

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

Pneumonies à *Pseudomonas aeruginosa*
Données expérimentales, pharmacologiques et
microbiologiques

Thèse de Doctorat

École doctorale Biologie Santé

Discipline Sciences de la vie et de la santé

Présentée

Et soutenue publiquement par

Cédric Bretonnière

le 7 octobre 2014, devant le jury ci-dessous :

M. le Pr G. POTEL	Président
M. le Pr B. GUERY	Rapporteur
M. le Pr P. TATTEVIN	Rapporteur
M. le Dr J.P. BEDOS	Examineur
M ^{me} le Dr J. CAILLON	Examineur
M. le Pr J. CHASTRE	Examineur

Directeurs de thèse :

M. le Pr D. BOUTOILLE

M. le Dr C. JACQUELINE

Ce travail a été réalisé pendant 4 années (2010-2014) à l'Université de Nantes, au Laboratoire EA3826, Thérapeutiques Cliniques et Expérimentales des Infections (Directeur : Pr Gilles Potel).

Il fait suite à l'année de Master 2 au sein de la même équipe (2008-2009).

Il a donné lieu :

- aux publications suivantes :
 - **Efficacy of doripenem in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* experimental pneumonia versus imipenem and meropenem**
Cédric Bretonnière, Cédric Jacqueline, Jocelyne Caillon, Christophe Guitton, Virginie Le Mabeccque, Anne Françoise Miègeville, Daniel Villers, Gilles Potel and David Boutoille
[Journal of Antimicrobial Chemotherapy](#) 2010; 65: 2423–2427,
 - **Evaluation of doripenem in an experimental model of resistant *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia**
Cédric Bretonnière, Cédric Jacqueline, Jocelyne Caillon, Christophe Guitton, Cyndie Desessard, Virginie Le Mabeccque, Anne Françoise Miègeville, Daniel Villers, Gilles Potel and David Boutoille
[Journal of Antimicrobial Chemotherapy](#) 2012 doi:10.1093/jac/dkr528,
 - **(in press) In vivo efficacy of ceftolozane against *Pseudomonas aeruginosa* in a rabbit experimental model of pneumonia: Comparison with ceftazidime, piperacillin/tazobactam and imipenem**
Cédric Bretonnière, David Boutoille, Jocelyne Caillon, Cyndie Desessard, Christophe Guitton, Gilles Potel and Cédric Jacqueline
[International Journal of Antimicrobial Agents](#) 2014,
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.04.017>.
- à la soumission suivante au *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* :
 - **Are all penems equal when treating pseudomonas infections? Comparison of the susceptibility of 139 *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains to doripenem, meropenem and imipenem**
Cédric Bretonnière, Adeline Maitte, Jocelyne Caillon, Christophe Guitton, Gilles Potel, David Boutoille and Cédric Jacqueline.

Cette thèse est dédiée

à Claire,

qui m'a conseillé, soutenu notamment pendant les semaines difficiles de rédaction,

à Agathe et à Jade,

qui savent déjà qu'il faut travailler dur même (surtout ?) quand on est grand !

à l'Université et à mes Maîtres,

à mes parents,

à mes beaux-parents,

à mes amis,

à la mémoire de mes grands-parents.

Remerciements

AUX MEMBRES DU JURY

À M. le Pr Gilles Potel,

Merci d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

Merci aussi pour votre soutien, votre chaleureux accueil au sein de l'EA 3826. J'ai un grand respect pour vos qualités de clinicien. Le travail considérable qu'il a fallu pour construire et fédérer cette équipe de recherche force également l'admiration. J'espère dans les années à venir pouvoir continuer à apporter ma (petite) pierre à cet édifice !

À M. le Pr Benoit Guery,

Merci Benoit d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail.

C'est pour nous une chance que de pouvoir bénéficier de tes remarques, tes commentaires qui contribueront à améliorer nos travaux de recherche. Nous perpétons ainsi la collaboration nantolilloise et - nous en avons souvent discuté avec David - il semble que nous ayons bien des raisons de continuer dans cette voie.

À M. le Pr Pierre Tattevin,

Merci Pierre d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail.

Nous t'en savons d'autant plus gré que tu nous as rappelé que cette recherche ne correspondait pas forcément à tes topiques habituels. Ton œil de clinicien, ta connaissance des modèles animaux et au-delà, ton acuité de scientifique nous seront d'une grande aide. En outre, tes qualités naturelles d'enseignant dépassent de loin celles de nos plus illustres pédagogues bretons.

À M^{me} le Dr Jocelyne Caillon,

Merci Jocelyne d'avoir accepté de juger ce travail.

Depuis mon arrivée au labo, dès le master 2, vous avez été tellement présente, attentive pour ne pas écrire attentionnée, qu'il n'était pas envisageable que vous ne participiez pas au jury de cette thèse. Merci sincèrement de tout ce que vous m'avez appris, de tout ce que vous continuez à m'apprendre. David a raison : c'est une chance de vous avoir comme professeur.

À M. le Pr Jean Chastre,

Merci d'avoir accepté de juger ce travail.

Pouvoir vous compter parmi les membres du jury est un honneur. Vos connaissances et vos recherches dans le domaine sont telles que c'est une réelle chance pour nous que d'avoir l'occasion de vous soumettre nos propres travaux. Nous tenterons de placer ceux-ci dans la perspective clinique que nous partageons.

À M. le Dr Jean-Pierre Bedos,

Merci Jean-Pierre d'avoir accepté de juger ce travail.

Les (parfois difficiles !) moments de labeur que nous avons partagés pour la RFE sur les antibiotiques ont été à la fois un grand honneur et un grand plaisir pour moi. Tes connaissances cliniques et fondamentales, ta curiosité, ton enthousiasme sont autant de qualités qui nous seront très utiles pour améliorer nos recherches.

À M. le Pr David Boutoille et à M. le Dr Cédric Jacqueline,

Merci à vous deux d'avoir encadré ces travaux.

Comment pourrais-je en quelques lignes vous témoigner toute ma reconnaissance ? J'ai tellement appris à vos côtés et il me reste encore tellement à apprendre... Je suis fier d'être votre élève !

Une pensée particulière pour Hélène et Natacha à qui j'ai gâché quelques journées cet été...

À TOUTE L'EQUIPE EA3826

Anne-Françoise, Virginie, Cyndie, Marion, Raymonde, Isabelle, merci pour votre aide, votre gentillesse. J'ai beaucoup appris à vos côtés. Chaque semaine passée au labo est une grande joie. Je compte bien continuer à venir vous embêter régulièrement dans les années à venir !

Alexis, Matthieu, Nicolas, Xavier (parce qu'il y a aussi des garçons dans l'équipe !), merci pour ces moments de travail (ou non) partagés dans la bonne humeur.

À TOUTE L'ÉQUIPE DE REANIMATION MEDICALE

À M. le Pr Daniel Villers,

Merci de m'avoir accueilli dans le service puis de m'avoir permis d'effectuer ces travaux de recherche. Vous avez largement contribué à mes choix de carrière : le choix d'une discipline, la réanimation médicale, tout d'abord puis ensuite mon positionnement comme référent dans le domaine des maladies infectieuses au sein de l'unité.

À M. le Dr Christophe Guitton,

Merci pour ton soutien sans faille. Merci pour ce que tu es en voie de construire pour notre discipline au sein du CHU. J'espère en retour pouvoir t'apporter mon aide dans de nombreux domaines : clinique, recherche fondamentale et clinique, enseignement.

À mes collègues médecins,

Olivier, Julien, Laurence, Paul, Maud, Laurent, Noëlle, travailler auprès de vous est un plaisir. Sans votre compréhension et votre bienveillance, il ne m'aurait pas été facile de m'échapper au labo !
Merci pour cela.

À tous nos collègues du 3810,

Vous êtes extraordinaires. C'est pour cela que j'ai choisi de travailler en réanimation où - plus encore peut-être qu'ailleurs - la notion de travail en équipe est fondamentale. Bien qu'elle ait été largement remaniée, je suis toujours aussi fier de travailler dans l'Équipe du 3810 !

Sommaire

Remerciements	ii
Sommaire	vi
Liste des Tableaux	x
Liste des Figures	xi
Résumé.....	xii
Introduction	1
Revue Bibliographique	3
I- Bactériologie : Mécanismes d'action et de résistance aux antibiotiques.....	4
A- Site d'action des bêtalactamines : la paroi bactérienne.....	5
1- Rappel sur la structure des enveloppes bactériennes	5
• Structure du peptidoglycane (PG).....	6
• Structure de la membrane externe.....	6
• Structure de la membrane cytoplasmique	6
• Les protéines liant la pénicilline (PLP).....	7
2- Mécanisme d'action des bêtalactamines.....	7
B- Mécanisme de résistance aux bêtalactamines	10
C- Mécanisme de résistance aux bêtalactamines chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
II- Pharmacologie : Bases PK-PD	16
A- Principaux paramètres PK-PD	16
B- Effet post-antibiotique	20
C- Lien PK-PD et efficacité (infections pulmonaires).....	20
D- Lien avec l'émergence de bactéries résistantes	21
E- Limites de ces concepts	21
III- Épidémiologie	23
A- Évolution générale de la résistance	23
1- En Europe	23
2- Aux États-Unis	24
3- Au niveau mondial.....	25
B- Épidémiologie chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
1- Évolution de la résistance chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29

•	En Europe ?	30
•	En France ?	30
2-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> et pneumonie	32
•	Réanimation	32
•	Mucoviscidose	33
IV-	De nouveaux antibiotiques ?	34
A-	Quid des molécules identifiées par l'eCDC dans son rapport de 2009 ?	34
1-	PTZ601 = razpenem	34
2-	ME1036 = CP5609	35
3-	Tomopenem = CS023	35
4-	hLF1-11	35
5-	Lactoferrine	36
6-	Talactoferrine	37
7-	rBPI21	37
8-	NXL 104/ceftazidime	38
B-	Doripénème	39
1-	Programme de développement	39
2-	Mécanisme d'action	40
3-	Infections intra-abdominales	41
4-	Infections urinaires	41
5-	Pneumonies	42
•	Les études DORI-09 et DORI-10	42
•	Des arguments PK-PD et/ou pharmaco-économiques en faveur du doripénème	45
•	Études ultérieures	46
C-	Ceftolozane	48
1-	Mécanisme d'action	48
2-	Données d'activité <i>in vitro</i>	50
3-	Données pharmacocinétiques	51
4-	Données des expérimentations animales	51
5-	Données cliniques	52

Travaux personnels	53
I- Objectifs	54
II- Matériels et Méthodes	54
A- Antibiotiques	54
B- Souches bactériennes	54
1- PAO1 et $\Delta oprD$ PAO1	54
2- Souches cliniques	56
C- Milieux	56
D- Antibiogrammes	56
E- Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)	57
1- Pour la partie expérimentation animale	57
• Microdilution en milieu liquide	57
• Diffusion en milieu gélosé	57
2- Pour les souches cliniques	58
F- Expérimentations <i>in vivo</i> : modèles de pneumonie chez le lapin	59
1- Animaux	59
2- Modèle de pneumonie expérimentale aiguë	59
• Préparation de l'inoculum	59
• Expérimentation	60
3- Modèle de pneumonie expérimentale chronique	60
• Souche bactérienne	60
• Corps étranger intra-bronchique	60
• Utilisation de microbilles d'agar	61
G- Données pharmacocinétiques	64
• Étude de la pharmacocinétique plasmatique spontanée des antibiotiques chez le lapin	64
• Détermination de la pharmacocinétique plasmatique humanisée	65
• Suivi de la pharmacocinétique plasmatique chez les animaux traités	65
H- Évaluation de l'efficacité des antibiotiques dans le modèle expérimental aigu	66
I- Mutants sous traitements	67
J- Analyses statistiques	67
1- Efficacité des antibiotiques dans le modèle expérimental	67
2- Comparaison de la sensibilité aux carbapénèmes	68
3- Seuil de positivité retenu	69
III- Résultats - Commentaires	70
A- Modèles d'infection chronique	70
1- Corps étranger intra-bronchique	70

2-	Modèle avec microbilles	70
•	Fabrication des microbilles	70
•	Modèle murin	71
•	Modèle d'infection chronique chez le lapin.....	72
B-	Modèle d'infection aiguë.....	75
1-	Données d'efficacité <i>in vivo</i>	75
•	Étude n°1 : doripénème <i>versus</i> imipénème et méropénème + comparaison de différentes modalités d'administration du doripénème.....	75
•	Étude n°2 : doripénème <i>versus</i> imipénème et méropénème.....	89
•	Étude n°3 : ceftolozane <i>versus</i> ceftazidime, pipéracilline/tazobactam imipénème	93
2-	Mutants résistants	106
3-	Pharmacocinétiques.....	107
•	Étude n°1 : doripénème <i>versus</i> imipénème et méropénème + comparaison de différentes modalités d'administration du doripénème.....	107
•	Étude n°2 : doripénème <i>versus</i> imipénème et méropénème (souche $\Delta OprD$ PAO1)	109
•	Étude n°3 : ceftolozane <i>versus</i> ceftazidime, pipéracilline/tazobactam imipénème	110
C-	Comparaison de la sensibilité aux carbapénèmes.....	112
IV-	Discussion	131
A-	Modèle expérimental d'infection aiguë	132
B-	Modèle de pneumonie chronique	137
C-	Intérêt des nouvelles molécules ?	138
1-	Doripénème.....	138
2-	Ceftolozane	140
3-	Développement des nouvelles molécules.....	141
	Conclusion/Perspectives	142
	Références	144
	Annexes	158

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Classification des antibiotiques selon leur site d'action.....	5
Tableau 2 : Classification des bêtalactamines.....	9
Tableau 3 : Classification des bêtalactamases	11
Tableau 4 : Différents types de bêtalactamases acquises hydrolysant les céphalosporines de troisième génération (C3G) et/ou les carbapénèmes	13
Tableau 5 : Différents types de carbapénémases	13
Tableau 6 : Phénotypes de résistance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aux bêtalactamines	15
Tableau 7 : <i>Escherichia coli</i> : Résistance aux céphalosporines de troisième génération ^a (résumé des taux de résistance rapportés ou publiés par région OMS)	26
Tableau 8 : <i>Escherichia coli</i> : Résistance aux fluoroquinolones ^a (résumé des taux de résistance rapportés ou publiés par région OMS)	26
Tableau 9 : <i>Klebsiella pneumoniae</i> : Résistance aux céphalosporines de troisième génération ^a (résumé des taux de résistance rapportés ou publiés par région OMS)	28
Tableau 10 : <i>Klebsiella pneumoniae</i> : Résistance aux carbapénèmes ^a (résumé des taux de résistance rapportés ou publiés par région OMS)	28
Tableau 11 : Antibiotiques, par famille et par molécules, utilisés pour classer les souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dans les différentes catégories (MDR, XDR et PDR).....	29
Tableau 12 : Résultats des études de non-infériorité du doripénème dans les infections intra-abdominales compliquées.....	41
Tableau 13 : Résultats des études de non-infériorité du doripénème dans les pneumonies.....	44
Tableau 14 : Concentrations critiques pour les 3 carbapénèmes selon les recommandations de l'EUCAST	58
Tableau 15 : Modalités de traitement des animaux pour les études <i>in vivo</i>	66
Tableau 16 : Détails des résultats de la mise au point du modèle de pneumonie chronique chez le lapin (microbilles)	73
Tableau 17 : Apports des modèles animaux illustrés au travers de quelques-uns des grands progrès de la médecine depuis le début du XX ^{ème} siècle	133

Liste des Figures

Figure 1 : Evolution de la concentration plasmatique de l'antibiotique (<i>en mg/L</i>) en fonction du temps (<i>en heure:minute</i>) selon des modalités d'administration différentes : huit vitesses de perfusion différentes de 10 secondes à 8 heures.....	18
Figure 2 : Evolution des charges bactériennes (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853) en fonction du temps et en présence de concentrations croissantes d'antibiotiques.....	19
Figure 3 : Evolution de la résistance chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en France	31
Figure 4 : Modifications de formes de <i>E. coli</i> ou <i>Pseudomonas aeruginosa</i> exposés à différents carbapénèmes.....	40
Figure 5 : Modifications de formes de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PAO1) exposés au ceftolozane	49
Figure 6: Génome de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1.....	55
Figure 7 : Double cathéter pour prélèvement distal bronchique protégé.....	61
Figure 8 : Fabrication des microbilles d'agarose	62
Figure 9 : Charges bactériennes pulmonaires obtenues dans le modèle murin de pneumonie chronique	71
Figure 10 : Charges bactériennes pulmonaires obtenues dans le modèle de pneumonie chronique chez le lapin	72
Figure 11 : Charges bactériennes pulmonaires obtenues selon les différents bras de traitement (d'après étude n°2).....	89
Figure 12 : Charges bactériennes pulmonaires obtenues selon les différents bras de traitement (variation d'après l'étude n°3).....	94
Figure 13 : Exemple de gamme étalon pour le dosage microbiologique du méropénème	107
Figure 14 : Nombre de publications référencées dans Pubmed par années pour le doripénème (DOR) et le ceftolozane (TOL)	141

Résumé

Les pneumonies, notamment nosocomiales, sont fréquentes et grevées d'une mortalité et d'une morbidité élevées. *Pseudomonas aeruginosa* est au premier rang des bactéries responsables de ces infections et pose des problèmes préoccupants d'émergence de résistance aux antibiotiques. Dès lors, toute nouvelle donnée microbiologique ou expérimentale pertinente est utile.

Dans un premier temps, à partir d'un modèle d'infection pulmonaire aiguë chez le lapin, animal chez qui il est possible de simuler fidèlement la pharmacologie humaine, nous avons tenté de mettre au point un nouveau modèle d'infection pulmonaire, chronique cette fois, en utilisant une solution bactérienne avec des microbilles d'agarose.

Nous avons utilisé le modèle d'infection aiguë pour évaluer l'efficacité de nouvelles molécules antibiotiques contre *Pseudomonas aeruginosa*. Ainsi, le dernier antibiotique de la classe des carbapénèmes, le doripénème, à différentes posologies et différents modes d'administration intraveineuse, a été comparé en termes d'efficacité aux 2 molécules de référence, le méropénème et l'imipénème. Nous avons pu montrer que des posologies plus élevées de doripénème devaient être privilégiées.

Nous avons également, dans ce même modèle, évalué l'efficacité du ceftolozane. Cette nouvelle céphalosporine est aussi efficace que les comparateurs (ceftazidime, pipéracilline/tazobactam et imipénème) à posologie « usuelle » (1gX3/j) et plus efficace à doses plus élevées (2gX3/j).

Enfin, nous avons comparé la sensibilité *in vitro* de 169 souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis des 3 carbapénèmes cités ci-dessus (imipénème, méropénème et doripénème) démontrant que ces 3 molécules ont, au final, des CMI's assez proches.

Introduction

Dans la première partie de ce travail, nous proposons une revue de la littérature sur différentes notions (bactériologiques, pharmacologiques, épidémiologiques...). Ce travail bibliographique ne prétend pas être exhaustif. L'accent est volontairement mis principalement sur les bêtalactamines, les infections respiratoires, *Pseudomonas aeruginosa*, les patients les plus sévères...

Organiser la présentation des travaux réalisés au cours des années de thèse relève toujours d'un réel casse-tête... Ces travaux ont en effet donné lieu à des publications. Chacune de celles-ci constitue un ensemble cohérent en soi avec présentation successive des différents chapitres : introduction, matériel et méthodes (M&M), résultats, discussion...

Les articles font partie intégrante du présent mémoire. Ils sont matérialisés par des feuilles de couleur. Plutôt que de construire le plan de cette thèse en consacrant une partie à chaque article (avec pour chacun, une succession des sous chapitres *introduction, matériel et méthodes, résultats, discussion*), nous choisissons de regrouper les techniques utilisées dans un seul chapitre « *M&M* ».

Les articles sont présentés dans le chapitre « *Résultats* ». Afin d'éviter de proposer des informations (tant les résultats que la discussion de ceux-ci) en doublons, les résultats déjà détaillés dans les articles ne sont que rapidement résumés. Il en est de même de la discussion spécifique de chaque étude que le lecteur trouvera dans les articles. De brefs commentaires sont ajoutés pour préciser certains résultats.

En revanche, les travaux qui n'ont pas donné lieu à publication sont discutés plus longuement. De même, les travaux de thèse dans leur ensemble, sont commentés dans un chapitre « *Discussion* » dédié.

Les consignes de l'Université quant à la rédaction de la thèse, en dehors du choix de la langue – le français sauf dérogation ! – sont relativement souples. Ainsi, bien qu'il soit d'un usage classique de recourir aux formes verbales passées (imparfait, passé simple), puisque cette contrainte n'est pas (réglementairement) obligatoire, nous assumons le parti pris d'écrire au présent !

Tout mémoire de thèse comprend une partie « *Remerciements* », qui parfois paraît longue mais le doctorat est une épreuve qui n'est surmontable que grâce aux efforts conjugués de nombreuses personnes. C'est le cas pour nos travaux ! Aussi ces remerciements sont-ils tout à fait sincères comme l'est le vœu suivant.

Nous souhaitons que le lecteur prenne autant de plaisir à la lecture de ce mémoire que nous en avons eu à l'écrire.

Nantes,

juillet 2014,

Cédric Bretonnière.

Revue Bibliographique

I-	Bactériologie : Mécanismes d'action des antibiotiques - Mécanismes de résistance	4
A-	Site d'action des bêtalactamines : la paroi bactérienne	5
B-	Mécanisme de résistance aux bêtalactamines.....	10
C-	Mécanisme de résistance aux bêtalactamines chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
II-	Pharmacologie : Bases PK-PD	16
A-	Principaux paramètres PK-PD.....	16
B-	Effet post-antibiotique	20
C-	Lien PK-PD et efficacité (infections pulmonaires)	20
D-	Lien avec l'émergence de bactéries résistantes.....	21
E-	Limites de ces concepts.....	21
III-	Épidémiologie.....	23
A-	Évolution générale de la résistance.....	23
B-	Épidémiologie chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
IV-	De nouveaux antibiotiques ?.....	34
A-	Quid des molécules identifiées par l'eCDC dans son rapport de 2009 ?	34
B-	Doripénème.....	39
C-	Ceftolozane.....	48

« Un antibiotique [**Bentley 2003**] (du grec *anti* : « contre », et *bios* : « la vie ») est une molécule naturelle ou synthétique qui détruit ou bloque la croissance des bactéries. » Wikipédia®, Encyclopédie libre...

On utilise habituellement une classification basée sur le site d'action dans la bactérie ou sur le processus physiologique visé.

Ainsi, distingue-t-on :

- les antibiotiques actifs sur la paroi bactérienne,
- les antibiotiques actifs sur la membrane cytoplasmique,
- les antibiotiques actifs sur des processus qui se déroulent dans le cytoplasme : la synthèse des protéines, au niveau des ribosomes notamment, et les acides nucléiques, notamment en perturbant leur synthèse.

Au sein de chaque groupe, les familles d'antibiotiques sont définies en fonction de la structure chimique des molécules. Pour chaque famille, le(s) mécanisme(s) moléculaires respectivement mis en jeu sont de mieux en mieux connus. Les principales familles sont présentées dans le [Tableau 1](#).

Notre travail porte sur deux bêtalactamines. Aussi, les rappels sur le mode d'action et les mécanismes de résistance ne portent que sur ce groupe d'antibiotiques.

ATB actifs sur la paroi bactérienne	bêtalactamines glycopeptides phosphonopectides
ATB actifs sur la membrane cytoplasmique	gramicidines polymyxines daptomycine
ATB actifs sur la synthèse protéique	aminosides cyclines macrolides lincosamides kétolides streptogramines phénicolés acide fusidique oxazolidinones
ATB actifs sur les acides nucléiques	quinolones rifamycines nitro-imidazolés nitrofuranes sulfamides diaminopyrimidines
les inhibiteurs de bêtalactamase	

Tableau 1 : Classification des antibiotiques selon leur site d'action

(d'après [Jehl 2012a])

A- Site d'action des bêtalactamines : la paroi bactérienne

1- Rappel sur la structure des enveloppes bactériennes

Trois catégories d'antibiotiques agissent sur la paroi bactérienne : les bêtalactamines (Tableau 2), les glycopeptides et le seul représentant de phosphonopectides, la fosfomycine. Ces trois familles agissent à des étapes différentes de la synthèse du peptidoglycane, composant essentiel de cette paroi bactérienne.

De la structure de la paroi dépend l'appartenance des bactéries au groupe des bactéries à Gram positif ou à Gram négatif. Pour les bactéries à Gram positif, le peptidoglycane (PG) est épais et constitue la partie la plus externe de la bactérie. En revanche, le PG est plus fin et entouré d'une membrane, dite membrane externe, chez les bactéries à Gram négatif.

- Structure du peptidoglycane (PG)

Le PG est constitué d'un polymère de chaînes polyosidiques reliées entre elles par de courtes chaînes peptidiques, les tétrapeptides. Ce réseau tridimensionnel entoure la bactérie. Il est plus ou moins compact en fonction du nombre de ponts peptidiques et d'éventuelles liaisons hydrogènes [Jehl 2012a].

On distingue trois étapes pour la synthèse de ce PG [Sobhanifar 2013]. Au cours de l'étape cytoplasmique, un pentapeptide est synthétisé. Celui-ci est transporté à travers la membrane cytoplasmique (transporteur lipidique). Lors de l'étape membranaire, le peptide se lie à un disaccharide puis perd son transporteur. Enfin, lors de l'étape pariétale, ce pentapeptide-disaccharide est attaché à un fragment identique contribuant ainsi au développement du PG (allongement, formation d'un septum ou encore épaissement de la paroi). À chacune de ces étapes correspond une machinerie enzymatique particulière : glycosyltransférases, transpeptidases, carboxypeptidases. Certaines peuvent d'ailleurs avoir plusieurs types d'action : transpeptidase et carboxypeptidase par exemple. Quoiqu'il en soit, ces trois catégories d'enzymes concourent au développement du PG. Les autolysines en revanche découpent le PG, réalisant ce que certains auteurs décrivent comme un « travail de finition ». Cette activité à l'état basal est modeste pour une bactérie donnée. Toutefois, un déséquilibre entre l'activité des enzymes « constructrices » et ces autolysines, à la faveur de celles-ci, peut résulter en une mort cellulaire (bactérienne) [Jehl 2012a].

- Structure de la membrane externe

La paroi des bactéries à Gram négatif est plus fine et plus complexe que celle des bactéries à Gram positif. Elle comporte en effet une membrane externe, constituée d'un double feuillet lipidique (phospholipides et lipopolysaccharides). Au sein de cette membrane externe, un très grand nombre de protéines ont été identifiées dont les fonctions sont multiples : transport spécifique, ou non (porines), protéines de conjugaison, de structure ou encore douées d'activités enzymatiques.

- Structure de la membrane cytoplasmique

Elle constitue la partie la plus interne de la paroi bactérienne, définissant l'espace intracellulaire. Il s'agit là-aussi d'un double feuillet lipidique au sein duquel on trouve de très nombreuses protéines (co-enzymes de la respiration, enzymes de synthèse des acides gras et des phospholipides, de l'ATPase membranaire...).

- Les protéines liant la pénicilline (PLP)

Ces protéines sont ancrées dans la membrane cytoplasmique. Elles émergent à la face externe de cette membrane dans l'espace périplasmique. Elles ont toutes une activité enzymatique par laquelle elles participent à la synthèse du PG : glycosyltransférase, transpeptidase, carboxypeptidase [Sobhanifar 2013]. Leurs structures biochimiques sont de mieux en mieux connues ce qui permet aussi de mieux appréhender leurs fonctions [Sainsbury 2011; Smith 2013].

2- Mécanisme d'action des bêtalactamines

Avant de pouvoir interagir avec leurs cibles, les PLP, les bêtalactamines doivent pénétrer dans la bactérie puis résister à l'hydrolyse des bêtalactamases périplasmiques.

Pour les bactéries à Gram positif, la paroi est le seul constituant que les bêtalactamines doivent franchir. À quelques exceptions près, ceci ne pose pas de grandes difficultés.

En revanche, pour les bactéries à Gram négatif, les choses sont rendues plus compliquées par la membrane externe. Le passage par voie lipidique, la présence de porines et différents facteurs physico-chimiques, tels que la taille, l'hydrophobicité, ou la charge des molécules, influencent cette pénétration.

Une fois dans l'espace périplasmique, les bêtalactamines doivent résister aux bêtalactamases qui sont toujours présentes ne serait-ce qu'à très faible niveau. Cette capacité de résistance¹ dépend du flux d'entrée de l'antibiotique, de l'affinité des enzymes vis-à-vis de la molécule.

Ensuite seulement, les bêtalactamines peuvent interagir avec les PLP. Ces dernières sont variables en nombre selon les espèces. La fixation (liaison covalente) aboutit à une inhibition de la fonction enzymatique des PLP dont on a dit qu'elles étaient impliquées dans la synthèse du PG. Certaines bêtalactamines se fixent préférentiellement à telle ou telle PLP [Nikolaidis 2014; Sobhanifar 2013]. Ceci est variable selon les espèces et les molécules.

La fixation d'une bêtalactamine sur une PLP peut avoir trois types de conséquences morphologiques sur la bactérie : formation de filaments, de sphéropastes suivie d'une lyse bactérienne ou de formes globulaires [Curtis 1979; Hayes 1983]. Là encore, il existe une grande variabilité selon les espèces. Bloquant ainsi la synthèse du PG, la fixation aux PLP entraîne *stricto-sensu* une bactériostase. C'est la

¹ Résistance (pour une fois !) des antibiotiques à l'enzyme bactérienne et non des bactéries aux antibiotiques !

mise en jeu d'autres groupes d'enzymes lytiques (lysines) qui conduit à l'effet bactéricide de ces molécules.

F. Jehl *et al.* résumant ainsi la situation : [Jehl 2012a]

« Le peptidoglycane est en perpétuel remaniement. Il résulte d'un équilibre dynamique entre activité de synthèse (PLP= transpeptidases, carboxypeptidases, glycosyltransférases) et d'hydrolyse (autolysines à bas niveau). Toute rupture de cet équilibre, comme par exemple inhibition des PLP par les bêtalactamines, puis activation des autolysines est péjorative (mort) pour la bactérie.

Les paramètres clefs qui expliquent les différences importantes d'activité des nombreuses bêtalactamines disponibles, alors qu'elles ont le même mécanisme d'action pharmacologique, sont les suivants :

- *pénétration variant, en termes de vitesse, d'un facteur 1 à 500 en fonction des molécules,*
- *stabilité extrêmement variable vis-à-vis des bêtalactamases périplasmiques chez les bactéries à Gram négatif, la vitesse d'hydrolyse variant d'un facteur 1 à 10 000. Ces deux aspects sont difficilement dissociables.*
- *affinité très variable vis-à-vis des PLP. »*

Pénames	Méthoxy-pénames	Témocilline
	Pénicillines	Pénicilline G, A, M, Carboxypénicillines, Uréidopénicillines, Aminidopénicillines Sulbactam, Tazobactam...
	Oxapénames	Acide clavulanique
	Carbapénames	
Pénèmes	Oxapénèmes	
	Carbapénèmes	Imipénème, Méropénème, Ertapénème, Doripénème...
	Sulfopénèmes	
Céphèmes	Oxacéphèmes	Moxalactam
	Céphalosporines	1 ^{ère} génération
		2 ^{ème} génération: Céfamandole, Céfuroxime...
		3 ^{ème} génération: Céfotaxime, Ceftazidime, Ceftriaxone... à large spectre: Céfépime, Cefpirome, Ceftaroline, Ceftolozane...
	Céphamycines	Céfoxitine, Céfotétan, Cefmétazole
	Carbacéphèmes	
Monolactames	Nocardicines	
	Monobactames	Aztréonam
	Monophosphames	
	Monocarbames	
	Monosulfactames	

Tableau 2 : Classification des bêtalactamines

(d'après [Bush 2012; Jehl 2012a])

B- Mécanisme de résistance aux bêtalactamines

De très nombreux mécanismes ont été identifiés pour cette famille d'antibiotiques [Nikolaidis 2014; Wilke 2005].

On rencontre des résistances par **impermeabilité** chez les bactéries à Gram négatif par altération quantitative ou qualitative des porines. Elles sont souvent associées à d'autres mécanismes de résistance [Farra 2008].

Les **efflux actifs** sont représentés par 4 systèmes¹ : MexA-MexB-OprM, MexC-MexJ-OprM, MexE-MexF-OprN, MexX-MexY-OprM [Hinchliffe 2013]. La surexpression de ces systèmes conduit à une résistance à la ticarcilline et à l'aztréonam pour MexAB ou au céfépime pour MexCD.

Les bactéries à Gram positif peuvent **modifier leur PLP** en modifiant leurs gènes de structure (entérocoques), en remplaçant dans les gènes de PLP certains fragments par des fragments correspondants d'autres espèces (« gènes mosaïques ») ou encore en intégrant dans leur chromosome un gène codant pour une nouvelle PLP (staphylocoques résistants à la méticilline).

Enfin, les bactéries peuvent produire des enzymes inactivant les bêtalactamines [Drawz 2010]. Ces **bêtalactamases** sont classées selon Ambler [Ambler 1980] ou Bush et Jacoby [Bush 2010; Bush 1995] selon leur structure ou leur fonction. Elles sont présentées dans le [Tableau 3](#).

C- Mécanisme de résistance aux bêtalactamines chez *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est probablement l'espèce bactérienne qui offre la plus grande variété de possibilité de mécanismes de résistance [Boutoille 2009a; Livermore 2002; Morita 2014]. Il est naturellement résistant à de nombreux antibiotiques. De plus, il est très fréquent que plusieurs mécanismes de résistance, souvent intriqués d'ailleurs, soient mis en œuvre par la bactérie aboutissant à des souches cliniques dites MDR ou XDR (pour Multi-Drug Resistant ou eXtensively²

¹ En fait le nombre de systèmes d'efflux est plus important (n=11) mais seuls ces 4 systèmes (pour l'instant) semblent impliqués dans les mécanismes de résistance aux antibiotiques.

² On trouve parfois aussi l'abréviation XDR pour eXtremely Drug Resistant

Patel, S. J., A. P. Oliveira, *et al.* (2014). "Risk factors and outcomes of infections caused by extremely drug-resistant gram-negative bacilli in patients hospitalized in intensive care units." *American journal of infection control* **42**: 626-631....

CLASSIFICATION		TYPE D'ENZYME	CARACTERISTIQUES
Structurale (Ambler)	Fonctionnelle (Bush)		
A	2a	Pénicillinases à spectre étroit	C1G peu ou pas touchées C2G non touchées Très sensibles à l'AC
	2b	Pénicillinases à spectre large	C1G fortement touchées C2G touchées de façon variable (sauf céphamycines) Très sensibles à l'AC Enzymes les plus fréquentes: TEM-1, TEM-2, SHV-1
	2be	Pénicillinases à spectre étendu	Toutes les céphalosporines (sauf céphamycines) et aztréonam touchés Très sensibles à l'AC
	2br	Pénicillinases résistantes aux inhibiteurs de type TRI (TEM résistantes aux inhibiteurs)	C1G peu ou pas touchées Résistantes à l'AC
	2c	Carbénécillinasés (CARB ou PSE)	Carboxypénicillines très fortement touchées Peu sensibles à l'AC
	2e	Céfuroximasés	Aminopénicillines, C1G et C2G (sauf céphamycines) fortement touchés Très sensibles à l'AC
	2f	Carbapénémases	Pénicillines, céphalosporines et aztréonam aussi touchés Sensibilité variable à l'AC
B (métallo-enzymes à Zn)	3	Carbapénémases	Pénicillines et céphalosporines aussi touchées mais pas aztréonam Résistantes à l'AC mais Sensibles à l'EDTA
C	1	Céphalosporinasés	Aminopénicillines et C1G touchées C2G touchées de façon variable C3G non touchées (sauf mutant déréprimé ou enzyme plasmidique) Résistantes à l'AC
D	2d	Oxacillinasés (inactivent plus l'oxacilline que la pénicilline G)	Activité variable sur C1G et C2G C3G très rarement touchées Céfépime souvent faiblement touché Carbapénèmes touchés par certaines enzymes (OXA-48 notamment) Peu sensibles à l'AC

Tableau 3 : Classification des bêta-lactamases

(d'après [Ambler 1980; Bush 1995; Jehl 2012b])

Drug-Resistant) voire des souches résistantes « à tout » (on parle alors de PDR pour PanDrug Resistance ; voir chapitre épidémiologie).

L'étude des mécanismes de résistance aux autres familles d'antibiotiques est bien sûr passionnante mais on centre cette revue sur les mécanismes de résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux bêtalactamines.

Pseudomonas aeruginosa présente une résistance naturelle à de nombreuses pénicillines (aminopénicillines avec ou sans inhibiteur, les céphalosporines de première et de deuxième génération y compris les céphamycines, le céfotaxime et la ceftriaxone, et l'ertapénème) [EUCAST 2012]. Il produit une céphalosporinase de type AmpC, inductible. Ces molécules rencontrent également des difficultés de pénétration (porines peu perméables et système d'efflux) [Morita 2014].

Les résistances acquises sont enzymatiques ou non enzymatiques. Les résistances enzymatiques acquises aux C3G et/ou aux carbapénèmes sont résumées dans le [Tableau 4](#). De même, le [Tableau 5](#) reprend les carbapénémases identifiées chez les entérobactéries ou chez *Pseudomonas aeruginosa*.

ENZYME	ENTEROBACTERIES	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>
BLSE de classe A	CTX-M, TEM, SHV	PER, VEB, SHV, TEM	PER, VEB
	PER, VEB, GES, SFO, TLA	CTX-M, GES, BEL	SHV, TEM, CTX-M
Céphalosporinases (classe C) plasmidiques	CMY, DHA, ACC		
	FOX, MOX, ACT		
Oxacillinase à spectre étendu aux C3G		Dérivés de OXA-2 et OXA-10 (dont OXA-19 et OXA-28)	
	Très rares : dérivés de OXA-2 et OXA-10	OXA-18, OXA-45	
Carbapénèmases de classe A	KPC		
	GES	KPC, GES	KPC, GES
Carbapénèmases de classe B	NDM, VIM, IMP	IMP, VIM	IMP, VIM, NDM
		NDM, SPM, GIM	SIM
Carbapénèmases de classe D	OXA-48		
			OXA-23 et dérivés, OXA-24/40 et dérivés, OXA-58 et dérivés, OXA-143 et dérivés

Tableau 4 : Différents types de bêta-lactamases acquises hydrolysant les céphalosporines de troisième génération (C3G) et/ou les carbapénèmes

(d'après [Jehl 2012b] et [Drawz and Bonomo 2010])

NB : Les enzymes indiquées **en gras** sont les plus fréquentes.

CLASSE D'AMBLER	DIFFERENTES FAMILLES
A	KPC, GES, IMI, NMC, PER, IBC, SFC, SFO, SME
B	VIM, NDM, IMP, GIM, SIM, SPM
C	OXA, PSE

Tableau 5 : Différents types de carbapénèmases

(d'après [Jehl 2012b])

Parmi les résistances acquises non enzymatiques chez *Pseudomonas aeruginosa*, on trouve la perte de la porine D2 qui touche essentiellement l'imipénème¹, les systèmes d'efflux et de façon exceptionnelle des modifications de cibles (certaines PLP modifiées conférant une résistance aux carbapénèmes). Les quatre systèmes d'efflux ont été décrits chez *Pseudomonas aeruginosa*. Ils ne sont pas spécifiques des bêtalactamines. Ainsi, les 4 systèmes touchent les fluoroquinolones. MexABOprM et MexXYOprM sont exprimés à bas niveau chez les souches sauvages. Mais c'est leur hyperexpression qui explique la résistance acquise [Jehl 2012b].

Parmi les résistances acquises enzymatiques, on trouve :

- hyperproduction par mutation de la céphalosporinase chromosomique (qui touche le céfépime et explique très fréquemment la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* à la ceftazidime ou à l'aztréonam),
- pénicillinases de classe A « non BLSE », de type TEM, pénicillinases à spectre large (type 2b de Bush) ou de type CARB, Carbénécillinases (type 2c),
- BLSE de classe A, cependant peu fréquentes,
- oxacillinases de classe D dont certaines voient leur spectre élargi à la ceftazidime et à l'aztréonam (oxacillinases à spectre étendu),
- carbapénémases de classe A (dont KPC qui ont diffusé des entérobactéries vers *Pseudomonas aeruginosa*) et surtout de classe B, cinq groupes de métallo-enzymes décrites chez *Pseudomonas aeruginosa* (IMP, VIM², NDM-1, SPM-1 et GIM-1) [Jehl 2012b].

La prévalence de ces mécanismes de résistance est présentée dans le chapitre épidémiologie.

¹ Le mécanisme est détaillé dans le paragraphe Matériel et Méthodes.

² Plusieurs variants ont été décrits pour IMP et VIM.

	Phénotype sauvage	Pénicillinasés		BLSE		C ^{ase} Haut niveau	Efflux				Carbapénémase	Porine D2
		TEM	OXA étroit	OXA	PER		MexABOprM	MexXYOprM	MexCDOprJ	MexEFOprN		
		CARB			VEB							
		PSE										
Ticarcilline	S	R	R	R	R	R	I/R	S	S	S	R	S
Ticarcilline +IBL	S	S/I	I/R	I/R	S/I	R	I/R	S	S	S	R	S
Pipéracilline	S	I/R	R	R	I/R	I/R	S	S	S	S	R	S
Pipéracilline +IBL	S	S/I	I/R	I/R	S/I	I/R	S	S	S	S	R	S
Ceftazidime	S	S	S	I/R	R	I/R	S	S	S	S	R	S
Céfépime	S	S	I/R	I/R	R	I/R	S	I/R	I/R	S	R	S
Cefpirome	S	S	I/R	I/R	R	I/R	S	I/R	I/R	S	R	S
Aztréonam	S	S	S	I/R	R	I/R	I/R	S	S	S	S	S
Imipénème	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R

Tableau 6 : Phénotypes de résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux bêta-lactamines

(d'après [Jehl 2012b])

BLSE : bêta-lactamase à spectre étendu

C^{ase} : céphalosporinase

IBL : inhibiteur de bêta-lactamase

II- Pharmacologie : Bases PK-PD

Le concept de pharmacocinétique-pharmacodynamie (PK-PD) a été proposé par l'équipe du Dr H. Eagle dans les années 1950 [EAGLE 1953; EAGLE 1950a; EAGLE 1950b] puis développé dans les années suivantes. Le sujet a cependant été peu traité des années 1970 jusqu'aux années 1990 où il a été remis en avant par de nombreuses équipes parmi lesquelles celles d'Albany, NY [Ambrose 2007] et de Brisbane, Australia [Roberts 2009].

Comme pour les chapitres précédents, on insiste ici aussi surtout sur les points relatifs aux bêtalactamines et pour les données cliniques sur les infections respiratoires.

Si les données in vitro sont nombreuses, l'apport des modèles animaux à la compréhension de cette pharmacodynamie des antibiotiques est considérable. Les données cliniques humaines sont plus rares. Il est néanmoins établi aujourd'hui que ces concepts sont valables tant chez l'animal que chez l'homme [Ambrose 2007].

A- Principaux paramètres PK-PD

Les antibiotiques étudiés dans notre travail sont administrés par voie intraveineuse. Leur distribution tissulaire dépend de nombreux facteurs : liés aux molécules elles-mêmes (taille, charges électriques, lipophilie ou hydrophilie, liaison aux protéines plasmatiques...), ou aux patients, notamment en réanimation (état inflammatoire, hyperperméabilité capillaire, remplissage vasculaire, vasoconstricteurs...). On définit ainsi un **volume (apparent) de distribution (Vd)**.

Le volume de distribution, ou volume apparent de distribution, est le paramètre qui caractérise la distribution de la substance active dans le corps humain. Son symbole est Vd.

Il est défini par l'équation suivante :

$$\text{Vd} = \text{Quantité totale de médicament dans l'organisme} / \text{Concentration plasmatique de ce médicament}$$

L'élimination est essentiellement rénale mais peut aussi être hépatobiliaire. Elle est souvent diminuée, requérant des ajustements de posologies mais aussi parfois augmentée ; nécessitant là-aussi une prise en compte [Shorr 2014; Udy 2014; Udy 2013].

Ainsi, le devenir du médicament est souvent représenté par un modèle pharmacologique à un compartiment qui s'écrit :

$$C(t) = C_0 e^{-kt}$$

où la concentration $C(t)$ en fonction du temps dépend :

- de la **concentration C_0** à T_0 (qui peut être approchée par la concentration dite C_{\max} en fin d'injection si la durée de l'injection est courte),
- de la constante k qui est liée à la **demi-vie $T_{1/2}$** .

$$T_{1/2} = - \ln (0,5/k)$$

Les 3 paramètres PK-PD pertinents sont [Drusano 2004a] :

- le **pourcentage du temps passé au-dessus de la concentration minimale inhibitrice, CMI** (ou au-dessus d'un multiple de la CMI), noté $T_{>CMI}$ (ou $T_{>x.CMI}$),
- le **rapport¹ entre la concentration maximale (C_{\max}) et la CMI**, noté C_{\max}/CMI ,
- le **rapport entre l'aire sous la courbe et la CMI**, noté ASC_{0-24h}/CMI .

Pour certains antibiotiques (les fluoroquinolones par exemple), les paramètres qui prédisent le mieux l'efficacité sont les rapports C_{\max}/CMI et ASC_{0-24h}/CMI . L'activité de ces molécules est dite « concentration-dépendante ». Pour les bêtalactamines en revanche, l'activité est « temps-dépendante » et est mieux corrélée au pourcentage $T_{>CMI}$.

On démontre ces caractères temps ou concentration dépendant *in vitro* grâce à l'étude des vitesses de bactéricidie. Ainsi, lorsque la dose d'antibiotiques augmente, la vitesse de bactéricidie augmente pour les antibiotiques « concentration-dépendant » alors qu'elle « plafonne » au-delà d'un certain seuil pour les antibiotiques « temps-dépendants » (Figure 2).

NB : il faudrait, pour être parfaitement rigoureux, étudier la forme libre des antibiotiques. Toutefois, le ratio forme libre/ forme liée (aux protéines) est difficile à mesurer. En outre, il est moins important de faire cette distinction entre les 2 formes pour les bêtalactamines que pour d'autres familles telles que les fluoroquinolones. En effet, même s'il existe des différences entre les molécules, les bêtalactamines sont circulent essentiellement sous forme libre [Drusano 2004a].

¹ Aussi appelé quotient inhibiteur.

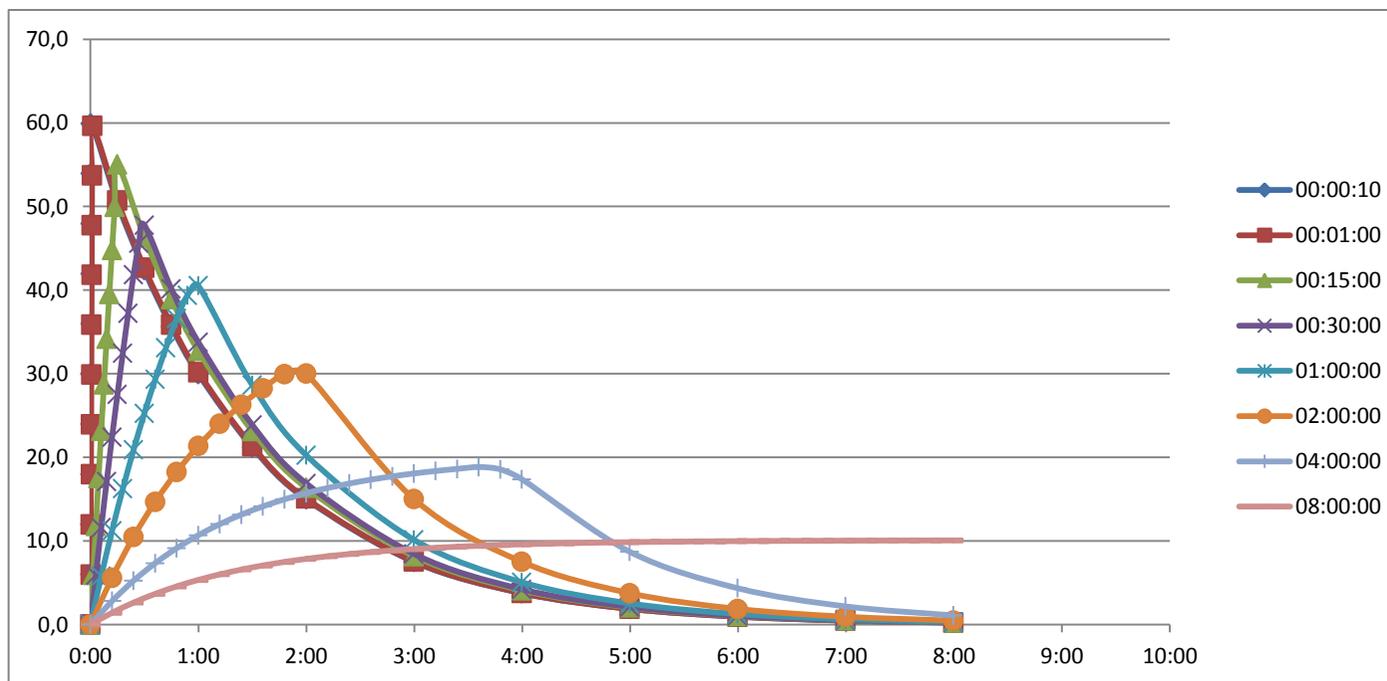


Figure 1 : Evolution de la concentration plasmatique de l'antibiotique (en mg/L) en fonction du temps (en heure:minute) selon des modalités d'administration différentes : huit vitesses de perfusion différentes de 10 secondes à 8 heures (dans ce dernier cas, on décrit une perfusion continue)

On décrit ici l'évolution des concentrations plasmatiques d'un antibiotique¹ qui aurait pour caractéristiques les données suivantes :

- demi-vie ($T_{1/2}$) : une heure,
- C_{max} : 55 mg/L pour une perfusion de 1 g sur 20 minutes,
- Volume de distribution : 17 litres.

On note que plus la perfusion est allongée plus le taux plasmatique maximal obtenu est faible. En cas de perfusion continue (courbe rose), on tend ainsi vers un équilibre (classiquement obtenu après 5 demi-vies) plafonné à environ 10 mg/L.

Il est également important de noter qu'on illustre ici l'évolution des concentrations plasmatiques d'un intérêt certain pour le traitement d'une bactériémie par exemple, mais qu'il est beaucoup plus difficile de modéliser ce qui se passe au niveau tissulaire (dans le poumon par exemple).

¹ Ces données correspondent à peu de choses près aux caractéristiques des bêta-lactamines étudiées dans ce travail.

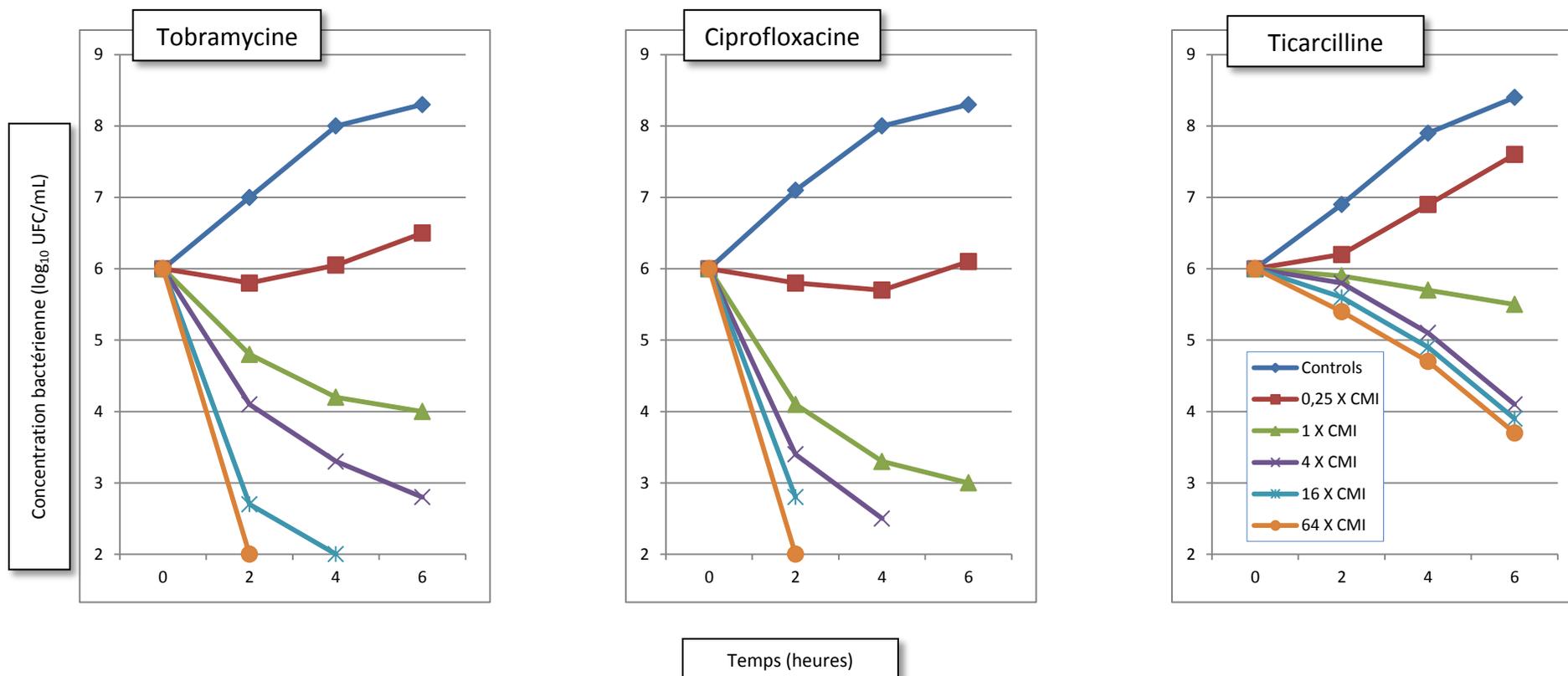


Figure 2 : Evolution des charges bactériennes (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) en fonction du temps et en présence de concentrations croissantes d'antibiotiques

(d'après [Craig 1998; Drusano 2004a])

Ainsi, pour les deux premiers antibiotiques, plus la quantité d'antibiotique est importante, plus l'effet est accentué. Les aminosides et les fluoroquinolones sont « concentration-dépendants ». En revanche, augmenter la concentration de ticarcilline au-delà de 4 fois la CMI ne change rien dans cette expérience *in vitro*. L'action de la ticarcilline est « temps-dépendante ».

B- Effet post-antibiotique

Mis en évidence pour les aminosides essentiellement, cet effet peut être défini comme la rémanence de l'effet bactéricide de l'antibiotique même lorsque celui-ci n'est plus présent. Il a été décrit *in vitro* comme *in vivo*. Dans ce cas, il est dépendant des leucocytes (PALE : post-antibiotic leucocyte effect).

Il est décrit pour l'imipénème [Bustamante 1984] et serait responsable du fait que l'objectif PK-PD à atteindre serait plus bas pour les carbapénèmes comparativement aux autres bêtalactamines.

Un effet post-antibiotique est décrit avec les inhibiteurs de bêtalactamases [Lavigne 2004; Murdoch 1990; Thorburn 1996]. Sader *et al* décrivent l'effet post-antibiotique du tazobactam qui est utilisé en association avec le ceftolozane sur 2 souches cliniques d'*E. coli* produisant une BLSE (CTX-M15) [Sader 2014c]. Il faut cependant noter que, dans cette étude, le ratio ceftolozane:tazobactam est de 1:1 alors qu'il est de 2:1 pour les études de phase 3 en cours.

C- Lien PK-PD et efficacité (infections pulmonaires)

Les données tant animales qu'humaines sont très nombreuses pour les fluoroquinolones. On ne fait que rappeler qu'elles sont concordantes et démontrent que le paramètre PK-PD d'intérêt est le rapport ASC_{0-24h}/CMI [Ambrose 2007].

Pour les bêtalactamines, les données animales sont concordantes et permettent de retenir que $T_{>CMI}$ est le paramètre le mieux corrélé à la survie des animaux [Craig 2003]. L'efficacité est probablement maximale si on maintient une concentration à 4 ou 5 fois la CMI [Angus 2000; Mouton 1994].

Le « standard minimal » (pour les infections les moins sévères) est probablement :

- $T_{>CMI}$ supérieur à 50% pour les pénicillines,
- supérieur à 60-70% pour les céphalosporines,
- et possiblement plus bas pour les carbapénèmes (de l'ordre de 40%).

Il faut cependant souligner que les données chez l'homme très peu nombreuses. Dans les pneumonies nosocomiales, on trouve essentiellement des travaux sur les fluoroquinolones [Drusano 2004b; Forrest 1993] mais aussi quelques-uns sur les bêtalactamines [Lee 2007; Scaglione 2009]. Pour les infections communautaires, 40% semble l'objectif $T_{>CMI}$ à atteindre [Ambrose 2007].

D- Lien avec l'émergence de bactéries résistantes

Notion de concentration préventive de l'apparition de mutation (ou préventive de la sélection de mutants), CPM

Dans toute population, pour peu qu'elle soit suffisamment abondante, co-existent des bactéries sensibles mais aussi un petit nombre de bactéries résistantes. Cette sous-population minoritaire n'est pas détectée par les techniques usuelles de détermination de la CMI. Par contre, en présence d'antibiotiques à dose suffisante pour faire disparaître la population sensible, elle peut se développer. Cette CPM est donc ainsi définie, pour un antibiotique donné, comme étant la concentration qui prévient l'émergence de toute bactérie mutante à partir d'une population d'au moins 10^{10} bactéries [Zhao 2001].

Fenêtre de sélection de mutants, FS

Cette notion découle de la précédente. La FS est définie par le temps pendant lequel la concentration en antibiotique est comprise entre la CPM et la CMI. Ainsi, pour les bêta-lactamines, l'objectif PK-PD à atteindre ne serait plus $T_{>CMI}$ mais un pourcentage de temps passé au-dessus de la fenêtre de sélection $T_{>FS}$ [Roberts 2008].

Il est important de noter que les quelques données obtenues en clinique [Gugel 2006; Thomas 1998] ne permettent pas d'étayer ces hypothèses pourtant séduisantes *in vitro* [Olofsson 2007].

E- Limites de ces concepts

Ou « Pourquoi, les patients les plus sévères (de réanimation), sont-ils potentiellement les plus difficiles à traiter ? »

Les modifications du volume de distribution, de clairance qui peut être augmentée, diminuée en cas d'insuffisance rénale aiguë, ou encore modifiée en cas d'épuration extra-rénale, de liaison aux protéines plasmatiques sont autant de facteurs liés au patient qu'il convient de prendre en compte. De plus, les espèces et souches bactériennes sont souvent plus difficiles à traiter en cas d'infections nosocomiales (CMI plus élevées) [Roberts 2011].

L'ensemble de ces éléments conduit à utiliser des stratégies nouvelles de traitement antibiotiques pour ces patients : doses de charge, perfusions allongées voire continues, dosages plasmatiques répétées. Ces progrès thérapeutiques commencent à être étayés par les données cliniques humaines [Udy 2013]. Ils ont clairement pu émerger grâce aux connaissances PK-PD acquises *in vitro* ou *in vivo*.

III- Épidémiologie

A- Évolution générale de la résistance

“A post-antibiotic era - in which common infections and minor injuries can kill - far from being an apocalyptic fantasy, is instead a very real possibility for the 21st century.”

Dr Keiji Fukuda, Rapport OMS 2014

Au niveau mondial, l'émergence et la dissémination de bactéries résistantes [McKenna 2013] et en parallèle l'absence (ou le faible nombre) de nouvelles molécules en développement sont extrêmement préoccupants [Cannon 2014; Hede 2014]. Plusieurs rapports récents étayent ce fait¹.

1- En Europe

En 2009, l'European Centre for Disease prevention and Control (ECDC) et l'European Medicines Agency (EMA) publient un rapport, *The Bacterial Challenge: Time to React*. Celui-ci dresse le même tableau très sombre en termes de résistance. Ainsi la résistance aux C3G pour *E. coli* ou pour *K. pneumoniae* peut atteindre 25% dans certains Etats membres. Pour *Pseudomonas aeruginosa*, le taux de résistance aux carbapénèmes peut lui aussi atteindre 25%... Le coût global des infections dues à l'ensemble des bactéries résistantes étudiées dans ce rapport est très lourd : 25 000 décès par an dans l'Union Européenne² et 1,5 milliards d'euros/an en prenant en compte les surcoûts en soins et la perte de productivité. Pour l'ensemble *E. coli* et *K. pneumoniae* résistants aux C3G et *P. aeruginosa* résistants aux carbapénèmes, on retient que le nombre annuel d'infections est estimé à près de 200 000 et le nombre annuel de décès à près de 20 000.

L'intérêt de ce rapport est qu'il propose, en parallèle de la présentation de l'émergence de résistances, un inventaire des nouveaux traitements antibiotiques. Le constat est très préoccupant puisque sur les 167 molécules en développement identifiées comme de potentielles armes pour lutter contre la résistance, les auteurs n'en retiennent finalement que 15 qui répondent aux critères suivants : nouveau mécanisme d'action ou nouvelle cible et utilisation possible par voie générale (par

¹ Ils sont fournis en Annexes.

² y compris l'Islande et la Norvège.

opposition aux traitements uniquement utilisables sous forme de topiques). C'est contre les bacilles à Gram négatif qu'il y a le plus à craindre du peu de progrès à venir : seules huit nouvelles molécules sont identifiées. Quatre d'entre elles ont des mécanismes d'action connus correspondant à une classe thérapeutique déjà définie : 3 sont des inhibiteurs de la synthèse de la paroi, un est un inhibiteur de bêtalactamase. Deux nouveaux mécanismes d'action sont envisagés : agents chélateurs (immunomodulation) pour hLF1-11, lactoferrin et talactoferrin-alpha et majoration de la perméabilité membranaire (immunomodulation) pour opebacan. Mais aucune n'est disponible sur l'efficacité réelle des molécules au moment de la publication du rapport.

Le suivi de ce rapport en 2013 (données 2012) montre l'évolution suivante [**European Centre for Disease Control 2012**]. Si pour les bactéries à Gram positif, on note des signes encourageants, ce n'est pas le cas pour les bactéries à Gram négatif. Globalement, la résistance progresse chez les entérobactéries ou chez les bactéries non fermentaires. Même s'il existe des disparités Nord-Sud et Ouest-Est, ces résultats sont inquiétants...

2- Aux États-Unis

En 2013, le département Santé du CDC (Centers for Diseases Control and Prevention) aux États-Unis publie un document, destiné à un public très large, sur les menaces réelles que la résistance aux antibiotiques fait peser sur la Santé [**Centers for Disease Control and Prevention 2013**]. Ce rapport estime à 2 millions par an le nombre d'infections liés à des bactéries résistantes et à 23 000 le nombre de décès en lien avec ces infections. Ces bactéries (et une levure, *Candida*) sont classées par ordre de priorité selon l'urgence, l'importance des problèmes soulevés par les résistances aux antibiotiques. *Clostridium difficile*¹, les entérobactéries résistantes aux carbapénèmes et les gonocoques résistants sont au premier rang des priorités. Ils sont classés dans la catégorie « *urgent threats* ».

Les *Pseudomonas aeruginosa* multirésistants, définis comme tels car résistants à au moins 3 classes d'antibiotiques, sont quant à eux dans la deuxième catégorie, « *serious threats* ». Ne sont prises en compte que les infections diagnostiquées à l'hôpital ; à l'exclusion donc des infections survenues en Services de Longs Séjours, établissements hospitaliers accueillant des personnes âgées dépendantes

¹ *Clostridium difficile* ne pose pas *stricto sensu* de problème de résistance. Il est toutefois inclus dans ce rapport car il pose un problème majeur de santé publique aux États-Unis et est directement lié à la consommation des antibiotiques.

(EHPAD ou équivalent) ou des infections diagnostiquées après la sortie de l'hôpital. Le poids de cette bactérie est estimé à 6 700 infections et 440 décès par an.

Le rapport insiste sur 4 points qui doivent permettre de lutter contre les résistances :

- prévenir les infections, prévenir la diffusion des résistances,
- établir un programme strict de surveillance,
- améliorer les prescriptions des antibiotiques,
- développer de nouvelles molécules et de nouveaux tests diagnostiques.

3- Au niveau mondial

En 2014, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) dresse elle aussi un constat très inquiétant. Le rapport place le problème de la résistance aux antibiotiques dans le contexte plus large de la résistance aux agents anti-infectieux : antiviraux (VIH, grippe), antipalustres, antibiotiques antituberculeux [WHO 2014].

Le rapport propose dans un premier temps un état des lieux de la résistance dans les 6 régions du monde (Afrique, Amérique Nord et Sud, Asie du Sud-Est, Europe, Moyen Orient et Méditerranée, Pacifique Ouest) puis selon les couples bactéries-antibiotiques d'intérêt :

- *E. coli* et fluoroquinolones (FQ) ou céphalosporine de troisième génération (C3G),
- *K. pneumoniae* et C3G ou carbapénèmes,
- *S. aureus* et méticilline,
- *S. pneumoniae* et pénicilline,
- *S. non typhii* et FQ,
- Shigelles et FQ,
- Gonocoques et C3G.

Pour *E. coli*, les données sont concordantes et montrent des taux élevés de résistance tant pour les C3G que pour les FQ dans toutes les régions du monde (Tableaux 7 et 8). En outre, un des points majeurs du rapport consiste en l'analyse systématique du poids de la résistance en termes de Santé Publique. Les données sont plus nombreuses pour les pays développés. La qualité méthodologique est discutée, notamment la mesure de l'utilisation (surutilisation probable) des ressources pour des bactéries résistantes par rapport à des bactéries non résistantes. Toutefois, les auteurs retiennent, à partir de 37 études (12 pour les FQ, 25 pour les C3G), les éléments suivants. Les infections à *E. coli* résistant aux C3G ou aux FQ sont associées à une surmortalité (toutes causes confondues ; risque

Data sources based on at least 30 tested isolates ^b	Overall reported range of resistant proportion (%)	Reported range of resistant proportion (%) in invasive isolates ^c (no. of reports)
African Region – National data (n=13 countries) – Publications (n=17) from 7 additional countries	2–70 0–87	28–36 (n=4) 0–17 (n=5)
Region of the Americas – National data or report to ReLAVRA (n=14 countries) – Publications (n=10) from 5 additional countries	0–48 0–68	
Eastern Mediterranean Region – National data (n=4 countries) – Surveillance network in 1 country ^d – Publications (n=44) from 11 additional countries	22–63 39 (caz)–50 (cro) 2–94	41 (n=1) 11–33 (n=6)
European Region – National data or report to EARS-Net (n=35 countries) – Publications (n=5) from 2 additional countries	3–82 0–8	3–43 (n=32) 0–8 (n=2)
South-East Asia Region – National data (n=5 countries) – Publications (n=26) from 2 additional countries	16–68 19–95	20–61 (n=2)
Western Pacific Region – National data (n=13 countries) – Institute surveillance (data from 3 hospitals in one country) – Publications (n=4) from 2 additional countries	0–77 4–14 8–71	

EARS-Net, European Antimicrobial Resistance Surveillance Network; ReLAVRA, Latin American Antimicrobial Resistance Surveillance Network. (For details see Annex 2, Tables A2.1–A2.6).

a. Based on antibacterial susceptibility testing with caz, ceftazidim; cefotaxim or cro, ceftriaxone
b. Reported proportions may vary between compound used for testing and some countries report data for several compounds, or data from more than one surveillance system.
c. Invasive isolates are deep infections, mostly bloodstream infections and meningitis.
d. US Naval Medical Research Unit No 3, Global Disease Detection Program, Egypt.

Tableau 7 : *Escherichia coli*: Résistance aux céphalosporines de troisième génération ^a
(résumé des taux de résistance rapportés ou publiés par région OMS)

Data sources based on at least 30 tested isolates ^b	Overall reported range of resistant proportion (%)	Reported range of resistant proportion (%) in invasive isolates ^c (no. of reports)
African Region – National data (n=14 countries) – Publications (n=23) from 8 additional countries	14–71 0–98	34–53 (n=2) 0–10 (n=4)
Region of the Americas – National data or report to ReLAVRA (n=16 countries) – Publications (n=5) from 4 additional countries	8–58 2–60	
Eastern Mediterranean Region – National data (n=4 countries) – Surveillance network ^d , one additional country – Publications (n=32) from 10 additional countries	21–62 35 0–91	54 (n=1) 15–53 (n=5)
European Region – National data or report to EARS-Net (n=35 countries) – Publications (n=3) from 2 additional countries	8–48 0–18	8–47 (n=33) 0–18 (n=2)
South-East Asia Region – National data (n=5 countries) – Publications (n=19) from 2 additional countries	32–64 4–89	
Western Pacific Region – National data (n=16 countries) – Institute surveillance (data from 3 hospitals in 1 country) – Publications (n=5) from 3 additional countries	3–96 0–14 0.2–65	7 (n=1) 31 (n=1)

EARS-Net, European Antimicrobial Resistance Surveillance Network; ReLAVRA, Latin American Antimicrobial Resistance Surveillance Network (For details see Annex 2, Tables A2.7–A2.12).

a. Based on antibacterial susceptibility testing with ciprofloxacin, gatifloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, norfloxacin, ofloxacin, pefloxacin, refloxacin or sparfloxacin. Where the fluoroquinolone was not specified, ciprofloxacin was used.
b. Reported proportions may vary between compound used for testing and some countries report data for several compounds, or data from more than one surveillance system.
c. Invasive isolates are deep infections, mostly bloodstream infections and meningitis.
d. US Naval Medical Research Unit No 3, Global Disease Detection Program, Egypt.

Tableau 8 : *Escherichia coli*: Résistance aux fluoroquinolones ^a
(résumé des taux de résistance rapportés ou publiés par région OMS)

multiplié par deux). Les données relatives aux admissions en réanimation et/ou à l'évolution vers un choc septique sont peu nombreuses.

Pour *K. pneumoniae*, les données sont également très préoccupantes tant pour la résistance aux C3G que pour celle aux carbapénèmes. Le rapport souligne cependant que l'épidémiologie est surtout bien décrite en Europe et en Amérique du Nord ou du Sud mais qu'il y a un réel déficit de données dans les autres régions. On retient que globalement, 30% des souches de *K. pneumoniae* sont résistantes aux C3G, parfois jusqu'à 60% et que la résistance aux carbapénèmes peut, elle aussi, atteindre 50% des souches (Tableaux 9 et 10)... Là encore, la mortalité est plus élevée pour les infections dues aux souches résistantes (C3G ou FQ). Les admissions en réanimation sont plus fréquentes en cas d'infections à *K. pneumoniae* résistante sans pour autant plus de progression vers un choc septique ou vers le décès.

Ainsi ce rapport très récent, souligne que le problème des résistances est mondial tant pour les infections communautaires que liées aux soins. Il met en avant les défauts de surveillance, de coordination, de partage des données. Il replace la lutte contre le développement des résistances aux antibiotiques dans le cadre plus large des résistances aux autres anti-infectieux. Comme le rapport du CDC, il insiste sur l'importance d'une surveillance globale, avec des outils universellement utilisés par des réseaux qui collaborent les uns avec les autres. Il précise aussi l'urgence qu'il y a à considérer l'utilisation des antibiotiques non pas seulement dans le domaine de la santé humaine mais aussi leur utilisation dans la production agricole, tout au long de la chaîne alimentaire...

Data sources based on at least 30 tested isolates ^b	Overall reported range of resistant proportion (%)	Reported range of resistant proportion (%) in invasive isolates ^c (no. of reports)
African Region – National data (n=13 countries) – Publications (n=4) from 1 additional country	8–77 9–69	41–62 (n=3)
Region of the Americas – National data or report to ReLAVRA (n=17 countries) – Publications (n=3) from 3 additional countries	4–71 15–56	56 (n=1)
Eastern Mediterranean Region – National data (n=4 countries) – Surveillance network ^d (n=1) in 1 additional country – Publications (n=16) from 7 additional countries	22–50 72 (caz)–82 (cro) 6–75	48 (n=1) 17 (ctx); 43 (caz); 50 (cro) (n=1)
European Region – National data or report to EARS-Net (n=33 countries) – Publications (n=2) from 2 additional countries	2–82 4–61	2–82 (n=31) 11 (cro); 16 (ctx); 18 (caz) (n=1)
South-East Asia Region – National data (n=4 countries) – Publications (n=23) from 4 additional countries	34–81 5–100	53.3–100 (n=4)
Western Pacific Region – National data (n=14 countries) – Institute surveillance (data from 3 hospitals in 1 country) – Publications (n=3) from 2 additional countries	1–72 17–30 27–35	72 (n=1) 27 (n=1)

EARS-Net, European Antimicrobial Resistance Surveillance Network; ReLAVRA, Latin American Antimicrobial Resistance Surveillance Network.

a. caz, ceftazidim; ctx, cefotaxim; cro, ceftriaxone
b. Reported proportions may vary between compound used for testing and some countries report data for several compounds, or data from more than one surveillance system.
c. Invasive isolates are deep infections, mostly bloodstream infections and meningitis.
d. US Naval Medical Research Unit No 3, Global Disease Detection Program, Egypt.

Tableau 9 : *Klebsiella pneumoniae*: Résistance aux céphalosporines de troisième génération ^a (résumé des taux de résistance rapportés ou publiés par région OMS)

Data sources based on at least 30 tested isolates ^b	Overall reported range of resistant proportion (%)	Reported range of resistant proportion (%) in invasive isolates ^c (no. of reports)
African Region – National data (n=4 countries) – Publications (n=0)	0–4	
Region of the Americas – National data or report to ReLAVRA (n=17 countries) – Publications (n=2) from 2 additional countries	0–11 0–2	
Eastern Mediterranean Region – National data (n=4 countries) – Surveillance network ^d (n=1) in 1 additional country – Publications (n=9) from 5 additional countries	0–54 6 0–21	54 (n=1) 0 (n=1)
European Region – National data or report to EARS-Net (n=31 countries) – Publications (n=3) from 2 additional countries	0–68 2–7	0–68 (n=30) 2 (n=1)
South-East Asia Region – National data (n=4 countries) – Publications (n=15) from 2 additional countries	0–8 0–55	0–52 (n=3)
Western Pacific Region – National data (n=9 countries) – Institute surveillance (data from 2 hospitals in 1 country) – Publications (n=2) from 2 additional countries	0–8 0–1 0–11	

EARS-Net, European Antimicrobial Resistance Surveillance Network; PAHO, Pan American Health Organization; ReLAVRA, Latin American Antimicrobial Resistance Surveillance Network.

a. Based on antibacterial susceptibility testing with doripenem, ertapenem, imipenem or meropenem
b. Reported proportions may vary between compound used for testing and some countries report data for several compounds, or data from more than one surveillance system.
c. Invasive isolates are deep infections, mostly bloodstream infections and meningitis.
d. US Naval Medical Research Unit No 3, Global Disease Detection Program, Egypt.

Tableau 10 : *Klebsiella pneumoniae*: Résistance aux carbapénèmes ^a (résumé des taux de résistance rapportés ou publiés par région OMS)

B- Épidémiologie chez *Pseudomonas aeruginosa*

1- Évolution de la résistance chez *Pseudomonas aeruginosa*

On trouve dans les publications des qualificatifs tels que bactéries multirésistantes, extrêmement résistantes, voire totorésistantes... Ces dénominations méritaient un effort d'harmonisation international [Magiorakos 2012]. Pour *Pseudomonas aeruginosa*, les différentes catégories (MDR, XDR et PDR) sont présentées dans le tableau suivant.

Antimicrobial category	Antimicrobial agent	Results of antimicrobial susceptibility testing (S or NS)
Aminoglycosides	Gentamicin	
	Tobramycin	
	Amikacin	
	Netilmicin	
Antipseudomonal carbapenems	Imipenem	
	Meropenem	
	Doripenem	
Antipseudomonal cephalosporins	Ceftazidime	
	Cefepime	
Antipseudomonal fluoroquinolones	Ciprofloxacin	
	Levofloxacin	
Antipseudomonal penicillins + β -lactamase inhibitors	Ticarcillin-clavulanic acid	
	Piperacillin-tazobactam	
Monobactams	Aztreonam	
Phosphonic acids	Fosfomycin	
Polymyxins	Colistin	
	Polymyxin B	
Criteria for defining MDR, XDR and PDR in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MDR: non-susceptible to ≥ 1 agent in ≥ 3 antimicrobial categories. XDR: non-susceptible to ≥ 1 agent in all but ≤ 2 categories. PDR: non-susceptible to all antimicrobial agents listed. http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/diseaseprogrammes/ARHAI/Pages/public_consultation_clinical_microbiology_infection_article.aspx .		

Tableau 11 : Antibiotiques, par famille et par molécules, utilisés pour classer les souches de *Pseudomonas aeruginosa* dans les différentes catégories (MDR, XDR et PDR) [Magiorakos 2012]

- En Europe ?

Les dernières données de l'ECDC en 2013 [**European Centre for Disease Control 2012**] montrent d'importantes disparités entre les Etats membres. En outre, l'analyse des tendances est rendue difficile par le changement progressif des normes des laboratoires européens qui passent du standard CLSI aux normes EUCAST. Néanmoins, des taux élevés de résistance sont rapportés dans toute l'Europe. Les taux de résistance à la pipéracilline (+/- tazobactam), à la ceftazidime, aux fluoroquinolones, aux aminosides et aux carbapénèmes sont respectivement, en 2012, de 19,8%, 13,5%, 21,0%, 18,4% et 17,1%. La résistance à au moins 3 antibiotiques/catégories parmi les 5 sus cités est de 13,8%. Ce chiffre est (globalement) stable depuis 2009. Il faut noter que près de 6% des souches sont résistantes à ces 5 catégories...

Concernant la sensibilité aux carbapénèmes en Europe, Castanheira *et al.* montrent que 529 parmi 2070 souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* disponibles (soit 25,6%) sont résistantes. Les mécanismes de résistance sont très divers. Parmi ceux-ci, on peut citer :

- une fréquence très élevée de perte de porine D (94,9% des 529 souches),
- la production à haut niveau d'une céphalosporinase de type AmpC (44% des souches),
- l'hyperexpression d'un efflux de type MexAB-OprM dans 20,1% des cas,
- et enfin, une métallo-bêtalactamase pour 106 souches (VIM-2 prédominante), soit 20,3% des souches [**Castanheira 2014**].

- En France ?

Les données de surveillance de l'ECDC sont également très informatives [**European Centre for Disease Control 2012**]. Les taux de résistance aux principales classes d'antibiotiques en 2012 et l'évolution sur la période 2005-2012 sont présentés dans la [Figure 3](#).

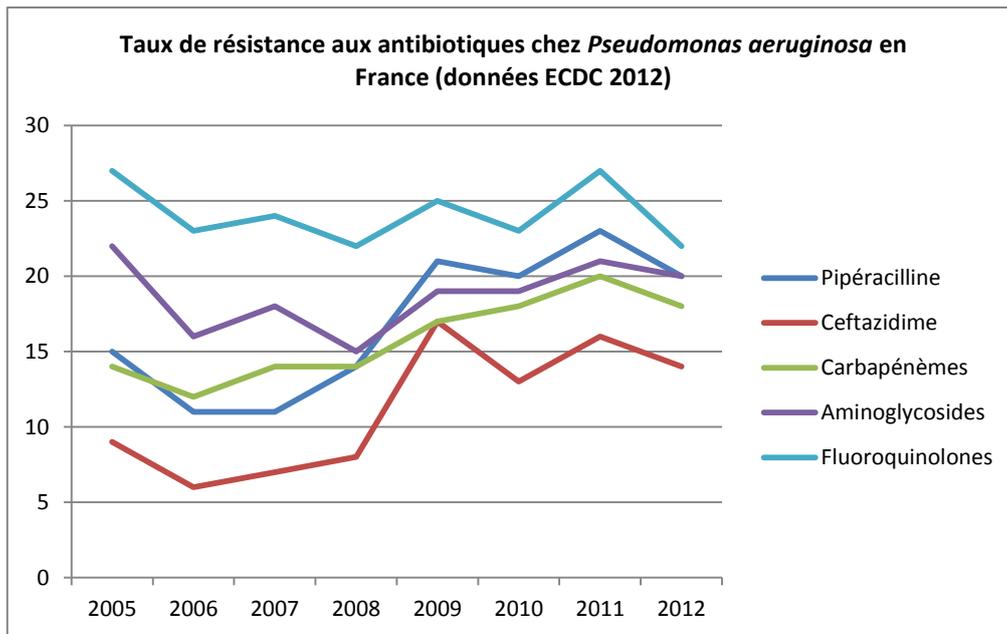


Figure 3 : Evolution de la résistance chez *Pseudomonas aeruginosa* en France

Les données du réseau REA-Raisin, pour la surveillance des infections nosocomiales dans les unités de Réanimation en France, sont disponibles depuis novembre 2013 [Savey 2013]. Concernant la sensibilité¹ de *Pseudomonas aeruginosa* à la ceftazidime, on note que le taux est de 76,4% ; soit 23,6% des souches intermédiaires ou résistantes à cet antibiotique. Il est stable par rapport à 2004 où 26,2% des souches étaient résistantes. Le taux de *P. aeruginosa* résistants aux carbapénèmes est documenté depuis 2011. Il est en 2012 de 23,4%².

Enfin, concernant les données chez les patients atteints de mucoviscidose, on retient qu'en 2007, pour 204 souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolés chez 156 patients dans 10 centres universitaires français, une grande diversité de souches circule. Parmi celles-ci, 124 (60,8%) sont sensibles aux bêtalactamines (ticarcilline, pipéracilline, ceftazidime, céfépime, imipénème) [Llanes 2013]. Parmi les 80 souches non sensibles, 49 (63,1%) produisent une céphalosporinase de type AmpC constitutionnelle (déréprimée donc). On trouve (éventuellement associée à la précédente) une

¹ Nombre de souches déclarées pour lesquelles le phénotype résistance est connu en 2012 : n=1 278.

² Deux cent quatre-vingt-dix-neuf souches pour un total de 1 278.

production de bêta-lactamase acquise pour 11 souches (13,8%). On trouve une production augmentée de pompes à efflux pour 88,8% de ces souches (n=71). Enfin, 43 souches (53,8%) ont perdu leur porine D.

2- *Pseudomonas aeruginosa* et pneumonie

NB : pour les bactériémies à Pseudomonas aeruginosa, il existe un lien entre résistance et devenir [Lodise 2007; Morata 2012; Tam 2010; Tumbarello 2011]. Ce lien est moins évident pour les pneumonies causées par Pseudomonas aeruginosa...

- Réanimation

Les données de REA-Raisin confirment qu'en 2012, en France, *Pseudomonas aeruginosa* est l'espèce la plus fréquemment isolée lors des infections nosocomiales, toutes infections confondues. Elle représente 16% des micro-organismes isolés. Les pneumonies associées à la ventilation (PAVM) représentent la plus fréquente des infections acquises en réanimation. Leur incidence diminue passant de 16,26 pour 1000 jours d'intubation en 2004 à 14,66‰ en 2012.

P. aeruginosa reste la bactérie la plus souvent responsable de ces épisodes de pneumonies [American Thoracic Society 2005; Kollef 2014; Savey and Machut 2013] et c'est dans ces infections pulmonaires que le taux d'infections à *P. aeruginosa* est le plus élevé par rapport aux infections urinaires, aux bactériémies, ou aux infections liées au cathéter.

La question de l'impact de *P. aeruginosa* par rapport aux autres bactéries sur le devenir des patients présentant une pneumonie en réanimation fait débat. Il est établi que les PAVM augmentent la durée de séjour en réanimation et les coûts de santé [Kollef 2012b]. La mortalité attribuable est difficile à établir [Bekaert 2011; Timsit 2011].

L'impact de la résistance de *P. aeruginosa* sur le devenir des patients présentant une pneumonie en réanimation n'est là-encore pas parfaitement claire [Tumbarello 2013]. Certains travaux suggèrent une augmentation de la mortalité pour les infections à *Pseudomonas aeruginosa* résistant à la pipéracilline [Combes 2006; Kaminski 2011]. Pourtant, une étude du groupe OUTCOMEREA, récemment publiée [Planquette 2013], ne trouve pas d'association entre l'échec de traitement,

défini comme la survenue d'un décès et/ou une récurrence de l'infection dans les 14 jours qui suivent le diagnostic de la PAVM et le profil de résistance de *Pseudomonas aeruginosa* (393 épisodes de PAVM chez 314 patients ; période de l'étude 1997-2011). Dans ce travail, les *Pseudomonas aeruginosa* classés MDR, pour multidrug resistant¹, ou XDR, pour extensively resistant², sont associés à une sortie de réanimation plus tardive. Pour Pena *et al*, la résistance des souches de *Pseudomonas aeruginosa* (91 chez 83 patients ; souches sensibles : 34%) est certes associée au caractère approprié ou non de l'antibiothérapie initialement prescrite mais pour autant, c'est essentiellement la sévérité de l'infection qui explique la mortalité [Pena 2013]. Enfin, ces résultats sont confirmés par une étude italienne. Les auteurs mettent en évidence que le profil de résistance de *Pseudomonas aeruginosa* influence le caractère approprié de l'antibiothérapie initiale mais c'est ce dernier facteur qui est un des 4 facteurs³ associés à la mortalité en réanimation [Tumbarello 2013].

- Mucoviscidose

Les infections respiratoires sont évidemment très fréquentes chez les patients porteurs d'une mucoviscidose. *S. aureus* et *P. aeruginosa* sont les deux principales bactéries en cause.

Pour *P. aeruginosa*, on considère que 80% des patients adultes sont colonisés à l'âge de 18 ans. Ces infections marquent souvent un cap dans l'évolution de la maladie. Les épisodes se multiplient et évoluent vers des infections chroniques qui sont d'autant plus difficiles à traiter que les souches deviennent de plus en plus résistantes aux antibiotiques au fil du temps.

Ce sont ces formes chroniques d'infections qui font la particularité de la maladie. Elles sont notamment causées par des souches muqueuses qui sont extrêmement difficiles à atteindre par les antibiotiques du fait de la production de biofilms [Gaspar 2013].

¹ MDR : résistance à 2 des antibiotiques parmi les suivants : pipéracilline, ceftazidime, imipénème, fluoroquinolones (FQ), amikacine, colimycine

² XDR : résistance concomitante aux antibiotiques suivants : pipéracilline, ceftazidime, FQ et imipénème.

³ La régression logistique montre que les facteurs suivants sont associés à la mortalité : une antibiothérapie initiale inadaptée, la présence d'un diabète, un score IGS2 élevé et un âge plus élevé.

IV- De nouveaux antibiotiques ?

On l'a vu, le problème de l'émergence des résistances bactériennes aux antibiotiques est une préoccupation mondiale. Ce, d'autant plus que le nombre de nouvelles molécules est extrêmement limité [Bassetti 2013; Boucher 2013; Boucher 2009; Bush 2012].

Nous illustrons ce point en présentant l'avancée du développement en 2014 des molécules ciblées par l'eCDC en 2009 comme porteuses d'espoir pour le traitement des infections à bactéries à Gram négatif (n=8) [European Centre for Disease Control 2009].

Puis, nous proposons une revue de la littérature, non exhaustive, sur les deux molécules sur lesquelles nos travaux ont porté : le doripénème et le ceftolozane.

A- Quid des molécules identifiées par l'eCDC dans son rapport de 2009 ?

En termes d'avancement du développement des 8 molécules anti bactéries à Gram négatif, on procède à une recherche systématique sur Pubmed® pour chacune de ces molécules (dernière recherche effectuée le 29 juillet 2014). On complète nos recherches par l'interrogation de la base Clinicaltrials.gov®, service du NIH (National Institutes of Health) américain qui enregistre les essais cliniques à travers le monde¹. L'ensemble des études enregistrées est proposé en Annexe.

1- PTZ601 = razpenem

Peu de publications depuis 2009 (n=3). Concernant, l'intérêt potentiel de ce carbapénème contre les bactéries à Gram négatif, en 2009, Livermore rapporte une bonne activité sur les souches d'entérobactéries y compris celles produisant des BLSE. En revanche, la molécule est touchée en cas d'expression d'une céphalosporinase de type AmpC², ou d'une carbapénémase [Livermore 2009b].

ClinicalTrials : pas d'étude enregistrée dans la base pour cette molécule.

¹ <https://clinicaltrials.gov/ct2/about-site/terms-conditions>

² Ce qui n'est pas classique pour un carbapénème.

2- ME1036 = CP5609

Ce nouveau carbapénème a comme propriété principale d'inclure dans son spectre les souches de *S. aureus*, résistantes à la méticilline (SARM). Sur les 10 publications trouvées dans Pubmed, aucune ne concerne les bactéries à Gram négatif...

ClinicalTrials : pas d'étude enregistrée dans la base pour cette molécule.

3- Tomopenem = CS023

Il s'agit là aussi d'un carbapénème actif sur les SARM. On trouve une vingtaine d'articles publiés. Ce sont pour l'instant essentiellement des données *in vitro* [Koga 2005; Koga 2008; Koga 2009; Tanaka 2009; Thomson 2004] mais également des données (pharmacodynamiques) pharmacocinétiques animales et humaines. La molécule a une demi-vie plus longue que les autres pénèmes (un peu moins de 2 heures) [MacGowan 2008; Mallalieu 2009; Mallalieu 2008; Shibayama 2006a; Shibayama 2007a; Shibayama 2007b; Shibayama 2007c; Shibayama 2006b; Sugihara 2010; Tomozawa 2010].

L'efficacité du tomopénème est également testée dans des modèles animaux [Koga 2005; Morinaga 2008; Sugihara 2010; Sugihara 2011], montrant une bonne activité contre le SARM et contre *Pseudomonas aeruginosa*.

ClinicalTrials : pas d'étude enregistrée dans la base pour cette molécule.

4- hLF1-11

Ce dérivé de la lactoferrine humaine a donné lieu à de nombreuses publications depuis le rapport de l'ECDC. Leur identification est rendue plus difficile que pour les précédentes molécules car le mot clé « lactoferrin » fait référence à d'autres domaines que les traitements antibiotiques.

C'est essentiellement l'action sur les biofilms qui est mise en avant [Costa 2014; Godoy-Gallardo 2014]. La molécule est ainsi testée comme anti-infectieux ajouté au ciment pour les implants [Faber 2005; Kazemzadeh-Narbat 2010; Stallmann 2008; Stallmann 2004; Stallmann 2003]. Les modulations immunologiques induites par hLF1-11 sont également investiguées [van der Does 2010a; van der Does 2010b; van der Does 2012a; van der Does 2012b]. Enfin, chez les volontaires sains ou greffés de cellules souches hématopoïétiques, une étude de tolérance et de pharmacocinétique est publiée [Velden 2009].

ClinicalTrials : malgré les données prometteuses, seuls 2 essais ont été menés à terme (industriels : AM-Pharma®). Il s'agit de phases 1/2 chez des patients d'hématologie pour l'une (NCT00509938) et chez des patients atteints d'une candidémie pour l'autre (NCT00509834). On a cité la publication qui présente les résultats de la première étude [Velden 2009]. Les résultats de la seconde ne sont pas disponibles. Enfin, on note que deux essais (prévus initialement par le même industriel) ont été retirés (chez les brûlés et chez les greffes de moelle).

5- Lactoferrine

Là encore, la recherche bibliographique est rendue complexe par les multiples domaines dans lesquels la lactoferrine est citée mais aussi car ce peptide d'origine bovine a de nombreux dérivés (semi-)synthétiques au milieu desquels il est difficile de se retrouver.

Ce peptide antimicrobien [Haney 2012; Lacasse 2008] est présenté comme ayant une activité contre de nombreuses bactéries : *S. aureus* [Stallmann 2003], *E. coli* [Flores-Villasenor 2012a; Flores-Villasenor 2010], *S. pneumoniae* [Leon-Sicairos 2014], *Vibrio parahaemolyticus* [Leon-Sicairos 2009]... Enfin, administrée par voie orale, dans un modèle d'infection urinaire murin, la lactoferrine diminue le taux d'infection et l'inflammation au niveau du tractus urinaire [Haversen 2000]. Dans un modèle expérimental murin d'infection intestinale à *E. coli*, elle diminue l'excrétion des bactéries dans les selles des animaux et réduit les dommages systémiques associés à l'infection (rénaux) [Flores-Villasenor 2012b]. En revanche, certains de ses dérivés sont toxiques pour les érythrocytes ou les cellules osseuses [Stallmann 2005].

Clinicaltrials : De très nombreux essais (n=53) sont enregistrés dans la base. Ils concernent des domaines extrêmement variés. Dans le domaine des maladies infectieuses, on retient 17 essais dont les 4 qui concernent en fait hLF1-11 et 3 qui concernent la talactoferrine. Parmi les 10 restants, 7 concernent les infections bactériennes : prévention des infections chez les patients adultes ou nouveau-nés (n=4) essentiellement. Un de ces essais a donné lieu à publication. Il s'agit d'une étude pilote de faisabilité chez les nouveau-nés en réanimation qui montre une bonne tolérance du gel (Biotene OralBalance® gel, GlaxoSmithKline Pharmaceuticals) contenant une association de lactoperoxydase, lysozyme, lactoferrine, administré par voie orale [Stefanescu 2013]. Un autre essai est terminé sans pour autant que les résultats ne soient disponibles (« Pilot Study: Lactoferrin for Prevention of Neonatal Sepsis » ; NCT01264536).

6- Talactoferrine

Cette lactoferrine humaine recombinante est l'objet de recherches dans des domaines extrêmement variés ! Elle est proposée comme traitement dans les cancers pulmonaires [Digumarti 2011; Madan 2013; Ramalingam 2013] ou rénaux [Jonasch 2008; Lewis 2011] mais aussi comme topique pour les plaies [Engelmayer 2008], faisant même l'objet d'un essai de phase 1/2 pour les plaies chez les patients diabétiques [Lyons 2007]. L'étude la plus surprenante est sans conteste celle publiée en 2013 [Guntupalli 2013]. Guntupalli *et al.* montrent en effet, un effet de la talactoferrine contre placebo, dans cette étude multicentrique américaine : une réduction de la mortalité à J28 – cette réduction persistant même à 6 mois ! – chez des patients (194 patients inclus) traités par voie orale dans les premières heures d'un sepsis sévère. Cette étude demande confirmation mais est très encourageante [McCulloh 2013]. A noter, le pourcentage de patients infectés par une bactérie Gram négatif dans cette étude est de 40% environ (43,9% des patients dans le groupe placebo et 35,9% des patients dans le groupe talactoferrine).

Clinicaltrials : seuls trois essais en lien avec les maladies infectieuses sont enregistrés. Le premier ("Study of Talactoferrin Oral Solution for Nosocomial Infection in Preterm Infants"; NCT00854633) est toujours enregistré comme en cours d'inclusions. Le deuxième correspond à l'étude préliminaire rapportée par Guntapilli en 2013 [Guntupalli 2013]. La troisième étude (NCT01273779) correspond à la précédente mais un effectif plus important était prévu (1280 patients contre 190 dans l'étude préliminaire). Cette étude est malheureusement interrompue et le site de l'industriel promoteur (Agennix®) donne quelques explications. Le comité de surveillance a recommandé un arrêt de l'essai pour une sur-mortalité à J28 dans le bras talactoferrine...

http://agennix.com/index.php?option=com_content&view=article&id=205%3Aagennix-ag-halts-phase-iiii-oasis-trial-in-severe-sepsis&catid=23%3Apress-releases-2012&Itemid=56&lang=en

7- rBPI21

Ce peptide recombinant dérive d'une protéine produite par le polynucléaire neutrophile. Son activité antibactérienne est dirigée contre les bactéries à Gram positif, staphylocoques ou pneumocoques [Domingues 2014; Srivastava 2007] mais également contre *E. coli* [Domingues 2014]. Il agit en modifiant la perméabilité de la paroi des bactéries, notamment de la membrane externe. La principale voie de recherche concernant ce peptide porte sur ses propriétés systémiques qui permettraient de neutraliser le lipopolysaccharide (LPS) dans les infections à bactéries à Gram négatif. Ainsi, des réels espoirs sont fondés sur cette action dans les chocs endotoxiques [Zhang

2008] au premier rang desquels, le purpura fulminans. Après des résultats décevants chez l'enfant [**Giroir 2001; Levin 2000**], les résultats de nouvelles études de phase III seraient attendus prochainement.

Clinicaltrials : seuls 2 essais (tous 2 terminés) sont enregistrés. Aucun ne vise réellement à explorer les propriétés anti-infectieuses de la molécule.

8- NXL 104/ceftazidime

Cette association d'un inhibiteur de bêtalactamase non bêtalactamine et d'une céphalosporine avec activité anti-pseudomonas suit un développement habituel avec plusieurs études de phase III en cours. On cite les « classiques » infections urinaires compliquées (NCT00690378, NCT01599806 et NCT01595438), les péritonites (NCT01499290, NCT01726023, NCT01500239 et NCT00752219) mais aussi les pneumonies nosocomiales (NCT01808092). Cette association devrait prochainement obtenir l'autorisation de mise sur le marché tant aux États-Unis qu'en Europe.

On peut noter qu'une association aztréonam/avibactam est également en cours d'investigation (NCT01689207) pour les infections intra-abdominales et que des études pharmacocinétiques sont également prévues pour l'association ceftaroline/avibactam.

*Toutes ces molécules ne sont pas les seules en développement [**Bosurgi 2014; Boucher 2013; Bush 2012; Drawz 2010; Tillotson, 2013; Moir 2012**]. Malheureusement en parallèle de ces découvertes, sont également mis à jour les mécanismes de résistance correspondant [**Guilhelmelli 2013; Hede 2014**].*

B- Doripénème

Doripenem ? Doripénem ? Doripénème ?

On trouve les trois orthographes. Dans la littérature anglo-saxonne, c'est le terme doripenem qui est utilisé. Pour le VIDAL®, le nom de la molécule s'écrit sans « e » : doripénem. Enfin, pour l'Agence européenne des médicaments (EMA), dans le résumé des caractéristiques du produit dans sa version française, c'est le terme doripénème qu'on trouve. Cette dernière orthographe nous semble plus logique car elle correspond aux orthographes des autres molécules de la classe des carbapénèmes. Nous retiendrons donc le terme doripénème ainsi orthographié pour le reste de l'exposé.

Ce tour d'horizon (rapide !) de la littérature s'appuie sur les données publiées accessibles depuis le site de la US National Library of Medicine (Pubmed). Ainsi, la recherche « doripenem » retrouve 431 références publiées depuis février 1996. Parmi elles, on trouve 14 études randomisées contrôlées (filtre : « randomized controlled trials ») et 33 études cliniques (filtre : « clinical trials »). C'est essentiellement sur ces articles que repose la suite de ce paragraphe ainsi que sur quelques autres qui nous ont semblé importants bien que non référencés comme essais cliniques dans Pubmed.

1- Programme de développement

Le doripénème est le carbapénème le plus récemment mis sur le marché (Laboratoire Janssen-Cilag). Il a obtenu l'autorisation de mise sur le marché (AMM) en 2007 aux États-Unis et en Europe en 2008. Dans les deux cas, les indications étaient initialement les infections intra-abdominales compliquées et les infections urinaires compliquées.

L'AMM européenne a été complétée secondairement pour les pneumonies acquises à l'hôpital, y compris les pneumonies associées à la ventilation mécanique (PAVM).

En parallèle, plusieurs travaux ont mis en avant les avantages pharmacocinétiques ou pharmacoeconomiques de la molécule.

2- Mécanisme d'action

Le doripénème agit comme les autres bêtalactamines au niveau des protéines de liaison aux pénicillines (PLP). Cette action résulte en une fragilisation du peptidoglycane et aboutit finalement à la mort de la bactérie (bactéricidie).

Le doripénème a en particulier une affinité préférentielle pour les PLP2 et PLP3 chez *Pseudomonas aeruginosa* [Davies 2008; Guery 2009] suivies des PLP1a et 1b alors que pour *E. coli*, ce sont les PLP2 qui sont les plus affines suivies de PLP1a, PLP1b et PLP3.

Ces liaisons sont relativement proches des liaisons établies par le mérépénème. En revanche, pour l'imipénème, l'affinité est plus grande avec PLP1a et PLP1b alors qu'elle est moindre avec PLP2 et PLP3. Ces différences entre les pénèmes, variables selon les espèces bactériennes, ont potentiellement un impact. L'inhibition de PLP1a et 1b résultent en formation de sphéroplastes puis en une mort bactérienne rapide [Curtis 1979]. L'inhibition de PLP2 cause la transformation des bactéries en bâtonnets en cellules sphériques. L'inhibition de PLP3 quant à elle entraîne la formation de formes filamenteuses [Curtis 1979; Hayes and Orr 1983].

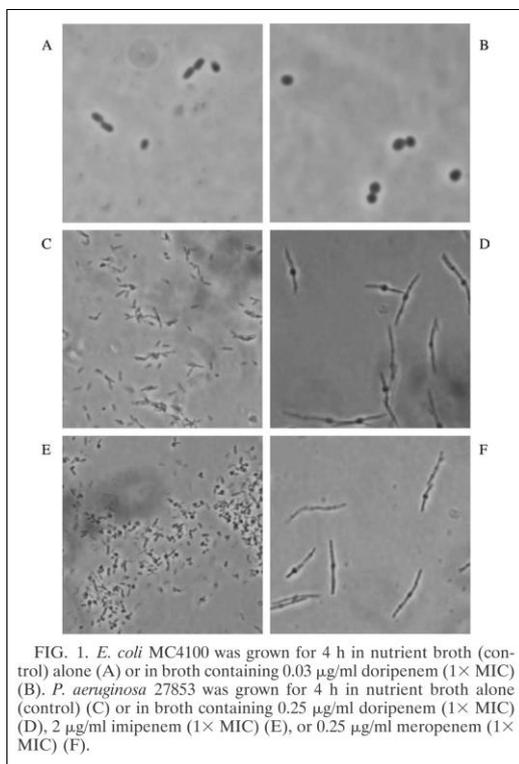


Figure 4 : Modifications de formes de *E. coli* ou *Pseudomonas aeruginosa* exposés à différents carbapénèmes (d'après [Davies 2008])

3- Infections intra-abdominales

Le programme de développement se tourne d'abord vers les infections urinaires et intra-abdominales visant l'obtention des AMM. Nous ne reprenons que les grandes lignes de ces études mais détaillons plus longuement les études portant sur les pneumonies.

Pour les infections intra-abdominales dites compliquées, deux études contrôlées sont conduites, dont l'objectif est de démontrer la non-infériorité du doripénème par rapport au méropénème. Seule une des 2 est publiée [Lucasti 2008]. Les résultats de la seconde sont présentés dans le rapport de la commission de transparence [HAS 2009]. Pour chacune d'elles, près de 500 patients sont inclus. Il s'agit de patients adultes, immunocompétents, peu sévères (mortalité 2%) dont une majorité est traitée pour une appendicite (62% des patients traités par doripénème dont la moitié présentait une péritonite localisée). Dans les deux études, le doripénème (500mg trois fois par jour) est non-inférieur (seuil delta=15%) au méropénème (1g trois fois par jour) sur les critères principaux de jugement : le taux de guérison clinique à la visite de contrôle (21-60 jours après traitement) dans la population microbiologiquement évaluable (ME) et les taux de guérison clinique survenant jusqu'à 60 jours après la dernière dose de traitement dans la population en intention de traiter microbiologiquement modifiée (mMITT).

	étude DORI-07		étude DORI-08	
	<i>Lucasti, Clin Therap 2008</i>		<i>non publiée</i>	
	doripénème	méropénème	doripénème	méropénème
Nbe de patients inclus	237	239		
Guérison clinique ME % (n/N)	85,9 (140/163)	85,3 (133/156)	83,3 (135/162)	83,0 (127/153)
	<i>différence: 0,6; IC_{95%} [-7,7; 9,0]</i>		<i>différence: 0,3; IC_{95%} [-8,6; 9,2]</i>	
Guérison clinique mMITT % (n/N)	77,9 (152/195)	78,9 (150/190)	74,5 (149/200)	75,7 (140/185)
	<i>différence: -1,0; IC_{95%} [-9,7; 7,7]</i>		<i>différence: -1,2; IC_{95%} [-10,3; 8,0]</i>	

Tableau 12 : Résultats des études de non-infériorité du doripénème dans les infections intra-abdominales compliquées

ME : population microbiologiquement évaluable

mMITT : population en intention de traiter modifiée pour laquelle au moins un pathogène est mis en évidence

4- Infections urinaires

Le doripénème (500mg trois fois par jour) s'avère non-inférieur à la lévofloxacine (250 mg une fois par jour) sur le taux de guérison bactériologique (= éradication de tous les pathogènes identifiés à l'inclusion) à la visite de contrôle (5 à 11 jours après traitement) dans la population microbiologiquement évaluable (82,1% versus 83,4% ; différence -1,3 IC_{95%}[-8,0 ; 5,5]) et dans la population mMITT (79,2 % versus 78,2 % ; différence 1,0 IC_{95%} [-5,6 ; 7,6]) [Naber 2009]. Les résultats

de cette première étude ont été confortés par une seconde, non comparative [HAS 2009]. Cependant, le rapport de la Commission de Transparence souligne que les données sont insuffisantes concernant l'efficacité dans le traitement des pyélonéphrites aiguës compliquées (choc septique, abcès, insuffisance rénale...) ou associées à un facteur de risque de complication (diabète, immunodépression, âge>65 ans, malformations des voies excrétrices....). En effet, la majorité des pyélonéphrites traitées (84%) dans ces deux études sont des pyélonéphrites simples. Par ailleurs, la dose de lévofloxacine utilisée dans ces études (250 mg/jour) ne correspond à la posologie de lévofloxacine (500 mg/jour) recommandée en France dans les pyélonéphrites aiguës.

5- Pneumonies

- Les études DORI-09 et DORI-10

Le programme de développement clinique repose initialement sur 2 études contrôlées, dont l'objectif est de démontrer la non-infériorité du doripénème par rapport à l'association pipéracilline/tazobactam (étude DORI-09) [Rea-Neto 2008] ou à l'imipénème/cilastatine (étude DORI-10) [Chastre 2008].

Les critères d'inclusion et de non-inclusion des patients dans les deux études sont similaires, à l'exception de la sévérité de la pathologie. Dans l'étude DORI-09, sont éligibles les patients adultes ayant une pneumonie nosocomiale, hospitalisés depuis au moins 48 heures, ou sortis d'une hospitalisation d'au moins 48 heures dans les 7 jours précédents, non ventilés ou ventilés depuis moins de 5 jours. Dans l'étude DORI-10, les patients sont des adultes ayant développé une pneumonie sous ventilation (durée de ventilation de plus de 24 heures) ou déventilés depuis moins de 72 heures, avec un score clinique d'infection pulmonaire (CPIS, Clinical pulmonary infection score, [Pugin 1991]) supérieur à 5.

Pour les deux essais, les patients peuvent être inclus avant que les résultats des cultures bactériennes ne soient connus. En revanche, ne peuvent pas être inclus les patients ayant : un syndrome de détresse respiratoire aiguë, une mucoviscidose, une pneumonie à *Pneumocystis jirovecii*, une maladie affectant rapidement le pronostic vital (insuffisance hépatique aiguë ou choc septique), un Score APACHE II¹ inférieur à 8 ou supérieur à 25 (DORI-09) ou supérieur à 29 (DORI-10).

¹ Le score APACHE II prédit, sur des critères recueillis en début de séjour, la mortalité en réanimation. Les scores à 8, 15, 20, 25, 29 correspondent respectivement à une mortalité attendue de 9%, 21%, 36%, 53% et 67%.
Knaus, W. A., E. A. Draper, et al. (1985). "APACHE II: a severity of disease classification system." Critical care medicine 13(10): 818-829.

Les patients immunodéprimés ne peuvent pas être inclus de même que ceux ayant reçu des antibiotiques par voie systémique pendant plus de 24 heures dans les 72 h (DORI-09) ou 48 h (DORI-10) précédant l'inclusion¹. Enfin, une antibiothérapie systémique concomitante n'est pas autorisée (sauf exceptions précisées ci-après). Les patients sont randomisés, après stratification sur la région géographique, le mode de ventilation et la sévérité de la maladie (score APACHE II) pour recevoir en ouvert dans l'étude DORI-09, le doripénème, en perfusion de 1 heure à la dose de 500 mg toutes les 8 heures, ou l'association pipéracilline-tazobactam, en perfusion de 30 minutes à la dose de 4,5 g toutes les 6 heures. Dans l'étude DORI-10, le doripénème est administré en perfusion de 4 heures à la dose de 500 mg toutes les 8 heures, et le comparateur est l'imipénème, en perfusion de 30 minutes à la dose de 500 mg toute les 6 heures ou en perfusion d'une heure à la dose de 1000 mg toute les 8 heures.

Les patients doivent recevoir le traitement pendant une durée de 7 à 14 jours (IV seul dans l'étude DORI-10 ou IV ± PO dans l'étude DORI-09). L'amikacine peut être adjointe lors de l'instauration du traitement IV en cas de suspicion d'infection à *Pseudomonas aeruginosa*. La vancomycine peut également être associée en cas d'infection à *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM). Après 72 heures de traitement IV, les patients peuvent être traités par voie orale (lévofloxacine 750 mg/jour) en cas d'amélioration clinique favorable (étude DORI-09).

Le critère principal de jugement est le taux de guérison clinique évalué à la visite de contrôle (6 à 20 jours après l'arrêt du traitement par voie IV + oral), dans la population cliniquement évaluable (CE) et dans la population en intention de traiter cliniquement modifiée (cMITT). La guérison clinique est définie par la « *résolution des signes et symptômes cliniques dus à l'infection et l'amélioration ou l'absence de progression de toutes les anomalies observées à la radiographie pulmonaire, telle qu'un autre traitement antibiotique n'est plus nécessaire après le traitement* ».

Les 2 études ont inclus respectivement 448 et 531 patients. Les principales caractéristiques démographiques et médicales de ceux-ci sont proches, équilibrées entre les différents groupes de traitement, mais différentes entre les deux études.

Dans l'étude DORI-09, l'âge médian des patients est de 61 ans (18-97 ans, dont 44,6% ≥ 65 ans ; 68% d'hommes). Les patients sont en ventilation spontanée dans 78 % des cas. Pour les autres patients (22%), la durée de ventilation est inférieure à 5 jours. La majorité des patients n'a pas de bactériémie à l'inclusion (94% dans le groupe doripénème *versus* 85,7% dans le groupe

¹ Une antibiothérapie préalable est possible si elle est introduite très récemment.

pipéracilline/tazobactam). Le score APACHE II est supérieur à 15 et supérieur à 20 chez seulement respectivement 19% et 6,3% des patients. La majorité (78% du groupe doripénème et 85 % du groupe pipéracilline/tazobactam) a reçu une antibiothérapie additionnelle par amikacine. La vancomycine est associée chez 13% des patients du groupe doripénème et 18% du groupe pipéracilline/tazobactam. Un relais oral par lévofloxacine est réalisé chez 41% des patients. Ceux-ci reçoivent en moyenne 7 jours de traitement IV préalablement, soit une durée totale (IV + PO) de 11 jours en moyenne.

Dans l'étude DORI-10, l'âge médian des patients est de 50 ans (18-86 ans, dont 28,6% ≥ 65 ans ; 78% d'hommes). La majorité des patients n'a pas de bactériémie à l'inclusion (90 % dans les deux groupes). Le score APACHE II est inférieur à 15 chez la moitié des patients (48%), supérieur à 20 et à 25 chez respectivement 21% et 0,8% des patients. Au moins une antibiothérapie concomitante est reçue par 81 % des sujets dans la population CE (dont 33% considérés comme des échecs au traitement). Environ 22% des patients reçoivent une antibiothérapie additionnelle pour un *P. aeruginosa* (prouvé ou probable) et 28% pour un SAMR.

Les agents pathogènes les plus fréquemment isolés dans les deux études (> 10 patients) sont : *S. aureus*, *H. influenzae*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. cloacae*, *A. baumannii* et *S. pneumoniae*.

Les principaux résultats sont présentés dans le [Tableau 13](#).

	étude DORI-09		étude DORI-10	
	<i>Réa-Neto, Curr Med Res Opin 2008</i>		<i>Chastre, CCM 2008</i>	
	doripénème	pipéracilline/tazobactam	doripénème	imipénème
Nbe de patients inclus	225	223	264	267
Guérison clinique ME % (n/N)	81,3 (109/134)	79,8 (95/119)	68,3 (86/126)	64,8 (79/122)
	<i>différence: 1,5; IC_{95%} [-9,1; 12,1]</i>		<i>différence: 3,5; IC_{95%} [-9,1; 16,1]</i>	
Guérison clinique cMITT % (n/N)	69,5 (148/213)	64,1 (134/209)	59,0 (144/244)	57,8 (144/249)
	<i>différence: 5,4; IC_{95%} [-4,4; 14,8]</i>		<i>différence: 1,2; IC_{95%} [-7,9; 10,3]</i>	

Tableau 13 : Résultats des études de non-infériorité du doripénème dans les pneumonies

ME : population microbiologiquement évaluable

cMITT : population en intention de traiter modifiée pour laquelle le diagnostic de pneumonie est confirmé

Pour les deux études, le doripénème s'avère non-inférieur aux comparateurs (pipéracilline/tazobactam ou imipénème/cilastatine) sur le taux de guérison clinique évalué à la visite de contrôle (6 à 20 jours après l'arrêt du traitement IV et/ou oral) dans la population cliniquement

évaluable (CE) et dans la population en intention de traiter cliniquement modifiée (cMITT). Les analyses sur les critères secondaires de jugement (notamment la réponse microbiologique) et les analyses en sous-groupes confortent la non-infériorité du doripénème rapport aux comparateurs.

Il convient cependant d'attirer l'attention sur le fait que les patients inclus sont peu sévères : non inclusion des patients en choc septique ou en SDRA (syndrome de détresse respiratoire aiguë). En outre, les patients immunodéprimés, porteurs de mucoviscidose ne peuvent être inclus. Enfin, on note le faible taux de bactéries responsables multirésistantes [HAS 2009].

- Des arguments PK-PD et/ou pharmaco-économiques en faveur du doripénème

Les résultats de l'étude de Chastre *et al.* en 2008 sont encourageants montrant une non-infériorité du doripénème par rapport à l'imipénème. Ces données laissent espérer un atout pharmaco-économique substantiel grâce au doripénème. Le traitement par ce dernier diminue la durée de ventilation mécanique mais aussi la durée de séjour réduisant d'autant les coûts [Amin 2009].

En outre, les données PK-PD permettent :

- de mieux décrire la pharmacocinétique. Elle est finalement relativement proche qu'il s'agisse d'un volontaire sain, ou d'un patient inclus dans une des études DORI-09 ou DORI-10 [Nandy 2010]. On rappelle cependant que ces études ont inclus peu de patients sévères. L'insuffisance rénale est le déterminant clé qui modifie la PK. Il existe en revanche une variabilité interindividuelle importante [Nandy 2010]. Les patients atteints de mucoviscidose ont également des paramètres PK relativement proches des précédents [Cirillo 2012]. Les sujets âgés ont eux aussi des paramètres PK proches mais une fonction rénale altérée si bien que des posologies « standard » (0,5g sur une heure trois fois par jour) peuvent convenir [Harada 2013].
- de préciser que des posologies plus élevées (1 g plutôt que 0,5 g) de doripénème et en perfusion allongée de 4 heures permettent d'augmenter le pourcentage de patients qui atteignent la cible $T_{>CMI}>40\%$ [Apisarntharak 2010; Apisarntharak 2012; Van Wart 2009]. Ces données sont confirmées pour les patients les plus sévères [Roberts 2013].

Ces éléments associés à des données épidémiologiques favorables au doripénème [Kiratisin 2012; Nordmann 2011] conduisent à proposer l'étude comparant 7 jours de doripénème (1g en perfusion de 4 heures) à 10 jours d'imipénème. Si les résultats de cette étude sont dramatiques du point de

vue commercial [Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM) 2014], ils ne doivent sans doute pas condamner la molécule. La différence¹, si elle existe, est dans les détails [Udy 2012].

- Études ultérieures

Kollef, Critical Care 2012

Cette étude internationale a permis d'évaluer deux traitements pour les pneumonies associées à la ventilation (PAVM) tardives, documentées par des bacilles à Gram négatif [Kollef 2012a]. Deux durées fixes d'antibiotiques sont comparées : 7 jours de doripénème (1 g en perfusion de 4 heures trois fois par jour) *versus* 10 jours d'imipénème-cilastatine (1 g sur 1 heure toutes les 8 heures).

L'étude est prospective, en double insu, randomisée. Elle débute en avril 2008 et doit être interrompue en juin 2011 par le comité indépendant de surveillance. L'analyse intermédiaire prévue montre en effet des écarts (préalablement définis) justifiant cette décision.

L'analyse finale porte sur 274 patients randomisés (524 étaient prévus) et montre un taux de guérison clinique à la fin du traitement, dans le groupe en intention de traiter microbiologiquement évaluable (mITT), plus faible dans le groupe doripénème (45,6% *versus* 56,8% dans le groupe imipénème-cilastatine ; $IC_{95\%}$: -26,3% à 3,8%). De même, le taux de guérison clinique à la fin de traitement est plus bas pour les patients présentant une pneumonie à *Pseudomonas aeruginosa* (41,2% *versus* 60,0%; $IC_{95\%}$: -57,2 à 19,5). Cette bactérie est la plus fréquente des bactéries à Gram négatif isolées. La mortalité toutes causes confondues à 28 jours est plus élevée dans le groupe doripénème (21,5% *versus* 14,8%; $IC_{95\%}$: -5,0 à 18,5) et en particulier pour les patients ayant une PAVM à *P. aeruginosa* (35,3% *versus* 0,0%; $IC_{95\%}$: 12,6 à 58,0).

La conclusion des auteurs est la suivante. Pour une PAVM tardive, documentée, le doripénème en traitement de 7 jours montre un taux plus élevé - de façon non significative - d'échecs cliniques ou de mortalité par rapport à un traitement par imipénème-cilastatine pendant 10 jours. Un traitement supérieur à 7 jours doit être privilégié.

¹ A défaut de la vérité... On fait ici référence à l'éditorial par D. Gilbert dans CCM.
Gilbert, D. (2008). "The truth, if it exists, is in the details." *Critical care medicine* 36: 1368-1369.

Luyt, AAC 2014

Dans une étude rétrospective monocentrique [Luyt 2014], les auteurs comparent le devenir des patients traités par carbapénèmes pour une PAVM à *Pseudomonas aeruginosa* (n=169). Les souches cliniques sont moins souvent résistantes au doripénème, qu'au méropénème et qu'à l'imipénème. Le pourcentage de résistance est respectivement de 15%, 22% et 36%. L'exposition antérieure à un carbapénème (hors ertapénème, non pris en compte) et la durée de ventilation mécanique avant le premier épisode de PAVM sont les 2 facteurs associés à la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* (intermédiaire ou résistant) aux carbapénèmes. Finalement, 88 patients sont traités par un carbapénème : imipénème (n=32), méropénème (n=24) et doripénème (n=32). Pour ces 3 groupes de patients, aucune différence de devenir n'est observée tant en termes de mortalité, que de récurrence. L'émergence de résistance sous l'un de ces trois régimes, n'est pas différente selon le pénème utilisé.

C- Ceftolozane

Ceftolozane : « le » ceftolozane ?, « la » ceftolozane ?

On ne trouve pas à l'heure actuelle d'usage courant en langue française... Aussi, nous semble-t-il - pour l'instant - acceptable d'utiliser le féminin comme le masculin. Cette dernière option semble « mieux sonner »... C'est celle que nous retiendrons !

La recherche « ceftolozane » dans Pubmed de la NLM trouve 41 références. Quatre sont classées « clinical trials », 3 « randomized clinical trials ».

Ces quelques éléments de revue de la littérature s'appuient sur ces références (exception faite des 5 revues générales ne traitant pas uniquement du ceftolozane ; n=36). Une seule étude réellement clinique (phase II) est publiée à ce jour chez des patients traités pour des infections intra-abdominales compliquées. Quatre études présentent des données pharmacocinétiques chez des volontaires. Toutes les autres études proposent des données *in vitro*.

1- Mécanisme d'action

Des données *in vitro*, on retient un mécanisme d'action par inhibition des PLP. Comme pour la ceftazidime, le ceftolozane est un inhibiteur de PLP3. Cette affinité intense explique la formation de formes septales et filamenteuses sous traitement par ceftolozane. Celui-ci en revanche aurait une affinité supérieure à celle de la ceftazidime pour PLP1b, 1c, PLP2 et PLP3 [Hong 2013]. En comparaison à l'imipénème, l'affinité est supérieure pour PLP1b mais moindre pour PLP1c. Comme la ceftazidime, et contrairement à l'imipénème, le ceftolozane est un faible inducteur d'AmpC ce qui est cohérent avec une affinité moindre pour PLP4 [Moya 2010a]. Ces modifications des PLP jouent un rôle dans la survenue de résistance chez *Pseudomonas aeruginosa* [Moya 2012].

Par ailleurs, l'association du ceftolozane avec le tazobactam confère un effet « post inhibiteur de bêta-lactamase » sur les souches productrices de bêta-lactamase à spectre élargi [Sader 2014c].

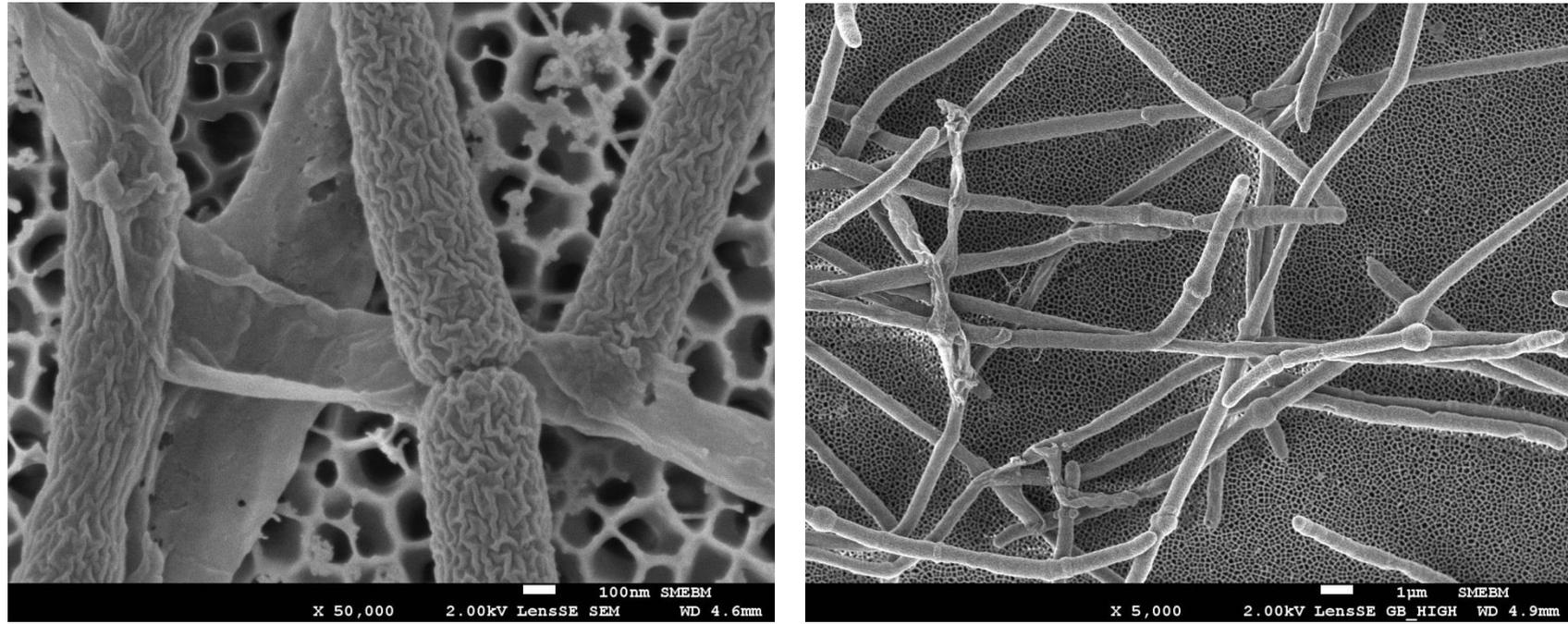


Figure 5 : Modifications de formes de *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) exposés au ceftolozane

(photos : AF Miègeville)

1- Données d'activité *in vitro*

Les premières données datent de 2007. La molécule seule¹ est positionnée comme un anti-*Pseudomonas*. Comme la ceftazidime (CAZ), le ceftolozane est touché par les souches de *Pseudomonas aeruginosa* produisant des BLSE ou des métallo-enzymes. En revanche, il est moins touché par les souches exprimant des céphalosporinases de type AmpC que ne l'est CAZ [Bulik 2010; Takeda 2007a; Takeda 2007b]. Ceci est confirmé sur des souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* isolées de patients atteints de mucoviscidose chez lesquels les CMI à CXA101 sont plus faibles que celles à la ceftazidime [Livermore 2009a]. Chez ces patients [Zamorano 2010] comme chez les patients de réanimation [Moya 2010b], la sélection de mutants résistants est faible. Elle nécessite en effet plusieurs mutations pour aboutir finalement à une hyperexpression et une modification structurale de AmpC [Cabot 2014].

Pour les entérobactéries, y compris certaines produisant des bêtalactamases sensibles aux inhibiteurs, ou pour les bactéries anaérobies telles que *B. fragilis*, l'adjonction du tazobactam offre un avantage [Sader 2011; Snyderman 2014; Titelman 2011]. En revanche, pour *Pseudomonas aeruginosa*, cet ajout ne change pas grand-chose [Bulik 2010; Juan 2010].

Les données actuelles disponibles sur l'épidémiologie sont peu nombreuses. Un réseau européen et aux États-Unis est constitué (projet PACTS : Program to Assess Ceftolozane/Tazobactam Susceptibility). Un laboratoire, JMI Laboratories, rémunéré par Cubist centralise des souches bactériennes (*Pseudomonas aeruginosa* et entérobactéries) isolées de prélèvements cliniques issus de centres européens (une trentaine) ou américains (une soixantaine de centres). Les résultats de sensibilité des souches au ceftolozane sont présentés pour l'ensemble des souches européennes [Sader 2014a], pour les souches issues de prélèvements respiratoires européens et américains [Farrell 2014] ou de prélèvements urinaires ou péritonéaux là-encore sur les 2 continents [Sader 2014b]. On retient de ces études, une sensibilité au ceftolozane excellente tant pour *P. aeruginosa* que pour les entérobactéries, y compris certaines souches productrices de BLSE ; BLSE dont l'activité enzymatique serait inhibée par le tazobactam. Il faut cependant prendre ces résultats avec recul.

Certes, la moindre affinité du ceftolozane pour la céphalosporinase de classe C, AmpC, et l'association au tazobactam, confèrent un avantage à la molécule par rapport à la ceftazidime avec laquelle il existe de réels écarts de CMI₅₀ et CMI₉₀. On note aussi une activité conservée sur des

¹ Initialement étudié seul, le FR264205 est ensuite dénommé CXA101. Son association avec le tazobactam est appelée CXA201. Les trois lettres qui désignent le ceftolozane pour les tests de sensibilité *in vitro* sont TOL.

souches résistantes aux pénèmes pour peu qu'il ne s'agisse pas de souches produisant des métallo-enzymes (IMP, VIM par exemple).

Toutefois, on note que les concentrations critiques pour le ceftolozane ne sont pas définies à l'heure actuelle et que les seuils choisis pour la classification des souches en catégories Sensible/Intermédiaire/Résistante pour les comparateurs (pénèmes notamment) ne sont pas exactement ceux recommandés par l'EUCAST. On note aussi que les CMI sont réalisées à concentration fixe en tazobactam (4 µg/mL). Ceci peut sans doute favoriser l'association avec le ceftolozane puisqu'on sait que l'inhibition des bêtalactamases dépend de la concentration en inhibiteur. Ce ratio ceftolozane:tazobactam est un élément important à prendre en compte notamment pour les souches BLSE [Vanscoy 2013].

Des résultats également encourageants sont présentés sur les souches canadiennes de *Pseudomonas aeruginosa* [Walkty 2013].

2- Données pharmacocinétiques

On dispose de données chez le volontaire sain pour le ceftolozane seul [Ge 2010] ou en association avec le tazobactam (ratio 2:1) [Miller 2012]. La pharmacocinétique du ceftolozane est sans grande particularité par rapport à d'autres bêtalactamines en dehors d'une demi-vie un peu plus longue : 2,3 à 2,6 heures. L'élimination se fait à 90% par voie rénale sous forme inchangée. On dispose également de données comparatives par rapport à l'association pipéracilline/tazobactam dans les lavages broncho-alvéolaires de sujets sains confirmant la bonne diffusion des 2 molécules, ceftolozane et tazobactam, dans le poumon profond même si l'inhibiteur est désavantagé par une demi-vie plus courte (1 heure environ) [Chandorkar 2012]. Enfin, la même équipe publie des données chez les patients insuffisants rénaux chroniques, pour lesquels – sans surprise – l'aire sous la courbe est augmentée. Les auteurs proposent ainsi des ajustements de posologies et de fréquences d'administration [Wooley 2014].

3- Données des expérimentations animales

Elles sont peu nombreuses. Le ceftolozane montre une bonne activité contre *Pseudomonas aeruginosa* et contre des entérobactéries dans un modèle murin d'infection de cuisse (et pulmonaire pour la seconde) chez des animaux immunocompétents [Bulik 2012] ou neutropéniques [Craig 2013]. En outre, l'étude de Craig permet de préciser que parmi les ratios testés, le meilleur est le

ratio 2 pour 1 (ceftolozane 1g et tazobactam 0,5g par exemple). Enfin, une étude montre l'impact du ceftolozane sur les paramètres inflammatoires dans un modèle murin de pneumonie [Jacqueline 2013].

4- Données cliniques

Une seule étude est publiée concernant l'association ceftolozane/tazobactam dans les infections intra-abdominales compliquées [Lucasti 2014]. Il s'agit d'une comparaison de l'efficacité et de la tolérance entre ceftolozane/tazobactam (1g/0,5g trois fois par jour) +/- métronidazole (82 patients) *versus* méropénème (1g trois fois par jour). Les critères de jugement principaux sont le taux de réponse clinique dans la population cliniquement évaluable (ME) et dans la population en intention de traiter modifiée microbiologiquement (mMITT).

Plusieurs études de phase 3 sont en cours :

- à la posologie de 1g/0,5g (ceftolozane/tazobactam) trois fois par jour :
 - o dans les infections urinaires (<http://clinicaltrials.gov>, identifiants : NCT01345955, NCT01345929 et NCT00921024)
 - o et dans les infections intra-abdominales compliquées (NCT01147640, NCT01445665 et NCT01445678),
- et à la posologie de 1g/0,5g trois fois par jour :
 - o dans les pneumonies associées à la ventilation (NCT01853982).

Travaux personnels

I-	Objectifs.....	54
II-	Matériels et Méthodes.....	54
A-	Antibiotiques	54
B-	Souches bactériennes.....	54
C-	Milieus.....	56
D-	Antibiogrammes	56
E-	Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI).....	57
F-	Expérimentations <i>in vivo</i> : modèles de pneumonie chez le lapin	59
G-	Données pharmacocinétiques.....	64
H-	Évaluation de l'efficacité des antibiotiques dans le modèle expérimental aigu.....	66
I-	Mutants sous traitements.....	67
J-	Analyses statistiques	67
III-	Résultats - Commentaires	70
A-	Modèles d'infection chronique	70
B-	Modèle d'infection aiguë	75
C-	Comparaison de la sensibilité aux carbapénèmes	112
IV-	Discussion	131
A-	Modèle expérimental d'infection aiguë.....	132
B-	Modèle de pneumonie chronique.....	137
C-	Intérêt des nouvelles molécules ?.....	138

I- Objectifs

Nos objectifs au cours de cette thèse sont :

- de mettre au point, à partir d'un modèle d'infection aiguë, un modèle expérimental d'infection pulmonaire chronique chez le lapin,
- d'évaluer l'efficacité de nouvelles molécules dans le modèle d'infection aiguë : doripénème puis ceftolozane,
- enfin, de comparer la sensibilité aux différents carbapénèmes de souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa*.

Dans la mesure où les techniques utilisées sont proches, nous les présentons dans un seul et même chapitre Matériels et Méthodes.

II- Matériels et Méthodes

A- Antibiotiques

Le doripénème est fourni par le laboratoire Janssen-Cilag (Issy-les-Moulineaux, France), sous forme de poudre se conservant à température ambiante. De la même façon, le ceftolozane est obtenu du laboratoire Cubist (Lexington, États-Unis) également sous forme de poudre.

L'imipénème, le méropénème, la ceftazidime et l'association pipéracilline/tazobactam sont obtenus sous leur forme commerciale respectivement des laboratoires Merck Sharp & Dohme-Chibert (Courbevoie, France), AstraZeneca (Rueil-Malmaison, France), GlaxoSmithKline (Marly-le-Roi, France) et Pfizer (Paris, France).

Pour les études *in vivo*, les médicaments sont reconstitués immédiatement avant utilisation dans une solution de NaCl à 0,9%, tel que recommandé par les fabricants.

Pour les études *in vitro*, les dilutions antibiotiques sont réalisées à partir d'une solution stock d'antibiotique conservée à -80°C et titrant à 2000 µg/mL.

B- Souches bactériennes

1- PAO1 et $\Delta oprD$ PAO1

La souche utilisée pour les expérimentations *in vivo* est la souche référencée de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 [Boutoille 2009b; Chou 2008; Drusano 2009; Kukavica-Ibrulj 2008a; Oberhardt 2008]. Son génome (Figure 6) est connu depuis une dizaine d'années [Stover 2000]. Elle est exempte de tout mécanisme de résistance (acquise !) aux antibiotiques.

L'avantage de cette souche PAO1, en dehors du fait qu'elle est largement utilisée, réside dans l'existence de mutants isogéniques. Nous disposons de plusieurs souches de ce type grâce pour la plupart au concours du Centre National de Référence (Pr P. Plésiat).

Ainsi, le mutant $\Delta oprD$ est inactivé au niveau de son gène *OprD* ce qui entraîne une perte de l'expression de la porine D au niveau de la membrane externe. Ceci entraîne une diminution de la perméabilité de *Pseudomonas* et une résistance de bas niveau aux carbapénèmes, préférentiellement à l'imipénème [Riera 2011]. La protéine canalaire (porine) OprD permet aussi le passage de certains acides aminés ou peptides avec une possible compétition avec les carbapénèmes. Elle est régulée au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel (ions métaux, petites molécules bioactives, acides aminés et pompes à efflux). Ses mutations et/ou niveaux variables d'expression sont très souvent en cause dans la résistance aux carbapénèmes chez *Pseudomonas aeruginosa*. Ceci en fait aussi une voie de recherche pour le développement de nouvelles molécules antibiotiques [Li 2012].

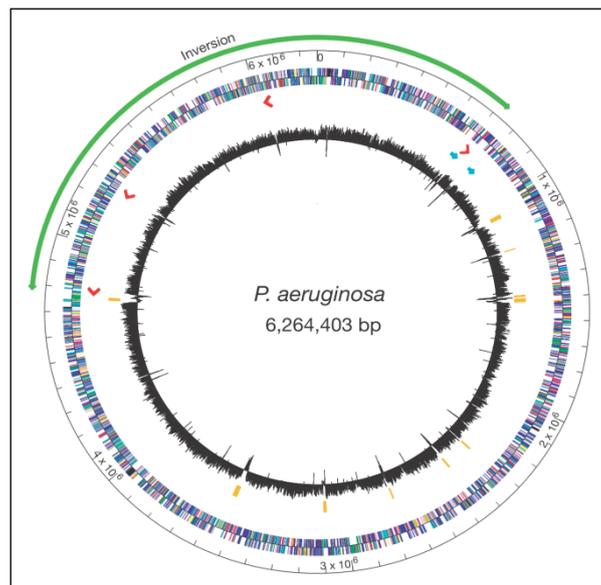


Figure 6: Génome de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1
(d'après [Stover 2000])

Les souches bactériennes sont conservées congelées à -80°C, en bouillon Trypticase-Soja (TS) additionné de 15 à 20% de glycérol réparti dans des cryotubes. Pour chaque expérimentation *in vivo*, elles sont décongelées et repiquées 3 fois.

2- Souches cliniques

Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* utilisées pour la comparaison de la sensibilité aux carbapénèmes sont des isolats cliniques prospectivement et consécutivement collectés de prélèvements respiratoires. Ces derniers proviennent de patients hospitalisés au CHU de Nantes (3000 lits dont 2100 « aigus », dits MCO, Médecine Chirurgie Obstétrique) pendant une période de 6 mois. Pour moitié, il s'agit de patients porteurs d'une mucoviscidose, pour l'autre moitié, de patients « tout-venant »¹.

C- Milieux

Pour la partie « expérimentation animale », la croissance des bactéries est effectuée sur milieu gélosé Tryptocase-Soja (TS ; Difco®, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France). Pour la vérification de la sensibilité aux antibiotiques des souches, les milieux de culture utilisés sont les suivants : bouillon de Mueller-Hinton (BMH, pH 7,3 ± 0,2 à 25°C) et gélose Mueller-Hinton (MH) (Difco®) à 4 mm d'épaisseur.

Pour les souches cliniques, les techniques de cultures sont effectuées au laboratoire de Bactériologie du CHU. Elles sont conformes aux recommandations de la Société Française de Microbiologie (SFM) et de l'European Committee on Susceptibility Testing (EUCAST).

D- Antibiogrammes

Les antibiogrammes sont réalisés par la méthode de diffusion en milieu gélosé selon les recommandations (SFM et EUCAST). Après inondation de géloses MH à partir d'une suspension bactérienne calibrée par néphélométrie à 10⁶ bactéries/mL, les disques d'antibiotiques sont déposés et les géloses placées à l'étuve à 35°C pendant 18 (à 24) heures. Les résultats sont également interprétés selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la SFM [Soussy 2009] et de l'EUCAST [Jehl 2014].

¹ ...mais hospitalisés et ayant bénéficié d'un prélèvement respiratoire !

Pour les souches cliniques, l'antibiotype est déterminé par technique automatisée en milieu liquide (système VITEK2- bioMérieux®) avec une évaluation des concentrations minimales inhibitrices (CMI) vis-à-vis de différentes classes d'antibiotiques, via un algorithme intégré. Un système expert permet une aide à la validation biologique des phénotypes de résistance les plus couramment rencontrés. Le phénotype de résistance de certaines souches est vérifié par méthode manuelle de diffusion en milieu gélosé avec utilisation de disques chargés de concentration précise de chaque antibiotique testé (Pasteur Biorad®). Les résultats des phénotypes de résistance sont là aussi, interprétés selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie [Jehl 2014].

E- Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)

1- Pour la partie expérimentation animale

Pour chacun des antibiotiques (doripénème, imipénème, méropénème, ceftazidime, association pipéracilline/tazobactam, ceftolozane), la détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) a été réalisée par les méthodes de microdilution en milieu liquide, puis de diffusion en milieu gélosé.

- Microdilution en milieu liquide

L'inoculum bactérien calibré à 10^5 bactéries/mL est mis au contact de bouillon MH contenant les concentrations de chaque antibiotique en progression géométrique de raison 2 [Courvalin 2006]. La CMI, qui caractérise l'activité bactériostatique de l'antibiotique, est définie comme la plus faible concentration antibiotique capable d'inhiber la croissance bactérienne visible après 18 à 24 heures d'incubation à 37°C.

- Diffusion en milieu gélosé

La CMI est déterminée à l'aide de bandelettes Etest® (AB BIODISK, Solna, Suède), dispensant une gamme de concentrations antibiotiques allant de 0,016 à 256 mg/L. L'inoculum est calibré à 10^7 bactéries/mL et ensemencé par écouvillonnage sur gélose MH standard. La CMI est la concentration où l'ellipse d'inhibition croise la bandelette avec une inhibition complète de la croissance bactérienne après 18 à 24 heures d'incubation à 37°C.

2- Pour les souches cliniques

Les données obtenues du laboratoire de Bactériologie sont toutes vérifiées par la technique de référence de dilution en milieu gélosé de Mueller-Hinton telle que recommandée par la SFM et l'EUCAST [Jehl 2014]. Il s'agit de préparer une série de dilutions croissantes d'antibiotiques (de 0.03 à 64 mg/L) pour chacun des pénèmes. L'inoculum pour chaque souche est standardisé à 0,5 MacFarland puis dilué au 1/10^{ème}. L'ensemencement sur la gélose se fait ensuite grâce à l'inoculateur multipoint de Steers® de telle sorte que chaque point corresponde à un inoculum de 10⁴ UFC. Après 18 heures d'incubation à 35°C, la CMI pour une souche donnée est déterminée par la concentration en antibiotique la plus basse qui empêche toute croissance bactérienne (moins de 3 colonies au niveau du point correspondant). La ventilation des souches selon les 3 classes, sensible (S), intermédiaire (I) ou résistante (R) est conforme aux recommandations EUCAST 2014.

	CONCENTRATIONS CRITIQUES mg / L	
	S	R
Imipénème	≤4	>8
Méropénème	≤2	>8
Doripénème	≤1	>2

Tableau 14 : Concentrations critiques pour les 3 carbapénèmes selon les recommandations de l'EUCAST

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

F- Expérimentations *in vivo* : modèles de pneumonie chez le lapin

1- Animaux

Les études *in vivo* sont réalisées sur des lapins blancs de Nouvelle-Zélande femelles, âgés de 10 semaines, pesant 2 à 2,5 kg, maintenus en cage individuelle avec accès libre à l'eau et à la nourriture, selon les recommandations actuelles [Close 1996; Close 1997]¹.

Le protocole est approuvé par le Comité d'Éthique Animale de l'Université de Nantes.

2- Modèle de pneumonie expérimentale aiguë

Nous avons mis au point² au sein du laboratoire EA 3826, le modèle de pneumonie aiguë expérimentale à Pseudomonas aeruginosa à partir des données de la littérature [Croisier 2002; Martha 2006; Piroth 1999]. La souche étudiée ne doit pas être spontanément et rapidement éliminée (phénomène de clairance bactérienne intra pulmonaire naturelle observé chez le lapin comme pour d'autres espèces). Les animaux doivent développer des infections de façon reproductible et stable dans le temps (hypothèse d'une clairance tardive). La mortalité en dehors de tout traitement, les éventuelles complications liées à la procédure sont colligées.

- Préparation de l'inoculum

L'inoculum est préparé à partir d'un « souchier » unique. La veille de l'inoculation, la souche est décongelée puis, en suspension dans un bouillon Mueller-Hinton (MH), mise en incubation à 37°C pendant 12 heures. Cette culture est centrifugée à 4000 tours/min pendant 10 minutes. Après élimination du surnageant, on la reconstitue avec du sérum salé à 9‰. On effectue ces opérations 2 fois puis on calibre la solution pour obtenir une concentration finale de 9,5 log₁₀ UFC/mL.

¹ NB : Ces références étaient valables au début de nos travaux. En 2014, la réglementation européenne repose sur la Directive 2010/63/UE du Parlement Européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. Elle est disponible avec les annexes.

² Ce travail de mise au point correspond au Master 2 (2008-2009).

- Expérimentation

L'animal est perfusé (veine auriculaire marginale) puis reçoit une anesthésie générale (association diazépam 1mg puis propofol 15mg). On cathétérise sa trachée (laryngoscope pédiatrique) puis on instille la solution bactérienne à 5 Mac Farland ce qui correspond à un inoculum de 10^9 UFC par animal. L'animal est maintenu 2 minutes en position verticale, tête vers le haut pour favoriser la diffusion de la solution.

3- Modèle de pneumonie expérimentale chronique

A partir du modèle d'infection aiguë, on tente de mettre au point un modèle d'infection chronique. Dans le modèle aigu en effet, les infections sont sévères et les charges bactériennes pulmonaires stables pendant 48 à 72 heures. Par contre au-delà de ce délai, les animaux survivant guérissent spontanément. On parle de clairance naturelle de l'infection. Deux pistes sont envisagées pour prolonger le temps d'infection : l'utilisation de microbilles d'agar et l'utilisation d'un corps étranger intra-bronchique. Dans les deux cas, l'idée est de « protéger » les bactéries de la réponse immunitaire initiale en permettant de favoriser le développement d'un « mucus » au sein desquels les bactéries pourraient survivre.

- Souche bactérienne

La souche utilisée est *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. En effet, cette souche est bien connue et on sait qu'elle permet de produire une infection pulmonaire (aiguë) chez le lapin.

- Corps étranger intra-bronchique

Dans un premier temps, on envisage la mise en place de l'extrémité terminale (de 0,5 ou 1 cm) du cathéter interne d'un COMBICATH^{®1}, préalablement incubé dans une solution bactérienne. Ce dispositif ne peut pas être testé sur des animaux de plus petite taille. C'est donc d'emblée chez le

¹ Ce dispositif permet la réalisation de prélèvements pulmonaires (chez les patients sous ventilation artificielle en réanimation) pour documenter une infection pulmonaire. Pham, L. H., C. Brun-Buisson, *et al.* (1991). "Diagnosis of nosocomial pneumonia in mechanically ventilated patients. Comparison of a plugged telescoping catheter with the protected specimen brush." The American review of respiratory disease **143**(5 Pt 1): 1055-1061.

lapin qu'il est testé. On envisage l'utilisation d'autres cathéters (artériels ou veineux) disponibles pour une utilisation chez l'homme en cas de résultats décevants avec le COMBICATH®.

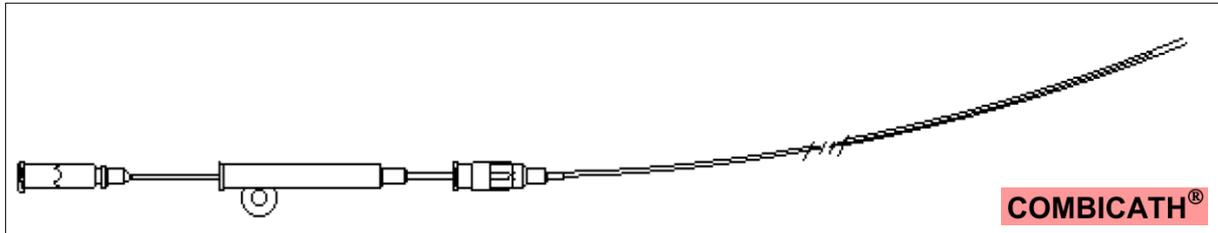


Figure 7 : Double cathéter pour prélèvement distal bronchique protégé

- Utilisation de microbilles d'agar

Cette technique est proposée pour créer une infection pulmonaire chronique chez la souris permettant d'obtenir des infections persistant plus de 10 jours [van Heeckeren 2002]. L'idée est donc de reproduire dans notre laboratoire cette technique de fabrication des billes, d'en tester l'efficacité chez la souris puis de l'évaluer chez le lapin.

Fabrication de microbilles

On fait fondre une gélose d'agarose que l'on mélange avec de l'huile minérale. On ajoute la solution bactérienne à 10^9 voire 10^{10} UFC/mL. L'ensemble est ensuite mélangé grâce à un agitateur électrique (ULTRATURRAX® ; 15 000 tours/min). Le culot obtenu est lavé par du DOC¹ à 0,5% puis du PBS plusieurs fois.

¹ DOC : acide déoxycholique

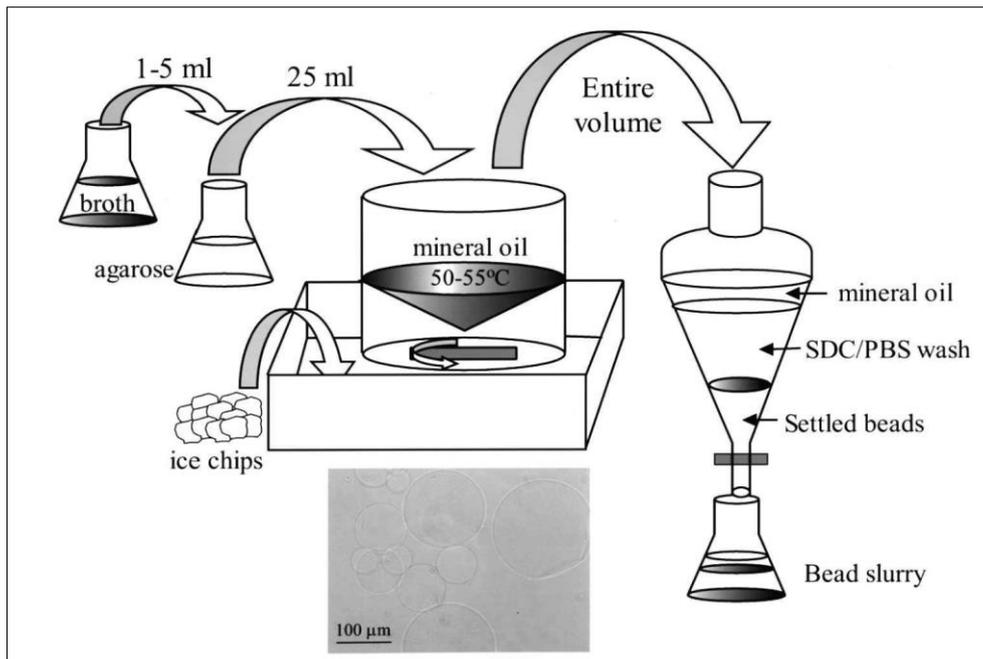


Figure 8 : Fabrication des microbilles d'agarose
(d'après [van Heeckeren and Schluchter 2002])

Les résultats sont jugés sur :

- la qualité des microbilles observées en microscopie optique à 1/40 : sphéricité, présence de bactéries à l'intérieur des billes, mobilité de ces bactéries ;
- la viabilité des bactéries : outre la mobilité en MO citée ci-dessus, on vérifie que le traitement par l'agitateur électrique n'a pas cassé un nombre trop important de bactéries. Entre les dilutions successives et compte-tenu de l'action de l'ULTRATURRAX®, on s'attend à une perte de 2 log₁₀ après fabrication des billes.

On vérifie aussi que la préparation peut être réalisée la veille de l'inoculation, en effectuant les mêmes analyses en MO et les numérations bactériennes sur une solution avec microbilles stockée 24 heures à 4°C.

Validation de l'intérêt de ces microbilles dans un modèle de pneumonie murin

Une fois la solution « microbilles + bactéries » disponible, on prévoit de tester la capacité de cette solution à créer des infections pulmonaires chroniques chez la souris, telles que décrites dans le modèle publié [van Heeckeren and Schluchter 2002].

Pour cela, on utilise le modèle habituellement utilisé dans le laboratoire [Jacqueline 2013]. Le mode opératoire est le même que pour ce modèle aigu. En bref, les animaux utilisés sont des souris Swiss, femelles, immunocompétentes, âgées de 15 à 21 jours. Après anesthésie générale (inhalation d'isoflurane), l'instillation intra-trachéale est réalisée à l'aide d'une sonde de gavage 24G. La position intra-trachéale est validée par les mouvements, induits par la ventilation, de l'inoculum dans la seringue avant instillation. En cas de traitement par antibiotique (ce qui n'est pas le cas ici), il est administré par voie sous cutanée. Les animaux sont euthanasiés à H24 ou H48 selon le type d'évaluation.

Par rapport au modèle aigu, pour le modèle d'infection chronique, l'inoculum est plus faible : 100 µL d'une solution à 10⁷ et non 10⁹ UFC/mL. En outre, les résultats sont évalués plus tard. On prévoit 2 groupes témoins infectés sans microbilles qui sont euthanasiés à H24 et H48 mais les groupes infectés par la solution « microbilles + bactéries » sont euthanasiés à H48 (J2), J5 et J7.

Les résultats sont jugés sur le niveau et la stabilité dans le temps des charges bactériennes pulmonaires pour les animaux infectés avec la solution avec microbilles.

Intérêt dans le modèle expérimental chez le lapin

Après validation chez la souris, on souhaite pouvoir apprécier la capacité de la solution « microbilles + bactéries » à créer une infection chronique chez le lapin.

On fixe l'inoculum initial à 5mL d'une solution à 7 log₁₀ UFC/mL. En fonction des résultats, on envisage de modifier ce paramètre.

Les résultats sont jugés sur :

- les taux de survie initiale (dans les premières heures) puis dans le temps (J3, J5, J7),
- l'aspect macroscopique et microscopique¹ des poumons après euthanasie,
- les charges bactériennes pulmonaires : niveau et stabilité dans le temps.

¹ Score anatomopathologique validant que les animaux ont effectivement développé une infection invasive. Piroth, L., L. Martin, *et al.* (1999). "Development of a new experimental model of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* pneumonia and amoxicillin treatment by reproducing human pharmacokinetics." Antimicrob Agents Chemother **43**(10): 2484-2492.

G- Données pharmacocinétiques

Que ce soit pour traiter les animaux dans un modèle d'infection aiguë ou chronique, l'administration du traitement « humanisé » passe par plusieurs étapes. Reproduire chez le lapin la pharmacocinétique humaine nécessite :

- dans un premier temps d'étudier les pharmacocinétiques spontanées chez l'animal,
- puis d'adapter, de paramétrer, à partir des données de pharmacocinétique humaine, le pilotage des seringues électriques mis au point au laboratoire [Bugnon 1998].

1- Étude de la pharmacocinétique plasmatique spontanée des antibiotiques chez le lapin

L'étude des pharmacocinétiques spontanée et plasmatique humanisées a été réalisée successivement selon la même méthodologie pour les 3 carbapénèmes (imipénème, doripénème et méropénème), pour la ceftazidime et pour le ceftolozane et enfin pour l'association pipéracilline/tazobactam.

- Prélèvements

Après la perfusion *via* la veine marginale de l'oreille, d'une dose équivalente à une dose humaine de 500mg de doripénème par exemple (ou 1g de méropénème ou encore 1g de ceftazidime) sur 30 minutes, des prélèvements sanguins sont effectués sur l'artère médiane de l'oreille controlatérale, aux temps 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 3 et 4 heures. Chaque échantillon de sang total est placé dans un microtube type Eppendorf (Eppendorf® SARL, Le Pecq, France) de 1,5 mL contenant 5 µL d'héparine à 25000 UI/5 mL (Héparine Choay®, Sanofi-Aventis, Paris, France). Après centrifugation des échantillons sanguins à 4°C et 7500 tr/min pendant 10 minutes, le plasma est prélevé et congelé à -80°C pour son utilisation ultérieure.

- Dosages microbiologiques

La méthode de diffusion des antibiotiques en milieu gélosé est utilisée pour le dosage plasmatique des antibiotiques. Une gamme de concentrations de l'antibiotique d'intérêt réalisée en plasma de lapin, en progression géométrique de raison 2, entre 0,5 et 256 mg/L, est distribuée dans les puits d'une gélose AM2 (Antibiotique Medium)ensemencée avec la bactérie indicatrice *Bacillus subtilis*. Parallèlement à cette gamme étalon, les échantillons plasmatiques à doser sont déposés. Après incubation, la droite de régression entre le logarithme des concentrations de la gamme et les

diamètres d'inhibition correspondants est construite. Les diamètres obtenus avec les échantillons à doser sont ensuite reportés sur la droite permettant de calculer la concentration correspondante [Kitzis 2006]. Le seuil de détection est de 0,5 mg/L. Les coefficients de variation intra- et inter-expérimentation sont inférieurs à 5%.

2- Détermination de la pharmacocinétique plasmatique humanisée

L'établissement de la pharmacocinétique plasmatique humanisée des antibiotiques est réalisée à l'aide d'un système bioinformatique développé dans le laboratoire [Bugnon 1998]. La perfusion est délivrée par une pompe (Braun®), gérée par un logiciel informatique d'adaptation des vitesses de perfusion à un profil mathématique établi au préalable, afin d'obtenir les paramètres pharmacocinétiques semblables à ceux obtenus chez l'homme pour une perfusion d'antibiotique, n fois par jour : par exemple, imipénème 1g 3 fois par jour (perfusion de 30 minutes). Les paramètres pharmacocinétiques considérés sont la concentration maximale plasmatique (C_{max}), l'aire sous la courbe des concentrations en fonction du temps entre le temps 0 et l'infini (ASC), et la 1/2-vie ($t_{1/2}$).

Après détermination des pharmacocinétiques spontanées chez l'animal et en fonction des objectifs à simuler (données de la littérature concernant la pharmacocinétique humaine), le système bioinformatique est adapté. Il est ensuite validé par de nouveaux dosages microbiologiques chez des lapins recevant l'antibiotique via cette seringue électrique à vitesse variable afin de vérifier la pertinence des modalités d'administration de la molécule. Pour chaque molécule, sont ainsi mises au point des pharmacocinétiques humanisées vérifiées, à chaque fois, sur 3 animaux.

3- Suivi de la pharmacocinétique plasmatique chez les animaux traités

Dans les différents protocoles visant à mesurer l'efficacité de telle ou telle molécule, les animaux bénéficient d'un suivi des concentrations plasmatiques de l'antibiotique en question afin de s'assurer que la pharmacocinétique est réellement « humanisée » telle qu'on l'attend. Les prélèvements et les dosages microbiologiques se font selon les mêmes modalités que celles qui sont décrites ci-dessus.

H- Évaluation de l'efficacité des antibiotiques dans le modèle expérimental aigu

La solution bactérienne est instillée à H0. Les animaux sont randomisés selon différents bras de traitement. Le tableau suivant récapitule les différents bras pour chacune des 3 études.

Souche	Groupe	Nombre d'animaux	Traitement administré	Posologie simulée
Etude 1				
PAO1	Témoin	10	aucun	
PAO1	IMP 1000X3	8	imipénème	1g 3 fois par jour
PAO1	MP 1000X3	8	méropénème	1g 3 fois par jour
PAO1	DP 500X3	8	doripénème	500mg 3 fois par jour
PAO1	DP 1000X3	8	doripénème	1g 3 fois par jour
PAO1	DP 1500	8	doripénème	1500mg par jour en continu
Etude 2				
<i>δoprD</i> PAO1	Témoin	8	aucun	
<i>δoprD</i> PAO1	IMP 1000X3	8	imipénème	1g 3 fois par jour
<i>δoprD</i> PAO1	DP 500X3	8	doripénème	500mg 3 fois par jour
<i>δoprD</i> PAO1	MP 1000X3	8	méropénème	1g 3 fois par jour
Etude 3				
PAO1	Témoin	10	aucun	
PAO1	TOL 1000X3	7	ceftolozane	1g 3 fois par jour
PAO1	TOL 2000X3	7	ceftolozane	2g 3 fois par jour
PAO1	CAZ 1000X3	7	ceftazidime	2g 3 fois par jour
PAO1	TZP 4500X4	7	pipéracilline/tazobactam	4,5g 4 fois par jour
PAO1	IMP 1000X3	7	imipénème	1g 3 fois par jour

Tableau 15 : Modalités de traitement des animaux pour les études *in vivo*

L'antibiothérapie est débutée à H5 et poursuivie pendant 2 jours. Ce traitement est administré par seringue électrique dont le débit est adapté automatiquement pour simuler une pharmacocinétique humaine (comme décrit précédemment). Pour le groupe traité par antibiotiques en administration continue, le débit a été calculé de façon à perfuser la même quantité d'antibiotiques que dans le schéma discontinu (aires sous la courbe égales). Les perfusions sont stoppées 4 heures avant l'euthanasie de façon à obtenir un taux faible d'antibiotique au moment de la réalisation des prélèvements.

Plusieurs types de contrôle sont effectués. D'une part, les inocula (5 Mac Farland) sont contrôlés en dénombrement bactérien de façon à vérifier que les instillations sont bien homogènes en termes de concentrations bactériennes. D'autre part, un dosage d'antibiotique en résiduelle juste avant

l'euthanasie permet de s'assurer qu'effectivement le taux d'antibiotiques plasmatique est nul de façon à ne pas induire de biais dans les cultures microbiologiques des prélèvements pulmonaires, spléniques et les hémocultures. On évite ainsi l'effet lié au transport d'antibiotiques.

Par ailleurs, des dosages d'antibiotiques sont également réalisés de façon à s'assurer que les pharmacocinétiques réellement obtenues sont bien en accord avec celles visées. En effet, la modélisation est adaptée à partir de pharmacocinétiques humaines et animales chez des individus sains. On peut émettre l'hypothèse que l'infection modifie les paramètres pharmacocinétiques chez les animaux malades. Les résultats de ces pharmacocinétiques sont présentés.

A J2, les lapins sont euthanasiés par une injection létale de thiopental sodique (Pentothal®, Laboratoire Mayne Pharma, France). Les poumons et la rate sont prélevés, pesés puis broyés après adjonction de NaCl 9‰ (1mL). Des hémocultures sont également réalisées. Après dilution en séries, ces prélèvements sont ensemencés sur des géloses MH pour dénombrer les bactéries survivantes. Le seuil de détection de cette méthode est de 100 UFC/g de tissu pour un échantillon tissulaire pesant 10 mg. L'efficacité thérapeutique est quantifiée par la moyenne du nombre bactérien (UFC/g) et l'écart type. On évalue également l'efficacité des traitements selon la proportion d'hémocultures ou de cultures spléniques positives (données qualitatives).

I- Mutants sous traitements

La recherche d'éventuels mutants sélectionnés sous traitement, au site de l'infection, est systématique. Pour cela, on ensemence une gélose contenant l'antibiotique utilisé à la concentration équivalente à 4 fois la CMI. L'incubation dure 48 heures à 37°C.

J- Analyses statistiques

1- Efficacité des antibiotiques dans le modèle expérimental

Pour les expérimentations *in vivo*, l'efficacité des antibiotiques est évaluée dans les différents groupes en comparant les différentes charges bactériennes par ANOVA. Les groupes sont ensuite

comparés 2 à 2 en utilisant une correction de Bonferroni. Les données qualitatives sont comparées par le test exact de Fischer.

2- Comparaison de la sensibilité aux carbapénèmes

Il s'agit :

- de comparer les différences de sensibilité des souches de *Pseudomonas aeruginosa* aux trois carbapénèmes (imipénème, méropénème et doripénème),
- de savoir si la connaissance de la sensibilité à l'imipénème ou au méropénème permet de prédire la sensibilité au doripénème.

Pour la comparaison de la sensibilité, on compare, dans un premier temps, les pourcentages de souches sensibles, intermédiaires ou résistantes telles que définies au paragraphe précédent (paragraphe E, sous paragraphe 2, Tableau 14 page 58) grâce au test exact de Fischer. On propose ensuite de comparer des scores de CMI. En effet, il est difficile de comparer des CMI pour des antibiotiques donnés si les concentrations critiques sont différentes ; ce qui est le cas pour les carbapénèmes. On attribue donc un score selon la CMI : pour une souche donnée, zéro est attribué si la CMI de cette souche correspond à une souche classée intermédiaire. Un score de -1 est attribué à une souche dont la CMI serait à la limite supérieure des CMI de la catégorie sensible. Un score de -2 est attribué à la souche dont la CMI est une dilution plus basse que la précédente et ainsi de suite. A *contrario*, un score positif est attribué selon les CMI des souches résistantes (Table 2, page 125). Ces scores de CMI sont ensuite comparés de façon à réellement comparer les antibiotiques deux à deux en tenant compte des concentrations critiques différentes selon les molécules, grâce au test de Student.

La question de l'acceptabilité de la substitution du résultat de la sensibilité d'un premier antibiotique A au résultat de la sensibilité à un second antibiotique B ne requière pas à proprement parler d'analyse statistique mais impose de présenter les résultats sous forme de scattergrams [Hagihara 2012; Jones 2007] et de décrire les erreurs qu'induirait cette substitution. Ainsi, si on cherche à estimer la sensibilité de l'antibiotique B grâce aux résultats de la sensibilité à l'antibiotique A, les erreurs vraiment majeures (very major errors, ou VME) correspondent aux souches pour lesquelles on déclarerait la souche sensible (parce que sensible à A) alors qu'elles sont en fait résistantes (à B). Les erreurs majeures correspondent au contraire aux souches déclarées résistantes (parce que effectivement résistantes à A) mais qui sont en fait sensibles (à B). Enfin, les erreurs mineures

correspondent aux souches injustement classées intermédiaires alors qu'elles sont soit sensibles, soit résistantes à B.

3- Seuil de positivité retenu

Le seuil de significativité retenu est 0,05. Les données sont saisies sous EXCEL2010, Microsoft® Office, puis analysées avec Prism® 5.0, GraphPad, et SPSS® 18.0.

Pour une méthode diagnostique de sensibilité, on accepte en général la substitution si la somme du taux d'erreurs vraiment majeures et du taux d'erreurs majeures est inférieur à 3%. On exige également un taux d'erreurs mineures inférieur à 10%.

Les articles publiés (ou en cours de soumission) sont intégrés dans ce chapitre.

Aussi, afin de ne pas alourdir le propos, seuls les principaux résultats seront (re)présentés. De même, on fait le choix de proposer de se référer parfois aux tableaux et figures dans les articles plutôt que de les reproduire à l'identique.

À la fin de chaque sous-chapitre, on intègre quelques commentaires qui viennent compléter les résultats (et/ou la discussion) proposés dans les articles.

A- Modèles d'infection chronique

1- Corps étranger intra-bronchique

On utilise une solution bactérienne « standard » de PAO1 : 5 mL à $9,5 \log_{10}$ UFC/mL qui sont instillés au travers le dispositif qui a permis la mise en place du matériel.

Plusieurs tentatives (n=5) sont réalisées avec différents corps étrangers : COMBICATH[®], morceau de cathéter artériel. Toutes s'avèrent non concluantes. La tolérance est bonne (pas de décès) mais le matériel est systématiquement expulsé (sauf chez un animal !) et non retrouvé à l'examen post-mortem. Pour cette raison, cette voie est abandonnée.

2- Modèle avec microbilles

- Fabrication des microbilles

Après quelques ajustements (1 essai infructueux puis 3 manipulations concluantes), le mode opératoire est au point. On produit des microbilles dont l'aspect en microscopie optique est tout à fait satisfaisant : billes sphériques, bactéries mobiles, manifestement viables. L'ensemencement permet de valider que la concentration obtenue (en moyenne $7,5 \log_{10}$ UFC/mL) est compatible avec la suite du projet. En revanche, le temps de préparation de la solution est relativement long (4 heures).

On valide qu'effectivement, comme précisé dans l'article princeps [**van Heckeren and Schluchter 2002**], les billes peuvent être préparée à l'avance : après 24 heures à 4°C, elles ont gardé leur aspect sphérique. La perte de quelques bactéries ($-0,5 \log_{10}$) reste compatible avec une préparation différée.

- Modèle murin

La souche utilisée est PAO1.

L'inoculum bactérien est de $7,3 \log_{10}$ UFC/mL pour la solution avec microbilles et de 7 pour les témoins. Ceci constitue, pour les témoins, un inoculum faible par rapport à ce qu'on propose habituellement dans le modèle murin de pneumonie aiguë où l'inoculum est généralement aux alentours de 10^9 bactéries par mL.

Chez les témoins (n=5), on constate que la souche de PAO1 a permis chez la souris le développement d'une pneumonie telle qu'attendue (lésions macroscopiques et anatomo-pathologiques). Les charges bactériennes peuvent paraître basses mais l'inoculum était également bas.

En revanche, les charges bactériennes pour les animaux infectés avec la solution « microbilles + bactéries » (n=10) sont beaucoup plus élevées dès J2 et sont stables dans le temps jusqu'à 7 jours (Figure 9).

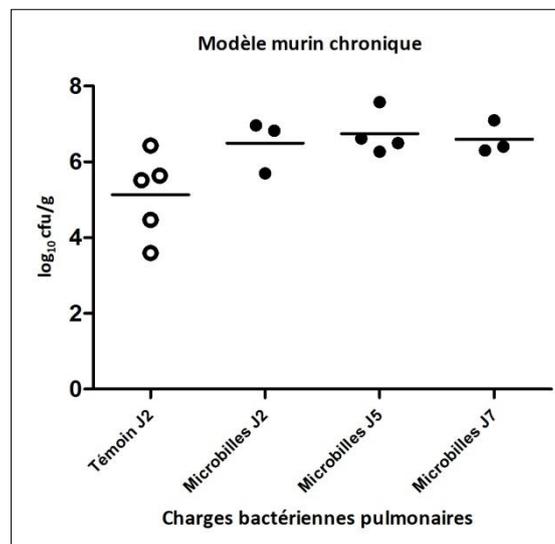


Figure 9 : Charges bactériennes pulmonaires obtenues dans le modèle murin de pneumonie chronique

Ces résultats confirment :

- que le développement d'une infection pulmonaire est possible chez la souris à partir de l'inoculum avec microbilles,

- que celles-ci permettent une prolifération bactérienne plus importante et durable dans le temps par rapport à des infections aiguës réalisées avec des solutions bactériennes standard sans microbilles. Ceci est vraisemblablement dû à la protection vis-à-vis de la réponse immunitaire qu'offrent les microbilles aux bactéries [van Heeckeren and Schluchter 2002].

Ils conduisent à proposer de créer le même type d'infection chez le lapin.

- Modèle d'infection chronique chez le lapin

Cinq séries sont réalisées. Ainsi, au total, 35 animaux sont utilisés pour la mise au point de ce modèle.

L'inoculum moyen est de 6,7 log₁₀ UFC/mL.

Les résultats peuvent être résumés ainsi :

- décès entre J1 et J4 : n=14,
- décès à l'induction : n=2,
- animaux pour lesquels des données de charges bactériennes sont exploitables : n=11,
- animaux dont les cultures s'avèrent négatives : n=7,
- animal manifestement non infecté (*instillation œsophagienne très probable*) : n=1.

Les charges bactériennes pulmonaires sont présentées dans la [Figure 9](#) et le détail des manipulations est fourni dans le [Tableau 16](#).

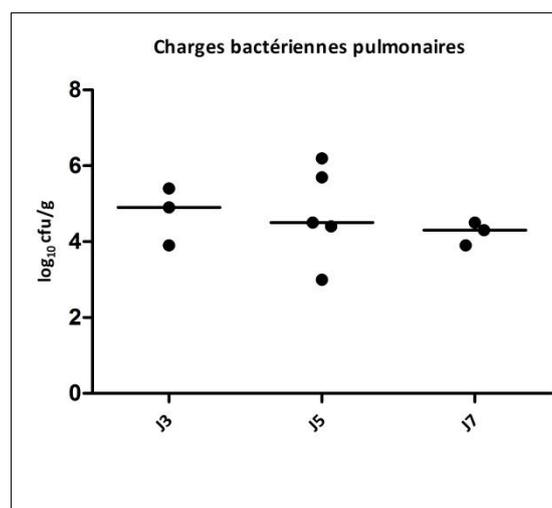


Figure 10 : Charges bactériennes pulmonaires obtenues dans le modèle de pneumonie chronique chez le lapin

	Induction	H24	H48	H72	H96	H120	H144	H168
	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	
Série 1 n=3 inoculum: 6,5 log ₁₀ UFC/mL	décès/induction n=1					5,7 [5,4 - 6,9] 4,4 [3,6 - 5,2]		
Série 2 n=6 inoculum: 7,0 log ₁₀ UFC/mL		décès/H24 n=1	décès/J3 n=1			cultures négatives 4,5 [4,3 - 4,7]		cult. négatives 3,6 [2,9 - 4,3]
Série 3 n=7 inoculum: 7,3 log ₁₀ UFC/mL	décès/H12 n=1	Signes d'infection aiguë +++	décès/ H48 n=5	1 animal non infecté				
Série 4 n=7 inoculum: 7,0 log ₁₀ UFC/mL		Signes d'infection aiguë +++	décès/H48 n=2			cultures négatives 3,0 [2,1 - 4,4] 6,2 [5,1 - 8,1]		4,3 [2,3 - 5,9] 4,5 [2,4 - 8,2]
Série 5 n=12 inoculum: 5,7 log ₁₀ UFC/mL	décès/induction n=1		décès/H36 n=2	cultures négatives 3,9 [3,2 - 4,7] 4,9 [2,6 - 6,5] 5,4 [3,3 - 6,3]	Décès /J4 n=1	cultures négatives cultures négatives cultures négatives cultures négatives		

Tableau 16 : Détails des résultats de la mise au point du modèle de pneumonie chronique chez le lapin (microbilles)

Au total, pour ce modèle d'infection pulmonaire chez le lapin, on retient que les infections sont sévères. La mortalité - exclusion faite des animaux décédés à l'induction (n=2) - est ainsi de 14/33 soit plus de 40%. L'examen macroscopique confirme la sévérité des lésions pulmonaires : abcès fréquents, formes parfois même pseudo-tumorales...

En outre, malgré ces signes d'infection aiguë, les charges bactériennes pulmonaires obtenues sont décevantes car aux alentours de $4,5 \log_{10}$ UFC/g (Figure 10).

Enfin, le taux de « guérison spontanée » est lui aussi beaucoup trop élevé pour que ce modèle puisse être utilisé : pour 7 animaux, les cultures se sont avérées négatives alors que l'inoculation semblait correcte mais surtout que les animaux avaient présentés des signes d'infections et que l'examen de leurs poumons confirmait la présence de lésions pulmonaires. On peut ainsi estimer le taux de clairance spontanée à 7/18, soit 40% des animaux survivants...

Ce modèle ne peut donc pas être retenu comme modèle expérimental fiable. Pour des raisons éthiques et financières, il est abandonné.

B- Modèle d'infection aiguë

C'est dans le modèle d'infection aiguë qu'on évalue l'efficacité de 2 nouveaux antibiotiques : le doripénème puis le ceftolozane. Pour le premier, deux souches isogéniques de PAO1 sont testées (études n°1 & 2) contre seulement la souche sensible pour le second (étude n°3). Les différents bras de traitement ont été présentés dans le [Tableau 15](#).

1- Données d'efficacité *in vivo*

- Étude n°1 : doripénème *versus* imipénème et méropénème + comparaison de différentes modalités d'administration du doripénème

Résultats

Cette étude a permis d'évaluer l'efficacité des différents traitements (5 bras) chez 10 témoins et 40 lapins traités (8 par bras) sur PAO1, souche sensible *in vitro* aux trois molécules.

La mortalité est de 20% chez les témoins telle qu'attendue pour ce modèle. Il n'y a aucun décès parmi les animaux traités.

L'efficacité est globalement très satisfaisante puisqu'en 48 heures de traitement, les charges bactériennes pulmonaires sous traitement sont très nettement diminuées ($3,2 \pm 0,8 \log_{10}$ UFC/g) par rapport aux animaux contrôles ($7,6 \pm 1,0 \log_{10}$ UFC/g).

Le doripénème à la posologie de 500 mg trois fois par jour fait aussi bien que les comparateurs, imipénème ou méropénème (tous 2 à la posologie de 1 g toutes les 8 heures) en termes de charges bactériennes pulmonaires ([Figure S5 page 86](#)). En revanche, les rates sont moins souvent stériles dans le bras doripénème (2 rates stériles¹ sur 8) que pour l'imipénème (7 rates stériles) ou le méropénème (4 rates stériles). ([Table 2 page 79](#))

Une posologie plus élevée de doripénème permet une réduction de la charge pulmonaire plus nette encore : $2,7 \pm 0,7 \log_{10}$ UFC/g pour le bras 1 g contre $3,4 \pm 0,6 \log_{10}$ UFC/g pour le bras 500 mg. Cette

¹ ce qui correspond au niveau des animaux du groupe contrôle pour lesquels, chez les survivants, à 48 heures de l'induction, 6 rates sont positives et 2 stériles.

différence n'atteint pas la significativité mais s'en approche ([Figure S6 page 86](#)). Les cultures de rates sont toutes stériles avec le traitement à plus forte posologie ce qui est statistiquement significatif ([Table 3 page 79](#)).

L'administration du doripénème en continu (équivalent de 1500 mg/j) n'apporte rien : charges bactériennes pulmonaires plus élevées qu'en discontinu ($3,9 \pm 0,8 \log_{10}$ UFC/g), rates très souvent positives (1 seule stérile pour 7 positives) et même hémocultures positives (n=3) alors qu'aucune hémoculture ne s'avère positive pour aucun autre groupe traité.

Commentaires

Il est intéressant de noter que les résultats plaident en faveur d'une posologie plus élevée pour traiter une infection pulmonaire que celle initialement proposée dans les études de phase III tant dans les infections intra-abdominales [**Lucasti 2008**] que les pneumonies [**Chastre 2008; Rea-Neto 2008**].

Les pages suivantes ([77-88](#)) présentent l'article original tel qu'il est paru en 2010 dans le **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** ainsi que les données supplémentaires accessibles en ligne.

ARTICLE1 + supplément online (5+7=12 pages)

PAGE 1

SUP PAGE 1

SUP PAGE 2

SUP PAGE 3

SUP PAGE 4

SUP PAGE 5

SUP PAGE 6

SUP PAGE 7

• Étude n°2 : doripénème *versus* imipénème et méropénème

Résultats

Cette étude permet d'évaluer l'efficacité des différents traitements (5 bras initialement prévus) chez 8 témoins et 32 lapins traités (8 par bras) sur $\Delta OprD$ PAO1, souche isogénique de PAO1 mutée au niveau de sa porine D2. Cette dernière n'est plus exprimée au niveau de la membrane externe de PAO1 ce qui confère à la bactérie une résistance à l'imipénème. Ainsi, les CMI pour l'imipénème, le méropénème et le doripénème sont respectivement 16 mg/L (R), 8 mg/L (I) et 1 mg/L (S).

Les données publiées ne rapportent que les bras de traitement « conventionnels » : imipénème (1gX3/j), doripénème (1gX3/j), méropénème (1gX3/j). Un quatrième bras était initialement prévu pour évaluer l'efficacité du traitement par doripénème IVSE. Selon les résultats du traitement par doripénème à posologie « basses », on envisageait également un bras à plus forte posologie (1gX3/j) comme nous l'avons fait pour l'étude précédente. Cependant, les résultats étant tout à fait bons avec la posologie minimale administrée en discontinu, le groupe IVSE n'a pas été complété. Nous présentons cependant les résultats des 4 animaux de ce bras.

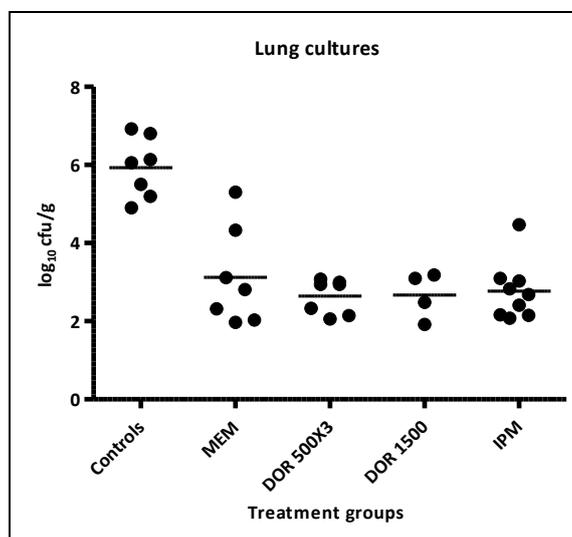


Figure 11 : Charges bactériennes pulmonaires obtenues selon les différents bras de traitement (d'après étude n°2)

L'analyse de variance montre une différence entre les 5 bras.

L'analyse *post-hoc* selon Bonferroni montre que tous les groupes traités sont statistiquement différents du groupe contrôle ($p < 10^{-4}$) sans montrer aucune différence entre les différents bras de traitement pris deux à deux.

Les proportions de cultures spléniques stériles (ou non) sous traitement ne sont pas différentes statistiquement parlant. À noter cependant, que dans le groupe doripénème en continu les rates des 4 animaux s'avèrent stériles. Les hémocultures ne sont pas réalisées dans cette étude.

Commentaires

Il est intéressant de noter que la corrélation entre la CMI et l'efficacité sous traitement n'est pas parfaite. De telles discordances ont déjà été constatées [**Boutoille 2009b**]. Nos résultats illustrent toute la difficulté qu'il y a à décider des concentrations critiques [**Mouton 2012**]...

On note que les charges bactériennes sont sensiblement plus basses avec cette souche mutée ($5,9 \pm 0,8 \log_{10}$ UFC/g) qu'avec la souche isogénique PAO1 non mutée utilisée pour l'étude 1 ($7,6 \pm 1,0 \log_{10}$ UFC/g). Certains auteurs avancent qu'un avantage pour la bactérie en termes de résistance pourrait être au contraire délétère car associée à une perte de « fitness ». En d'autres termes, une plus grande résistance serait associée à une moindre virulence, expliquant un moindre développement de la pneumonie avec la souche résistante...On sait que les choses sont en fait beaucoup plus complexes [**Abdelraouf 2011; Boutoille 2009b; Cannon 2014**].

Les pages suivantes (91-92) présentent l'article (research letter) tel qu'il est paru dans le **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** en 2012.

ARTICLE2 (2 pages)

PAGE 1

Résultats

Cette étude permet d'évaluer l'efficacité des différents traitements (5 groupes traités et un groupe contrôle) chez 12 témoins et 35 lapins traités (7 par bras) sur PAO1, souche sensible *in vitro* aux 4 antibiotiques dans le modèle de pneumonie expérimentale aiguë chez le lapin.

Quatre animaux sont morts : deux dans le groupe témoin et un dans chacun des groupes ceftazidime et pipéracilline/tazobactam. Un animal du groupe imipénème n'a finalement pas reçu le traitement de façon conforme au protocole (panne de seringue électrique). Au final, l'efficacité est évaluée sur 10 témoins, 7 animaux dans chacun des 2 groupes ceftolozane (1 ou 2 g toutes les 8 heures) et 6 animaux dans chacun des groupes ceftazidime, pipéracilline/tazobactam et imipénème.

La réduction des charges pulmonaires est relativement faible dans le groupe pipéracilline/tazobactam (différence non significative avec le groupe témoin).

En revanche, par rapport au groupe témoin, elle est d'environ $1,5 \log_{10}$ UFC/g pour les groupes ceftolozane 1g et ceftazidime et d'environ $2,5 \log_{10}$ UFC/g pour les groupes ceftolozane 2g et imipénème (Table 2 page 98).

Il est intéressant de souligner l'influence du nombre de groupes sur l'analyse statistique post-hoc selon Bonferroni. Le principe de cette analyse consiste à ne conclure à la significativité de la différence entre 2 groupes que si cette différence est importante et surtout d'autant plus importante que le nombre de groupes est grand. Ainsi, si le nombre de groupes se multiplie, il y a un risque que le test de Bonferroni « rate » une différence qui pourtant existe. C'est ce qui se passe ici. L'impression visuelle (Figure S6) est qu'il existe effectivement une différence entre les groupes ceftolozane 1g et 2g. Si on supprime le groupe pipéracilline/tazobactam (au motif d'une trop importante hétérogénéité par exemple), la Figure S6 (page 105) « devient » la figure suivante (Figure 12).

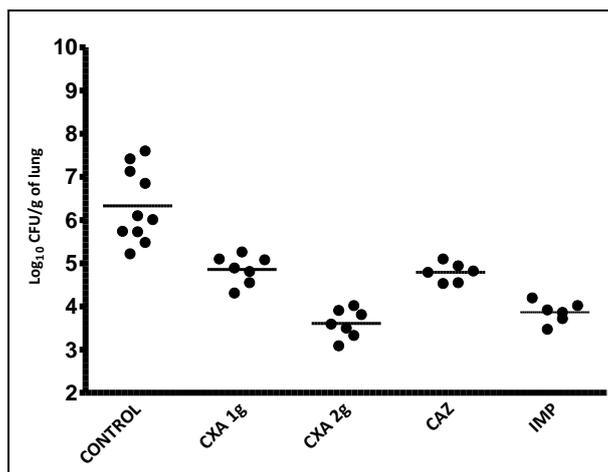


Figure 12 : Charges bactériennes pulmonaires obtenues selon les différents bras de traitement (variation d'après l'étude n°3)

L'analyse de variance montre une différence entre les 5 bras. L'analyse post-hoc selon Bonferroni montre que tous les groupes traités sont statistiquement différents du groupe contrôle ($p < 10^{-4}$). Le groupe CXA 1g n'est pas différent de CAZ mais significativement différent (comme le groupe CAZ) de CXA 2g et IMP. Ces deux derniers groupes ne sont pas statistiquement différents. Ceci peut se résumer de façon un peu triviale (mais proche de l'impression visuelle initiale !) :

Contrôles \ll CAZ ou CXA 1g \ll IMP ou CXA 2 g.

Les rates sont plus souvent positives en fin de traitement chez les témoins et dans le groupe pipéracilline/tazobactam sans pour autant que cette apparente différence avec les autres groupes n'atteigne la significativité. Les hémocultures sont rarement positives.

Commentaires

Une question se pose naturellement après avoir exposé les limites de la comparaison des groupes selon Bonferroni... Pourquoi utiliser ce test ? Voire même pourquoi utiliser une ANOVA ?

Plusieurs éléments de réponse...

L'utilisation d'une analyse de variance sous-entend plusieurs conditions. La première est la normalité de la distribution des variables étudiées. Des tests validant que cette distribution est gaussienne, existent. Il n'est toutefois pas forcément pertinent de les utiliser sur de petits échantillons. On s'en tient à l'hypothèse que les charges bactériennes varient, selon les animaux, vraisemblablement selon

une loi normale ; ce d'autant qu'on transforme les valeurs en leur logarithme et que cette transformation augmente la probabilité de distribution gaussienne. La deuxième condition nécessaire à l'utilisation d'une ANOVA, est d'avoir des variances égales (en tout cas non statistiquement différentes !). C'est cette hypothèse d'égalité de variance qu'explore le test de Bartlett. Toutefois, il est possible que les résultats soient en faveur de variances inégales ($p < 0,05$) mais que cela soit dû « au hasard » (lié à l'échantillon). Si on a la conviction (ou mieux des données antérieures qui le prouvent !) que les variances sont égales, on peut passer outre un test de Bartlett positif.

Des alternatives¹ existent au test *post-hoc* de Bonferroni : le test de Tukey par exemple. Des alternatives existent aussi à l'ANOVA : les tests non paramétriques tels que celui de Kruskal-Wallis avec un test *post-hoc* de Dunn...

Ces tests sont sans doute préférables du point de vue « rigueur statistique » mais l'utilisation d'une ANOVA et d'un Bonferroni (avec prudence) sont acceptables. En outre, il est plus facile de présenter des résultats tels qu'ils sont habituellement (précédemment) publiés...

Quoiqu'il en soit, le ceftolozane apparaît comme un traitement efficace contre *Pseudomonas aeruginosa*. L'efficacité de la molécule est discutée dans le chapitre Discussion (page 140).

Les pages suivantes (96-105) présentent l'article original tel qu'il a été récemment accepté pour publication dans **International Journal of Antimicrobial Agents** ainsi que les données supplémentaires accessibles en ligne.

¹ http://www.graphpad.com/guides/prism/6/statistics/index.htm?stat_comparing_three_or_more_groups.htm

ARTICLE3 (4+6= 10 pages)

PAGE 1

SUP PAGE 1

SUP PAGE 2

SUP PAGE 3

SUP PAGE 4

SUP PAGE 5

SUP PAGE 6

2- Mutants résistants

Résultats

Pour les trois études, la recherche de mutants potentiellement sélectionnés sous traitement est systématique. On ne met en évidence de telle sélection pour aucun des régimes thérapeutiques utilisés (carbapénèmes, céphalosporines ou uréidopénicilline).

Commentaires

Il peut sembler superflu de rechercher des mutants résistants pour des traitements qui sont courts, manifestement actifs rapidement (décroissance de $3 \log_{10}$ UFC/g en 48h). En outre, les bêtalactamines ne sont sans doute pas les molécules les plus susceptibles de sélectionner des bactéries résistantes par rapport aux fluoroquinolones par exemple. Cette donnée est habituellement donnée dans les modèles expérimentaux. Parmi les dernières molécules développées récemment, dans un domaine autre qu'est celui des bactéries à Gram positif, la daptomycine par exemple, surtout pour des posologies basses, peut très vite sélectionner des bactéries résistantes **[Jacqueline 2003; Lefebvre 2010]**.

Bien sûr, lorsqu'on ne recherche sous traitement des bactéries résistantes qu'au site de l'infection (broyats pulmonaires dans nos travaux), on n'envisage qu'une (toute petite) partie du problème. Nous n'avons pas exploré l'apparition sous traitement de bactéries résistantes dans les selles des animaux par exemple. On sait, pour l'imipénème par exemple, qu'une seule dose de traitement par cette molécule augmente statistiquement le risque d'isoler des bactéries résistantes dans les selles des patients **[Armand-Lefevre 2013]**.

3- Pharmacocinétiques

- Étude n°1 : doripénème *versus* imipénème et méropénème + comparaison de différentes modalités d'administration du doripénème

Résultats

Dans cette étude, différents dosages plasmatiques sont réalisés à des temps différents par rapport au début des injections. Ainsi, on dispose pour chacun des 3 bras de traitement (doripénème 500mg, imipénème et méropénème), d'une vingtaine de dosages (précisément, respectivement 24, 20 et 21) ; chaque animal étant prélevé (cathéter artériel auriculaire) aléatoirement dans le temps entre 2 et 3 fois en moyenne.

Ces prélèvements permettent de réaliser les dosages d'antibiotiques selon la méthode microbiologique prévue [Kitzis 2006]. Les corrélations des gammes étalons sont vérifiées à chaque manipulation avec une linéarité reproductible. À chaque fois, la linéarité est quasi-parfaite ($R^2 \geq 0,98$). À titre d'illustration, la Figure 12, montre une gamme étalon pour le méropénème.

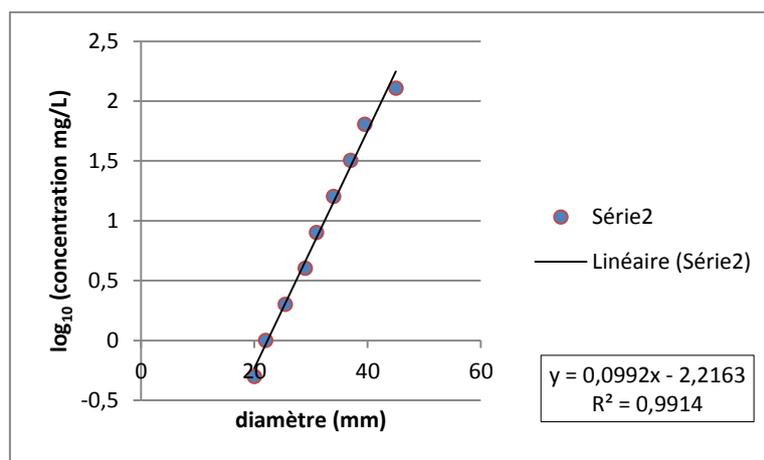


Figure 13 : Exemple de gamme étalon pour le dosage microbiologique du méropénème

À partir de cette gamme étalon, les dosages sont déduits du diamètre d'inhibition de pousse de *Bacillus subtilis* exprimé en millimètres selon la formule suivante.

$$\text{On sait que : } \log_{10}(\text{concentration en mg/L})_{\text{gamme}} = 0,099 * (\text{diamètre en mm}) - 2,216$$
$$\text{d'où : concentration (mg/L)} = 10^{(0,099 * (\text{diamètre en mm}) - 2,216)}$$

On dispose d'un nombre conséquent de dosages d'antibiotiques. Ces points permettent de réaliser les courbes de concentration plasmatique en fonction du temps puisqu'ils correspondent à des temps différents : entre 30 minutes (C_{\max}) et 4 heures après le début de l'injection (Figures S1 à S4 pages 82-85). À partir de ces données, sont calculées les corrélations « idéales » décrivant le devenir du médicament en fonction du temps.

Les corrélations sont correctes pour les bras imipénème, méropénème et doripénème : R^2 respectivement à 0,886, 0,841 et 0,878. Toutefois, pour le groupe doripénème 1 g, on dispose d'un nombre beaucoup moins important de points rendant l'équation reliant concentration et temps beaucoup moins fiable ($R^2=0,676$) (Figure S4 page 85).

Tous les traitements sont administrés sur 30 minutes. À partir des dosages réellement réalisés au pic, on dispose de la concentration maximale (C_{max}). Les paramètres demi-vie ($t_{1/2}$), aire sous la courbe (ASC) sont estimés à partir de la relation concentration-temps présentée plus haut. Les paramètres PK-PD, temps passé au-dessus de la CMI ($T_{>CMI}$), rapport aire sous la courbe et CMI (ASC/CMI), sont calculés à partir de la CMI de PAO1.

Ces paramètres PK-PD sont différents entre les groupes notamment en termes d'ASC/CMI. Toutefois, les $T_{>CMI}$ sont assez proches (Table 1 page 78). Ces données sont cohérentes avec celles visées (pharmacocinétiques humanisées prévues); elles-mêmes étant cohérentes avec les données humaines [Jaruratanasirikul 2005; Zhanel 2007].

Toutefois, aucun de ces paramètres ne permet « d'expliquer » la réponse microbiologique observée.

Commentaires

L'étude pharmacocinétique des différentes modalités d'administration du doripénème doit être analysée avec précaution. On rappelle en effet que le nombre de dosages pour le groupe doripénème 1g est deux fois moindre par rapport aux autres groupes. On note que les concentrations plasmatiques maximales (C_{max}) de doripénème sont de 52 mg/L dans le groupe doripénème 500mg et de 73 mg/L dans le bras 1 g. Il existe cependant une variabilité importante dont témoignent des écart-types respectivement de 11 et 8 mg/L. A noter aussi des concentrations beaucoup plus basses dans le dernier groupe (13 ± 3 mg/L) ce qui est cohérent avec le mode d'administration continue dans ce groupe (Table 1 page 78).

• Étude n°2 : doripénème *versus* imipénème et méropénème (souche $\Delta OprD$ PAO1)

Résultats

Les données pharmacocinétiques pour cette étude montrent des C_{max} et des $t_{1/2}$ qui sont dans les intervalles attendus. On note des différences importantes en terme de $T_{>CMI}$ ce qui semble logique compte tenu des différences de CMI pour la souche $\Delta OprD$ PAO1 (Table 1 page 92). Néanmoins, avec des doses de 1g trois fois par jour, $T_{>CMI}$ pour l'imipénème est supérieur à 40% ce qui peut peut-être expliquer l'efficacité du traitement sur une souche qualifiée *in vitro* de résistante.

Commentaires

Les échanges avec l'éditeur (Pr D. Honeybourne, Birmingham, UK) et les reviewers au sujet de l'article donnent lieu à des investigations complémentaires. Un de reviewers pose en effet la question de la fraction libre des antibiotiques, suggérant qu'il puisse y avoir dans la fixation aux protéines différente selon les molécules, une explication aux résultats présentés.

À partir des échantillons congelés de plasma, nos collègues pharmacologues (Pr E. Dailly) réalisent les dosages des 3 carbapénèmes en HPLC (High Performance Liquid Chromatography) [Dailly 2011] : après déprotéination du plasma (acéto-nitrile), les pénèmes sont séparés sur une colonne pentafluorophényl (PFP) avec un gradient binaire d'élution. L'absorbance est mesurée à 295 nm. Sont utilisés ensuite les mêmes paramètres chromatographiques pour le plasma filtré selon une technique validée pour l'ertapénème [Musson 2003]. En bref, il s'agit de faire passer l'échantillon de plasma au travers d'un dispositif multipore (Centrifree Centrifugal Filter Device ; Millipore™, USA) par centrifugation (1500G pendant 15 minutes). Cinquante microlitres du produit de filtration (sans protéine car celles-ci ont été bloquées dans le filtre) sont techniqués par HPLC. Le ratio de concentrations permet de calculer le pourcentage d'antibiotique en fraction libre.

Les résultats sont intéressants. D'une part, les dosages en HPLC sont très proches des dosages microbiologiques (différences inférieures à 10%) confirmant que la technique microbiologique est une technique de dosage robuste pour les dosages de pénèmes. D'autre part, on observe des différences de fixation qui vont dans le même sens chez l'homme et chez l'animal : l'imipénème est plus lié aux protéines que le doripénème qui est lui-même plus lié que le méropénème. Puisque l'imipénème est moins « libre » que les 2 autres molécules, nous concluons que ce n'est pas ce biais qui explique nos résultats et notamment l'efficacité « inattendue » de cette molécule sur une souche résistante *in vitro*.

Le pourcentage des formes libres est cependant plus bas chez le lapin qu'attendu chez l'homme. On évoque plusieurs explications. Tout d'abord la technique de mesure utilisée est validée pour l'ertapénème et non pour les autres pénèmes. En outre, ces mesures sont réalisées sur des échantillons qui ont été stockés plusieurs semaines au congélateur (-80°C) ce qui a peut-être altéré les protéines elles-mêmes ou les liaisons antibiotiques-protéines.

• Étude n°3 : ceftolozane *versus* ceftazidime, pipéracilline/tazobactam imipénème

Résultats

L'analyse pharmacocinétique de cette étude repose sur les mêmes principes que les précédentes : dosages itératifs chez les animaux traités, calcul de la relation concentration-temps avec présentation de la corrélation (R^2) puis estimation des paramètres PK-PD.

On retient que pour cette étude, les nombres de points pour chaque antibiotique est plus important que dans les études précédentes ce qui explique des corrélations qui sont très bonnes ($R^2 \geq 0,90$).

Pour autant, aucun de ces paramètres ne permet d'expliquer les différences entre les différences d'efficacité observées. On note que le temps passé au-dessus de la CMI, $T_{>CMI}$, paramètre souvent cité comme prédictif de l'efficacité, est de 100% pour toutes les molécules alors qu'on aurait pu attendre des différences compte-tenu des charges bactériennes observées. Il faut cependant rappeler, comme nous l'avons d'ailleurs rappelé dans l'article que l'étude est construite pour montrer des différences en termes d'efficacité et non en termes de PK-PD.

Commentaires

Les résultats sont décevants pour la pipéracilline. Ils sont pourtant cohérents avec des résultats précédents [Boutoille 2009b]. Les posologies utilisées sont ici plutôt élevées¹. La pipéracilline serait-elle un moins bon traitement anti-pseudomonas que les pénèmes ou les céphalosporines ? Il n'est pas possible de répondre. En effet, il y a peut-être un « effet souche » sur PAO1 et ses « sœurs » isogéniques. En outre, il est difficile de reproduire dans un modèle la pharmacocinétique d'une association d'antibiotiques. On sait que chez l'homme que la pipéracilline et le tazobactam n'ont pas exactement le même devenir (demi-vie, distribution...) et il n'est pas sûr que ce qui se passe chez

¹ Quatre fois 4,5g/j, là où parfois seules 3 injections sont utilisées.

l'homme se passe aussi chez le lapin ! Il convient donc d'être prudent pour l'interprétation de ces « mauvais » résultats avec l'association pipéracilline/tazobactam. La question est néanmoins intéressante car les inhibiteurs de bêta-lactamases connaissent un développement important. La question des caractéristiques PK-PD de ces inhibiteurs est donc cruciale. La connaissance d'éventuels effets post-antibiotique [Lavigne 2004; Sader 2014c], de possibles impacts d'une des molécules sur l'élimination de l'autre [Komuro 1994] sont autant de phénomènes à prendre en compte tant pour les modèles expérimentaux qu'en clinique.

L'efficacité du ceftolozane est intéressante car la molécule a été mise « dans des conditions difficiles » notamment vis-à-vis de la ceftazidime et de l'association pipéracilline/tazobactam utilisés à posologies élevées. Il est intéressant de noter qu'alors que les paramètres PK-PD cibles sont (largement) atteints¹, l'efficacité augmente si les posologies sont augmentées. Il est impossible de préciser à partir de nos résultats si l'efficacité est mieux prédite par un autre paramètre (ASC_{0-24}/CMI ?) ou si l'objectif à atteindre est plutôt un pourcentage de temps supérieur à un multiple de la CMI (4, 6, 10 fois la CMI ?) comme cela a été proposé par certains auteurs [Manduru 1997; Vogelmann 1988]. On peut aussi envisager, même si cela paraît moins probable, un effet concentration-dépendant de la molécule...

¹ Le $T_{>CMI}$ cible habituellement considéré pour les céphalosporines est de 70%.
Drusano, G. L. (2004a). "Antimicrobial pharmacodynamics: critical interactions of 'bug and drug'." Nature reviews. Microbiology 2(4): 289-300.

C- Comparaison de la sensibilité aux carbapénèmes

Résultats

Cette étude compare la susceptibilité aux trois carbapénèmes d'une série de *Pseudomonas aeruginosa* isolés de prélèvements pulmonaires (n=139). La moitié de ces souches provient de patients porteurs d'une mucoviscidose. Les doublons (même souche provenant du même patient) sont éliminés.

Les souches cliniques sont statistiquement plus sensibles au méropénème qu'aux 2 autres antibiotiques : tant en comparant les pourcentages dans les catégories sensible ([Figure 1 page 127](#)), intermédiaire et résistante qu'en appliquant le score de CMI tel que décrit dans la partie Matériel et Méthodes. Cela étant, les écarts sont inférieurs à une dilution. Du point de vue du clinicien, la pertinence de ces écarts est faible.

Il existe une bonne corrélation entre le caractère sensible, intermédiaire ou résistant des 3 pénèmes. ([Figures 2 et 3 pages 128-129](#)).

Cependant, aucun des deux carbapénèmes habituellement testés dans les laboratoires, imipénème ou doripénème, ne peut servir de façon parfaite de substitut pour prédire la sensibilité au doripénème. Le profil de sensibilité de ce dernier se rapproche plus de la sensibilité à l'imipénème sans pour autant en faire un marqueur fiable (taux d'erreurs mineures supérieur à 10%) ([Table 3 page 130](#)).

Commentaires

Avant de proposer le score de CMI, nous avons cherché dans la littérature une évaluation de ce type sans succès. Nous pensons que ce nouvel outil peut être utile car il semble « parler » aux cliniciens auxquels nous l'avons présenté !

Les pages suivantes ([113-130](#)) présentent l'article original tel qu'il a été récemment soumis pour publication dans le **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**.

1 **Are all penems equal when treating pseudomonal infections?**

2 **Comparison of the susceptibility of 139 *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains to doripenem,**
3 **meropenem and imipenem**

4

5

6 Cédric Bretonnière^{1,2*},

7 Adeline Maitte¹,

8 Jocelyne Caillon¹,

9 Christophe Guitton²,

10 Gilles Potel¹,

11 David Boutoille¹,

12 Cédric Jacqueline¹.

13

14

15 ¹ *Université de Nantes, Faculté de Médecine, UPRES EA 3826, 1 rue Gaston Veil Nantes, F-44035*
16 *France*

17 ² *CHU Nantes, Pôle Anesthésie-Réanimations, Service de Réanimation Médicale Polyvalente, place A.*
18 *Ricordeau, Nantes, F-44000 France*

19

20 **Running title:** Comparison of penems for pseudomonal infections

21

22 **Keywords:** MIC, pneumonia, susceptibility testing

23

24 ***Corresponding author:**

25 ○ Mailing address: UPRES EA 3826, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, 44035
26 Nantes, France

27 ○ Tel: +33-2-40087369

28 ○ Fax: +33-2-40412854

29 ○ E-mail : cedric.bretonniere@chu-nantes.fr

30

31 **Synopsis**

32 **Objectives:** This study aimed to compare the susceptibility to carbapenems (imipenem, meropenem
33 and doripenem) of clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. It also studied whether susceptibility
34 to imipenem or meropenem could predict, reliably, susceptibility to doripenem.

35 **Methods:** Pseudomonal strains were collected from respiratory specimens, half of them from cystic
36 fibrosis patients. MICs were determined according to EUCAST recommendations. Carbapenems were
37 compared according to the susceptible, intermediate or resistant categories. A new approach also
38 allowed comparing these carbapenems in a “MIC score” taking into account the differences in
39 breakpoints between drugs.

40 **Results:** One hundred thirty nine strains were studied. They were found to be statistically more
41 susceptible to meropenem than to the two other drugs. However, this difference was small: less than
42 one dilution between the molecules. This study also highlighted a significant correlation between
43 susceptibility to penems taken in pairs. However, susceptibility to imipenem or meropenem did not
44 reliably predict susceptibility to doripenem.

45 **Conclusion:** Despite potential differences in resistance mechanisms, the *Pseudomonas aeruginosa*
46 strains showed close susceptibility to 3 carbapenems. This was true for both cystic fibrosis patients
47 and others. However, there were variations between strains. That justifies MICs to be determined for
48 each of the three penems. This might be useful in case of elevated MICs and / or for potentially
49 difficult to treat infections such as pneumonia in patients with cystic fibrosis patients.

50

51 **Introduction**

52 Pseudomonal infections are common, especially in specific populations such as in intensive care (ICU)
53 patients or cystic fibrosis (CF) patients.¹⁻⁴ As with other species, physicians treating *Pseudomonas*
54 *aeruginosa* are facing an increase in resistant strains.^{5, 6} This is concerning as there are relatively few
55 treatment options.^{3, 4, 7} The carbapenems are a class of antibiotics which are currently very active
56 against these strains.

57 Doripenem is the newest penem.⁸ Some studies have compared the different penems, however they
58 are relatively few.^{7, 9, 10} In addition, none of them really takes into account differences in breakpoints
59 between molecules.¹¹ We therefore sought to compare imipenem, meropenem and doripenem while
60 taking account of these specific breakpoints thanks to a simple and original method. In addition,
61 doripenem is not routinely tested in laboratories for strains of *Pseudomonas*.¹² It seemed useful to
62 test the hypothesis that the results of the susceptibility of a given strain to imipenem or meropenem
63 may predict susceptibility to doripenem.

64

65 **Material and methods**

66 Bacterial strains

67 One hundred and thirty nine strains of *Pseudomonas aeruginosa* were studied. These bacteria were
68 isolated from various respiratory specimens from different patients admitted to the University
69 Hospital of Nantes. This is a 3000 bedded University Hospital providing care for a population of one
70 million inhabitants. After exclusion of duplicate and redundant samples, over a six month period,
71 sixty seven consecutive strains from patients with CF were analysed. Seventy two strains from non-
72 CF patients were also studied at the same time.

73

74 Antimicrobial drugs

75 The tested antibiotics were imipenem/cilastatin (Merck Sharp & Dohme-Chibret, Paris, France),
76 meropenem (AstraZeneca, Rueil-Malmaison, France) and doripenem (Janssen-Cilag, Issy-les-
77 Moulineaux, France). Stock solutions (2000 mg/L) of each antibiotic were prepared from powders of
78 the antibiotics according to manufacturer's recommendations.

79

80 Minimum inhibitory concentrations (MICs)

81 MICs were determined by the agar dilution method on Mueller-Hinton as recommended by the
82 European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).¹³ In brief, a series of
83 increasing antibiotic concentrations, from 0.03 to 64 mg/L, was prepared for each molecule. The
84 inoculum for each strain was standardized at 0.5 Mac Farland (McF) then diluted to 1:10, so that
85 each of the Steers multipoint inoculator laid 10^4 UFC on the agar. After 18 h of incubation at 35°C,
86 the MIC for each strain was defined as the lowest concentration of antibiotic leaving no growth or
87 less than three colonies at each inoculation of corresponding points.

88 The current EUCAST recommendations for imipenem, meropenem and doripenem were used to
89 classify *P. aeruginosa* strains as susceptible (S), intermediate (I) or resistant (R) (Table 1).

90

91 Ethical committee

92 For this study without clinical data, the local ethical committee ruled out the need for informed
93 consent.

94

95 Statistical analysis

96 The first part of the analysis consisted of the comparison of the susceptibility of the *P. aeruginosa*
97 strains to each of the three carbapenems. The categories (susceptible, intermediate or resistant)
98 were first compared by Fischer's exact test.

99 To take into account the differences in breakpoints, a MIC score defined as follows was used. A score
100 of zero is assigned to an intermediate strain. A negative score of -1 is assigned to a strain with a MIC
101 to the upper terminal of the susceptible class. A score of -2 is assigned if the strain has an MIC one
102 dilution lower than the upper terminal of the susceptible class, a score of -3 if the strain has a MIC
103 two dilutions lower than the upper terminal of the susceptible class, and so on. On the contrary, a
104 positive score indicates a resistant strain. The correspondence between these scores and actual MICs
105 are summarised in Table 2. Presenting MICs that way allows the comparison between the three
106 antibiotics, despite their different breakpoints. The observed difference between the average scores
107 for two out of the three studied antibiotics (Student's t test) reflects the gap in dilutions between
108 these two molecules. If this difference is statistically different from zero, it is concluded that there is
109 a difference between the two drugs.

110 In a second step, we looked at whether the results of the susceptibility to one of the three antibiotics
111 could serve as surrogates for the two other molecules: if so, for instance, it could be proposed to test
112 the susceptibility to imipenem and extrapolate the results to meropenem and doripenem. The
113 correlation between the MIC scores was tested using the Spearman correlation test. For each pair of
114 penems, the scattergrams were built and presented. To predict doripenem susceptibility, the
115 surrogate value of imipenem or of meropenem was investigated in terms of error rates as follows: a
116 very major error (VME) was defined as the percent of isolates susceptible to one or two molecules
117 and resistant to doripenem, a major error (ME) was defined as the percent of isolates resistant to
118 one or two molecules and susceptible to doripenem, and minor errors (mE) were any categorical
119 disagreements that resulted in an intermediate for one carbapenem and either susceptibility or
120 resistance for doripenem. A testing methodology is usually defined as acceptable when the sum of

121 VMEs and MEs is 3% or less. Additionally, minor errors must be 10% or less. Surrogate predictive
122 value (SPV) was also assessed as described previously. SPV was defined as the percentage of
123 meropenem (or imipenem)-susceptible isolates that were susceptible to doripenem.

124 Given the particular population of our study, we will focus on some analyses in subgroups (patients
125 CF vs non-CF patients).

126 All statistical analyses were performed using Microsoft® Office Excel 2010 and IBM SPSS® Statistics
127 19.0. P-value less than 0.05 were considered significant.

128

129 **Results**

130 MICs for were available for 139 strains (Figure 1). MIC for doripenem was missing for one strain.
131 MIC₅₀ were 4, 2 and 1 mg/L respectively for imipenem, meropenem and doripenem and MIC₉₀ were
132 32 mg/L for imipenem and 16 for both meropenem and doripenem. The distribution of the three
133 categories (susceptible, intermediate, and resistant) was statistically different between the three
134 antibiotics, not only for the entire cohort but also for the 2 subgroups (cystic fibrosis and non-CF
135 patients).

136 The comparison of the MIC scores revealed that the *Pseudomonas aeruginosa* strains in our study
137 were statistically more susceptible to meropenem than to the other two drugs. The average
138 difference in MIC scores between meropenem and imipenem was 0.4 (95%CI: 0.20-0.66, $p < 10^{-3}$) and
139 0.6 (95%CI: 0.39-0.76, $p < 10^{-6}$) between meropenem and doripenem. There was no statistical
140 difference in susceptibility between imipenem and doripenem (0.1 [95%CI: -0.08-0.32], $p > 0.05$).

141 Because of the differences in breakpoints such as defined by EUCAST, the MCI score zero is assigned
142 to two classes of MIC for meropenem against only one for imipenem or doripenem (Table 2). For that
143 reason, the score has been forced by assigning +1 to the upper class of the intermediate class for

144 meropenem (and the following scores are shifted accordingly). The observed difference between the
145 molecules remained statistically significant; meropenem remaining superior to doripenem (data not
146 shown). Similarly, the lowest MICs of doripenem could disadvantage doripenem. But, even if the
147 scoring system is changed censoring extreme values (minimum score of -6 and maximum score of 3
148 for the three study drugs), we found the same differences between the molecules (data not shown).

149 There were significant correlations between drugs taken in pairs. These results are shown in Figure 2.

150 The prediction of susceptibility to doripenem from tests to meropenem or imipenem was not easy.
151 Indeed, there was variability between the three penems as evidenced by the scattergrams presented
152 in Figure 3. Thus, in this cohort of *Pseudomonas aeruginosa* neither doripenem nor meropenem can
153 serve as a perfect surrogate marker for doripenem. Indeed, although very major or major errors
154 were rare, minor errors occurred in over 10% of cases (Table 3).

155

156 **Discussion**

157 Doripenem, a relatively new drug, originally appeared as a promising antibiotic, probably more
158 efficient than previously developed penems.^{7, 8, 12, 14, 15} This was noticed even in populations of
159 patients for whom antibiotic use can be very complex such as CF patients.^{4, 16} However, data
160 specifically comparing the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to the three available
161 carbapenems are lacking. None takes into account differences in breakpoints.^{11, 17, 18} The new scoring
162 system that we propose is original and very easy to implement. It seems interesting because it allows
163 to make "a real difference in dilutions" (incorporating the difference in breakpoints) between two
164 molecules and it seems that this concept may be useful to clinicians. This score can be criticised.
165 Nevertheless, even when correcting points possibly disfavouring doripenem, the same differences
166 were observed. The results seem then quite robust.

167 It is interesting to note that in two previous experimental studies, we have demonstrated a really
168 good efficacy of meropenem; this at doses that might seem a little low today.^{19, 20}

169 Thus, we demonstrate a difference between the three penems, for the first time in favour of
170 meropenem. This difference is statistically significant. However, is it clinically relevant? We do not
171 think so. An average difference of 0.4 or 0.6 in dilutions does not seem sufficient to be a decision
172 criterion for the choice of one drug versus another. Indeed, the PK / PD parameters, as a whole, are
173 key determinants in the choice of one antibiotic.²¹⁻²³

174 Finally, there is little difference between the three drugs. This was not necessarily expected. The
175 oprD mutations are often involved in resistance to imipenem but not for meropenem or doripenem.
176 However, the mechanisms of resistance in *Pseudomonas* are much more complex.^{5, 24} Thus, several
177 mechanisms may be involved simultaneously to explain resistance to carbapenems such as
178 production of a metallo- β -lactamase, overexpression of efflux pumps... The three molecules can thus
179 be affected (class effect).

180 Our aim was also to try to determine if the susceptibility test to one penem could replace tests with
181 the other drugs in this class. For antimicrobial classes that contain more molecules (penicillins,
182 cephalosporins, fluoroquinolones), it is well recognized that in fact only one or two molecules have
183 to be tested and extrapolations are acceptable. Using such surrogates is, of course, cost-effective.²⁵ It
184 is interesting here as doripenem is not routinely available in all laboratories. The major or very major
185 errors are effectively low level (Table 3). Nevertheless, the rate of minor errors is much higher so that
186 it seems difficult to recommend using imipenem or meropenem as surrogate markers instead of
187 doripenem. The SPV (surrogate predictive value) is excellent but it is not a recognised indicator yet.¹²

188 However, our study has limitations. The main limitations are first that it is a single centre study and
189 second that it has a relatively small sample size. Nevertheless, we believe that this "snapshot" is
190 accurate since in the baseline study for doripenem, each country (n = 16) was represented by an
191 average of only five centres resulting in a total of only about 150 PA strains per country.⁷ In addition,

192 it is interesting to note that the breakpoints vary depending on the organisation that determines
193 them (EUCAST, FDA or CLSI) and our results according to EUCAST would probably be different if other
194 breakpoints were applied.

195 In conclusion, we showed that in our cohort of *Pseudomonas aeruginosa* (with a significant number
196 of cystic fibrosis patients), differences in susceptibility between the penems exist without being
197 major. Because of these differences, the MIC should be determined for the three drugs when facing a
198 potentially difficult to treat infection (resistance involving several classes of antibiotics, specific
199 infectious sites ...).

200

201 **Acknowledgements**

202 The authors would like to thank A. Pearson for assisting with preparation of the manuscript.

203

204 **Funding**

205 This work was supported by internal funding.

206

207 **Transparency declarations**

208 The authors do not have any conflicts of interest to declare.

209

210

211 **References**

- 212 1. Tumbarello M, De Pascale G, Trecarichi EM et al. Clinical outcomes of *Pseudomonas aeruginosa*
213 pneumonia in intensive care unit patients. *Intensive care medicine* 2013; **39**: 682-92.
- 214 2. Fournier D, Richardot C, Muller E et al. Complexity of resistance mechanisms to imipenem in intensive
215 care unit strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2013; **68**: 1772-80.
- 216 3. Llanes C, Pourcel C, Richardot C et al. Diversity of beta-lactam resistance mechanisms in cystic fibrosis
217 isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: a French multicentre study. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*
218 2013; **68**: 1763-71.
- 219 4. Parkins MD, Elborn JS. Newer antibacterial agents and their potential role in cystic fibrosis pulmonary
220 exacerbation management. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2010; **65**: 1853-61.
- 221 5. Castanheira M, Deshpande LM, Costello A et al. Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms
222 of carbapenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* collected during 2009-11 in 14 European and
223 Mediterranean countries. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2014.
- 224 6. Riera E, Cabot G, Mulet X et al. *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistance mechanisms in Spain:
225 impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*
226 2011; **66**: 2022-7.
- 227 7. Nordmann P, Picazo JJ, Mutters R et al. Comparative activity of carbapenem testing: the COMPACT
228 study. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2011; **66**: 1070-8.
- 229 8. Paterson DL, Depestel DD. Doripenem. *Clinical infectious diseases : an official publication of the*
230 *Infectious Diseases Society of America* 2009; **49**: 291-8.
- 231 9. Castanheira M, Jones RN, Livermore DM. Antimicrobial activities of doripenem and other carbapenems
232 against *Pseudomonas aeruginosa*, other nonfermentative bacilli, and *Aeromonas* spp. *Diagnostic microbiology*
233 *and infectious disease* 2009; **63**: 426-33.
- 234 10. Jean SS, Hsueh PR, Lee WS et al. In vitro activities of doripenem and other carbapenems against
235 clinically important bacteria isolated in intensive care units: nationwide data from the SMART Programme.
236 *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of*
237 *Clinical Microbiology* 2010; **29**: 471-5.
- 238 11. Hojabri Z, Ahangarzadeh Rezaee M, Nahaei MR et al. Comparison of in Vitro Activity of Doripenem
239 versus Old Carbapenems against *Pseudomonas Aeruginosa* Clinical Isolates from both CF and Burn Patients.
240 *Advanced pharmaceutical bulletin* 2013; **3**: 121-5.
- 241 12. Hagihara M, Kuti JL, Nicolau DP. Predicting doripenem susceptibility based on meropenem and
242 imipenem interpretation for *Pseudomonas aeruginosa*. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 2012;
243 **72**: 258-62.
- 244 13. Jehl F. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (SFM - EUCAST).
245 www.sfm-microbiologie.org; Société Française de Microbiologie, 2014.
- 246 14. Berthoin K, Le Duff CS, Marchand-Brynaert J et al. Stability of meropenem and doripenem solutions for
247 administration by continuous infusion. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2010; **65**: 1073-5.
- 248 15. Jones RN, Huynh HK, Biedenbach DJ et al. Doripenem (S-4661), a novel carbapenem: comparative
249 activity against contemporary pathogens including bactericidal action and preliminary in vitro methods
250 evaluations. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2004; **54**: 144-54.
- 251 16. Chen Y, Garber E, Zhao Q et al. In vitro activity of doripenem (S-4661) against multidrug-resistant
252 gram-negative bacilli isolated from patients with cystic fibrosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2005;
253 **49**: 2510-1.
- 254 17. Betriu C, Gomez M, Lopez-Fabal F et al. Activity of doripenem against extended-spectrum beta-
255 lactamase-producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *European journal of clinical*
256 *microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 2010;
257 **29**: 1179-81.

- 258 18. Lascols C, Legrand P, Merens A et al. In vitro antibacterial activity of doripenem against clinical isolates
259 from French teaching hospitals: proposition of zone diameter breakpoints. *European journal of clinical*
260 *microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 2011;
261 **30**: 475-82.
- 262 19. Bretonniere C, Jacqueline C, Caillon J et al. Evaluation of doripenem in an experimental model of
263 resistant *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2012; **67**: 780-1.
- 264 20. Bretonniere C, Jacqueline C, Caillon J et al. Efficacy of doripenem in the treatment of *Pseudomonas*
265 *aeruginosa* experimental pneumonia versus imipenem and meropenem. *The Journal of antimicrobial*
266 *chemotherapy* 2010; **65**: 2423-7.
- 267 21. Ambrose PG, Bhavnani SM, Rubino CM et al. Pharmacokinetics-pharmacodynamics of antimicrobial
268 therapy: it's not just for mice anymore. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious*
269 *Diseases Society of America* 2007; **44**: 79-86.
- 270 22. Mouton JW, Brown DF, Apfalter P et al. The role of pharmacokinetics/pharmacodynamics in setting
271 clinical MIC breakpoints: the EUCAST approach. *Clinical microbiology and infection : the official publication of*
272 *the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2012; **18**: E37-45.
- 273 23. Zelenitsky SA, Rubinstein E, Ariano RE et al. Integrating pharmacokinetics, pharmacodynamics and MIC
274 distributions to assess changing antimicrobial activity against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*
275 causing infections in Canadian hospitals (CANWARD). *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2013; **68**
276 **Suppl 1**: i67-72.
- 277 24. Dunham SA, McPherson CJ, Miller AA. The relative contribution of efflux and target gene mutations to
278 fluoroquinolone resistance in recent clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *European journal of clinical*
279 *microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 2010;
280 **29**: 279-88.
- 281 25. Jones RN, Sader HS, Fritsche TR et al. Selection of a surrogate beta-lactam testing agent for initial
282 susceptibility testing of doripenem, a new carbapenem. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 2007;
283 **59**: 467-72.

MIC breakpoints mg / L		
	S	R
Imipenem	≤4	>8
Meropenem	≤2	>8
Doripenem	≤1	>2

Table 1: Breakpoints for the 3 carbapenems following EUCAST's recommendations

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
MIC: Minimum Inhibitory Concentration

MIC µg / mL	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64
Imipenem	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3
Meropenem	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	0	1	2	3
Doripenem	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5

Table 2: Correspondence between MIC scores and actual MICs

MIC: Minimum Inhibitory Concentration

This transformation of MICs into MIC scores allows comparison between the 3 molecules, taking into account the different MIC breakpoints.

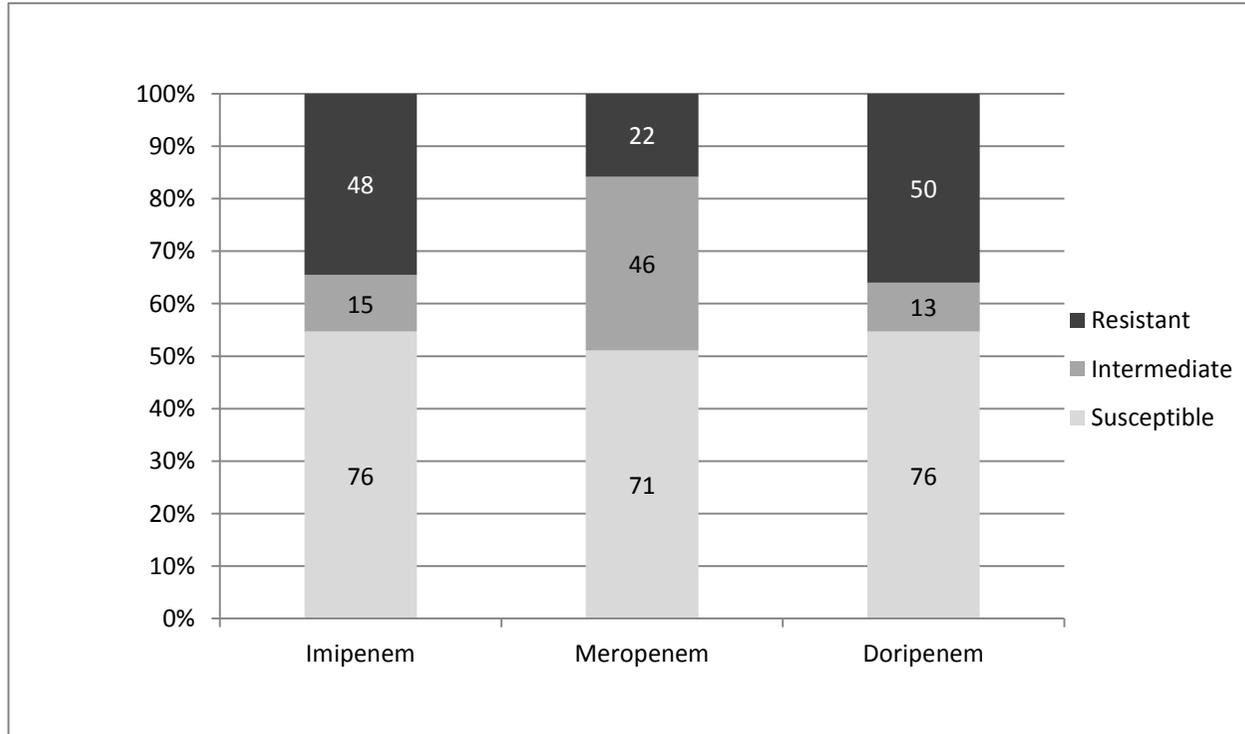


Figure 1: Distribution of the *Pseudomonas aeruginosa* strains (n=139) according to their susceptibility to penems

Numbers for each class are detailed.

Chi² test revealed statistical differences in the distribution of the susceptibility among the three penems ($p < 10^{-6}$).

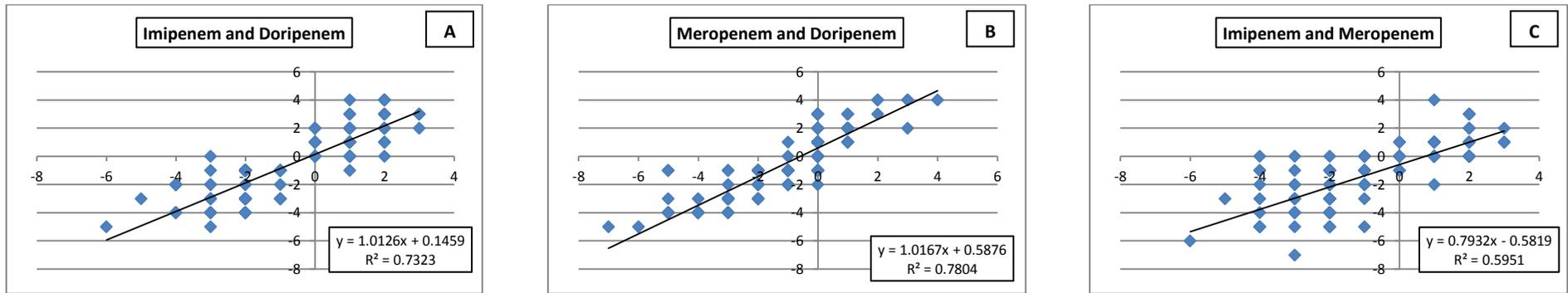


Figure 2: Correlation between MIC scores for the 3 penems taken in pairs

Graph A shows the correlation between imipenem (x-axis) and doripenem (y-axis).
For each pair (Graph A, B or C) the association is highly statistically significant ($p < 10^{-6}$).

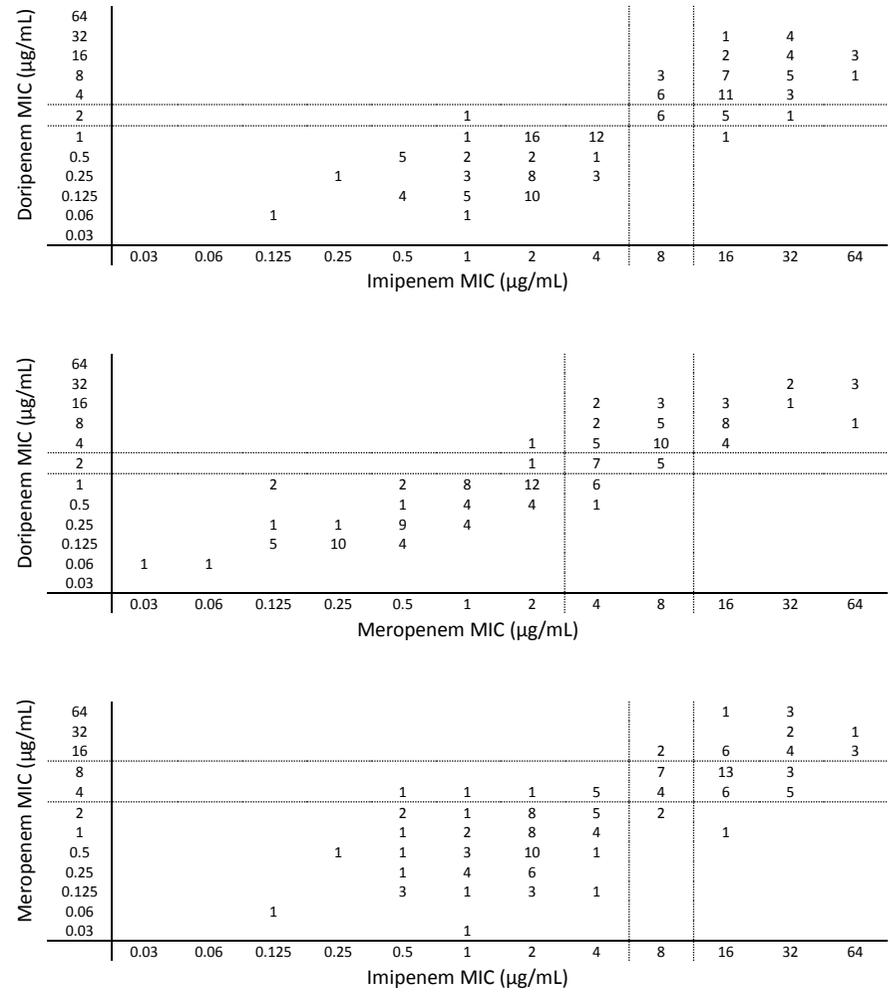


Figure 3: MIC scattergrams of the three penems taken in pairs against 139 *Pseudomonas aeruginosa*

EUCAST breakpoints are indicated by dashed lines.

Surrogate antibiotic	Categorical agreement (%)	Error rates (%)			Surrogate predictive value
		Minor	Major	Very Major	
Imipenem	87.8%	11.5%	0.7%	0.0%	100.0%
Meropenem	74.1%	25.2%	0.0%	0.7%	92.0%

Table 3: Categorical agreement, error rates, and surrogate predictive value for imipenem and meropenem to predict doripenem interpretative criteria against 139 *Pseudomonas aeruginosa*

IV- Discussion

A- Modèle expérimental d'infection aiguë.....	132
B- Modèle de pneumonie chronique.....	137
C- Intérêt des nouvelles molécules ?.....	138
1- Doripénème.....	138
2- Ceftolozane.....	140
3- Développement des nouvelles molécules.....	141

A- Modèle expérimental d'infection aiguë

Nous avons utilisé un modèle de pneumonie expérimentale à *Pseudomonas aeruginosa* chez le lapin. Ce modèle crée une véritable infection pulmonaire et permet de reproduire très précisément chez l'animal, la pharmacocinétique humaine.

Les modèles animaux sont régulièrement l'objet de critiques¹. Il y a quelques années les associations de défense des animaux ont alerté sur certaines conditions qui n'étaient pas acceptables du point de vue éthique. De mauvaises conditions de vie pour les animaux (stress lié au bruit, à un nombre trop élevé d'animaux par cage, à une alimentation insuffisante etc...) sont aussi autant de risques de biais pour l'expérimentation. La société et les contraintes réglementaires ont évolué ces dernières années. Nous pouvons écrire, sans aucune arrière-pensée, que l'EA 3826 s'inscrit dans cette démarche continue d'amélioration de la qualité des conditions mises en œuvre pour la pratique de ces expérimentations animales (bien-être des animaux). À titre d'exemples, on peut citer l'utilisation de nouveaux locaux plus spacieux, de nouveaux équipements (cages), de nouveaux protocoles de sédation ou d'analgésie...

De nombreux scientifiques remettent également en cause les modèles animaux [Perel 2007]. Ces derniers sont pourtant utilisés depuis très longtemps [Poli-de-Figueiredo 2008] et surtout, ont permis de nombreuses avancées (Tableau 17).

Pour les modèles de sepsis, plusieurs arguments contre l'utilisation de modèles animaux sont avancés [Dyson 2009].

¹ On trouve notamment de nombreux sites internet :

- <http://antidote-europe.org/experimentation-animale-10-mensonges/>
- <http://www.one-voice.fr/sante-sans-torture/abolition-de-l experimentation-animale/>
- <http://www.fondationbrigittebardot.fr/s-informer/experimentation-animale>.

Année	Lauréats	Thèmes	Modèles animaux
1905	R. Koch	Agent de la tuberculose et du choléra	Vache, Mouton
1907	A Laveran	Agent du paludisme	Oiseau
1923	F.G. Banting et J.J.R. Macleod	Découverte de l'insuline et mécanisme du diabète	Chien, Lapin, Poisson
1945	A. Fleming et E.B. Chain	Découverte de la pénicilline	Souris
1951	M. Theiler	Vaccin contre la fièvre jaune	Singe, Souris
1954	J.F. Enders, T.H. Wellers, F.C. Robbins	Vaccin contre la poliomyélite (culture <i>in vitro</i> du virus)	Singe, Souris
1966	F.P. Rous, C.B. Huggins	Virus induisant des tumeurs et traitement hormonal du cancer de la prostate	Rat, Lapin, Poule
1976	C. Gajdusek, B.S. Blumberg	Origine du kuru	Chimpanzé
1990	J.E. Murray, E.D. Thomas	Techniques et transplantation d'organes (jumeaux homozygotes)	Chien
1997	S. Prusiner	Découverte des prions	Souris, Hamster
2005	B. Marshall, R. Warren	Rôle de <i>H. pylori</i> dans les ulcères gastriques	Gerbille, Porc
2008	H. Zur Hausen, F. Barré-Sinoussi, L. Montagnier	Découverte des virus HPV et HIV	Souris, Primate
2010	R. Edwards	Développement de la fécondation <i>in vitro</i>	Souris, Lapine

Tableau 17 : Apports des modèles animaux illustrés au travers de quelques-uns des grands progrès de la médecine depuis le début du XX^{ème} siècle (Prix Nobel de Médecine ou de Physiologie)
(d'après [Commission "Relations Homme-Animaux" 2012])

Certains modèles utilisent non pas des bactéries mais des « toxines » (endotoxines, agonistes des Toll-like récepteurs, zymosane etc...) produisant ainsi des modèles mimant un sepsis mais ne reproduisant malheureusement pas parfaitement ce qui se passe chez l'homme [Remick 2005].

L'inconvénient des modèles qui utilisent des bactéries vivantes est que souvent ces bactéries ne parviennent pas à créer une véritable infection mais plutôt une réaction systémique de type « toxémie » [Schultz 2002]. Nous sommes confrontés à ce problème de « greffe » de souches bactériennes. Certaines en effet sont éliminées sans créer aucune réaction (du moins physiquement évaluable). D'autres créent des désordres physiologiques observables et des dégâts tissulaires évidents mais pas pour autant de réelles infections (cultures stériles). Les souches que nous utilisons (PAO1 et souches isogéniques) créent de réelles infections, évidentes tant du point de vue « clinique » (observation des symptômes présentés par les animaux : prostration, frissons, perte d'appétit, de poids, toux...) qu'anatomo-pathologique. Ces constatations sont parfaitement corrélées aux résultats microbiologiques (travaux précédents de mise au point rapportés dans le mémoire de Master 2). On oppose souvent aux modèles expérimentaux l'utilisation d'animaux jeunes et sans comorbidités. C'est effectivement le cas dans le modèle que nous utilisons. Toutefois, peu d'études montrent, pour un modèle donné, l'impact de l'âge sur l'expérimentation elle-même [Turnbull 2003]. En revanche, on sait que les résultats sont fortement impactés par le statut immunitaire des animaux [Koh 2009]. La question est particulièrement cruciale lorsque l'on s'intéresse à des infections à *Pseudomonas*. Une évolution possible de notre modèle serait d'utiliser des animaux immunodéprimés. On pourrait notamment en attendre un élargissement du panel de bactéries susceptibles de créer des infections.

Un autre argument avancé contre l'utilisation des animaux pour les modèles de sepsis est soit l'absence d'utilisation d'antibiotiques, soit l'utilisation de ceux-ci alors que les propriétés pharmacocinétiques sont très différentes chez l'homme et chez l'animal [Mizgerd 2008]. De fait, l'élimination des bêtalactamines est beaucoup plus rapide chez le lapin que chez l'homme : la demi-vie spontanée est souvent voisine de 10-15 minutes chez l'animal lorsqu'elle est (de plus) d'une heure chez l'homme. La pharmacocinétique humanisée permet de corriger ce défaut. Au niveau plasmatique, les dosages itératifs permettent de vérifier qu'on obtient ce que l'on souhaite. En revanche, on n'a, au niveau pulmonaire, qu'un reflet indirect de la diffusion des antibiotiques : l'efficacité *in fine* des antibiotiques sur la décroissance bactérienne chez les animaux traités par rapport aux témoins.

Des prélèvements respiratoires sont envisageables (lavages broncho-alvéolaires sous anesthésie générale) à partir desquels des dosages sont possibles. Néanmoins, si ces techniques sont de plus en

plus proposées chez les patients [Kiem 2008], il faut avoir conscience de leurs limites. La correction de la dilution imposée par la technique de recueil est possible par le dosage de l'urée (plasmatique et dans le LBA) [Chandorkar 2012]. En revanche, la diffusion des antibiotiques au niveau tissulaire est probablement très dépendante de paramètres tels que la qualité de la circulation sanguine (tant systémique que locale), de l'inflammation. Ceci est documenté pour la diffusion dans le LCR [Shen 2004], par exemple, mais moins bien connu au niveau pulmonaire. Il n'est probablement pas équivalent d'analyser la diffusion des antibiotiques au tout début d'une infection où l'inflammation est maximale (et où probablement la diffusion est bonne) et leur diffusion après plusieurs jours de traitement (diffusion vraisemblablement moins bonne si le traitement a contrôlé l'infection !) ou encore chez le volontaire sain [Chandorkar 2012].

Une dernière critique est souvent opposée aux modèles animaux. Le patrimoine génétique de ceux-ci serait tellement différent du nôtre que l'interprétation des résultats est impossible... Comment pourtant reproduire la complexité des processus biologiques à l'échelle d'un organisme par un modèle cellulaire ou informatique ? Pour l'instant, cela n'est pas possible... En outre, nous partageons tout de même un large patrimoine génétique avec nos cousins mammifères¹ et même avec les insectes ! La découverte récente des récepteurs Toll chez la drosophile a représenté une avancée considérable dans la compréhension des processus impliqués dans l'immunité innée [Lindsay 2014].

Finalement, on doit (continuer à !) suivre les règles des 3 « R » de Russel et Bush [Commission "Relations Homme-Animaux" 2012]: remplacement, réduction, raffinement². L'amélioration continue du modèle (protocole d'anesthésie, conditions de vie des animaux, qualité des données pharmacologiques, rigueur dans l'interprétation des résultats) et les améliorations envisagées citées plus haut s'inscrivent dans le sens du raffinement. Pour l'instant, nous pensons que les modèles animaux sont indispensables pour la recherche biomédicale [Commission "Relations Homme-Animaux" 2012; Perrin 2014] et, sans aucun doute utiles pour aider à mieux utiliser les antibiotiques [Potel 2010].

On peut critiquer l'administration de doripénème (et des autres molécules) par perfusion de durée courte (30 minutes). Cependant, au moment où les protocoles de ces études ont été écrits (2007 pour les études 1 et 2), les perfusions prolongées ne semblent pas être la règle [Cirillo 2009a;

¹ <http://www.cnrs.fr/cw/fr/pres/compress/ScienceDefense/Page06.html>

² <http://3rs.ccac.ca/fr/a-propos/trois-r.html>

Crandon 2009; van Zanten 2013]. En outre, le bras IVSE est envisageable compte-tenu de la stabilité de la molécule [**Keel 2011; Psathas 2008**]. L'avantage de notre modèle réside dans l'adaptabilité à toutes les modalités d'administration intraveineuses envisageables.

Dans l'étude n°3, pour les comparateurs, pour la ceftazidime notamment, le choix aurait pu être aussi une perfusion continue [**Lipman 1999**]. Toutefois, bien qu'il existe des arguments en faveur de l'utilisation des bêtalactamines en perfusion allongée voire en continu [**Jehl 2009; Roberts 2011; Roberts and Lipman 2009**], l'administration discontinue reste encore largement utilisée. De plus l'administration continue d'antibiotiques peut poser souci comme, par exemple, l'accumulation de pyridine chez les patients atteints de mucoviscidose [**Bourget 2014**].

Pour ces études (n°1 à 3), se pose la question de la validité des résultats. Les effectifs sont souvent faibles : une dizaine d'animaux par groupe. Toutefois, l'expérimentation permet d'obtenir une grande homogénéité parmi ces animaux. Le seul paramètre qui diffère entre les groupes est le traitement (ou l'absence de traitement). On peut ainsi attribuer les éventuelles différences observées à ces traitements (validité interne). En recherche clinique, malgré les procédures de randomisation, on peut parfois observer des différences entre les caractéristiques des individus d'un groupe par rapport à un autre. L'utilisation d'animaux du même âge, de même sexe, selon une procédure rigoureusement identique permet de mettre en évidence des différences entre les groupes avec des effectifs éthiquement (et financièrement !) acceptables.

Plus difficile est la question de la validité externe de nos résultats : si on observe une différence d'efficacité entre deux traitements chez nos lapins, les résultats sont-ils extrapolables à l'homme ? Certes, la pharmacocinétique est « humanisée ». Toutefois, il s'agit d'une souche particulière de *Pseudomonas aeruginosa*, PAO1, et d'animaux identiques mais particuliers...

Le recul dont nous disposons par rapport aux résultats obtenus avec le doripénème est intéressant. En effet, nos résultats sont confortés par ceux des études ultérieures qui incitent, eux aussi, à administrer des posologies plus élevées [**Cirillo 2009b; Van Wart 2009**].

Pour le ceftolozane, de tels éléments confirmant nos résultats ne sont pas disponibles. Néanmoins, ces derniers sont également en faveur des posologies les plus élevées. Nous ne pouvons évidemment pas prouver qu'il en sera de même chez l'homme mais la validité interne de nos résultats et la nature même du modèle (en particulier la pharmacocinétique identique à ce qui se passe chez l'homme) conduisent à considérer nos résultats en vue d'une utilisation chez l'homme (extrapolation).

B- Modèle de pneumonie chronique

Nous avons échoué dans notre tentative de créer un nouveau modèle d'infection pulmonaire chronique. La première technique (corps étranger intra-bronchique) est rapidement abandonnée. La seconde utilise des microbilles d'agarose. Elle produit des infections mais sévères et aiguës : mortalité initiale élevée puis guérison des animaux survivants après quelques jours.

De nombreux modèles d'infection pulmonaire sont décrits [Kukavica-Ibrulj 2008b], la plupart chez la souris et le rat. Ces petits animaux présentent l'avantage d'un coût faible et permettent d'utiliser des effectifs importants. Pourtant, dans une perspective thérapeutique, notamment antibiotique, leur petite taille limite les possibilités de modélisation pharmacocinétique et pharmacodynamique. Or, pour des infections difficiles à traiter telles que les pneumonies à *Pseudomonas aeruginosa*, ces paramètres PK-PD sont importants. Le lapin permet la simulation d'une pharmacocinétique humaine [Bugnon 1998]. La possibilité de traitements plus longs que ceux que nous utilisons dans le modèle aigu (48 heures) semble intéressante dans l'hypothèse d'infections à bactéries non fermentaires [Chastre 2003; Kollef 2012a]. En outre, la création d'un mucus pourrait rapprocher ce modèle de ce qui se passe chez les patients atteints de mucoviscidose, souvent touchés par les infections à *Pseudomonas* [Gaspar 2013].

Si la mise au point des microbilles d'agarose et la reproduction d'infections durables chez la souris donnent satisfaction, en revanche, le passage chez le lapin ne permet pas d'obtenir les infections souhaitées. Une piste pourrait aussi être l'utilisation d'animaux immunodéprimés.

C- Intérêt des nouvelles molécules ?

Nos travaux ne sont évidemment pas suffisants pour porter un jugement sur le doripénème, encore moins sur le ceftolozane. On ne peut que formuler quelques commentaires...

Ces deux molécules font partie des rares molécules antibiotiques qui aient été développées ces dernières années dans le contexte très difficile qu'on a rappelé dans la première partie [Boucher 2013].

1- Doripénème

Nous montrons que le doripénème est efficace contre deux souches isogéniques de *Pseudomonas aeruginosa*, PAO1, dans un modèle de pneumonie aiguë chez le lapin. Pour la souche sensible, la posologie qui semble devoir être privilégiée est l'administration de doses équivalentes à 1 gramme trois fois par jour chez l'homme.

Une étude de la sensibilité de souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa*, provenant de prélèvements respiratoires (de patients atteints de mucoviscidose pour la moitié d'entre eux) montre qu'il y a peu de différences entre les trois carbapénèmes.

Les premières publications (avant 2008) concernant le doripénème montrent des données prometteuses. La sensibilité *in vitro* est d'interprétation difficile initialement [Chen 2005; Fritsche 2005] puisque les concentrations critiques ne sont pas connues ; même si le seuil de 2mg/L est proposé [Brown 2005]. La sensibilité au doripénème est excellente pour les entérobactéries. Elle semble même supérieure à l'imipénème [Livermore 2008] pour *Pseudomonas aeruginosa* mais moindre sur les souches d'*Acinetobacter* [Paterson 2009].

Les arguments favorables pharmacologiques [Psathas 2008], cliniques [Chastre 2008; Rea-Neto 2008] et finalement pharmaco-économiques [Merchant 2008] conduisent à proposer une étude particulièrement originale puisqu'elle compare deux durées de traitement différentes. Il est intéressant de noter que, pour cette troisième étude clinique incluant des patients présentant une pneumonie, les posologies utilisées, choisies sur des bases PK-PD [Cirillo 2009a; Van Wart 2009], correspondent celles que nous avons montrées plus efficaces [Bretonniere 2010].

Comme nous l'avons écrit plus haut, l'arrêt prématuré de cette étude [Kollef 2012a], ne doit pas condamner la molécule. La récente communication de l'expérience de l'utilisation en clinique du

doripénème pour traiter des PAVM à *Pseudomonas aeruginosa* [Luyt 2014], pourrait laisser à penser qu'il n'est « qu'un carbapénème de plus ». Toutefois, les auteurs précisent que les CMI sont plus basses pour le doripénème mais aussi que les souches imipénème-résistantes restent sensibles au doripénème. Ces données illustrent qu'il y a un certain degré d'hétérogénéité entre les souches. Elles vont dans le même sens que les données que nous rapportons. Si les souches de *Pseudomonas aeruginosa*, sont peu différentes en termes de sensibilité aux carbapénèmes, surtout si on utilise le CMI score, elles ne sont pas absolument équivalentes et méritent de continuer à coexister dans cette classe.

La récente décision de Janssen-Cilag de rendre à Shionogi & Co l'exploitation de la molécule laisse cependant de sérieuses inquiétudes sur sa future disponibilité en Europe [Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM) 2014]...

2- Ceftolozane

Nous montrons que le ceftolozane est efficace dans le modèle d'infection pulmonaire aiguë à *Pseudomonas aeruginosa*. Il est plus efficace à posologie plus élevée (2g trois fois par jour *versus* 1g trois fois). Pour cette posologie, il est supérieur à la ceftazidime, à l'association pipéracilline/tazobactam et équivalent à l'imipénème.

Concernant le ceftolozane, les données sont pour l'instant peu nombreuses. Le développement de la molécule a sans doute été retardé par la mise au point de l'association avec le tazobactam, notamment la recherche du ratio adéquat dont on sait qu'il est capital en termes d'activités vis-à-vis des bêta-lactamases [Livermore 2010; Sader 2014c; Vanscoy 2013]. Comme initialement pour le doripénème, les données d'activité *in vitro* sont excellentes [Farrell 2013; Farrell 2014] tant vis-à-vis des entérobactéries [Bulik 2012; Sader 2011; Titelman 2011] que vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* [Bulik 2010; Juan 2010; Moya 2010b; Zamorano 2010]. Notons toutefois que pour ce dernier, l'association avec un inhibiteur de bêta-lactamases n'apporte pas grand-chose puisque la production de telles enzymes n'est pas la règle chez ces bactéries et que le tazobactam n'est pas actif contre les carbapénèmases [Juan 2010]. Un point en revanche concerne l'activité anti-pseudomonas de la molécule : sa moindre sensibilité vis-à-vis des céphalosporinases de type AmpC pourrait lui conférer un avantage par rapport à la céphalosporine anti-pseudomonas de référence, la ceftazidime [Takeda 2007a]. Bien sûr, la souche de PAO1 que nous avons utilisée est parfaitement sensible aux 2 molécules, cependant, il est intéressant de noter qu'il existe une réelle différence d'efficacité entre celles-ci à même posologie : charges pulmonaires moyennes, $3,6 \pm 0,3 \log_{10}$ UFC/g contre $4,8 \pm 0,2 \log_{10}$. La différence pourrait aussi se faire sur la réponse immunitaire sous traitement [Jacqueline 2013; Knapp 2005].

Ainsi, la molécule semble prometteuse tant comme pour son activité sur *Pseudomonas* que celle sur les entérobactéries. Un souci majeur pourrait être l'émergence de carbapénèmases chez ces bactéries. Jusqu'à présent aucun inhibiteur ne parvenait à reverser l'activité de ces enzymes. Une publication très récente permet de nourrir des espoirs [Meziane-Cherif 2014]. L'équipe de King décrit la réversibilité de la résistance aux carbapénèmes par production d'une métallo-enzyme, NDM-1, grâce à l'association du méropénème à l'aspergillomarasmine A [King 2014].

Il convient néanmoins d'être prudent. Le ceftolozane n'est qu'au début de son développement (Figure 14).

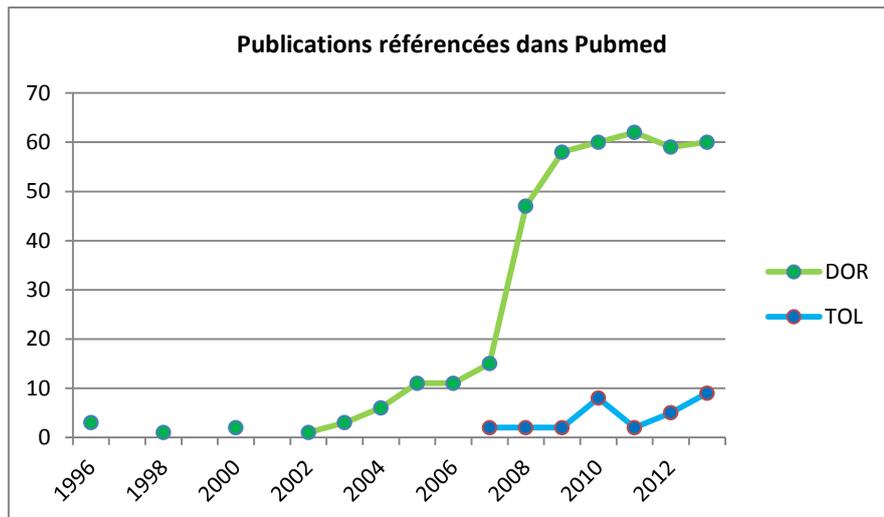


Figure 14 : Nombre de publications référencées dans Pubmed par années pour le doripénème (DOR) et le ceftolozane (TOL)

Pubmed est un service gratuit de la National Library of Medicine.

3- Développement des nouvelles molécules

Afin d'obtenir les indispensables AMM, les industriels conduisent souvent des plans de développement en complet décalage avec les attentes des cliniciens [Potel 2005]. On a ainsi suivi les études évaluant, par exemple, l'ertapénème ou le linézolide, dans des indications telles que les infections intra-abdominales peu sévères ou les infections de la peau et des tissus mous... La tentation est grande d'utiliser les molécules à faible posologie (moindres coûts, moindres toxicités) pour des infections communautaires (bactéries avec des CMI basses) chez des patients peu sévères (recrutement plus simple donc plus rapide, taux d'échec moindre).

Le doripénème n'a pas échappé à la règle : études sur les infections intra-abdominales ne permettant pas un positionnement facile de la molécule dans cette indication [Guery 2009]. Par contre, il n'y a pas eu d'(inutiles) investigations dans les infections cutanées... De même, la stratégie de développement dans les pneumonies nosocomiales est intéressante : premières études, arguments médico-économiques, ultime étude de confirmation malheureusement négative (et pourtant originale !).

Il est trop tôt pour juger de la stratégie de développement de l'association ceftolozane (+ tazobactam).

Conclusion/Perspectives

Ces travaux de thèse ont permis pour notre équipe, l'appropriation puis le développement d'un modèle de pneumonie expérimentale à *Pseudomonas aeruginosa* chez le lapin.

Ils nous ont permis d'affiner nos connaissances tant microbiologiques (mécanismes d'action des antibiotiques et de résistance vis-à-vis de ceux-ci), que pharmacologiques (pharmacocinétique-pharmacodynamique des antibiotiques).

Au final, ils ont permis d'améliorer les connaissances concernant deux nouvelles molécules antibiotiques, le doripénème et le ceftolozane. De par la nature même de l'équipe de recherche, EA 3826, pluridisciplinaire par essence, ils s'intègrent dans une approche globale de la problématique de l'émergence de résistance.

Les perspectives sont nombreuses !

Des développements PK-PD sont souhaitables. L'exploration de la distribution tissulaire des antibiotiques (dosages dans les lavages broncho-alvéolaires) peut permettre de mieux expliquer les différences d'efficacité observées entre les traitements.

De nouvelles modalités d'administration peuvent aussi être étudiées : nanoparticules [**Habash 2014; Hadinoto 2014**], vectorisation (liposomes par exemple) [**Alipour 2014**].

L'utilisation de nouveaux traitements antimicrobiens [**Sharma 2014**] seuls ou en association pourra aussi être développée.

Enfin, l'exploration des processus immunologiques impliqués, en particulier l'immunité innée [**Broquet 2014; Cohen 2013**], et les modulations de ceux-ci par tel ou tel traitement anti-infectieux est une voie de recherche particulièrement prometteuse. En effet, pour une endocardite, l'action de l'antibiotique au niveau des végétations est déterminante. En revanche, au niveau pulmonaire, la part des phénomènes immunitaires est majeure si bien que la corrélation entre l'efficacité prédite des antibiotiques par les CMI vis-à-vis d'une bactérie donnée et l'évolution clinique finalement observée sont souvent discordants.

Finalement, la difficulté d'obtenir des données cliniques suffisantes pour étayer telle nouvelle posologie ou telle nouvelle indication d'un traitement anti-infectieux offre une large place pour les travaux *in vitro* ou *in vivo* au laboratoire pour améliorer les connaissances et *in fine* la prise en charge des patients.

La mise à disposition de nouvelles molécules comme le meilleur usage des antibiotiques déjà connus, à l'heure de l'émergence dramatique des résistances bactériennes, sont plus que jamais nécessaires...

Références

- Abdelraouf, K., S. Kabbara, *et al.* (2011). "Effect of multidrug resistance-conferring mutations on the fitness and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*." *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 66: 1311-1317.
- Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM) (2014). DORIBAX® (doripénème) 250 mg et 500 mg, poudre pour solution pour perfusion - Retrait prévu du marché, ANSM.
- Alipour, M. and Z. E. Suntres (2014). "Liposomal antibiotic formulations for targeting the lungs in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa*." *Therapeutic delivery* 5: 409-427.
- Ambler, R. P. (1980). "The structure of beta-lactamases." *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 289: 321-331.
- Ambrose, P. G., S. M. Bhavnani, *et al.* (2007). "Pharmacokinetics-pharmacodynamics of antimicrobial therapy: it's not just for mice anymore." *Clin Infect Dis* 44(1): 79-86.
- American Thoracic Society (2005). "Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia." *Am J Respir Crit Care Med* 171(4): 388-416.
- Amin, A. (2009). "Clinical and economic consequences of ventilator-associated pneumonia." *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 49 Suppl 1.
- Angus, B. J., M. D. Smith, *et al.* (2000). "Pharmacokinetic-pharmacodynamic evaluation of ceftazidime continuous infusion vs intermittent bolus injection in septicemic melioidosis." *British journal of clinical pharmacology* 50(2): 184-191.
- Apisarnthanarak, A. and L. M. Mundy (2010). "Use of high-dose 4-hour infusion of doripenem, in combination with fosfomycin, for treatment of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia." *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 51: 1352-1354.
- Apisarnthanarak, A. and L. M. Mundy (2012). "Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia with intermediate minimum inhibitory concentrations to doripenem: combination therapy with high-dose, 4-h infusion of doripenem plus fosfomycin versus intravenous colistin plus fosfomycin." *International journal of antimicrobial agents* 39: 271-272.
- Armand-Lefevre, L., C. Angebault, *et al.* (2013). "Emergence of imipenem-resistant gram-negative bacilli in intestinal flora of intensive care patients." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 57(3): 1488-1495.
- Bassetti, M., M. Merelli, *et al.* (2013). "New antibiotics for bad bugs: where are we?" *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 12: 22.
- Bekaert, M., J.-F. Timsit, *et al.* (2011). "Attributable mortality of ventilator-associated pneumonia: a reappraisal using causal analysis." *American journal of respiratory and critical care medicine* 184: 1133-1139.
- Bentley, R. and J. W. Bennett (2003). "What is an antibiotic? Revisited." *Advances in applied microbiology* 52: 303-331.
- Bosurgi, R. (2014). "Highlights from the 24th ECCMID." *Lancet Infect Dis* 14(7): 557-558.
- Boucher, H. W., G. H. Talbot, *et al.* (2013). "10 x '20 Progress--development of new drugs active against gram-negative bacilli: an update from the Infectious Diseases Society of America." *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 56: 1685-1694.
- Boucher, H. W., G. H. Talbot, *et al.* (2009). "Bad bugs, no drugs: no ESCAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America." *Clin Infect Dis* 48(1): 1-12.
- Bourget, P., A. Amin, *et al.* (2014). "How to minimize toxic exposure to pyridine during continuous infusion of ceftazidime in patients with cystic fibrosis?" *Antimicrobial agents and chemotherapy* 58: 2849-2855.

- Boutoille, D. (2009a). Etude chez *Pseudomonas aeruginosa* de l'impact du système d'efflux MexAB-OprM sur les traitements antibiotiques et sur l'expression de la virulence Thèse de Doctorat, Université de Nantes.
- Boutoille, D., C. Jacqueline, *et al.* (2009b). "In vivo impact of the MexAB-OprM efflux system on beta-lactam efficacy in an experimental model of *Pseudomonas aeruginosa* infection." Int J Antimicrob Agents **33**(5): 417-420.
- Bretonniere, C., C. Jacqueline, *et al.* (2010). "Efficacy of doripenem in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* experimental pneumonia versus imipenem and meropenem." J Antimicrob Chemother **65**(11): 2423-2427.
- Broquet, A., A. Roquilly, *et al.* (2014). "Depletion of natural killer cells increases mice susceptibility in a *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia model." Critical care medicine **42**: e441-450.
- Brown, S. D. and M. M. Traczewski (2005). "Comparative in vitro antimicrobial activity of a new carbapenem, doripenem: tentative disc diffusion criteria and quality control." J Antimicrob Chemother **55**(6): 944-949.
- Bugnon, D., G. Potel, *et al.* (1998). "In vivo simulation of human pharmacokinetics in the rabbit." Bulletin of mathematical biology **60**: 545-567.
- Bulik, C. C., H. Christensen, *et al.* (2010). "In vitro potency of CXA-101, a novel cephalosporin, against *Pseudomonas aeruginosa* displaying various resistance phenotypes, including multidrug resistance." Antimicrob Agents Chemother **54**(1): 557-559.
- Bulik, C. C., P. R. Tessier, *et al.* (2012). "In vivo comparison of CXA-101 (FR264205) with and without tazobactam versus piperacillin-tazobactam using human simulated exposures against phenotypically diverse gram-negative organisms." Antimicrob Agents Chemother **56**(1): 544-549.
- Bush, K. (2012). "Improving known classes of antibiotics: an optimistic approach for the future." Current opinion in pharmacology **12**: 527-534.
- Bush, K. and G. A. Jacoby (2010). "Updated functional classification of beta-lactamases." Antimicrobial agents and chemotherapy **54**: 969-976.
- Bush, K., G. A. Jacoby, *et al.* (1995). "A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure." Antimicrobial agents and chemotherapy **39**: 1211-1233.
- Bustamante, C. I., G. L. Drusano, *et al.* (1984). "Postantibiotic effect of imipenem on *Pseudomonas aeruginosa*." Antimicrobial agents and chemotherapy **26**(5): 678-682.
- Cabot, G., S. Bruchmann, *et al.* (2014). "*Pseudomonas aeruginosa* Ceftolozane-Tazobactam Resistance Development Requires Multiple Mutations Leading to Overexpression and Structural Modification of AmpC." Antimicrobial agents and chemotherapy **58**: 3091-3099.
- Cannon, B. (2014). "Microbiology: Resistance fighters." Nature **509**.
- Castanheira, M., L. M. Deshpande, *et al.* (2014). "Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of carbapenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* collected during 2009-11 in 14 European and Mediterranean countries." The Journal of antimicrobial chemotherapy.
- Centers for Disease Control and Prevention (2013). Antibiotic Resistance Threats in the United States. U.S. Department of Health and Human Services. USA, Centers for Diseases Control and Prevention, : 114.
- Chandorkar, G., J. A. Huntington, *et al.* (2012). "Intrapulmonary penetration of ceftolozane/tazobactam and piperacillin/tazobactam in healthy adult subjects." J Antimicrob Chemother **67**(10): 2463-2469.
- Chastre, J., M. Wolff, *et al.* (2003). "Comparison of 8 vs 15 days of antibiotic therapy for ventilator-associated pneumonia in adults: a randomized trial." JAMA **290**(19): 2588-2598.
- Chastre, J., R. Wunderink, *et al.* (2008). "Efficacy and safety of intravenous infusion of doripenem versus imipenem in ventilator-associated pneumonia: a multicenter, randomized study." Critical care medicine **36**: 1089-1096.

- Chen, Y., E. Garber, *et al.* (2005). "In vitro activity of doripenem (S-4661) against multidrug-resistant gram-negative bacilli isolated from patients with cystic fibrosis." Antimicrobial agents and chemotherapy **49**: 2510-2511.
- Chou, H. T., D. H. Kwon, *et al.* (2008). "Transcriptome analysis of agmatine and putrescine catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1." J Bacteriol **190**(6): 1966-1975.
- Cirillo, I., N. Vaccaro, *et al.* (2012). "Pharmacokinetics of single-dose doripenem in adults with cystic fibrosis." Journal of clinical pharmacology **52**: 1645-1653.
- Cirillo, I., N. Vaccaro, *et al.* (2009a). "Pharmacokinetics, safety, and tolerability of doripenem after 0.5-, 1-, and 4-hour infusions in healthy volunteers." Journal of clinical pharmacology **49**: 798-806.
- Cirillo, I., N. Vaccaro, *et al.* (2009b). "Pharmacokinetics, safety, and tolerability of doripenem after 0.5-, 1-, and 4-hour infusions in healthy volunteers." Journal of clinical pharmacology **49**(7): 798-806.
- Close, B., K. Banister, *et al.* (1996). "Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. DGXI of the European Commission." Lab Anim **30**(4): 293-316.
- Close, B., K. Banister, *et al.* (1997). "Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. DGXT of the European Commission." Lab Anim **31**(1): 1-32.
- Cohen, T. S. and A. S. Prince (2013). "Activation of inflammasome signaling mediates pathology of acute *P. aeruginosa* pneumonia." The Journal of clinical investigation **123**: 1630-1637.
- Combes, A., C.-E. Luyt, *et al.* (2006). "Impact of piperacillin resistance on the outcome of *Pseudomonas* ventilator-associated pneumonia." Intensive care medicine **32**: 1970-1978.
- Commision "Relations Homme-Animaux" (2012). Recherche scientifique et expérimentation animale. Etat de la question. Académie Vétérinaire de France. Montpellier, France, Académie Vétérinaire de France: 68.
- Commission "Relations Homme-Animaux" (2012). Recherche scientifique et expérimentation animale. Etat de la question. Académie Vétérinaire de France. Montpellier, France, Académie Vétérinaire de France: 68.
- Costa, F., S. Maia, *et al.* (2014). "Characterization of hLF1-11 immobilization onto chitosan ultrathin films, and its effects on antimicrobial activity." Acta biomaterialia **10**: 3513-3521.
- Courvalin, P. (2006). Détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricide en milieu liquide. Antibiogramme. P. Courvalin, R. Leclercq and E. Bingen. Paris, ESKA: 653-666.
- Craig, W. A. (1998). "Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men." Clin Infect Dis **26**(1): 1-10; quiz 11-12.
- Craig, W. A. (2003). "Basic pharmacodynamics of antibacterials with clinical applications to the use of beta-lactams, glycopeptides, and linezolid." Infect Dis Clin North Am **17**(3): 479-501.
- Craig, W. A. and D. R. Andes (2013). "In vivo activities of ceftolozane, a new cephalosporin, with and without tazobactam against *Pseudomonas aeruginosa* and Enterobacteriaceae, including strains with extended-spectrum beta-lactamases, in the thighs of neutropenic mice." Antimicrob Agents Chemother **57**(4): 1577-1582.
- Crandon, J. L., C. C. Bulik, *et al.* (2009). "In vivo efficacy of 1- and 2-gram human simulated prolonged infusions of doripenem against *Pseudomonas aeruginosa*." Antimicrobial agents and chemotherapy **53**: 4352-4356.
- Croisier, D., P. Chavanet, *et al.* (2002). "Efficacy and pharmacodynamics of simulated human-like treatment with levofloxacin on experimental pneumonia induced with penicillin-resistant pneumococci with various susceptibilities to fluoroquinolones." J Antimicrob Chemother **50**(3): 349-360.
- Curtis, N. A., D. Orr, *et al.* (1979). "Competition of beta-lactam antibiotics for the penicillin-binding proteins of *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella aerogenes*, *Proteus rettgeri*, and *Escherichia coli*: comparison with antibacterial activity and effects upon bacterial morphology." Antimicrobial agents and chemotherapy **16**(3): 325-328.
- Dailly, E., R. Bouquie, *et al.* (2011). "A liquid chromatography assay for a quantification of doripenem, ertapenem, imipenem, meropenem concentrations in human plasma: application to a clinical

- pharmacokinetic study." Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences **879**: 1137-1142.
- Davies, T. A., W. Shang, *et al.* (2008). "Affinity of doripenem and comparators to penicillin-binding proteins in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*." Antimicrobial agents and chemotherapy **52**(4): 1510-1512.
- Digumarti, R., Y. Wang, *et al.* (2011). "A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase II study of oral talactoferrin in combination with carboplatin and paclitaxel in previously untreated locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer." Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer **6**: 1098-1103.
- Domingues, M. M., P. M. Silva, *et al.* (2014). "Antimicrobial protein rBPI21-induced surface changes on Gram-negative and Gram-positive bacteria." Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine **10**: 543-551.
- Drawz, S. M. and R. A. Bonomo (2010). "Three decades of beta-lactamase inhibitors." Clinical microbiology reviews **23**.
- Drusano, G. L. (2004a). "Antimicrobial pharmacodynamics: critical interactions of 'bug and drug'." Nature reviews. Microbiology **2**(4): 289-300.
- Drusano, G. L., W. Liu, *et al.* (2009). "Differing effects of combination chemotherapy with meropenem and tobramycin on cell kill and suppression of resistance of wild-type *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and its isogenic MexAB efflux pump-overexpressed mutant." Antimicrob Agents Chemother **53**(6): 2266-2273.
- Drusano, G. L., S. L. Preston, *et al.* (2004b). "Relationship between fluoroquinolone area under the curve: minimum inhibitory concentration ratio and the probability of eradication of the infecting pathogen, in patients with nosocomial pneumonia." The Journal of infectious diseases **189**: 1590-1597.
- Dyson, A. and M. Singer (2009). "Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting?" Crit Care Med **37**(1 Suppl): S30-37.
- EAGLE, H., R. FLEISCHMAN, *et al.* (1953). "'Continuous' vs. 'discontinuous' therapy with penicillin; the effect of the interval between injections on therapeutic efficacy." The New England journal of medicine **248**: 481-488.
- EAGLE, H., R. FLEISCHMAN, *et al.* (1950a). "Effect of schedule of administration on the therapeutic efficacy of penicillin; importance of the aggregate time penicillin remains at effectively bactericidal levels." The American journal of medicine **9**: 280-299.
- EAGLE, H., R. FLEISCHMAN, *et al.* (1950b). "The effective concentrations of penicillin in vitro and in vivo for streptococci, pneumococci, and *Treponema pallidum*." Journal of bacteriology **59**: 625-643.
- Engelmayer, J., P. Blezinger, *et al.* (2008). "Talactoferrin stimulates wound healing with modulation of inflammation." The Journal of surgical research **149**: 278-286.
- EUCAST and CASFM (2012). European Manual of Clinical Microbiology, Vivactis Plus.
- European Centre for Disease Control (2012). Summary of the latest data on antibiotic resistance in the European Union. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Stockholm, European Centre for Disease Prevention and Control,: 7.
- European Centre for Disease Control and European Medicine Agency (2009). The bacterial challenge: time to react. European Centre for Disease Prevention and Control. Stockholm, European Centre for Disease Prevention and Control,: 54.
- Faber, C., H. P. Stallmann, *et al.* (2005). "Comparable efficacies of the antimicrobial peptide human lactoferrin 1-11 and gentamicin in a chronic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis model." Antimicrobial agents and chemotherapy **49**: 2438-2444.
- Farra, A., S. Islam, *et al.* (2008). "Role of outer membrane protein OprD and penicillin-binding proteins in resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem and meropenem." International journal of antimicrobial agents **31**(5): 427-433.

- Farrell, D. J., R. K. Flamm, *et al.* (2013). "Antimicrobial activity of ceftolozane-tazobactam tested against Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* with various resistance patterns isolated in U.S. Hospitals (2011-2012)." Antimicrobial agents and chemotherapy **57**: 6305-6310.
- Farrell, D. J., H. S. Sader, *et al.* (2014). "Ceftolozane/tazobactam activity tested against Gram-negative bacterial isolates from hospitalised patients with pneumonia in US and European medical centres (2012)." International journal of antimicrobial agents **43**: 533-539.
- Flores-Villasenor, H., A. Canizalez-Roman, *et al.* (2012a). "Lactoferrin and lactoferrin chimera inhibit damage caused by enteropathogenic *Escherichia coli* in HEp-2 cells." Biochimie **94**: 1935-1942.
- Flores-Villasenor, H., A. Canizalez-Roman, *et al.* (2010). "Bactericidal effect of bovine lactoferrin, LFcin, LFampin and LFchimera on antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*." Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine **23**: 569-578.
- Flores-Villasenor, H., A. Canizalez-Roman, *et al.* (2012b). "Protective effects of lactoferrin chimera and bovine lactoferrin in a mouse model of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection." Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire **90**: 405-411.
- Forrest, A., D. E. Nix, *et al.* (1993). "Pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin in seriously ill patients." Antimicrobial agents and chemotherapy **37**: 1073-1081.
- Fritsche, T. R., M. G. Stilwell, *et al.* (2005). "Antimicrobial activity of doripenem (S-4661): a global surveillance report (2003)." Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases **11**: 974-984.
- Gaspar, M. C., W. Couet, *et al.* (2013). "*Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis lung disease and new perspectives of treatment: a review." European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology **32**: 1231-1252.
- Ge, Y., M. J. Whitehouse, *et al.* (2010). "Pharmacokinetics and safety of CXA-101, a new antipseudomonal cephalosporin, in healthy adult male and female subjects receiving single- and multiple-dose intravenous infusions." Antimicrob Agents Chemother **54**(8): 3427-3431.
- Gilbert, D. (2008). ""The truth, if it exists, is in the details"." Critical care medicine **36**: 1368-1369.
- Giroir, B. P., P. J. Scannon, *et al.* (2001). "Bactericidal/permeability-increasing protein--lessons learned from the phase III, randomized, clinical trial of rBPI21 for adjunctive treatment of children with severe meningococemia." Critical care medicine **29**: S130-135.
- Godoy-Gallardo, M., C. Mas-Moruno, *et al.* (2014). "Covalent immobilization of hLf1-11 peptide on a titanium surface reduces bacterial adhesion and biofilm formation." Acta biomaterialia **10**: 3522-3534.
- Guery, B.-P. (2009). "[Doripenem: need for a new carbapenem]." Medecine et maladies infectieuses **39**: 871-876.
- Gugel, J., A. Dos Santos Pereira, *et al.* (2006). "beta-Lactam MICs correlate poorly with mutant prevention concentrations for clinical isolates of *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*." Antimicrobial agents and chemotherapy **50**: 2276-2277.
- Guilhelmelli, F., N. Vilela, *et al.* (2013). "Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance." Frontiers in microbiology **4**: 353.
- Guntupalli, K., N. Dean, *et al.* (2013). "A phase 2 randomized, double-blind, placebo-controlled study of the safety and efficacy of talactoferrin in patients with severe sepsis." Critical care medicine **41**: 706-716.
- Habash, M. B., A. J. Park, *et al.* (2014). "Synergy of Silver Nanoparticles and Aztreonam against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilms." Antimicrobial agents and chemotherapy.
- Hadinoto, K. and W. S. Cheow (2014). "Nano-antibiotics in chronic lung infection therapy against *Pseudomonas aeruginosa*." Colloids and surfaces. B, Biointerfaces **116**: 772-785.
- Hagihara, M., J. L. Kutti, *et al.* (2012). "Predicting doripenem susceptibility based on meropenem and imipenem interpretation for *Pseudomonas aeruginosa*." Diagnostic microbiology and infectious disease **72**: 258-262.

- Haney, E. F., K. Nazmi, *et al.* (2012). "Structural and biophysical characterization of an antimicrobial peptide chimera comprised of lactoferricin and lactoferrampin." Biochimica et biophysica acta **1818**: 762-775.
- Harada, M., N. Inui, *et al.* (2013). "Pharmacokinetic analysis of doripenem in elderly patients with nosocomial pneumonia." International journal of antimicrobial agents **42**(2): 149-154.
- HAS (2009). Doripénème - Avis de la Commission de Transparence. Saint-Denis, France, Haute Autorité de Santé: 1-17.
- Haversen, L. A., I. Engberg, *et al.* (2000). "Human lactoferrin and peptides derived from a surface-exposed helical region reduce experimental Escherichia coli urinary tract infection in mice." Infection and immunity **68**: 5816-5823.
- Hayes, M. V. and D. C. Orr (1983). "Mode of action of ceftazidime: affinity for the penicillin-binding proteins of Escherichia coli K12, *Pseudomonas aeruginosa* and Staphylococcus aureus." The Journal of antimicrobial chemotherapy **12**(2): 119-126.
- Hede, K. (2014). "Antibiotic resistance: An infectious arms race." Nature **509**.
- Hinchliffe, P., C. Symmons Mf Fau - Hughes, *et al.* (2013). "Structure and operation of bacterial tripartite pumps." Annu. Rev. Microbiol. **67**(1545-3251 (Electronic)): 221–242.
- Hong, M. C., D. I. Hsu, *et al.* (2013). "Ceftolozane/tazobactam: a novel antipseudomonal cephalosporin and beta-lactamase-inhibitor combination." Infection and drug resistance **6**: 215-223.
- Jacqueline, C. (2003). Evaluation expérimentale des nouveaux anti-staphylococciques: corrélation in vitro - in vivo. Thèse de Doctorat, Université de Nantes.
- Jacqueline, C., A. Roquilly, *et al.* (2013). "Efficacy of ceftolozane in a murine model of *Pseudomonas aeruginosa* acute pneumonia: in vivo antimicrobial activity and impact on host inflammatory response." J Antimicrob Chemother **68**(1): 177-183.
- Jaruratanasirikul, S., N. Raungsri, *et al.* (2005). "Pharmacokinetics of imipenem in healthy volunteers following administration by 2 h or 0.5 h infusion." J Antimicrob Chemother **56**(6): 1163-1165.
- Jehl, F. (2014). CASFM: Recommandations 2014. EUCAST and SFM. Paris, Société Française de Microbiologie,; 114.
- Jehl, F., M. Chomarat, *et al.* (2012a). Les antibiotiques: classification, spectre et mécanismes d'action. De l'antibiogramme à la prescription. F. Jehl. Marcy l'Etoile, France, bioMérieux: 14-33.
- Jehl, F., M. Chomarat, *et al.* (2012b). Mécanismes de résistance chez les bactéries à Gram négatif. De l'antibiogramme à la prescription. F. Jehl. Marcy l'Etoile, France, bioMérieux: 56-77.
- Jehl, F. and D. Levêque (2009). "Perfusion continue des bêtalactamines : intérêts, inconvénients, modalités pratiques." Réanimation **18**(4): 343-352.
- Jonasch, E., W. M. Stadler, *et al.* (2008). "Phase 2 trial of talactoferrin in previously treated patients with metastatic renal cell carcinoma." Cancer **113**: 72-77.
- Jones, R. N., H. S. Sader, *et al.* (2007). "Selection of a surrogate beta-lactam testing agent for initial susceptibility testing of doripenem, a new carbapenem." Diagnostic microbiology and infectious disease **59**: 467-472.
- Juan, C., L. Zamorano, *et al.* (2010). "Activity of a new antipseudomonal cephalosporin, CXA-101 (FR264205), against carbapenem-resistant and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains." Antimicrob Agents Chemother **54**(2): 846-851.
- Kaminski, C., J.-F. Timsit, *et al.* (2011). "Impact of ureido/carboxypenicillin resistance on the prognosis of ventilator-associated pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*." Critical care (London, England) **15**.
- Kazemzadeh-Narbat, M., J. Kindrachuk, *et al.* (2010). "Antimicrobial peptides on calcium phosphate-coated titanium for the prevention of implant-associated infections." Biomaterials **31**: 9519-9526.
- Keel, R. A., C. A. Sutherland, *et al.* (2011). "Stability of doripenem, imipenem and meropenem at elevated room temperatures." International journal of antimicrobial agents **37**: 184-185.

- Kiem, S. and J. J. Schentag (2008). "Interpretation of antibiotic concentration ratios measured in epithelial lining fluid." Antimicrobial agents and chemotherapy **52**(1): 24-36.
- King, A. M., S. A. Reid-Yu, *et al.* (2014). "Aspergillomarasmine A overcomes metallo-beta-lactamase antibiotic resistance." Nature **510**(7506): 503-506.
- Kiratisin, P., A. Chongthaleong, *et al.* (2012). "Comparative in vitro activity of carbapenems against major Gram-negative pathogens: results of Asia-Pacific surveillance from the COMPACT II study." International journal of antimicrobial agents **39**: 311-316.
- Kitzis, M. D. (2006). Dosage des antibiotiques. Antibiogramme. P. Courvalin, R. Leclercq and E. Bingen. Paris, ESKA: 653-666.
- Knapp, S., M. J. Schultz, *et al.* (2005). "Pneumonia models and innate immunity to respiratory bacterial pathogens." Shock (Augusta, Ga.) **24 Suppl 1**: 12-18.
- Knaus, W. A., E. A. Draper, *et al.* (1985). "APACHE II: a severity of disease classification system." Critical care medicine **13**(10): 818-829.
- Koga, T., T. Abe, *et al.* (2005). "In vitro and in vivo antibacterial activities of CS-023 (RO4908463), a novel parenteral carbapenem." Antimicrobial agents and chemotherapy **49**(8): 3239-3250.
- Koga, T., N. Masuda, *et al.* (2008). "Potent in vitro activity of tomopenem (CS-023) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*." Antimicrobial agents and chemotherapy **52**: 2849-2854.
- Koga, T., C. Sugihara, *et al.* (2009). "Affinity of Tomopenem (CS-023) for penicillin-binding proteins in *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*." Antimicrobial agents and chemotherapy **53**: 1238-1241.
- Koh, A. Y., G. P. Priebe, *et al.* (2009). "Inescapable need for neutrophils as mediators of cellular innate immunity to acute *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia." Infection and immunity **77**: 5300-5310.
- Kollef, M. H., J. Chastre, *et al.* (2012a). "A randomized trial of 7-day doripenem versus 10-day imipenem-cilastatin for ventilator-associated pneumonia." Critical care (London, England) **16**.
- Kollef, M. H., J. Chastre, *et al.* (2014). "Global Prospective Epidemiologic and Surveillance Study of Ventilator-Associated Pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*." Critical care medicine.
- Kollef, M. H., C. W. Hamilton, *et al.* (2012b). "Economic impact of ventilator-associated pneumonia in a large matched cohort." Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America **33**(3): 250-256.
- Komuro, M., T. Maeda, *et al.* (1994). "Inhibition of the renal excretion of tazobactam by piperacillin." The Journal of antimicrobial chemotherapy **34**(4): 555-564.
- Kukavica-Ibrulj, I., A. Bragonzi, *et al.* (2008a). "In vivo growth of *Pseudomonas aeruginosa* strains PAO1 and PA14 and the hypervirulent strain LESB58 in a rat model of chronic lung infection." J Bacteriol **190**(8): 2804-2813.
- Kukavica-Ibrulj, I. and R. C. Levesque (2008b). "Animal models of chronic lung infection with *Pseudomonas aeruginosa*: useful tools for cystic fibrosis studies." Laboratory animals **42**(4): 389-412.
- Lacasse, P., K. Lauzon, *et al.* (2008). "Utilization of lactoferrin to fight antibiotic-resistant mammary gland pathogens." Journal of animal science **86**.
- Lavigne, J.-P., R. Bonnet, *et al.* (2004). "Post-antibiotic and post-beta-lactamase inhibitor effects of ceftazidime plus sulbactam on extended-spectrum beta-lactamase-producing Gram-negative bacteria." The Journal of antimicrobial chemotherapy **53**: 616-619.
- Lee, S. Y., J. L. Kutj, *et al.* (2007). "Cefepime pharmacodynamics in patients with extended spectrum beta-lactamase (ESBL) and non-ESBL infections." The Journal of infection **54**: 463-468.
- Lefebvre, M., C. Jacqueline, *et al.* (2010). "Efficacy of daptomycin combined with rifampicin for the treatment of experimental methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) acute osteomyelitis." International journal of antimicrobial agents **36**(6): 542-544.

- Leon-Sicaïros, N., U. A. Angulo-Zamudio, *et al.* (2014). "Bactericidal effect of bovine lactoferrin and synthetic peptide lactoferrin chimera in *Streptococcus pneumoniae* and the decrease in luxS gene expression by lactoferrin." *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine.*
- Leon-Sicaïros, N., A. Canizalez-Roman, *et al.* (2009). "Bactericidal effect of lactoferrin and lactoferrin chimera against halophilic *Vibrio parahaemolyticus*." *Biochimie* 91: 133-140.
- Levin, M., P. A. Quint, *et al.* (2000). "Recombinant bactericidal/permeability-increasing protein (rBPI21) as adjunctive treatment for children with severe meningococcal sepsis: a randomised trial. rBPI21 Meningococcal Sepsis Study Group." *Lancet* 356: 961-967.
- Lewis, M. A. and T. G. Hayes (2011). "Talactoferrin immunotherapy in metastatic renal cell carcinoma: a case series of four long-term survivors." *Journal of clinical medicine research* 3.
- Li, H., Y.-F. Luo, *et al.* (2012). "Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies." *International journal of medical microbiology : IJMM* 302: 63-68.
- Lindsay, S. A. and S. A. Wasserman (2014). "Conventional and non-conventional *Drosophila* Toll signaling." *Developmental & Comparative Immunology* 42(1): 16-24.
- Lipman, J., C. D. Gomersall, *et al.* (1999). "Continuous infusion ceftazidime in intensive care: a randomized controlled trial." *J Antimicrob Chemother* 43(2): 309-311.
- Livermore, D. M. (2002). "Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare?" *Clin Infect Dis* 34(5): 634-640.
- Livermore, D. M., R. Hope, *et al.* (2008). "Non-susceptibility trends among *Pseudomonas aeruginosa* and other non-fermentative Gram-negative bacteria from bacteraemias in the UK and Ireland, 2001-06." *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 62 Suppl 2.
- Livermore, D. M., S. Mushtaq, *et al.* (2010). "Chequerboard titration of cephalosporin CXA-101 (FR264205) and tazobactam versus beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae." *J Antimicrob Chemother* 65(9): 1972-1974.
- Livermore, D. M., S. Mushtaq, *et al.* (2009a). "Activity of cephalosporin CXA-101 (FR264205) against *Pseudomonas aeruginosa* and Burkholderia cepacia group strains and isolates." *Int J Antimicrob Agents* 34(5): 402-406.
- Livermore, D. M., S. Mushtaq, *et al.* (2009b). "Activity of the anti-MRSA carbapenem razupenem (PTZ601) against Enterobacteriaceae with defined resistance mechanisms." *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 64: 330-335.
- Llanes, C., C. Pourcel, *et al.* (2013). "Diversity of beta-lactam resistance mechanisms in cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: a French multicentre study." *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 68: 1763-1771.
- Lodise, T. P. J., N. Patel, *et al.* (2007). "Predictors of 30-day mortality among patients with *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: impact of delayed appropriate antibiotic selection." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51: 3510-3515.
- Lucasti, C., E. Hershberger, *et al.* (2014). "A Multicenter, Double-Blind, Randomized, Phase II Trial to Assess the Safety and Efficacy of Ceftolozane/Tazobactam plus Metronidazole Compared with Meropenem in Adult Patients with Complicated Intra-abdominal Infections." *Antimicrobial agents and chemotherapy.*
- Lucasti, C., A. Jasovich, *et al.* (2008). "Efficacy and tolerability of IV doripenem versus meropenem in adults with complicated intra-abdominal infection: a phase III, prospective, multicenter, randomized, double-blind, noninferiority study." *Clinical therapeutics* 30: 868-883.
- Luyt, C.-E., A. Aubry, *et al.* (2014). "Imipenem, meropenem, or doripenem to treat patients with *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 58: 1372-1380.
- Lyons, T. E., M. S. Miller, *et al.* (2007). "Talactoferrin alfa, a recombinant human lactoferrin promotes healing of diabetic neuropathic ulcers: a phase 1/2 clinical study." *American journal of surgery* 193.

- MacGowan, A. P., K. E. Bowker, *et al.* (2008). "Pharmacodynamics of the antibacterial effect and emergence of resistance to tomopenem, formerly RO4908463/CS-023, in an in vitro pharmacokinetic model of *Staphylococcus aureus* infection." Antimicrobial agents and chemotherapy **52**: 1401-1406.
- Madan, R. A., K.-Y. Tsang, *et al.* (2013). "Effect of talactoferrin alfa on the immune system in adults with non-small cell lung cancer." The oncologist **18**: 821-822.
- Magiorakos, A. P., A. Srinivasan, *et al.* (2012). "Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance." Clin Microbiol Infect **18**(3): 268-281.
- Mallalieu, N. L., S. Lennon, *et al.* (2009). "Lack of age and gender effects on single-dose pharmacokinetics of tomopenem (RO4908463/CS-023), a novel carbapenem." British journal of clinical pharmacology **67**: 469-472.
- Mallalieu, N. L., S. Lennon, *et al.* (2008). "Effect of impaired renal function on the pharmacokinetics of tomopenem (RO4908463/CS-023), a novel carbapenem." Antimicrobial agents and chemotherapy **52**(7): 2360-2366.
- Manduru, M., L. B. Mihm, *et al.* (1997). "In vitro pharmacodynamics of ceftazidime against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients." Antimicrob Agents Chemother **41**(9): 2053-2056.
- Martha, B., D. Croisier, *et al.* (2006). "In-vivo impact of the MexXY efflux system on aminoglycoside efficacy in an experimental model of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia treated with tobramycin." Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases **12**: 426-432.
- McCulloh, R. and S. M. Opal (2013). "Human recombinant lactoferrin for sepsis: too good to be true?." Critical care medicine **41**: 908-909.
- McKenna, M. (2013). "Antibiotic resistance: the last resort." Nature **499**(7459): 394-396.
- Merchant, S., C. Gast, *et al.* (2008). "Hospital resource utilization with doripenem versus imipenem in the treatment of ventilator-associated pneumonia." Clinical therapeutics **30**: 717-733.
- Meziane-Cherif, D. and P. Courvalin (2014). "Antibiotic resistance: to the rescue of old drugs." Nature **510**(7506): 477-478.
- Miller, B., E. Hershberger, *et al.* (2012). "Pharmacokinetics and safety of intravenous ceftolozane-tazobactam in healthy adult subjects following single and multiple ascending doses." Antimicrobial agents and chemotherapy **56**: 3086-3091.
- Mizgerd, J. P. and S. J. Skerrett (2008). "Animal models of human pneumonia." American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology **294**: L387-398.
- Moir, D. T., T. J. Opperman, *et al.* (2012). "New classes of antibiotics." Current opinion in pharmacology **12**(5): 535-544.
- Morata, L., N. Cobos-Trigueros, *et al.* (2012). "Influence of multidrug resistance and appropriate empirical therapy on the 30-day mortality rate of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia." Antimicrobial agents and chemotherapy **56**: 4833-4837.
- Morinaga, Y., K. Yanagihara, *et al.* (2008). "In vivo efficacy and pharmacokinetics of tomopenem (CS-023), a novel carbapenem, against *Pseudomonas aeruginosa* in a murine chronic respiratory tract infection model." The Journal of antimicrobial chemotherapy **62**: 1326-1331.
- Morita, Y., J. Tomida, *et al.* (2014). "Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials." Frontiers in microbiology **4**: 422.
- Mouton, J. W., D. F. J. Brown, *et al.* (2012). "The role of pharmacokinetics/pharmacodynamics in setting clinical MIC breakpoints: the EUCAST approach." Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases **18**.
- Mouton, J. W. and J. G. den Hollander (1994). "Killing of *Pseudomonas aeruginosa* during continuous and intermittent infusion of ceftazidime in an in vitro pharmacokinetic model." Antimicrob Agents Chemother **38**(5): 931-936.

- Moya, B., A. Beceiro, *et al.* (2012). "Pan-beta-lactam resistance development in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains: molecular mechanisms, penicillin-binding protein profiles, and binding affinities." Antimicrob Agents Chemother **56**(9): 4771-4778.
- Moya, B., L. Zamorano, *et al.* (2010a). "Affinity of the new cephalosporin CXA-101 to penicillin-binding proteins of *Pseudomonas aeruginosa*." Antimicrob Agents Chemother **54**(9): 3933-3937.
- Moya, B., L. Zamorano, *et al.* (2010b). "Activity of a new cephalosporin, CXA-101 (FR264205), against beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants selected in vitro and after antipseudomonal treatment of intensive care unit patients." Antimicrob Agents Chemother **54**(3): 1213-1217.
- Murdoch, D. A., S. Gibbs, *et al.* (1990). "Effect of ceftazidime and gentamicin on the oropharyngeal and faecal flora of patients with haematological malignancies." The Journal of antimicrobial chemotherapy **26**: 419-428.
- Musson, D. G., K. L. Birk, *et al.* (2003). "Assay methodology for the quantitation of unbound ertapenem, a new carbapenem antibiotic, in human plasma." Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences **783**.
- Naber, K. G., L. Llorens, *et al.* (2009). "Intravenous doripenem at 500 milligrams versus levofloxacin at 250 milligrams, with an option to switch to oral therapy, for treatment of complicated lower urinary tract infection and pyelonephritis." Antimicrobial agents and chemotherapy **53**: 3782-3792.
- Nandy, P., M. N. Samtani, *et al.* (2010). "Population pharmacokinetics of doripenem based on data from phase 1 studies with healthy volunteers and phase 2 and 3 studies with critically ill patients." Antimicrobial agents and chemotherapy **54**: 2354-2359.
- Nikolaidis, I., S. Favini-Stabile, *et al.* (2014). "Resistance to antibiotics targeted to the bacterial cell wall." Protein science : a publication of the Protein Society **23**(3): 243-259.
- Nordmann, P., J. J. Picazo, *et al.* (2011). "Comparative activity of carbapenem testing: the COMPACT study." The Journal of antimicrobial chemotherapy **66**: 1070-1078.
- Oberhardt, M. A., J. Puchalka, *et al.* (2008). "Genome-scale metabolic network analysis of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PAO1." J Bacteriol **190**(8): 2790-2803.
- Olofsson, S. K., L. L. Marcusson, *et al.* (2007). "Dose-related selection of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli*." J Antimicrob Chemother **60**(4): 795-801.
- Patel, S. J., A. P. Oliveira, *et al.* (2014). "Risk factors and outcomes of infections caused by extremely drug-resistant gram-negative bacilli in patients hospitalized in intensive care units." American journal of infection control **42**: 626-631.
- Paterson, D. L. and D. D. Depestele (2009). "Doripenem." Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America **49**: 291-298.
- Pena, C., S. Gomez-Zorrilla, *et al.* (2013). "Impact of multidrug resistance on *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia outcome: predictors of early and crude mortality." European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology **32**: 413-420.
- Perel, P., I. Roberts, *et al.* (2007). "Comparison of treatment effects between animal experiments and clinical trials: systematic review." BMJ **334**(7586): 197.
- Perrin, S. (2014). "Preclinical research: Make mouse studies work." Nature **507**(7493): 423-425.
- Pham, L. H., C. Brun-Buisson, *et al.* (1991). "Diagnosis of nosocomial pneumonia in mechanically ventilated patients. Comparison of a plugged telescoping catheter with the protected specimen brush." The American review of respiratory disease **143**(5 Pt 1): 1055-1061.
- Piroth, L., L. Martin, *et al.* (1999). "Development of a new experimental model of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* pneumonia and amoxicillin treatment by reproducing human pharmacokinetics." Antimicrob Agents Chemother **43**(10): 2484-2492.
- Planquette, B., J. F. Timsit, *et al.* (2013). "*Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia. predictive factors of treatment failure." Am J Respir Crit Care Med **188**(1): 69-76.

- Poli-de-Figueiredo, L. F., A. G. Garrido, *et al.* (2008). "Experimental models of sepsis and their clinical relevance." Shock (Augusta, Ga.) **30 Suppl 1**: 53-59.
- Potel, G. (2005). "« Nouveaux » antibiotiques : entre AMM et Réalité clinique, comment en finir avec le double langage ?" Antibiotiques **7(4)**: 211-212.
- Potel, G., C. Jacqueline, *et al.* (2010). "Les modèles expérimentaux animaux peuvent-ils contribuer à la bonne utilisation des antibiotiques ?" Antibiotiques **12**: 131-135.
- Psathas, P. A., A. Kuzmission, *et al.* (2008). "Stability of doripenem in vitro in representative infusion solutions and infusion bags." Clinical therapeutics **30**: 2075-2087.
- Pugin, J., R. Auckenthaler, *et al.* (1991). "Diagnosis of ventilator-associated pneumonia by bacteriologic analysis of bronchoscopic and nonbronchoscopic "blind" bronchoalveolar lavage fluid." The American review of respiratory disease **143**: 1121-1129.
- Ramalingam, S., J. Crawford, *et al.* (2013). "Talactoferrin alfa versus placebo in patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer (FORTIS-M trial)." Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO **24**: 2875-2880.
- Rea-Neto, A., M. Niederman, *et al.* (2008). "Efficacy and safety of doripenem versus piperacillin/tazobactam in nosocomial pneumonia: a randomized, open-label, multicenter study." Current medical research and opinion **24**: 2113-2126.
- Remick, D. G. and P. A. Ward (2005). "Evaluation of endotoxin models for the study of sepsis." Shock (Augusta, Ga.) **24 Suppl 1**: 7-11.
- Riera, E., G. Cabot, *et al.* (2011). "*Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem." J Antimicrob Chemother **66(9)**: 2022-2027.
- Roberts, J. A. (2011). "Using PK/PD to optimize antibiotic dosing for critically ill patients." Curr Pharm Biotechnol **12(12)**: 2070-2079.
- Roberts, J. A., P. Kruger, *et al.* (2008). "Antibiotic resistance--what's dosing got to do with it?" Crit Care Med **36(8)**: 2433-2440.
- Roberts, J. A. and J. Lipman (2009). "Pharmacokinetic issues for antibiotics in the critically ill patient." Crit Care Med **37(3)**: 840-851; quiz 859.
- Roberts, J. A. and J. Lipman (2013). "Optimal doripenem dosing simulations in critically ill nosocomial pneumonia patients with obesity, augmented renal clearance, and decreased bacterial susceptibility." Critical care medicine **41**: 489-495.
- Sader, H. S., D. J. Farrell, *et al.* (2014a). "Antimicrobial activity of ceftolozane/tazobactam tested against *Pseudomonas aeruginosa* and Enterobacteriaceae with various resistance patterns isolated in European hospitals (2011-12)." The Journal of antimicrobial chemotherapy.
- Sader, H. S., D. J. Farrell, *et al.* (2014b). "Ceftolozane/tazobactam activity tested against aerobic Gram-negative organisms isolated from intra-abdominal and urinary tract infections in European and United States hospitals (2012)." The Journal of infection.
- Sader, H. S., P. R. Rhomberg, *et al.* (2011). "Antimicrobial activity of CXA-101, a novel cephalosporin tested in combination with tazobactam against Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Bacteroides fragilis* strains having various resistance phenotypes." Antimicrobial agents and chemotherapy **55**: 2390-2394.
- Sader, H. S., P. R. Rhomberg, *et al.* (2014c). "Post-beta-lactamase-inhibitor effect of tazobactam in combination with ceftolozane on extended-spectrum-beta-lactamase-producing strains." Antimicrobial agents and chemotherapy **58**: 2434-2437.
- Sainsbury, S., L. Bird, *et al.* (2011). "Crystal structures of penicillin-binding protein 3 from *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of native and antibiotic-bound forms." Journal of molecular biology **405(1)**: 173-184.

- Savey, A. and A. Machut (2013). Résultats 2012. Surveillance des infections nosocomiales en réanimation adulte. DMI. France, Réseau REA-Raisin: 38.
- Scaglione, F., S. Esposito, *et al.* (2009). "Feedback dose alteration significantly affects probability of pathogen eradication in nosocomial pneumonia." The European respiratory journal **34**.
- Schultz, M. J. and T. van der Poll (2002). "Animal and human models for sepsis." Annals of medicine **34**: 573-581.
- Sharma, G., S. Rao, *et al.* (2014). "*Pseudomonas aeruginosa* biofilm: potential therapeutic targets." Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization **42**.
- Shen, D. D., A. A. Artru, *et al.* (2004). "Principles and applicability of CSF sampling for the assessment of CNS drug delivery and pharmacodynamics." Advanced drug delivery reviews **56**(12): 1825-1857.
- Shibayama, T., Y. Matsushita, *et al.* (2006a). "Pharmacokinetics of CS-023 (RO4908463), a novel parenteral carbapenem, in healthy male Caucasian volunteers." Antimicrobial agents and chemotherapy **50**(12): 4186-4188.
- Shibayama, T., Y. Matsushita, *et al.* (2007a). "Pharmacokinetics and disposition of CS-023 (RO4908463), a novel parenteral carbapenem, in animals." Antimicrobial agents and chemotherapy **51**: 257-263.
- Shibayama, T., Y. Matsushita, *et al.* (2007b). "Prediction of pharmacokinetics of CS-023 (RO4908463), a novel parenteral carbapenem antibiotic, in humans using animal data." Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems **37**.
- Shibayama, T., D. Sugiyama, *et al.* (2007c). "Characterization of CS-023 (RO4908463), a novel parenteral carbapenem antibiotic, and meropenem as substrates of human renal transporters." Drug metabolism and pharmacokinetics **22**: 41-47.
- Shibayama, T., N. Yamamura, *et al.* (2006b). "Renal handling of CS-023 (RO4908463), a novel parenteral carbapenem antibiotic, in rabbits in comparison with meropenem." Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems **36**: 1273-1287.
- Shorr, A. F. and M. D. Zilberberg (2014). "Augmented renal clearance: an augmented definition of appropriate antibiotic therapy?" Critical care medicine **42**(3): 728-729.
- Smith, J. D., M. Kumarasiri, *et al.* (2013). "Structural analysis of the role of *Pseudomonas aeruginosa* penicillin-binding protein 5 in beta-lactam resistance." Antimicrobial agents and chemotherapy **57**(7): 3137-3146.
- Snydman, D. R., L. A. McDermott, *et al.* (2014). "Activity of ceftolozane-tazobactam against a broad spectrum of recent clinical anaerobic isolates." Antimicrobial agents and chemotherapy **58**(2): 1218-1223.
- Sobhanifar, S., D. T. King, *et al.* (2013). "Fortifying the wall: synthesis, regulation and degradation of bacterial peptidoglycan." Current opinion in structural biology **23**.
- Soussy, C. J. (2009). Recommandations 2009 Comité de l'antibiogramme. Société Française de Microbiologie.
- Srivastava, A., H. Casey, *et al.* (2007). "Recombinant bactericidal/permeability-increasing protein rBPI21 protects against pneumococcal disease." Infection and immunity **75**: 342-349.
- Stallmann, H. P., R. de Roo, *et al.* (2008). "In vivo release of the antimicrobial peptide hLF1-11 from calcium phosphate cement." Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society **26**: 531-538.
- Stallmann, H. P., C. Faber, *et al.* (2005). "Histatin and lactoferrin derived peptides: antimicrobial properties and effects on mammalian cells." Peptides **26**: 2355-2359.
- Stallmann, H. P., C. Faber, *et al.* (2004). "Osteomyelitis prevention in rabbits using antimicrobial peptide hLF1-11- or gentamicin-containing calcium phosphate cement." The Journal of antimicrobial chemotherapy **54**: 472-476.
- Stallmann, H. P., C. Faber, *et al.* (2003). "Continuous-release or burst-release of the antimicrobial peptide human lactoferrin 1-11 (hLF1-11) from calcium phosphate bone substitutes." The Journal of antimicrobial chemotherapy **52**: 853-855.

- Stefanescu, B. M., C. Hetu, *et al.* (2013). "A pilot study of Biotene OralBalance(R) gel for oral care in mechanically ventilated preterm neonates." Contemporary clinical trials **35**(2): 33-39.
- Stover, C. K., X. Q. Pham, *et al.* (2000). "Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen." Nature **406**(6799): 959-964.
- Sugihara, K., C. Sugihara, *et al.* (2010). "In vivo pharmacodynamic activity of tomopenem (formerly CS-023) against *Pseudomonas aeruginosa* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a murine thigh infection model." Antimicrobial agents and chemotherapy **54**(12): 5298-5302.
- Sugihara, K., K. Tateda, *et al.* (2011). "Efficacy of human-simulated exposures of tomopenem (formerly CS-023) in a murine model of *Pseudomonas aeruginosa* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection." Antimicrobial agents and chemotherapy **55**(11): 5004-5009.
- Takeda, S., Y. Ishii, *et al.* (2007a). "Stability of FR264205 against AmpC beta-lactamase of *Pseudomonas aeruginosa*." International journal of antimicrobial agents **30**: 443-445.
- Takeda, S., T. Nakai, *et al.* (2007b). "In vitro and in vivo activities of a new cephalosporin, FR264205, against *Pseudomonas aeruginosa*." Antimicrobial agents and chemotherapy **51**: 826-830.
- Tam, V. H., C. A. Rogers, *et al.* (2010). "Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia on patient outcomes." Antimicrobial agents and chemotherapy **54**: 3717-3722.
- Tanaka, K., H. Mikamo, *et al.* (2009). "In vitro activity of tomopenem (CS-023/RO4908463) against anaerobic bacteria." Antimicrobial agents and chemotherapy **53**(1): 319-322.
- Thomas, J. K., A. Forrest, *et al.* (1998). "Pharmacodynamic evaluation of factors associated with the development of bacterial resistance in acutely ill patients during therapy." Antimicrob Agents Chemother **42**(3): 521-527.
- Thomson, K. S. and E. S. Moland (2004). "CS-023 (R-115685), a novel carbapenem with enhanced in vitro activity against oxacillin-resistant staphylococci and *Pseudomonas aeruginosa*." The Journal of antimicrobial chemotherapy **54**: 557-562.
- Thorburn, C. E., S. J. Molesworth, *et al.* (1996). "Postantibiotic and post-beta-lactamase inhibitor effects of amoxicillin plus clavulanate." Antimicrobial agents and chemotherapy **40**: 2796-2801.
- Timsit, J.-F., J.-R. Zahar, *et al.* (2011). "Attributable mortality of ventilator-associated pneumonia." Current opinion in critical care **17**: 464-471.
- Titelman, E., I. M. Karlsson, *et al.* (2011). "In vitro activity of CXA-101 plus tazobactam (CXA-201) against CTX-M-14- and." Diagnostic microbiology and infectious disease **70**: 137-141.
- Tomozawa, T., C. Sugihara, *et al.* (2010). "In vitro postantibiotic effects of tomopenem (CS-023) against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*." Journal of medical microbiology **59**: 438-441.
- Tumbarello, M., G. De Pascale, *et al.* (2013). "Clinical outcomes of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in intensive care unit patients." Intensive care medicine **39**: 682-692.
- Tumbarello, M., E. Repetto, *et al.* (2011). "Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: risk factors and mortality." Epidemiology and infection **139**: 1740-1749.
- Turnbull, I. R., J. J. Wlczek, *et al.* (2003). "Effects of age on mortality and antibiotic efficacy in cecal ligation and puncture." Shock (Augusta, Ga.) **19**(4): 310-313.
- Udy, A. A., J. P. Baptista, *et al.* (2014). "Augmented renal clearance in the ICU: results of a multicenter observational study of renal function in critically ill patients with normal plasma creatinine concentrations." Critical care medicine **42**(3): 520-527.
- Udy, A. A., J. A. Roberts, *et al.* (2012). "What's behind the failure of emerging antibiotics in the critically ill? Understanding the impact of altered pharmacokinetics and augmented renal clearance." International journal of antimicrobial agents **39**(6): 455-457.
- Udy, A. A., J. A. Roberts, *et al.* (2013). "Clinical implications of antibiotic pharmacokinetic principles in the critically ill." Intensive Care Med **39**(12): 2070-2082.

- van der Does, A. M., S. J. P. Bogaards, *et al.* (2010a). "The human lactoferrin-derived peptide hLF1-11 primes monocytes for an enhanced." *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 23.
- van der Does, A. M., S. J. P. Bogaards, *et al.* (2010b). "Antimicrobial peptide hLF1-11 directs granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-driven monocyte differentiation toward macrophages with enhanced recognition and clearance of pathogens." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54: 811-816.
- van der Does, A. M., P. J. Hensbergen, *et al.* (2012a). "The human lactoferrin-derived peptide hLF1-11 exerts immunomodulatory effects by specific inhibition of myeloperoxidase activity." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 188: 5012-5019.
- van der Does, A. M., S. A. Joosten, *et al.* (2012b). "The antimicrobial peptide hLF1-11 drives monocyte-dendritic cell differentiation toward dendritic cells that promote antifungal responses and enhance Th17 polarization." *Journal of innate immunity* 4: 284-292.
- van Heeckeren, A. M. and M. D. Schluchter (2002). "Murine models of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection." *Laboratory animals* 36(3): 291-312.
- Van Wart, S. A., D. R. Andes, *et al.* (2009). "Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling to support doripenem dose regimen optimization for critically ill patients." *Diagnostic microbiology and infectious disease* 63: 409-414.
- van Zanten, A. R. H. and Y. G. van der Meer (2013). "Prolonged infusion of carbapenems in critically ill patients: time to extend our practice." *Critical care medicine* 41: 676-677.
- Vanscoy, B., R. E. Mendes, *et al.* (2013). "Pharmacological basis of beta-lactamase inhibitor therapeutics: tazobactam in combination with Ceftolozane." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 57(12): 5924-5930.
- Velden, W. J., T. M. van Iersel, *et al.* (2009). "Safety and tolerability of the antimicrobial peptide human lactoferrin 1-11 (hLF1-11)." *BMC medicine* 7: 44.
- Vogelman, B., S. Gudmundsson, *et al.* (1988). "Correlation of antimicrobial pharmacokinetic parameters with therapeutic efficacy in an animal model." *J Infect Dis* 158(4): 831-847.
- Walkty, A., J. A. Karlowsky, *et al.* (2013). "In vitro activity of ceftolozane-tazobactam against *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from patients in Canadian hospitals in the CANWARD study, 2007 to 2012." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 57(11): 5707-5709.
- WHO (2014). Antimicrobial Resistance Global Report on surveillance. World Health Organization. Geneva, Switzerland, World Health Organization,: 256.
- Wilke, M. S., A. L. Lovering, *et al.* (2005). "Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective." *Current opinion in microbiology* 8: 525-533.
- Wooley, M., B. Miller, *et al.* (2014). "Impact of renal function on the pharmacokinetics and safety of ceftolozane-tazobactam." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 58: 2249-2255.
- Zamorano, L., C. Juan, *et al.* (2010). "Activity of the new cephalosporin CXA-101 (FR264205) against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically-infected cystic fibrosis patients." *Clin Microbiol Infect* 16(9): 1482-1487.
- Zhanel, G. G., R. Wiebe, *et al.* (2007). "Comparative review of the carbapenems." *Drugs* 67(7): 1027-1052.
- Zhang, L.-t., Y.-m. Yao, *et al.* (2008). "Recombinant bactericidal/permeability-increasing protein inhibits endotoxin-induced high-mobility group box 1 protein gene expression in sepsis." *Shock (Augusta, Ga.)* 29: 278-284.
- Zhao, X. and K. Drlica (2001). "Restricting the selection of antibiotic-resistant mutants: a general strategy derived from fluoroquinolone studies." *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 33 Suppl 3: S147-156.

Abréviations

Abréviation	Signification	Remarque
BLSE	bêtalactamase à spectre étendu	
C3G	céphalosporine de troisième génération	
C ^{ase}	céphalosporinase	
CAZ	ceftazidime	
CAZ	ceftazidime	
CF	cystic fibrosis	mucoviscidose
CMI(s)	Concentration(s) Minimale(s) Inhibitrice(s)	
DOC	acide déoxycholique	
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing	
FQ	fluoroquinolones	
IBL	inhibiteur de bêtalactamase	
IGS2	Indice de Gravité Simplifié 2	
IVSE	intraveineux à la seringue électrique	traitement administré en continu par voie intraveineuse
MDR	multi-drug resistance	
ME	erreur majeure	major error
mE	erreur mineure	minor erreur
MO	microscopie optique	
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
PAVM	pneumonie associée à la ventilation	
PDR	pan-drug resistance	
PG	peptidoglycane	
SFM	Société Française de Microbiologie	
UFC	Unité Formant Colonie	ou CFU pour colony forming unit
VME	erreur vraiment majeure	very major error
XDR	extensively drug resistance	

Annexes

Centers for Disease Control and Prevention (2013). Antibiotic Resistance Threats in the United States. U.S. Department of Health and Human Services. USA, Centers for Diseases Control and Prevention,; 114 pages.

Clinicaltrials : récapitulatif des différentes études enregistrées concernant les nouveaux traitements antibiotiques cités ; fichier .xlsx

Commission "Relations Homme-Animaux" (2012). Recherche scientifique et expérimentation animale. Etat de la question. Académie Vétérinaire de France. Montpellier, France, Académie Vétérinaire de France: 68 pages.

Directive 2010/63/UE du Parlement Européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. 47 pages.

European Centre for Disease Control and European Medicine Agency (2009). The bacterial challenge: time to react. European Centre for Disease Prevention and Control. Stockholm, European Centre for Disease Prevention and Control,; 54 pages.

European Centre for Disease Control (2013). Summary of the latest data on antibiotic resistance in the European Union. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Stockholm, European Centre for Disease Prevention and Control,; 218 pages.

WHO (2014). Antimicrobial Resistance Global Report on surveillance. World Health Organization. Geneva, Switzerland, World Health Organization,; 256 pages.

Thèse de Doctorat

CÉDRIC BRETONNIÈRE

Pneumonies à *Pseudomonas aeruginosa* : Données expérimentales, pharmacologiques et microbiologiques

Les pneumonies, notamment nosocomiales, sont fréquentes et grevées d'une mortalité et d'une morbidité élevées. *Pseudomonas aeruginosa* est au premier rang des bactéries responsables de ces infections et pose des problèmes préoccupants d'émergence de résistance aux antibiotiques. Dès lors, toute donnée microbiologique ou expérimentale pertinente est utile.

Dans un premier temps, à partir d'un modèle d'infection pulmonaire aiguë chez le lapin, dont la particularité est la reproduction fidèle de la pharmacologie humaine, nous avons tenté de mettre au point un nouveau modèle d'infection pulmonaire chronique en utilisant une solution bactérienne avec des microbilles d'agarose.

Nous avons utilisé le modèle d'infection aiguë pour évaluer l'efficacité de nouvelles molécules antibiotiques contre *Pseudomonas aeruginosa*. Ainsi, le dernier antibiotique de la classe des carbapénèmes, le doripénème, à différentes posologies et modes d'administration IV, a été comparé en termes d'efficacité aux 2 molécules de références, le méropénème et l'imipénème. Nous avons pu montrer que les posologies plus élevées de doripénème devaient être privilégiées.

Nous avons également, dans ce même modèle, montré l'efficacité du ceftolozane. Cette nouvelle céphalosporine est aussi efficace que les comparateurs (ceftazidime, pipéracilline/tazobactam et imipénème) à posologie « usuelle » (1gX3/j) et plus efficace à doses plus élevées (2gX3/j).

Enfin, nous avons comparé la sensibilité *in vitro* de 169 souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis des 3 carbapénèmes cités ci-dessus (imipénème, méropénème et doripénème) démontrant que ces 3 molécules sont au final assez proches.

***Pseudomonas aeruginosa* pneumonia: experimental, pharmacological and microbiological data**

Pneumonia, especially hospital acquired, is frequent and accounts for both high mortality and high morbidity. *Pseudomonas aeruginosa* is the main bacteria responsible for these infections and is cause for concern with emerging antibiotic resistance. Therefore, any relevant microbiological or experimental data may be useful.

From an experimental model of acute lung infection in rabbits, whose particularity is the faithful reproduction of human pharmacology, we tried try to develop a new model of chronic pulmonary infection by using a bacterial solution with agarose micro-beads. The results of these experiments are presented.

We used the acute infection experimental model to evaluate the efficacy of new antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*. Thus, doripenem, lasted available carbapenem, at different doses and routes of IV administration, was compared to the two reference drugs, meropenem and imipenem. We have shown that higher doses of doripenem should be preferred.

We also, in the same acute model, evaluated the efficacy of ceftolozane, newer cephalosporin, versus the following drugs: ceftazidime, piperacillin / tazobactam and imipenem. At usual doses (1g thrice a day), ceftolozane showed the same efficacy than comparators and a higher efficacy when higher doses were used (2g TID).

Finally, we compared the *in vitro* susceptibility of 169 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* to the three mentioned above carbapenems (imipenem, meropenem and doripenem) demonstrating that these three drugs are actually quite close.

