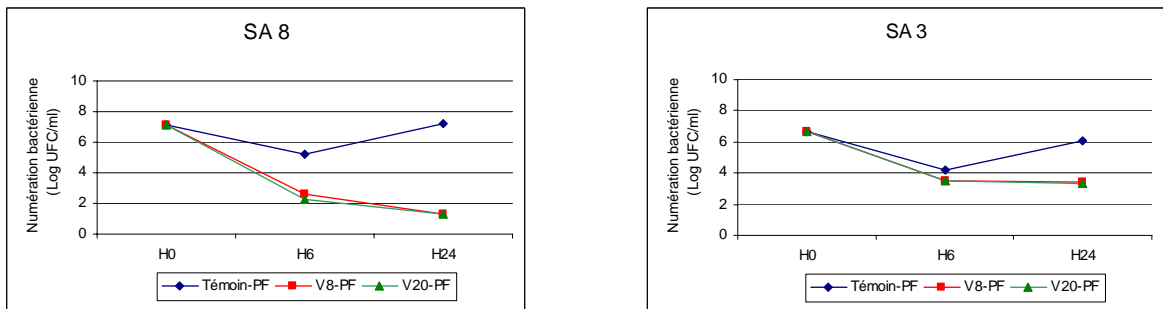
**Figure 12-A : Cinétique en bouillon de Mueller Hinton (MH)**



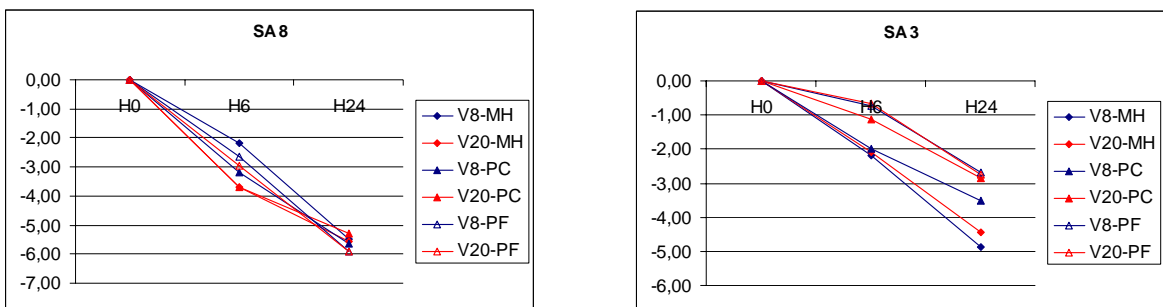
**Figure 12-B : Cinétique en plasma frais congelé (PC)**



**Figure 12-C : Cinétique en plasma fraîchement prélevé (PF)**



**Figure 12-D : Courbes de mortalité bactérienne**



## Activité de la vancomycine dans un modèle d'infection de caillots de fibrine

Le modèle d'infection de caillots de fibrine peut être rapproché de celui d'endocardite de lapin, car les éléments moléculaires et cellulaires constituant ces caillots fibrino-plaquettaire sont des composants essentiels des végétations d'endocardite. Le but était à la fois de rechercher des facteurs inhibant la vancomycine produits au moment de l'activation plaquettaire, et de trouver une façon simple de reproduire les observations faites *in vivo*.

Méthode : Les caillots sont constitués à partir d'un plasma frais riche en plaquettesensemencé avec une suspension des souches SA 8 ou SA 3. L'activation plaquettaire est provoquée par l'ajout de thrombine calcique humaine. Les caillots sont ensuite retirés du sérum restant et incubés dans un bouillon MH pur ou contenant 20mg/l de vancomycine. Au temps 0, et après 24H d'incubation, la charge bactérienne de chaque caillot est dénombrée.

Résultats : L'effet de la vancomycine à 20 mg/L est comparable sur les deux souches dans ce modèle (tableau XI). L'activité de cette molécule dans ce modèle est globalement faible sur les deux souches, avec réduction de moins de deux Log UFC/g en 24H.

**Tableau XI** : Numération bactérienne dans le modèle d'infection de caillots de fibrine

	UFC / gramme +/- déviation standard (nombre de caillots)	
	SA 3	SA 8
H0	7.22 ± 0.39 (3)	7.23 ± 0.91 (3)
H24-Témoin	9.39 ± 0.27 (3)	9.70 ± 0.26 (3)
H24-V20	6.5 ± 0.13 (3)	5.46 ± 0.56 (3)

## Discussion

Aucune de ces explorations n'a permis de déterminer dans quelle situation le SA 8 peut échapper à l'activité de la vancomycine, ni quels facteurs sont en cause.

Dans la littérature, le rôle des plaquettes dans la réponse inflammatoire, et leur présence dans les lésions infectées endovasculaires, a été bien décrit (Yeaman, CID, 1997). L'interaction plaquettes - micro-organismes était déjà connue, notamment l'activation de l'agrégation plaquettaire par *S.aureus*. Des facteurs anti-bactériens (platelet microbicidal proteins) ont été isolés dans le surnageant de plaquettes après stimulation par la thrombine. Ces facteurs sont des protéines de petite taille, cationiques, dont la cible est la membrane cellulaire du staphylocoque (Yeaman, J Clin Invest, 1998). Ils sont également libérés de plaquettes agrégées par contact avec des staphylocoques, ou après stimulation par alpha-toxine. Leur rôle a été étudié dans le modèle d'endocardite du lapin, la souche sensible au tPMP-1 (thrombin induced platelet microbicidal protéin) provoque une maladie moins sévère (mesurée sur la persistance de la bactériémie, les dommages valvulaire aortiques) qu'une souche isogénique résistante à ce facteur (Kupferwasser, Circulation, 2002).

L'interaction de ces facteurs anti-microbiens avec certains antibiotiques a été démontrée. *In vitro*, YQ Xiong constatait une augmentation de l'effet anti-bactérien du tPMP-1 après prétraitement par des antibiotiques agissant sur la paroi bactérienne, pénicilline et vancomycine (Xiong, AAC, 1999).

*In vivo*, l'impact de la sensibilité au tPMP a été étudié dans le modèle d'endocardite du lapin à *S.aureus*, en testant une paire de souches isogéniques différant seulement par le profil de résistance au tPMP. VK Dhawan a montré une perte d'activité de la vancomycine sur la souche résistante au tPMP, mesurée sur la densité bactérienne des végétations, sans perte d'effet sur les lésions spléniques et rénales. (Dhawan, JID, 1999).

L'hypothèse d'une influence de la résistance au tPMP sur l'effet *in vivo* de la vancomycine vis-à-vis de SA 8 est compatible avec nos résultats. Ce profil était

associé à une perte d'efficacité de la vancomycine dans un modèle d'endocardite du lapin, cependant nous n'avons pas de donnée sur une corrélation possible avec le modèle d'infection de caillots fibrino-plaquettaires. Nous ne savons pas si ce facteur est toujours présent au sein du caillot après avoir été extrait et mis en suspension dans un bouillon MH, ni s'il est présent, et à quelle concentration, dans le sang circulant.

## **C - Etude des facteurs bactériens modifiant l'action de l'antibiotique**

Les souches étudiées dans ce travail (à l'exception de hGISA) ont des CMI comparables aux glycopeptides. Néanmoins, il est possible qu'elles soient différentes pour d'autres critères phénotypiques ou génotypiques, et qu'il existe des facteurs interférant avec l'activité *in vivo* des glycopeptides, qui n'aient pas été détectés avec les techniques développées précédemment.

Certaines publications avaient fait état d'un phénomène de tolérance de *S.aureus* aux glycopeptides (May, JAC, 1998). Dans cette étude, la tolérance avait été détectée en mesurant la bactéricidie au cours des premières heures de contact avec l'antibiotique. Aucun mécanisme n'avait été proposé à l'époque pour expliquer ce phénomène. Dans le cas de la tolérance de *S.aureus* aux bêta-lactamines, le mécanisme est une diminution de l'activité spécifique des enzymes autolytiques (Goessens, EJCMID, 1993).

Sur la base de travaux plus récents, l'hypothèse d'une interaction entre la fonction de régulation *agr* et l'activité antistaphylococcique de la vancomycine a été soulevée. Nous poursuivons donc nos explorations par la recherche d'un effet de tolérance, et par la détermination du type de régulon *agr*.

### **Recherche de la tolérance de *S.aureus* vis-à-vis de la vancomycine**

Méthodologie : Les suspensions bactériennes de SA 3, SA 8, SA 13 et SA 7, ont été mises en présence de vancomycine à diverses concentrations (1, 4, 16, 32, 64, 128 mg/l). Un dénombrement bactérien est effectué après 24H d'incubation. Le résultat est exprimé en Log UFC/ml, et en % de bactéries survivantes rapporté à l'inoculum de départ. La CMB est considérée comme la concentration d'antibiotique la plus petite capable de tuer 99.9% des bactéries de l'inoculum de départ (Courvalin, Bactéricidie, 1990). L'inoculum de départ était d'environ 6 Log UFC/mL.

Résultats : Pour la souche SA 8, la CMB n'est jamais atteinte, la bactéricidie ne dépasse pas 99% environ de l'inoculum de départ (soit une division par 100). Ceci est pourtant possible avec les 3 autres souches de *S.aureus*. Ces résultats sont rapportés dans le tableau XIII, et dans la figure 13, avec l'expression en pourcentage de l'inoculum de départ. On mesure ainsi la CMB de SA 3 à 16 mg/L, celle de SA 7 et SA 13 à 1 mg/L. Pour ces trois souches, le rapport CMB/CMI peut-être calculé à 2, 1 et 16 pour SA 7, SA 13, et SA 3 respectivement. Pour la souche SA 8, ce rapport est difficile à calculer puisque aucune CMB ne peut être définie, en considérant celle-ci comme supérieure à 128 pour une CMI à 1 mg/L, on peut conclure que ce rapport est au moins supérieur à 128. Une souche est dite tolérante lorsque ce rapport est supérieur à 32 (Courvalin, Bactéricidie, 1990).

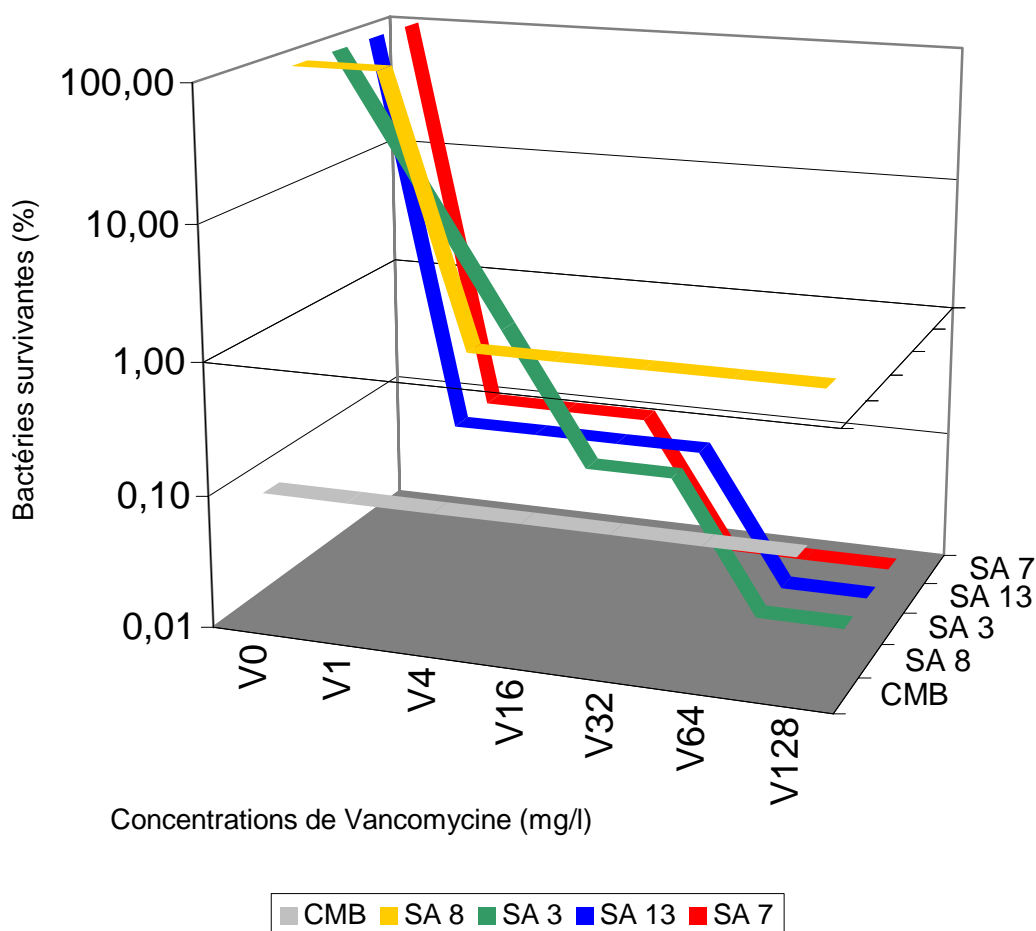
**Tableau XIII** : Bactéricidie en un point final (24H) à des concentrations variées de Vancomycine

Souches		Concentrations de Vancomycine (mg/l)						
		V 0	V 1	V 4	V 16	V 32	V 64	V 128
SA 8	Log UFC	8.3	8.3	4.2	4.1	3.8	4.3	3.9
	%	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
SA 3	Log UFC	8.5	5.6	3.5	2.6	2.6	1.6	1.3
	%	<b>100</b>	<b>10</b>	<b>1</b>	<b>0.1</b>	<b>0.1</b>	<b>0.01</b>	<b>0.01</b>
SA 13	Log UFC	8	3.1	2.5	2.5	2.5	1.6	1.3
	%	<b>100</b>	<b>0.1</b>	<b>0.1</b>	<b>0.1</b>	<b>0.1</b>	<b>0.01</b>	<b>0.01</b>
SA 7	Log UFC	8	3.1	2.6	2.9	1.3	1.6	1.3
	%	<b>100</b>	<b>0.1</b>	<b>0.1</b>	<b>0.1</b>	<b>0.01</b>	<b>0.01</b>	<b>0.01</b>

Log UFC : Numération des bactéries survivantes à 24H

% : Pourcentage de bactéries survivantes

**Figure 13** : Recherche de la tolérance de *S.aureus* à la vancomycine



### Discussion

On peut ainsi définir la souche de SA 8 comme tolérante *in vitro* à la vancomycine, et rapprocher la tolérance de l'échappement observé *in vivo*.

Les résultats observés ici sont différents des résultats obtenus avec la méthode en microdilution (Asseray, AAC, 2005). Cette discordance doit être un élément de réflexion dans le choix des tests de détection de la tolérance en routine. De même pour le calcul du rapport CMB/CMI et son interprétation, nos résultats nous conduisent plutôt à conclure que la CMB n'est jamais atteinte pour la souche tolérante, alors que les CMB des autres souches sont inférieures aux concentrations thérapeutiques cibles.

La tolérance de la souche SA 8 mise en évidence ici, ne pouvait pas être détectée sur les cinétiques de bactéricidie que nous avons précédemment réalisées. Avec les concentrations testées et l'inoculum utilisé dans cette étude, la perte de bactéricidie n'était pas observable.

La tolérance que nous avons détectée paraît associée à une perte d'effet *in vivo* de cette molécule dans le modèle d'endocardite. Cette association entre tolérance détectée *in vitro* et perte d'effet *in vivo* est cependant discutable. En effet, pour la souche de SA 13, le retard d'efficacité précoce observé *in vivo* n'est pas associé à une perte de bactéricidie mesurée par cette méthode. De plus, dans le travail sur le modèle d'endocardite, aucune sur-mortalité n'a été observée dans les groupes infectés par SA 8 et traités par glycopeptides (en particulier si on compare à un groupe traité par une molécule inefficace sur cette souche, l'amikacine, où la mortalité était de 100%, cf Chap 2). La question de l'impact clinique de la tolérance n'est donc pas totalement résolue. L'échappement d'une souche de staphylocoque doré à l'effet bactéricide *in vivo* de la vancomycine est peut-être associé à une aggravation du pronostic (May, JAC, 1998).

Une autre question non résolue est celle du mécanisme de la tolérance. Certains auteurs ont avancé récemment l'hypothèse d'une inhibition du système d'autolyse (muréïne hydrolase staphylococcique) de *S.aureus* (souches de type VISA ou tolérantes) en présence de vancomycine (Sieradzki, AAC, 2006).

## Détermination du type *agr*

### Introduction : Pourquoi s'intéresser au régulon *agr* ?

Certains auteurs ont étudié les relations possibles entre la perte de sensibilité des souches aux glycopeptides et les gènes de régulation de la croissance de *S.aureus*, en particulier le locus *agr* (accessory gene regulator). Ce régulon joue un rôle dans le quorum-sensing, il intervient également dans la régulation de certains facteurs de virulence (comme les hémolysines), ou d'adhésion (protéines liant la fibronectine, *fnb A*, ou liant le fibrinogène, *clf A et B* médiateurs de l'activation et de l'agrégation plaquettaire). Il regroupe 5 gènes (*hld*, *agr B*, *agr D*, *agr C* et *agr A*), code pour un système à deux composants (*agrA-C*) dont le ligand activateur est un « bacterial-density-sensing peptide » (autoinducing peptide [AIP]), codé par *agrD*. L'autoinduction active la synthèse d'un transcrit *agr* hautement conservé, RNAIII, qui est l'effecteur de la régulation du gène de l'exoprotéine. Un polymorphisme a été observé dans la séquence en acides aminés de l'AIP et dans celle de son récepteur (*agrC*) chez les staphylocoques. Les souches de *S. aureus* peuvent être divisées en 4 groupes majeurs (notés de 1 à 4).

D'autres gènes de régulation interviennent dans les capacités d'adhérence, de prolifération de *S.aureus* ou dans la production de toxine. Néanmoins, ils n'ont pas fait l'objet de travaux montrant leur impact sur l'effet des glycopeptides.

Un lien probable entre la résistance à la vancomycine et le groupe *agr 2* a été rapporté. Ces travaux ont d'abord conclu que les souches GISA et hGISA étudiées étaient des souches de *S.aureus* du groupe *agr 2* et avaient perdu la fonction *agr* (perte de la production de delta-hémolysine, qui est sous le contrôle du gène *hld*) (Sakoulas, AAC, 2002). Par la suite, sur des souches appartenant aux différents groupes *agr*, il semble que la perte de fonction de ce locus prédispose mieux à la perte d'effet de la vancomycine pour les souches *agr 2* (Sakoulas, JID, 2003).

Des travaux cliniques ont également été menés. Ils semblent avoir montré un lien entre la gravité du tableau clinique (complications hématogènes de bactériémies sur cathéters infectés à *S.aureus*) et le groupe *agr 2* (Fowler, CID, 2005). Cependant, il existe d'autres facteurs de gravité, notamment associés au terrain et à la présence du cathéter, rendant difficile l'interprétation de ces résultats. Par

ailleurs, le facteur groupe *agr* 2 a également été associé à l'échec clinique de traitement par vancomycine (Moise-Broder, CID, 2004).

A la lumière de ces travaux, nous avons souhaité connaître le type de régulon *agr* des souches étudiées dans ce travail.

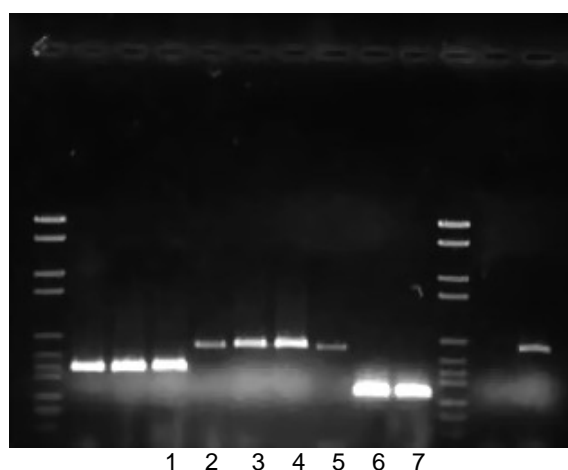
### Méthodologie

Les quatre souches SA 7, SA 13, SA 3 et SA 8, ainsi que d'autres souches, SA P9 et deux souches VISA décrites dans la littérature mu3 et mu50 (Hanaki, AAC, 1998), ont été étudiées. Le groupe *agr* de chacune de ces souches a été déterminé en PCR multiplex, utilisant 5 primers, dont 4 correspondant à la région hypervariable du locus *agr*.

### Résultats

On confirme après plusieurs tests (dont un exemple est illustré sur la figure 14) que la souche SA 8 appartient au groupe 2, ainsi que la souche de *S.aureus* P9 pour laquelle l'efficacité de la vancomycine *in vivo* a déjà été rapportée (Jacqueline, AAC, 2002), et les deux souches mu3 et mu50 pour lesquelles le mécanisme de perte de sensibilité à la vancomycine a été mis en évidence (Hanaki, AAC, 1998).

**Figure 14** : Typage *agr* par PCR multiplex, exemple d'un gel



- |                            |                |
|----------------------------|----------------|
| 1 : <i>S. aureus</i> SA 3  | (groupe agr 1) |
| 2 : <i>S. aureus</i> P9    | (groupe agr 2) |
| 3 : <i>S. aureus</i> SA 8  | (groupe agr 2) |
| 4 : <i>S. aureus</i> Mu3   | (groupe agr 2) |
| 5 : <i>S. aureus</i> Mu50  | (groupe agr 2) |
| 6 : <i>S. aureus</i> SA 7  | (groupe agr 3) |
| 7 : <i>S. aureus</i> SA 13 | (groupe agr 3) |

## Discussion

La question d'un lien entre le groupe *agr 2* de *S.aureus*, la fonction *agr*, et la perte d'activité de la vancomycine, est donc soulevée devant ce résultat. L'intervention de certains facteurs de l'hôte (tel le tPMP) pourrait y être associée. En effet, certains travaux ont montré que les souches *agr 2* ainsi que la perte de sensibilité au tPMP, pourraient être des facteurs significativement associés à la persistance de la bactériémie à *S.aureus* (Fowler, JID, 2004). Plus récemment, un lien a été montré entre la perte de sensibilité de *S.aureus* à la vancomycine (obtenue par passage successifs, et mesurée par analyse de population), la perte de fonction du locus *agr*, la diminution des capacités d'auto-lyse induite par la vancomycine, et la diminution de la bactéricidie induite par le tPMP (Sakoulas, AAC, 2005). Néanmoins les mécanismes de cette association ne sont pas élucidés, l'hypothèse d'un défaut de production de muréïne hydrolase, sous le contrôle d'*agr*, est discutée par ces auteurs. Ceci rejoint l'hypothèse d'une perte d'autolyse en présence de vancomycine, proposée pour expliquer la tolérance. Ces deux pistes sont donc probablement liées.

Les souches SA 8 et *S.aureus* P9 sont de groupe *agr 2*, elles ont toutes deux fait l'objet d'études *in vivo* dans le modèle d'endocardite du lapin, en administrant la vancomycine selon le même protocole. Dans un autre travail (Jacqueline, AAC, 2002), l'effet de la vancomycine en 5 jours de traitement est notablement supérieur sur SA P9 que sur SA 8. Cependant, nous n'avons étudié que le groupage *agr*, sans en mesurer la fonction. Il s'agissait d'approcher l'échappement de *S.aureus* au traitement par vancomycine avec des méthodes utilisables en routine. Les études citées se sont attachées à comprendre les mécanisme de la perte de sensibilité *in vitro*, et à décrire les facteurs associés aux échecs thérapeutiques cliniques. Mais, actuellement aucun test de routine ne s'est clairement montré prédictif du succès ou de l'échec du traitement par glycopeptides des infections à *S.aureus*.

## Partie 3

### Perspectives

L'effet *in vivo*, ainsi que l'efficacité thérapeutique de la vancomycine est donc aléatoire, voué dans un certain nombre de cas à l'échec, ou pour le moins, à un retard d'efficacité. Ce risque est donc pris au moment de la décision de traitement, fondée sur un pari microbiologique probabiliste, tenant compte de la fréquence des résistances à la méticilline chez *S.aureus*. La mesure de la sensibilité par l'antibiogramme standardisé ne permet pas de conforter ce choix, car il ne prédit pas clairement l'effet thérapeutique de la vancomycine. Le traitement initial est donc risqué, et son adaptation sur l'antibiogramme, aveugle.

Il nous faut désormais aller plus loin dans l'exploration de l'échappement de *S.aureus* à l'effet thérapeutique de la vancomycine. Les relations qui s'installent au cœur de l'infection, entre l'hôte, les bactéries et l'antibiotique, sont encore difficiles à décrypter. On peut imaginer, sur la base des résultats de ces travaux, que la bactérie met en place des stratégies de survie, qui ne passent pas seulement par des mécanismes de résistance détectables *in vitro*, et qui lui permettent d'échapper à la lyse par l'antibiotique ou les facteurs de l'hôte. Pour avancer sur cette thématique, il faudra probablement développer d'autres outils de recherche fondamentale, afin de mieux connaître les souches sur le plan moléculaire et phénotypique tels que l'étude de la morphologie des bactéries en présence d'antibiotiques, leur capacité d'autolyse, la modification de leur production toxinique...etc.

Un autre aspect qui pourrait être développé est celui de la pharmacocinétique locale des antibiotiques, et en particulier des glycopeptides. Des travaux de recherche ont été menés (Cremieux, JID, 1989) par radio-marquage il y a plus de quinze ans. Ces explorations avaient surtout conclu à l'hétérogénéité de la pénétration tissulaire des antibiotiques dans les végétations d'endocardite, leur limite principale étant la difficulté de mise en place de telles techniques. De nouvelles méthodes physiques de mesure de la pénétration tissulaire des antibiotiques, technologiquement moins exigeantes, pourraient permettre de

reprendre cette réflexion. Il existe peut-être une variabilité de concentration expliquant la variabilité des résultats obtenus *in vivo*.

Les résultats de travaux expérimentaux ou fondamentaux ne sont pas suffisants pour explorer l'influence des facteurs bactériens sur l'effet de la vancomycine. Il faut pouvoir les confronter aux facteurs cliniques, afin d'en estimer le poids réel dans le pronostic du patient traité. L'ensemble de ce travail a donc conduit à la proposition d'une étude clinique, laquelle a donné lieu à une demande de financement dans le cadre d'un appel d'offre interne de notre CHU (PHRC local).

L'impact respectif dans le pronostic du patient traité,

- de la perte de sensibilité à la vancomycine et/ou la tolérance,
- d'autres facteurs bactériens (facteurs de virulence ou d'adhérence),
- de facteurs liés au patient infecté ou au type d'infection,
- des modalités d'utilisation de la vancomycine, et des traitements associés

est à prendre en compte au moment de la décision de traitement. Cependant nous ne disposons pas d'étude permettant de distinguer clairement ce qui, dans la décision thérapeutique, conditionne le pronostic. Nous avons donc proposé un travail prospectif visant à mesurer l'influence de chacun de ces facteurs sur l'effet de la vancomycine.

D'autres travaux cliniques nous manquent également pour mieux définir la place des différentes molécules anti-staphylococciques dans le traitement des infections à *S.aureus*. En effet, sur la base de nos résultats, la place des glycopeptides dans le traitement de première intention des infections supposées à SARM est discutable, ainsi que leur position de comparateur dans les études visant à évaluer l'efficacité clinique de nouvelles molécules.

# Facteurs prédictifs de l'effet clinique de la Vancomycine dans le traitement des bactériémies à *Staphylococcus aureus* (SA).

Projet de Recherche clinique

Nathalie Asseray, Cedric Jacqueline

Laboratoire Antibiotologie, UPRES EA 3826, Nantes, France

## Résumé

Les échecs ou retards de réponse clinique à l'antibiothérapie, rencontrés avec la vancomycine dans le traitement des infections à staphylocoque doré restent difficiles à expliquer. Les résultats de précédents travaux discutent l'impact respectif de facteurs liés directement à la bactérie (en particulier, sa sensibilité aux antibiotiques testée *in vitro* en routine, mais aussi certains facteurs de virulence ou d'adhérence) ou de facteurs liés au patient infecté. Les modalités d'utilisation de l'antibiotique, ainsi que les traitements associés paraissent également devoir être pris en compte. Nous proposons donc un travail prospectif visant à mesurer l'influence de chacun de ces facteurs sur l'effet de la vancomycine. Nous avons choisi de nous intéresser aux bactériémies à *S.aureus*. Notre travail partira donc d'un repérage des hémocultures positives au laboratoire de l'hôpital. Le recueil des données cliniques ainsi que les explorations bactériologiques seront conduites ensuite, sans que la prise en charge habituelle du patient soit modifiée. Le critère principal de jugement sera le délai de retour à l'apyrexie, jugé sur la courbe de température suivie dans le service d'accueil de chaque patient.

## Conclusion

---

A l'issue de ces travaux, il apparaît que le seul résultat de l'antibiogramme, ou la mesure des CMI, est très insuffisant pour prédire l'efficacité d'un traitement anti-staphylococcique par aminosides, et/ou glycopeptides.

Au moment de la décision thérapeutique, le choix d'un aminoside doit reposer sur l'interprétation de l'antibiogramme que nous avons validée *in vivo*. Nous avons également pu démontrer qu'on ne peut pas préjuger de l'effet des associations comprenant un aminoside sur la seule base des résultats mesurés *in vitro*. Les résultats de ces tests sont parfois discordants avec les résultats observés *in vivo*. Ceci souligne bien l'importance de la modélisation animale dans l'évaluation de l'effet des antibiotiques et de leurs associations.

Pour les glycopeptides, le risque d'un échappement thérapeutique du à une tolérance n'est pas non plus prédit par la mesure de la sensibilité faite en routine. Ces travaux montrent bien à quel point il est malaisé, pour le bactériologiste et le clinicien, de définir la meilleure stratégie thérapeutique. La place de la tolérance dans les échecs cliniques des traitements par vancomycine reste à définir. De nouveaux paramètres prédictifs de l'effet de ces antibiotiques sont nécessaires, et devront être définis au terme d'autres études. Les alternatives thérapeutiques sont également à explorer, la place des nouvelles molécules est encore à évaluer. Les recommandations de traitement des infections à *Staphylocoque doré*, et le positionnement des anti-staphylococciques, doivent s'appuyer non seulement sur les données d'évaluation clinique et microbiologique, mais aussi sur des résultats d'évaluation expérimentale. Une meilleure maîtrise des tests prédisant leur effet thérapeutique devrait pouvoir éclairer le choix du thérapeute.

## Références Bibliographiques

---

1. American Thoracic Society (ATS) Documents. Guidelines for the Management of Adults with Hospital-acquired, Ventilator-associated, and Healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005. 171 : 388-416.
2. ARCHER G., CLIMO M. *Staphylococcus aureus* bacteremia – Consider the source. *N Engl J Med*. 2001. 344 (1) : 55-56.
3. ASSERAY N., MALLARET MR., SOUSBIE M., LIBERELLE B., SCHAERER L., BORREL E., RIEUSSEC MO., WALTER B., GUIMIER C., BUFFET X., SOULE H., CROIZE J., STAHL JP., et le RIPIN. Antibiothérapie à l'hôpital : évaluation des pratiques de prescription dans le cadre d'un réseau inter-hospitalier. *Med Mal Inf*. 2002. 32 : 468-476.
4. ASSERAY N., CAILLON J., ROUX N., JACQUELINE C., BISMUTH R., KERGUERIS MF., POTEL G., BUGNON D. Different aminoglycoside-resistant phenotypes in a rabbit *Staphylococcus* endocarditis infection model. *Antimicrob Agent Chemother*. 2002. 46 (5) : 1591-1593.
5. ASSERAY N., JACQUELINE C., LE MABECQUE V., BATARD E., BUGNON D., POTEL G., CAILLON J. Activity of glycopeptides against *Staphylococcus aureus* infection in a rabbit endocarditis model : MICs do not predict *in vivo* efficacy. *Antimicrob Agent Chemother*. 2005. 49 (2) : 857-859.
6. AUBRY-DAMON H., LEMANISSIER V., LEPOUTRE A., COIGNARD B. Prévalence des traitements antibiotiques à l'hôpital. Résultats de l'enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales 2001. *BEH*. 2004. 32-33 : 162-164.
7. AUBRY-DAMON H., LEGRAND P., BRUN-BUISSON C., ASTIER A., SOUSSY CJ., LECLERCQ R. Reemergence of Gentamicin-susceptible strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* : Role of an infection control program and changes in aminoglycoside use. *Clin Infect Dis*. 1997. 25 : 647-653.
8. BADDOUR L., WILSON W., BAYER A., FOWLER V., BOLGER A., LEVISON M., FERRIERI P., GERBER M., and coll. Infective endocarditis. Diagnosis, Antimicrobial therapy, and management of complications. A statement of healthcare professionals from the committee on rheumatic fever, endocarditis, and Kawasaki disease, council and cardiovascular disease in the young, and the council on cardiovascular surgery and anesthesia, American heart association. *Circulation*. 2005. 111 : e394-e433.

9. BATARD E., JACQUELINE C., BOUTOILLE D., HAMEL A., DRUGEON HB., ASSERAY N., LECLERCQ R., CAILLON J., POTEL G., BUGNON D. Combination of quinupristin-dalfopristin and gentamicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* : experimental rabbit endocarditis study. *Antimicrob Agent Chemother.* 2002. 46 (7) : 2174-2178.
10. BISMUTH R. Détermination du contenu en enzymes modificateurs des aminosides au moyen de sondes intra-géniques. Influence des enzymes sur l'activité bactériostatique et bactéricide des aminosides. In Thèse : « approche phénotypique, génotypique, et épidémiologique de la résistance aux antibiotiques chez *S.aureus*. Implications thérapeutiques ». 1989 : 103-143.
11. BISMUTH R. Cocci à Gram positif et aminosides. In *L'antibiogramme*. P.COURVALIN., F.GOLDSTEIN, A.PHILIPPON, J. SIROT. MPC-Vigot éditeurs, 1985.
12. BLASER J., KONIG C. Once daily dosing of Aminoglycosides. *Eur. J Antimicrobiol. Infect. Dis.* 1995. 14 : 1029-1038.
13. BLOT S., VANDEWOUDE K., HOSTE E., COLARDYN F. Outcome and attributable mortality in critically ill patients with bacteremia involving methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Arch Intern Med.* 2002. 162 : 2229-2235.
14. BUGNON D., POTEL G., CAILLON J., BARON D., DRUGEON H. B., KERGUERIS M. F., FEIGEL P. In vivo simulation of human pharmacokinetics in the rabbit. *Bull. Math. Biol.* 1998. 60:545-567.
15. CAILLON J., JUVIN ME., PIRAULT JR., DRUGEON HB. Activité bactéricide de la daptomycine comparée à celle de la vancomycine et de la teicoplanine sur les bactéries à Gram positif. *Path Biol.* 1989. 37 (5bis) : 540-548.
16. CASIN I., COLLATZ E. Mécanisme de résistance aux aminosides. *Med Thérap.* 1997. 3 (1) : 86-96.
17. CHANG FY., PEACOCK J., MUSER D., TRIPLETT P., McDONALD B., MYLOTTE J., O'DONNELL A., WAGENER M., YU V. *Staphylococcus aureus* bacteremia. Recurrence and the impact of antibiotic treatment in a prospective study. *Medicine.* 2003. 82 (5) : 333-339.
18. CHAMBERS H. Methicillin-resistant Staphylococci. *Clin Microb Rev.* 1988. 1 (2) : 173-186.
19. CHAMBERS H., KENNEDY S. Effects of dosage, peak and trough concentrations in serum, protein binding, and bactericidal rate on efficacy of teicoplanine in a rabbit model of endocarditis. *Antimicrob Agent Chemother.* 1990. 34 (4) : 510-514.

20. CHARLEBOIS E., PERDREAU-REMINGTON F., KREISWIRTH B., BANGSBERG D., CICCARONE D., DIEP B., NG V., CHANSKY K; EDLINB., CHAMBERS H. Origins of community strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis. 2004. 39 : 47-54.
21. CHESNEAU O., MORVAN A., EL SOHL N. Retrospective screening for heterogenous vancomycin resistance in diverse *Staphylococcus aureus* clones disseminated in french hospitals. J Antimicrob Chemother. 2000. 45 : 887-890.
22. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM). Communiqué 2005. Disponible sur <http://www.sfm.asso.fr/>.
23. CORKILL J., ANSON J., GRIFFITHS P., HART A. Detection of elements of the staphylococcal cassette chromosome (scc) in a methicillin-susceptible (mecA gene negative) homologue of a fucidin-resistant MRSA. J Antimicrob Chemother. Advance Access published. May 18, 2004.
24. COURVALIN P., DRUGEON H., FLANDROIS J., GOLDSTEIN F. Bactéricidie. Edition Maloine, Paris, 1990.
25. CRAIG W. Does the dose matter. Clin Infect Dis. 2001. 33 Suppl. 3 : S233-237.
26. CRAIG W. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters : rationale for antibacterial dosing of mice and men. Clin Infect Dis. 1998. 26 : 1-12.
27. CREMIEUX AC., CARBON C. Pharmacokinetic and pharmacodynamic requirements for antibiotic therapy of experimental endocarditis. Antimicrob Agent Chemother. 1992. 36 (10) : 2069-2074.
28. CREMIEUX AC., MAZIERE B., VALLOIS JM., OTTAVIANI M., AZANCOT A., RAFFOUL H., BOUVET A., POCIDALO JJ., CARBON C. Evaluation of antibiotic diffusion into cardiac vegetations by quantitative autoradiography. J Infect dis. 1989. 159(5) : 938-944.
29. CROISIER D., ETIENNE M., BERGOIN E., CHARLES PE., LEQUEU C., PIROTH L., PORTIER H., CHAVANET P. Mutant Selection window in Levofloxacin and Moxifloxacin treatments of experimental pneumococcal pneumonia in a rabbit model of human therapy. Antimicrob Agent Chemother. 2004. 48 (5) : 1699-1707.
30. DAROUICHE R. Current concepts. Treatment of infections associated with surgical implants. N Engl J Med. 2004. 350 : 1422-1429.
31. DELAHAYE F., GOULET V., LEPORTE C. Epidémiologie des endocardites infectieuses. Rev Prat. 1998. 48 486-490.
32. DHAWAN VK., YEAMAN MR., BAYER AS. Influence of in vitro susceptibility phenotype against thrombin-induced platelets microbicidal

- protin on treatment and prophylaxis outcomes of experimental *S.aureus* endocarditis. J Infect Dis. 1999. 180 : 1561-1568.
33. DUBE L., CAILLON J., GRAS-LE GUEN C., JACQUELINE C., KERGUERIS MF., GRANRY JC., POTEL G., BUGNON D. Simulation of Human Gentamicin Pharmacokinetics in an Experimental *Enterococcus faecalis* Endocarditis Model. Antimicrob Agents Chemother. 2003. 47 (11) : 3663-3666.
  34. DUFFULL S., BEGG E., CHAMBERS S., BARCLAY M. Efficacies of different vancomycine dosing regimens against *Staphylococcus aureus* determined with a dynamic in vitro model. Antimicrob Agents Chemother. 1994. 38 (10) : 2480-2482.
  35. ELLIOTT T., FOWERAKER J., GOULD F., PERRY J., SANDOE J. 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 : 971-981.
  36. FAGON J.Y., CHASTRE J., HANCE A.J., MONTRAVERS P., NOVARA A., GIBERT C. Nosocomial pneumonia in ventilated patients: a cohort study evaluating attributable mortality and hospital stay. Am J Med. 1993. 94 (3) : 281-288.
  37. FOWLER V., SAKOULAS G., Mc INTYRE L., MEKA V., ARBEIT R., CABELL C (...), YEAMAN M., BAYER A. Persistent bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection is associated with *agr* dysfunction and low-level in vitro resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein. J infect Dis. 2004.190 : 1140-1149.
  38. FOWLER V., JUSTICE A., MOORE C., BENJAMIN D., WOODS C., CAMPBELL S., RELLER L., COREY G., DAY N., PEACOK S. Risk factors for hematogenous complications of intravascular catheter-related *Staphylococcus aureus* bacteremia. Clin Infect Dis. 2005. 40 : 695-703.
  39. FOWLER V., OLSEN M., COREY R., WOODS C., CABELL C., RELLER B., CHENG A., DUDLEY T., ODDONE E. Clinical identifiers of complicated *Staphylococcus aureus* bacteremia. Arch Intern Med. 2003. 163 : 2066-2072.
  40. FRIDKIN S., HAGEMAN J., MORRISON M., SANZA L., SABETTI K., JERNIGAN J., HARRIMAN K., HARRISON L., LYNFIELD R., FARLEY M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities. N Engl J Med. 2005. 352 : 1436-1444.
  41. GEISEL R., SCHMITZ FJ., FLUIT AC., LABISCHINSKI H. Emergence, mechanism, and clinical implications of reduced glycopeptides susceptibility in *Staphylococcus aureus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2001. 20 : 685-697.

42. GOESSENS WH. Basic mechanisms of bacterial tolerance of antimicrobial agents. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1993. 12 (suppl 1) : S9-12.
43. GOPAL V., BISNO A., SILVERBLATT J. Failure of treatment in *Staphylococcus aureus* endocarditis. *In vivo* and *in vitro* observations. *JAMA*. 1976. 236 (14) : 1604-1606.
44. GRAHAM J., GOULD F. Role of aminoglycosides in the treatment of bacterial endocarditis. *J Antimicrob. Chemother*. 2002. 49 : 437-444.
45. GRIFFITH R. Vancomycin use – an historical review. *J Antimicrob. Chemother*. 1984. 14 (suppl. D) : 1-5.
46. HANAKI H., KUWHARA-ARAI K., BOYLE-VAVRA S., DAUM R., LABISCHINSKI H., HIRAMATSU K. Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycine resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. *Antimicrob Chemother*. 1998. 42 : 199-209.
47. HIRAMATSU K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* : a new model of antibiotic resistance. *Lancet Infect Dis*. 2001. 1 (3) : 147-155.
48. HIRAMATSU K., HANAKI H., INO T., YABUTA K., OGURI T., TENOVER C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother*. 1997. 40 : 135-136.
49. HUTEN D., NOURISSAT G., CREMIEUX AC., TATTEVIN P. Les infections sur prothèse de hanche. In : Infections à staphylocoques sur prothèse. De la prévention au traitement. AC. CREMIEUX et M. WOLFF. EDK éditeur, Paris 2001.
50. IBRAHIM E., SHERMAN G., WARD S., FRASER V., KOLLEF M. The Influence of Inadequate Antimicrobial Treatment of Bloodstream Infections on Patient Outcomes in the ICU Setting. *Chest*. 2000. 118 : 146-155.
51. IREGUI M., WARD S., SHERMAN G., FRASER V., KOLLEF M. Clinical Importance of Delays in the Initiation of Appropriate Antibiotic Treatment for Ventilator-Associated Pneumonia. *Chest*. 2002. 122 : 262-268.
52. JACQUELINE J., ASSERAY N., BATARD E., LE MABECQUE V., KERGUERIS MF., DUBE L., BUGNON D., POTELG., CAILLON J. *In vivo* efficacy of linezolid in combination with gentamicin for the treatment of experimental endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents*. 2004. 24 : 393-396.
53. JACQUELINE C., CAILLON J., LE MABECQUE V., MIEGEVILLE AF., DONNIO PY., BUGNON D., POTELG. *In vitro* activity of linezolid alone and in combination with gentamicin, vancomycine or rifampicin against

- methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by time-kill curve methods. J Antimicrob Chemother. 2003. 51 : 857-864.
54. JACQUELINE C., BATARD E., PEREZ L., BOUTOILLE D., HAMEL A., CAILLON J., KERGUERIS MF., POTEL G., BUGNON D. In Vivo Efficacy of Continuous Infusion versus Intermittent Dosing of Linezolid Compared to Vancomycin in a Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Rabbit Endocarditis Model. Antimicrob Agents Chemother. 2002. 46 (12) : 3706-3711.
55. JAMES J., PALMER S., LEVINE D., RYBAK M. Comparison of conventional dosing versus continuous infusion vancomycin therapy for patients with suspected or documented gram positive infections. Antimicrob Agents Chemother. 1996. 40 (3) : 696-700.
56. JARLIER V. and RAISIN. Bactéries multirésistantes dans les hôpitaux français : des premiers indicateurs au réseau d'alerte d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales (Raisin). BEH. 2004. 32-33 : 148-151.
57. JEHL F. Pharmacocinétique et pharmacodynamie des glycopeptides. Antibiotiques. 2003. 5 : 89-98.
58. JENSEN A., WACHMANN C., ESPERSEN F., SCHEIBEL J., SKINHOJ P., FRIMODT-MOLLER N. Treatment and outcome of *Staphylococcus aureus* bacteremia. A prospective study of 278 cases. Arch Intern Med. 2002. 162 : 25-32.
59. KARCHMER A. Staphylococcal endocarditis. Laboratory and clinical basis for antibiotic therapy. Am J Med. 1985. 78 : 120-127.
60. KAZAKOVA S., HAGEMAN J., MATAVA M., SRINAVASAN A., PHELAN L., GARFINKEL B., BOO T., McALLISTER S., ANDERSON J., JENSEN B;? DODSON D., LONSWAY D., McDOUGAL L., ARDUINO M., FRASER V., KILLGORE G., TENOVER F., CODY S., JERNIGAN D. A clone of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among professional football players. New Engl J Med. 2005. 352 : 468-475.
61. KOLLEF M., SHERMAN G., WARD S., FRASER V. Inadequate Antimicrobial Treatment of Infections A Risk Factor for Hospital Mortality Among Critically Ill Patients. Chest. 1999. 115 : 462-474.
62. KUPFERWASSER LI., YEAMAN MR., SHAPIRO SM., NAST CC., BAYER AS. In vitro susceptibility to thrombin-induced platelet microbicidal protein is associated with reduced disease progression and complication rates in experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis : microbiological, histopathologic and echographic analyses. Circulation. 2002. 105 : 746-752.

63. LAURENT F., LELIEVRE H., CORNU M., VANDENESCH F., CARRET G., ETIENNE J., FLANDROIS JP. Fitness and competitive growth advantage of new gentamicin-susceptible MRSA clones spreading in french hospitals. J Antimicrob Chemother. 2001. 47 : 277-283.
64. LECLERCQ R. Les coques à gram positif multirésistants aux antibiotiques : intérêt du Linezolide. Med Mal Inf. 2002. 32 : 449-459.
65. LECLERCQ R. Résistance aux Glycopeptides. Med Thérap. 1997. 3 (1) : 77-85.
66. LELIEVRE H., LINA G., JONES M., OLIVE C., FOREY F., ROUSSEL-DELVALLEZ M., NICOLAS-CHANOINE MH., BEBEAR C., JARLIER V., ANDREMONT A., VANDENESCH F., ETIENNE J. Emergence and spread in French hospitals of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with increasing susceptibility to gentamicin and other antibiotics. J Clin. Microbiol. 1999. 37(11) : 3452-3457.
67. LEMAITRE N., SOUGAKOFF W., MASMOUDI A., FIEVET MH., BISMUTH R. Characterization of gentamicin-susceptible strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* involved in nosocomial spread. J Clin Microbiol. 1998. 36(1) : 81-85.
68. LENTINO J. Prosthetic joint infections : bane of orthopedists, challenge for infectious disease specialists. Clin Infect Dis. 2003. 36 : 1157-1161.
69. LEVINE D., FROMM B., REDDY B. Slow response to vancomycine or vancomycine plus rifampicin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis. Ann Int Med. 1991. 115 : 674-680.
70. LEW D., WALDVOGEL F. Current concept. Osteomyelitis. N Engl J Med. 1997. 336 (14) : 999-1007.
71. LODISE T., Mc KINNON P., SWIDERSKI L., RYBAK M. Outcomes analysis of delayed antibiotic treatment for hospital-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremia. Clin Infect Dis. 2003. 36 : 1418-1423.
72. LORTAT-JACOB A., DACQUET V., DESPLACE N., BENARD E., BAILLEAU C. EPICAL (Enquête sur la Prise en charge des Infections Chroniques de l'Appareil Locomoteur). Journées nationales d'Infectiologie, Juin 2001, Nantes.
73. LOWY F. Medical progress : *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med. 1998. 339 (8) : 520-532.
74. LYON B., SKURRAY R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* : genetic basis. Microbiol Rev. 1987. 51 (1) : 88-134.
75. MAINARDI JL. Microbiologie des endocardites infectieuses. Rev Prat. 1998. 48 486-490.

76. MAY J., SHANNON K., KING A., FRENCH G. Glycopeptides tolerance in *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother. 1998. 42 : 189-197.
77. MEHROTRA R., DE GAUDIO R., PALAZZO M. Antibiotic pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations in critical illness. Int Care Med. 2004. 30 : 2145-2156.
78. MERMEL L., FARR B., SHERERTZ R., RAAD I., O'GRADY N., HARRIS J., CRAVEN D. Guidelines for the management of intravascular catheter-related infections. Clin Infect Dis. 2001. 32 : 1249-1272.
79. MGHIR AS., CREMIEUX AC., BLETON R., ISMAEL F., MANTEAU M., DAUTREY S., MASSIAS L., GARRY L., SALES N., MAZIERE B., CARBON C. Efficacy of teicoplanin and autoradiographic diffusion pattern of [<sup>14</sup>C]teicoplanin in experimental *Staphylococcus aureus* infection of joint prostheses. Antimicrob Agents Chemother. 1998. 42(11) : 2830-2835.
80. MILLER L., REMINGTON F., RIEG G., MEHDI S., PERLROTH J., BAYER A., TANG A., PHUNG T., SPELLBERG B. Necrotizing fasciitis caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Los Angeles. N Engl J Med. 352 : 1445-1453.
81. MOISE-BRODER P., SAKOULAS G., ELIOPOULOS G., SCHENTAG J., FORREST A., MOELLER R. Accessory gene regulator group II polymorphism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is predictive of failure of vancomycin therapy. Clin Infect Dis. 2004. 38 : 1700-1705.
82. MOISE P., SCHENTAG J. Vancomycin treatment failures in *Staphylococcus aureus* lower respiratory tract infections. Int J Antimicrob Agents. 2000. 16 : S31-S34.
83. MOORE R., LIETMAN P. Clinical response to aminoglycoside therapy : importance of the ratio of peak concentration to minimal inhibitory concentration. J Infect Dis. 1987. 155 : 93-99.
84. MOREILLON P. Rôle des adhésines de *Staphylococcus aureus* et de *Staphylococcus epidermidis* dans l'adhérence aux corps étrangers. In : Infections à staphylocoques sur prothèse. De la prévention au traitement. AC. CREMIEUX et M. WOLFF. EDK éditeur, Paris. 2001.
85. MYLONAKIS E., CALDERWOOD S. Medical progress : Infective endocarditis in adults. N Engl J Med. 2001. 345 (18) : 1318-1330.
86. NITENBERG. Les cathéters imprégnés d'agents anti-infectieux : intérêts et limites. In : Infections à staphylocoques sur prothèse. De la prévention au traitement. AC. CREMIEUX et M. WOLFF. EDK éditeur, Paris. 2001.
87. OLIVEIRA D., LENCASTRE H. Multiplex strategy for rapid identification of structural types and variant of the *mec* element in methicillin-resistant

- Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2002. 46 (7) : 2155-2161.
88. ONERBA. Panton-Valentine Leukocidin-Producing Methicillin-Resistant *S. aureus* in France. 2001-2004. ECC/RICAI, Palais des congrès, Paris, Décembre 2004. Disponible sur : [www.onerba.org/fr/centre-doc/](http://www.onerba.org/fr/centre-doc/).
  89. PAVIE J., LEFORT A., PLOY MC., MASSIAS L., CHAU F., GARRY L., DENIS F., FANTIN B. Influence of Reduced Susceptibility to Glycopeptides on Activities of Vancomycin and Teicoplanin against *Staphylococcus aureus* in experimental Endocarditis. Antimicrob Agents Chemother. 2003. 47 (6) : 2018-2021.
  90. PECHERE JC. Current and future management of infections due to methicillin-resistant staphylococci : the role of quinupristin-dalfopristin. J Antimicrob Chemother. 1999. 44 (Suppl A) : 11-18.
  91. PERICHON B., COURVALIN P. Heterogeneous expression of the enterococcal *van A* operon in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2004. 48 (11) : 4281-4285.
  92. PERLMAN B., FREEDMAN L. Experimental endocarditis II. Staphylococcal infection of the aortic valve following placement of a polyethylene catheter in the left side of the heart. Yale J. Biol. Med. 1971. 44:206-213.
  93. RAISIN (Réseau d'alerte, d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales), CTIN (Comité technique des infections nosocomiales), InVS (Institut national de veille sanitaire). Surveillance des bactériémies nosocomiales en France, résultats 2002. Disponible sur : [www.invs.sante.fr/publications/2004/bacteriemies\\_noso\\_141204/rapport\\_bacteriemies\\_noso.pdf](http://www.invs.sante.fr/publications/2004/bacteriemies_noso_141204/rapport_bacteriemies_noso.pdf)
  94. RODER B., WANDALL D., FRIMODT-MOLLER N., ESPERSEN F., SKINHOJ P., ROSDAHL V. Clinical features of *Staphylococcus aureus* endocarditis : a 10 years experience in Denmark. Arch Intern Med. 1999. 159 (5) : 462-469.
  95. ROGHMAN MC. Predicting methicillin-resistant and the effect of inadequate empiric therapy on survival in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. Arch Intern Med. 2000. 160(7) : 1001-1004.
  96. RYBAK M., ABATE B., KANG L., RUFFING M., LERNER S., DRUSANO G. Prospective Evaluation of the Effect of an Aminoglycoside Dosing Regimen on Rates of Observed Nephrotoxicity and Ototoxicity. Antimicrob Agents Chemother. 1999. 43 (7) : 1549-1555.
  97. SANCHEZ-RECIO M., COLINO C., SANCHEZ-NAVARRO A. A retrospective analysis of pharmacokinetic/pharmacodynamic indices as indicators of the clinical efficacy of ciprofloxacin. J Antimicrob Chemother. 2000. 45 : 321-328.

98. SAKOULAS G., ELIOPOULOS G., FOWLER V., MOELLERING R., NOVICK R., LUCINDO N., YEAMAN M., BAYER A. Reduced susceptibility of *Staphylococcus aureus* to vancomycin and platelet microbicidal protein correlates with defective autolysis and loss of accessory gene regulator (*agr*) function. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005. 49 (7) : 2687-2692.
99. SAKOULAS G., ELIOPOULOS G., MOELLERING R., NOVICK R., VENKATARAMAN L., WENNERSTEN C., DEGIROLAMI P., SCHWABER M., GOLD H. *Staphylococcus aureus* accessory gene regulator (*agr*) group II: is there a relationship to the development of intermediate-level glycopeptide resistance. *J Infect Dis.* 2002. 187 : 929-938.
100. SAKOULAS G., ELIOPOULOS G., MOELLERING R., WENNERSTEN C., VENKATARAMAN L., NOVICK R., GOLD H. Accessory gene regulator (*agr*) locus in geographically diverse *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to vancomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002. 46: 1492-1502.
101. SAKOULAS G., MOISE-BRODER P., SCHENTAG J., FORREST A., MOELLERING R., ELIOPOULOS G. Relationship of MIC and bactericidal activity to efficacy of Vancomycin for treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J Clin. Microbiol.* 2004. 42 (6) : 2398-2402.
102. SCHENTAG J., GILLILAND K., PALADINO J. What have we learned from pharmacokinetic and pharmacodynamic theories. *Clin Infect Dis.* 2001. 32 (Suppl 1) : S39-46.
103. SCHENTAG J., HYATT J., CARR J., PALADINO J., BIRMINGHAM M., ZIMMER G., CUMBO T. Genesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), how treatment of MRSA infections has selected for vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*, and the importance of antibiotic management and infection control. *Clin Infect Dis.* 1998. 26 : 1204-1214.
104. SCHWABER M., WRIGHT S., CARMELI Y., VENKATARAMAN L., DEGIROLAMI P., GRAMATIKOVA A., PERL T., SAKOULAS G., GOLD H. Clinical Implications of varying degrees of vancomycin susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Emerg Inf Dis.* 2003. 9 (6) : 657-664.
105. SIERADZKI K., TOMASZ A. Inhibition of the autolytic system by vancomycin causes vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*-type resistance, cell concentration dependence of the MIC, and antibiotic tolerance in vancomycin-susceptible *S.aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006. 50 (2) : 527-533.

106. SMALL P., CHAMBERS F. Vancomycin for *Staphylococcus aureus* Endocarditis in Intravenous Drug Users. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1990. 34: 1227-1231.
107. Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF) et Association Française d'Urologie (AFU). Infections Urinaires Nosocomiales de l'Adulte. Conférence de Consensus. Paris, Novembre 2002. *Med Mal Inf.* 2003. 33 supplément 4.
108. Société Française d'Anesthésie et de Réanimation (SFAR). Antibiothérapie probabiliste des états septiques graves. Conférence d'experts. 2004. Disponible sur [http://www.sfar.org/s/article.php3?id\\_article=253](http://www.sfar.org/s/article.php3?id_article=253) (site de la SFAR).
109. Société Française d'Hygiène Hospitalière (SFHH). Gestion préopératoire du risque infectieux. Conférence de consensus. Paris. Mars 2004.
110. SORIANO A., MARTINEZ JA., MENSA J., MARCO F., ALMELA M., MORENO-MARTINEZ A., SANCHEZ F., MUNOZ I., JIMENEZ MT., SORIANO E. Pathogenic Significance of Methicillin Resistance for Patients with *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Clin Infect Dis.* 2000. 30 : 368-373.
111. TIEMERSMA E., BRONZWAER S., LYYTIKAINEN O., DEGENER J., SCHRIJNEMAKERS P., BRUINSMA N., MONEN J., WITTE W., GRUNDMANN H., and European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) participants. Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* in Europe 1999-2002. *Emerg Inf Dis.* 2004. 10 (9) : 1627-1634. Disponible sur : [www.earss.rivm.nl](http://www.earss.rivm.nl)
112. VEDEL G., LERUEZ M., LEMANN F., HRAOUI E., RATOVOHERY D. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and coagulase-négative *Staphylococci* with decreased sensitivity to glycopeptides as assessed by determination of MICs. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1990. 9 : 820-822.
113. VEYSSIER P., DOMART Y., LIEBBE A.M. Infections sur cathéter et dispositifs intravasculaires. In : Infections nosocomiales. 2<sup>ème</sup> édition. Masson éditeur. 1998.
114. VINCENT J., BIHARI D., SUTER P., BRUINING H., WHITE J., NICOLAS-CHANOINE M., WOLFF M., SPENCER R., HEMMER M. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *JAMA.* 1995. 274 (8) : 639-644.
115. XIONG Y., YEAMAN M., BAYER A. In vitro antibacterial activity of platelet microbicidal protein and neutrophil defensin against *Staphylococcus*

- aureus* are influenced by antibiotics differing in mechanism of action. Antimicrob. Agents Chemother. 1999. 43 (3) : 1111-1117.
116. YAO J., THAUVIN-ELIOPOULOS C., ELIOPOULOS G., MOELLERING R. Efficacy of teicoplanin in two dosage regimens for experimental endocarditis caused by a Bêta-lactamase-producing strain of *Enterococcus faecalis* with high level resistance to gentamicin. Antimicrob. Agents Chemother. 1990. 34 (5) : 827-830.
117. YEAMAN M. The role of platelets in antimicrobial host defense. Clin Infect Dis. 1997. 25 : 951-970.
118. YEAMAN M., BAYER A., KOO S., FOSS W., SULLAM P. Platelet microbicidal proteins and neutrophil defensin disrupt the *Staphylococcus aureus* cytoplasmic membrane by distinct mechanisms of action. J. Clin. Invest. 1998. 101 : 178-187.

## Tableaux et Figures

---

Tableau I	Fréquence et coûts des infections sur matériel aux US.
Tableau II	Fréquence des SARM en France, en milieu hospitalier
Tableau III	Evolution de la sensibilité des SARM aux antibiotiques
Tableau IV	Fréquence des souches de SARM sensibles à la gentamicine
Tableau V	Numérations bactériennes sur les tissus, animaux témoins.
Tableau VI	Lecture et interprétation de l'antibiogramme des staphylocoques vis-à-vis des aminosides
Tableau VII	Antibiogrammes (diamètre d'inhibition mesuré en mm) et CMI (en mg/l) des quatre souches étudiées vis-à-vis des aminosides
Tableau VIII	Effet <i>in vivo</i> des aminosides sur différents phénotypes de résistance de <i>S.aureus</i> .
Tableau IX	Nombre d'animaux décédés en cours de protocole.
Tableau X	Paramètres pharmacocinétiques connus pour la vancomycine et la teicoplanine
Tableau XI	Présence du gène <i>mecA</i> et typage <i>scc mec</i>
Tableau XII	Numérations bactériennes dans le modèle d'infection de caillots de fibrine
Tableau XIII	Bactéricidie en un point final à des concentrations variées de Vancomycine

---

Figure 1	Prévalence des SARM en Europe 1999-2002
Figure 2	Evolution de la consommation de vancomycine à l'AP-HP (Paris)
Figure 3	Prévalence des traitements antibiotiques (pour 1000 patients hospitalisés)
Figure 4	Numérations bactériennes dans les végétations en fonction de l'inoculum
Figure 5	Variabilité de l'activité <i>in vivo</i> de la vancomycine

Figure 6	Cinétiques de bactéricidie, avec diverses concentrations de glycopeptides
Figure 7	Analyse de population
Figure 8	Activité <i>in vivo</i> des glycopeptides dans le modèle d'endocardite du lapin
Figure 9	Pharmacocinétique des glycopeptides en perfusion continue dans le modèle d'endocardite du lapin.
Figure 10	Influence d'un traitement par 5 jours de vancomycine
Figure 11	Electrophorèse en champ pulsé, reproduction du gel, dendrogramme
Figure 12	Cinétiques de bactéricidie sur plasma humain
Figure 13	Recherche de la tolérance de <i>S.aureus</i> à la vancomycine
Figure 14	Typage <i>agr</i> par PCR multiplex, reproduction du gel

## Lexique des abréviations et définitions majeures

---

AMEs (EMAs) = Aminoglycosides Modifying Enzymes (Enzymes modifiant les aminosides). Mécanisme de résistance de *S.aureus* aux aminosides.

ATS = American Thoracic Society

AUC = area under the curve (aire sous la courbe).

Paramètre pharmacocinétique, défini par la surface sous la courbe des concentrations sériques du médicament en fonction du temps, mesuré sur 24H.

Biofilm = slime

Microorganismes contenus dans une matrice solide, recouvrant habituellement des polymères tels que des dispositifs médicaux

CA SFM = Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

Ce comité définit dans un communiqué diffusé annuellement, les règles de réalisation de l'antibiogramme standardisé, les diamètres critiques, ainsi que les règles de lecture interprétative.

CMI = Concentration Minimale Inhibitrice

Concentration d'antibiotique la plus faible inhibant toute culture visible. Exprimée en mg/ml, elle caractérise l'effet bactériostatique d'un antibiotique.

CMB = Concentration Minimale Bactéricide

Plus petite concentration d'antibiotique bactéricide (< 0,1% de survivants)

CTIN = Comité technique des infections nosocomiales

DUJ = once daily dosing

Dose unique journalière. Mode d'administration actuellement privilégié pour les aminosides.

EUCAST = European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing  
Comité européen dont l'objectif est de standardiser la méthodologie de l'antibiogramme, et d'harmoniser les concentrations critiques.

IDSA = Infectious Diseases Society of America

Infection nosocomiale = infection contractée lors d'une hospitalisation. Elle n'est ni présente ni en incubation à l'admission.

InVS = Institut national de veille sanitaire

K, KT, et KTG : Ces abréviations définissent les différents phénotypes de résistances des staphylocoques aux aminosides

K : résistance à la kanamycine

KT : résistance à la kanamycine et à la tobramycine

KTG : résistance à la kanamycine, la tobramycine, la gentamicine et par extension, à tous les aminosides

MH = Müller – Hinton

Milieu de culture de composition standard, utilisé dans ce travail sous forme liquide ou gélosé pour la mesure de l'effet *in vitro* des antibiotiques.

Pic = peak ou Cmax

Paramètre pharmacocinétique, défini par la concentration la plus élevée du médicament, après l'administration.

Plateau = steady-state

Paramètre pharmacocinétique, défini par la concentration plasmatique obtenue à l'état d'équilibre.

PCR = Polymérase Chain Reaction

Amplification d'une partie définie du génome, permet de détecter la présence d'une séquence d'ADN connue.

#### RAISIN

Réseau d'alerte, d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales

SA = *S.aureus* = *Staphylococcus aureus* = Staphylocoque doré

Cocci à Gram positif, de la famille des Micrococcaceae. L'espèce *S.aureus* se distingue le plus souvent des autres espèces du genre *Staphylococcus* par la production d'une coagulase.

SARM = MRSA

*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

SFHH = Société Française d'Hygiène Hospitalière

SPILF = Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française

Vallée = creux ou Cmin

Paramètre pharmacocinétique, défini par la concentration la plus basse du médicament, entre deux administrations.

## ANTIBIOTHERAPIE DES INFECTIONS A STAPHYLOCOQUE DORE : MIEUX PREDIRE LE SUCCES OU L'ECHEC. APPROCHE EXPERIMENTALE ET *IN VITRO*.

### Résumé

Pour répondre aux défis posés par les infections à Staphylocoques dorés, tant par leur fréquence et leur gravité que par les difficultés thérapeutiques qu'elles soulèvent, les stratégies de traitement reposent actuellement sur quelques molécules, notamment les aminosides et les glycopeptides. L'activité *in vitro* (bactériostatique et/ou bactéricide) d'un antibiotique ne prédit pas toujours son effet *in vivo*. Ces travaux de recherche se sont donc appuyés sur les résultats obtenus *in vivo* dans le modèle d'endocardite du lapin, et *in vitro*, avec ces molécules. Pour les aminosides, les résultats obtenus avec différents phénotypes de résistances, ont permis de valider la lecture interprétative de l'antibiogramme. L'activité des glycopeptides dans ce modèle apparaît variable d'une souche à l'autre. L'existence d'une activité bactériostatique et bactéricide mesurée *in vitro* en conditions standardisées ne prédit pas l'effet précoce *in vivo*. L'échappement *in vivo* de *S.aureus* aux glycopeptides est associé à une tolérance *in vitro*, et probablement à un risque d'échec clinique. Le mécanisme de cet échappement reste à explorer.

### Mots-clé

*Staphylococcus aureus* ; Modèle expérimental ; Glycopeptide ; Aminoside ; Antibiothérapie

## ANTIBIOTICS FOR *S.AUREUS* INFECTIONS : TO IMPROVE THE PREDICTION OF THERAPEUTIC OUTCOME. EXPERIMENTAL AND *IN VITRO* STUDIES.

### Summary

To take up the challenges posed by *S.aureus* infections, as well by their frequency and their severity as by the therapeutic difficulties that they raise, the strategies of treatment currently use some molecules, particularly aminoglycosides and glycopeptides. The *in vitro* activity (bacteriostatic and/or bactericidal) of antibiotics does not valuably predict their *in vivo* effect. These research works were based on *in vitro* and *in vivo* (experimental model of rabbit endocarditis) studies, with these molecules. For the aminoglycosides, the results obtained with various phenotypes of resistance, led to validate the interpretative reading of *in vitro* susceptibility. The activity of the glycopeptides in this model appears variable from one strain to another. The existence of a bacteriostatic and bactericidal activity observed *in vitro* does not predict *in vivo* early efficacy. The *in vivo* failure of glycopeptides against *S.aureus* is associated with an *in vitro* tolerance and, probably, the risk of clinical failure. The mechanism of this failure remains to be investigated.

### Key-words

*Staphylococcus aureus* ; Experimental model ; Glycopeptide ; Aminoglycoside ; Antibiotherapy

ASSERAY – MADANI Nathalie

Laboratoire d'Antibiologie expérimentale et clinique. Faculté de Médecine

1, rue Gaston VEIL

44 000 NANTES