

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES

COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : Pharmacologie

Par

Matthieu GREGOIRE

Optimisation de l'utilisation des céphalosporines en curatif et préventif d'infections bactériennes à partir de données PK/PD, de la pharmacocinétique de population, de simulations et d'une analyse du microbiote intestinal

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 21 novembre 2018

Unité de recherche: INSERM UMR1235 TENS - The enteric nervous system in gut and brain

Rapporteurs avant soutenance :

Pierre Marquet

Professeur des universités - Praticien hospitalier, Université de Limoges

Gilles Paintaud

Professeur des universités - Praticien hospitalier, Université de Tours

Composition du Jury :

Président :

Examineurs : Pascale Jolliet

Michel Neunlist

Marie-C. Verdier

Professeur des universités - Praticien hospitalier, Université de Nantes

Directeur de recherche, Université de Nantes

Maître de conférences des universités – Praticien hospitalier, Université de Rennes

Dir. de thèse : Eric Dailly

Professeur des universités - Praticien hospitalier, Université de Nantes

A Gwennan, merci pour ce que tu es, je t'admire, tu es l'épaule sur laquelle je peux me reposer dans la difficulté et celle avec qui partager les bonheurs de la vie.

A Maël, trésor de ma vie, chaque jour ton caractère curieux et gourmand est un bonheur.

A ma famille, parents, frère et sœur, grands-parents, vous qui m'avez inspiré et accompagné dans toutes ces aventures, je vous dois en grande partie ce travail de thèse.

Remerciements

À monsieur le Professeur Pierre Marquet, rapporteur

Cher Maître, je vous remercie de l'honneur que vous me faites en acceptant d'être rapporteur de mon travail. Votre très grande expertise sur le suivi thérapeutique pharmacologique et sur les modèles de population enrichira la réflexion de ce travail de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de toute ma gratitude et de mon profond respect.

À monsieur le Professeur Gilles Paintaud, rapporteur

Cher Maître, je vous remercie de l'honneur que vous me faites en ayant accepté spontanément d'être rapporteur de mon travail. Votre large culture pharmacologique, en particulier sur la modélisation pharmacocinétique, sera précieuse pour juger ce travail de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de toute ma gratitude et de mon profond respect.

À madame le Professeur Pascale Jolliet, examinateur

Madame, je vous remercie pour l'honneur que vous me faites de participer à ce jury mais surtout pour votre rôle de guide, toujours bienveillant, dans mon aventure professionnelle. Veuillez trouver ici l'expression de mon immense reconnaissance.

À madame le Docteur Marie-Clémence Verdier, examinateur

Chère Marie-Clémence, je te remercie pour ta participation à ce jury, toi qui as pu suivre l'avancée de ces travaux chaque année. Je sais que la thématique des bêta-lactamines te tient particulièrement à cœur et c'est toujours un plaisir d'échanger avec toi sur le sujet (mais également sur d'autres).

À monsieur le Docteur Michel Neunlist, examinateur

Cher Michel, je te remercie pour ta participation à ce jury mais aussi et surtout pour ton accueil au sein de la joyeuse équipe "TENS". Puissent nos projets aboutir sur des belles histoires scientifiques.

À monsieur le Professeur Éric Dailly, Directeur

Cher Éric, je te remercie de m'accompagner chaque jour avec bienveillance et patience dans mon parcours de jeune hospitalo-universitaire. Après le master 2 et la thèse d'exercice, cette thèse marque l'aboutissement d'un long travail en binôme.

Table des matières

<i>Remerciements</i>	
<i>Table des matières</i>	
<i>Table des figures</i>	
<i>Table des tableaux</i>	
<i>Abréviations</i>	
<i>Avant-propos</i>	
1. Introduction générale	1
1.1 L'histoire de la découverte des bêta-lactamines	1
1.2 La structure des bêta-lactamines	2
1.3 La constitution de la paroi bactérienne	3
1.4 Le mécanisme d'action des bêta-lactamines	4
1.5 La découverte des céphalosporines	5
1.6 La relation structure - activité	6
1.7 Les générations de céphalosporines	6
1.7.1 Les céphalosporines de première génération (C1G)	6
1.7.2 Les céphalosporines de deuxième génération (C2G)	9
1.7.3 Les céphamycines	10
1.7.4 Les céphalosporines de troisième génération (C3G)	10
1.7.5 Les céphalosporines de quatrième génération (C4G)	13
1.7.6 Les céphalosporines de cinquième génération (C5G)	13
1.8 La variabilité de la réponse aux céphalosporines d'origine pharmacocinétique	14
1.8.1 La clairance d'élimination des céphalosporines	14
1.8.1.1 La sécrétion tubulaire des céphalosporines	14
1.8.1.2 L'insuffisance rénale	16
1.8.1.3 L'épuration extra-rénale	17
1.8.1.4 L'augmentation de la clairance rénale	18
1.8.1.5 Les techniques d'Extra Corporeal Life Support	19
1.8.2 L'albuminémie	20
1.8.3 La diffusion au site de l'infection	21
1.8.3.1 La distribution cérébrospinale	22
1.8.3.2 La distribution pulmonaire	23
1.8.3.3 La distribution ostéo-articulaire	23
1.8.3.4 La distribution dans l'endocardite	23

1.9	<i>La variabilité de la réponse aux céphalosporines d'origine pharmacodynamique ..</i>	24
1.9.1	La pharmacodynamie des céphalosporines	24
1.9.2	La variabilité pharmacodynamique	25
1.9.2.1	Les mécanismes de résistance non enzymatiques	26
1.9.2.2	Les mécanismes de résistance enzymatiques: les bêta-lactamases	27
1.9.2.3	Les inhibiteurs de bêta-lactamases.....	30
1.9.2.4	La sélection de résistance et le microbiote.....	31
1.10	<i>Le suivi thérapeutique pharmacologique</i>	32
1.10.1	Les méthodes de dosage	33
1.10.2	Les cibles PK-PD	34
1.11	<i>L'objectif de la thèse.....</i>	36
2.	<i>Publication 1.....</i>	37
2.1	<i>Résumé détaillé en français</i>	37
2.2	<i>Article accepté dans International Journal of Antimicrobial Agents</i>	38
2.3	<i>Introduction</i>	38
2.4	<i>Materials and methods</i>	39
2.4.1	Patients and ethics.....	39
2.4.2	Study protocol	40
2.4.3	Quantification of cefazolin concentrations	40
2.4.4	Population pharmacokinetics analysis	41
2.4.5	Monte Carlo simulations of dosage regimens.....	42
2.5	<i>Results.....</i>	43
2.6	<i>Discussion.....</i>	44
2.7	<i>References.....</i>	50
2.8	<i>Tables and figures</i>	53
2.9	<i>Remarques complémentaires sur l'article</i>	60
3.	<i>Publication 2.....</i>	63
3.1	<i>Résumé détaillé en français</i>	63
3.2	<i>Article soumis au British Journal of Clinical Pharmacology</i>	65
3.3	<i>Introduction</i>	65
3.4	<i>Materials and methods</i>	66
3.4.1	Ethics and patients.....	66
3.4.2	Collection of clinical and therapeutic data	66
3.4.3	Quantification of ceftriaxone concentrations	66
3.4.4	Population pharmacokinetics analysis	67
3.4.5	Monte Carlo simulations of dosage regimens.....	68

3.5	<i>Results</i>	69
3.6	<i>Discussion</i>	70
3.7	<i>References</i>	74
3.8	<i>Tables et figures</i>	76
3.9	<i>Remarques complémentaires sur l'article</i>	82
4.	<i>Publication 3</i>	84
4.1	<i>Résumé détaillé en français</i>	84
4.2	<i>Article à soumettre à Microbiome</i>	86
4.3	<i>Introduction</i>	86
4.4	<i>Results and discussion</i>	87
4.4.1	CRO induced higher ESBL-producing <i>K. pneumoniae</i> colonization than CTX	87
4.4.2	CRO and CTX are both excreted in gut lumen.....	87
4.4.3	No difference in transit between CRO and CTX	88
4.4.4	CRO and CTX alters the overall architecture of gut microbiota	88
4.4.5	ESBL-producing <i>Klebsiella pneumoniae</i> carriage is associated to taxonomic changes	89
4.4.6	Taxonomic changes between CTX and CRO treated mice	90
4.4.7	Antibiotic fecal concentrations impact on OTU abundance	91
4.4.8	Gut microbiota before contact with <i>Klebsiella pneumoniae</i> can predict intensity of colonization.....	91
4.4.9	CRO increases class C beta-lactamase level	92
4.4.10	Conclusion	92
4.5	<i>Methods</i>	93
4.5.1	Animals	93
4.5.2	Antibiotics.....	93
4.5.3	Bacterial strain and gavage.....	93
4.5.4	Stool collection and seeding.....	94
4.5.5	16S rRNA gene amplification and sequencing	94
4.5.6	Pharmacokinetics	95
4.5.7	Quantification and statistical analysis.....	96
4.5.8	Declarations	96
4.6	<i>References</i>	97
4.7	<i>Tables and figures</i>	100
4.8	<i>Remarques complémentaires sur l'article</i>	122
5.	<i>Conclusion</i>	124
6.	<i>Perspectives</i>	132
7.	<i>Références de la thèse</i>	134
	<i>Annexe I</i>	144

<i>Annexe II</i>	153
<i>Annexe III</i>	179
<i>Annexe IV</i>	187

Table des figures

Figure 1: Structure moléculaire du noyau bêta-lactame	2
Figure 2: Structure de la paroi des bactéries Gram négatif et Gram positif.....	3
Figure 3: Analogie structurale entre une bêta-lactamine typique et le dipeptide D-Alanyl-D-Alanine.....	4
Figure 4: Structure moléculaire de l'acide 7-aminocéphalosporanique et de l'acide 6-aminopénicillanique.	5
Figure 5: Processus de sécrétion tubulaire active des céphalosporines.....	15
Figure 6: Mécanismes conduisant à l'augmentation de la clairance rénale chez les patients de réanimation	19
Figure 7: Carte européenne de la résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération des souches isolées de <i>K. pneumoniae</i>	27
Figure 8: Classification des bêta-lactamases portées par les entérobactéries selon Ambler.....	28
Figure 9: Représentation de l'histoire naturelle de la transmission inter-espèce de la résistance aux C3G par bêta-lactamase à spectre étendue à partir du genre <i>Kluyvera</i>...	29

Table des tableaux

Tableau I: Caractéristiques pharmacocinétiques des principales céphalosporines de première génération	8
Tableau II: Caractéristiques pharmacocinétiques des principales céphalosporines de deuxième génération	9
Tableau III: Caractéristiques pharmacocinétiques de la céfoxitine.....	10
Tableau IV: Caractéristiques pharmacocinétiques des principales céphalosporines de troisième génération	12
Tableau V: Caractéristiques pharmacocinétiques-de la céfépime.....	13
Tableau VI: Caractéristiques pharmacocinétiques des principales céphalosporines de cinquième génération	14
Tableau VII: Propriétés convulsivantes des différentes bêta-lactamines comparées à la pénicilline G	16
Tableau VIII: Propriétés de dialyse des principales céphalosporines.....	18
Tableau IX: Ratios des concentrations tissulaires sur les concentrations plasmatiques des principales céphalosporines dans les tissus ciblés.....	22
Tableau X: Cibles pour la concentration résiduelle plasmatique totale ou libre en cas d'administration discontinue, et pour la concentration plasmatique totale ou libre à l'équilibre en cas d'administration continue, pour les principales céphalosporines.	35

Abréviations

ARC	Augmented renal clearance
ATP	Adenosine triphosphate
BLSE	Bêta-lactamases à spectre élargi
C1G	Céphalosporines de première génération
C2G	Céphalosporines de deuxième génération
C3G	Céphalosporines de troisième génération
C4G	Céphalosporines de quatrième génération
C5G	Céphalosporines de cinquième génération
CHU	Centre hospitalier universitaire
CKD-EPI	Chronic kidney disease – epidemiology collaboration
Cl	Clairance
CMI	Concentrations minimales inhibitrices
CRO	Ceftriaxone
CTX	Céfotaxime
CVVH	Hémofiltration veino-veineuse continue
CVVHD	Hémodialyse veino-veineuse continue
CVVHDF	Hémodiafiltration veino-veineuse continue
DFG	Débit de filtration glomérulaire
ECLS	Extra Corporeal Life Support
ECMO	Extra Corporeal Membrane Oxygenation
ECOFF	Epidemiological cut-off value
EER	Épuration extra-rénale
EUCAST	European committee on antimicrobial susceptibility testing
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
IMC	Indice de masse corporelle
LCS	Liquide cérébrospinal
LPP	Liaison aux protéines plasmatiques
LPS	Lipopolysaccharide
MDRD	Modification of Diet in Renal Disease Study Group
OMS	Organisation mondiale de la santé

ORL	Otorhinolaryngologie
PLP	Protéines liant les pénicillines
PTA	Probability of target attainment
PK/PD	Pharmacocinétique/pharmacodynamique
RCP	Résumé des caractéristiques du produit
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline
STP	Suivi thérapeutique pharmacologique
V_d	Volume de distribution

Avant-propos

Ce manuscrit fait la synthèse de mes trois années de travaux de thèse qui portaient sur l'optimisation des traitements antibiotiques par des céphalosporines, antibiotiques appartenant à la famille de bêta-lactamines. Cette thèse s'articule en trois volets comprenant deux études basées chacune sur une analyse de pharmacocinétique de population et un projet d'expérimentation animale. Ces travaux ont été réalisés au laboratoire de pharmacologie clinique du centre hospitalier universitaire de Nantes et dans les laboratoires de recherche de l'unité Inserm UMR1235 "TENS" et de l'équipe émergente 1701 "MiHAR" sous la direction du Professeur Éric Dailly, en parallèle de mon assistantat hospitalo-universitaire.

1. Introduction générale

1.1 L'histoire de la découverte des bêta-lactamines

Nous devons l'émergence de la classe des bêta-lactamines à la découverte de la pénicilline par le chercheur et pharmacologue écossais Alexander Fleming au cours de ses travaux de recherche portant sur le lysozyme de *Staphylococcus aureus* dans son laboratoire du *Saint-Mary's hospital* de Londres. En effet, le matin du 3 septembre 1928, de retour de vacances, il constate que ses boîtes de Petri ont été contaminées en son absence par un champignon filamenteux: *Penicillium notatum*. En observant avec attention les cultures, il constate que la croissance des Staphylocoques est inhibée en périphérie des colonies de *Penicillium*. Il émet alors l'hypothèse que cette inhibition est entraînée par la sécrétion d'une molécule produite par le champignon qu'il nomme "pénicilline" (1). Il ne mesure pas encore la portée de sa découverte...

Ce n'est que huit ans plus tard, en 1936, que deux chercheurs d'Oxford, un Professeur de pathologie d'origine australienne, Howard Walter Florey, et un biochimiste allemand, Ernst Boris Chain, reprennent les travaux de Fleming dont ils ont saisi l'intérêt pour la médecine humaine. Après de long mois ayant pour objectif d'isoler et de purifier la molécule, leur équipe parvient à produire quelques centaines de milligrammes de pénicilline en mars 1940. En mai de la même année, Florey expérimente l'administration de plusieurs doses de cet extrait à des souris infectées par un streptocoque avec succès. Ces premiers résultats sont publiés dans *Lancet* en août (2). En décembre 1940, un jeune policier britannique, blessé au visage par une rose dont la plaie s'infecta par une souche de Staphylocoque et une autre de Streptocoque, fut le premier patient traité par la pénicilline. Si les résultats furent spectaculaires les premiers jours du traitement, le patient finit par décéder par manque de quantité de traitement. En pleine seconde guerre mondiale, alors que Londres est bombardée par l'aviation allemande, cette découverte majeure n'obtient pas le succès escompté. La principale difficulté à laquelle se heurtent les chercheurs est l'impossibilité de produire la pénicilline en grande quantité, toutes les forces publiques et industrielles étant alors tournées vers la guerre. Florey traverse alors l'Atlantique pour collaborer avec une usine basée dans l'Illinois spécialisée dans l'épuration biologique des eaux usées par le biais de bactéries spécifiques. Un jour, un melon couvert d'une moisissure présentant un aspect inhabituel est

apporté au laboratoire de l'usine. Un *Penicillium notatum* renommé alors *chrysogenum* est isolé à partir du fruit et les chercheurs découvrent qu'il présente la capacité de produire deux cents fois plus de pénicilline que le *Penicillium notatum* initialement isolé par Fleming. Il est dès lors possible de produire de la pénicilline en quantité industrielle et les laboratoires américains *Merck*, *Squibb* et *Pfizer* se lancent dans les premières productions.

La pénicilline participe au sauvetage de nombreux blessés sur le front et ouvre la voie de la guérison pour de nombreuses pathologies d'origine bactérienne comme la syphilis. La pénicilline remplace progressivement les sulfamides antibactériens utilisés à l'époque, très toxiques et moins efficaces. Fleming a été anobli par la Reine et récompensé en 1945 par le prix Nobel de physiologie et de médecine avec Florey et Chain.

Bien avant Fleming, des écrits datant de l'antiquité faisaient déjà état de l'application de fruits contaminés par des moisissures pour soigner des plaies infectées. Néanmoins, on ne pouvait pas isoler, caractériser et produire la molécule à cette époque.

Aujourd'hui, les bêta-lactamines, toutes dérivées de la pénicilline, sont les antibiotiques les plus consommés dans le monde (3). On estime que cette classe d'antibiotique, découverte par inadvertance par Alexander Fleming, a permis d'allonger l'espérance de vie d'une dizaine d'année.

1.2 La structure des bêta-lactamines

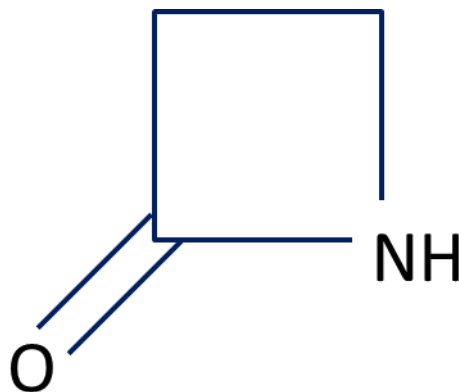


Figure 1: Structure moléculaire du noyau bêta-lactame

Les bêta-lactamines présentent toutes la particularité de contenir un noyau bêta-lactame dans leur structure moléculaire (Fig. 1). Ce noyau est la fraction structurale responsable de

l'activité antibactérienne. De la structure de ce noyau découle un mécanisme d'action commun à toutes les molécules de cette classe.

1.3 La constitution de la paroi bactérienne

Les bêta-lactamines sont des inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane qui est un polymère constituant en partie la paroi de la cellule bactérienne. Ce polymère confère à la bactérie sa forme et sa rigidité. En fonction du type de bactérie (coloration de Gram positive ou négative), la constitution de la paroi est différente et modifie la susceptibilité de la souche aux bêta-lactamines (Fig. 2).

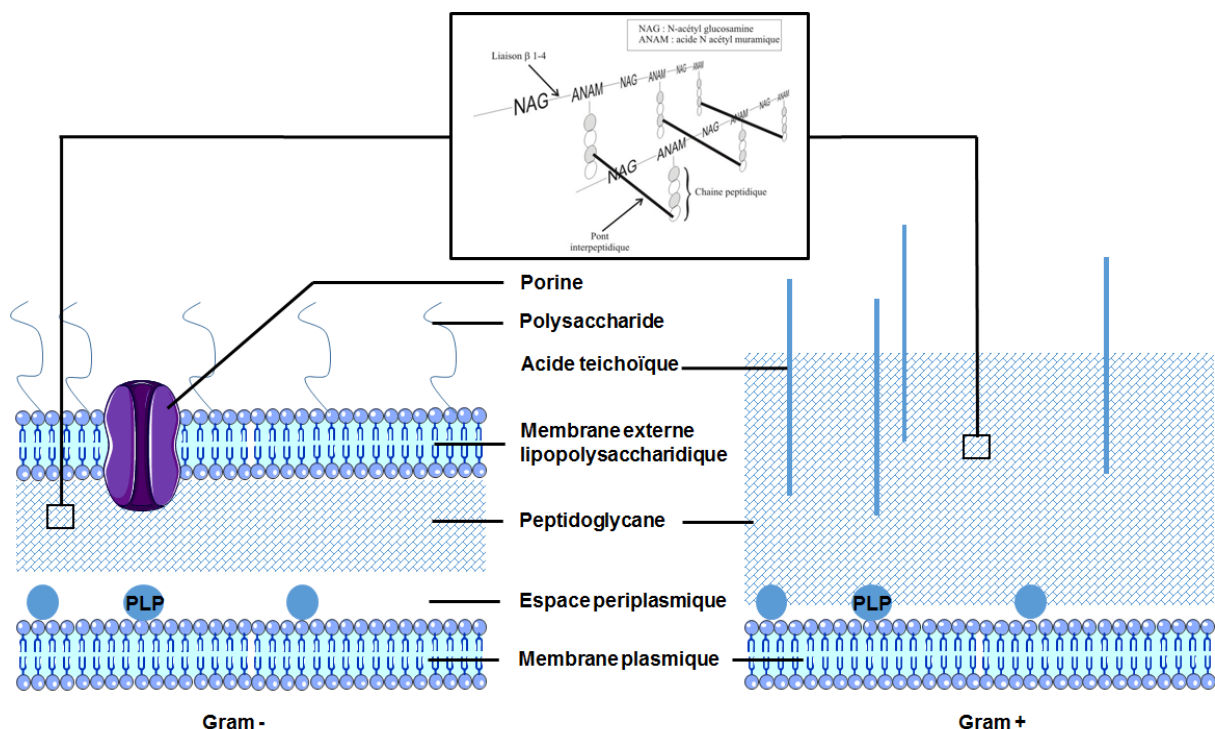


Figure 2: Structure de la paroi des bactéries Gram négatif et Gram positif.

La paroi des bactéries Gram positif est essentiellement constituée d'une couche épaisse de peptidoglycane qui est au contact de la membrane cytoplasmique. Celle-ci peut être éventuellement recouverte d'une couche polysaccharidique (4). Le peptidoglycane est constitué de longues chaînes de polymère ayant pour motif de base un disaccharide: N-Acétyl Glucosamine-Acide N-Acétyl Muramique. Ce motif peut être répété d'une trentaine à plusieurs centaines de fois selon l'organisme. Ces chaînes polysaccharidiques sont reliées entre elles par des ponts interpeptidiques unissant des chaînes pentapeptidiques attachées à l'acide muramique. Les chaînes pentapeptidiques se terminent systématiquement par deux D-

Alanines. La paroi des Gram positif est constituée de cinquante à cent feuillets de peptidoglycane se recouvrant les uns sur les autres. Chez les bactéries Gram négatif, l'organisation de la paroi est plus complexe (5). Il existe une membrane externe séparée de la membrane cytoplasmique interne par l'espace périplasmique. Cet espace contient le peptidoglycane en quantité beaucoup moins importante que pour une bactérie Gram positif (un à deux feuillets seulement). La membrane externe est formée de phospholipides et du lipopolysaccharide (LPS).

1.4 Le mécanisme d'action des bêta-lactamines

L'action des bêta-lactamines passe par l'inhibition compétitive des principales enzymes impliquées dans cette construction des polymères de peptidoglycane et regroupées sous le terme de protéines liant les pénicillines (PLP). Ces PLPs sont majoritairement des transpeptidases et des carboxypeptidases bactériennes dont le rôle est d'assurer la réticulation du peptidoglycane.

Les bêta-lactamines possèdent une analogie structurale tridimensionnelle avec le dipeptide D-Alanyl-D-Alanine qui est un constituant du peptidoglycane en formation (Fig. 3). Après ouverture du cycle, elles forment une liaison covalente et stable avec les PLPs et inhibent leur activité (6). La bêta-lactamine agit donc comme un substrat suicide.

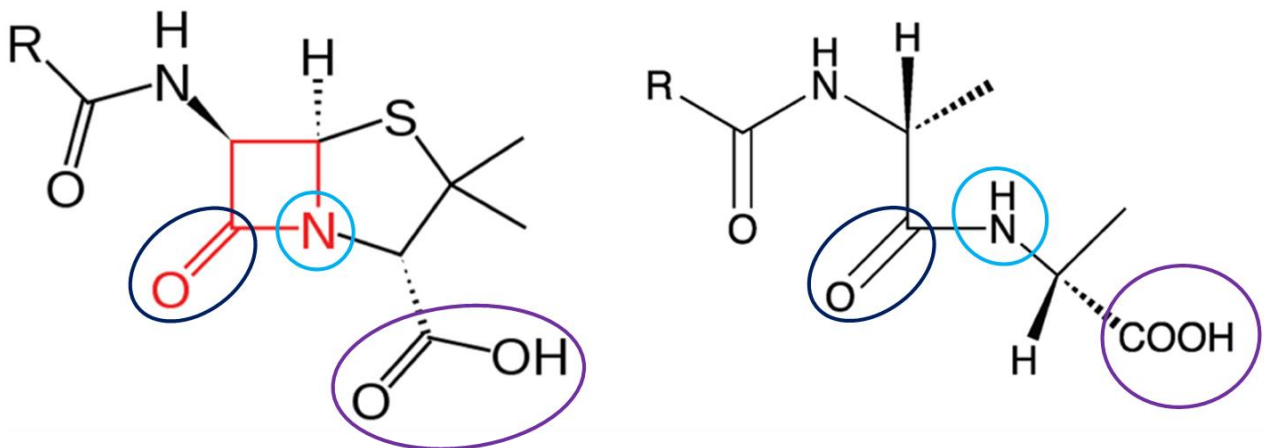


Figure 3: Analogie structurale entre une bêta-lactamine typique (à gauche, le noyau bêta-lactame en rouge) et le dipeptide D-Alanyl-D-Alanine (à droite). Les fortes homologies de structure sont représentées par les cercles de couleur.

Chez les bactéries Gram positif, l'accessibilité des bêta-lactamines à ces enzymes situées sur la membrane cytoplasmique est libre, le peptidoglycane n'est pas une barrière à leur diffusion. En revanche, chez les bactéries à Gram négatif, l'accessibilité aux PLPs dépend

de la capacité à traverser la membrane externe. Cette membrane hydrophobe empêcherait le passage des molécules hydrophiles telles que les bêta-lactamines sans la présence de protéines spécialisées appelées porines permettant la diffusion de ces molécules (7). Plus une molécule est petite, hydrophile et peu chargée, et plus elle pourra diffuser par le biais de ces protéines trimériques.

1.5 La découverte des céphalosporines

La classe des céphalosporines, cousines de la pénicilline de Fleming, n'a été découverte que plus tardivement, en 1948, par le scientifique et pharmacologue italien Giuseppe Brotzu avec l'isolement d'une substance produite par une souche de *Cephalosporium acremonium* provenant des égouts de Cagliari en Sardaigne (8). Le chercheur mit en évidence la capacité de cette souche à inhiber la croissance de *Salmonella typhi*, l'agent responsable de la fièvre typhoïde. Par la suite, Brotzu transmit sa souche à l'équipe de la *Dunn School of Pathology* d'Oxford, travaillant déjà sur la purification de la pénicilline, qui parvint à la caractériser par des méthodes de cristallographie et à isoler la molécule responsable de l'effet antibiotique: la céphalosporine C (9). Edward Penley Abraham démontra que le noyau de la céphalosporine, l'acide 7-aminocéphalosporanique, était proche de celui de la pénicilline, l'acide 6-aminopénicillanique, et comportait dans sa structure le noyau bêta-lactame. La différence résidait dans l'hétérocycle thioazoté à 6 atomes pour les céphalosporines (dihydrothiazine) et à 5 atomes pour les pénicillines (thiazolidine) (Fig. 4) (10). Abraham démontra également que la modification des chaînes latérales de l'hétérocycle pouvait améliorer l'efficacité antibiotique. Ces travaux ont conduit à la commercialisation de la première céphalosporine, la céfalotine, par *Elie Lilly and Company* en 1964. De la céfalotine à nos jours, cinq générations de céphalosporines ont été développées et sont toutes issues de ces premiers travaux.

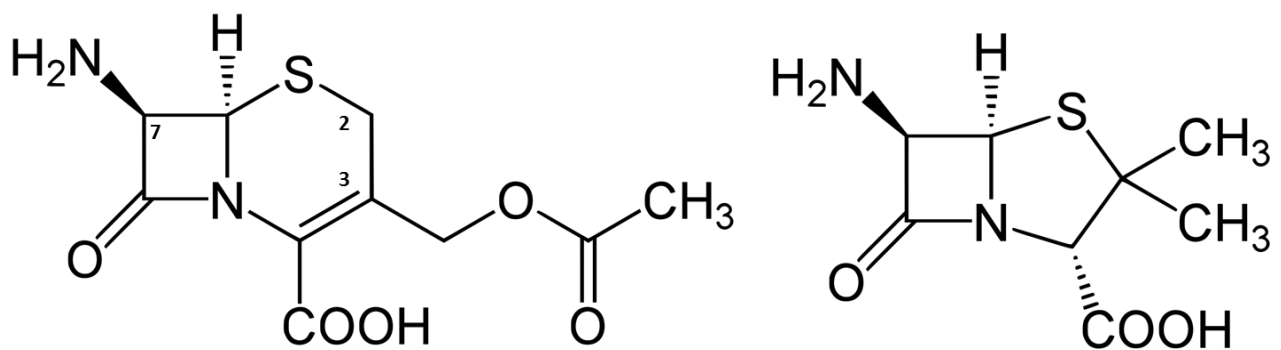


Figure 4: Structure moléculaire de l'acide 7-aminocéphalosporanique (à gauche) et de l'acide 6-aminopénicillanique (à droite).

1.6 La relation structure - activité

Contrairement aux pénicillines, la double liaison du cycle dihydrothiazine peut venir en résonance avec l'énamine, ce qui confère une plus grande stabilité à ces molécules en milieu acide et donc une meilleure biodisponibilité par voie orale. La substitution de l'amine tertiaire est responsable des propriétés antibactériennes, de la stabilité ainsi que de la résistance à l'hydrolyse par les bêta-lactamases. La présence d'un radical méthoxy en position 7 augmente également la résistance aux bêta-lactamases. Le radical situé en position 3 est responsable des propriétés pharmacocinétiques et du spectre antibactérien. La position 2 est toujours laissée libre pour limiter l'encombrement stérique et faciliter le couplage de la céphalosporine à la PLP. L'acide carboxylique en position 4 est disponible pour la synthèse de pro-médicaments par estérification.

1.7 Les générations de céphalosporines

1.7.1 Les céphalosporines de première génération (C1G)

Ce sont des dérivés très proches des amino-pénicillines en termes de structure et de spectre antibactérien. La molécule la plus utilisée et aujourd'hui considérée comme le chef de file est la céfazoline.

Le spectre d'activité de ces molécules est proche de celui des amino-pénicillines: Staphylocoques sensibles à la méthicilline (producteurs ou non de pénicillinase), streptocoques dont pneumocoques (mais résistance croisée avec la résistance acquise du pneumocoque à la pénicilline), *Haemophilus*, certaines entérobactéries (résistance naturelle du groupe 3 de la classification de Ambler).

Ces molécules sont actuellement indiquées *per os* dans les infections oto-rhino-laryngologiques (ORL) (mais non recommandée par l'ANSM), les infections respiratoires basses, les infections urinaires basses non compliquées et certaines infections cutanées. Par voie parentérale, les C1G, et particulièrement la céfazoline, sont utilisées pour tous types d'infections à germe sensible excepté dans les méningites du fait de la probable faible diffusion méningée. Ce sont par ailleurs des antibiotiques de référence dans l'antibioprophylaxie chirurgicale pour prévenir le risque d'infection par un germe commensal de la peau et des muqueuses.

Les principaux effets indésirables rencontrés sont des réactions allergiques, des troubles digestifs et hépatiques et de rares cas de troubles hématologiques. Ces molécules étant principalement éliminées par voie rénale, une adaptation de leur posologie est recommandée en cas de diminution du débit de filtration glomérulaire (DFG). Ces molécules sont déconseillées en cas de grossesse et contre-indiquées en cas d'allergie.

Les principales caractéristiques pharmacocinétiques des CIG sont résumées dans le Tableau I.

Tableau I: Caractéristiques pharmacocinétiques des principales céphalosporines de première génération (données issues des RCP)

	Céfazoline	Céfalexine (Keforal®)	Céfadroxil	Céfradine (Dexef®)	Céfaclor (Alfatil®)
Posologie par 24h	2 à 6 g	2 g en 2 prises	2 g en 2 prises	2 g en 2 prises	750 mg en 3 prises
Absorption <i>per os</i>	Utilisation uniquement en IV	85 à 95%, diminuant avec la dose. Pic en 40 à 60 minutes, retardé par la prise alimentaire	80 à 90% non modifiée par l'alimentation. Pic en 60 à 90 minutes	Presque 100% non modifiée par l'alimentation	80 à 90% diminuée par la prise alimentaire Pic en 60 à 70 minutes
Distribution	LPP: 85 à 90% Bonne diffusion au niveau pleural, articulaire et ascitique mais faible dans le LCS	LPP: 6 à 10% Faible passage dans le LCS	LPP: 15 à 20% Bonne diffusion pulmonaire, ORL, osseuse, prostatique et articulaire.	LPP: 6 à 30%	LPP: 25 à 50% Bonne diffusion ORL et pulmonaire mais faible dans le LCS
Elimination	Majoritairement rénale sans métabolisation. Faiblement retrouvée dans la bile Demi-vie: 100 minutes	Majoritairement rénale sans métabolisation. Faiblement retrouvée dans la bile Demi-vie: 45-70 minutes	Majoritairement rénale sans métabolisation. Demi-vie: 100-120 minutes	Majoritairement rénale sans métabolisation. Faiblement retrouvée dans la bile Demi-vie: 45-70 minutes	Majoritairement rénale sans métabolisation. Faiblement retrouvée dans la bile. Demi-vie: 34 à 54 minutes

RCP: résumé des caractéristiques du produit, LPP: Liaison aux protéines plasmatiques. LCS: Liquide cébrospinal.

1.7.2 Les céphalosporines de deuxième génération (C2G)

Ces molécules dérivent directement des C1G avec un élargissement du spectre aux bactéries Gram négatif grâce à une résistance accrue à leurs bêta-lactamases, tout en conservant une bonne activité sur le *Staphylococcus aureus* sensible à la méthicilline.

Les indications sont actuellement restreintes aux infections ORL et respiratoires basses *per os*. Par voie parentérale, leur utilisation est possible en antibioprophylaxie chirurgicale visant les germes ayant pour origine la peau et les muqueuses.

Comme les C1G, les C2G sont des molécules bien tolérées. Les principaux effets indésirables rencontrés sont le risque allergique et un risque majoré de syndrome de Lyell et de Stevens-Johnson avec le céfuroxime. Des troubles hématologiques (hyperéosinophilie, leucopénie, neutropénie) sont également décrits. Du fait des troubles de l'hémostase observés avec ces molécules (baisse du taux de prothrombine), la coadministration de molécules à propriétés anticoagulantes est déconseillée. Le céfamandole est responsable d'un effet antabuse. Ces molécules étant principalement éliminées par voie rénale, une adaptation de leur posologie est recommandée en cas de diminution du DFG. Ces molécules sont déconseillées en cas de grossesse et contre-indiquées en cas d'allergie.

Les principales caractéristiques pharmacocinétiques des C2G sont résumées dans le Tableau II.

Tableau II: Caractéristiques pharmacocinétiques des principales céphalosporines de deuxième génération (données issues des RCP)

	Céfamandole	Céfuroxime (Zinnat®)	Céfuroxime axétil (Zinnat®)
Posologie/24h	3 g en 3 ou 4 prises	2.25 à 4.5 g en 3 prises	500 à 1000 mg en 2 prises
Absorption <i>per os</i>	Utilisation uniquement en parentérale	Utilisation uniquement en parentérale	30 à 40% augmenté par l'alimentation (50 à 60%). Pic en 120 à 180 minutes
Distribution	LPP: 56 à 78% Bonne diffusion tissulaire mais faible dans le LCS	LPP: 33 à 50% Bonne diffusion tissulaire mais faible dans le LCS	LPP: 33% Bonne diffusion tissulaire mais faible dans le LCS
Elimination	Majoritairement rénale sans métabolisation. Demi-vie: 50-66 minutes	Majoritairement rénale sans métabolisation. Demi-vie: 70 minutes	Majoritairement rénale sans métabolisation. Demi-vie: 66-96 minutes

RCP: résumé des caractéristiques du produit, LPP: Liaison aux protéines plasmatiques. LCS: Liquide cérébrospinal.

1.7.3 Les céphamycines

Ces molécules sont apparentées aux C2G mais ont la particularité de mieux résister à l'hydrolyse par certaines bêta-lactamases et notamment par les bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE).

Ces molécules présentent une demi-vie courte et sont utilisées par voie parentérale. Actuellement, seule la céfoxitine est encore commercialisée et connaît un regain d'intérêt devant l'augmentation d'infections à entérobactéries productrices de BLSE.

Les principales caractéristiques pharmacocinétiques des céphamycines sont résumées dans le Tableau III.

Tableau III: Caractéristiques pharmacocinétiques de la céfoxitine (données issues des RCP)

Céfoxitine	
Posologie/24h	3 à 6 g/24h
Absorption <i>per os</i>	Utilisation uniquement en parentérale
Distribution	LPP: 65 à 80% Bonne diffusion tissulaire
Elimination	Majoritairement rénale sans métabolisation. Demi-vie: 45 minutes

RCP: résumé des caractéristiques du produit, LPP: Liaison aux protéines plasmatiques.

1.7.4 Les céphalosporines de troisième génération (C3G)

Ces molécules élargissent leur spectre antibactérien vers les bacilles Gram négatif et plus particulièrement les entérobactéries tout en conservant une activité suffisante sur les bactéries Gram positif. On observe une amélioration de leur biodisponibilité par voie orale autour de 50% grâce à des formes estérifiées (pro-médicaments).

Les indications des C3G sont larges, incluant les infections pulmonaires et ORL en administration *per os* mais également les infections sévères à entérobactéries sensibles au niveau urinaire et digestif. La ceftazidime présente une activité importante sur le *Pseudomonas aeruginosa*, la ceftriaxone et le céfotaxime étant utilisés dans le traitement des méningites bactériennes communautaires et nosocomiales hors *Listeria*.

Comme les C1G et les C2G, les C3G sont des molécules bien tolérées. Le principal effet indésirable rencontré est le risque allergique. Les troubles neurologiques décrits semblent liés aux concentrations plasmatiques. Des troubles hématologiques (hyperéosinophilie, leucopénie, neutropénie), hépatologiques et rénaux sont également

décrits. Ces molécules étant principalement éliminées par voie rénale, une adaptation de leur posologie est recommandée en cas de diminution du DFG. La ceftriaxone présente des caractéristiques pharmacocinétiques différentes des autres avec une demi-vie plus longue et une élimination mixte rénale et hépatobiliaire. Ces molécules sont déconseillées en cas de grossesse et contre-indiquées en cas d'allergie.

Les principales caractéristiques pharmacocinétiques des C3G sont résumées dans le Tableau IV.

Tableau IV: Caractéristiques pharmacocinétiques des principales céphalosporines de troisième génération (données issues des RCP)

	Ceftriaxone (Rocéphine®)	Céfotaxime	Ceftazidime (Fortum®)	Céfixime (Oroken®)	Cefpodoxime proxétil (Orelox®)	Cefotiam texodil
Posologie/24h	Jusqu'à 100 mg/kg/24h	Jusqu'à 300 mg/kg/24h	Jusqu'à 6 g/kg/24h	400 mg/24h en 2 prises	400 mg/24h en 2 prises	400 mg/24h en 2 prises
Absorption <i>per os</i>	Utilisation uniquement en parentérale	Utilisation uniquement en parentérale	Utilisation uniquement en parentérale	50% non modifiée mais retardée par l'alimentation. Pic en 180 à 240 minutes	51,5% augmentée par l'alimentation. Pic en 120 à 180 minutes	45% non modifiée par l'alimentation. Pic en 90 à 150 minutes
Distribution	LPP: 85 à 95% Bonne diffusion tissulaire et dans le LCS (méningite)	LPP: 20 à 40% Bonne diffusion tissulaire et dans le LCS (méningite)	LPP: < 10% Bonne diffusion tissulaire et dans le LCS (méningite)	LPP: 70% Bonne diffusion tissulaire et dans le LCS (méningite)	LPP: 40% Bonne diffusion tissulaire et dans le LCS (méningite)	LPP: 40% Bonne diffusion tissulaire et dans le LCS (méningite)
Elimination	Mixte rénale (60%) et biliaire (40%). Demi-vie: 6-9 heures	Majoritairement rénale après métabolisation en un désacétyl actif. Demi-vie: 40 minutes	Majoritairement rénale sans métabolisation. Demi-vie: 108 minutes	Majoritairement rénale et biliaire (25%). Demi-vie: 180-240 minutes	Majoritairement rénale et biliaire (25%). Demi-vie: 144 minutes	Majoritairement rénale. Demi-vie: 60 minutes

RCP: résumé des caractéristiques du produit, LPP: Liaison aux protéines plasmatiques. LCS: Liquide cérébrospinal.

1.7.5 Les céphalosporines de quatrième génération (C4G)

Ces molécules, structurellement proches des C3G, sont également appelées céphalosporines à spectre élargi du fait d'un élargissement du spectre vers les entérobactéries habituellement résistantes aux C3G par hyperproduction de céphalosporinases déréprimées (*Enterobacter*, *Serratia*). Elles ne sont cependant pas actives sur les souches productives de BLSE. Ces molécules présentent une bonne activité sur le *Pseudomonas aeruginosa*. Actuellement, seul le céfépime est encore commercialisé.

Les principales caractéristiques pharmacocinétiques du céfépime sont résumées dans le Tableau V.

Tableau V: Caractéristiques pharmacocinétiques de la céfépime (données issues des RCP)

Céfépime (Axépim®)	
Posologie/24h	6 g/24h en 3 injections
Absorption <i>per os</i>	Utilisation uniquement en parentérale
Distribution	LPP: <19% Bonne diffusion tissulaire
Elimination	Majoritairement rénale avec une faible métabolisation. Demi-vie: 120 minutes

RCP: résumé des caractéristiques du produit, LPP: Liaison aux protéines plasmatiques.

1.7.6 Les céphalosporines de cinquième génération (C5G)

Ces molécules ont été développées dans les dix dernières années et présentent des spectres plus étroits, axés soit sur les entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa* comme le ceftolozane, soit actives sur le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) comme la ceftaroline et le ceftobiprole. Elles sont le plus souvent indiquées en deuxième intention en l'absence d'alternative thérapeutique.

Les principales caractéristiques pharmacocinétiques des C5G sont résumées dans le Tableau VI.

Tableau VI: Caractéristiques pharmacocinétiques des principales céphalosporines de cinquième génération (données issues des RCP)

	Ceftolozane (Zerbaxa®)	Ceftaroline (Zinforo®)	Ceftobiprole (Mabelio®)
Posologie/24h	1 g toutes les 8 heures	600 mg toutes les 12 heures	500 mg toutes les 8 heures
Absorption <i>per os</i>	Utilisation uniquement en parentérale	Utilisation uniquement en parentérale	Utilisation uniquement en parentérale
Distribution	LPP: 16 à 30% Bonne diffusion tissulaire	LPP: 20% Bonne diffusion tissulaire après biotransformation de l'ester fosamil en ceftaroline	LPP: 16% Bonne diffusion tissulaire après biotransformation de l'ester medocaril en ceftobiprole
Elimination	Majoritairement rénale sans métabolisation. Demi-vie: 180 minutes	Majoritairement rénale sans métabolisation. Demi-vie: 150 minutes	Majoritairement rénale sans métabolisation. Demi-vie: 180 minutes

RCP: résumé des caractéristiques du produit, LPP: Liaison aux protéines plasmatiques.

Au fil du temps et des générations, le spectre d'activité antibactérienne a évolué avec une diminution de l'activité sur les Gram positifs (sauf pour la ceftaroline et le ceftobiprole), une augmentation de l'activité sur les Gram négatifs, une amélioration de certaines caractéristiques pharmacocinétiques (absorption, diffusion, demi-vie) ainsi qu'une augmentation de la résistance aux bêta-lactamases.

1.8 La variabilité de la réponse aux céphalosporines d'origine pharmacocinétique

1.8.1 La clairance d'élimination des céphalosporines

La première cause de variabilité de la réponse aux céphalosporines tant sur le plan de l'efficacité que sur le plan de la toxicité est la fonction rénale. En effet, la majorité de ces molécules est éliminée quasi exclusivement par voie urinaire sans processus de biotransformation hépatique.

1.8.1.1 La sécrétion tubulaire des céphalosporines

La plupart des céphalosporines sont sécrétées au niveau des tubules proximaux rénaux par des transporteurs transmembranaires de la famille des *solute carrier proteins* spécialisés dans le transport des anions organiques appelés *organic anion transporter* (OAT) de type 1 et 3 (11,12). Ces molécules sont ensuite sécrétées par transport actif consommant de l'adénosine triphosphate (ATP) de type *multidrug resistance protein* (MRP) de type 2 et *breast cancer resistance protein* (BCRP) au niveau luminal (13). Ces mécanismes de sécrétion sont présentés dans la Figure 5. Ces transporteurs sont également ceux utilisés pour l'élimination tubulaire du méthotrexate et la compétition entre ces molécules au niveau tubulaire explique le risque d'interaction et de surdosage en méthotrexate lors de l'association à une

céphalosporine (14). La ceftriaxone présente des caractéristiques d'élimination originales comparée aux autres céphalosporines avec une demi-vie d'élimination plus longue expliquée en partie par un profil d'élimination mixte rénale et biliaire (15).

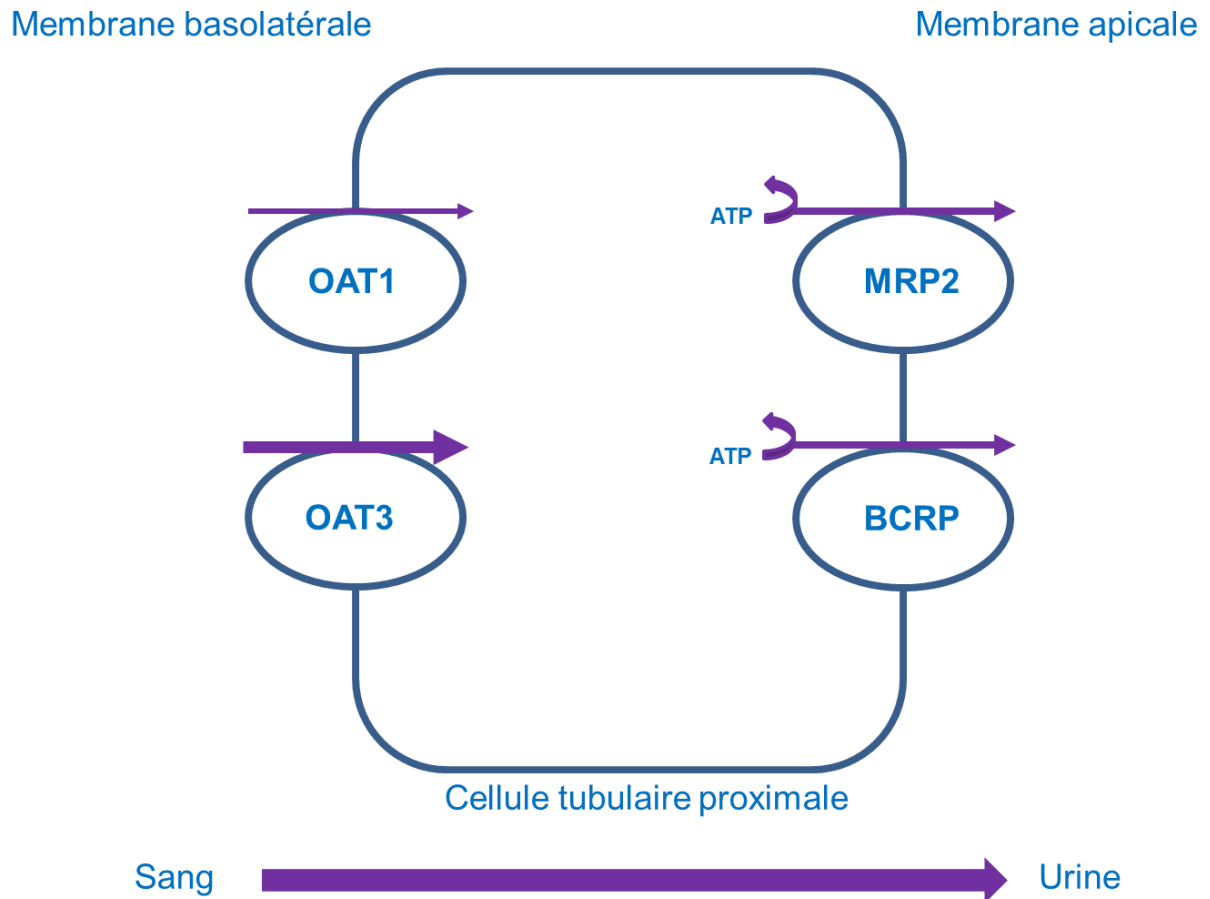


Figure 5: Processus de sécrétion tubulaire active des céphalosporines. L'épaisseur des traits correspond à l'importance de la voie d'élimination de ces molécules.

OAT : organic anion transporter, MRP : multidrug resistance protein, BCRP: breast cancer resistance protein.

Compte tenu de l'importance de la fonction rénale dans l'élimination des céphalosporines, deux cas de figure extrêmes peuvent être rencontrés : le risque d'accumulation toxique par diminution de la fonction rénale et le risque de sous-dosage en cas d'augmentation de la clairance (Cl) du médicament comme observé fréquemment chez les patients hospitalisés en unité de soins intensifs avec le phénomène appelé « Augmented renal clearance » (ARC) et défini par une valeur de $Cl_{\text{creatinine}} > 130 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ de surface corporelle (16).

1.8.1.2 L'insuffisance rénale

Le risque d'accumulation en cas d'insuffisance rénale est connu depuis les débuts de l'utilisation de ces molécules. La maladie rénale chronique est définie par une atteinte rénale et/ou un DFG < 60 mL/min/1,73 m² de surface corporelle pendant au moins trois mois (17). Les recommandations internationales et françaises préconisent l'estimation du DFG par calcul par la méthode *Chronic kidney disease – epidemiology collaboration* (CKD-EPI) et surtout l'abandon du calcul par la méthode de Cockroft & Gault qui sous-estime la fonction rénale chez le sujet âgé (18,19). La défaillance rénale aigüe concerne actuellement plus d'un patient sur deux en réanimation (20).

Le principal risque en cas d'accumulation de ces molécules est une toxicité neurologique caractérisée par un abaissement du seuil épiléptogène et directement corrélée aux concentrations plasmatiques (21). Cette toxicité s'expliquerait par un effet antagoniste compétitif au niveau du récepteur à l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) de type a (22). Certaines molécules telles que la céfazoline ou le céfépime semblent présenter un seuil de neurotoxicité plus bas que les autres céphalosporines (Tableau VII) (23).

Tableau VII: Propriétés convulsivantes des différentes bêta-lactamines comparées à la pénicilline G

Céphalosporine	Neurotoxicité relative (référence: pénicilline G=1)	Concentrations toxiques
Céfazoline	2,94	C _{min} <360 mg/L (24)
Céfépime	1,60	C _{min} <22 mg/L (25), C _{eq} <35 mg/L (26)
Ceftazidime	0,17	-
Ceftriaxone	0,12	C _{min} <100 mg/L (27)
Céfotaxime	0,088	-
Céfoxitine	0,018	-

C_{min}: concentration résiduelle, C_{eq}: concentration à l'équilibre en perfusion continue.

Le céfépime, utilisé majoritairement chez les patients d'unité de soins intensifs, est la molécule pour laquelle les risques de neurotoxicité ont été le mieux évalués (25,26). Des seuils de concentrations toxiques ont été déterminés. La céfazoline connaît un regain d'utilisation car son efficacité dans les infections sévères à *Staphylococcus aureus* a été démontrée. Elle profite également de la pénurie récurrente de pénicillines du groupe M. Cependant, son potentiel neurotoxique reste encore à étudier et un seuil de concentration toxique à ne pas dépasser est à déterminer. Les données actuelles sur la céfazoline ne concernent que des cas cliniques (24). Enfin, l'étude "Ceftriaxone forte dose" conduite par le CHU de Nantes a permis de définir un seuil toxique à 100 mg/L pour la ceftriaxone (27).

Les sociétés savantes recommandent aujourd'hui une adaptation de la posologie des céphalosporines à la fonction rénale. Mais le plus souvent, cette adaptation n'est réalisée que lorsque la Cl de la créatinine est inférieure à 15 mL/min. Pour la ceftriaxone, l'adaptation n'est nécessaire que lorsque la Cl de la créatinine est inférieure à 10 mL/min car cet antibiotique est sensé bénéficier d'une compensation d'élimination hépatobiliaire.

1.8.1.3 L'épuration extra-rénale

L'épuration extra-rénale (EER) est employée dans un cinquième des cas d'insuffisance rénale aigüe lorsque cette dernière menace le pronostic vital du patient (hyperkaliémie menaçante, acidose sévère, surcharge hydrosodée majeure, syndrome urémique majeur) avec une modification des paramètres pharmacocinétiques des céphalosporines (28). Lorsque l'EER est intermittente, il est recommandé d'administrer la céphalosporine à posologie adaptée après chaque séance de dialyse. L'exemple type est l'utilisation de la céfazoline pour le traitement des infections de cathéters de dialyse par des *cocci* Gram positif avec une posologie adaptée à 2 g après la séance de dialyse qui permet d'atteindre des concentrations résiduelles équivalentes à celles retrouvées chez le patient normo-rénal traité par 6 g (29).

Lorsque qu'une EER continue est requise, trois techniques sont actuellement disponibles: l'hémodialyse veino-veineuse continue (CVVHD) (basée sur le principe de la diffusion à travers une membrane semi-perméable suivant un gradient de concentration), l'hémofiltration veino-veineuse continue (CVVH) (basée sur le principe de convection à travers une membrane filtrante) et l'hémodiafiltration veino-veineuse continue (CVVHDF) (combinaison entre les deux techniques précédentes). L'hémofiltration continue permet l'épuration d'une grande quantité de molécules de petite taille et de taille moyenne, le profil des molécules épurées étant fonction du diamètre des pores de la membrane. Les techniques

diffusives permettent d'épurer efficacement les petites molécules, mais ont théoriquement un effet plus limité sur les molécules de taille moyenne, du moins lorsque des membranes standards sont utilisées. Aucune étude ne démontre une supériorité en termes de bénéfice clinique de l'une ou l'autre de ces techniques. La technique et les débits utilisés influencent directement l'élimination des céphalosporines dialysables, mais l'efficacité d'épuration pour chaque technique varie d'une molécule à l'autre.

La capacité d'une molécule à être épurée dépend de plusieurs paramètres. Plus le volume de distribution (V_d) sera important et moins l'EER aura un impact sur les concentrations plasmatiques de la céphalosporine du fait d'une réserve tissulaire importante en comparaison de la réserve plasmatique. Les céphalosporines étant des molécules particulièrement hydrophiles (hormis la ceftriaxone), elles présentent un V_d réduit et seront donc assez sensibles à l'EER. Le poids moléculaire joue également un rôle, bien que modéré. Plus le poids moléculaire sera faible et plus la molécule sera capable de traverser la membrane de filtration. Enfin, la liaison aux protéines plasmatiques (LPP) est un facteur influençant de façon importante les capacités d'épuration de la molécule par l'EER. Cependant, cela suggère que les molécules les plus fortement liées comme la ceftriaxone seraient peu dialysées alors qu'en réalité il existe un mécanisme annexe d'adsorption des protéines plasmatiques sur les membranes de filtration permettant une épuration de la fraction liée (30). Les coefficients d'extraction de dialyse des molécules les plus utilisées sont décrits dans le Tableau VIII. Toutes les céphalosporines sont dialysables à des niveaux variables cependant.

Tableau VIII: Propriétés de dialyse des principales céphalosporines (Source GPR (29))

Céphalosporine	Coefficient d'extraction en hémodialyse (%)
Céfazoline	62±8
Céfuroxime	25
Céfixime	10
Céfépime	72,2±6,4
Ceftazidime	55
Ceftriaxone	40
Céfoxitine	20 à 50

1.8.1.4 L'augmentation de la clairance rénale

Les patients hospitalisés en services de soins intensifs et de réanimations présentent bien souvent un syndrome de réponse inflammatoire systémique qui a pour conséquence une augmentation des débits sanguins cardiaque, rénal et de la majorité des organes. Les principales recommandations internationales préconisent une stratégie de remplissage

intravasculaire agressive associée à une prise en charge cardiovasculaire (cristalloïdes, vasopresseurs) dans la phase précoce du sepsis ce qui a pour conséquence l'accroissement de cette phase hyperdynamique (31). S'ajoute à cela un mécanisme encore peu connu appelé réserve rénale qui se manifeste dans certaines conditions physiologiques et pathologiques par une augmentation du fonctionnement rénal (32). L'ensemble de ces phénomènes conduit à une forte augmentation du DFG en dehors d'un contexte d'insuffisance rénale aiguë (Fig. 6).

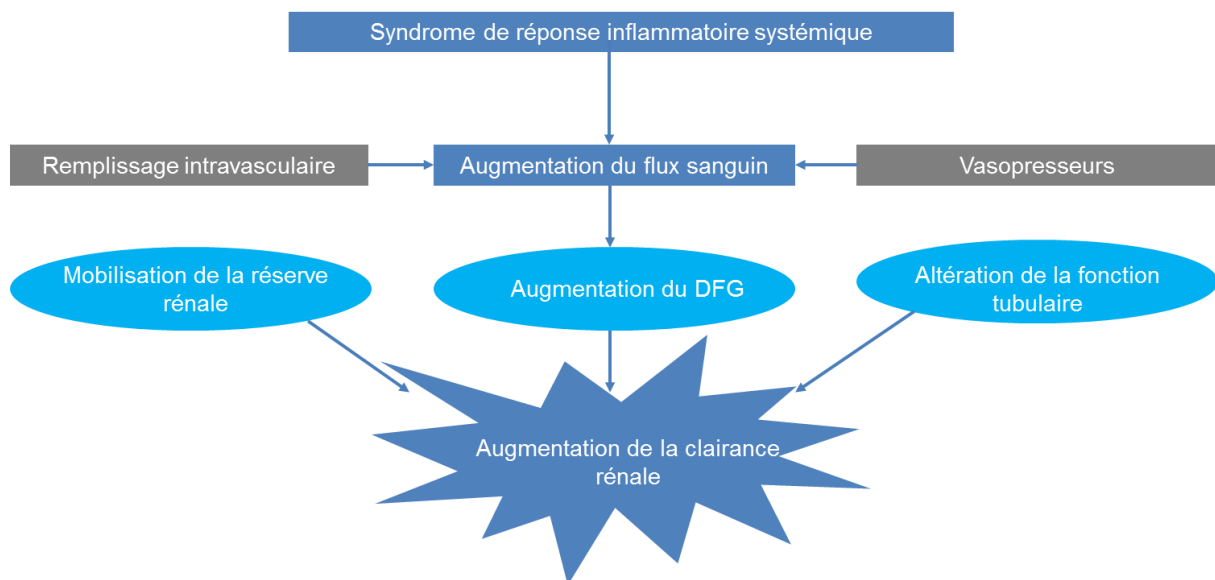


Figure 6: Mécanismes conduisant à l'augmentation de la clairance rénale chez les patients de réanimation (adapté de Udy *et al* (30))

DFG: débit de filtration glomérulaire

Cette augmentation de DFG, appelée également ARC, conduisant à des DFG supérieurs à 130 mL/min/1,73 m² de surface corporelle a pour conséquence la diminution des concentrations plasmatiques mais aussi tissulaires en céphalosporine (33–35).

1.8.1.5 Les techniques d'Extra Corporeal Life Support

Les techniques d'*Extra Corporeal Life Support* (ECLS) encore appelées *Extra Corporeal Membrane Oxygenation* (ECMO) permettent de suppléer temporairement une défaillance cardiaque et/ou pulmonaire réfractaire aux traitements médicaux. Le recours à l'ECLS a augmenté de manière exponentielle au cours de la dernière décennie, du fait d'avancées technologiques significatives et d'évènements spécifiques (36). Les résultats favorables de l'étude CESAR, conjugués à la recrudescence de cas sévères de syndrome de détresse respiratoire aiguë lors de la pandémie de grippe A (H1N1) de 2009, a généré un intérêt considérable pour ces techniques dans les défaillances respiratoires aiguës (37). De même,

l'utilisation de l'ECLS cardiaque a augmenté de façon spectaculaire dans certains pays après la publication de l'étude IABP-SHOCK II (38).

Les profils pharmacocinétiques/dynamiques des médicaments sont significativement altérés chez les patients implantés avec ECLS, pouvant induire une toxicité par accumulation ou au contraire un échec thérapeutique (39). Ces patients sont pour la grande majorité d'entre eux traités par des antibiotiques dont des céphalosporines et ils présentent des facteurs de risques important d'infection (40). Aucune étude n'a pour le moment exploré spécifiquement la pharmacocinétique des céphalosporines chez ces patients implantés.

1.8.2 L'albuminémie

Les antibiotiques hydrophiles comme les céphalosporines et autres bêta-lactamines présentent un faible V_d . Ce V_d peut toutefois être considérablement augmenté dans certaines populations de patients présentant des niveaux inflammatoires très élevés comme les patients de réanimation, notamment du fait d'une augmentation de la perméabilité capillaire observée au cours du syndrome de réponse inflammatoire systémique. Conjointement, une hypoalbuminémie est observée dans la moitié des cas en réanimation, consécutive à une hémorragie, une hémodilution associé au remplissage vasculaire, une malnutrition, une insuffisance hépatocellulaire, une fuite urinaire ou cutanée par brûlure et à la création d'un secteur interstitiel à forte pression oncotique (41).

La liaison des céphalosporines à l'albumine et aux protéines plasmatiques détermine la fraction libre qui est la fraction biologiquement active. Celle-ci diffuse à travers les membranes biologiques vers les tissus et est éliminable par les reins. Lorsque la protidémie et notamment l'albuminémie baissent, la fraction libre tend à augmenter entraînant alors une augmentation du V_d . Par exemple, le V_d de la ceftriaxone est doublé en moyenne chez le patient de réanimation (41). Les études réalisées chez les patients de réanimation montrent que la liaison des céphalosporines aux protéines plasmatiques varie fortement notamment pour les molécules les plus fortement liées comme le sont la ceftriaxone et la céfazoline (42). Une corrélation entre le pourcentage de fraction libre et l'albuminémie a pu être démontrée pour certaines bêta-lactamines comme la flucloxacilline, mais ceci n'est pas applicable pour l'ensemble de la classe. De plus, la présence fréquente d'autres médicaments fortement liés aux protéines dans le plasma des patients de réanimation (molécules les plus acides telles que les anti-inflammatoires non stéroïdiens) pourrait interagir dans la liaison entre l'albumine et

les céphalosporines (43). En conséquence, les concentrations plasmatiques de céphalosporines peuvent être beaucoup plus faibles avec une variabilité inter- et intra-individuelle accrue chez le patient sévèrement hypoalbuminémique et le risque de sous-dosage et d'inefficacité du traitement est alors important.

1.8.3 La diffusion au site de l'infection

La fraction qui diffuse dans les tissus cibles est la fraction non liée aux protéines plasmatiques et notamment à l'albumine. Il est généralement considéré que les céphalosporines présentent une bonne diffusion dans le liquide interstitiel mais que la diffusion dans les tissus est variable et dépend de nombreux facteurs propres à la molécule ou aux tissus eux-mêmes.

Plusieurs facteurs conditionnent la diffusion de ces molécules dans les tissus:

- **Les caractéristiques physicochimiques:** les molécules les plus lipophiles traversent mieux les membranes lipidiques que les molécules les plus hydrophiles.
- **La taille des molécules:** les capillaires sanguins étant perméables aux plus petites molécules (<1000 kDa), seule la forme non liée aux protéines plasmatiques est à même de passer cette barrière.
- **Le taux de LPP** est donc un facteur important pour la diffusion tissulaire. S'il a longtemps été considéré que plus la LPP était importante et moins la diffusion tissulaire était importante, ce concept est actuellement remis en cause. En effet, il faut tenir compte de l'affinité de la molécule pour les protéines tissulaires ainsi que des phénomènes de saturation de la LPP qui sont parfois observables. Ainsi, la ceftriaxone et la ceftazidime présentent toutes les deux un V_d d'environ quinze litres qui est le reflet de leur distribution tissulaire alors que la ceftriaxone est liée à environ 90% aux protéines plasmatiques et la ceftazidime à moins de 10%. De plus, la fraction non liée aux protéines est la fraction éliminée par les reins. Plus elle augmente, plus la Cl du médicament est importante et moins la quantité de médicament disponible pour diffuser dans les tissus est importante.
- **Les barrières hémato-tissulaires** qui "protègent" certains organes et systèmes comme le système nerveux-central, l'œil, les testicules ou le placenta limitent grandement la diffusion dans ces tissus. Deux phénomènes entraînent une diffusion accrue dans ces tissus: la rupture de continuité de la barrière (brèche méningée par exemple) ou alors

les phénomènes inflammatoires qui vont modifier la conformation des capillaires et perméabiliser la barrière (44). Ainsi la diffusion méningée de la ceftriaxone passe de 0,6-1,8% à 2-7% dans un contexte d'inflammation méningée tel que la méningite aiguë communautaire à pneumocoque ou méningocoque (45,46).

- **Le débit sanguin d'un organe** influe sur les échanges et les organes les plus irrigués comme le foie ou les poumons présentent une diffusion facilitée comparée à des tissus peu ou mal irrigués comme le système squelettique.

Les données concernant la diffusion des principales céphalosporines sont décrites dans le Tableau IX.

Tableau IX: Ratios des concentrations tissulaires sur les concentrations plasmatiques des principales céphalosporines dans les tissus ciblés.

	Fraction libre (Données RCP)	Pénétration dans les tissus ciblés			
		Cerveau (LCS)	Poumon (LBA)	Os	Endocardite
Céfazoline	10-15%	10-12% (Annexe I)	-	25% (47)	-
Céfuroxime	50 – 67%	4% (sans inflammation) (48) 11-18% (inflammation) (48)	30 % (49)	15-30% (50)	-
Céfépime	> 81%	7.8% (sans inflammation) (51)	100% (52,53)	87% (cortical) (54) 106% (spongieux) (54)	-
Céfotaxime	60-80%	3-21% (sans inflammation) (45)	4-20% (55)	15-30% (50)	-
Ceftazidime	> 90%	2.7-12.3% (sans inflammation) (56,57)	20% (58,59)	15-30% (50)	87-136% (60)
Ceftriaxone	5-15%	0.6 – 1.8% (sans inflammation) (45) 2-7% (inflammation) (46)	39% (61)	112% (cortical) (62)	3-5% (63)

RCP: résumé des caractéristiques du produit, LCS: liquide cérébrospinal, LBA: liquide de lavage broncho-alvéolaire.

L'interprétation des données de la littérature concernant la diffusion tissulaire des céphalosporines est compliquée par le manque de standardisation en terme de posologie, de site de prélèvement et de méthodologie de mesure tissulaire.

1.8.3.1 La distribution cérébrospinale

La diffusion des céphalosporines dans le liquide cérébrospinal (LCS) est influencée par de multiples facteurs. Les céphalosporines étant des molécules très hydrosolubles et très ionisées

à pH physiologique, leur diffusion au travers de la barrière hématoencéphalique est considérée comme étant assez faible. Cependant, en cas d'inflammation, la diffusion augmente grâce à l'augmentation de la perméabilité de la barrière capillaire (44). L'atteinte de concentration efficace est largement envisageable dans ce cas. Ce phénomène justifie l'utilisation du céfotaxime et de la ceftriaxone dans le traitement de première intention des méningites aiguës communautaires à pneumocoque ou méningocoque. L'emploi de fortes doses conformément aux recommandations françaises et internationales permet d'atteindre une concentration efficace (64–66). Le céfotaxime semble avoir une bonne diffusion hémato-méningée même en l'absence d'inflammation méningée ce qui justifie son utilisation dans les infections sur dérivation ventriculaire externe (45). En réaction aux ruptures de stock actuelles en céfotaxime, l'emploi de céfazoline dans cette indication a été tenté avec succès au CHU de Nantes et démontre bien que sa diffusion méningée, bien que considérée comme faible, n'est pas négligeable et permet l'atteinte de concentrations efficaces dans le LCS (Annexe I, article accepté dans *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*).

1.8.3.2 La distribution pulmonaire

Les poumons étant des organes bénéficiant d'un débit sanguin élevé et d'une bonne irrigation capillaire sans barrière hémato-tissulaire, la diffusion des céphalosporines est généralement très bonne et permet d'atteindre des concentrations tissulaires satisfaisantes aux posologies habituelles dans les indications pulmonaires.

1.8.3.3 La distribution ostéo-articulaire

La diffusion des céphalosporines au niveau osseux est souvent meilleure au niveau de l'os spongieux qu'au niveau de l'os cortical du fait d'une vascularisation plus importante (67). Le tissu osseux étant très riche en protéines tissulaires, les molécules ayant une grande affinité pour ces protéines, comme la ceftriaxone, diffuseront mieux et se concentreront de manière importante. La lipophilie est un facteur augmentant la diffusion au niveau osseux et explique le niveau de pénétration moyen de ces molécules (67).

1.8.3.4 La distribution dans l'endocardite

La principale difficulté de traitement d'une endocardite est l'architecture de la végétation qui se compose de bactéries enchâssées dans un sarcophage de fibrine et de plaquettes afin de se protéger du flux sanguin. Ceci limite la diffusion des antibiotiques. Cependant, plusieurs

études ont démontré que les céphalosporines pénétraient correctement les végétations avec des concentrations largement supérieures aux concentrations minimales inhibitrices (CMI) des germes rencontrés (60,68). La deuxième difficulté réside dans la quiescence des bactéries présentes profondément au sein de cette végétation sans capacité immédiate de division, ce qui les rend peu sensibles aux molécules antibiotiques de l'environnement. Ce second point oblige à obtenir des concentrations en antibiotique très élevées au centre de la végétation (68).

1.9 La variabilité de la réponse aux céphalosporines d'origine pharmacodynamique

1.9.1 La pharmacodynamie des céphalosporines

La pharmacodynamie ou pharmacodynamique peut se définir par l'effet d'une molécule sur un organisme. Dans le cas des céphalosporines, il s'agit de l'effet de l'antibiotique sur la bactérie cible ou sur une population bactérienne. Par ailleurs, les céphalosporines peuvent avoir également un effet pharmacologique néfaste sur l'organisme humain (toxicité, allergie) que l'on appellera toxicodynamie.

Le paramètre le plus reconnu et permettant de définir la sensibilité pharmacodynamique bactérienne est la CMI, qui est la plus faible concentration d'antibiotique, dans un milieu standardisé, capable d'inhiber une croissance bactérienne observable après 16 à 20 h d'incubation à une température de 34 à 37 °C. Cette méthode de mesure a été adaptée pour la réalisation de l'antibiogramme.

La CMI permet ensuite de classer les souches bactériennes comme "sensibles", "intermédiaires" ou "résistantes" après confrontation aux référentiels internationaux qui définissent les seuils de CMI appelés CMI ou seuils critiques. En Europe, le comité d'expert qui émet ces recommandations est l'*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) avec une mise au point quasi annuelle de ces valeurs (69). L'antibiothérapie est adaptée en fonction du profil de résistance de la bactérie.

Bien que généralisée et reconnue, la détermination standardisée des CMI présente cependant certaines limites. Premièrement, bien que relativement standardisées, les méthodes de mesure de la CMI ont une précision d'environ deux dilutions par deux soit un facteur de quatre. Deuxièmement, la CMI ne présage en rien du comportement *in vivo* de la souche bactérienne et de son adaptation à l'environnement (système immunitaire, température,

nutriments, compétition). De plus, l'inoculum bactérien ainsi que les concentrations de l'antibiotique variables en fonction du temps ne sont absolument pas prises en compte dans la mesure d'une CMI.

1.9.2 La variabilité pharmacodynamique

La découverte des bêta-lactamines, composés naturels ou synthétiques, a été l'une des plus grandes avancées scientifiques du XX^{ème} siècle permettant un allongement significatif de l'espérance de vie humaine (1). Elle s'est cependant accompagnée rapidement de l'apparition puis de l'extension de résistances par pression de sélection notamment liée à un usage des antibiotiques intensif, humain mais aussi vétérinaire et agronomique, favorisant la multiplication de souches mutantes (70).

Cette résistance peut être naturelle, liée à l'espèce bactérienne (en lien avec sa structure le plus souvent) et elle se transmet dans ce cas verticalement à sa descendance, c'est-à-dire de génération en génération, car l'information est portée par les chromosomes et est stable dans le temps, définissant le phénotype "sauvage". En revanche, ce type de résistance ne se transmet pas ou peu de manière horizontale, c'est-à-dire d'une bactérie à une bactérie voisine. Par exemple, le genre *Klebsiella* est naturellement résistant aux pénicillines par production d'une bêta-lactamase de type A chromosomique inhibée par l'acide clavulanique. Parallèlement, il existe des résistances acquises par certaines souches au sein d'une même espèce présentant un phénotype de résistance particulier et permettant parfois une transmission horizontale avec un rôle important dans la diffusion épidémique de la résistance. En effet, ce type de résistance se propage relativement facilement d'une bactérie à une autre et permet aux bactéries de "tolérer" des concentrations d'antibiotique plus élevées que les souches sensibles de la même espèce. Deux principaux modes d'acquisition de ces résistances ont été décrits:

- **La résistance chromosomique** qui résulte d'une mutation au hasard avec pour conséquence la perte ou la modification d'une protéine bactérienne habituellement ciblée par un antibiotique donné. Ce type de mutation est relativement rare mais très stable et uniquement transmis entre génération. Ces souches présenteront le plus souvent un déficit d'activité de la protéine mutée et resteront très minoritaires mais elles pourront être sélectionnées au décours d'une antibiothérapie.

- **La résistance extra-chromosomique** qui résulte de l'acquisition d'un élément mobile (plasmide ou transposon) de façon horizontale, y compris entre différentes espèces. Ces éléments sont rapidement diffusibles dans une population. Les plasmides sont porteurs de gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques mais aussi de facteurs de virulence microbiologique. Ces éléments mobiles transmettent ainsi par « blocs », des supports génétiques permettant de passer rapidement d'une souche sauvage à une souche multi-résistante d'emblée et agressive (71,72).

Voici les principaux mécanismes de résistance:

1.9.2.1 Les mécanismes de résistance non enzymatiques

- **Modification de la perméabilité de la membrane externe**

Ce mode de résistance concerne les bactéries à Gram négatif. En effet, pour accéder aux peptidoglycanes, les céphalosporines doivent franchir la membrane externe, constituée d'une bicouche lipidique recouverte de LPS, grâce à des porines codées par les gènes *Omp*. La modification de la quantité de porine à la surface bactérienne mais aussi leur conformation structurale peut altérer les capacités de pénétration des céphalosporines et donc leur activité (73).

- **Système de pompe d'efflux**

Les systèmes d'efflux participent à l'homéostasie cellulaire en exportant notamment des molécules toxiques ou des déchets du métabolisme. Ils existent non seulement chez de nombreux micro-organismes mais aussi chez les eucaryotes pluricellulaires. La membrane externe des bactéries, notamment Gram négatif, peut également contenir des protéines transmembranaires d'efflux ayant pour rôle d'évacuer l'antibiotique hors de la cellule bactérienne. Ces protéines, dont certaines utilisent de l'ATP comme substrat énergétique, peuvent être spécifiques d'une classe d'antibiotique ou alors concerner plusieurs classes de molécules (*multi drug resistance*). En produisant ces protéines en grande quantité, la bactérie empêche la céphalosporine d'accéder à sa cible. La surexpression du gène *AcrB* chez *E. coli* conduit à un efflux et une résistance à toutes les bêta-lactamines (74).

- **Modification de la cible des céphalosporines: les PLPs**

Les PLPs sont la cible pharmacologique des bêta-lactamines et par conséquent des céphalosporines. La modification conformationnelle de cette cible peut avoir une origine

chromosomique ou alors être portée par un élément mobile qui conduit à une diminution de l'affinité de la céphalosporine pour la PLP. L'exemple le plus célèbre est celui de la résistance du *Staphylococcus aureus* à la méthicilline par production d'une PLP de type 2 modifiée appelée PLP2a codée par le gène *mecA* qui est porté par une cassette (75). Cette mutation confère une résistance du *Staphylococcus aureus* à la quasi-totalité des bêta-lactamines.

1.9.2.2 Les mécanismes de résistance enzymatiques: les bêta-lactamases

Ce mode de résistance est aujourd'hui majoritaire du fait de la diminution de la prévalence de la résistance à la méthicilline chez le *Staphylococcus aureus* en Europe et surtout de l'explosion de la résistance par BLSE chez les entérobactéries (Figure 7).

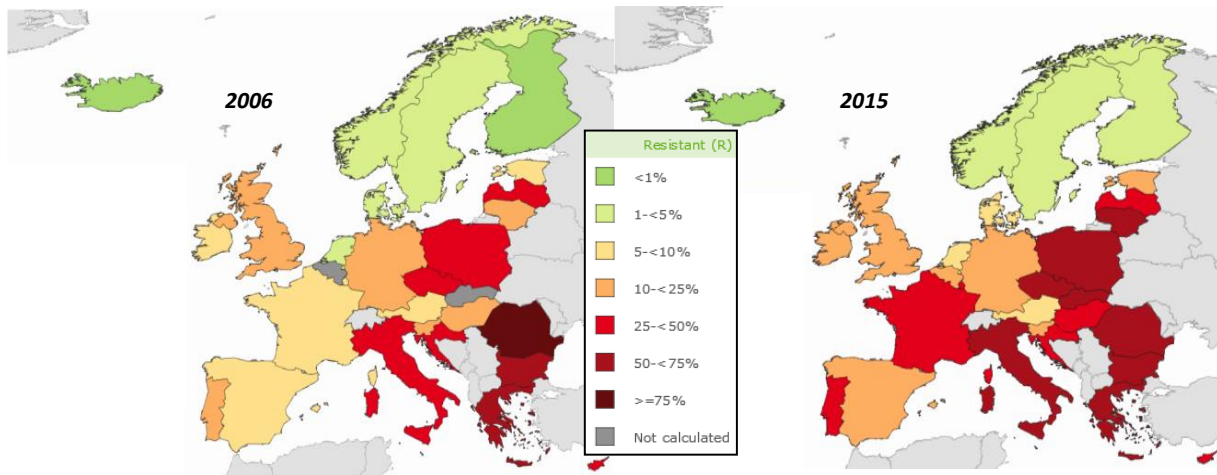


Figure 7: Carte européenne de la résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération des souches isolées de *K. pneumoniae* (Données 2006 et 2015 de l'European Centre for Disease prevention and Control (ECDC) ; ecdc.europa.eu/)

Les bêta-lactamases sont des enzymes d'inactivation de type sérine transférase ou métalloenzyme qui hydrolysent le cycle bêta-lactame au niveau de la liaison amide, produisant ainsi une molécule inactive de type acide (céphalosporoïque pour les céphalosporines) après un réarrangement irréversible. Ces enzymes ont été très précocement décrites après la découverte de la pénicilline (76). On distingue les bêta-lactamases inductibles, qui sont produites par la souche uniquement en présence d'une bêta-lactamine dans le milieu de culture (c'est le cas de la bêta-lactamase produite par *Staphylococcus aureus*) et les bêta-lactamases constitutives qui sont produites de façon permanente, qu'une bêta-lactamine soit présente ou non dans le milieu. C'est le cas des bêta-lactamases d'*Haemophilus* et de *Neisseria*.

Parmi ces bêta-lactamases, il en existe de plusieurs types: les pénicillinases (actives uniquement sur les pénicillines et éventuellement sur les C1G), les céphalosporinases de type AmpC (actives sur les pénicillines et les céphalosporines), les BLSE (pénicillinases actives également sur les céphalosporines à l'exception des céphamycines) et les carbapénémases (actives également sur les carbapénèmes en plus des autres bêta-lactamines).

La principale bêta-lactamase retrouvée chez les *cocci* Gram positif est la pénicillinase produite par les *Staphylococci*. Cependant, cette enzyme, de déterminisme chromosomique, n'est pas capable d'hydrolyser les céphalosporines car son site catalytique est trop étroit. Compte-tenu de l'arsenal thérapeutique disponible pour le traitement des *cocci* Gram positif résistant aux bêta-lactamines (glycopeptides, oxazolidinones, daptomycine), conséquence de la forte prévalence de SARM en Amérique du nord, la majorité des problématiques de résistances enzymatiques aux bêta-lactamines rencontrées en Europe concernent les bacilles Gram négatif (Entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*).

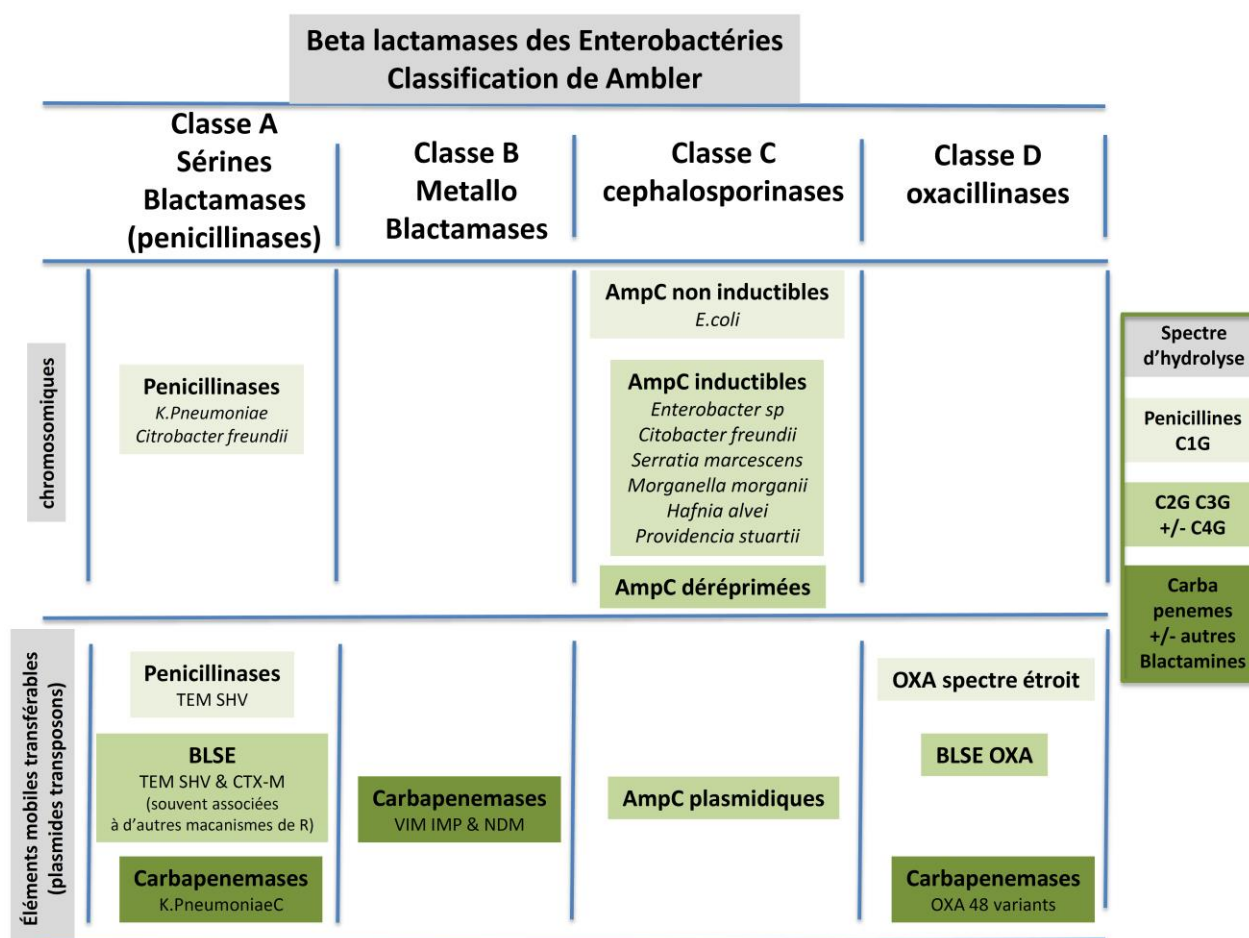


Figure 8: Classification des bêta-lactamases portées par les entérobactéries selon Ambler (77), (Figure disponible sur infectiologie.com).

Les bêta-lactamases produites par les entérobactéries sont classées selon la classification d'Ambler (Fig. 8) (77).

Aujourd'hui le mécanisme de résistance aux céphalosporines le plus fréquemment retrouvé chez les bacilles Gram négatif est la production d'une BLSE (90% dans cas de résistance aux céphalosporines). Les BLSE sont des pénicillinases modifiées dérivant de pénicillinases natives avec extension de leur spectre d'hydrolyse aux céphalosporines (à l'exception des céphamycines) suite à la mutation ponctuelle d'un ou plusieurs acides aminés de la poche catalytique de l'enzyme. L'élargissement de la poche catalytique permet ainsi d'accueillir de plus grosses molécules (78). Ces enzymes ont une origine principalement plasmidique avec le plus souvent des résistances associées à d'autres classes antibiotiques. Plus de deux cents BLSE ont été décrites et elles sont classées en trois types principaux: TEM, SHV en cause dans les infections nosocomiales et CTX-M majoritaire en Europe de l'ouest et principalement en cause dans les infections communautaires. Certaines oxacillinases sont associées aux BLSE mais leur action sur les céphalosporines est modérée.

Ainsi, parmi les BLSE de classe A d'Ambler, une enzyme hydrolysant le céfotaxime (CTX) fut initialement retrouvée en 1986, codée par un plasmide issu d'une souche d'*E. coli* provenant de la flore digestive d'un chien utilisé comme modèle de pharmacocinétique des bêta-lactamines puis elle fut classée au sein d'un groupe similaire découvert à Munich (CTX-M) (79). L'histoire naturelle de l'apparition de cette résistance a pu être établie *post hoc* avec la découverte, au début des années 2000, du même support génétique mais sur les chromosomes du genre *Kluyvera*, entérobactérie non pathogène issue de l'environnement à l'origine de la formation d'un plasmide hautement transmissible aux entérobactéries comme les *Klebsiella spp.* et les *E. coli* (Fig. 9) (80).

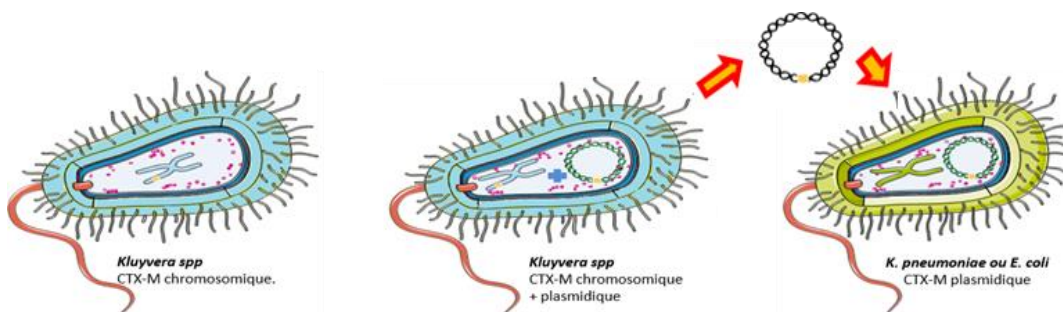


Figure 9: Représentation de l'histoire naturelle de la transmission inter-espèce de la résistance aux C3G par bêta-lactamase à spectre étendue à partir du genre *Kluyvera*.

L'émergence de ces souches productrices de BLSE est le résultat de l'utilisation massive de C3G et autres bêta-lactamines.

Un second mécanisme de résistance enzymatique impactant les céphalosporines est la production d'une céphalosporinase de type AmpC. Ce mécanisme est actuellement plus marginal. Certaines espèces comme les *E. coli* ou les *Shigella spp.* (Entérobactéries du groupe I) produisent ce type de céphalosporinases à bas niveau de manière constitutive, ce qui leur confère une résistance aux C1G. Chez les entérobactéries du groupe III et chez *Pseudomonas aeruginosa* ces enzymes sont inductibles avec une synthèse de la céphalosporinase qui augmente en présence d'une bêta-lactamine inductrice, et qui disparaît à l'arrêt de l'exposition. Elles entraînent une résistance naturelle aux C1G et aux C2G. Enfin, les céphalosporinases dérégulées sont des résistances acquises mais transmissibles uniquement à la descendance. Elles sont sécrétées de manière constitutive et stable à très haut niveau suite à une mutation dans les mécanismes de régulation transcriptionnelle. Elles confèrent un haut niveau de résistance à toutes les céphalosporines. Ce type de mutation de résistance est sélectionné par une antibiothérapie comprenant une bêta-lactamine et encore plus par les C3G.

Enfin, le troisième type d'enzyme affectant les céphalosporines sont les carbapénémases, enzymes qui sont soit dérivées de pénicillinases (Type KPC ou OXA48) soit des métalloenzymes (Type VIM ou NDM). Elles sont présentes de manière naturelle chez certaines espèces comme *Bacillus cereus* ou *Stenotrophomonas maltophilia* mais la problématique actuelle concerne l'acquisition de ces résistances par des souches d'entérobactéries, de *Pseudomonas aeruginosa* ou d'*Acinetobacter baumannii* via des éléments génétiques mobiles avec une forte capacité de diffusion. Ces enzymes confèrent une résistance à la totalité des bêta-lactamines.

1.9.2.3 Les inhibiteurs de bêta-lactamases

Des molécules dérivées de la famille des bêta-lactamines ont été développées afin de bloquer spécifiquement l'activité des bêta-lactamases. Ces molécules présentent une affinité très élevée pour la poche catalytique de l'enzyme et sont des inhibiteurs compétitifs de la dégradation des bêta-lactamines. Ces molécules sont essentiellement efficaces sur les pénicillinases et parmi elles les BLSE qui sont susceptibles de dégrader les céphalosporines. Cependant, la plupart des inhibiteurs de bêta-lactamases sont inactifs sur les céphalosporinases de type AmpC et ont même tendance à induire leur synthèse en ce qui

concerne les céphalosporinases inductibles. Deux inhibiteurs de bêta-lactamases sont actuellement commercialisés associés à une céphalosporine: le tazobactam avec le ceftolozane et l'avibactam avec la ceftazidime. L'avibactam, qui est la dernière molécule commercialisée dans cette classe, présente une structure plus éloignée des bêta-lactamines que le tazobactam, tout en ayant pour objectif de mimer le noyau bêta-lactame. Cette particularité lui permet d'être actif sur les céphalosporinases de type AmpC et de mieux protéger la ceftazidime.

Les résistances combinées à plusieurs classes mènent à la survenue de clones « *multi drug resistant* » (résistance à au moins trois classes d'antibiotiques), extensifs (moins de trois classes d'antibiotiques encore actives) voire pan-résistants (81). Ainsi, la résistance aux C3G s'accompagne fréquemment de résistance à la classe des quinolones et/ou aminosides présentant pourtant des modes d'action très différents.

Jusqu'à présent, la résistance microbiologique était compensée par le développement continu d'innovations technologiques amenant à un état stable dans cette course à l'armement permanente. Cependant, le coût élevé de recherche & développement d'un nouvel antibiotique par rapport à son amortissement financier potentiel a entraîné, au fil du temps, un émoussement de plus en plus marqué dans la commercialisation de nouvelles molécules efficaces (82).

En conséquence, les cliniciens ont à leur disposition un arsenal parfois rendu obsolète face à l'accumulation des résistances. La prise de conscience collective associée à une médiatisation croissante du problème conduit les responsables politiques à mettre en place des mesures pour en limiter les impacts et l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) vient de classer, en Février 2017, la résistance des entérobactéries aux C3G comme priorité critique pour la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques.

1.9.2.4 La sélection de résistance et le microbiote

La flore commensale du tractus digestif héberge un grand nombre de micro-organismes : des bactéries surtout, mais aussi des virus, des *fungi*, des archées et des parasites. On estime qu'il y a autant d'organismes unicellulaires composant notre flore que de cellules nous composant (83). Grâce au progrès de la métagénomique et plus précisément du séquençage des gènes portés par l'ARN ribosomal 16 S des bactéries provenant d'échantillon de selle, il est possible de définir la composition du microbiote digestif, c'est-à-dire définir les espèces présentes, leurs abondances et leurs diversités. Le règne bactérien serait composé de huit cents à mille

espèces comprenant plus de sept mille souches différentes (84). La composition du microbiote est influencée par de nombreux facteurs exogènes tels que le mode de vie, le régime alimentaire ou encore le stress (85). On découvre de plus en plus son implication dans différentes pathologies telles que l'obésité, l'athérosclérose, les cancers, les troubles anxieux ou les maladies dysimmunitaires telles que les entérocolopathies inflammatoires (85). Cette flore est composée d'agents vivant en symbiose ainsi que de pathogènes opportunistes dont la population et le métabolisme semblent se réguler bien que les mécanismes ne soient encore que partiellement compris (86). Au sein de cette population de 10^{12} à 10^{13} individus, il existe à l'état basal des organismes portant des gènes de résistance aux antibiotiques. Aussi lors d'un traitement par antibiotiques, on constate une destruction partielle de la flore résidente (principalement anaérobie) sensible à l'agent administré, laissant ainsi la place et l'accès aux ressources nécessaires aux pathogènes résistants à ce traitement. Leur multiplication, pouvant aller jusqu'à une colonisation et une excrétion dans le milieu extérieur peut conduire à une transmission inter individuelle (87). Les traitements par antibiotiques, en modifiant la population et la diversité microbiologique du tube digestif, détériorent également son potentiel de barrière (88,89). Ce mécanisme a été démontré chez différentes espèces de mammifères : souris, rat (90), porc (91) et humain. Les effets des traitements antibiotiques peuvent rester visibles à très long terme (92). C'est pourquoi des travaux récents se consacrent à l'étude de la transplantation fécale afin de restaurer des flores saines dans des cas de perturbations du microbiote, appelées dysbioses (85).

1.10 Le suivi thérapeutique pharmacologique

Peu d'études ont évalué de manière comparative l'impact du suivi thérapeutique pharmacologique (STP) des céphalosporines et aucune de ces études n'a montré un impact sur l'évolution clinique. Cependant, l'ensemble de ces études a montré que le STP permettait d'améliorer l'exposition à l'antibiotique et l'atteinte des objectifs PK-PD (93). Au vu de la forte variabilité pharmacocinétique observée dans certaines populations (réanimation, brûlés, mucoviscidose, obèse...) le STP paraît donc être un outil important pour éviter les situations de sous- et surdosage et son niveau d'évidence a sensiblement augmenté au cours des dix dernières années (94,95).

Pour évaluer le pourcentage de temps pendant lequel la concentration plasmatique libre reste au-dessus de la CMI, les concentrations plasmatiques sont mesurées en résiduelles pour les administrations discontinues, et à l'équilibre pour les administrations en perfusion

continue. L'état d'équilibre est atteint après cinq demi-vies, soit globalement 24 à 48 h après l'initiation du traitement pour les bêta-lactamines, et même plus précocement en cas d'administration d'une dose de charge (dès 24 h). Toute modification importante des fonctions circulatoires, rénales, hépatiques, ou de l'état inflammatoire du patient, ainsi que toute intervention susceptible de modifier significativement la pharmacocinétique des bêta-lactamines (expansion volémique, introduction de catécholamines, instauration d'une épuration extra-rénale, etc.) est une indication au contrôle des concentrations plasmatiques.

1.10.1 Les méthodes de dosage

Avec l'intérêt grandissant du STP des bêta-lactamines et notamment des céphalosporines, un effort important a été fait sur le développement de nouvelles méthodes de dosage (96). Beaucoup de méthodes décrites dans la littérature utilisent la chromatographie liquide haute performance couplée à une détection dans le domaine de l'ultra-violet (97–102). La barrette de diodes utilisée pour la détection permet de sélectionner la longueur d'onde la plus appropriée à chaque molécule mais permet aussi d'obtenir le spectre d'absorption de chaque molécule ce qui permet d'augmenter la spécificité de la technique. Ce type de technique analytique présente cependant certaines limites. Le manque de spécificité de la détection dans le domaine de l'ultra-violet ne permet pas de différencier certaines molécules et est à l'origine d'interférences analytiques ayant un impact sur le rendu du résultat. Du fait du manque de spécificité, les molécules dosées devront être séparées complètement en chromatographie ce qui a pour conséquence des séquences chromatographiques relativement longues ou alors la création de méthodes spécifiques à chaque molécule. Par ailleurs, la détection par la barrette de diodes souffre d'une sensibilité limitée et ne permet pas d'atteindre des limites de détection suffisamment basses pour le dosage dans certains compartiments tissulaires comme le LCS. Du fait de ces performances analytiques limitées, la détection par spectrométrie de masse a progressivement supplanté la détection par barrette de diodes. L'analyse par spectrométrie de masse détecte les composés en fonction de leur masse moléculaire et de leur charge. Le principal intérêt de ces méthodes est la capacité à quantifier un grand nombre de molécules sur une seule séquence chromatographique (103–110). Un analyseur à triple-quadripôle permet une spécificité importante qui autorise des séquences chromatographiques plus courtes car la co-élution de certains analytes ne compromet pas leur quantification. La principale limite de la spectrométrie de masse est l'utilisation quasi systématique d'un étalon interne

portant un marquage par un deutérium (^2H) ou un carbone 13 (^{13}C) entraînant une augmentation des coûts par analyse.

1.10.2 Les cibles PK-PD

La plupart des études sur la relation pharmacocinétique-pharmacodynamique (PK-PD) des céphalosporines ont été réalisées chez les patients de réanimation. Les résultats de l'étude DALI suggère que la cible PK-PD doit être une concentration plasmatique résiduelle libre supérieure à la CMI du germe ciblé (111). Etant donné la sévérité des affections des patients en réanimation, une cible fixée pour la concentration plasmatique résiduelle libre pour l'administration discontinue, ou à l'équilibre pour la perfusion continue, entre quatre et huit fois la CMI de la bactérie identifiée est habituellement admise (112). Cette marge de sécurité par rapport à une cible fixée à une fois la CMI se justifie par l'imprécision dans la détermination de la CMI (cf. Chapitre 1.9.1 La pharmacodynamie des céphalosporines) (113) mais également par la variabilité de la diffusion des céphalosporines vers le tissu cible, particulièrement dans des infections telles que les endocardites, médiastinites, infections neuro-méningées ou infections sur matériel prothétique. Par ailleurs, l'utilisation de cibles élevées permet de prévenir le risque de sélection de mutants résistants (114) et d'assurer une vitesse de bactéricidie maximale (113). Dans le cas d'une prescription probabiliste (*i.e.* documentation bactériologique non encore disponible) ou en cas d'infections non documentées (*i.e.* absence de prélèvement microbiologique ou prélèvement non contributif), la valeur de *l'epidemiological cut-off value* (ECOFF) définie par l'EUCAST la plus élevée pour les principales bactéries habituellement incriminées dans l'infection considérée est à utiliser (69). Dans le cas d'une infection documentée mais avec une CMI de la bactérie identifiée en culture non disponible, l'ECOFF pour cette espèce bactérienne est à considérer.

La concentration maximale cible pour limiter le risque de toxicité est définie à partir des données mettant en évidence une relation concentration/toxicité et des seuils toxiques pour les concentrations résiduelles ou à l'équilibre. Ces données existent pour le céfépime (25,26), et la ceftriaxone (27). Lorsque ces données n'existent pas, une concentration libre résiduelle égale à 8 fois la CMI a été retenue comme seuil maximal à ne pas dépasser, car des concentrations supérieures à ce seuil ne semblent pas améliorer l'efficacité d'une part (115), et augmentent le risque de toxicité neurologique d'autre part (116). Le Tableau X résume les principales cibles du STP des céphalosporines.

Tableau X: Cibles pour la concentration résiduelle plasmatique totale (C_{\min}) ou libre ($C_{\min L}$) en cas d'administration discontinuée, et pour la concentration plasmatique totale ($C_{\text{éq}}$) ou libre ($C_{\text{éqL}}$) à l'équilibre en cas d'administration continue, pour les principales céphalosporines (adapté des recommandations de la SFAR et de la SFPT).

	Concentrations plasmatiques cibles recommandées [#]		CMI seuil considérée [£]
	Infection documentée	Infection non documentée	
Céfazoline (47)	$C_{\min L}$ ou $C_{\text{éqL}} \geq 4x$ CMI C_{\min} ou $C_{\text{éq}} < 80$ mg/L	C_{\min} : 40-80 mg/L [§] $C_{\text{éq}}$: 40-80 mg/L	2 mg/L (<i>S. aureus</i>)
Céfépime (25,26)	$C_{\min L}$ ou $C_{\text{éqL}} \geq 4x$ CMI $C_{\min} < 20$ mg/L ou $C_{\text{éq}} < 35$ mg/L	C_{\min} : 5-20 mg/L $C_{\text{éq}}$: 5-35 mg/L	1 mg/L (Entérobactéries) ^{§§}
Céfotaxime (117)	$C_{\min L}$ ou $C_{\text{éqL}} \geq 4x$ CMI C_{\min} ou $C_{\text{éq}} < 60$ mg/L	C_{\min} : 25-60 mg/L $C_{\text{éq}}$: 25-60 mg/L	4 mg/L (<i>S. aureus</i>)
Ceftazidime (118)	$C_{\min L}$ ou $C_{\text{éqL}} \geq 4x$ CMI C_{\min} ou $C_{\text{éq}} < 80$ mg/L	C_{\min} : 35-80 mg/L [§] $C_{\text{éq}}$: 35-80 mg/L	8 mg/L (<i>P. aeruginosa</i>)
Ceftriaxone (27)	$C_{\min L} \geq 4x$ CMI $C_{\min} < 100$ mg/L	C_{\min} : 20-100 mg/L	0,5 mg/L (<i>E. cloacae</i>)

£ La CMI seuil considérée a été choisie en considérant le traitement par céphalosporines soit durant sa phase probabiliste, soit en cas de non documentation microbiologique, lorsque la molécule administrée a fait l'objet d'un pari clinique pour couvrir un maximum de pathogènes habituellement identifiés dans l'infection considérée.

Pour les infections des tissus avec une mauvaise diffusion des céphalosporines (endocardites, infections sur matériel prothétique, médiastinites, etc.), les valeurs hautes de la cible sont à privilégier.

§ La concentration résiduelle cible minimale est difficilement atteignable par administration discontinuée suggérant de choisir une administration par voie continue pour atteindre cette cible.

§§ La CMI seuil épidémiologique la plus élevée (ECOFF = 8 mg/L pour *P. aeruginosa*) n'a pas été retenue car les concentrations cibles calculées ne seraient pas compatibles avec les seuils toxiques définis par les données cliniques. Pour être cohérent avec les concentrations décrites dans la littérature, la CMI seuil clinique égale à 1 mg/L (Entérobactéries), supérieure aux « CMI seuil épidémiologiques » (ECOFF) en dehors de celle de *P. aeruginosa*, a été retenue.

1.11 L'objectif de la thèse

L'objectif de ce travail de thèse a été d'étudier trois facteurs de la variabilité de la réponse pharmacologique aux céphalosporines. Le premier facteur étudié était l'obésité morbide et ses conséquences sur la pharmacocinétique de la céfazoline lorsqu'elle est employée en prophylaxie de la chirurgie bariatrique. Le second facteur étudié était les modifications physiologiques retrouvées chez le patient traité pour une méningite bactérienne et leur impact sur la pharmacocinétique de la ceftriaxone. Enfin, le troisième facteur étudié était le choix d'une antibiothérapie par C3G et ses conséquences sur la sélection de bactéries résistantes et sur le microbiote digestif.

L'ensemble de ces travaux avait pour but d'augmenter la somme des connaissances sur les céphalosporines et d'en améliorer l'utilisation au quotidien.

2. Publication 1

Prophylactic cefazolin concentrations in morbidly obese patients undergoing sleeve gastrectomy: Do we achieve targets?

2.1 Résumé détaillé en français

L'obésité morbide est connue pour augmenter le risque d'infections du site opératoire. Des concentrations tissulaires optimales en antibiotique au niveau du site de l'infection potentielle sont nécessaires en antibioprofylaxie chirurgicale. L'objectif de ce travail était de construire un modèle de pharmacocinétique de population pour une population d'obèses morbides afin d'évaluer, en simulation de Monte Carlo, la dose de 4000 mg de céfazoline actuellement recommandée en France et de proposer de nouveaux schémas d'administration.

Cent dix-sept patients souffrant d'obésité morbide (indice de masse corporelle moyen: 46,95 kg/m²) ont reçu 4000 mg de céfazoline par voie intraveineuse avant une gastrectomie de type *sleeve*. À l'aide de la modélisation pharmacocinétique de la population et des simulations de Monte Carlo, des *probability of target attainment* (PTA) (concentration tissulaire sous-cutanée de céfazoline supérieure à la CMI des germes ciblés pendant toute la durée de la procédure chirurgicale) ont été déterminées. Pour *Staphylococcus* spp et *Streptococcus* spp, qui sont les espèces les plus fréquemment isolées des infections post-chirurgicales en chirurgie bariatrique (CMI habituellement ≤ 2 mg/L), la PTA était supérieure à 0,9 jusqu'à 2 h après l'administration de 4000 mg de céfazoline. Pour les CMI allant jusqu'à 4 mg/L, une prophylaxie efficace a été vérifiée jusqu'à 1 heure après l'administration initiale. Un régime de 3000 mg suivi d'une perfusion continue (1000 mg/h) permettait d'atteindre ces 2 cibles jusqu'à 4 h après la dose de charge. Une administration de 2000 mg et de 3000 mg ne permettait par contre pas d'atteindre des concentrations suffisantes.

Selon la durée de l'intervention chirurgicale et les valeurs de CMI, une administration initiale de 4000 mg devrait être suffisante, mais pour les chirurgies prolongées, une perfusion continue peut être envisagée.

2.2 Article accepté dans *International Journal of Antimicrobial Agents*

Matthieu Grégoire, Romain Dumont, Ludovic Ronchi, Jean-Baptiste Woillard, Vincent Atthar, Éric Letessier, Raphaël Cinotti, Antoine Roquilly, Guillaume Deslandes, Pascale Jolliet, Karim Asehnoune, Éric Dailly

2.3 Introduction

The incidence of morbid obesity has reached epidemic levels in many parts of the world [1]. Bariatric surgery is the only efficient strategy to treat it [2,3]. Bariatric surgery is offered to overweight patients to reduce the burden of their pathology, but this type of intervention increases the risk of infection [4]. Obesity is known to increase infectious morbidity and mortality and to be an independent risk factor for surgical site infections (SSIs) [5]. SSIs, defined as infections occurring within 30 days after a surgical operation, are classified as either superficial or deep wound infections or infections involving organs or body spaces [6,7]. Most SSIs are superficial wound infections [8]. For antimicrobial prophylaxis for bariatric procedures, cefazolin, a first-generation cephalosporin, was one of the first agents to show proven efficiency [4]. Currently, it is the most commonly used agent because of its broad spectrum, safety and experience of use [7,9]. Despite its extensive use in obese patients, there are limited data available describing cefazolin pharmacokinetics in this patient population. Previous studies suggest that this patient group may experience altered pathophysiology [10,11]. The usual dosing strategy (2000 mg administered before surgery) may fail to provide adequate perioperative prophylaxis in different bariatric surgeries [10–12]. One study found that a 2000-mg dose was sufficient in obese patients to prevent SSIs with no significant differences from non-obese patients [13]. However, in this study, the rate of SSIs remained relatively high in the 2 groups (7 of 99 patients in the obese group). Another study, based on tissue concentrations, showed that 2000 mg before surgery allowed coverage for bacteria with MIC <1 mg/L, especially because of the post-antibiotic effect [14]. These results based on a few patients should be confirmed. The American Society of Health-System Pharmacists (ASHP), the Infectious Diseases Society of America (IDSA), the Surgical Infections Society (SIS) and the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) currently recommend 2000 mg of cefazolin before surgery followed by a second dose 4 h

after the first for patients weighing more than 80 kg, and 3000 mg before surgery followed by a second dose 4 h after the first for patients weighing more than 120 kg. The French Society of Anaesthesia and Reanimation (SFAR) recommends 4000 mg of cefazolin before surgery followed by a second dose of 2000 mg 4 h after the first [9,15]. These guidelines are based on very few pharmacokinetics data and, to our knowledge, these dosing strategies for sleeve gastrectomy have not been investigated previously despite the increasing popularity of bariatric surgery [7]. Here, we aimed to investigate the pharmacokinetics parameters of cefazolin in obese patients undergoing sleeve gastrectomy who received an intravenous dose of cefazolin of 4000 mg before surgery. From these data, the duration of prophylaxis cover and the most appropriate doses were determined using a population pharmacokinetics approach and Monte Carlo simulations. The results obtained were then compared with current guidelines.

2.4 Materials and methods

2.4.1 Patients and ethics

This open-label, prospective study was conducted between May 1, 2012, and March 1, 2015 at Nantes University Hospital.

Morbidly obese patients aged 18–70 years, with a body mass index (BMI) ≥ 40 and ≤ 65 kg/m² and undergoing sleeve gastrectomy were considered for inclusion in the study. Patients were excluded from the study in cases of pregnancy, ongoing treatment by cefazolin, moderate or severe renal impairment defined by an MDRD (Modification of Diet in Renal Disease) estimated glomerular filtration (eGFR) rate ≤ 60 mL/min or known β -lactam allergy.

Written informed consent was obtained from all patients enrolled in the study. The study design and consent form were approved by the local human research and ethics committee of Tours (no. BRD 11/6-R), and the study was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki (22 October 2008 version) and in accordance with French legislation. A license was issued by ANSM. This study has been registered at ClinicalTrials.gov under identifier NCT01537380.

2.4.2 Study protocol

Patients received cefazolin 4000 mg intravenously 30 min before the incision according to the SFAR guidelines [15]. Patients received remifentanyl/propofol associated with cisatracurium adjusted for ideal body weight for general anaesthesia. A perfusion line devoted to the pharmacological doses was then inserted in the patient's contralateral arm.

The same surgeon performed all surgical procedures (E.L.). Blood samples for determination of total and unbound cefazolin concentrations were collected at incision time and 15 min, 30 min, 60 min (if the surgery was longer than 60 min) after incision and at the time of wound closure. Samples were centrifuged for 15 min to obtain plasma samples and then stored immediately at -20°C until analysis. In addition, the surgeon performed subcutaneous fatty tissue biopsy just after the surgical incision and at the end of the procedure just before skin closure.

2.4.3 Quantification of cefazolin concentrations

Total cefazolin plasma concentrations were measured using a high-performance liquid chromatography (HPLC) assay coupled with UV detection. A 1 mL aliquot of plasma was added to 1 mL of acetonitrile for protein precipitation. Then, the mixture was mixed in a vortex and centrifuged at $1800 \times g$ for 5 min at 4°C . The supernatant layer (1.6 mL) was extracted with 8 mL of dichloromethane. The tubes were shaken horizontally for 10 min and centrifuged at $1800 \times g$ for 5 min at 4°C . Fifty microliters of the upper aqueous layer was injected into the HPLC system (Agilent 1200 Series, Agilent, Palo Alto, CA). The separation was performed on a Symmetry C18, 5- μm column (250×4.6 mm inner diameter) (Waters, Milford, MA). The absorbance peak for cefazolin was detected by UV absorbance at 265 nm.

Unbound cefazolin plasma concentrations were determined according to a previously validated method [10]. Plasma samples were thawed and incubated at 37°C for 20 min. A 1-mL sample of plasma was then transferred into a Millipore 4104 Centrifree YM-30 cup (Millipore Merck, Cork, Ireland), and the cups were centrifuged for 30 min at $1000 \times g$. Fifty microliters of the clear filtrate were injected into the HPLC system under the chromatographic conditions described above.

Whole tissue samples were rinsed with saline solution and blotted to remove superficial residual blood. Blood contamination was checked by visual examination of each

sample. Then, 3 fragments from different locations in each sample were taken and weighed. These fragments were sonicated individually and centrifuged at $13\,000 \times g$ for 5 min. Five hundred microliters of supernatant were mixed with 500 μL of acetonitrile and centrifuged at $13\,000 \times g$ for 5 min. Eight hundred microliters of the supernatant were added to dichloromethane (4 mL). The tubes were shaken horizontally for 10 min and centrifuged at $1800 \times g$ for 5 min at 4°C . Fifty microliters of the upper aqueous layer was injected into the HPLC system under the chromatographic conditions described above. The tissue concentration for each sample was determined as the mean of the concentrations of the 3 fragments.

The limits of quantitation were 1 mg/L in plasma and 1 $\mu\text{g/g}$ in fatty tissue. The methods were accurate (inter-day and intra-day inaccuracy $<15\%$) and showed good precision (inter-day and intra-day imprecision $<15\%$).

2.4.4 Population pharmacokinetics analysis

Cefazolin pharmacokinetics analysis was performed using a non-parametric method implemented in Pmetrics (Laboratory of Applied Pharmacokinetics, University of Southern California, CA) [16]. Pmetrics is a library package for R using Fortran.

The relationship between total and unbound plasma cefazolin was explored by regression analysis using WinReg 4.0 (Jean Debord, Limoges, France). Linear, polynomial, exponential and saturation regression models were tested.

An initial analysis was conducted to estimate the parameters of the structural model without covariates. Three kinds of structural model were tested: a one-compartment model, a two-compartment model and a three-compartment model. For each model, a linear and a saturation protein binding model were assessed.

The selection of the structural model was based on the Akaike information criterion (AIC value) and Bayesian information criterion (BIC value). The model displaying the lowest AIC and BIC values was chosen. Models were also assessed by visual examination of the diagnostic plots (observed concentration versus individual predicted concentrations, weighted residuals versus time or individual predicted concentrations, visual predictive checks). Convergence of all runs was required to investigate them.

The influence of covariates on the parameters was assessed using a backward stepwise process and visual examination of the parameter versus covariate plot. Linear, exponential, power associations and allometric scaling were assessed. The following covariates were tested: age, sex, total body weight, BMI, body surface area estimated by the formula of Dubois, ideal body weight by the formula of Hammond, creatinine serum concentration measured by enzymatic assay (Roche, Basel, Switzerland), serum albumin concentration, CKD-EPI eGFR and MDRD eGFR [17,18].

The assay error polynomial equation was defined as C0: 0.50, C1: 0.05, C2 and C3:0.00 for each output equation with an additive coefficient (lambda with 0.5 as starting value).

2.4.5 Monte Carlo simulations of dosage regimens

The final population pharmacokinetics validated model was used to perform Monte Carlo simulations. Cefazolin pharmacokinetics profiles (including total, unbound and subcutaneous tissue concentrations) from 1000 patients were simulated and the simulated subcutaneous tissue concentrations were analysed after 4 different administration schemes: 2000 mg before surgery as prescribed by American guidelines for patients weighing between 80 and 120 kg, 3000 mg before surgery as prescribed by American guidelines for patients weighing more than 120 kg, 4000 mg before surgery as prescribed by French guidelines and 3000 mg before surgery followed by a 1000 mg/h continuous infusion. In all dosing schemes, a loading dose administered in 9 minutes was simulated.

For each simulated patient, simulated subcutaneous fatty tissue concentrations were compared with 7 different values of MIC (0.25, 1, 2, 4, 8, 16, 32 $\mu\text{g/g}$) at 3 different times from the initial administration of cefazolin (1 h, 2 h and 4 h) during surgery. Fatty tissue density was considered to be 1 g/mL according to Martin *et al.* [19] so MIC values, usually expressed in mg/L, were converted in $\mu\text{g/g}$ with a 1:1 ratio for comparison with data simulated in fatty tissues. For effective prophylaxis, subcutaneous fatty tissue cefazolin concentrations above MIC should be targeted for the duration of the surgical procedure with a $\text{PTA} \geq 0.9$.

2.5 Results

One hundred and seventeen morbidly obese patients with a mean body weight of 129.9 kg (range, 95–182 kg) were included (Table 1). Four hundred and thirty-four total concentrations, 380 unbound concentrations and 238 subcutaneous fatty tissue concentrations were used to build the model.

A two-compartment model including a saturation binding model was chosen as the basic pharmacokinetics model (Fig. 1). The relationship between unbound and total concentrations was best described by a saturable binding model as follows: total concentration = (unbound concentration \times A)/(unbound concentration + B). This relationship was obtained from the classic ligand-receptor relationship after approximations assuming that unbound concentrations are negligible compared with A \times unbound concentrations. Thus, A could be considered as the total density of binding sites and B as the equilibrium dissociation constant.

GFR estimated by the CKD-EPI formula was the only covariate that significantly affected the pharmacokinetics of ceftriaxone. This covariate was integrated into the elimination constant K_e using a power model where eGFR is weighted by the median of the population (103 mL/min/1.73 m²). The estimates of the population pharmacokinetics parameters are presented in Table 2.

Diagnostic plots for subcutaneous tissue concentrations are shown in Fig. 2. Equations established by linear regression of observed concentrations versus individual predicted concentrations are close to the identity line and analysis of residuals appears to be satisfactory. Diagnostic plots for total and unbound concentrations are represented in supplementary data Fig. S1. Fig. 3 shows the visual predicted checks obtained for 1000 simulated patients for total (A), unbound (B) and subcutaneous tissue (C) concentrations. Proportion of concentrations between the 0.05 and the 0.95 quantiles was 0.901 for subcutaneous tissue concentrations, showing that the model correctly described the observed concentrations.

From the validated model, 1000 subcutaneous tissue concentration simulations were performed with 4 different administration schemes at 3 times after cefazolin administration. Median of the population CKD-EPI eGFR (103 mL/min/1.73 m²) was chosen for the simulations. Simulations show that the 4 regimens display concentrations above 2 μ g/g 1 h after the beginning of administration but only the 4000 mg scheme and the continuous

infusion scheme achieve concentrations above 4 $\mu\text{g/g}$ (probabilities of 0.936 and 0.953, respectively) (Fig. 4A). Two hours after the beginning of administration, only the 4000 mg scheme and the continuous infusion scheme achieve concentrations above 2 $\mu\text{g/g}$ (probabilities of 0.940 and 0.978, respectively, versus 0.895 for the 3000 mg scheme and 0.771 for the 2000 mg scheme) and the continuous infusion scheme is the only one to exceed 4 $\mu\text{g/g}$ (probability of 0.936 versus 0.771 for the 4000 mg scheme) (Fig. 4B). For the extended time intervention (4 h), the continuous infusion scheme is the only one to approach these 2 targets (probabilities of 0.973 for 2 $\mu\text{g/g}$ and 0.907 for 4 $\mu\text{g/g}$); the probabilities of the 4000 mg scheme are 0.609 and 0.339 for 2 or 4 $\mu\text{g/g}$, respectively (Fig. 4C).

As the model included the renal function, the influence of this covariate on PTA was studied. Three different levels of renal function (median, first and third quartiles of the population CKD-EPI eGFR: 103.0, 95.0 and 116.3 mL/min/1.73 m² respectively) were simulated and compared for each administration scheme. Conclusions of the PTA are the same at the 3 levels of renal function for the 2000 mg scheme. For the 3000 mg scheme, probability to achieve 2 $\mu\text{g/g}$ gets from 0.895 to 0.923 2h after infusion in case of 95 mL/min/1.73 m² CKD-EPI eGFR and conclusions do not differ at other time. After a 4000 mg scheme or a continuous infusion scheme, probabilities to achieve 2 $\mu\text{g/g}$ decrease respectively from 0.94 to 0.88 and from 0.936 to 0.894 2h after the beginning of infusion in case of 116.3 mL/min/1.73 m² CKD-EPI eGFR. Conclusions do not differ at other time excepted in the continuous infusion scheme where probability to achieve 4 $\mu\text{g/g}$ also decreases from 0.907 to 0.843 in case of 116.3 mL/min/1.73 m² CKD-EPI eGFR.

2.6 Discussion

The first objective of this work was to generate a population pharmacokinetics model describing the pharmacokinetics of cefazolin in a morbidly obese population. The second objective was to assess the suitability of an intravenous cefazolin dose of 4000 mg before incision, as recommended by French guidelines, to achieve tissue concentrations of cefazolin above the MIC of the most commonly encountered bacteria in SSIs throughout the surgery [20].

This is the largest trial assessing pharmacokinetics of cefazolin for antibacterial prophylaxis of bariatric surgery. One hundred and seventeen morbidly obese patients were included to build the model, whereas 3 previously published studies included less than 40

patients [10–12]. These works evaluated a 2000-mg preoperative regimen, which does not seem to be sufficient to achieve targeted concentrations. Based on these results and according to the French guidelines, we decided to assess a dose of 4000 mg, which has not been evaluated in the context of bariatric surgery [15]. For prophylaxis of caesarean delivery in morbidly obese patients, the use of high doses of cefazolin has been discussed. A recent study reported on a dose of 3000 mg for BMI greater than 30 kg/m²; another study showed no clinical or microbiological superiority of a 4000-mg dose compared with 2000 mg [21,22]. But a recent population study modelled with Pmetrics showed that a 2000-mg dose probably achieved sufficient penetration in adipose tissues [23]. Confounding for all types of surgery, another recent study showed no increase in the number of SSIs in obese patients undergoing antibiotic prophylaxis provided by 2000 mg of cefazolin [13].

In accordance with the only published model on a set of antibacterial prophylaxis in bariatric surgery, a two-compartment model was chosen [11]. The medians and the means of the pharmacokinetics parameters estimated by the model were consistent with the results obtained previously using a non-parametric approach population analysis in a morbidly obese patient population undergoing caesarean delivery; the slight differences can be explained by pregnancy, which may modify the parameters (volume of the central compartment = 11.8 L vs 7.1 L, volume of the peripheral compartment = 80.12 L vs 131.2 L, clearance = 7.38 L/h vs 6.25 L/h). However, median values for KCP (constant for transfer from the peripheral compartment to the central compartment) and KPC (constant for transfer from the central compartment to the peripheral compartment) were high (more than 100 h⁻¹), suggesting that the peripheral compartment is useless for describing plasma cefazolin kinetics, but a two-compartment model was nevertheless chosen in order to represent the tissue concentrations. Moreover, VPC values showed overprediction of the variability by the model for predictions of total and unbound concentrations. This limitation appears to be irrelevant for simulations because VPC values are satisfactory for tissue concentrations. In the population used to build the model, we demonstrate the influence of CKD-EPI eGFR on the elimination constant. This influence was expected because cefazolin is almost exclusively eliminated unchanged by the kidneys [24,25]. No other covariates have been found to influence pharmacokinetics parameters, especially weight on the volume of distribution. This could be explained by the fact that cefazolin, like all the β -lactam drugs, is a particularly hydrophilic compound. Adipose tissues contain about 30% water, therefore the volume of distribution of cefazolin is not much influenced by the amount of fat [26]. The homogeneity of the patient population

may also explain this finding because the population was exclusively patients with morbid obesity with small weight differences. Similar observations have been described previously in a population of obese women who underwent a caesarean delivery [27]. Inversely, Brill *et al.* [11], in a study comparing 8 morbidly obese patients with 7 non-obese patients, reported the influence of total body weight on the volume of distribution. The work of Brill *et al.* is based on microdialysis, which is the gold standard for sampling unbound drug fractions directly into interstitial space fluids. Moreover, this model included obese and non-obese patients, therefore the population is more heterogeneous than ours and is difficult to compare with our data because of differences in population size, biological values, anthropometric characteristics or age. Serum albumin concentrations surprisingly did not show any impact on binding parameters A and B. This is a possible limitation of the model. This may be due to the particular homogeneity of the study population (mean (SD) serum albumin concentration: 65.37 (12.51) $\mu\text{mol/L}$) with no case of undernourishment.

In our study, concentrations of cefazolin in interstitial space fluid were not studied. The only technique allowing measurement of unbound concentrations in the interstitial fluid is microdialysis, which remains the gold standard [28]. We did not perform a microdialysis pharmacokinetics analysis, which has several limitations: it requires a time-consuming calibration and a skilled operator [11]. Because of the number of patients and the time in the operating theatre, microdialysis was not possible. Concentrations of cefazolin in fatty tissue cannot be considered as unbound cefazolin concentrations at the site of infection, which is the main limit of our study. However, cefazolin is distributed mainly extracellularly in tissues, and cefazolin concentrations in our study were obtained by grinding up fatty tissues. As a consequence, the dilution of cefazolin induced by mixing intracellular and extracellular fluids probably results in an underestimation of concentrations at the site of infection, which are usually located in the extracellular compartment [29].

The most commonly encountered species in wound infections in the context of bariatric surgeries are *Staphylococcus* spp and *Streptococcus* spp [30,31]. The proportion of Gram-negative bacilli is negligible. Cefazolin has a broad antibacterial spectrum but is particularly effective in prevention of infections caused by Gram-positive cocci including *Staphylococcus aureus*. The MIC level has been used as the pharmacodynamics target in fatty tissues even though its predictive value is discussed. It has been demonstrated that for β -lactam antibacterials such as cefazolin, the stationary concentration (an *in vivo* susceptibility indicator) is close to the MIC value, which may explain why concentrations *in vivo* need to be

above the MIC, while regrowth of bacteria occurs when concentrations decline below the MIC [32]. Moreover, we considered that the MIC was the easiest susceptibility indicator to obtain. The MIC of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* and *Streptococci* is usually ≤ 2 mg/L; the MIC of coagulase-negative *Staphylococci* is higher (≤ 4 mg/L) [21,33,34].

Our results indicate that the administration of 4000 mg of cefazolin is sufficient for prophylaxis of SSIs caused by sensitive organisms (MIC ≤ 2 mg/L) for at least 2 h. However, the susceptibility of the targeted germs may differ between countries and care facilities, and higher MIC values of 4 mg/L are taken for reference in previous studies [11,35]. As shown in Fig. 4, 2 h after the first administration of 3000 mg, concentrations were not sufficient for prophylaxis of bacteria with MIC of 2 mg/L. These findings validate the French recommendations concerning the dose to be administered before the procedure. However, if tissue concentrations are not sufficient with a targeted MIC value of 4 mg/L, another solution can be proposed. A loading dose of 3000 mg followed by continuous infusion of 1000 mg/h has been assessed and showed adapted tissue concentrations even when MIC ≤ 4 mg/L, as reported in a recent study [28]. Moreover, this solution results in tissue concentrations above 4 $\mu\text{g/g}$ for at least 4 h. The doses recommended by American guidelines appear to be insufficient for intervention lasting for more than 1 h.

However, as shown in the results, renal function may influence these PTA and an extended eGFR could decrease efficacy of the 4000 mg and the continuous infusion schemes while a reduced eGFR increase efficacy of the 3000 mg scheme. The renal function is likely to be taken into account in the choice of the dose, in particular in case of prolonged intervention.

In our work, the mean duration between the first administration and wound closure was around 100 min because the method used (sleeve gastrectomy) allows short interventions. However, in other types of bariatric surgery, such as gastric bypass surgery, the duration of the intervention can be extended. This type of bariatric surgery affects the same population of morbidly obese patients, so this model could also be used for this [11,12]. However, it seems to be complicated to transpose this model to other surgeries in obese patients such as critically ill patients or women undergoing caesarean delivery [21–23,27,36,37].

In the future, the strategy of continuous infusion proposed here based on simulations needs to be assessed in real life to evaluate the rate and the type of wound infections and to demonstrate a potential clinical superiority for the prevention of SSI in bariatric surgery [31].

Funding

This study was funded by the University Hospital of Nantes. The design and conduct of the trial, as well as the analysis of the trial data and opinions, conclusions and interpretation of the data, are the responsibility of the authors. The authors retained full control of the manuscript content and its conclusions.

Transparency declarations

None to declare

Ethical approval

Written informed consent was obtained from all patients enrolled in the study. The study design and consent form were approved by the local human research and ethics committee of Tours (no. BRD 11/6-R) and the study was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki (22 October 2008 version) and in accordance with French legislation. A license was issued by ANSM. This study has been registered at ClinicalTrials.gov under identifier NCT01537380.

2.7 References

1. World Health Organization. Global database on body mass index [Internet], <http://apps.who.int/bmi/index.jsp> [accessed 24 June 2015].
2. DeMaria EJ. Bariatric surgery for morbid obesity. *N Engl J Med* 2007;356:2176–83.
3. Sjöström L, Lindroos A-K, Peltonen M, Torgerson J, Bouchard C, Carlsson B, *et al.* Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery. *N Engl J Med* 2004;351:2683–93.
4. Pories WJ, van Rij AM, Burlingham BT, Fulghum RS, Meelheim D. Prophylactic cefazolin in gastric bypass surgery. *Surgery* 1981;90:426–32.
5. Falagas ME, Kompoti M. Obesity and infection. *Lancet Infect Dis* 2006;6:438–46.
6. Chopra T, Zhao JJ, Alangaden G, Wood MH, Kaye KS. Preventing surgical site infections after bariatric surgery: value of perioperative antibiotic regimens. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res* 2010;10:317–28.
7. Mangram AJ, Horan TC, Pearson ML, Silver LC, Jarvis WR. Guideline for prevention of surgical site infection, 1999. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. *Am J Infect Control* 1999;27:97–132; quiz 133–134; discussion 96.
8. Réseau d’alerte, d’investigation et de surveillance. Surveillance des infections du site opératoire France, 1999 à 2006 [Internet]. Institut de veille sanitaire; 2008. http://www.invs.sante.fr/publications/2008/iso_raisin/iso_raisin_rapport.pdf
9. Bratzler DW, Dellinger EP, Olsen KM, Perl TM, Auwaerter PG, Bolon MK, *et al.* Clinical practice guidelines for antimicrobial prophylaxis in surgery. *Am J Health Syst Pharm* 2013;70:195–283.
10. van Kralingen S, Taks M, Diepstraten J, van de Garde EM, van Dongen EP, Wiezer MJ, *et al.* Pharmacokinetics and protein binding of cefazolin in morbidly obese patients. *Eur J Clin Pharmacol* 2011;67:985–92.
11. Brill MJE, Houwink API, Schmidt S, Dongen EPAV, Hazebroek EJ, Ramshorst B van, *et al.* Reduced subcutaneous tissue distribution of cefazolin in morbidly obese versus non-obese patients determined using clinical microdialysis. *J Antimicrob Chemother* 2014;69:715–23.
12. Edmiston CE, Krepel C, Kelly H, Larson J, Andris D, Hennen C, *et al.* Perioperative antibiotic prophylaxis in the gastric bypass patient: do we achieve therapeutic levels? *Surgery* 2004;136:738–47.
13. Unger NR, Stein BJ. Effectiveness of pre-operative cefazolin in obese patients. *Surg Infect* 2014;15:412–16.
14. Chen X, Brathwaite CEM, Barkan A, Hall K, Chu G, Cherasard P, *et al.* Optimal cefazolin prophylactic dosing for bariatric surgery: no need for higher doses or intraoperative redosing. *Obes Surg* 2017;27:626–9.

15. SFAR. Antibioprophylaxie en chirurgie et médecine interventionnelle [Internet]. 2010. http://sfar.org/wp-content/uploads/2015/10/2_AFAR_Antibioprophylaxie-en-chirurgie-et-medecine-interventionnelle.pdf
16. Neely MN, van Guilder MG, Yamada WM, Schumitzky A, Jelliffe RW. Accurate detection of outliers and subpopulations with Pmetrics, a nonparametric and parametric pharmacometric modeling and simulation package for R. *Ther Drug Monit* 2012;34:467–76.
17. Levey AS, Coresh J, Greene T, Stevens LA, Zhang YL, Hendriksen S, *et al.* Using standardized serum creatinine values in the modification of diet in renal disease study equation for estimating glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2006;145:247–54.
18. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF, Feldman HI, *et al.* A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009;150:604–12.
19. Martin AD, Daniel MZ, Drinkwater DT, Clarys JP. Adipose tissue density, estimated adipose lipid fraction and whole body adiposity in male cadavers. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1994;18:79–83.
20. Roberts JA, Kirkpatrick CMJ, Lipman J. Monte Carlo simulations: maximizing antibiotic pharmacokinetic data to optimize clinical practice for critically ill patients. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:227–31.
21. Swank ML, Wing DA, Nicolau DP, McNulty JA. Increased 3 gram cefazolin dosing for cesarean delivery prophylaxis in obese women. *Am J Obstet Gynecol* 2015;213:415.e1-8.
22. Stitely M, Sweet M, Slain D, Alons L, Hollis W, Hochberg C, *et al.* Plasma and tissue cefazolin concentrations in obese patients undergoing cesarean delivery and receiving differing pre-operative doses of drug. *Surg Infect* 2013;14:455–9.
23. Grupper M, Kuti JL, Swank ML, Maggio L, Hughes BL, Nicolau DP. Population pharmacokinetics of cefazolin in serum and adipose tissue from overweight and obese women undergoing cesarean delivery. *J Clin Pharmacol* 2017;57:712–19.
24. Brogard JM, Pinget M, Brandt C, Lavillaureix J. Pharmacokinetics of cefazolin in patients with renal failure; special reference to hemodialysis. *J Clin Pharmacol* 1977;17:225–30.
25. Craig WA, Welling PG, Jackson TC, Kunin CM. Pharmacology of cefazolin and other cephalosporins in patients with renal insufficiency. *J Infect Dis* 1973;128:Suppl:S347-53.
26. Wurtz R, Itokazu G, Rodvold K. Antimicrobial dosing in obese patients. *Clin Infect Dis* 1997;25:112–18.
27. Maggio L, Nicolau DP, DaCosta M, Rouse DJ, Hughes BL. Cefazolin prophylaxis in obese women undergoing cesarean delivery: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* 2015;125:1205–10.
28. Pevzner L, Swank M, Krepel C, Wing DA, Chan K, Edmiston CE. Effects of maternal obesity on tissue concentrations of prophylactic cefazolin during cesarean delivery. *Obstet Gynecol* 2011;117:877–82.
29. Mouton JW, Theuretzbacher U, Craig WA, Tulkens PM, Derendorf H, Cars O. Tissue concentrations: do we ever learn? *J Antimicrob Chemother* 2008;61:235–7.

30. Fischer MI, Dias C, Stein A, Meinhardt NG, Heineck I. Antibiotic prophylaxis in obese patients submitted to bariatric surgery. A systematic review. *Acta Cir Bras* 2014;29:209–17.
31. Chopra T, Marchaim D, Lynch Y, Kosmidis C, Zhao JJ, Dhar S, *et al.* Epidemiology and outcomes associated with surgical site infection following bariatric surgery. *Am J Infect Control* 2012;40:815–19.
32. Mouton JW, Vinks AA. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling of antibacterials in vitro and in vivo using bacterial growth and kill kinetics: the minimum inhibitory concentration versus stationary concentration. *Clin Pharmacokinet* 2005;44:201–10.
33. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S24 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement [Internet]. 2014. http://ncipd.org/control/images/NCIPD_docs/CLSI_M100-S24.pdf
34. EUCAST. Antimicrobial wild type distributions of microorganisms [Internet]. <http://mic.eucast.org/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=performSearch&BeginIndex=0&Micdif=mic&NumberIndex=50&Antib=237&Specium=-1> (accessed 6 November 2015).
35. Koopman E, Nix DE, Erstad BL, Demeure MJ, Hayes MM, Ruth JT, *et al.* End-of-procedure cefazolin concentrations after administration for prevention of surgical-site infection. *Am J Health Syst Pharm* 2007;64:1927–34.
36. Roberts JA, Udy AA, Jarrett P, Wallis SC, Hope WW, Sharma R, *et al.* Plasma and target-site subcutaneous tissue population pharmacokinetics and dosing simulations of cefazolin in post-trauma critically ill patients. *J Antimicrob Chemother* 2015;70:1495–502.
37. Schmitz MJ, Blumer JL, Cetnarowski W, Rubino CM. Determination of appropriate weight-based cutoffs for empiric cefazolin dosing using data from a phase 1, pharmacokinetics and safety study of cefazolin administered for surgical prophylaxis in pediatric patients aged 10 to 12 years. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:4173–80.

2.8 Tables and figures

Table 1. Demographic data in a cohort of 117 obese patients.

Variable (unit)	Mean (SD) or n (%)	Range
Age (years)	41.97 (10.60)	23–68
Female gender	88 (75.21%)	
Height (m)	1.66 (0.09)	1.28–1.95
Weight (kg)	129.91 (17.63)	95–182
Ideal body weight (kg)	61.70 (10.901)	25.20–97.50
BMI (kg/m ²)	46.95 (5.39)	40.1–65
Body surface area (m ²)	2.31 (0.20)	1.76–2.98
Serum creatinine concentration (μmol/L)	65.37 (12.51)	36–111
MDRD eGFR (mL/min/1.73 m ²)	103.10 (22.11)	58–186
CKD-EPI eGFR (mL/min/1.73 m ²)	103.13 (16.00)	55.8–132.8
Serum albumin concentration (g/L)	37.62 (3.33)	28.7–45.5
Wound closure post dose (min)	104.90 (28.38)	60–227

Ideal body weight was estimated by the formula of Hammond (IBW = 48 + 1.1 × (height – 150 cm) [if men] or 45 + 0.9 × (height – 150 cm) [if female]. BMI, body mass index. Body surface area was estimated by the formula of Dubois (BSA = weight × height × 71.84/10 000m where height is expressed in cm). MDRD eGFR, glomerular filtration rate estimated by the MDRD equation (eGFR = 175 × (Scr)^{-1.154} × (age)^{-0.203} × 0.742 [if female] × 1.212 [if African American] where Scr is serum creatinine in mg/dL). CKD-EPI eGFR, glomerular filtration rate estimated by the CKD Epidemiology Collaboration equation (eGFR = 141 × min(Scr/κ, 1)^α × max(Scr/κ, 1)^{-1.209} × 0.993^{age} × 1.018 [if female] × 1.159 [if Black], where Scr is serum creatinine in mg/dL, κ is 0.7 for females and 0.9 for males, α is –0.329 for females and –0.411 for males, min indicates the minimum of Scr/κ or 1, and max indicates the maximum of Scr/κ or 1).

Table 2. Population pharmacokinetics parameter estimates.

Parameter (unit)	Final model parameter estimate, median (range)	95 % confidence interval of the median	Variance	95 % confidence interval of the variance
K_{e1} (h^{-1})	0.885 (0.2–2)	0.706–1.150	0.364	0.280–0.437
K_{e2} (h^{-1})	1.599 (0.001–5)	1.091–2.088	0.869	0.663–1.118
K_{CP} (h^{-1})	105.950 (0.2–200)	82.520–126.665	47.365	36.966–59.283
K_{PC} (h^{-1})	113.121 (5–200)	91.657–129.516	51.426	40.074–60.583
V (L)	7.061 (2–22)	6.499–8.152	2.099	1.443–2.765
A (mg/L)	20872.999 (1–60000)	19796.590–22255.750	7376.171	5477.790–8941.266
B (mg/L)	3415.898 (1–5000)	2818.043–3713.673	929.265	595.679–1179.914
V_p (L)	131.213 (20–250)	109.446–152.154	45.302	35.290–56.045

K_e , constant of elimination from the central compartment; K_{CP} , constant of transfer from the central compartment to the peripheral compartment; K_{PC} , constant of transfer from the peripheral compartment to the central compartment; V, volume of the central compartment; A, constant A of the binding equation; B, constant B of the binding equation; V_p , volume of the peripheral compartment.

Median (Min – Max) value of unbound fraction from individual data was 14.07 % (5.16 – 25.15).

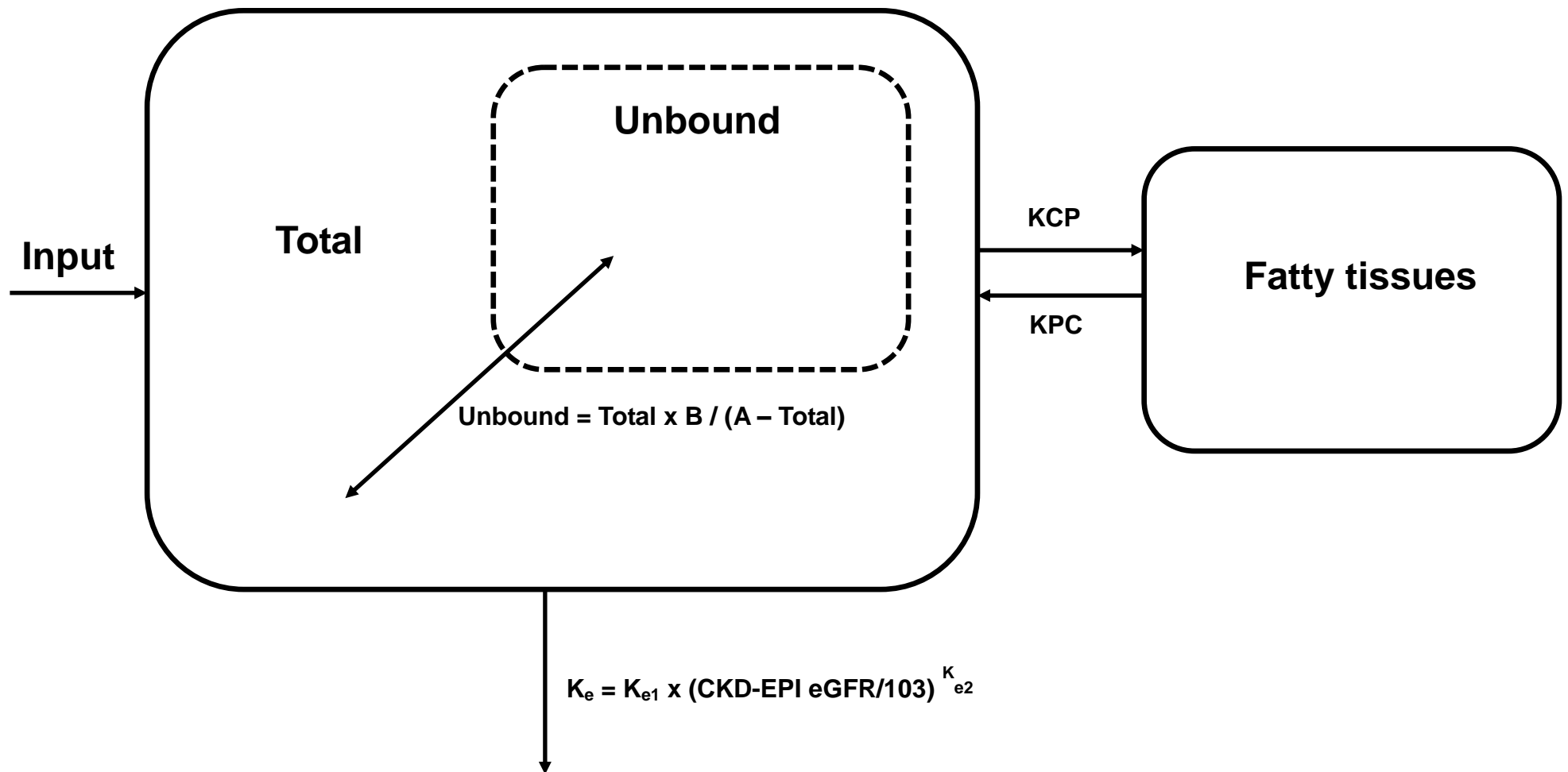


Figure 1. Representation of the population pharmacokinetics model. A two-compartment model integrating a saturation protein binding model was chosen. CKD-EPI estimated glomerular filtration rate was integrated as a covariate of the elimination constant (K_e).

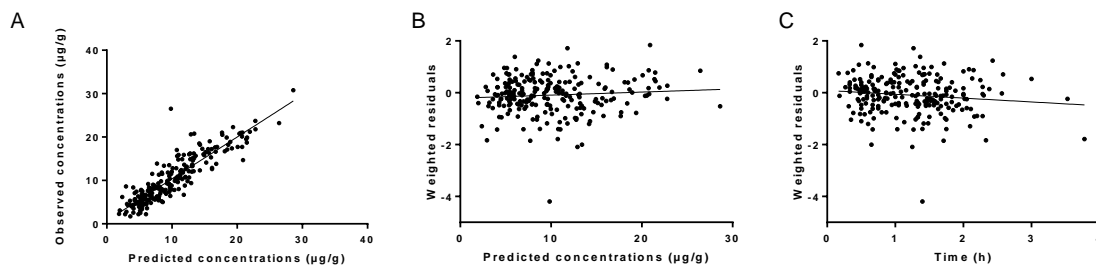


Figure 2. Graphical representations for validation of the population pharmacokinetics model of subcutaneous tissue cefazolin concentrations. (A) Observed concentrations were plotted against individual predicted concentrations (mg/L), $R^2 = 0.8041$. (B) Weighted residuals were plotted against individual predicted concentrations (mg/L). (C) Weighted residuals were plotted against time post administration (h).

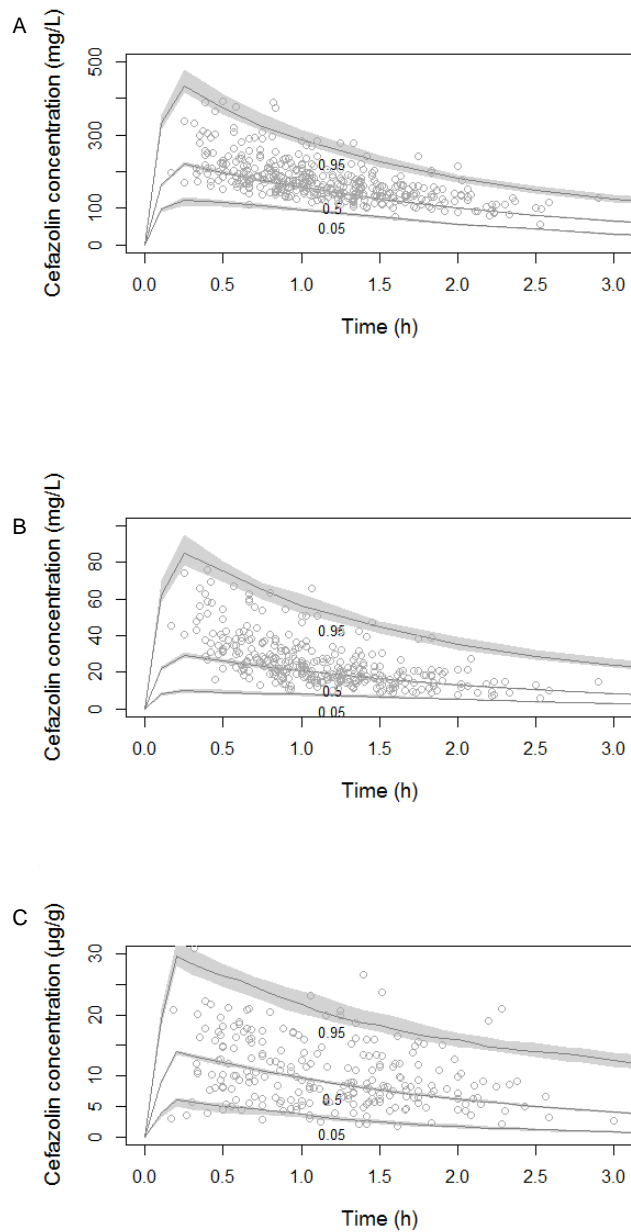


Figure 3. Visual predictive checks for total (A), unbound (B) and subcutaneous tissue (C) concentrations of cefazolin after an initial dose of 4000 mg administered in 9 min. The 5th, the median and the 95th percentiles of the simulated concentrations in 1000 Monte Carlo simulated patients are presented with the 95% confidence interval. Observed concentrations (open circles) are superimposed on simulated values. For total, unbound and tissue concentrations, 97.1%, 99.4% and 90.1% of patients, respectively, were between the 5th and the 95th percentiles.

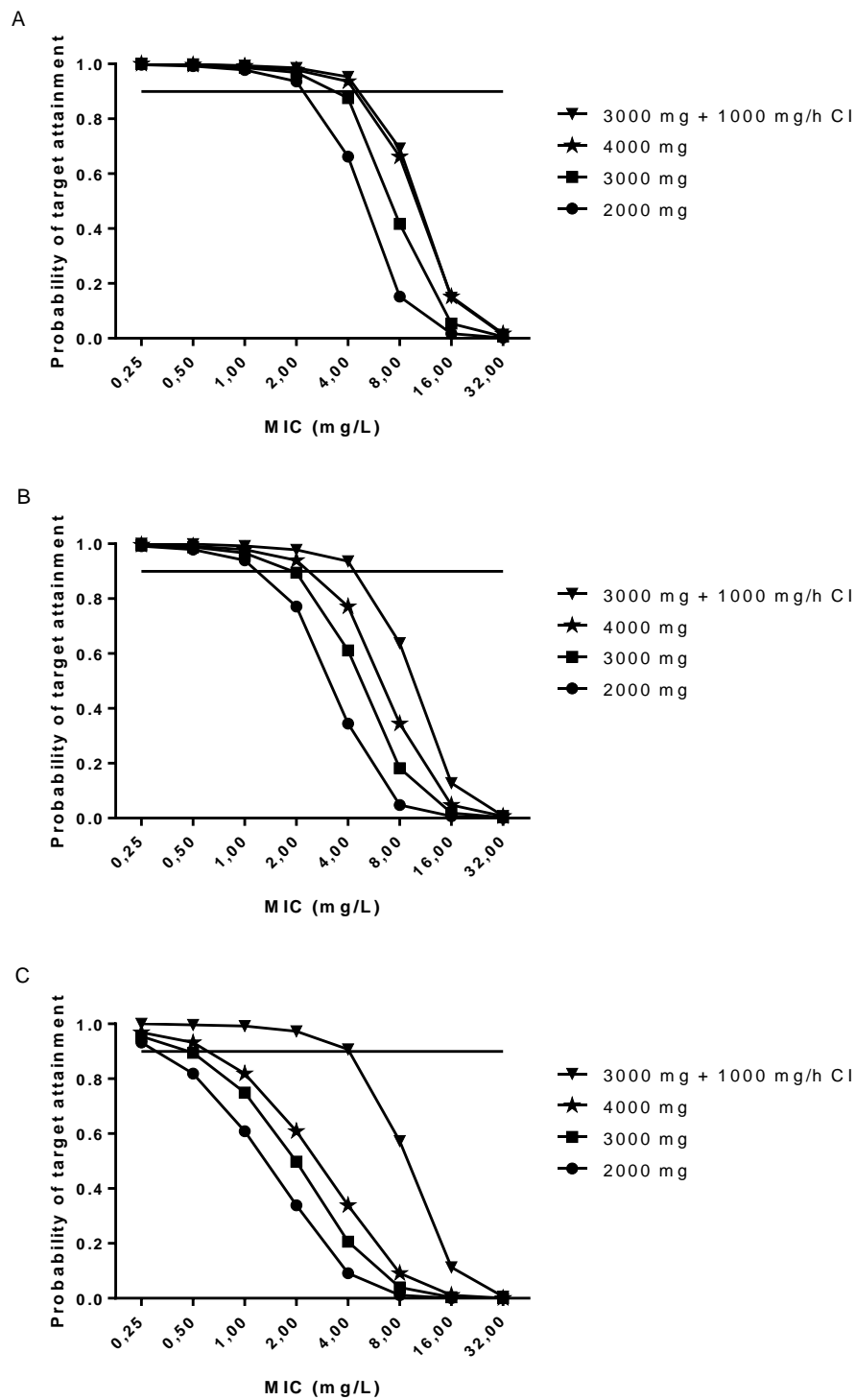
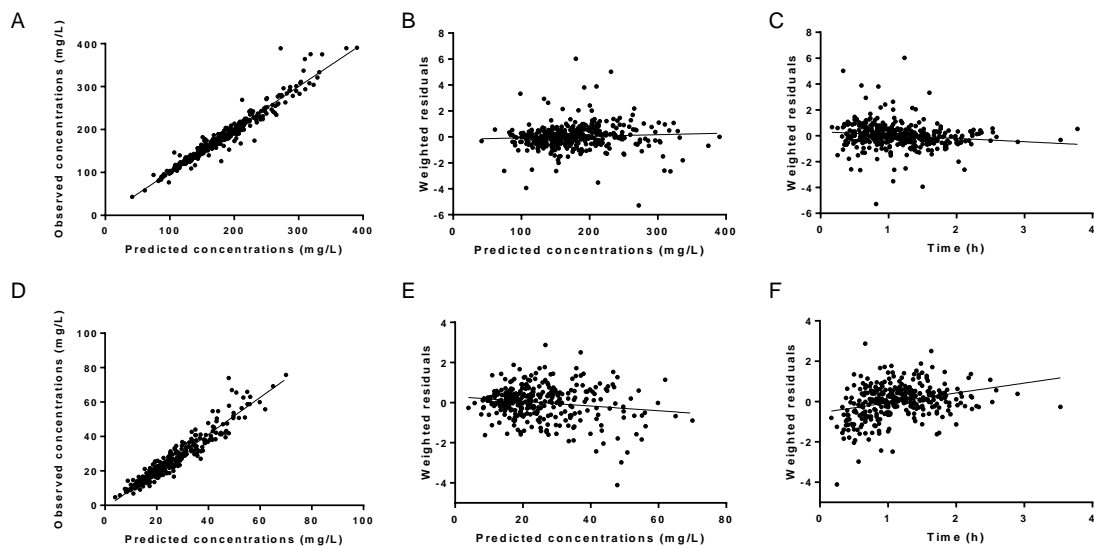


Figure 4. Probabilities of target attainment 1 h (A), 2 h (B) and 4 h (C) after the initial dose with 4 different administration schemes: 2000 mg, 3000 mg or 4000 mg in a 9-min infusion as recommended by guidelines or 3000 mg in 9 min followed by a 1000 mg/h continuous infusion. The horizontal line represents a probability of 0.9.



Supplementary data Figure S1. Graphical representations allowing the validation of population pharmacokinetic model of total (A, B and C) and unbound (D, E and F) cefazolin concentrations. (A and D) Observed concentrations were plotted against individual predicted concentrations (mg/L), $R^2=0.9483$ and 0.9219 respectively. (B and E) Weighted residuals were plotted against individual predicted concentrations (mg/L). (C and F) Weighted residuals were plotted against time post administration (h).

2.9 Remarques complémentaires sur l'article

La chirurgie bariatrique est la seule solution thérapeutique efficace à long terme pour traiter les patients souffrant d'obésité morbide (indice de masse corporelle (IMC) supérieur ou égal à 40 kg/m²). Ces patients sont particulièrement à risque d'infection du site chirurgical du fait de modifications hormonales chroniques liées à l'obésité qui impactent le système immunitaire (119). Afin de prévenir ce type d'infections, les recommandations américaines et françaises préconisent l'administration d'une antibioprofylaxie avant toute chirurgie bariatrique (120,121). La molécule la plus fréquemment recommandée dans ce contexte est la céfazoline, du fait de son spectre permettant de couvrir les germes commensaux de la peau et des muqueuses tels que les staphylocoques à coagulase négative, les *Staphylococcus aureus* ainsi que certains streptocoques mais aussi des entérobactéries. Cette molécule est d'ailleurs la première à avoir démontré son efficacité dans cette indication (122).

Aucune des recommandations actuelles ne repose sur des données de pharmacocinétique provenant d'une large cohorte de patient. Il en résulte une discordance entre les recommandations américaines et françaises. Les américains recommandent d'administrer 2 g de céfazoline avant l'intervention pour les patients pesant plus de 80 kg et 3 g pour les patients pesant plus de 120 kg. Cette première dose est suivie d'une seconde en cas d'intervention se prolongeant au-delà de 4 heures. Les recommandations de la société française d'anesthésie et de réanimation (SFAR) préconisent des posologies plus élevées avec l'administration d'une première dose de 4 g suivie si besoin par une seconde dose de 2 g en cas d'intervention se prolongeant au-delà de 4 heures.

Cette étude a permis de décrire les concentrations plasmatiques et tissulaires de la céfazoline obtenues dans cette population de patient après l'administration de 4 g de céfazoline conformément aux recommandations françaises en antibioprofylaxie d'une chirurgie bariatrique de type "sleeve" (NCT01537380).

En s'appuyant sur ces données, un travail de modélisation en pharmacocinétique de population a été conçu afin de simuler ensuite plusieurs schémas posologiques dans cette population et d'évaluer ainsi leur capacité à apporter une couverture antibiotique adéquate. Ce modèle a été construit en s'appuyant sur un algorithme non paramétrique.

Ce travail a nécessité de se former au logiciel Pmetrics, un package de R utilisant le Fortran comme langage de programmation. Une formation de 2 jours au CHU de Limoges, dans le service de pharmacologie et toxicologie (Formateur: Jean-Baptiste Woillard), a été suivie pour la maîtrise de ce package. Un DU de modélisation en pharmacocinétique a également été validé au cours de ces 3 années de thèse (Université d'Aix-Marseille, Professeur Athanassios Iliadis). Pmetrics s'est avéré très adapté à la modélisation des anti-infectieux et surtout aux simulations de Monte Carlo et à la construction de PTA. L'algorithme *nonparametric adaptive grid* (NPAG) utilisé dans ce package est le seul outil non paramétrique disponible en libre accès actuellement (123).

Un travail mené en parallèle sur la même cohorte de patient par l'équipe de réanimation chirurgicale a été publié dans le *British Journal of Anaesthesia* (impact factor: 6,499) (Annexe III). Ce travail visait à décrire les concentrations tissulaires et plasmatiques de céfazoline après une analyse non compartimentale des données de l'étude. Dans ce travail, les patients étaient divisés en 2 groupes en fonction de leur IMC (groupe A $40 \leq \text{IMC} \leq 50 \text{ kg/m}^2$ et groupe B $50 < \text{IMC} \leq 65 \text{ kg/m}^2$). Les concentrations tissulaires chez les patients du groupe B étaient parfois insuffisantes pour garantir la couverture antibioprophylactique lors d'interventions prolongées. Ces données sont en partie concordantes avec l'analyse de population que nous avons réalisée bien que cette dernière ne retrouvait pas d'influence du poids sur la pharmacocinétique tissulaire de la céfazoline. Cela pourrait s'expliquer par l'homogénéité de l'échantillon de patients qui n'a pas permis de mettre en évidence cette influence mais également par le choix des covariables anthropométriques testées qui n'étaient peut-être pas adaptées.

L'analyse de population a permis de simuler un schéma d'administration en perfusion continue après une dose de charge. Ce type de schéma n'est actuellement pas recommandé par les sociétés savantes mais présente un intérêt important en cas d'intervention compliquée et prolongée. En effet, les concentrations efficaces sont atteintes sur une longue période tout en diminuant les quantités d'antibiotique administrées au patient. Ce type de schéma est à considérer car il peut également améliorer la tolérance neurologique et rénale à l'antibiotique en limitant les concentrations élevées au pic.

La modélisation des données a été l'occasion de travailler sur la relation entre la forme libre et la forme totale de la céfazoline. Le logiciel WinReg 4.0 (Jean Debord, Limoges, France) a été utilisé pour analyser cette relation avec des modèles de régression linéaire,

polynomiaux, exponentiels et saturables qui ont pu être testés. La régression suivante a été choisie: $\text{concentration totale} = (\text{concentration non liée} \times A) / (\text{concentration non liée} + B)$. Cette relation a été obtenue à partir de la relation classique ligand-récepteur après approximation en supposant que les concentrations non liées étaient négligeables par rapport à A multiplié par les concentrations non liées. Ainsi, A pourrait être considéré comme la densité totale des sites de liaison et B comme la constante de dissociation à l'équilibre. L'intégration de cette relation dans le modèle a considérablement amélioré la vraisemblance de ce dernier. Cette relation semble être transposable pour la modélisation d'autres bêta-lactamines.

Les résultats de ce travail ont été publiés dans *l'International Journal of Antimicrobial Agents* (impact factor: 4,253) (Annexe IV). Ces données ont également été présentées en poster au 26^{ème} *European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* à Amsterdam en avril 2017.

3. Publication 2

Adaptation of high-dose ceftriaxone administration scheme to the renal function. Population pharmacokinetics part of “High-Dose Ceftriaxone in Central Nervous System Infections” a prospective multicentric cohort study.

3.1 Résumé détaillé en français

Des doses de ceftriaxone supérieures à 4 g ou 75 mg/kg par jour sont utilisées pour traiter les infections du système nerveux central. L'adaptation posologique en fonction du DFG n'est actuellement pas recommandée par les sociétés savantes. Au cours de ce travail, la pharmacocinétique de la ceftriaxone à haute dose a été étudiée par une approche populationnelle chez des patients traités pour une méningite bactérienne. Cette étude de cohorte prospective multicentrique a recruté des patients traités par ceftriaxone à haute dose pour des infections du système nerveux central, de décembre 2012 à juillet 2015.

Les concentrations dans le plasma et dans le LCS ont été analysées en pharmacocinétique de population à l'aide du logiciel Pmetrics. Les cibles thérapeutiques ont été définies comme des concentrations dans le LCS supérieures aux seuils épidémiologiques de CMI des bactéries causant généralement les méningites chez l'adulte, pendant toute la durée du traitement. Les probabilités d'atteindre ces cibles (PTA) ont été déterminées par des simulations de Monte Carlo dans 3 groupes affichant différents niveaux de DFG.

Sur la base de 153 patients inclus, un modèle intégrant les concentrations totales et les concentrations non liées de ceftriaxone dans le plasma et dans le LCS incluant le DFG estimé par Cockcroft & Gault en tant que covariable de l'élimination de la ceftriaxone a été utilisé. Les sujets présentant un DFG normal ont nécessité une administration en deux fois par jour pour obtenir une PTA supérieure à 0,9 pour les CMI habituellement retrouvées chez *Streptococcus pneumoniae*. En cas de DFG élevé, une PTA de 0,9 pour les patients infectés par *Haemophilus influenzae* et *Streptococcus pneumoniae* été atteinte seulement après 2 administrations quotidiennes. Pour un faible DFG, la PTA était supérieure à 0,9 dans tous les cas, même après une administration unique quotidienne.

Le schéma d'administration de la ceftriaxone devrait être adapté au DFG. En cas de DFG normal, une administration en deux fois par jour devrait être préférée.

3.2 Article soumis au *British Journal of Clinical Pharmacology*

Matthieu Grégoire, Éric Dailly, Denis Garot, Thomas Guimard, Louis Bernard, Pierre Tattevin, Yves-Marie Vandamme, Jérôme Hoff, Florian Lemaitre, Marie-Clémence Verdier, Guillaume Deslandes, Paul Le Turnier, David Bouteille, Dominique Navas, Nathalie Asseray

3.3 Introduction

Ceftriaxone is a broad-spectrum cephalosporin recommended for empiric treatment of bacterial meningitis [1–3]. This antibiotic displays original pharmacokinetics (PK) with a dual biliary and renal clearance and an extended half-life allowing a twice-daily or even a once-daily administration scheme. Ceftriaxone recommended dosages for treating meningitis are different from one learned society to another. IDSA (Infectious Diseases Society of America) and ESCMID (European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases) recommended 4 g per day in adults whatever patients weight [2,3], while French guidelines promote a dose-weighted adjustment in a range of 75 mg/kg to 100 mg/kg per day without upper limit dosage [1]. None of them recommends an adaptation according to the glomerular filtration rate (GFR) except French guidelines in case of GFR lower than 10 mL/min.

High dosages used in central nervous system (CNS) infections are widely higher than those usually prescribed. Hence, previous studies investigated ceftriaxone population PK after administration of dosage generally equal or lower than 2 g per day [4–8], and no specific study was performed in populations receiving more than 4g per day. Moreover, meningeal inflammation should modify antibiotic distribution by improvement of the penetration into the cerebrospinal fluid (CSF) and the brain and high GFR are frequently observed in critically ill patients with community-acquired acute infectious meningitis and are likely to affect ceftriaxone clearance [9,10]. These changes observed during meningitis justify investigating specifically ceftriaxone PK in this population. The aim of this work was to describe the PK of total and unbound plasma and CSF ceftriaxone concentrations in a large cohort of patients treated for suspected bacterial meningitis with high daily dosage (more than 75 mg/kg or 4 g per day). Based on the final developed model, Monte Carlo simulations were performed to propose an optimal ceftriaxone regimen in patients treated for suspected bacterial meningitis according to the renal function.

3.4 Materials and methods

3.4.1 Ethics and patients

This work is an ancillary population PK study from an open-label prospective, multicenter study entitled “High-Dose Ceftriaxone in Central Nervous System Infections” aiming to determine PK and tolerance of high-dose ceftriaxone in CNS infected patients. Study was approved by regulatory authorities according to French law and research clinical practices and has been registered both by French drug agency (ANSM) and American food and drug administration (FDA, registration available on ClinicalTrials.gov under identifier NTC01745679). All patients gave their written informed consent.

Patients suffering from suspected or proven CNS infections treated with ceftriaxone daily dosage equal or higher than 4 g or 75 mg/kg were enrolled in 6 French centers in Infectious Diseases departments or intensive care units from the west of France (Nantes University Hospital, Angers University Hospital, Saint-Nazaire Hospital, Tours University Hospital, La Roche-sur-Yon Hospital, Rennes University Hospital) between December 2012 and July 2015 and only those suffering from community or acquired meningitis were included.

3.4.2 Collection of clinical and therapeutic data

Clinical evolution was followed by the physician in charge of the patient and clinical and therapeutic data were listed in a case report form.

3.4.3 Quantification of ceftriaxone concentrations

Ceftriaxone plasma concentrations were determined by validated high-performance liquid chromatography methods with UV detection in the pharmacology departments of Nantes and Rennes University Hospital. Concentrations for patients included in Rennes University Hospital were measured using a previously validated assay [11]. Total ceftriaxone plasma concentrations for other patients were centralized in the pharmacology department of Nantes University Hospital and consistency of results between the two departments was checked. The limits of quantitation were 1 mg/L in plasma and in CSF. The methods were accurate (inter-day and intra-day inaccuracy <15%) and showed good precision (inter-day and intra-day imprecision <15%). A liquid/liquid extraction procedure was used in Nantes by mixing 1 mL

aliquot of plasma with 1 mL acetonitrile. Mixture was centrifuged at 1800 g for 5 min at +4°C. Supernatant layer (1.6 mL) was added to dichloromethane (8 mL). Tubes were horizontally shaken for 10 min and centrifuged at 1800 g for 5 min at +4°C and 50 µL of the upper aqueous layer were injected into the system. Mobile phase (Na₂HPO₄ 0.03 M - pH 1.9/acetonitrile: 85/15 (v/v)) was delivered at 1.3 mL/min and separation was performed on Waters Symmetry (5µm C18 column (250 x 4.6 mm ID)), (Waters, Milford, USA). Ceftriaxone plasma concentration was detected by ultraviolet absorbance at 260 nm. Chromatographic conditions defined in this assay were also applied to plasma ultrafiltrates obtained according to a previously validated method using the Amicon Ultra-0.5 mL 30,000 molecular weight cut-off centrifugal filter device (Millipore, Cork, Ireland) to measure ceftriaxone unbound plasma concentration [12]. These chromatographic conditions were also applied to measure ceftriaxone concentrations into CSF. All of the unbound plasma and CSF concentrations were determined at the pharmacology department of Nantes University hospital.

3.4.4 Population pharmacokinetics analysis

Ceftriaxone pharmacokinetics analysis was performed using a non-parametric method implemented in Pmetrics (Laboratory of Applied Pharmacokinetics, University of Southern California, CA) [13]. Pmetrics is a library package for R using Fortran.

The relationship between total and unbound plasma ceftriaxone was explored by regression analysis using WinReg 4.0 (Jean Debord, Limoges, France). Linear, polynomial, exponential and saturation regression models were tested.

An initial analysis was conducted to estimate the parameters of the structural model without covariates. Three kinds of structural model were tested: a one-compartment model, a two-compartment model and a three-compartment model. For each model, a linear and a saturation protein binding model were assessed.

The selection of the structural model was based on the Akaike information criterion (AIC value) and Bayesian information criterion (BIC value). The model displaying the lower AIC and BIC values was chosen. Models were also assessed by visual examination of the diagnostic plots (observed concentration versus individual predicted concentrations, weighted residuals versus time or individual predicted concentrations, visual predictive checks). Visual predictive checks were weighted by the median dosage in the population.

The influence of covariates onto parameters was assessed using backward stepwise process and visual examination of the parameter versus covariate plot. Linear, exponential, power associations and allometric scaling were assessed. The following covariates were tested: age, sex, total body weight, creatinine serum concentration measured by enzymatic assay (Roche, Basel, Switzerland), MDRD estimated Glomerular Filtration Rate (eGFR), Cockcroft and Gault eGFR, serum albumin concentration, corticoid use, mechanical ventilation, type of meningitis (community or postoperative-hospital acquired).

The assay error polynomial equation was defined as C0: 0.80, C1: 0.05, C2 and C3:0.00 for each output equation with a multiplicative coefficient (gamma with 10 as starting value).

3.4.5 Monte Carlo simulations of dosage regimens

The final population pharmacokinetic validated model was used to perform Monte Carlo simulations. Ceftriaxone pharmacokinetics profiles (including total, unbound and CSF concentrations) from 1000 patients were simulated after administration once daily or twice daily (mean daily dosage in studied population) in patients displaying various degrees of renal function: normal renal function (median of the observed Cockcroft and Gault eGFR in studied population), renal failure (first centile of the observed Cockcroft and Gault eGFR in studied population) and high filtration glomerular rate (last centile of the observed Cockcroft and Gault eGFR in studied population).

According to the ceftriaxone time-dependent activity, CSF ceftriaxone plasma concentrations above MIC (bacterial minimum inhibitory concentration) over 100% of the dosing interval have been selected as the pharmacodynamics target [14]. CSF trough ceftriaxone concentrations were compared with 8 different MIC values (0.016, 0.032, 0.064, 0.125, 0.25, 0.5, 1, and 2 mg/L) 72h hours (at steady state in case of particularly extended half-life) after the therapy beginning. MIC breakpoints were set according to the EUCAST guidelines: 0.5 mg/L for susceptible *Streptococcus pneumoniae* and 0.125 mg/L for susceptible *Neisseria meningitidis* or *Haemophilus influenzae* [15]. These 3 bacteria are involved in more than 90% of community bacterial meningitis in adult population [2]. Probability of target attainment (PTA) should be ≥ 0.9 for effective therapy.

3.5 Results

One hundred and fifty three patients were enrolled. In the overall population of treated CNS infections, suspected or proven community-acquired meningitis accounted for 72.2% (n=143), postoperative meningitis for 11.1% (n=22), cerebral abscess or empyema for 14.1% (n=28), and external ventricular drain associated infection for 2.0% (n=4). Among 165 patients treated for suspected or proven meningitis (community or hospital acquired), 12 were excluded because of missing pharmacokinetic data.

Clinical and therapeutic characteristics of the 153 patients finally included in the PK population analysis are presented in Table 1. For each patient, 1 to 4 blood samples were collected at least 23 hours after the beginning of the therapy (mean delay 92 hours (range:23-240)). Three hundred and one total concentrations, 214 unbound concentrations and 11 CSF concentrations were sampled. Elapsed time after last dose ranges from 5 min to 24 hours.

Causative bacteria were routinely identified in CSF and/or blood samples. Most frequent causative agents were *streptococci*, especially pneumococci. The overall outcome of included patients was favorable.

A two-compartment model including a saturation binding model was chosen as the basic pharmacokinetics model (Fig. 1). The relationship between unbound and total concentrations was best described by a saturable binding model as follows: total concentration = (unbound concentration \times A)/(unbound concentration + B). This relationship was obtained from the classic ligand-receptor relationship after approximations assuming that unbound concentrations are negligible compared with A \times unbound concentrations. Thus, A could be considered as the total density of binding sites and B as the equilibrium dissociation constant. GFR estimated by the Cockcroft and Gault formula was the only covariate that significantly affected the pharmacokinetics of ceftriaxone. This covariate was integrated into the elimination constant K_e using a power model where eGFR is weighted by the median of the population (112 mL/min). The estimates of the population pharmacokinetics parameters are presented in Table 2.

Diagnostic plots for total, unbound and CSF concentrations are shown in Fig. 2. Equations established by linear regression of observed concentrations versus individual predicted concentrations are close to the identity line and analysis of residuals appears to be satisfactory.

Fig. 3 shows the visual predicted checks obtained for 1000 simulated patients for total (A, D), unbound (B, E) and CSF (C, F) concentrations showing that the model correctly described the observed concentrations.

From the validated model, 1000 CSF concentration simulations were performed with 3 different eGFR levels: a normal level (Median of the population eGFR:112 mL/min), a low level (first centile of the population eGFR: 58.34 mL/min) and a high level (last centile of the population eGFR: 172 mL/min). Median of the population dosage (7110 mg/day) was chosen for the simulations and a once and a twice-daily scheme was each time simulated. For patients with a normal eGFR, the PTA is superior to 0.9 for $MIC \leq 0.5$ mg/L only after a twice daily administration and for $MIC \leq 0.125$ mg/L but not ≤ 0.5 mg/L after a once daily scheme. For patients displaying a high level of eGFR, the PTA is superior to 0.9 for $MIC \leq 0.5$ mg/L only after administration twice daily and not in case of once daily administration. For patients suffering from renal failure, the PTA is superior to 0.9 for $MIC \leq 0.5$ mg/L whatever the frequency of ceftriaxone administration.

3.6 Discussion

This first population PK study in patients treated with high dosages of ceftriaxone for suspected bacterial meningitis showed that creatinine clearance clearly influence ceftriaxone PK indicating that administration scheme should be adapted to the eGFR.

Contrary to previous ceftriaxone population PK studies, this analysis integrated not only total but also unbound and CSF ceftriaxone in the population PK model. As expected knowing previously published study, a saturation binding model was retained and no influence of albuminemia as covariate for total and unbound ceftriaxone PK parameters was found [16]. Cockcroft and Gault eGFR was the only covariate which significantly affected ceftriaxone PK. This result is consistent with previous studies and confirms the influence of the eGFR onto ceftriaxone clearance [7,17]. According to Schleibinger *et al.*, ceftriaxone concentration seems to depend only on the clearance of unbound ceftriaxone which depends e.g. on renal function but not on unbound fraction [18]. Influence of renal function was observed whatever the degree of renal insufficiency while not in previous study with lower ceftriaxone regimen [7]. According to Heinemeyer *et al.*, this result suggests that biliary ceftriaxone clearance does not compensate the decrease in renal elimination in patients with renal failure [19].

The pharmacokinetic/pharmacodynamics target is still debated for β -lactam antibiotics [20]. A previous study showed that ceftriaxone concentration lower than MIC was associated with an inadequate clinical outcome suggesting that ceftriaxone concentrations above MIC should be targeted along the treatment [21]. In this work, PTA was established in CSF and is the main interest of our study compared with plasma concentration based model.

According to this target, ceftriaxone administration twice daily (3555 mg/12h) should be efficacious in patients with normal renal function in order to exceed *Streptococcus pneumoniae* breakpoints, whereas a once daily regimen (7110 mg/24h) could be sufficient only for *Haemophilus influenzae* or *Neisseria meningitidis*. Nevertheless, at the time of clinical decision, the causative bacteria are rarely known, and a systematic administration of a twice daily regimen has to be recommended for adult meningitis management. In patients displaying a high creatinine clearance, as frequently observed in the first hours of severe sepsis in critically ill patients with acute infectious meningitis [10], a risk of having ineffective concentrations for exceeding *Streptococcus pneumoniae* MIC breakpoint exists but is broadly reduce in case of twice daily regimen. In contrary, for patients with renal failure, a once-daily scheme is sufficient to reach targeted breakpoints for *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenza* or *Neisseria meningitidis*. Moreover, clinical outcomes reported here are as well as expected in adults community acquired meningitis [2]. High dose ceftriaxone could be considered as an efficacious scheme for treating meningitis.

High-dose ceftriaxone administration scheme should be adapted to the eGFR. Under high or normal renal function, twice daily administration should be prescribed to achieve sufficient trough concentrations while once-daily scheme is sufficient in case of renal impairment.

Funding

This work was supported by a grant from the French Ministry of Health (Interregional French Clinical Hospital Research Program grant PHRCi 2012– API12N037).

Transparency declarations

All authors declare having no competing interest.

Ethical approval

Written informed consent was obtained from all patients enrolled in the study. The study design and consent form were approved by regulatory authorities and research clinical practices and the study was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki (22 October 2008 version) and in accordance with French legislation. A license was issued by ANSM. This study has been registered at ClinicalTrials.gov under identifier NTC01745679.

Acknowledgements

Preliminary results of this study were presented at ECCMID Congress, 22-25 April 2017, Vienna, Austria.

The authors want to thank Dr Jean-Baptiste Woillard (University hospital of Limoges, France) for his valuable advice in population pharmacokinetic modelling.

The authors want to thank all members of the High-Dose CRO CNS Infections Study Group:

Trial Steering Committee : Pierre Abgueguen, Natahalie Asseray (Principal Investigator), Louis Bernard, David Boutoille, Cédric Bretonnière, Jocelyne Caillon, Anne Chiffolleau, Eric Dailly, Martin Dary, Denis Garot, Thomas Guimard, Jérôme Hoff, Monique Marguerite, Dominique Navas, Maja Ogielska, François Raffi (chair), Véronique Sébille, Pierre Tattevin, Yves-Marie Vandamme

Expert Committee : David Boutoille, Anne Chiffolleau, Martin Dary, Dominique Navas

Investigators

Angers : Pierre Abgueguen, Nicolas Crochette; La Roche sur Yon : Jean Baptiste Lascarrou, Christine Lebert, Eve Trebouet, Isabelle Vinatier, Maud Fiancette, Aihem Yehia, Jean Reignier, Jea-Claude Lacherade, Laurent Martin-Lefevre, Matthieu Henry-Lagarrigue, Elsa Bieber, Bertrand Weys, Gwenaël Colin, Aurélie Joret, Kostas Bakoumas; Nantes : Marie Dalichampt, Guillaume Deslandes, Mathieu Grégoire, Monique Marguerite, Marion Rigot, Cédric Bretonnière, Jocelyne Caillon, Laurent Brisard, Syvie Raoul, Anne-Catherine Di Prizio, Charlotte Biron, Maeva Lefebvre, Magali Brière, Samuel Pineau, Jérémie Orain, Line Happi Djeukou, Laurene Leclair, Arnaud Peyre, Armelle Magot, Guillemette Favet ; Rennes : Solène Patrat-Delon, Paul Sauleau, Mathieu Revest, Cédric Arvieux, Caroline Piau-Couapel,

Enora Ouamara-Digue, Maja Ratajczak, Adèle Lacroix; Saint Nazaire : Céline Chevalier, Patricia Courouble, Alix Phelizot; Tours : Frédéric Bastides, Guillaume Gras, Maja Ogielska, Rodolphe Buzele, Emmanuelle Mercier, Pierre-François Dequin, Annick Legras, Antoine Guillon, Youenn Jouan, Stephan Ehrmann, Laeticia Bodet-Contentin, Emmanuelle Rouve, Karine Fevre

Contributions of the authors:

Data collection

MG, ED, DG, TG, LB, PT, YMV, JH, FL, MCV, GD, DB, NA

Concentration measurement

MG, ED, FL, MCV

Population pharmacokinetic analysis

MG, ED

Drafting of article

MG, ED, PLT, DN, NA

Writing

MG, ED

3.7 References

1. Société de pathologie infectieuse de langue française. [17th Consensus conference. Consensus conference on bacterial meningitis. Short text]. *Med Mal Infect* 2009;39:175–86.
2. van de Beek D, Cabellos C, Dzupova O, Esposito S, Klein M, Kloek AT, *et al.* ESCMID guideline: diagnosis and treatment of acute bacterial meningitis. *Clin Microbiol Infect Dis* 2016;22:S37-62.
3. Tunkel AR, Hartman BJ, Kaplan SL, Kaufman BA, Roos KL, Scheld WM, *et al.* Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. *Clin Infect Dis* 2004;39:1267–84.
4. Simon N, Dussol B, Sampol E, Purgus R, Brunet P, Lacarelle B, *et al.* Population pharmacokinetics of ceftriaxone and pharmacodynamic considerations in haemodialysed patients. *Clin Pharmacokinet* 2006;45:493–501.
5. Iida S, Kawanishi T, Hayashi M. Indications for a ceftriaxone dosing regimen in Japanese paediatric patients using population pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis and simulation. *J Pharm Pharmacol* 2011;63:65–72.
6. Iida S, Kinoshita H, Kawanishi T, Hayashi M. The pharmacokinetics of ceftriaxone based on population pharmacokinetics and the prediction of efficacy in Japanese adults. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2009;34:107–15.
7. Garot D, Respaud R, Lanotte P, Simon N, Mercier E, Ehrmann S, *et al.* Population pharmacokinetics of ceftriaxone in critically ill septic patients: a reappraisal. *Br J Clin Pharmacol* 2011;72:758–67.
8. Lodise TP, Nau R, Kinzig M, Jones RN, Drusano GL, Sörgel F. Comparison of the probability of target attainment between ceftriaxone and cefepime in the cerebrospinal fluid and serum against *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;58:445–52.
9. Lautrette A, Phan T-N, Ouchchane L, Aithssain A, Tixier V, Heng A-E, *et al.* High creatinine clearance in critically ill patients with community-acquired acute infectious meningitis. *BMC Nephrol* 2012;13:124.
10. Whitby M, Finch R. Bacterial meningitis. Rational selection and use of antibacterial drugs. *Drugs* 1986;31:266–78.
11. Verdier M-C, Tribut O, Tattevin P, Le Tulzo Y, Michelet C, Bentué-Ferrer D. Simultaneous determination of 12 beta-lactam antibiotics in human plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection: application to therapeutic drug monitoring. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:4873–9.
12. Briscoe SE, McWhinney BC, Lipman J, Roberts JA, Ungerer JPJ. A method for determining the free (unbound) concentration of ten beta-lactam antibiotics in human plasma using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2012;907:178–84.
13. Neely MN, van Guilder MG, Yamada WM, Schumitzky A, Jelliffe RW. Accurate detection of outliers and subpopulations with Pmetrics, a nonparametric and parametric pharmacometric modeling and simulation package for R. *Ther Drug Monit* 2012;34:467–76.

14. McKinnon PS, Paladino JA, Schentag JJ. Evaluation of area under the inhibitory curve (AUC) and time above the minimum inhibitory concentration (T>MIC) as predictors of outcome for cefepime and ceftazidime in serious bacterial infections. *Int J Antimicrob Agents* 2008;31:345–51.
15. EUCAST: Clinical breakpoints. Available from: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
16. Popick AC, Crouthamel WG, Bekersky I. Plasma protein binding of ceftriaxone. *Xenobiotica Fate Foreign Compd Biol Syst* 1987;17:1139–45.
17. Stoeckel K, McNamara PJ, Brandt R, Plozza-Nottebrock H, Ziegler WH. Effects of concentration-dependent plasma protein binding on ceftriaxone kinetics. *Clin Pharmacol Ther* 1981;29:650–7.
18. Schleibinger M, Steinbach CL, Töpfer C, Kratzer A, Liebchen U, Kees F, *et al.* Protein binding characteristics and pharmacokinetics of ceftriaxone in intensive care unit patients. *Br J Clin Pharmacol* 2015;80:525–33.
19. Heinemeyer G, Link J, Weber W, Meschede V, Roots I. Clearance of ceftriaxone in critical care patients with acute renal failure. *Intensive Care Med* 1990;16:448–53.
20. Wong G, Brinkman A, Benefield RJ, Carlier M, De Waele JJ, El Helali N, *et al.* An international, multicentre survey of β -lactam antibiotic therapeutic drug monitoring practice in intensive care units. *J Antimicrob Chemother* 2014;69:1416–23.
21. Sádaba B, Azanza JR, Campanero MA, García-Quetglas E. Relationship between pharmacokinetics and pharmacodynamics of beta-lactams and outcome. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:990–8.

3.8 Tables et figures

Table 1. Baseline clinical and therapeutic characteristics, microbiology and clinical outcomes of studied patients.

Number of participants	153
Age (years), mean +/- SD	53.4 +/- 19.8
Male, n (%)	88 (57.5)
Weight (kg), mean +/- SD	74.3 +/- 16.7
Cockcroft Gault creatinine clearance (ml/min), mean +/- SD	114.9 +/- 46.4
Albuminemia (g/L), mean +/- SD	30.4 +/- 6.2
Community acquired meningitis, n (%)	133 (86.9)
Postoperative hospital acquired-meningitis, n (%)	20 (13.1)
Number of patients receiving corticosteroids, n (%)	102 (66.7)
Daily ceftriaxone dosage (g), mean +/- SD	7.0 +/- 1.8
Daily ceftriaxone dosage (mg/kg), mean +/- SD	95.7 +/- 16.5
Ceftriaxone regimen	
once daily, n (%)	44 (28.8)
twice daily, n (%)	107 (69.9)
three times daily, n (%)	2 (1.3)
Bacteria (n =86)	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	34*
<i>Neisseria meningitidis</i>	21
<i>Haemophilus influenzae</i>	8
Other <i>Streptococci</i>	10
<i>Enterobacteriaceae</i>	5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4
Others	4
Clinical outcomes at ceftriaxone discontinuation (n=153)	
Death, n (%)**	4 (2.6)
No clinical improvement, n (%)	5 (3.3)
Partial clinical improvement, n (%)	19 (12.4)
Total clinical improvement, n (%)	120 (78.4)
Unknown, n (%)	5 (3.3)

*MIC values were determined for *Streptococcus pneumoniae* and ranged from <0.016 to 0.5 mg/L

**Deaths were caused by septic shock (n=2), stroke (n=1) and cerebral venous thrombosis (n=1).

Table 2. Population pharmacokinetic parameter estimates.

Parameter (unit)	Final model parameter estimate, median (range)	95 % confidence interval of the median	Variance	95 % confidence interval of the variance
K_{e1} (h^{-1})	0.125 (0.001 - 2)	0.125 – 0.141	0.005	0.000 – 0.027
K_{e2} (h^{-1})	0.576 (0.001 – 5)	0.488 – 0.728	0.179	0.115 – 0.269
K_{CP} (h^{-1})	11.068 (0.1 - 50)	8.749 – 11.976	4.580	2.855 – 9.249
K_{PC} (h^{-1})	25.976 (0.1 – 50)	20.031 – 27.822	8.475	5.196 – 13.128
V (L)	15.776 (5 – 80)	15.747 – 16.932	1.852	1.098 – 4.276
A (mg/L)	2973.590 (1000 – 7500)	1432.752 – 4497.028	1930.551	432.013 – 2664.649
B (mg/L)	259.334 (0.1 – 3000)	148.121 – 360.111	143.661	64.914 – 218.439
V_p (L)	193.657 (20- 250)	83.520 – 248.776	55.532	1.189 – 110.003

K_e , constant of elimination from the central compartment; K_{CP} , constant of transfer from the central compartment to the peripheral compartment; K_{PC} , constant of transfer from the peripheral compartment to the central compartment; V, volume of the central compartment; A, constant A of the binding equation; B, constant B of the binding equation; V_p , volume of the peripheral compartment.

Median (Min – Max) value of unbound fraction from 214 individual observed data was 7.57 % (1.61 – 49.30).

Median (Min – Max) value of CSF/plasma diffusion from 6 individual observed data was 14.39 % (5.86 – 65.94).

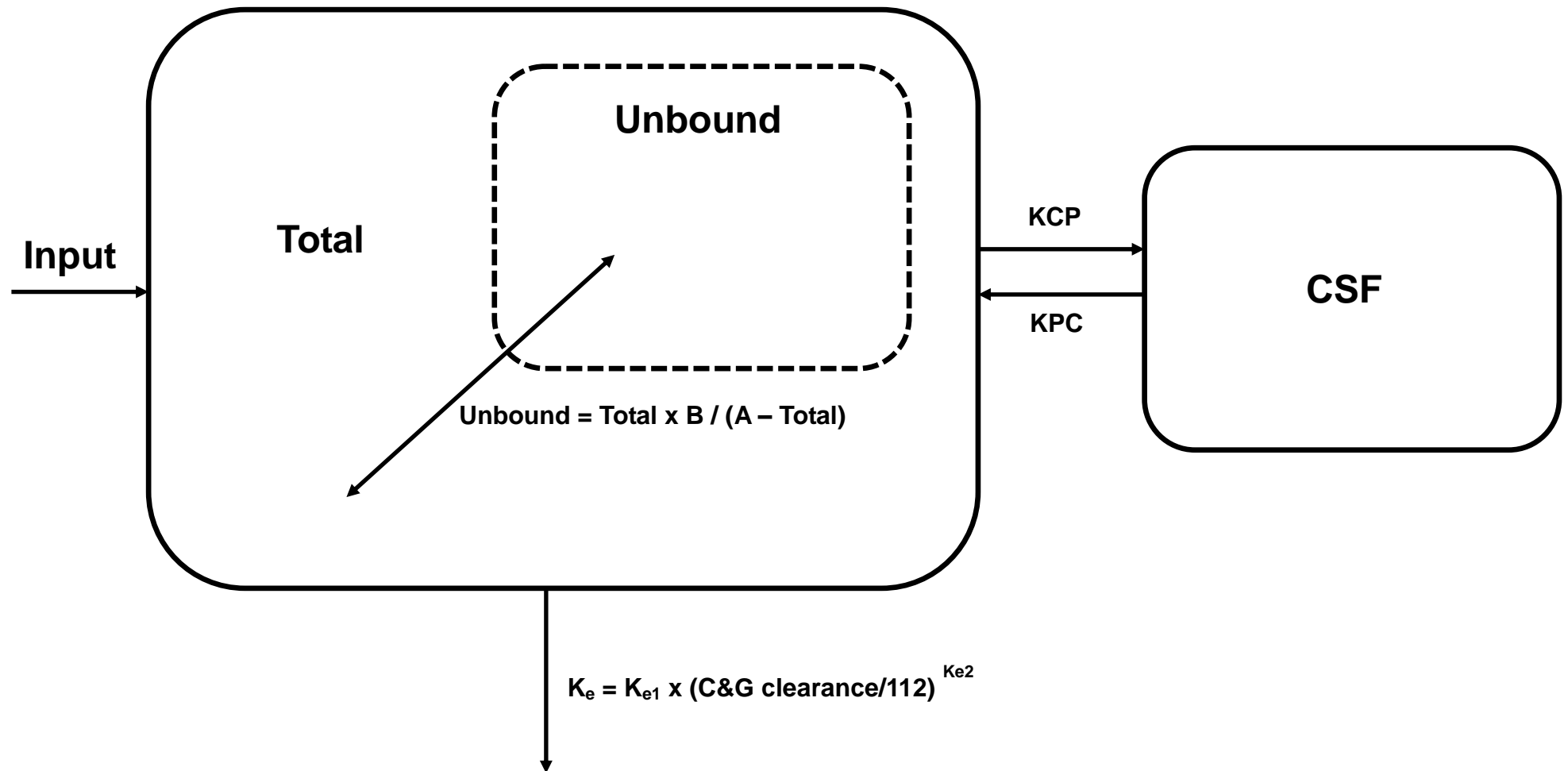


Figure 1. Representation of the population pharmacokinetic model. A two-compartment model integrating a saturation protein binding modelling was chosen. Cockroft and Gault estimated glomerular filtration rate was integrated as covariate of the elimination constant (K_e).

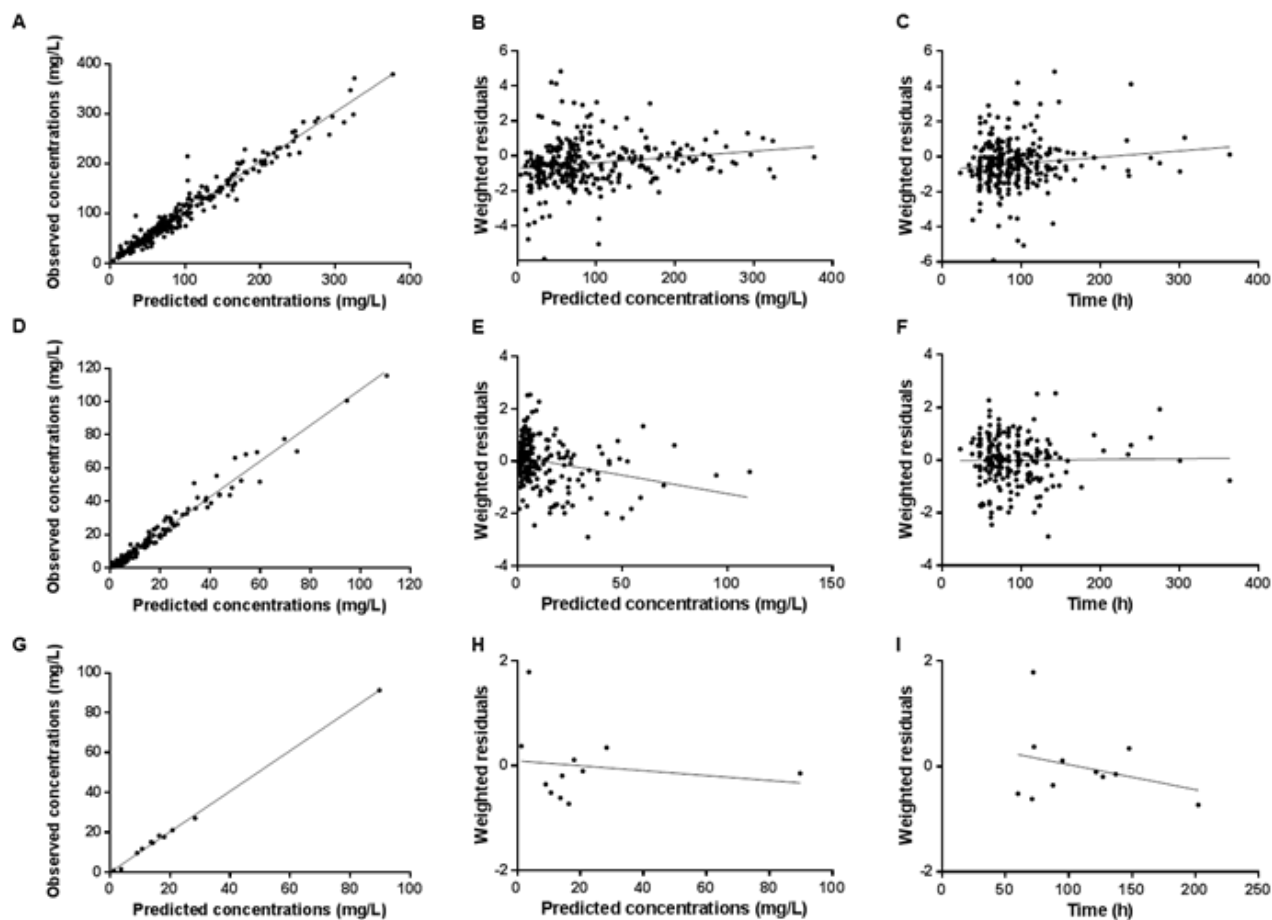


Figure 2. Graphical representations allowing the validation of population pharmacokinetic model of total (A, B and C), unbound (D, E and F) and CSF (G, H and I) ceftriaxone concentrations. (A, D and G) Observed concentrations were plotted against individual predicted concentrations (mg/L), $R^2=0.9592$, 0.9745 and 0.9977 respectively. (B, E and H) Weighted residuals were plotted against individual predicted concentrations (mg/L). (C, F and I) Weighted residuals were plotted against time post administration (h).

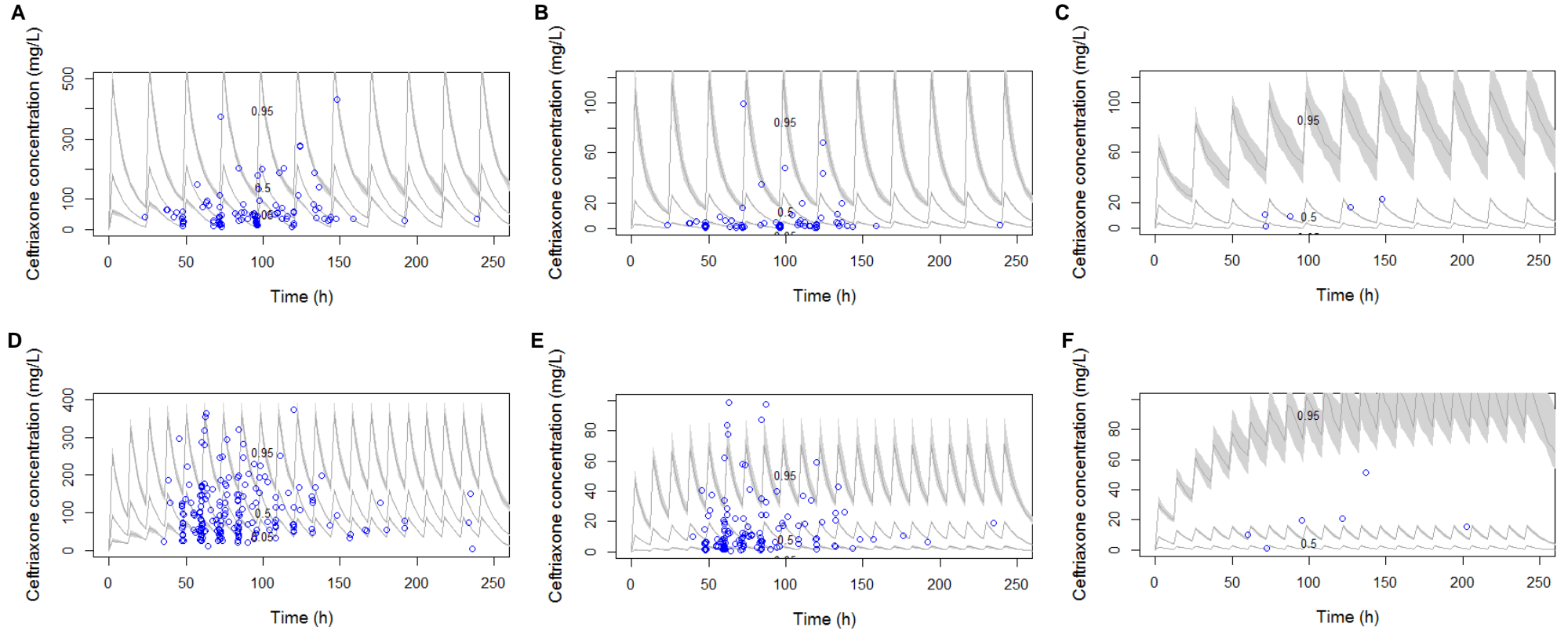


Figure 3. Visual predictive checks for total (A and D), unbound (B and E) and cerebrospinal fluid (C and F) concentrations of ceftriaxone after a daily dose of 7110 mg administered in 30 minutes once or twice daily. The 5th, the median and the 95th percentiles of the total concentrations in 1000 Monte Carlo simulated patients are represented with their 95% confidence interval. Observed concentrations (open circles) are superimposed on simulated values.

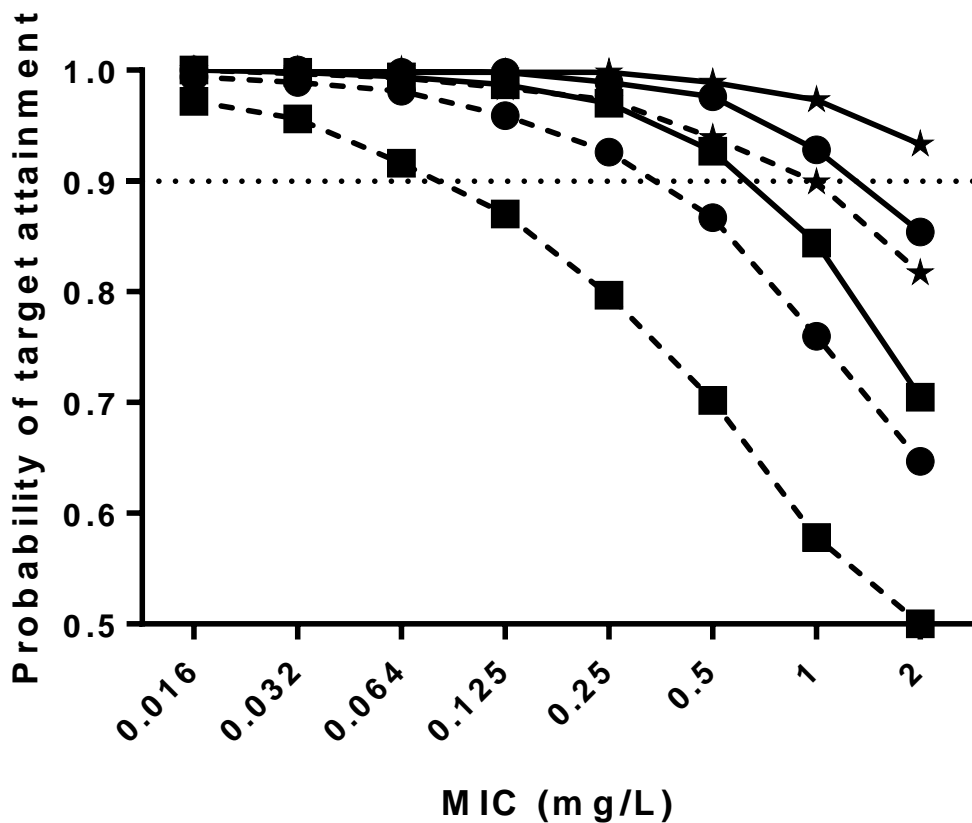


Figure 4. Probabilities of target attainment at steady state after a once (broken line) or a twice (continuous line) daily scheme in patients displaying low (58.34 mL/min) (Black stars), moderate (112 mL/min) (Black full circles) or high (172 mL/min) (Black full squares) Cockcroft and Gault estimated glomerular filtration rate. The horizontal line represents a probability of 0.9. MIC of 0.125 mg/L is not achieved after a once daily regimen in patients displaying high creatinine clearance. MIC of 0.5 mg/L is achieved after a twice daily regimen in patients displaying and a high or a moderate creatinine clearance but not after a once daily regimen in both regimen.

3.9 Remarques complémentaires sur l'article

La ceftriaxone est une céphalosporine de 3^{ème} génération utilisée notamment pour le traitement des infections bactériennes du système nerveux central dont les méningites communautaires et nosocomiales ainsi que certains abcès cérébraux. Dans ces indications, l'emploi de doses élevées est actuellement recommandé. Les recommandations américaines et européennes préconisent l'emploi de doses supérieures à 4 g par 24 h sans tenir compte du poids ou du nombre d'administrations tandis que les recommandations françaises préconisent des doses rapportées au poids de 75 mg/kg à 100 mg/kg sans limite de posologie (64–66).

Aucune étude pharmacocinétique ne valide actuellement ces posologies élevées dans cette population sachant que la distribution de la molécule peut être impactée par l'état inflammatoire des méninges et que la pharmacocinétique chez les patients en sepsis sévère est très souvent modifiée avec de fortes variations des DFG notamment. De plus, deux points importants au plan posologique ne sont pas abordés dans ces recommandations: (i) Aucune de ces recommandations ne préconise l'adaptation de la posologie de la ceftriaxone au DFG excepté en cas de DFG estimé inférieur à 10 mL/min pour les recommandations françaises. La ceftriaxone présente la particularité d'être éliminée de façon mixte par voie rénale et par voie biliaire. Beaucoup considèrent que l'une de ces deux voies compense l'élimination en cas de défaillance de l'autre mais aucune étude ne confirme actuellement ce postulat. (ii) De plus, la ceftriaxone présente la caractéristique d'une demi-vie assez longue pour une bêta-lactamine (environ 8 heures chez le patient normo-rénal) et est donc classiquement administrée en une à deux fois par jour mais les recommandations ne discutent pas de la fréquence d'administration de la molécule.

Cent cinquante-trois patients traités pour une méningite communautaire ou nosocomiale ont été inclus dans cette cohorte. Des prélèvements sanguins et de LCS ont été réalisés de façon non programmée et ont permis la construction d'un modèle de pharmacocinétique de population permettant d'évaluer les concentrations en ceftriaxone dans le LCS.

Le modèle de population a été une nouvelle fois construit en s'appuyant sur l'algorithme NPAG. A partir du modèle final, des schémas d'administration en une ou deux fois par jour chez des patients présentant différents niveaux de DFG ont été simulés afin de pouvoir proposer le schéma le plus adapté à la fonction rénale.

L'utilisation d'un modèle de saturation de la LPP, comme développé précédemment pour la céfazoline, a permis d'améliorer la vraisemblance du modèle final. Le choix d'intégrer les concentrations mesurées dans le LCS a permis d'améliorer le modèle mais également de réaliser des simulations de Monte Carlo des concentrations dans le LCS et de modéliser la pharmacocinétique de l'antibiotique directement au niveau de son site d'action.

Ce travail est le premier à proposer une adaptation de la posologie et du schéma d'administration de la ceftriaxone à la fonction rénale. Ces résultats vont dans le sens de constatations cliniques avec l'observation de cas de toxicité neurologique chez les patients insuffisants rénaux. L'un des objectifs futurs est que ces résultats soient pris en compte dans les prochaines recommandations françaises du traitement des méningites bactériennes. Par ailleurs, une analyse des données de l'étude par une équipe mixte d'infectiologues et de pharmacovigilants a permis de mettre en évidence un seuil de toxicité à 100 mg/L tous effets indésirables confondus (27). La réalisation d'un nomogramme de décision posologique et de schéma d'administration est envisagée en se basant sur un seuil de toxicité à 100 mg/L. Ces travaux sont en cours de publication.

Les résultats de ce travail ont été soumis pour publication dans le *British Journal of Clinical Pharmacology* (impact factor: 3,838). Ces données ont également été présentées en communications orales au 28^{ème} *European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* à Vienne en avril 2017 et aux 19^{èmes} journées nationales d'infectiologie à Nantes en juin 2018.

4. Publication 3

Ceftriaxone favors more intestinal carriage of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* than cefotaxime by selecting a specific microbial community.

4.1 Résumé détaillé en français

L'augmentation de la résistance globale due aux entérobactéries productrices de bêta-lactamase à spectre étendu est une préoccupation majeure. Des études récentes ont suggéré une sélection plus faible de ces souches lorsque le céfotaxime est remplacé par la ceftriaxone. L'objectif de ce travail était de confirmer expérimentalement ce postulat et d'expliquer pourquoi sur la base d'une hypothèse pharmacocinétique/métagénomique.

Les souris (SWISS, femelles, âgées de 6 semaines, 15 animaux par groupe) traitées à la ceftriaxone (250 mg/kg deux fois par jour pendant 5 jours) sont plus colonisées que les souris traitées au céfotaxime (500 mg/kg 3 fois par jour pendant 5 jours) après gavage de 10^5 CFU de *Klebsiella pneumoniae* CTX-M9 au jour 4 (p-value = 0,008, test de Mann-Whitney). La ceftriaxone et le céfotaxime sont tous les deux excrétés dans la lumière intestinale (l'aire sous la courbe de la ceftriaxone, du céfotaxime et du désacétyl-céfotaxime est respectivement de 1859 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{jour}$, de 1015 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{jour}$ et de 3962 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{jour}$). Ces deux antibiotiques semblent diriger l'architecture du microbiote intestinal dans différentes trajectoires. Les niveaux les plus élevés de colonisation ont été associés aux scores les plus élevés en PC1 et PC2, qui ont été plus souvent obtenus chez les souris traitées à la ceftriaxone et précédés par les concentrations fécales les plus élevées dans les deux groupes. Douze taxons sont significativement différents entre les souris traitées au céfotaxime et à la ceftriaxone. Plus précisément, les souris traitées à la ceftriaxone ont été associées à un gain significatif en *Lactobacillus*, *Klebsiella*, *Enterobacteriaceae* non classées et *Parabacteroides* par rapport aux souris traitées par céfotaxime qui montraient plus d'*Enterococcus*, de *Lactobacillales*, d'*Enterococcaceae*, de *Vagococcus* et d'*Anaeoplasma* non classés. Les taux de *Klebsiella* sont significativement plus élevés chez les souris traitées à la ceftriaxone que chez les souris traitées au céfotaxime (p-value = 0,01). L'abondance relative de 34 OTUS est positivement corrélée aux niveaux de concentration fécale de ceftriaxone, y compris la famille des *Enterobacteriaceae*.

Un indice de risque de prédiction de la colonisation a été construit et a démontré que la composition du microbiote avant le contact avec des bactéries résistantes était un puissant facteur de prédiction de l'intensité du portage. Ces données sont utiles pour construire un consortium pro/prébiotique permettant de limiter l'intensité de la colonisation.

Ici, nous confirmons l'intérêt d'une substitution thérapeutique de la ceftriaxone par le céfotaxime afin de limiter la sélection d'entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu dans le microbiote intestinal. La ceftriaxone semble sélectionner une communauté microbienne spécifique qui est fonction de sa concentration.

4.2 Article à soumettre à *Microbiome*

Matthieu Grégoire, Florian Berteau, Ronan Bellouard, Quentin Le Bastard, Philippe Aubert, Jacques Gonzales, François Javaudin, Anne Bessard, Pascale Bemer, Éric Batard, Didier Lepelletier, Michel Neunlist, Emmanuel Montassier, Éric Dailly

4.3 Introduction

The increasing global resistance of *Enterobacteriaceae* to beta-lactams is a major public health issue for the years to come and conducted, in February 2017, the World Health Organization to classify the resistance of *Enterobacteriaceae* to third-generation cephalosporins (3GC) as a critical priority for research and development of new antibiotics (1). The majority of 3GC-resistant *Enterobacteriaceae* produces extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) which increases morbidity and mortality, length of stay and health costs (2,3).

The microbiota would be composed of 800 to 1000 species comprising more than 7000 different strains (4). Within this population of 10^{12} to 10^{13} individuals, bacteria are carrying genes for antibiotic resistance. Antibiotics conduct to a partial destruction of the gut bacteria (mainly anaerobic) susceptible to the given agent, thus leaving room and access to the necessary resources for organisms resistant to this treatment (5). Knowing that gut microbiota is a reservoir for ESBL-producing *Enterobacteriaceae*, their multiplication can lead to excretion in the external environment and inter-individual transmission (6,7). These germs may be responsible for infections that will be difficult to treat (8). One of the possibilities to limit the emergence of resistant mutants is to choose the antibiotics that have the lowest impact on the microbiota but knowledges that could drive this choice are still scarce.

Hospital-level and patient-level studies have shown that use of 3GC and exposure to 3GC favors ESBL-mediated resistance in *Enterobacteriaceae* (9–11). Although they have similar antibacterial spectrum, ceftriaxone (CRO) and cefotaxime (CTX) may have different impact on ESBL-mediated resistance. Specifically, it has been advocated that CRO has more impact on the gut microbiota than CTX, due to higher biliary elimination than CTX (12). In a large multicentric study involving 701 health care facilities, use of CRO was positively associated with 3GC-resistant *E. coli*, whereas CTX use was not (13). However, use of both

3GC was associated with 3GC-resistant *K. pneumoniae* in the same study, and with 3GC-resistant *E. cloacae* in another time series (12,13). The impact of replacing CRO by CTX on resistance to 3GC has been reported in 2 hospital-level studies. In one center, it was associated with a slower growth of high-level cephalosporinase mediated resistance, mainly in *E. cloacae*, but had no impact of ESBL-mediated resistance (14). More recently, Tan *et al.* showed that switching from CRO to CTX had been associated with a decreased incidence of hospital-acquired infection caused by ESBL-producing *Enterobacteriaceae*. Hence, the ecological advantage of CTX on CRO remains debated, and no experimental study has compared the effects of CRO and CTX on the digestive microbiota.

The main objective of this experimental work was to compare the fecal carriage of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* (*Kp*) and gut microbiota alterations induced by CRO and CTX treatments.

4.4 Results and discussion

4.4.1 CRO induced higher ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* colonization than CTX

Stools were cultured on selective medium and results of growth culture are shown in Figure 1A and B. The absence of pre-existing 3GC-resistant strains prior to gavage by ESBL-producing *Kp* is demonstrated by the negativity of stool cultures on the day of gavage.

CRO-induced ESBL-producing *Kp* colonization was consistently higher than CTX-induced colonization from day 4 to day 12 (p-value = 0.008, Mann-Whitney test) (Figure 1C).

4.4.2 CRO and CTX are both excreted in gut lumen

Detectable fecal concentrations for CRO were observed and were maintained until 10 days after the end of treatment (Figure 1D). Detectable concentrations for CTX and its active metabolite desacetyl-CTX were observed until 10 days after stopping treatment (Figure 1E). These results confirm those of Grall *et al.* who found digestive excretion of CTX in significant proportions and also tested the interest of a digestive 3GC chelating coal in the prevention of the emergence of *Kp* carrying a derepressed cephalosporinase (15). Fecal exposures to antibiotics were compared using the area under the curve (AUC) of fecal concentrations over time. AUC of CTX and desacetyl-CTX were 1015 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{day}$ and 3962

$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{day}$ respectively. The bactericidal activity of desacetyl-CTX is generally considered to be lower than CTX (the MIC of desacetyl-CTX is 4-fold higher than that of CTX on susceptible strains of *Kp*). This exposure seems close to the CRO's AUC of $1859 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{day}$. These results challenge the pharmacokinetic hypothesis explaining the observed differences. Like direct inhibitors of beta-lactamases such as clavulanate or tazobactam, desacetyl-CTX has a weak antibiotic activity on *Enterobacteriaceae*. However, it could act by competition at the CTX-M9 enzyme site of action of the bacteria and thus leave sufficient concentrations of unmetabolized CTX to have a direct antibacterial effect. This hypothesis was tested in a previous study which found a lower affinity of the enzyme for desacetyl-CTX but a greater stability of this molecule compared to CTX (16). However, this study included only cephalosporinases and not ESBLs and none of the tested strains were *Kp*. Of note, fecal concentrations of CRO were similar to fecal concentrations that have been reported in humans (17,18).

Interestingly, colonization levels were similar in control and CTX-treated mice. This result may be due to higher CTX dose and fecal concentration at the time of inoculation than reported in previous studies in whom CTX induced a significant colonization (15,19). Nevertheless, higher colonization in CRO-treated mice than in CTX-treated ones supports the hypothesis that CRO promotes more efficiently 3GC-resistance in *Enterobacteriaceae* (13,14,20).

4.4.3 No difference in transit between CRO and CTX

Stools of CRO- and CTX-treated mice weighted more than control stools but no difference between the two antibiotic groups were observed (Figure 1F). In the same way, no differences in term of transit time or water content were observed (Figures 1G and 1H).

No differences related to transit time, weight and constitution of stool were observed. Those findings do not suggest a different impact of CRO and CTX which could explain colonization differences but could be a consequence of the major dysbiosis.

4.4.4 CRO and CTX alters the overall architecture of gut microbiota

Using non-phylogeny and phylogeny-based metrics, we found a significant decrease in alpha diversity between antibiotic-treated mice and control mice (ANOVA, Shannon index: p-value

= 0.001, observed species: p-value = 0.001, chao1 index: p-value = 0.001). However, we did not find significant difference in alpha diversity between CTX and CRO-treated mice (ANOVA, Shannon index: p-value = 0.665, observed species: p-value = 0.530, chao1 index: p-value = 0.855, Additional file 1 A, B and C respectively, indexes are reported in Additional file 1 D). Importantly, alpha diversity decreased significantly along time in both CTX and CRO-treated mice (p-value = 0.01, Additional 1 E), but this decrease was not different between CTX-treated mice and CRO-treated mice (p-value = 0.50).

Using Unweighted UniFrac distances, we found that both CTX and CRO significantly alter the overall architecture of the gut microbiota when compared to control mice (PERMANOVA, $r^2 = 0.128$, p-value = 0.001, principal component 1: ANOVA, p-value < 0.001, principal component 2: ANOVA, p-value < 0.001). Moreover, CRO and CTX drove the architecture of the gut microbiota in 2 different trajectories (PERMANOVA, $r^2 = 0.142$, p-value = 0.001, principal component 1: ANOVA, p-value = 0.358, principal component 2: ANOVA, p-value = 0.002, Figure 2A). We observed that the time after the antibiotic treatment has a strong impact on the beta-diversity with higher PC1 and PC2 scores observed at day 12 (Additional file 2). Before treatment and until day 4, it was impossible to tell the difference between CRO- and CTX-treated mice and differences appear at day 8 and are accentuated at day 12. A more important inter-individual variability is observed in CTX-treated mice which do not reach all the maximum values of PC1 and PC2 at day 12 contrary to CRO-treated mice. Beta-diversity trajectories by mouse are represented in Additional file 3. Supervised learning using Random Forests, a machine learning method using OTUs as predictive features, accurately assigned samples to their source population (CTX or CRO-treated mice) based on taxonomic profiles at the OTU level (83.3% accuracy, 3 times better than the baseline error rate for random guessing).

4.4.5 ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* carriage is associated to taxonomic changes

We observed that clustering of fecal samples was partly driven, by the increased carriage of BLSE-producing *Kp* ($r^2 = 0.0641$, p-value = 0.001, Additional file 4). Higher colonization levels being associated with higher PC1 and PC2 scores in the two groups. This beta-diversity pattern was mainly found in CRO-treated mice and especially at day 12 as described in Additional file 2 and suggested that CRO selects a microbial community which promotes colonization by ESBL-producing *Kp*. Conversely, highest inter-individual diversity observed

at day 12 in CTX-treated mice results in a lower level of colonization. We found that 8 taxa were significantly different between mice displaying a high level of ESBL-producing *Kp* and those displaying a low level (Additional file 5). Specifically, mice with a high level were associated with a significant gain in *Klebsiella* and unclassified *Pseudomonadaceae* when compared to low level mice, that were, conversely, associated with increase in unclassified *Bacteroidales*, unclassified *Desulfovibrionaceae*, *Sutterella*, unclassified *Peptococcaceae*, unclassified *Clostridiaceae* and *Akkermansia*.

These results were confirmed by a negative association found between intensity of ESBL-producing *Kp* carriage and OTUs from *Bacteroidales* and *Clostridiaceae* (Additional file 6).

4.4.6 Taxonomic changes between CTX and CRO treated mice

Using LEfSe (21), we found that 12 taxa were significantly different between CTX and CRO-treated mice. Specifically, CRO-treated mice were associated with a significant gain in *Lactobacillus*, *Klebsiella*, unclassified *Enterobacteriaceae*, and *Parabacteroides* when compared to CTX-treated mice, that were, conversely, associated with increase in *Enterococcus*, unclassified *Carnobacteriaceae*, unclassified *Planococcaceae*, *Granulicatella*, unclassified *Lactobacillales*, unclassified *Enterococcaceae*, *Vagococcus* and *Anaeoplasma* (Figure 2B). The most significant differentiating taxa between CTX and CRO-treated mice are represented in Additional file 7. Significantly different taxa between CRO and control mice and CTX and control mice respectively are described in Additional file 8 and 9.

To confirm these changes, we used SplinctomeR that enables group comparisons in longitudinal microbiome studies. First, we plotted the longitudinal changes in the three groups of mice, antibiotic-treated mice (CRO or CTX) and control mice. We found that in control mice, gut microbiota composition was relatively stable along time (Additional file 10 A), whereas, gut microbiota composition was dramatically altered following CRO and CTX treatment (Additional file 10 B and C). We confirm that *Enterococcus* was significantly more increased in CTX than in CRO-treated mice along days of collection (p-value=0.01, Figure 2C) and that *Klebsiella* was significantly more increased in CRO than in CTX-treated mice (p-value = 0.01, Figure 2D). Unclassified *Enterobacteriaceae*, *Parabacteroides* and *Lactobacillus* were also more increased in CRO than in CTX-treated mice (p-value = 0.04, p-value = 0.03 and p-value = 0.1, respectively). These metagenomics data largely confirm

results of stool cultures by showing that CRO promotes *Enterobacteriaceae* carriage and among them *Klebsiella* strains.

4.4.7 Antibiotic fecal concentrations impact on OTU abundance

We investigated the relationship between CRO, CTX and desacetyl-CTX fecal concentrations and the gut microbiome by identifying significant multivariate linear associations using MaAsLin. The relative abundance of 34 OTUS was positively correlated with CRO fecal concentration levels, including members of *Sphingomonadaceae*, *Microbacteriaceae*, *Sphingobacteriaceae* and *Enterobacteriaceae* families. Two OTUS were positively correlated with CTX/desacetyl-CTX fecal concentration levels, corresponding to *Lactobacillus* and *Leucobacter* genera.

We observed that higher antibiotic concentration levels were not associated with highest PC1 and PC2 scores but preceded these metagenomics alterations leading to colonization by ESBL-producing *Kp* (Additional file 11).

4.4.8 Gut microbiota before contact with *Klebsiella pneumoniae* can predict intensity of colonization

A panel of 78 OTUs that were significantly different between high colonization and low colonization using LEfSe were identified in fecal samples collected before *Kp* CTX-M9 gavage (corresponding to an LDA (log10) >2). Highly colonized mice had a significant increase in relative abundance of OTUs within *Lactobacillus*, *Lachnospiraceae* and *Sutterella*, while low colonized mice had a significant increase of OTUs within *Ruminococcaceae*, *Oscillospira*, *Bacteroides* and *Desulfovibrionaceae* (Additional file 12). A risk index of prediction for colonization was built from this panel of OTUs. The index, calculated in each mice (low and highly colonized mice), corresponds to the difference between the sum of the relative abundance of all the OTUs associated with nonresponse to treatment [i.e. with an LDA (log10) >2] and the sum of the relative abundance of all the OTUs associated with response to treatment [i.e. with an LDA (log10) >2], as built previously (22,23). The mean risk index score was significantly different (p -value = $1.356e^{-05}$, Mann-Whitney U test) between the highly colonized mice (mean score 0.28 ± 0.31) and low colonized mice (0.04 ± 0.07) (Additional file 13). Furthermore, ROC curve analysis showed that this risk index was a strong predictor of treatment response, with an AUC of 0.87. A cut-off of 0.14 was associated with a sensitivity of 92% and a specificity of 79% (Additional file

14). In order to assess our risk index, a leave-one-out cross-validation was performed, where the risk index was built 28 times using n-1 samples each time and then tested on the held-out sample. Thus, each held-out patient was treated as a new patient, independently from the initial cohort, on whom we tested and subsequently refined the optimal index cut-off to separate highly and low colonized mice. We showed that the risk index was a strong predictor of colonization (permutation test performed on the difference between the mean of those without response and the mean of those with response to treatment with 999 random permutations, p-value < 0.001; Additional file 15). We also determined with this leave-one-out procedure that a CDI risk index threshold of 0.11 best predicts response to treatment, yielding a sensitivity of 89% at a specificity of 76% (mean AUC = 0.90). Thus, we found that our risk index accurately identified mice that will become highly and low colonized after antibiotic treatment and *Kp* CTX-M9 gavage. These data are crucial for the development of a pro/prebiotic consortium allowing limiting the intensity of the carriage for patient displaying a high risk of colonization such as patient treated by antibiotics or travelers in endemic area.

4.4.9 CRO increases class C beta-lactamase level

To finish this work, we imputed functional aspects of the microbiota using PICRUSt (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) to predict KEGG pathways assignments. PICRUSt uses the 16S rRNA gene and a database of reference genomes to produce an annotated table of predicted gene family counts for each sample with a detailed KEGG Orthology (KO) description (24). We found that K01467 (beta-lactamase class C) was increased in CRO compared to CTX-treated mice (p-value < 0.01).

4.4.10 Conclusion

This work experimentally demonstrates a lower selection of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* under CTX regimen compared to an equivalent antibiotic treatment of CRO. Although considered to have an identical antibacterial spectrum, these 2 antibiotics do not select the same microbiota community and CRO appears to favor the selection of *Enterobacteriaceae* and probably among them, ESBL-producing *Enterobacteriaceae*. Interestingly, the intensity of carriage seems to be influenced by the microbiota composition before contact with resistant bacteria. As of now, the results of this experimental study suggest the preferential use of CTX rather than CRO in human medicine to limit selection of ESBL-producing *Enterobacteriaceae*.

4.5 Methods

4.5.1 Animals

SWISS non-consanguineous albino mice provided by the JANVIER laboratory (Le Genest-Saint-Isle, France) were used. These are robust and non-aggressive animals often used for pharmacological modeling (15). We studied females aged 6 weeks and weighing between 25 and 30 g, guaranteed without pathogens. The mice were housed at the Animal Research Center of the Institute of Health Research 2, University of Nantes, in a controlled environment (day/night cycle of 12h, extinction 7:30 pm) with a controlled sterile diet. After a review of the literature on multidrug-resistant bacteria implantation in murine models (17–20), the number of mice per treatment group was set at 15. In addition, mice were isolated in individual cages to prevent cross-contamination by coprophagia. Drinking water and food were provided *ad libitum*.

4.5.2 Antibiotics

Reconstitution of CRO and CTX was performed in physiological saline (NaCl 0.9%) to obtain initial concentrations of 100 g/L. Mice were divided in three groups: Group 1 received CRO 250 mg/kg twice daily for 5 days, group 2 received CTX 500 mg/kg three times daily for 5 days and the control group received NaCl 0.9% three times daily for 5 days. Taking into account the very short half-life of these molecules in mice and the concentrations usually found in humans, it was decided to use high dosages corresponding to 5 times the recommended dosage in humans when treating severe infections such as bacterial meningitis or infectious endocarditis (28). In addition, the therapeutic index of these two molecules is very broad and no toxicity was described (29). CTX daily dose was three times superior to CRO dose according to doses used in human therapeutic situation such as meningitis. All subcutaneous injections were 200 μ L.

4.5.3 Bacterial strain and gavage

The strain used was a clinical isolate of *Kp*, carrying the beta-lactamase CTX-M9 (MIC of CTX: 512 mg/L, MIC of CRO: 2046 mg/L). Inocula of 10^5 CFU were prepared extemporaneously using a spectrophotometer. Gavage was done at day 4 of the antibiotic treatment. Three run of experiments were done.

4.5.4 Stool collection and seeding

Stool collection was performed at predefined times. On the day of collection, each mouse was placed in a clean cage for 1 hour to collect his stool and was returned to his "accommodation" cage. Stools were isolated and immediately frozen at -80 ° C.

Other stools were weighed and then crushed (Ultraturrax Tube Drive®, IKA™, Germany) with 10 µL saline per milligram of stool. Serial dilutions were performed in the fresh state, then manual inoculations of 100 µL on selective chromogenic media (ChromID ESBL, BioMérieux™, Marcy L'Etoile, France) were carried out before incubation at 37°C of 24h.

Enumeration was performed on media containing 30 to 300 colonies after 24h of culture. The detection threshold was 2 log₁₀ CFU/g stool. Colonies were identified using mass spectrometry (MALDI TOF, Vitek MS®, BioMérieux™, Marcy L'Etoile, France) to confirm genus and species.

4.5.5 16S rRNA gene amplification and sequencing

Fecal samples were kept frozen at -80 °C until they were processed. After fecal DNA isolation (MoBio, Carlsbad, CA fecal DNA kit), amplicons spanning the variable region 4 of bacterial 16S rRNA gene were generated and sequenced using Illumina Mi-seq platform at the University of Minnesota Genomic Center, Twin Cities, MN (30). The 16S rRNA gene sequencing data from the Illumina runs were trimmed and filtered using SHI7 (31). We then performed operational taxonomic units (OTUs) assignment using 'NINJA-OPS' against the Greengenes 13.8 database as a reference (32,33). Next, we used Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) 1.9.1 for diversity analyses and taxonomic profiling (34). We represented beta diversity, based on Unweighted UniFrac distances, with principal coordinate analysis (PCoA). We applied the PERMANOVA method on the previously obtained dissimilarity matrices. PERMANOVA was performed using 1000 permutations. We computed alpha diversity metrics, using both non-phylogeny and phylogeny-based metrics. We also performed Random Forest (RF) classification with 500 trees and ten-fold cross-validation (35). To study longitudinal variation in our samples, we used SplinectomeR, that applied smoothing splines to summarize data for straightforward hypothesis testing in longitudinal studies (36).

To identify significant associations between microbial and phenotypic variables, we applied a linear multivariate regression model specifically adapted to microbiome data: MaAsLin, Multivariate microbial Association by Linear models (37). MaAsLin constructs boosted, additive general linear models to associate metadata and transformed microbial taxonomic or functional relative abundances. Since microbial community profiles are typically high dimensional, boosting is used for feature selection over potential covariates to identify those most associated with each microbial feature. Selected metadata are then used in a general linear model with metadata as predictors and arcsin-square root transformed microbial relative abundances as the responses.

4.5.6 Pharmacokinetics

Stools collected were weighed, diluted in 0.9 % NaCl (10 mg/100 μ L) and homogenized by grinding in ball tubes and sonication. The ground material obtained was centrifuged (5 min, 13000 g, + 4 ° C).

For the CTX and desacetyl-CTX assay, 125 μ L of the supernatant was mixed with 125 μ L of a methanol/ZnSO₄ 3M solution (80/20 v/v) and 250 μ L of an acetonitrile solution containing the deuterated internal standard (¹³C₂, ²H₃-CTX). After centrifugation of the mixture (10 min, 13000 g, +4°C), 2 μ L of the supernatant were injected into the chromatographic system (H-Class® Acquity UPLC system, Waters™, St Quentin en Yvelines, France). The system consisted of a Kinetex 2.6 μ m C18 column in a thermostatically controlled oven at 50°C, mobile phases with a binary gradient [(acetonitrile/formic acid 0.1% v/v) and (ultrapure water/formic acid 0.1% v/v)] at a flow rate of 0.8 mL/min and a mass spectrometer monitoring of the m/z ratios (456, 460, 414) for respectively CTX, ¹³C₂, ²H₃-CTX, and desacetyl-CTX for 4 min after each injection.

For the CRO assay, 250 μ L of the supernatant was mixed with 250 μ L of acetonitrile solution containing the deuterated internal standard (¹³C, ²H₃-CRO). After centrifugation (5 min, 13000 g, + 4°C) of the mixture, 300 μ L of the supernatant were mixed with 2 ml of dichloromethane. After centrifugation, 2 μ L of the supernatant was injected into the H-Class® Acquity UPLC system. The chromatographic system consisted in a Kinetex 2.6 μ m C18 column in a furnace thermostatically controlled at 50°C, mobile phases with a binary gradient (acetonitrile and a 1 mM aqueous ammonium acetate solution) at a flow rate of 0.8 mL/min and a mass spectrometer monitoring of the m/z ratios (555, 559) for the CRO and ¹³C, ²H₃-

CRO respectively for 4 min after each injection. For both methods, reproducibility and inaccuracy were less than 15%, the limit of quantification was 10 µg/g stool for CRO, CTX and desacetyl-CTX.

4.5.7 Quantification and statistical analysis

Statistical analyzes were performed using RStudio® (<https://www.r-project.org/>) and GraphPad Prism® 6.0 (GraphPad Software Inc. TM, La Jolla CA, USA). Areas under the curve (AUC) were calculated by trapezoidal method. Negative culture were fixed at 2 log₁₀ CFU/g stool.

The Kruskal-Wallis test was used for unpaired data. The post hoc multiple comparison tests were performed using the Dunn method. Non-parametric Mann-Whitney tests were performed between the two-by-two groups with Bonferroni correction. All tests were defined with alpha risk determined a priori as significant if ≤ 0.05 .

4.5.8 Declarations

Acknowledgments

This work was funded by the association AGISMED TOXICOLOGIE.

Authors' contributions

M.G., E.M. and E.D. designed the experiments, M.G., F.B., R.B. conducted animal experiments, M.G., F.B., R.B., F.J. and P.B. conducted bacterial culture, MG., P.A., A.B. and J.G. conducted functional exploration experiments, Q.L. and E.M. performed metagenomics analysis, F.B., R.B. and E.D. conducted pharmacokinetics measurements, M.G., F.B., E.M, E.D., E.B, D.L. and M.N. wrote the manuscript and created figures.

Ethics approval and consent to participate

Ethics approval was not required for the study

Competing interests

The authors declare no competing interests.

4.6 References

1. WHO [Internet] http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf
2. Pitout JDD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis*. 2008 Mar;8(3):159–66.
3. de Kraker MEA, Wolkewitz M, Davey PG, Koller W, Berger J, Nagler J, *et al*. Burden of antimicrobial resistance in European hospitals: excess mortality and length of hospital stay associated with bloodstream infections due to *Escherichia coli* resistant to third-generation cephalosporins. *J Antimicrob Chemother*. 2011 Feb;66(2):398–407.
4. Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 2005 Mar 25;307(5717):1915–20.
5. Ruppé E, Andremont A. Causes, consequences, and perspectives in the variations of intestinal density of colonization of multidrug-resistant enterobacteria. *Front Microbiol*. 2013;4:129.
6. Donskey CJ. The role of the intestinal tract as a reservoir and source for transmission of nosocomial pathogens. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2004 Jul 15;39(2):219–26.
7. Lerner A, Adler A, Abu-Hanna J, Cohen Percia S, Kazma Matalon M, Carmeli Y. Spread of KPC-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: the importance of super-spreaders and rectal KPC concentration. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2015 May;21(5):470.e1-7.
8. Razazi K, Mekontso Dessap A, Carreaux G, Jansen C, Decousser J-W, de Prost N, *et al*. Frequency, associated factors and outcome of multi-drug-resistant intensive care unit-acquired pneumonia among patients colonized with extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Ann Intensive Care*. 2017 Dec;7(1):61.
9. Colodner R, Rock W, Chazan B, Keller N, Guy N, Sakran W, *et al*. Risk factors for the development of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in nonhospitalized patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. 2004 Mar;23(3):163–7.
10. Kaier K, Frank U, Hagist C, Conrad A, Meyer E. The impact of antimicrobial drug consumption and alcohol-based hand rub use on the emergence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing strains: a time-series analysis. *J Antimicrob Chemother*. 2009 Mar;63(3):609–14.
11. Lee J, Pai H, Kim YK, Kim NH, Eun BW, Kang HJ, *et al*. Control of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a children's hospital by changing antimicrobial agent usage policy. *J Antimicrob Chemother*. 2007 Sep;60(3):629–37.

12. Muller A, Lopez-Lozano JM, Bertrand X, Talon D. Relationship between ceftriaxone use and resistance to third-generation cephalosporins among clinical strains of *Enterobacter cloacae*. *J Antimicrob Chemother.* 2004 Jul;54(1):173–7.
13. Gbaguidi-Haore H, Dumartin C, L'Hériveau F, Péfau M, Hocquet D, Rogues A-M, *et al.* Antibiotics involved in the occurrence of antibiotic-resistant bacteria: a nationwide multilevel study suggests differences within antibiotic classes. *J Antimicrob Chemother.* 2013 Feb;68(2):461–70.
14. Grohs P, Kerneis S, Sabatier B, Lavollay M, Carbonnelle E, Rostane H, *et al.* Fighting the spread of AmpC-hyperproducing *Enterobacteriaceae*: beneficial effect of replacing ceftriaxone with cefotaxime. *J Antimicrob Chemother.* 2014 Mar;69(3):786–9.
15. Grall N, Massias L, Nguyen TT, Sayah-Jeanne S, Ducrot N, Chachaty E, *et al.* Oral DAV131, a charcoal-based adsorbent, inhibits intestinal colonization by β -lactam-resistant *Klebsiella pneumoniae* in cefotaxime-treated mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Nov;57(11):5423–5.
16. Labia R, Morand A, Kazmierczak A. The action of beta-lactamases on desacetyl-cefotaxime and cefotaxime. *J Antimicrob Chemother.* 1984 Sep;14 Suppl B:45–51.
17. Arvidsson A, Leijd B, Nord CE, Angelin B. Interindividual variability in biliary excretion of ceftriaxone: effects on biliary lipid metabolism and on intestinal microflora. *Eur J Clin Invest.* 1988 Jun;18(3):261–6.
18. Léonard F, Andremont A, Leclercq B, Labia R, Tancrède C. Use of beta-lactamase-producing anaerobes to prevent ceftriaxone from degrading intestinal resistance to colonization. *J Infect Dis.* 1989 Aug;160(2):274–80.
19. Hertz FB, Løbner-Olesen A, Frimodt-Møller N. Antibiotic selection of *Escherichia coli* sequence type 131 in a mouse intestinal colonization model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(10):6139–44.
20. Tan BK, Vivier E, Bouziad KA, Zahar J-R, Pommier C, Parmeland L, *et al.* A hospital-wide intervention replacing ceftriaxone with cefotaxime to reduce rate of healthcare-associated infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in the intensive care unit. *Intensive Care Med.* 2018;44(5):672–3.
21. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, *et al.* Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* 2011 Jun 24;12(6):R60.
22. Khanna S, Montassier E, Schmidt B, Patel R, Knights D, Pardi DS, *et al.* Gut microbiome predictors of treatment response and recurrence in primary *Clostridium difficile* infection. *Aliment Pharmacol Ther.* 2016;44(7):715–27.
23. Montassier E, Al-Ghalith GA, Ward T, Corvec S, Gastinne T, Potel G, *et al.* Pretreatment gut microbiome predicts chemotherapy-related bloodstream infection. *Genome Med.* 2016 28;8(1):49.
24. Langille MGI, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, *et al.* Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat Biotechnol.* 2013 Sep;31(9):814–21.

25. Høyen CK, Pultz NJ, Paterson DL, Aron DC, Donskey CJ. Effect of parenteral antibiotic administration on establishment of intestinal colonization in mice by *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Nov;47(11):3610–2.
26. Stiefel U, Pultz NJ, Donskey CJ. Effect of carbapenem administration on establishment of intestinal colonization by vancomycin-resistant enterococci and *Klebsiella pneumoniae* in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Jan;51(1):372–5.
27. Pultz MJ, Donskey CJ. Effects of imipenem-cilastatin, ertapenem, piperacillin-tazobactam, and ceftriaxone treatments on persistence of intestinal colonization by extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Aug;51(8):3044–5.
28. Habib G, Lancellotti P, Antunes MJ, Bongiorni MG, Casalta J-P, Del Zotti F, *et al.* 2015 ESC Guidelines for the management of infective endocarditis: The Task Force for the Management of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by: European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), the European Association of Nuclear Medicine (EANM). *Eur Heart J.* 2015 Nov 21;36(44):3075–128.
29. Doerr BI, Glomot R, Kief H, Kramer M, Sakaguchi T. Cefotaxime toxicity studies: a review of preclinical studies and some clinical reports. *Rev Infect Dis.* 1982 Oct;4 Suppl:S354-359.
30. Gohl DM, Vangay P, Garbe J, MacLean A, Hauge A, Becker A, *et al.* Systematic improvement of amplicon marker gene methods for increased accuracy in microbiome studies. *Nat Biotechnol.* 2016;34(9):942–9.
31. Al-Ghalith GA, Hillmann B, Ang K, Shields-Cutler R, Knights D. SHI7 Is a Self-Learning Pipeline for Multipurpose Short-Read DNA Quality Control. *mSystems.* 2018 Jun;3(3).
32. Al-Ghalith GA, Montassier E, Ward HN, Knights D. NINJA-OPS: Fast Accurate Marker Gene Alignment Using Concatenated Ribosomes. *PLoS Comput Biol.* 2016 Jan;12(1):e1004658.
33. DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, *et al.* Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol.* 2006 Jul;72(7):5069–72.
34. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods.* 2010 May;7(5):335–6.
35. Knights D, Costello EK, Knight R. Supervised classification of human microbiota. *FEMS Microbiol Rev.* 2011 Mar;35(2):343–59.
36. Shields-Cutler RR, Al-Ghalith GA, Yassour M, Knights D. SplinctomeR Enables Group Comparisons in Longitudinal Microbiome Studies. *Front Microbiol.* 2018;9:785.
37. Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward DV, *et al.* Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol.* 2012 Apr 16;13(9):R79.

4.7 Tables and figures

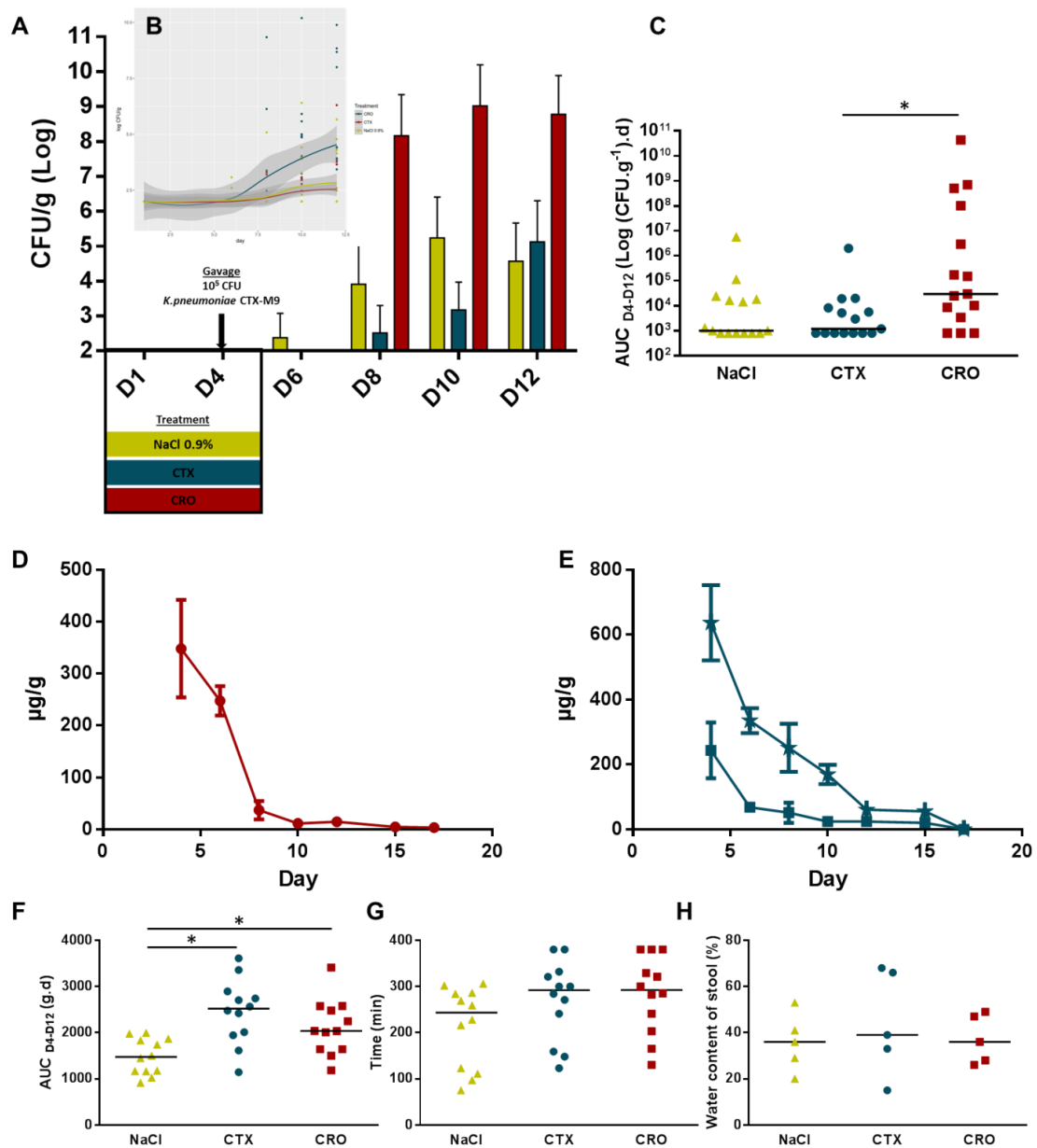


Figure 1. Gut colonization by *Klebsiella pneumoniae* (*Kp*), transit modifications and fecal concentrations of CRO and CTX.

(A) Quantification of fecal excretion of ESBL-producing *Kp* over time according to treatment administered (n = 15 per group). The bars represent the mean and the range. (B) Quantification of fecal excretion of ESBL-producing *Kp* over time according to treatment administered (n = 15 per group). Lines correspond to loess-smoothed conditional means and shading to standard error. (C) Area under the curve (AUC) of ESBL-producing *Kp* excretion of control, CTX and CRO groups. A statistically significant difference in colonization

between CRO and CTX was observed from day 4 to day 12 (p-value = 0.0078, Mann-Whitney test) and is symbolized by an asterisk. (D) CRO fecal concentrations along the protocol. (E) CTX (squares) and desacetyl-CTX (stars) fecal concentrations along the protocol. Values were indicated as means \pm SEM (n = 10 per group). Detection threshold was 10 μ g/g. (F) Weight of stool AUC between day 4 and day 12 showing differences between antibiotics groups (p-value = 0.0015 for CTX and 0.0268 for CRO, Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test, n = 12 per group) but not between the two antibiotics. (G) Transit time measured by carmin emission. No statistical differences were showed (Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test, n = 12 per group). (H) Water percentage in stool. No statistical differences were showed (Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test, n = 5 per group).

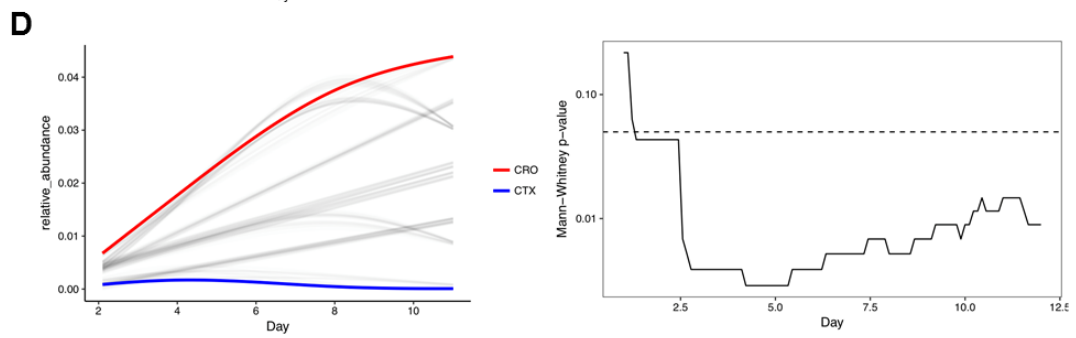
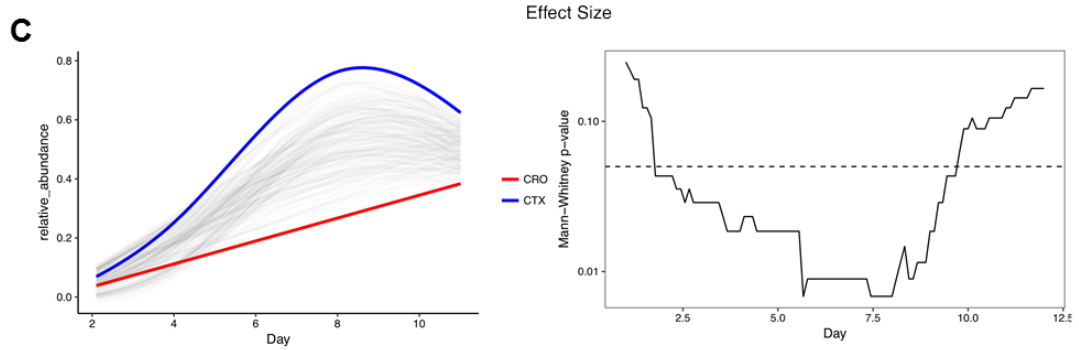
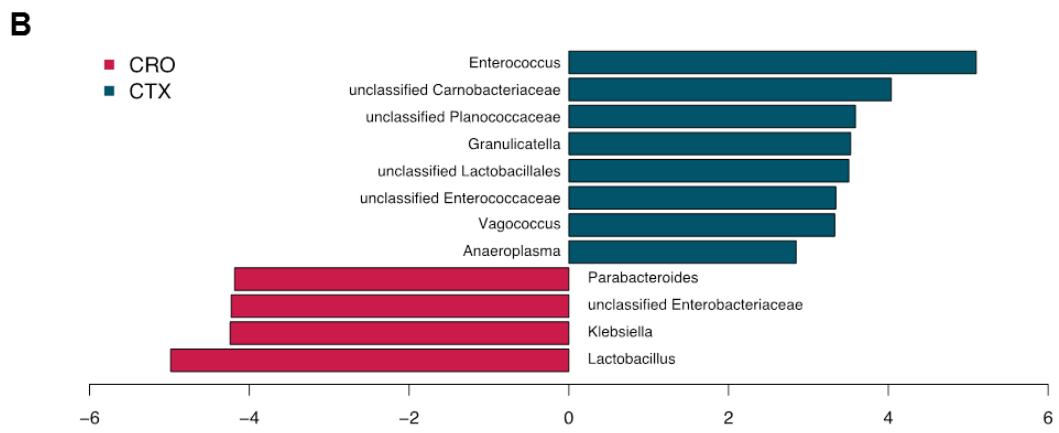
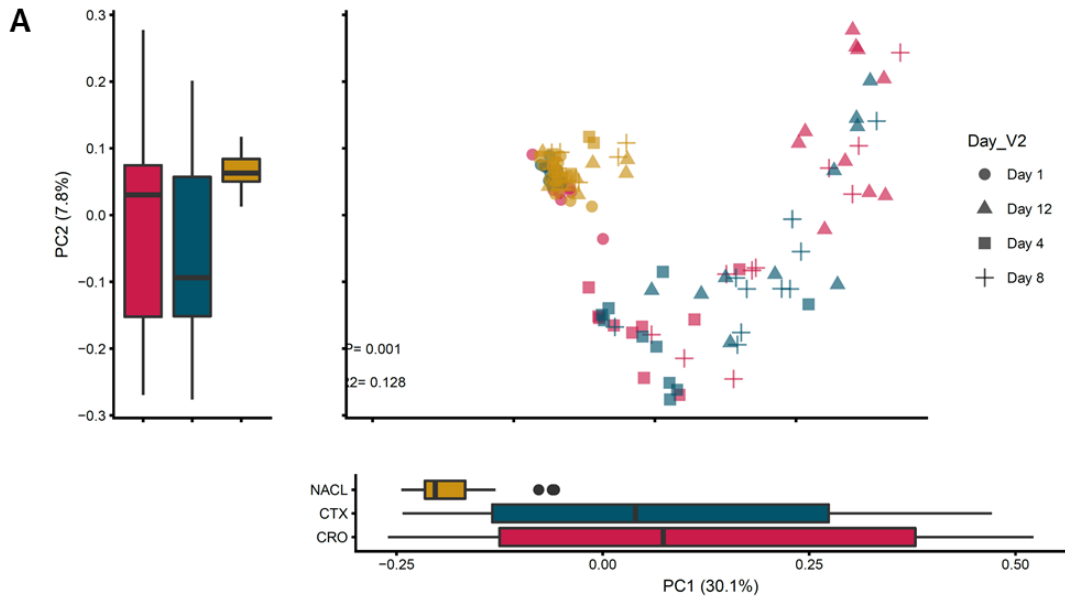


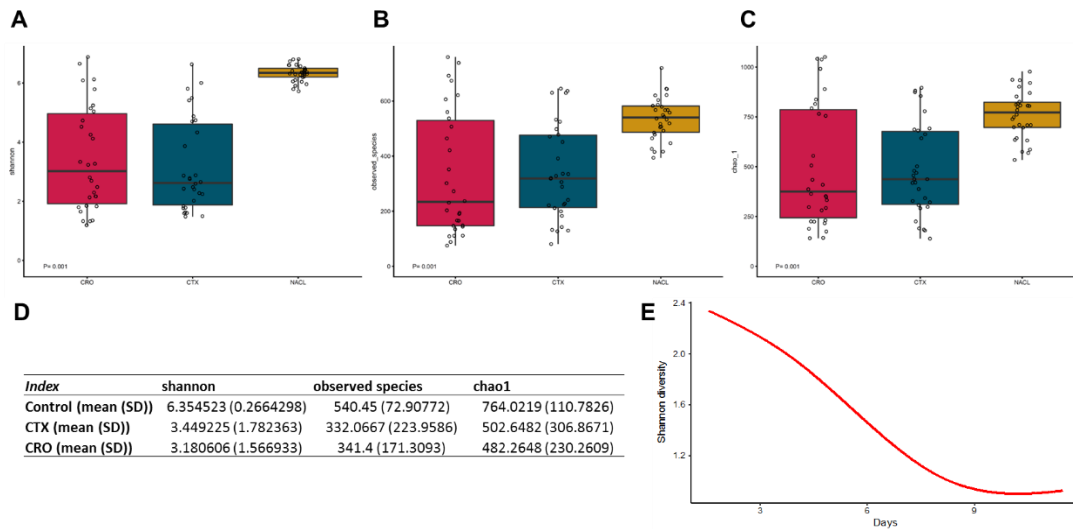
Figure 2. CRO and CTX alter the overall architecture of gut microbiota and induce taxonomic changes.

(A) Beta diversity comparisons of the gut microbiomes of the fecal samples collected from CTX and CRO-treated mice and control mice. Analyses were performed on 16S rRNA gene V4 regions data with a rarefaction depth of 18889 reads per sample. Principal coordinates analysis of Unweighted UniFrac distances. Proportion of variance explained by each principal coordinate axis is denoted in the corresponding axis label. The plot shows a separation between samples from CTX and CRO-treated mice (PERMANOVA, p-value = 0.001).

(B) Summary of the taxa that differentiate CTX from CRO-treated mice using Linear discriminant analysis Effect Size analysis (LEfSe). At genus level, 12 taxa were significantly different CTX from CRO-treated mice (absolute LDA log₁₀ score >2).

(C) Longitudinal changes in *Enterococcus* compared between CTX and CRO-treated mice, using SplinectomeR with permuted spline test. (C) *Enterococcus* relative abundance over time distinguishes CTX (group spline in blue) and CRO-treated mice (group spline in red; 999 permutations, p-value = 0.01). (C) The plot output of the sliding spliner function shows the p-value at each specified interval derived from the distribution of points from individuals' smoothed splines. Dotted line indicates p-value = 0.05.

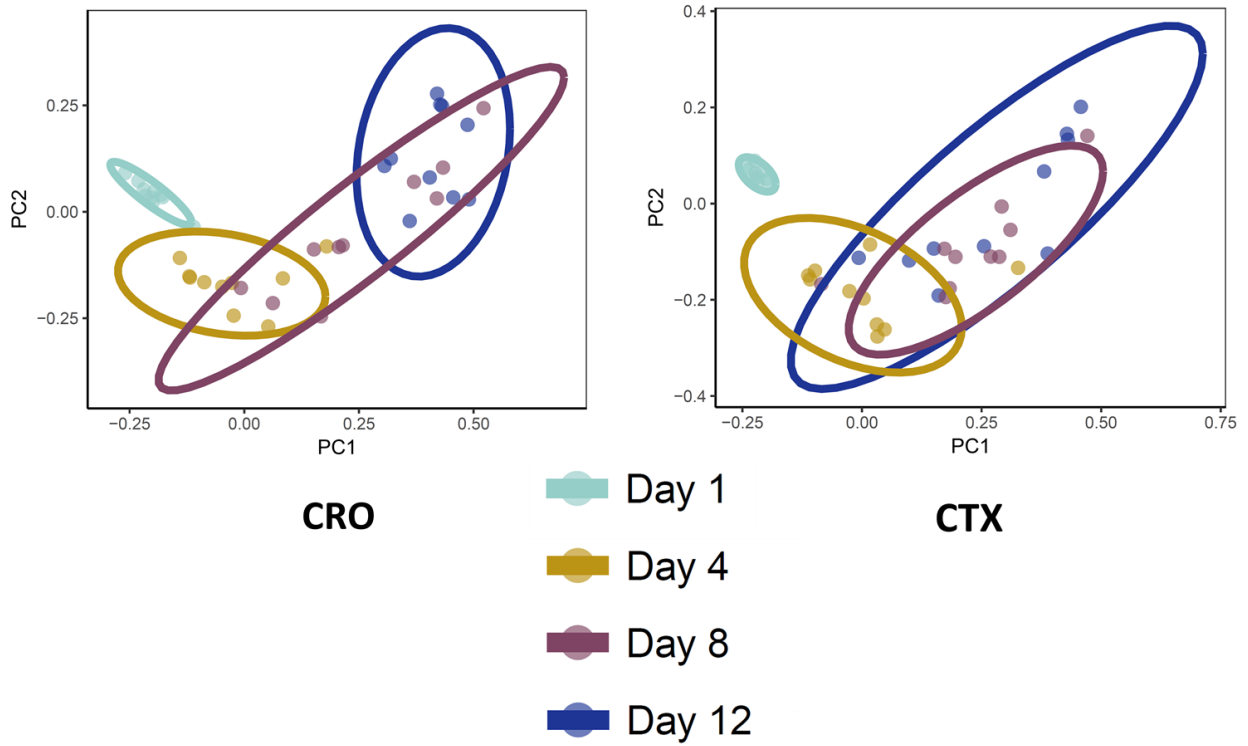
(D) Longitudinal changes in *Klebsiella* compared between CTX and CRO-treated mice, using SplinectomeR with permuted spline test. *Klebsiella* relative abundance over time distinguishes CTX (group spline in blue) and CRO-treated mice (group spline in red; 999 permutations, p-value = 0.01). (D) The plot output of the sliding spliner function shows the p-value at each specified interval derived from the distribution of points from individuals' smoothed splines. Dotted line indicates p-value = 0.05.



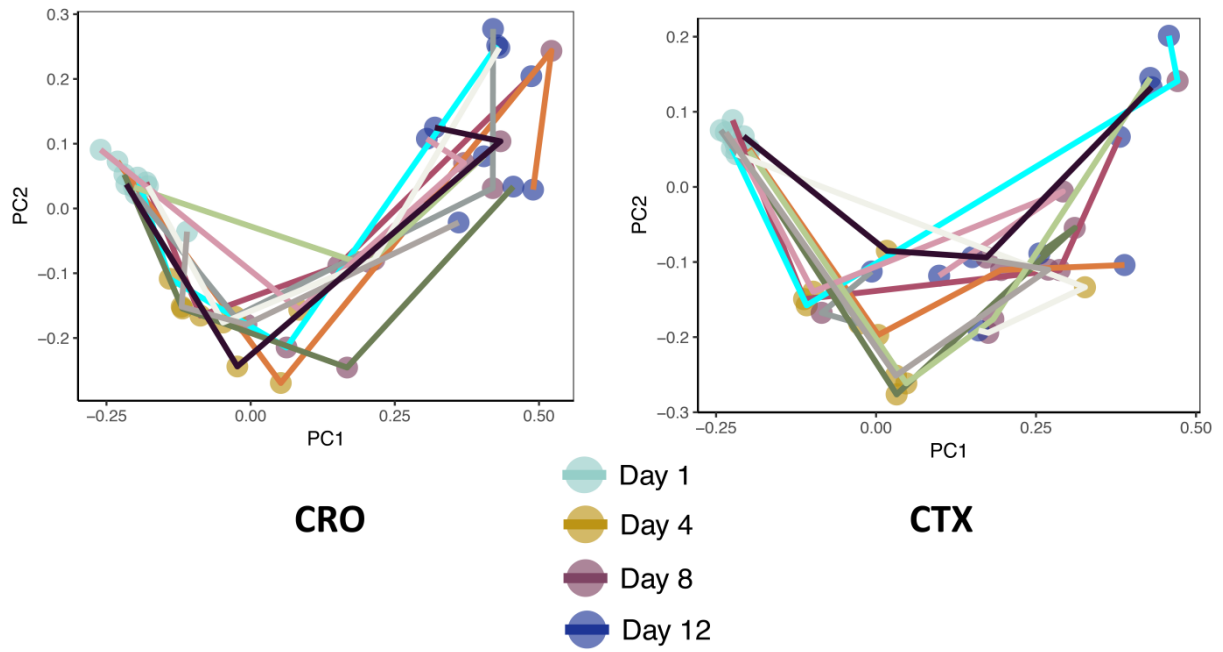
Additional file 1. Alpha diversity comparisons of the gut microbiomes of the fecal samples collected from CTX and CRO-treated mice and control. Analyses were performed on 16S rRNA gene V4 regions data with a rarefaction depth of 18889 reads per sample. The plot did not show significant changes in alpha diversity metrics, including Shannon index (A), observed species (B) and chao1 index (C), between samples from CTX and CRO-treated mice (ANOVA, $p > 0.05$).

(D) Index of alpha diversity tests.

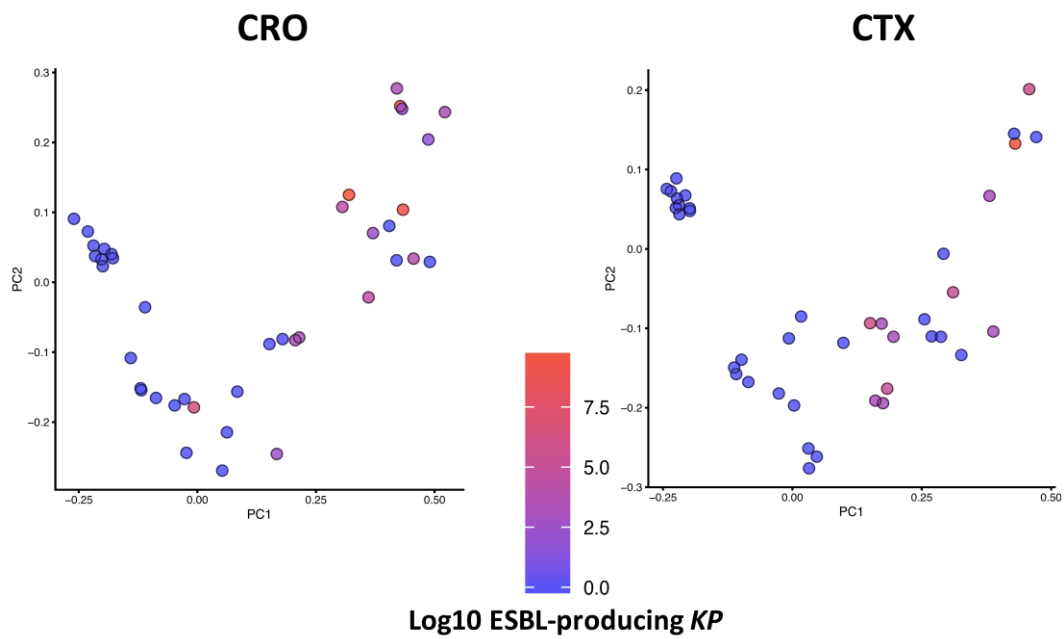
(E) The results plot from the trendyspliner function from SplinectomeR shows that the permuted data form a zero-change distribution from which the real data (red line) is significantly distinct (p -value = 0.01). This supports the hypothesis that alpha diversity decreased over time in CTX and CRO-treated mice.



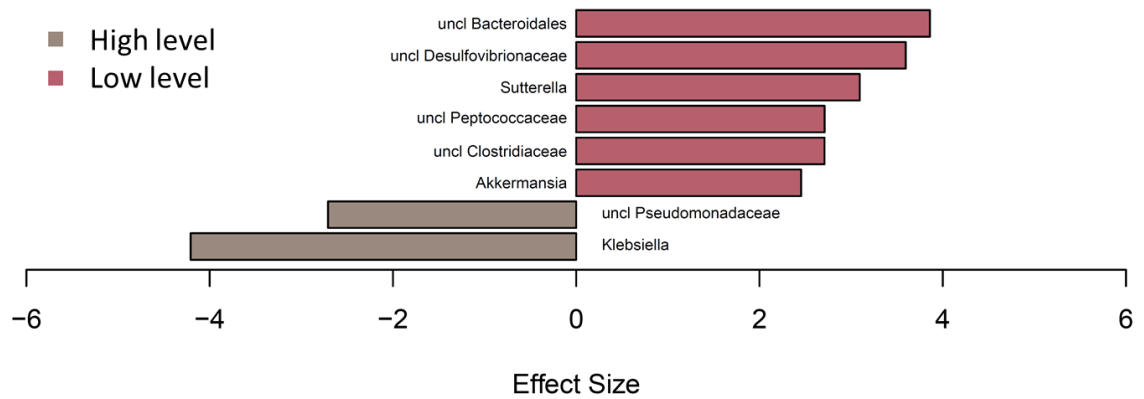
Additional file 2. Beta diversity comparisons of the gut microbiomes of the fecal samples collected from CTX- and CRO-treated mice. Beta diversity is represented by ellipse clustering according to the day after the start of antibiotic treatment.



Additional file 3. Beta diversity trajectories by mouse for comparisons of the gut microbiomes of the fecal samples collected from CTX- and CRO-treated mice.



Additional file 4. Beta diversity comparisons of the gut microbiomes of the fecal samples collected from CTX- and CRO-treated mice. Beta diversity is represented according to the level of carriage of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*.



Additional file 5. Summary of the taxa that differentiate high level ($AUC_{D4-D12} > 6 \log 10(\text{CFU.g}^{-1}).d$) of colonization versus low level ($AUC_{D4-D12} < 5 \log 10(\text{CFU.g}^{-1}).d$) mice using Linear discriminant analysis Effect Size analysis (LEfSe). At genus level, 8 taxa were significantly different low level from high level mice (absolute LDA log 10 score > 2).

Additional file 6. Linear regression including carriage level at each time and adjusted on the type of treatment.

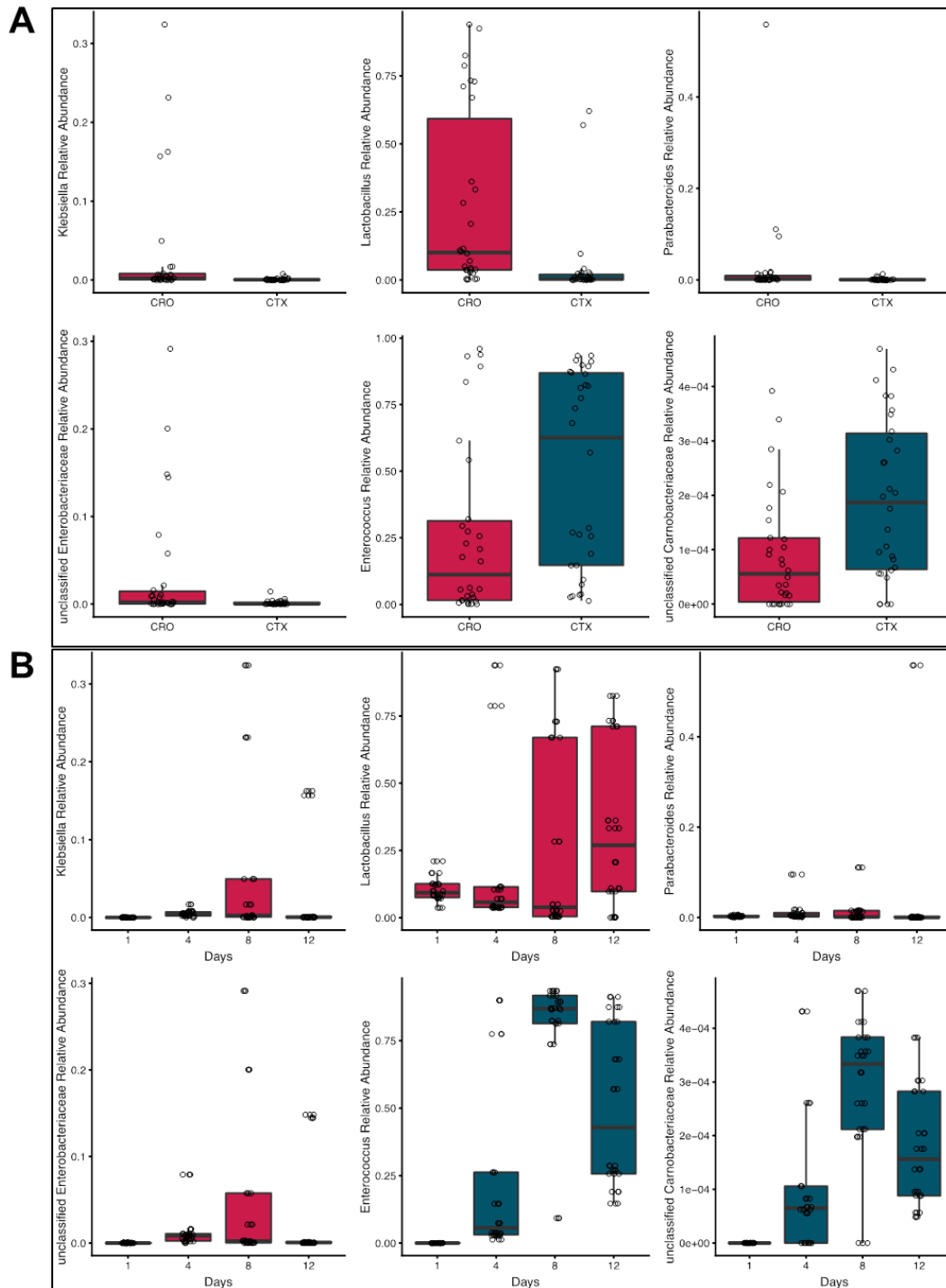
	estimate	pvalues	qvalues
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Rikenellaceae;g__	-0.008822595	4.08E-05	0.000921233
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__S24-7;g__	-0.021700484	4.95E-05	0.000932723
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__g__	-0.00434609	0.000795595	0.012843183
k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Lachnospiraceae;g__	-0.002065211	0.001265503	0.017875227
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__[Odoribacteraceae];g__Odoribacter	-0.006203656	0.001457281	0.018296968
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Porphyromonadaceae;g__Parabacteroides	0.009607272	0.002407888	0.019877091
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__[Paraprevotellaceae];g__[Prevotella]	-0.002149417	0.002462648	0.019877091
k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Ruminococcaceae;g__	-0.001518098	0.002151041	0.019877091

k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Ruminococcaceae;g__Oscillospira	-0.001343512	0.001817981	0.019877091
k__Bacteria;p__Tenericutes;c__Mollicutes;o__RF39;f__;g__	-0.000316676	0.002259321	0.019877091
k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Dehalobacteriaceae;g__Dehalobacterium	-0.000202403	0.003084823	0.023239001
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Coriobacterii;o__Coriobacteriales;f__Coriobacteriaceae;g__Adlercreutzia	-0.000108613	0.004157367	0.027634266
k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Lachnospiraceae;g__Coproccoccus	-0.000243835	0.004080936	0.027634266
k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Lachnospiraceae;g__[Ruminococcus]	-0.000408031	0.005358639	0.033640342
k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Erysipelotrichi;o__Erysipelotrichales;f__Erysipelotrichaceae;g__	-0.000324398	0.008292833	0.048071576
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Burkholderiales;f__Alcaligenaceae;g__Sutterella	-0.0008888	0.008508243	0.048071576

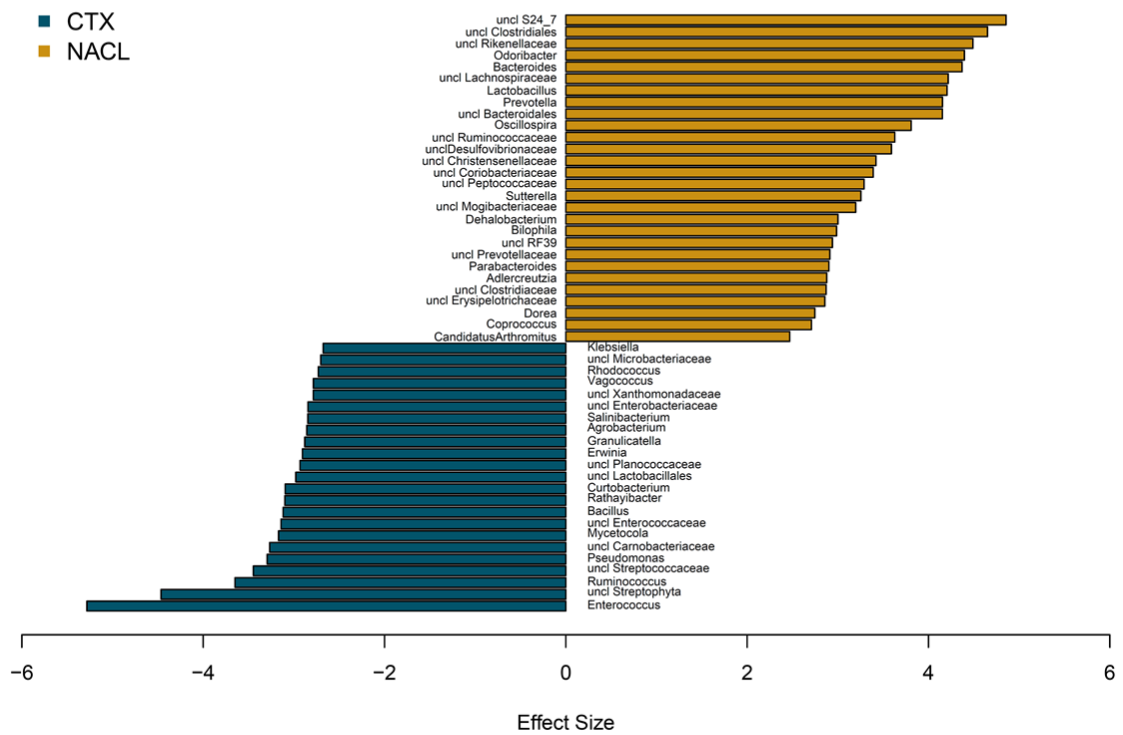
k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__[Mogibacteriaceae];g__	-2.31E-05	0.012645031	0.068042312
--	-----------	-------------	-------------

k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Prevotellaceae;g__Prevotella	-0.000851069	0.014498832	0.074471271
--	--------------	-------------	-------------

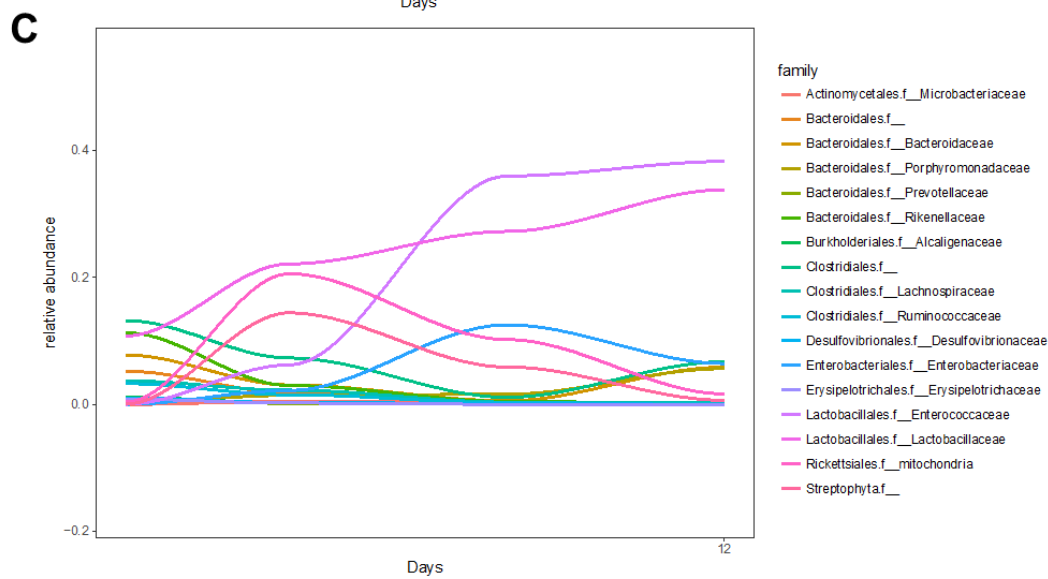
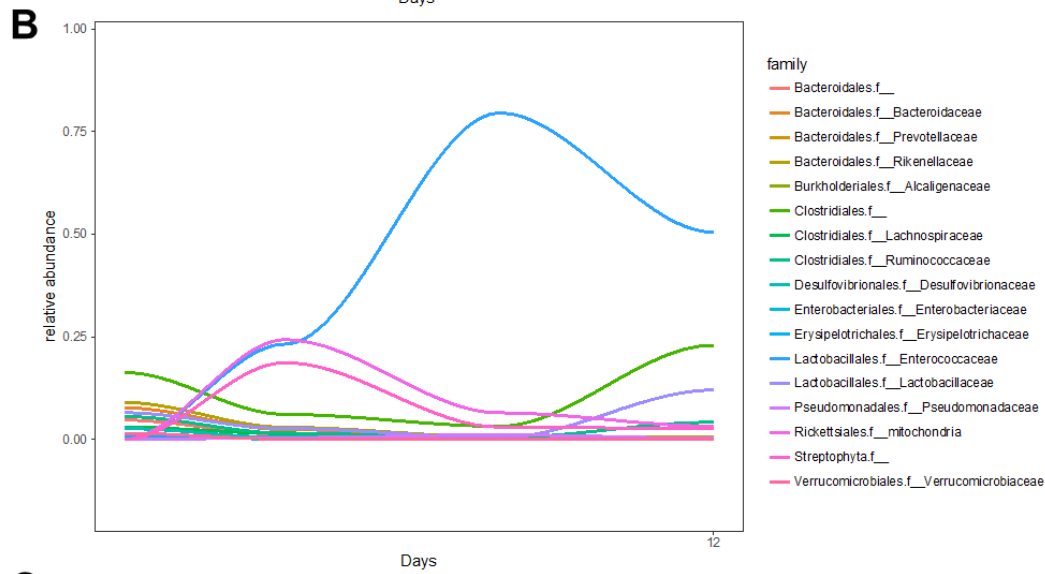
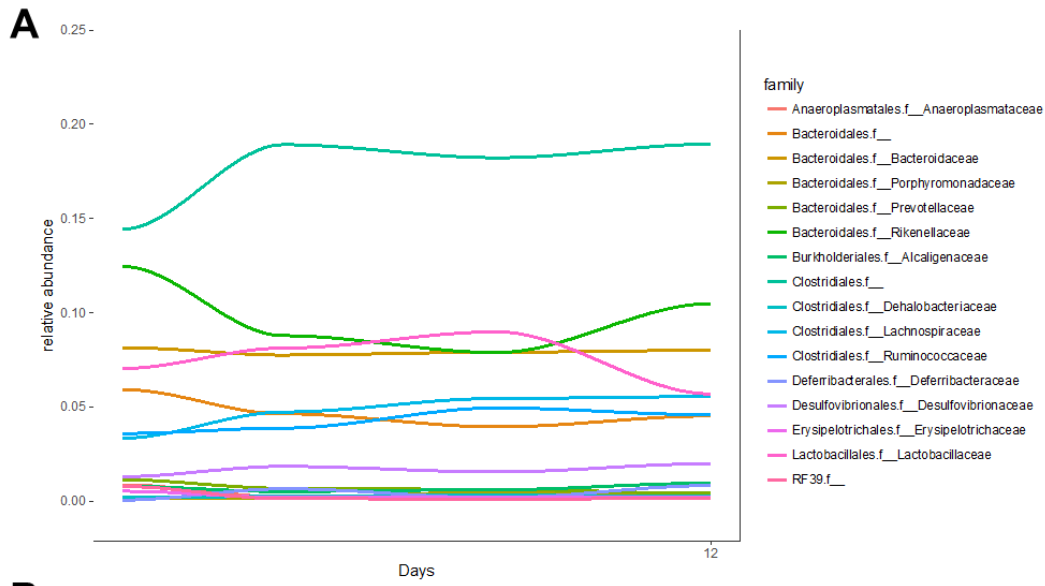
k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Lachnospiraceae;g__Dorea	-0.000139589	0.018929972	0.093003774
--	--------------	-------------	-------------



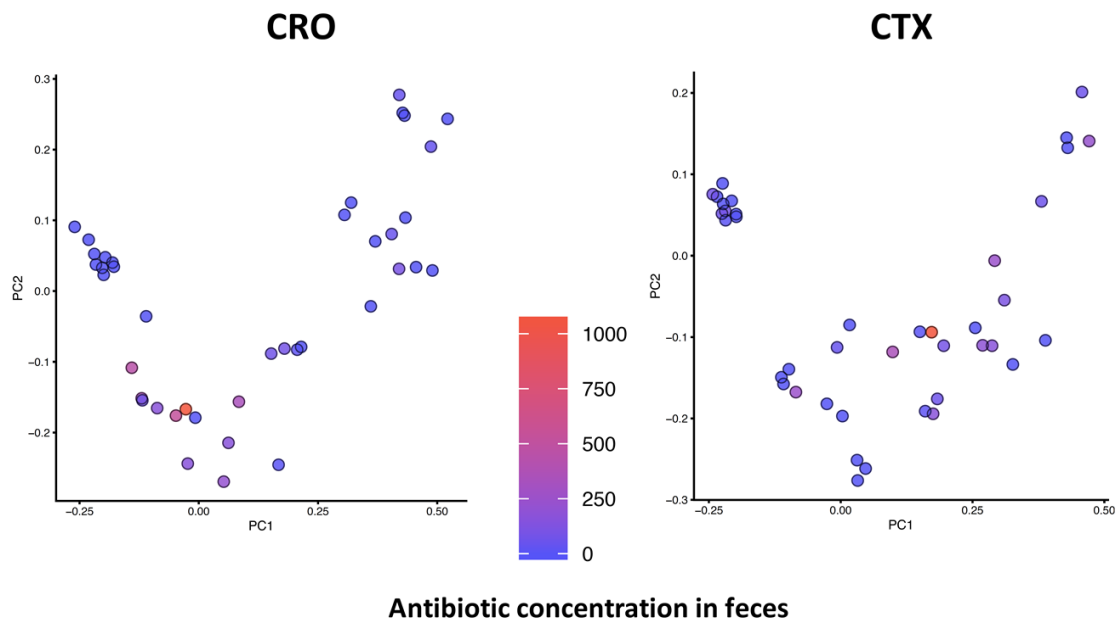
Additional file 7. (A) Most significant differentiating taxa between CTX and CRO-treated mice, based on the Linear discriminant analysis Effect Size analysis (LEfSe). (B) Most significant differentiating taxa between CTX and CRO-treated mice, based on the Linear discriminant analysis Effect Size analysis (LEfSe), classified along days of collection.



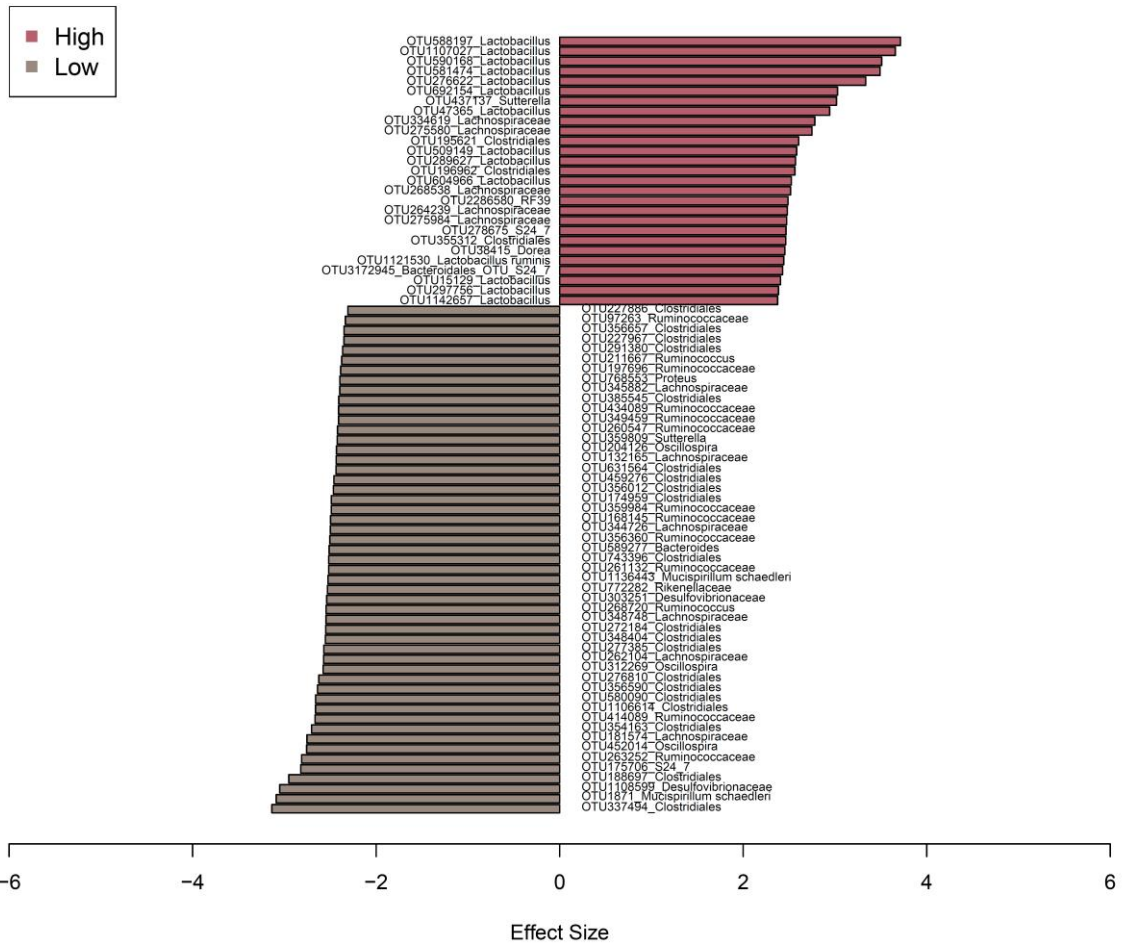
Additional file 9. Summary of the taxa that differentiate CTX-treated mice from control mice using Linear discriminant analysis Effect Size analysis (LEfSe). At genus level, 51 taxa were significantly different control from CTX-treated mice (absolute LDA log 10 score >2).



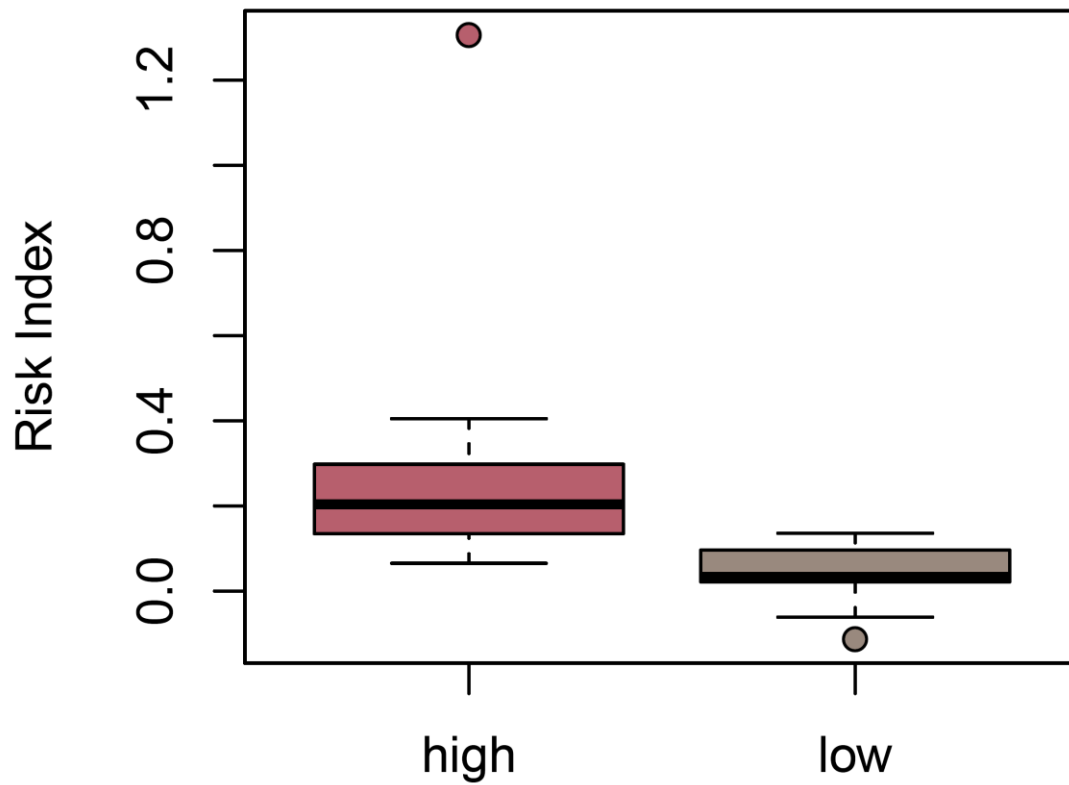
Additional file 10. (A) Most frequent taxa at family level in control mice along time. B) Most frequent taxa at family level in CTX-treated mice along time. C) Most frequent taxa at family level in CRO-treated mice along time.



Additional file 11. Beta diversity comparisons of the gut microbiomes of the fecal samples collected from CTX- and CRO-treated mice. Beta diversity is represented according to the antibiotic concentration in feces.

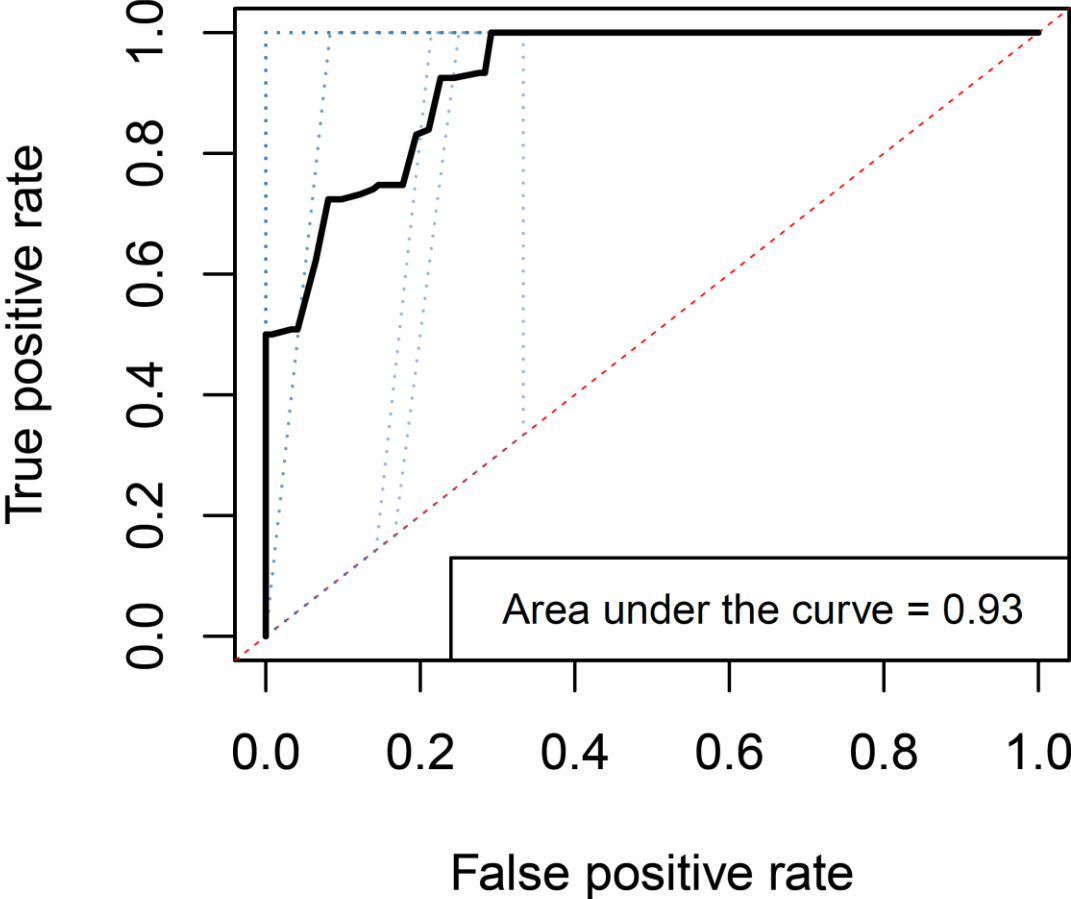


Additional file 12. Summary of the operational taxonomic units associated with high or low colonization by *Klebsiella pneumoniae* CTX-M9 using linear discriminant analysis effect size analysis (LEfSe). Representative bacteria with relative abundance of at least 1% with significant differences are represented.

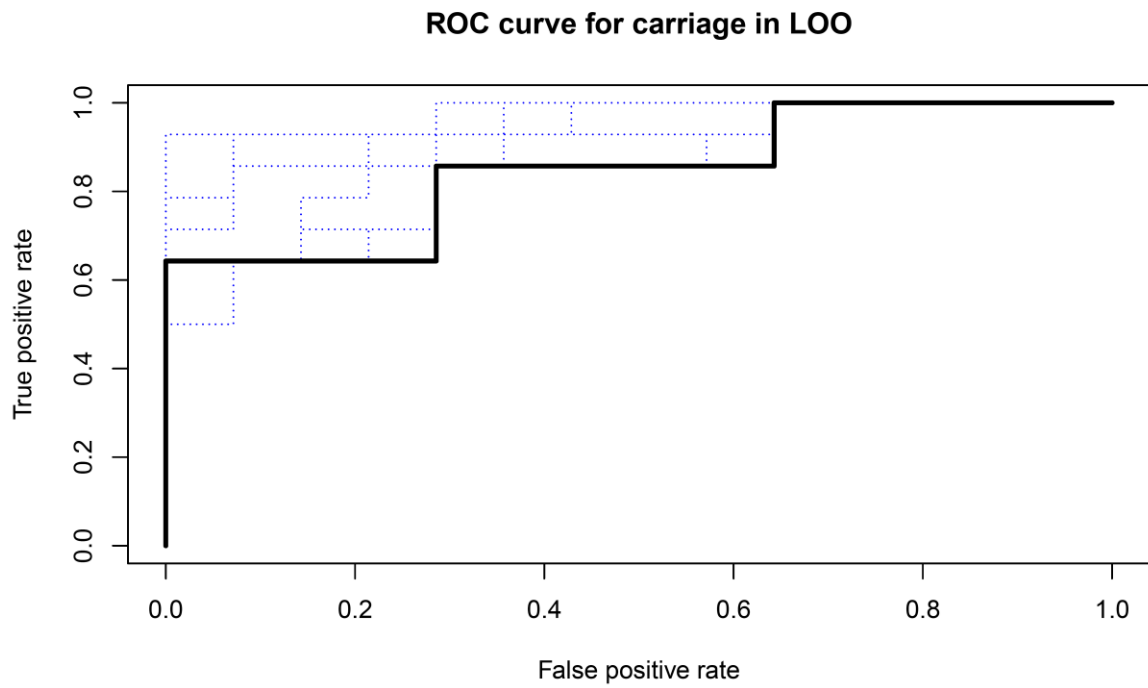


Additional file 13. *Klebsiella pneumoniae* CTX-M9 intestinal carriage risk index based on the differentiated genera in low and highly colonized mice with the Mann–Whitney U test: *** $P < 0.001$. The boxplots denote top quartile, median and bottom quartile and individual dots represent individual patient samples.

Risk Index



Additional file 14. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis of the *Klebsiella pneumoniae* CTX-M9 intestinal carriage risk index in pre-gavage fecal samples collected following 10-fold cross-validation.



Additional file 15. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis of the *Klebsiella pneumoniae* CTX-M9.

4.8 Remarques complémentaires sur l'article

La ceftriaxone et le céfotaxime sont deux céphalosporines de 3^{ème} génération utilisées dans les mêmes indications thérapeutiques du fait d'un spectre antibactérien considéré comme identique. L'emploi de l'une ou l'autre de ces molécules est guidé par des différences en termes d'élimination. En effet, la ceftriaxone qui présente l'avantage d'une demi-vie d'élimination plus longue, autorise des schémas d'administration en deux voire une seule injection par jour alors que le céfotaxime nécessite à *minima* trois administrations quotidiennes.

Depuis une dizaine d'années, des courants de pensées orientent vers l'utilisation privilégiée du céfotaxime en postulant sur le fait que cette molécule présente une élimination essentiellement rénale et présente ainsi moins d'impact sur le microbiote digestif que la ceftriaxone qui a une élimination mixte rénale et biliaire. Compte tenu des implications multiples du microbiote digestif sur le fonctionnement physiologique de l'organisme, cet élément est une donnée nouvelle à considérer comme une cible pharmacodynamique ou toxicodynamique à part entière. En effet, son rôle dans des pathologies aussi variées que l'obésité, l'athérosclérose, les cancers, les troubles anxieux ou les maladies dysimmunitaires telles que les entérocolopathies inflammatoires est maintenant clairement établi et en fait un organe à part entière (85).

Le microbiote digestif, composé d'au moins autant d'organismes unicellulaires que de cellules constituant l'organisme humain, serait de ce fait le siège privilégié de la sélection de résistance aux antibiotiques et notamment aux céphalosporines (84). L'OMS a classée, en février 2017, la résistance des entérobactéries aux C3G comme priorité critique pour la recherche et le développement de nouvelles solutions antibiotiques.

Ce travail, réalisé sur un modèle murin, avait pour objectif de comparer la capacité de la ceftriaxone et du céfotaxime à sélectionner des entérobactéries productrices de BLSE et résistantes aux C3G et à entraîner des modifications du microbiote. Une approche novatrice associant pharmacocinétique d'élimination fécale et métagénomique a été employée dans ce projet. En effet, ce travail est le premier du genre à évaluer les corrélations entre les concentrations en antibiotique au sein du microbiote et les altérations de celui-ci.

Ces résultats suggèrent que le choix de l'antibiothérapie doit maintenant être guidé en partie par l'impact qu'elle aura sur la sélection de mutants résistants avec une inscription nécessaire dans les recommandations. Ces résultats sont à modérer car le céfotaxime semble favoriser la sélection d'entérocoques dont le pouvoir pathogène n'est pas négligeable. Des travaux complémentaires s'inspirant du modèle murin utilisé sont à envisager pour confirmer cette hypothèse. Une solution thérapeutique permettant de détruire la céphalosporine au niveau digestif afin de préserver le microbiote est envisagé comme une solution séduisante permettant le traitement du patient à haute dose sans affecter son microbiote intestinal.

Ce travail sur un modèle animal a nécessité une formation à l'expérimentation animale avec une validation du diplôme de "Fonction de conception ou de réalisation des procédures expérimentales – Mammifères" anciennement appelé le "niveau 1 d'expérimentation animale" de l'école vétérinaire de Nantes. Par ailleurs, ce sujet a fait l'objet d'un encadrement de stage de master 2 (Florian Berteau).

Les résultats de ce travail seront soumis pour publication dans *Microbiome* (impact factor: 9,133). Ces données ont également été présentées en poster au 29^{ème} *European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* à Madrid en avril 2018.

5. Conclusion

L'intérêt du laboratoire de pharmacologie clinique du centre hospitalier universitaire (CHU) de Nantes pour les bêta-lactamines et particulièrement les céphalosporines est important et constitue l'un de ses domaines d'expertise de prédilection. Les relations anciennes avec le service de maladies infectieuses ainsi que les unités de réanimations chirurgicales et médicales nous poussent à nous interroger et à construire des projets de recherche répondant à certaines questions essentielles à la pratique clinique. Ces travaux, portant sur l'utilisation des céphalosporines, dépassent le cadre de ce travail de thèse et participent à l'innovation médicamenteuse en antibiothérapie (Annexe I acceptée dans *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*). Ces collaborations sont également à l'origine de mémoires (Annexe II, DES de biologie médicale et thèse d'exercice de médecine de Ronan Bellouard, soumise au *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*).

Ce travail de thèse de doctorat avait pour objectif de répondre à des questions traitant de la pharmacologie en relation avec l'utilisation des céphalosporines en pratique clinique. Trois réponses ont été apportées.

La première concernait l'antibioprophylaxie utilisée en chirurgie bariatrique. Avant ce projet, issu d'une collaboration entre les services de pharmacologie clinique et de réanimation chirurgicale du CHU de Nantes, aucune étude aussi importante en nombre de patients n'avait encore été réalisée. Les recommandations américaines et françaises, ne se basant sur aucune étude de grande ampleur, étaient discordantes. Les recommandations françaises de la SFAR préconisaient l'utilisation de 4 g de céfazoline avant le début de l'intervention alors qu'Outre-Atlantique, la posologie de 2 g (et de 3 g si le poids était supérieur ou égale à 120 kg) était recommandée (120,121). Les résultats de l'analyse non-compartimentale et de l'analyse de population que nous avons réalisés étaient concordants et démontraient l'intérêt d'une posologie d'au minimum 4 g de céfazoline avant le début l'intervention, comme recommandée actuellement par la SFAR. L'insuffisance des recommandations américaines quant à leur capacité de permettre l'atteinte de concentrations efficaces au niveau tissulaire a par ailleurs été mise en évidence. Les simulations de Monte Carlo ont également permis de proposer un schéma en perfusion continue permettant d'atteindre des concentrations tissulaires efficaces dans les situations les plus à risque (CMI élevée, durée de l'intervention

prolongée). Ce type de schéma posologique semble séduisant sur un plan pratique tout en garantissant une efficacité antibioprophy lactique maximale.

La principale limite de ce travail concernait la mesure des concentrations totales dans les prélèvements tissulaires en substitut des concentrations interstitielles libres qui ne sont dosable qu'après prélèvement par microdialyse, la technique de référence. L'emploi de la microdialyse pour un grand nombre de patients a été discuté pour notre étude mais elle s'avérait trop difficile à mettre en place alors que des dosages dans les tissus prélevés pendant l'intervention apparaissaient comme une alternative crédible et non limitée par le nombre de sujets.

Une seconde limite de ce travail a été de ne pas mettre en évidence l'impact d'une mesure anthropométrique sur le volume de distribution de la céfazoline alors que d'autres auteurs l'ont déjà fait dans cette population des obèses morbides (124). Seuls la taille, le poids, le poids idéal, l'indice de masse corporelle et la surface corporelle ont été testés comme covariables mais il aurait été pertinent d'étudier d'autres mesures et formules facilement accessibles comme le poids maigre, le pourcentage de masse grasse ou la différence entre le poids total et le poids maigre. Le pourcentage d'eau dans le tissu adipeux est d'environ 30 % et ne peut pas expliquer totalement que l'intégration des mesures anthropométriques testées comme covariables dans le calcul du V_d n'améliore pas la vraisemblance du modèle (125). Par ailleurs, les mesures dans les graisses attestent de la bonne distribution de la céfazoline dans ces tissus. L'homogénéité de la cohorte de patient ne peut également justifier ce résultat car les patients présentaient des poids allant de 85 à 182 kg et une covariable comme le poids corporel manquait vraisemblablement de sens dans une population mesurant entre 1,28 et 1,95 m. L'analyse de ce travail avec du recul laisse penser que l'étude de covariables supplémentaires aurait pu améliorer la vraisemblance du modèle.

Ce travail souligne l'intérêt de posologies élevées chez les patients obèses morbides et confirme notamment les travaux de Brill *et al.* qui démontraient la difficulté d'atteindre des concentrations tissulaires dépassant les CMI dans cette population en se basant sur des données issues de prélèvements réalisés en microdialyse mais sur 9 patients seulement (124). Des données récentes, montrent que le taux d'infections du site chirurgical chez les patients obèses est deux fois plus élevé que chez les patients non-obèses lorsque les recommandations américaines sont appliquées (126). Il serait pertinent de réaliser une étude similaire, évaluant l'efficacité en termes de prévention d'infections du site chirurgical. Ce type d'étude pourrait

comprendre 3 bras randomisés et comparerait les recommandations françaises, en évaluant une posologie de 4 g avant intervention, les recommandations américaines, en évaluant une posologie de 3 g avant intervention et un troisième schéma associant un bolus à de la perfusion continue comme proposé dans notre travail. Ce type d'étude serait obligatoirement multicentrique pour recruter le nombre de patients nécessaires (plus de 150 patients par bras si l'on se base sur l'étude précédente) et internationale (pour intégrer des centres appliquant les recommandations américaines).

Les résultats de ce travail ont été publiés dans *l'International Journal of Antimicrobial Agents* avec pour objectifs une mise à jour des recommandations françaises et surtout américaines avec un consensus sur la posologie de 4 g de céfazoline avant le début de l'intervention et la possibilité d'administrer la molécule en perfusion continue pendant toute la durée de l'intervention.

Le second volet de cette thèse s'intéressait à l'utilisation de la ceftriaxone dans une population de patients hospitalisés pour une infection neuro-méningée. Actuellement, la posologie de cette C3G n'est pas adaptée à la fonction rénale alors que le risque de toxicité neurologique n'est pas négligeable aux posologies employées dans ce type d'infections (127,128).

Cette étude de cohorte, multicentrique (Nantes, Angers, Rennes, Tours, Saint-Nazaire, et La Roche-sur-Yon), a permis d'inclure 153 patients traités par ceftriaxone à forte dose (plus de 75 mg/kg ou plus de 4 g par jour) pour une méningite communautaire ou nosocomiale. Les dosages plasmatiques et céphalorachidiens de ces patients ont été utilisés pour la construction d'un modèle de population intégrant le DFG estimé par la formule de Cockroft & Gault comme covariable. Les simulations de Monte Carlo réalisées en se basant sur ce modèle ont permis de démontrer l'intérêt de l'adaptation du schéma d'administration à la fonction rénale de chaque patient. En effet, alors qu'une administration quotidienne semble suffisante chez l'insuffisant rénal, un minimum de deux administrations quotidiennes est requis chez les patients normo-rénaux voir supranormaux pour traiter les infections à *Streptococcus pneumoniae* (bactéries présentant les CMI les plus élevées)

Cette étude de modélisation en pharmacocinétique de population de la ceftriaxone présente plusieurs limites importantes et parmi elles, l'intégration de l'estimation du DFG. La formule référence de calcul du DFG est actuellement la formule du CKD-EPI (19). La formule de Cockroft & Gault, qui a longtemps fait figure de référence, ne doit maintenant

plus être utilisée pour cette estimation et les recommandations françaises et internationales préconisent son abandon. En effet, elle sous-estime fortement la fonction rénale chez le sujet âgé alors qu'elle la surestime chez le sujet obèse et le patient cachectique (129). La formule du *Modification of Diet in Renal Disease Study Group* (MDRD) a été proposée en 1998 et a prouvé une plus grande précision que celle de Cockcroft & Gault chez le sujet jeune, l'obèse et la personne âgée de plus de 65 ans (130). Son intérêt est maintenant plus limité depuis la proposition de la formule du CKD-EPI par le même auteur. Alors que la formule de Cockcroft & Gault tenait compte du poids comme reflet de la masse musculaire qui est à l'origine de la synthèse de créatinine, celles du MDRD et du CKD-EPI sont calculées pour une surface corporelle de 1,73 m² et il faut donc corriger la formule en tenant compte de la surface corporelle de chaque patient. Les méthodes les plus souvent utilisées pour le calcul de la surface corporelle tiennent compte du poids et de la taille comme la formule de Dubois. Dans cette étude multicentrique, la taille ne faisait pas partie des covariables recueillies dans tous les centres et il n'a donc pas été possible de corriger le calcul du DFG calculé par la formule du CKD-EPI comme dans les travaux présentés en Publication 1 et en Annexe II. Dans l'analyse de population, le DFG calculé par la formule de Cockcroft & Gault (qui faisait encore office de référence au moment du design de l'étude) a été statistiquement plus pertinent que l'intégration du DFG par la formule du CKD-EPI ou par celle du MDRD non corrigées par la surface corporelle et il est probable que l'utilisation de la formule de Cockcroft & Gault soit plus pertinente pour l'adaptation de posologie que celle du CKD-EPI non corrigée par la surface corporelle.

Une seconde limite importante de ce travail est la forte dispersion des paramètres observés dans la population, notamment des paramètres concernant l'élimination de la ceftriaxone. Cette dispersion peut s'expliquer par des cas extrêmes (patients anuriques d'une part et patients avec un DFG très élevé dans les premières heures du sepsis sévère d'autre part). Une première approche pourrait consister en une détection des *outliers* afin de déterminer les facteurs de dispersion dans cette population mais il serait également potentiellement utile de fixer certains paramètres afin de limiter cette dispersion. L'utilisation de la formule de Cockcroft & Gault est possiblement une des causes de cette dispersion. En effet, chez les patients obèses ou âgés de plus de 65 ans, les performances de prédiction de cette formule sont faibles et il serait intéressant de savoir si les *outliers* observés dans cette analyse de population correspondent à des critères précis en termes de poids corporel et d'âge.

Un second travail sur cette cohorte, en lien avec la pharmacovigilance, a été réalisé afin de déterminer le seuil toxique de ceftriaxone à ne pas dépasser en concentration résiduelle. Un seuil de concentration résiduelle plasmatique totale de 100 mg/L a été déterminé (27).

En se basant sur cette cible toxicodynamique, il est envisagé d'utiliser ces données afin de déterminer les posologies à employer pour ne pas dépasser le seuil toxique de ceftriaxone tout en atteignant la cible en termes d'efficacité. Le modèle sera retravaillé pour inclure uniquement les concentrations plasmatiques libres et totales et développer une approche par nomogramme proche de celle déjà réalisée pour la céfazoline dans les bactériémies et les endocardites bactériennes (Annexe II).

Ces deux premiers travaux ont été réalisés à l'aide du package de R, Pmetrics (algorithme NPAG) (123). Le modèle d'erreur utilisé est spécifique au package. Dans Pmetrics, chaque observation est pondérée par $1/\text{erreur}^2$. Deux modèles d'erreur sont disponibles:

- Erreur = SD x gamma (où SD est l'écart type de chaque observation)
- Erreur = $(\text{SD}^2 + \text{lambda}^2)^{0,5}$

Gamma et lambda sont des termes qui représentent le bruit lié à l'observation, aux temps de dosage et d'observation mal définis. SD est modélisé par une équation polynomiale pouvant aller jusqu'à 4 termes: $C_0 + C_1 \times [\text{obs}] + C_2 \times [\text{obs}]^2 + C_3 \times [\text{obs}]^3$ où [obs] est l'observation. Il est généralement recommandé de commencer par une valeur de C_0 équivalente à la moitié de l'observation la plus faible dans le fichier de données, une valeur de C_1 fixée à 0,15 et des valeurs de C_2 et C_3 fixées à 0.

Dans un modèle d'erreur multiplicatif, gamma est un scalaire de SD. Lorsque les données sont robustes, gamma est généralement proche de 1. Lorsque les données sont de faible qualité, gamma dépasse la valeur de 5. De la même manière, dans un modèle d'erreur additif, une valeur de lambda approchant une fois C_0 est le signe de données de bonne qualité alors qu'une valeur dépassant les cinq fois C_0 est le signe de données de faible qualité.

Dans le premier travail présenté, un modèle d'erreur additif a été choisi avec une valeur de départ de lambda fixée à 0,5 pour un C_0 à 0,5. Ces résultats confirment la bonne qualité des données utilisées (données riches sur un grand nombre de patients). Dans le

second travail, un modèle multiplicatif a été choisi avec une valeur de départ de gamma à 10 qui semble être le reflet de données de qualité moyenne en termes de richesse mais aussi en termes de recueil. Il semblerait opportun d'essayer de fixer la valeur de gamma et de ne pas l'estimer pour améliorer le modèle. Ces résultats confirment les bonnes performances de l'analyse non-paramétrique en cas de données riches mais montre vraisemblablement les limites de cette approche lorsque les données sont plus pauvres.

Le troisième et dernier volet de ce travail de thèse répondait à un questionnaire plus récent mais prenant de l'importance: quel antibiotique choisir pour épargner au maximum le microbiote et limiter ainsi l'émergence de bactéries multirésistantes tout en maintenant une activité antibactérienne élevée?

L'objectif principal de ce projet était d'étudier les différences entre un traitement par céfotaxime et un traitement par ceftriaxone sur la sélection d'entérobactérie productrice de BLSE. Les résultats ont mis en évidence une excrétion plus précoce et plus importante de la souche de *K. pneumoniae* BLSE implantée lors du traitement par ceftriaxone par rapport à un traitement par céfotaxime. Ce travail chez l'animal a confirmé les observations épidémiologiques humaines émises par plusieurs auteurs ayant constaté un contrôle du taux d'émergence de résistances aux C3G lors de procédures locales visant à remplacer la ceftriaxone par du céfotaxime (131–134).

La première étape de ce projet a été de développer un modèle murin se rapprochant le plus possible de l'humain. Ce modèle reste finalement la principale limite de ce travail. En effet, la métabolisation des médicaments utilisés est variable d'une espèce à l'autre. Les techniques de pharmacocinétique « humanisée » étaient peu utilisables dans notre modèle car la souris est un animal trop petit pour bénéficier d'un cathéter veineux permanent pour une perfusion continue de cinq jours d'antibiothérapie. Une seconde solution aurait été de rendre les animaux insuffisants rénaux afin de ralentir l'élimination accélérée des traitements chez la souris. Cependant les modèles murins validés impliquent le plus souvent l'usage d'antibiotiques néphrotoxiques tels que les aminosides à fortes doses ce qui aurait représenté un biais considérable dans notre étude. Enfin, l'emploi d'animaux tels que le rat ou lapin n'a pas été envisagé pour des raisons logistiques. Avec du recul, l'utilisation de ces antibiotiques *per os*, dans l'eau de boisson, apparaît comme une idée intéressante et sera testée lors de travaux futurs. Malgré ces limites, la concentration fécale de ceftriaxone chez nos souris était proche de celle retrouvée chez l'Homme (135,136).

Ces travaux ont démontré que dix jours après l'arrêt de l'administration du traitement, le microbiote intestinal murin était toujours soumis à une pression de sélection exercée par la présence de la C3G au niveau fécal. Ces résultats confirment ceux de Grall *et al.* qui retrouvaient une excrétion digestive de céfotaxime dans des proportions non négligeables et testaient par ailleurs l'intérêt d'un charbon chélateur de C3G au niveau digestif dans la prévention de l'émergence de *K. pneumoniae* porteuses d'une céphalosporinase dérégulée (137).

Notre modèle murin permet de remettre en partie en cause l'argument purement pharmacocinétique de l'élimination principalement urinaire du céfotaxime opposée à une élimination mixte urinaire et biliaire de la ceftriaxone pour expliquer les différences observées. On observe en effet des expositions fécales à ces molécules assez similaires au cours du temps dans les conditions de notre modèle.

A l'image des inhibiteurs directs des bêta-lactamases tels que le clavulanate ou le tazobactam, le désacetyl-céfotaxime présente une activité antibiotique moindre sur les entérobactéries mais pourrait agir par compétition au site enzymatique comme substrat suicide pour l'enzyme CTX-M9 de la bactérie et permettre ainsi le maintien de concentrations suffisantes de céfotaxime non métabolisé avec un effet direct antibactérien. Ceci limiterait leur capacité de colonisation du tube digestif et donc leur excrétion et la contagiosité des patients. Cette hypothèse avait été testée dans des travaux anciens (138) qui retrouvaient une affinité plus faible de l'enzyme pour le désacetyl-céfotaxime mais une plus grande stabilité de cette molécule par rapport au céfotaxime. Cette étude ne prenait en compte que des céphalosporinases et non pas des BLSE (découvertes en 1986) et parmi les souches testées, aucune n'était une *K. pneumoniae*. Aussi cette hypothèse reste à étudier dans de futurs travaux.

L'analyse du microbiote dans les deux groupes a pu démontrer des différences de communautés microbiennes qui expliquent la sélection d'entérobactéries productrices de BLSE par la ceftriaxone. Cependant, le céfotaxime semble sélectionner plus d'entérocoques qui sont également une menace croissante avec l'émergence de mutants résistants à la vancomycine.

Au cours d'un travail complémentaire (qui sera peut-être demandé par des *reviewers*), il serait intéressant de réaliser des greffes fécales, sur des animaux rendus axéniques par des cocktails d'antibiotiques, à l'aide de fèces de souris traitées soit par ceftriaxone (PC1 et PC2

élevées) soit par céfotaxime (plus grande dispersion de PC1 et PC2) et de tenter de les coloniser par *K. pneumoniae* productrices de BLSE sans utiliser d'antibiotique directement sur ces animaux. Une seconde expérience consisterait à greffer des consortiums bactériens identifiés comme protecteur dans notre travail et de vérifier leur capacité à limiter la colonisation. Ces résultats confirmeraient l'implication de la composition du microbiote, appelée communauté microbienne, sur l'effet barrière, limitant ainsi la colonisation par des germes multirésistants et potentiellement pathogènes.

Dans ce travail, l'association entre les concentrations de ceftriaxone au niveau fécal et les modifications impactant le microbiote digestif a été démontrée. Il serait important et innovant d'associer les 2 méthodologies utilisées dans le manuscrit dans le cadre d'un projet clinique. Ce type de projet associant de la modélisation en pharmacocinétique de population à l'analyse de métagénomique (étude PK-MG) n'aurait un véritable intérêt que dans une population de patients traités et non pas sur du modèle animal ou chez le sujet sain.

L'ensemble des résultats obtenus sera à confronter avec les données issues de l'étude CEREMI, menée à l'AP-HP, qui vise à évaluer cette même hypothèse chez des patients traités par ceftriaxone et céfotaxime. Une sous-étude comprenant la mesure des concentrations fécales des deux antibiotiques chez l'Homme serait intéressante pour confirmer nos travaux. Ces données sont essentielles pour faire évoluer les futures recommandations en antibiothérapie en permettant une hiérarchisation des céphalosporines en fonction de leur impact environnemental et de leur potentiel épidémique.

Les trois volets de cette thèse s'inscrivent dans la dynamique actuelle de personnalisation des thérapeutiques médicamenteuses au profil de chaque patient. Dans le cadre de l'antibiothérapie, cette personnalisation tient compte de l'individu traité et de ses caractéristiques physiologiques, qui impactent notamment la pharmacocinétique, mais également de la molécule utilisée ainsi que de la cible pharmacodynamique et toxicodynamique.

6. Perspectives

Ce travail de thèse a permis d'assimiler et de maîtriser des éléments de méthodologie et de développer des collaborations scientifiques dans le cadre des deux thématiques abordées dans le manuscrit: la modélisation en pharmacocinétique de population dans le domaine de l'antibiothérapie et la recherche des modifications métagénomiques entraînées par ces médicaments sur des modèles animaux. Plusieurs projets dans la continuité de ce travail sont par ailleurs programmés.

Dans domaine de la modélisation en pharmacocinétique de population, les perspectives majeures concernent le développement de nouveaux modèles permettant de décrire les caractéristiques pharmacocinétiques des bêta-lactamines dans différentes populations d'intérêt au CHU de Nantes (patients greffés du bloc cœur/poumon, brûlés, mucoviscidosiques, traumatisés cérébraux, endocardites...). L'objectif à terme est de pouvoir proposer une adaptation de la posologie au moment de l'initiation de ces traitements mais également une adaptation bayésienne systématiquement associée au suivi thérapeutique pharmacologique de routine et permettant de s'adapter très rapidement aux modifications physiologiques brutales observées chez ces patients (*e.g.* fluctuation du DFG). La création d'une "clinique des données" (Professeurs Gourraud, Rozé et Moret) sur le CHU de Nantes permet maintenant de disposer d'un outil performant pour exploiter les données des patients hospitalisés et de construire des études basées sur des données rétrospectives. Un second objectif consistera à évaluer la pertinence de l'utilisation de ces outils sur le plan de l'atteinte des cibles pharmacologiques mais surtout sur le plan de l'amélioration de l'efficacité clinique et de la diminution des effets indésirables dépendants des concentrations plasmatiques.

Concernant le domaine de l'expérimentation animale, le travail présenté dans le troisième et dernier volet de ce manuscrit va être poursuivi par l'encadrement d'une thèse d'université (Ronan Bellouard) portant sur l'étude de l'impact de la ceftriaxone sur les fonctions de la barrière épithéliale intestinale dans des conditions de stress physiologiques (analogie faite aux patients hospitalisés en unité de réanimation). L'objectif de ce travail sera de déterminer quels sont les facteurs qui permettent à une bactérie colonisant l'appareil digestif de transloquer au travers de la barrière digestive et d'infecter un organe filtre tel que les poumons ou les reins. Ce projet a déjà fait l'objet d'une acceptation de dossier APAFIS

auprès du Ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation et les premières expérimentations ont déjà été réalisées depuis le début de l'année 2018.

La pérennité de l'ensemble de ces travaux a pour objectif d'être assurée *via* une candidature à un poste de Maître de conférence des universités – Praticien hospitalier (section CNU: 4803) à partir du mois de septembre 2019.

7. Références de la thèse

1. Fleming A. On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol*. 1929;10:226–36.
2. Chain E, Florey HW, Gardner AD, Heatley NG, Jennings MA, Orr-Ewing J, *et al.* Penicillin as a chemotherapeutic agent. *The Lancet*. 1940;236:226–8.
3. Versporten A, Zarb P, Caniaux I, Gros M-F, Drapier N, Miller M, *et al.* Antimicrobial consumption and resistance in adult hospital inpatients in 53 countries: results of an internet-based global point prevalence survey. *Lancet Glob Health*. 2018;6:619–29.
4. Shockman GD, Barrett JF. Structure, function, and assembly of cell walls of gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 1983;37:501–27.
5. Costerton JW, Ingram JM, Cheng KJ. Structure and function of the cell envelope of gram-negative bacteria. *Bacteriol Rev*. 1974;38:87–110.
6. Waxman DJ, Strominger JL. Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of beta-lactam antibiotics. *Annu Rev Biochem*. 1983;52:825–69.
7. Yoshimura F, Nikaido H. Diffusion of beta-lactam antibiotics through the porin channels of *Escherichia coli* K-12. *Antimicrob Agents Chemother*. 1985;27:84–92.
8. Bo G. Giuseppe Brotzu and the discovery of cephalosporins. *Clin Microbiol Infect*. 2000;6:6–9.
9. Newton GG, Abraham EP. Cephalosporin C, a new antibiotic containing sulphur and D-alpha-aminoadipic acid. *Nature*. 1955;175:548.
10. Loder B, Newton GGF, Abraham EP. The cephalosporin C nucleus (7-aminocephalosporanic acid) and some of its derivatives. *Biochem J*. 1961;79:408–16.
11. Ueo H, Motohashi H, Katsura T, Inui K. Human organic anion transporter hOAT3 is a potent transporter of cephalosporin antibiotics, in comparison with hOAT1. *Biochem Pharmacol*. 2005;70:1104–13.
12. Burckhardt G. Drug transport by Organic Anion Transporters (OATs). *Pharmacol Ther*. 2012;136:106–30.
13. Kato Y, Takahara S, Kato S, Kubo Y, Sai Y, Tamai I, *et al.* Involvement of multidrug resistance-associated protein 2 (Abcc2) in molecular weight-dependent biliary excretion of beta-lactam antibiotics. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem*. 2008;36:1088–96.
14. Tran HX, Herrington JD. Effect of ceftriaxone and cefepime on high-dose methotrexate clearance. *J Oncol Pharm Pract*. 2016;22:801–5.
15. Dailly E, Verdier M-C, Deslandes G, Bouquié R, Tribut O, Bentué-Ferrer D. [Level of evidence for therapeutic drug monitoring of ceftriaxone]. *Thérapie*. 2012;67:145–9.
16. Sime FB, Udy AA, Roberts JA. Augmented renal clearance in critically ill patients: etiology, definition and implications for beta-lactam dose optimization. *Curr Opin Pharmacol*. 2015;24:1–6.

17. KDIGO. 2012.
http://www.kdigo.org/clinical_practice_guidelines/pdf/CKD/KDIGO_2012_CKD_GL.pdf
18. Evaluation du débit de filtration glomérulaire et du dosage de la créatininémie dans le diagnostic de la maladie rénale chronique chez l'adulte. https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2012-10/evaluation_du_debit_de_filtration_glomerulaire_et_du_dosage_de_la_creatininemie_dans_le_diagnostic_de_la_maladie_renale_chronique_chez_ladulte_-_fiche_buts.pdf
19. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF, Feldman HI, *et al.* A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med.* 2009;150:604–12.
20. Hoste EAJ, Bagshaw SM, Bellomo R, Cely CM, Colman R, Cruz DN, *et al.* Epidemiology of acute kidney injury in critically ill patients: the multinational AKI-EPI study. *Intensive Care Med.* 2015;41:1411–23.
21. Sutter R, Rüegg S, Tschudin-Sutter S. Seizures as adverse events of antibiotic drugs: A systematic review. *Neurology.* 2015;85:1332–41.
22. Amakhin DV, Soboleva EB, Zaitsev AV. Cephalosporin antibiotics are weak blockers of GABA_A receptor-mediated synaptic transmission in rat brain slices. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;499:868–74.
23. De Sarro A, Ammendola D, Zappala M, Grasso S, De Sarro GB. Relationship between structure and convulsant properties of some beta-lactam antibiotics following intracerebroventricular microinjection in rats. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:232–7.
24. Moore TD, Bechtel TP, Ayers LW. Effect of multidose therapy on cerebrospinal fluid penetration of cefazolin. *Am J Hosp Pharm.* 1981;38:1496–9.
25. Lamoth F, Buclin T, Pascual A, Vora S, Bolay S, Decosterd LA, *et al.* High cefepime plasma concentrations and neurological toxicity in febrile neutropenic patients with mild impairment of renal function. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:4360–7.
26. Huwyler T, Lenggenhager L, Abbas M, Ing Lorenzini K, Hughes S, Huttner B, *et al.* Cefepime plasma concentrations and clinical toxicity: a retrospective cohort study. *Clin Microbiol Infect.* 2017;23:454–9.
27. Le Turnier P, Navas D, Dalichampt M, Dailly E, Garot D, Guimard T, *et al.* Is there a concentration threshold for ceftriaxone toxicity? Preliminary results of “High-Dose Ceftriaxone in Central Nervous System Infections”, a prospective multicenter cohort study. Poster presentation presented at: 27th. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; 2017; Vienna, Autriche.
28. Vinsonneau C, Allain-Launay E, Blayau C, Darmon M, Ducheyron D, Gaillot T, *et al.* Renal replacement therapy in adult and pediatric intensive care: Recommendations by an expert panel from the French Intensive Care Society (SRLF) with the French Society of Anesthesia Intensive Care (SFAR) French Group for Pediatric Intensive Care Emergencies (GFRUP) the French Dialysis Society (SFD). *Ann Intensive Care.* 2015;5:58.
29. Grégoire M, Lavainne F, Deslandes G, Boutoille D, Talarmin J-P, Bouquie R, *et al.* Use of cefazolin for the treatment of hemodialysis-dependent patients suffering from hemodialysis-access infections with methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. Poster

presentation presented at: IATDMCT European Conference; 2014; Prague, République Tchèque.

30. Vossen MG, Thalhammer F. Effects of renal replacement therapy on antimicrobial therapy. *Curr Clin Pharmacol*. 2013;8:39–45.

31. Udy AA, Roberts JA, Lipman J. Implications of augmented renal clearance in critically ill patients. *Nat Rev Nephrol*. 2011;7:539–43.

32. Thomas DM, Coles GA, Williams JD. What does the renal reserve mean? *Kidney Int*. 1994;45:411–6.

33. Woksepp H, Hällgren A, Borgström S, Kullberg F, Wimmerstedt A, Oscarsson A, *et al*. High target attainment for β -lactam antibiotics in intensive care unit patients when actual minimum inhibitory concentrations are applied. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;36:553–63.

34. Udy AA, Dulhunty JM, Roberts JA, Davis JS, Webb SAR, Bellomo R, *et al*. Association between augmented renal clearance and clinical outcomes in patients receiving β -lactam antibiotic therapy by continuous or intermittent infusion: a nested cohort study of the BLING-II randomised, placebo-controlled, clinical trial. *Int J Antimicrob Agents*. 2017;49:624–30.

35. Huttner A, Von Dach E, Renzoni A, Huttner BD, Affaticati M, Pagani L, *et al*. Augmented renal clearance, low β -lactam concentrations and clinical outcomes in the critically ill: an observational prospective cohort study. *Int J Antimicrob Agents*. 2015;45:385–92.

36. Karagiannidis C, Brodie D, Strassmann S, Stoelben E, Philipp A, Bein T, *et al*. Extracorporeal membrane oxygenation: evolving epidemiology and mortality. *Intensive Care Med*. 2016;42:889–96.

37. Peek GJ, Mugford M, Tiruvoipati R, Wilson A, Allen E, Thalanany MM, *et al*. Efficacy and economic assessment of conventional ventilatory support versus extracorporeal membrane oxygenation for severe adult respiratory failure (CESAR): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet*. 2009;374:1351–63.

38. Thiele H, Zeymer U, Neumann F-J, Ferenc M, Olbrich H-G, Hausleiter J, *et al*. Intra-aortic balloon counterpulsation in acute myocardial infarction complicated by cardiogenic shock (IABP-SHOCK II): final 12 month results of a randomised, open-label trial. *Lancet*. 2013;382:1638–45.

39. Hahn J, Choi JH, Chang MJ. Pharmacokinetic changes of antibiotic, antiviral, antituberculosis and antifungal agents during extracorporeal membrane oxygenation in critically ill adult patients. *J Clin Pharm Ther*. 2017;42:661–71.

40. Biffi S, Di Bella S, Scaravilli V, Peri AM, Grasselli G, Alagna L, *et al*. Infections during extracorporeal membrane oxygenation: epidemiology, risk factors, pathogenesis and prevention. *Int J Antimicrob Agents*. 2017;50:9–16.

41. Ulldemolins M, Roberts JA, Rello J, Paterson DL, Lipman J. The effects of hypoalbuminaemia on optimizing antibacterial dosing in critically ill patients. *Clin Pharmacokinet*. 2011;50:99–110.

42. Wong G, Briscoe S, Adnan S, McWhinney B, Ungerer J, Lipman J, *et al.* Protein binding of β -lactam antibiotics in critically ill patients: can we successfully predict unbound concentrations? *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57:6165–70.
43. Zeitlinger MA, Derendorf H, Mouton JW, Cars O, Craig WA, Andes D, *et al.* Protein binding: do we ever learn? *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:3067–74.
44. Varatharaj A, Galea I. The blood-brain barrier in systemic inflammation. *Brain Behav Immun.* 2017;60:1–12.
45. Nau R, Prange HW, Muth P, Mahr G, Menck S, Kolenda H, *et al.* Passage of cefotaxime and ceftriaxone into cerebrospinal fluid of patients with uninflamed meninges. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37:1518–24.
46. Latif R, Dajani AS. Ceftriaxone diffusion into cerebrospinal fluid of children with meningitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1983;23:46–8.
47. Zeller V, Durand F, Kitzis M-D, Lhotellier L, Ziza J-M, Mamoudy P, *et al.* Continuous cefazolin infusion to treat bone and joint infections: clinical efficacy, feasibility, safety, and serum and bone concentrations. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:883–7.
48. Sirinavin S, Chiemchanya S, Visudhipan P, Lolekha S. Cefuroxime treatment of bacterial meningitis in infants and children. *Antimicrob Agents Chemother.* 1984;25:273–5.
49. Dellamonica P. Cefuroxime axetil. *Int J Antimicrob Agents.* 1994;4:23–36.
50. Boselli E, Allaouchiche B. [Diffusion in bone tissue of antibiotics]. *Presse Medicale.* 1999;28:2265–76.
51. Lodise TP, Rhoney DH, Tam VH, McKinnon PS, Drusano GL. Pharmacodynamic profiling of cefepime in plasma and cerebrospinal fluid of hospitalized patients with external ventriculostomies. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006;54:223–30.
52. Boselli E, Breilh D, Duflo F, Saux M-C, Debon R, Chassard D, *et al.* Steady-state plasma and intrapulmonary concentrations of cefepime administered in continuous infusion in critically ill patients with severe nosocomial pneumonia. *Crit Care Med.* 2003;31:2102–6.
53. Breilh D, Saux MC, Delaisement C, Fratta A, Ducint D, Velly JF, *et al.* Pharmacokinetic Population Study to Describe Cefepime Lung Concentrations. *Pulm Pharmacol Ther.* 2001;14:69–74.
54. Breilh D, Boselli E, Bel JC, Chassard D, Saux MC, Allaouchiche B. Diffusion of cefepime into cancellous and cortical bone tissue. *J Chemother.* 2003;15:134–8.
55. Fick RB, Alexander MR, Prince RA, Kasik JE. Penetration of cefotaxime into respiratory secretions. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987;31:815–7.
56. Lodise TP, Nau R, Kinzig M, Drusano GL, Jones RN, Sörgel F. Pharmacodynamics of ceftazidime and meropenem in cerebrospinal fluid: results of population pharmacokinetic modelling and Monte Carlo simulation. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60:1038–44.
57. Nau R, Prange HW, Kinzig M, Frank A, Dressel A, Scholz P, *et al.* Cerebrospinal fluid ceftazidime kinetics in patients with external ventriculostomies. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996 Mar;40(3):763–6.

58. Boselli E, Breilh D, Rimmelé T, Poupelin J-C, Saux M-C, Chassard D, *et al.* Plasma and lung concentrations of ceftazidime administered in continuous infusion to critically ill patients with severe nosocomial pneumonia. *Intensive Care Med.* 2004;30:989–91.
59. Berkhout J, Melchers MJ, van Mil AC, Seyedmousavi S, Lagarde CM, Nichols WW, *et al.* Pharmacokinetics and penetration of ceftazidime and avibactam into epithelial lining fluid in thigh- and lung-infected mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59:2299–304.
60. McColm AA, Ryan DM. Comparative pharmacokinetics of ceftazidime in fibrin clots and cardiac vegetations in rabbits with *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985;27:925–7.
61. Martin C, Ragni J, Lokiec F, Guillen JC, Auge A, Pecking M, *et al.* Pharmacokinetics and tissue penetration of a single dose of ceftriaxone (1,000 milligrams intravenously) for antibiotic prophylaxis in thoracic surgery. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992 12;36:2804–7.
62. Gergs U, Clauss T, Ihlefeld D, Weiss M, Pönicke K, Hofmann GO, *et al.* Pharmacokinetics of ceftriaxone in plasma and bone of patients undergoing hip or knee surgery. *J Pharm Pharmacol.* 2014;66:1552–8.
63. Crémieux AC, Mazière B, Vallois JM, Ottaviani M, Bouvet A, Pocard JJ, *et al.* Ceftriaxone diffusion into cardiac fibrin vegetation. Qualitative and quantitative evaluation by autoradiography. *Fundam Clin Pharmacol.* 1991;5:53–60.
64. van de Beek D, Cabellos C, Dzupova O, Esposito S, Klein M, Kloek AT, *et al.* ESCMID guideline: diagnosis and treatment of acute bacterial meningitis. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22:37-62.
65. Tunkel AR, Hartman BJ, Kaplan SL, Kaufman BA, Roos KL, Scheld WM, *et al.* Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. *Clin Infect Dis.* 2004;39:1267–84.
66. Société de pathologie infectieuse de langue française. [17th Consensus conference. Consensus conference on bacterial meningitis. Short text]. *Med Mal Infect.* 2009;39:175–86.
67. Landersdorfer CB, Bulitta JB, Kinzig M, Holzgrabe U, Sörgel F. Penetration of antibacterials into bone: pharmacokinetic, pharmacodynamic and bioanalytical considerations. *Clin Pharmacokinet.* 2009;48:89–124.
68. Joly V, Pangon B, Vallois JM, Abel L, Brion N, Bure A, *et al.* Value of antibiotic levels in serum and cardiac vegetations for predicting antibacterial effect of ceftriaxone in experimental *Escherichia coli* endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987;31:1632–9.
69. EUCAST: Clinical breakpoints [Internet]. [cited 2017 Feb 13]. Available from: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
70. Van Boeckel TP, Gandra S, Ashok A, Caudron Q, Grenfell BT, Levin SA, *et al.* Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *Lancet Infect Dis.* 2014;14:742–50.
71. Ramirez MS, Traglia GM, Lin DL, Tran T, Tolmasky ME. Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance and Virulence in Gram-negatives: the *Klebsiella pneumoniae* Paradigm. *Microbiol Spectr.* 2014;2:1–15.

72. Hennequin C, Robin F. Correlation between antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016;35:333–41.
73. Nelson K, Hemarajata P, Sun D, Rubio-Aparicio D, Tsivkovski R, Yang S, *et al*. Resistance to Ceftazidime-Avibactam Is Due to Transposition of KPC in a Porin-Deficient Strain of *Klebsiella pneumoniae* with Increased Efflux Activity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61.
74. Poole K. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect*. 2004;10:12–26.
75. Jevons MP. “Celbenin” - resistant Staphylococci. *Br Med J*. 1961;1:124–5.
76. Abraham EP, Chain E. An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin. *Nature*. 1940;146:837.
77. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1980;289:321–31.
78. Adamski CJ, Cardenas AM, Brown NG, Horton LB, Sankaran B, Prasad BVV, *et al*. Molecular Basis for the Catalytic Specificity of the CTX-M Extended-Spectrum β -Lactamases. *Biochemistry*. 2015;54:447–57.
79. Matsumoto Y, Ikeda F, Kamimura T, Yokota Y, Mine Y. Novel plasmid-mediated beta-lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*. 1988;32:1243–6.
80. Humeniuk C, Arlet G, Gautier V, Grimont P, Labia R, Philippon A. Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:3045–9.
81. Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, *et al*. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18:268–81.
82. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, *et al*. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009;48:1–12.
83. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol*. 2016;14:e1002533.
84. Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 2005;307:1915–20.
85. Lynch SV, Pedersen O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *N Engl J Med*. 2016;375:2369–79.
86. Sommer F, Bäckhed F. The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11:227–38.
87. Donskey CJ. The role of the intestinal tract as a reservoir and source for transmission of nosocomial pathogens. *Clin Infect Dis*. 2004;39:219–26.

88. de Lastours V, Fantin B. Impact of fluoroquinolones on human microbiota. Focus on the emergence of antibiotic resistance. *Future Microbiol.* 2015;10:1241–55.
89. Blaser MJ. Antibiotic use and its consequences for the normal microbiome. *Science.* 2016;352:544–5.
90. Tulstrup MV-L, Christensen EG, Carvalho V, Linnige C, Ahrné S, Højberg O, *et al.* Antibiotic Treatment Affects Intestinal Permeability and Gut Microbial Composition in Wistar Rats Dependent on Antibiotic Class. *PloS One.* 2015;10:e0144854.
91. Holman DB, Chénier MR. Antimicrobial use in swine production and its effect on the swine gut microbiota and antimicrobial resistance. *Can J Microbiol.* 2015;61:785–98.
92. Korpela K, Salonen A, Virta LJ, Kekkonen RA, Forslund K, Bork P, *et al.* Intestinal microbiome is related to lifetime antibiotic use in Finnish pre-school children. *Nat Commun.* 2016;7:10410.
93. Jacobs A, Taccone FS, Roberts JA, Jacobs F, Cotton F, Wolff F, *et al.* β -Lactam Dosage Regimens in Septic Patients with Augmented Renal Clearance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(9).
94. Roberts JA, Ulldemolins M, Roberts MS, McWhinney B, Ungerer J, Paterson DL, *et al.* Therapeutic drug monitoring of beta-lactams in critically ill patients: proof of concept. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;36:332–9.
95. Vincent J-L, Bassetti M, François B, Karam G, Chastre J, Torres A, *et al.* Advances in antibiotic therapy in the critically ill. *Crit Care.* 2016;20:133.
96. Carlier M, Stove V, Wallis SC, De Waele JJ, Verstraete AG, Lipman J, *et al.* Assays for therapeutic drug monitoring of β -lactam antibiotics: A structured review. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;46:367–75.
97. Legrand T, Vodovar D, Tournier N, Khoudour N, Hulin A. Simultaneous Determination of Eight β -Lactam Antibiotics, Amoxicillin, Cefazolin, Cefepime, Cefotaxime, Ceftazidime, Cloxacillin, Oxacillin, and Piperacillin, in Human Plasma by Using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60:4734–42.
98. Wolff F, Deprez G, Seyler L, Taccone F, Hites M, Gulbis B, *et al.* Rapid quantification of six β -lactams to optimize dosage regimens in severely septic patients. *Talanta.* 2013;103:153–60.
99. Verdier M-C, Tribut O, Tattevin P, Le Tulzo Y, Michelet C, Bentué-Ferrer D. Simultaneous determination of 12 beta-lactam antibiotics in human plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection: application to therapeutic drug monitoring. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:4873–9.
100. Dailly E, Bouquié R, Deslandes G, Jolliet P, Le Floch R. A liquid chromatography assay for a quantification of doripenem, ertapenem, imipenem, meropenem concentrations in human plasma: application to a clinical pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2011;879:1137–42.

101. McWhinney BC, Wallis SC, Hillister T, Roberts JA, Lipman J, Ungerer JPJ. Analysis of 12 beta-lactam antibiotics in human plasma by HPLC with ultraviolet detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2010;878:2039–43.
102. Denooz R, Charlier C. Simultaneous determination of five beta-lactam antibiotics (cefepim, ceftazidim, cefuroxim, meropenem and piperacillin) in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2008;864:161–7.
103. Grégoire M, Leroy AG, Bouquié R, Malandain D, Dailly E, Boutoille D, *et al.* Simultaneous determination of ceftaroline, daptomycin, linezolid and rifampicin concentrations in human plasma by on-line solid phase extraction coupled to high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2016;118:17–26.
104. Carlier M, Stove V, De Waele JJ, Verstraete AG. Ultrafast quantification of β -lactam antibiotics in human plasma using UPLC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2015;978–979:89–94.
105. Colin P, De Bock L, T’jollyn H, Boussery K, Van Bocxlaer J. Development and validation of a fast and uniform approach to quantify β -lactam antibiotics in human plasma by solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Talanta.* 2013;103:285–93.
106. Carlier M, Stove V, Roberts JA, Van de Velde E, De Waele JJ, Verstraete AG. Quantification of seven β -lactam antibiotics and two β -lactamase inhibitors in human plasma using a validated UPLC-MS/MS method. *Int J Antimicrob Agents.* 2012;40:416–22.
107. Ohmori T, Suzuki A, Niwa T, Ushikoshi H, Shirai K, Yoshida S, *et al.* Simultaneous determination of eight β -lactam antibiotics in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2011;879:1038–42.
108. Rigo-Bonnin R, Cobo-Sacristán S, Padullés A, Ribera A, Arbiol-Roca A, Murillo Ó, *et al.* Measurement of ceftazidime concentration in human plasma by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Application to critically ill patients and patients with osteoarticular infections. *Biomed Chromatogr BMC.* 2016;30:410–8.
109. Abdulla A, Bahmany S, Wijma RA, van der Nagel BCH, Koch BCP. Simultaneous determination of nine β -lactam antibiotics in human plasma by an ultrafast hydrophilic-interaction chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2017;1060:138–43.
110. Sime FB, Roberts MS, Roberts JA, Robertson TA. Simultaneous determination of seven β -lactam antibiotics in human plasma for therapeutic drug monitoring and pharmacokinetic studies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2014;960:134–44.
111. Roberts JA, Paul SK, Akova M, Bassetti M, De Waele JJ, Dimopoulos G, *et al.* DALI: defining antibiotic levels in intensive care unit patients: are current β -lactam antibiotic doses sufficient for critically ill patients? *Clin Infect Dis.* 2014;58:1072–83.
112. Mouton JW, Punt N, Vinks AA. Concentration-effect relationship of ceftazidime explains why the time above the MIC is 40 percent for a static effect in vivo. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:3449–51.

113. Mouton JW, Muller AE, Canton R, Giske CG, Kahlmeter G, Turnidge J. MIC-based dose adjustment: facts and fables. *J Antimicrob Chemother.* 2017;
114. Goessens WHF, Mouton JW, ten Kate MT, Bijl AJ, Ott A, Bakker-Woudenberg I a. JM. Role of ceftazidime dose regimen on the selection of resistant *Enterobacter cloacae* in the intestinal flora of rats treated for an experimental pulmonary infection. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59:507–16.
115. Manduru M, Mihm LB, White RL, Friedrich LV, Flume PA, Bosso JA. In vitro pharmacodynamics of ceftazidime against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41:2053–6.
116. Beumier M, Casu GS, Hites M, Wolff F, Cotton F, Vincent JL, *et al.* Elevated β -lactam concentrations associated with neurological deterioration in ICU septic patients. *Minerva Anesthesiol.* 2015;81:497–506.
117. Seguin P, Verdier MC, Chanavaz C, Engrand C, Laviolle B, Donnio P-Y, *et al.* Plasma and peritoneal concentration following continuous infusion of cefotaxime in patients with secondary peritonitis. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63:564–7.
118. Aubert G, Carricajo A, Coudrot M, Guyomarc'h S, Auboyer C, Zeni F. Prospective determination of serum ceftazidime concentrations in intensive care units. *Ther Drug Monit.* 2010;32:517–9.
119. Falagas ME, Kompoti M. Obesity and infection. *Lancet Infect Dis.* 2006;6:438–46.
120. Bratzler DW, Dellinger EP, Olsen KM, Perl TM, Auwaerter PG, Bolon MK, *et al.* Clinical practice guidelines for antimicrobial prophylaxis in surgery. *Am J Health Syst Pharm.* 2013;70:195–283.
121. SFAR. Antibioprophylaxie en chirurgie et médecine interventionnelle [Internet]. 2010. Available from: http://sfar.org/wp-content/uploads/2015/10/2_AFAR_Antibioprophylaxie-en-chirurgie-et-medecine-interventionnelle.pdf
122. Pories WJ, van Rij AM, Burlingham BT, Fulghum RS, Meelheim D. Prophylactic cefazolin in gastric bypass surgery. *Surgery.* 1981;90:426–32.
123. Neely MN, van Guilder MG, Yamada WM, Schumitzky A, Jelliffe RW. Accurate detection of outliers and subpopulations with Pmetrics, a nonparametric and parametric pharmacometric modeling and simulation package for R. *Ther Drug Monit.* 2012;34:467–76.
124. Brill MJE, Houwink API, Schmidt S, Dongen EPAV, Hazebroek EJ, Ramshorst B van, *et al.* Reduced subcutaneous tissue distribution of cefazolin in morbidly obese versus non-obese patients determined using clinical microdialysis. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69:715–23.
125. Wurtz R, Itokazu G, Rodvold K. Antimicrobial dosing in obese patients. *Clin Infect Dis.* 1997;25:112–8.
126. Hussain Z, Curtain C, Mirkazemi C, Gadd K, Peterson GM, Zaidi STR. Prophylactic Cefazolin Dosing and Surgical Site Infections: Does the Dose Matter in Obese Patients? *Obes Surg.* 2018 29;

127. Inoue Y, Doi Y, Arisato T, Sugioka S, Koga K, Nishioka K, *et al.* Three Cases of Hemodialysis Patients Receiving High-Dose Ceftriaxone: Serum Concentrations and Its Neurotoxicity. *Kidney Int Rep.* 2017;2:984–7.
128. Hagiya H, Miyawaki K, Yamamoto N, Yoshida H, Kitagawa A, Asaoka T, *et al.* Ceftriaxone-induced Neurotoxicity in a Patient after Pancreas-Kidney Transplantation. *Intern Med.* 2017;56:3103–7.
129. Froissart M, Rossert J, Jacquot C, Paillard M, Houillier P. Predictive performance of the modification of diet in renal disease and Cockcroft-Gault equations for estimating renal function. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16:763–73.
130. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med.* 1999;130:461–70.
131. Muller A. Relationship between ceftriaxone use and resistance to third-generation cephalosporins among clinical strains of *Enterobacter cloacae*. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54:173–7.
132. Gbaguidi-Haore H, Dumartin C, L’Heriteau F, Pefau M, Hocquet D, Rogues A-M, *et al.* Antibiotics involved in the occurrence of antibiotic-resistant bacteria: a nationwide multilevel study suggests differences within antibiotic classes. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68:461–70.
133. Grohs P, Kerneis S, Sabatier B, Lavollay M, Carbonnelle E, Rostane H, *et al.* Fighting the spread of AmpC-hyperproducing *Enterobacteriaceae*: beneficial effect of replacing ceftriaxone with cefotaxime. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69:786–9.
134. Tan BK, Vivier E, Bouziad KA, Zahar J-R, Pommier C, Parmeland L, *et al.* A hospital-wide intervention replacing ceftriaxone with cefotaxime to reduce rate of healthcare-associated infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in the intensive care unit. *Intensive Care Med.* 2018;44:672–3.
135. Arvidsson A, Leijd B, Nord CE, Angelin B. Interindividual variability in biliary excretion of ceftriaxone: effects on biliary lipid metabolism and on intestinal microflora. *Eur J Clin Invest.* 1988;18:261–6.
136. Léonard F, Andremont A, Leclercq B, Labia R, Tancredi C. Use of beta-lactamase-producing anaerobes to prevent ceftriaxone from degrading intestinal resistance to colonization. *J Infect Dis.* 1989;160:274–80.
137. Grall N, Massias L, Nguyen TT, Sayah-Jeanne S, Ducrot N, Chachaty E, *et al.* Oral DAV131, a Charcoal-Based Adsorbent, Inhibits Intestinal Colonization by β -Lactam-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in Cefotaxime-Treated Mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57:5423–5.
138. Labia R, Morand A, Kazmierczak A. The action of β -lactamases on desacetyl-cefotaxime and cefotaxime. *J Antimicrob Chemother.* 1984;14:45–51.

Annexe I

Title: High-dosage cefazolin achieves sufficient cerebrospinal diffusion to treat an external ventricular drainage-related *Staphylococcus aureus* ventriculitis.

Running title: Cerebrospinal diffusion of high-dose cefazolin

Matthieu Grégoire^{#1,2}, Benjamin Gaborit^{3,4}, Colin Deschanvres³, Raphaël Lecomte³, Guillaume Deslandes¹, Éric Dailly^{1,5}, Xavier Ambrosi⁶, Ronan Bellouard^{1,5}, Nathalie Asseray³, Karim Lakhal⁶, David Boutoille^{3,4}

¹ Clinical Pharmacology Department, CHU Nantes, Nantes, France

² UMR Inserm 1235 The Enteric Nervous System in Gut and Brain Disorders, University of Nantes, France

³ Infectious diseases department, CHU Nantes and CIC 1413, Inserm, France

⁴ EA 3826 Thérapeutiques Cliniques et Expérimentales des Infections, University of Nantes, France

⁵ EE1701 Microbiotas, Hosts, Antibiotics and bacterial Resistances, University of Nantes, France

⁶ Réanimation Chirurgicale Polyvalente, Service d'Anesthésie-Réanimation, hôpital Laënnec, CHU Nantes, Nantes, France

[#] Correspondance to Matthieu Grégoire, Laboratoire de Pharmacologie clinique, Hôtel Dieu, 9 Quai Moncoussu, 44093 Nantes Cedex, France

email : matthieu.gregoire@chu-nantes.fr, Phone : +33 2 40 08 40 12

Keywords: Cefazolin, Pharmacokinetics, Cerebrospinal fluid, Meningitis, Healthcare associated infection

Abstract

A patient received continuous infusion of cefazolin 10 g then 8 g daily for an external ventricular drainage-related methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) ventriculitis.

Median free concentrations in the cerebrospinal fluid were 11.9 mg/L and 6.1 mg/L after a 10-g and an 8-g dosage respectively. Free concentrations in the cerebrospinal fluid were always above MIC usually displayed by MSSA.

These results support the use of high dose cefazolin to achieve sufficient meningeal concentrations.

Introduction

Recent studies showed that cefazolin is at least as effective as oxacillin or nafcillin for the treatment of severe methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) infections (1,2). External ventricular drainage (EVD)-related ventriculitis or meningitis are mostly caused by Gram-positive cocci and particularly *Staphylococci* (3). Owing to the poor diffusion of oxacillin and nafcillin into the meningeal compartment, cefotaxime, fosfomycin and rifampin are currently used in this indication (4). Despite good in vitro activity, the use of cefazolin for MSSA-related meningitis is limited because of its supposed weak meningeal diffusion due to a high level of protein binding (around 85%) associated with a moderate lipophilicity (5). Regarding the antistaphylococcal activity of this first-generation cephalosporin, data about the use of cefazolin in EVD-related ventriculitis or meningitis are required.

We herein describe the unique case of a patient treated by continuous intravenous infusion of cefazolin at high dose (8 to 10 g daily) for an EVD-related MSSA ventriculitis.

Methods

A 42-year old patient, with no medical history, weighting 67 kg, was hospitalized for a subarachnoid hemorrhage requiring an EVD. At Day 7, a neurological impairment led to the diagnosis of ventriculitis: glycorrhachia was <1 mmol/L and cerebrospinal fluid (CSF) lactate was of 8 mmol/L. An empirical combination of intravenous cefotaxime and linezolid was introduced. Two days later, as the CSF grew MSSA, the antimicrobial therapy relied on a continuous intravenous infusion of cefazolin 10 g plus levofloxacin 750 mg daily. The profile of antibiotic susceptibility was determined by Vitek* 2 automated system (bioMerieux, France): minimum inhibitory concentration (MIC) was 0.5 mg/L for oxacillin and 1.5 mg/L for cefotaxime. Moreover, this strain was resistant to cotrimoxazole and rifampin. The CSF collected at the time of the antibiotic switch (i.e., after two days of antimicrobial therapy) was still positive for *Staphylococcus aureus*. Thereafter, a CSF collection was performed every 48 hours until the achievement of sterilization which occurred 48 hours after the initiation of cefazolin. Then, the EVD was changed and was removed 13 days later after a progressive weaning. All the bacteriological cultures performed afterwards remained sterile, until the end of treatment, 6 weeks later. Glomerular filtration rate estimated by Chronic Kidney Disease - Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) progressively increased from 60 mL/min/1.73 m² at cefazolin initiation to 106 mL/min/1.73 m² after 6 weeks.

CSF and blood samples were simultaneously collected from Day 2 after cefazolin initiation to Day 21. Plasma samples were obtained by centrifugation and ultrafiltrates after CSF or plasma centrifugation at 37°C into a Millipore UFC503024 Amicon Ultra-0.5 (Millipore Merck, Cork, Ireland) for 20 minutes at 14,000 x g. Cefazolin concentrations were measured in CSF, plasma and ultrafiltrates by a liquid-chromatography coupled with mass-spectrometry validated assay. The limit of quantitation was 2 mg/L in CSF, plasma and ultrafiltrates. Clinical and biological data were collected during patient hospitalization. Written informed consent was obtained from the patient for this publication.

Results

Median total plasma concentrations at steady state (C_{ss}) were 118 mg/L with the 10-g dose and 66.5 mg/L with the 8-g daily dose (Fig. 1). Patient was switched for a lower dosage because of elevated plasma C_{ss} after a 10-g daily dose. These results are presented in Table 1. Median free fraction was 22 % after a 10-g dosage but only 13% after an 8-g dosage. Conversely, diffusion of the free fraction through the blood brain barrier showed an important intra-individual variability and CSF/plasma free C_{ss} (fC_{ss}) ratio decreased with the dose from 73 % after a 8-g dosage to 54 % after a 10-g dosage. fC_{ss} in CSF were 11.9 mg/L after a 10-g dosage and 6.1 after a 8-g dosage. Cefazolin, as a beta-lactam, displays a time-dependent activity. Hence, its efficacy relies on the percentage of time with a free drug concentration above the MIC of the bacteria (% $fT_{>MIC}$), over a dosing interval. Considering that MSSA strains usually display $MIC \leq 2$ mg/L according to the epidemiological cut-off values of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, the fC_{ss} in CSF was above MIC throughout the treatment, as usually targeted (100% $fT_{>MIC}$) (6).

Discussion

In this case of a patient treated by a continuous infusion of cefazolin for an EVD-related ventriculitis, the targeted fC_{ss} in the CSF above MIC was achieved for MSSA strains which usually display $MIC \leq 2$ mg/L (100% $fT_{>MIC}$), provided that a high dose (at least 8 g per day administered by continuous infusion) was used. During EVD-related ventriculitis and meningitis, the degree of meningeal inflammation is quite variable and is known to have a large impact on antibiotic penetration (7,8). This case highlights the important intra-individual variability of cefazolin plasmatic concentration (particularly free fraction concentration in critically ill patients) and the variability of CSF diffusion in case of infection with inconstant inflammation. In addition, it demonstrates the lack of linearity of the dose-concentration

relationship in the critically ill (9). Two previous studies reported high cefazolin CSF concentrations in patients not treated for meningitis and experiencing neurological adverse events (10,11). Of note, to the best of our knowledge, cefazolin pharmacokinetics in patients treated for meningeal infection has never been reported. Of course, our results need to be confirmed by a larger pharmacokinetics study. Moreover, a specific clinical investigation should address whether a cefazolin-based treatment of MSSA meningitis is suitable, since the success of this approach may depend on the inoculum effect, even if cefazolin meningeal diffusion is sufficient (12).

Conclusion

These preliminary findings support that cefazolin may be an alternative to cefotaxime, fosfomycin or rifampin in EVD-ventriculitis or meningitis. Indeed, its meningeal diffusion appeared to be sufficient. However, in the critically ill, inter- and intra-individual variations in plasma and CSF cefazolin concentrations mandate a close monitoring of these concentrations.

Acknowledgements

Karim Lakhali has no conflict of interest in connection with the work submitted. In addition, KL received, during the past 3 years, lecture fees from MEDTRONIC (once, in 2017), congress registration fees from SANOFI AVENTIS (once in 2018), travel fees from MSD France (once, in 2017), NOVEX PHARMA (once, in 2016) and GILEAD SCIENCES (twice, 2016 and 2017).

Other authors have no conflicts of interest to declare.

References

1. McDanel JS, Roghmann M-C, Perencevich EN, Ohl ME, Goto M, Livorsi DJ, Jones M, Albertson JP, Nair R, O'Shea AMJ, Schweizer ML. 2017. Comparative Effectiveness of Cefazolin Versus Nafcillin or Oxacillin for Treatment of Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Infections Complicated by Bacteremia: A Nationwide Cohort Study. *Clin Infect Dis* 65:100-106.
2. Pollett S, Baxi SM, Rutherford GW, Doernberg SB, Bacchetti P, Chambers HF. 2016. Cefazolin versus Nafcillin for Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infection in a California Tertiary Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother* 60:4684-4689.
3. Korinek A-M, Reina M, Boch AL, Rivera AO, De Bels D, Puybasset L. 2005. Prevention of external ventricular drain--related ventriculitis. *Acta Neurochir (Wien)* 147:39-45.
4. Beer R, Lackner P, Pfausler B, Schmutzhard E. 2008. Nosocomial ventriculitis and meningitis in neurocritical care patients. *J Neurol* 255:1617-1624.
5. Radouane A, Péhourcq F, Tramu G, Creppy EE, Bannwarth B. 1996. Influence of lipophilicity on the diffusion of cephalosporins into the cerebrospinal fluid. *Fundam Clin Pharmacol* 10:309-313.
6. Mouton JW, Muller AE, Canton R, Giske CG, Kahlmeter G, Turnidge J. 2017. MIC-based dose adjustment: facts and fables. *J Antimicrob Chemother* 73:564-568.
7. Varatharaj A, Galea I. 2017. The blood-brain barrier in systemic inflammation. *Brain Behav Immun* 60:1-12.
8. Nau R, Sörgel F, Eiffert H. 2010. Penetration of drugs through the blood-cerebrospinal fluid/blood-brain barrier for treatment of central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev* 23:858-883.
9. Kumta N, Roberts JA, Lipman J, Cotta MO. 2018. Antibiotic Distribution into Cerebrospinal Fluid: Can Dosing Safely Account for Drug and Disease Factors in the Treatment of Ventriculostomy-Associated Infections? *Clin Pharmacokinet* 57:439-454.
10. Moore TD, Bechtel TP, Ayers LW. 1981. Effect of multidose therapy on cerebrospinal fluid penetration of cefazolin. *Am J Hosp Pharm* 38:1496-1499.
11. Bechtel TP, Slaughter RL, Moore TD. 1980. Seizures associated with high cerebrospinal fluid concentrations of cefazolin. *Am J Hosp Pharm* 37:271-273.
12. Saeki M, Shinagawa M, Yakuwa Y, Nirasawa S, Sato Y, Yanagihara N, Takahashi S. 2018. Inoculum effect of high concentrations of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* on the efficacy of cefazolin and other beta-lactams. *J Infect Chemother* 24:212-215.

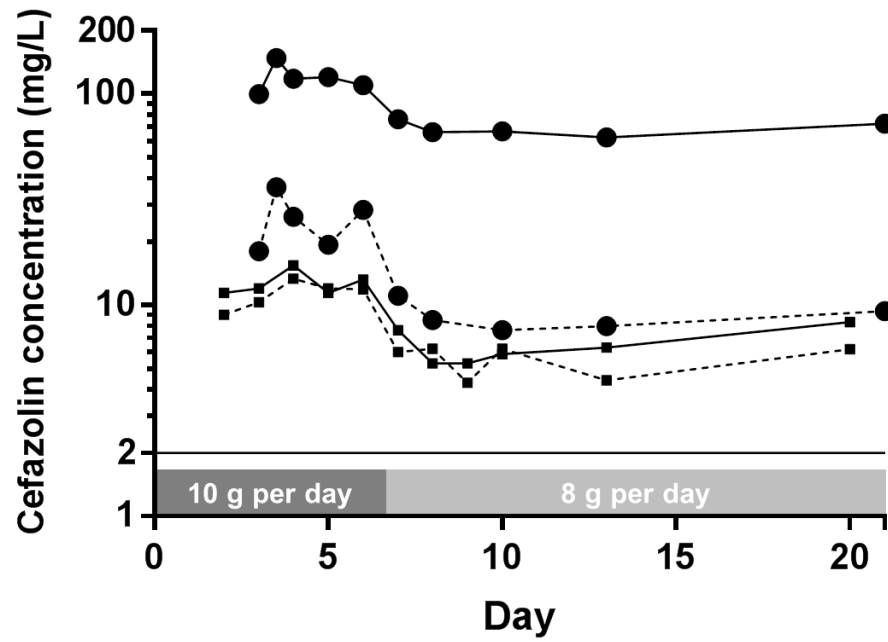


Figure 1. Pharmacokinetic of cefazolin in cerebrospinal fluid (full squares) and in plasma (full circles) after a 10-g dosage followed by a 8-g dosage. Total concentrations are represented in continuous lines and unbound in dotted lines.

Table 1. Cefazolin concentrations in cerebrospinal fluid (CSF) and plasma after 8 g or 10 g per day administered in continuous infusion.

	10 g per day			8 g per day		
	Plasma (n=5)	CSF (n=5)	CSF/plasma ratio (%)	Plasma (n=5)	CSF (n=6)	CSF/plasma ratio (%)
Total concentrations (mg/L)	118 (10)	12 (1.8)	12.0 (0.9)	66.5 (6.6)	6.1 (1.8)	10.0 (1.3)
Free concentrations (mg/L)	26.2 (8.9)	11.9 (1.7)	54.1 (9.97)	8.5 (1.4)	6.1 (1.4)	73.1 (26.3)
Free fraction (%)	22.2 (6.4)	86.4 (4.0)	-	12.9 (0.1)	79.7 (24.3)	-

Results are presented as median (interquartile range).

Annexe II

Cefazolin dosage adaptation in bacteremia and infective endocarditis based on a nomogram: a population pharmacokinetic study

Ronan Bellouard^{1,2}, Colin Deschanvres³, Guillaume Deslandes¹, Éric Dailly^{1,2}, Nathalie Asseray³, Pascale Jolliet^{1,4}, David Boutoille^{3,5}, Benjamin Gaborit^{3,5}, Matthieu Grégoire^{1,6}

¹Clinical Pharmacology Department, University Hospital of Nantes, Nantes, France

²EE1701 Microbiotas, Hosts, Antibiotics and Bacterial Resistances, University of Nantes, France

³Infectious Diseases Department, CHU Nantes and CIC 1413, Inserm, France

⁴UMR Inserm 1246 SPHERE Methods in Patients-centered Outcomes and Health Research, University of Nantes, France

⁵EA 3826 Thérapeutiques Cliniques et Expérimentales des Infections, University of Nantes, France

⁶UMR Inserm 1235 The Enteric Nervous System in Gut and Brain Disorders, University of Nantes, France.

Corresponding author: Ronan Bellouard, Laboratoire de Pharmacologie clinique, Hôtel Dieu, 9 quai Moncoussu, 44093 Nantes Cedex, France. Fax: +33 2 40 08 40 12. E-mail address: ronan.bellouard@chu-nantes.fr.

Synopsis

Background: Optimal dosing of continuous-infusion cefazolin can be challenging in patients treated for bacteremia or infective endocarditis.

Objectives: To describe and analyze the pharmacokinetics of cefazolin administered by continuous infusion in patients treated for bacteremia and/or infective endocarditis using a population pharmacokinetics modelling approach and establish a nomogram to determine the optimal daily dose of cefazolin.

Patients and methods: Population pharmacokinetics were modeled using Pmetrics™. Plasma concentrations were collected retrospectively from patients treated with continuous-infusion cefazolin for bacteremia or infective endocarditis. Influence of multiple parameters was tested, including renal function, total body weight, body mass index, body surface area (BSA), ideal weight, lean body weight, height and age. Probabilities of target attainment for selected target concentrations (40, 60 and 80 mg/L) were calculated. A dosing nomogram was then developed, using absolute value of glomerular filtration rate (aGFR) to determine the optimal daily dose to achieve target concentrations in at least 90 % of patients.

Results: 346 cefazolin plasma concentrations from 162 patients were collected. A one-compartment model best described the dataset. The only covariate was aGFR, calculated according to the CKD-EPI formula and patient's BSA, for the rate of elimination. Using the nomogram, achieving a cefazolin concentration target of 40 mg/L with a success rate of 90 % at least and with an aGFR of 30, 60, 90 and 120 mL/min requires a daily dose of 2.6, 4.6, 6.6 and 8.6 g/day, respectively.

Conclusions: These results confirm the interest of posology adaptation of cefazolin according to aGFR.

Introduction

Staphylococcus aureus and other staphylococcal species are responsible for more than a quarter of bloodstream infections and infective endocarditis.¹ Incidence of these pathologies has increased over the past years and are associated with a high rate of mortality (15 – 25 % of 30-day mortality rate in adults with *S. aureus* bacteremia and 20 – 30 % of in-hospital mortality for adults with *S. aureus* endocarditis).² For methicillin-susceptible strains, treatment with anti-staphylococcal penicillins such as oxacillin or cloxacillin is usually recommended.^{3,4} However, cefazolin appears to be an equally effective alternative for the treatment of *S. aureus* bacteremia.^{5,6} To achieve efficacy, free cefazolin plasma concentration must be 100 % of the time above four times the minimal inhibitory concentration (MIC) of the pathogenic bacteria.⁷

In guidelines, the recommended dosage for intra-venous cefazolin is usually 6,000 mg daily for patients with normal renal function.^{3,4} In France, recommendations are 80 – 100 mg/kg/day administered in 3 doses or by continuous infusion after a loading dose of 30 mg/kg over 1 hour.⁸ For patients with impaired renal function, guidelines do not precise dose adaptation but recommend it. Conversely, when renal clearance is markedly increased, such as in severe sepsis, β -lactam concentrations may be too low with the recommended dosage.⁹ A priori dose adaptation according to the renal function seems to be necessary to anticipate the risk of under or overdosing.

The aim of this study was to describe and analyze the pharmacokinetics of cefazolin administered by continuous infusion in patients treated for bacteremia and/or infective endocarditis using a population pharmacokinetics modelling approach. We sought then to establish a dosing nomogram to determine the optimal daily dose of cefazolin to be administered based on the clinical and biological characteristics of the patient.

Patients and methods

Patient population and data collection

Cefazolin concentration data were collected retrospectively from adult patients hospitalized in Nantes University Hospital and treated by cefazolin administered by continuous infusion for bacteremia or infective endocarditis from January 2013 to January 2018 and followed by therapeutic drug monitoring (TDM). Patients who received any type of dialysis during treatment were excluded.

For model validation, an external dataset with the same criteria was established from patients hospitalized between January 2018 and September 2018.

For each patient, dosage, duration of treatment, age, height, weight and serum creatinine were collected. Patients with missing data were excluded. Multiple parameters were calculated: body mass index (BMI), body surface area (BSA) according to the Du Bois formula¹⁰, lean body weight (LBW) according to the Devine formula¹¹, ideal weight (IWR) according to the Robinson¹² formula, estimated glomerular filtration rate indexed by BSA (eGFR) according to the CKD-EPI formula¹³ and absolute value of glomerular filtration rate (aGFR), calculated from the patient's eGFR and BSA.

To compare the characteristics of the two datasets, Fisher's exact test and Mann-Whitney-Wilcoxon test were performed using GraphPad Prism version 6.01 for Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com).

Study design was approved by the local human research and ethics committee of Nantes on 23 April 2018 and was in accordance with French legislation (CNIL MR003).

Cefazolin quantitation

Total cefazolin plasma concentrations were determined by a validated high-performance liquid chromatography coupled with ultraviolet spectrometry (HPLC-UV) assay. Blood samples were collected in EDTA tubes and centrifuged (1500 g for 10 min at 4 °C) at reception at the laboratory. Plasma was retrieved and mixed with 1 mL of acetonitrile for protein precipitation. The mixture was then centrifuged (1800 g for 5 min at 4 °C) and 1.6 mL of the supernatant layer was mixed with 8 mL of dichloromethane for extraction. The tubes were shaken horizontally for 10 min and centrifuged (1800 g for 5 min at 4 °C). Fifty microliters of the upper aqueous layer were injected into the HPLC system (Agilent 1200 Series, Agilent, Palo Alto, CA). The separation was performed on a Symmetry C18, 5- μ m column (250 \times 4.6 mm inner diameter) (Waters, Milford, MA). The ultraviolet absorbance peak for cefazolin was detected at 265 nm.

Lower limit of quantitation (LLOQ) of the method was 3 mg/L. Accuracy was satisfactory with intra-day and inter-day coefficient of variations lesser than 15 % (20 % for the LLOQ). Imprecision was also inferior to 15 % (20 % for the LLOQ).

Population pharmacokinetics analysis

Structural model

The first dataset was used to establish the structural model. Population pharmacokinetics modelling was performed using the Non Parametric Adaptive Grid algorithm with the Pmetrics™ package for R (version 1.5.1).^{14,15}

One-compartment and two-compartment (central and peripheral) models were initially tested without covariates to determine the best fitting structural model and to estimate the parameters.

Goodness of fit was evaluated based on the Akaike Information Criterion (AIC), which is an estimation of the likelihood of the model penalized by the number of parameters in the model.¹⁶ A lower value of the AIC indicates a better fitting model. The models were also assessed visually using diagnostic plots: observed concentrations versus population and individually predicted concentrations, weighted residual versus time or individual predictions. Bias (mean weighted error of predictions minus observations) and imprecision (bias-adjusted mean weighted squared error of predictions minus observations) were also factored in the model selection.

Additive and multiplicative error models were tested, where observations were weighted by $(SD^2 + \lambda^2)^{0.5}$ and $SD \times \gamma$, respectively. Lambda/gamma represented process noise such as sampling time uncertainty and model misspecification. SD was the standard deviation of each observation, modeled by a polynomial equation: $C_0 + C_1 \times [\text{obs}] + C_2 \times [\text{obs}]^2 + C_3 \times [\text{obs}]^3$ where [obs] is the observation.

The relationship between the model parameters and the different covariates (age, height, weight, serum creatinine, BMI, BSA, LBW, IWR, eGFR, aGFR) was then evaluated using stepwise linear regression and visual assessment of plots of the model parameters against covariates. Selected covariates were then independently tested by integrating them in the model using either a linear, exponential, power or allometric relationship after normalization with the population mean. If goodness of fit (evaluated as previously described) was improved, the covariate was included in the model. The process was iterated until no further improvement to the model was observed.

Model validation

Visual predictive checks (VPC) and prediction-corrected visual predictive checks (pcVPC) were performed using Monte Carlo simulations ($n = 1,000$) from each of the patient in the first dataset.¹⁷ Median, 5th and 95th percentiles for observed and simulated concentrations were then compared visually. Plotting was done using the “vpc” package for R.¹⁸

Monte Carlo simulations ($n = 1000$) were then made using the patients of the external dataset and the population parameter distribution of the first dataset. The model was evaluated using a plot of observed versus simulated concentrations, VPC and pcVPC.

Finally, the NPAG algorithm was run on the second dataset with the tested model, and pharmacokinetics parameters for this second population were retrieved and compared to those of the first population.

Probability of target attainment and dosing nomogram

Based on the parameters of the structural model, Monte Carlo simulations were generated ($n = 1,000$) from patient profiles with varying aGFR reflective of the population observed. For each of these profiles, exposure to cefazoline was assessed for doses ranging from 500 mg/day to 50,000 mg/day administered as a continuous infusion, without a loading dose.

Targeted plasma concentrations for cefazolin were defined as 40 mg/L, 60 mg/L and 80 mg/L. For the 40 mg/L target, the 2 mg/L EUCAST epidemiological cut-off MIC for *S. aureus*, the most commonly isolated bacteria in our population, was used.^{19,20} Accounting for the high protein binding of cefazolin, we considered the free fraction to be 20 % of the total concentration.²¹ Finally, to achieve efficacy, the targeted free drug concentration should be at least 4 times higher than the MIC.^{7,20} The 60 mg/L target accounts for other *Staphylococcus* species, where no breakpoint were defined but higher MICs can be encountered.¹⁹ The 80 mg/L target was defined as an upper limit beyond which the toxicity risk can largely be increased and corresponds to a free drug concentration of 8 times higher than the MIC, where efficacy of beta-lactams does not seem to be improved but neurotoxicity risk is increased.^{20,22,23}

To conceive the dosing nomogram, the lowest dose required to achieve a probability of target attainment (PTA) of 90 % at steady state for each of the simulated patient profiles

was reported against aGFR on a graph in Microsoft™ Excel (Microsoft Corporation, Redmond Washington, USA) for the 40 mg/L, 60 mg/L and 80 mg/L thresholds.

Results

Patient characteristics and cefazolin concentrations

A total of 162 patients were included in the analysis (129 with bacteremia and 33 with infective endocarditis). The median daily dose was 6,000 mg/day, ranging from 500 mg/day to 12,000 mg/day. For patients with an aGFR \geq 90 mL/min, the median daily dose was 7,000 mg/day, ranging from 3,000 mg/day to 12,000 mg/day. Patient characteristics are summarized in Table 1.

A total of 346 cefazolin plasma concentrations were used for the pharmacokinetic analysis. The number of samples per patient ranged from 1 to 11. Nineteen concentrations from 7 patients were measured during a second hospitalization or after a prolonged interruption of the cefazolin treatment (ranging from 15 to 355 days after the start of the first treatment). Fifty-eight percent of cefazolin concentrations were measured from patients with an aGFR $<$ 90 mL/min and 16 % from patients with an aGFR $>$ 120 mL/min. Blood sampling was done at least 12 hours after the start of the treatment except for 3 measurements. For 6 samples, measurement was done within 36 hours after the interruption of the treatment to monitor the decrease of plasma cefazolin in patients displaying very high concentrations.

The first dataset comprised 94 patients (200 concentrations) and the second dataset 68 patients (146 concentrations). No significant difference was observed between the two groups except for LBW and IBW (Table 1).

Population pharmacokinetics modelling

The observed data were best described by a one-compartment model with V as the central compartment volume and Ke as the elimination rate constant. One covariate was found to have an influence on the model parameters: normalized aGFR on Ke. The relationship was best described by a power equation. The final structural model is represented in Figure 1 and pharmacokinetic parameters estimates are summarized in Table 2. A lambda error model with a starting value of 7.5 was chosen, and values for C₀, C₁, C₂ and C₃ were 2.5, 0.15, 0 and 0 for the SD polynomial, respectively. The final cycle value of lambda was 3.35, inferior to the

lowest concentration measured (4.3 mg/L). This indicates an acceptable process noise, considering the retrospective nature of the data.

Observations versus predictions plots are presented in Figure 2. Bias and imprecision were 0.21 and 2.16 for population predictions and 0.13 and 0.43 for individual predictions, respectively. Residual plots for population predictions showed an even distribution of weighted residual errors over the concentration range and over time (Figure 3).

Model validation

VPC and pcVPC plots revealed that the model correctly described the observed data (Figure 4). Some variability can be observed for low values of aGFR, due to the heterogeneity of the data, covariates influence and population variability.

For the external data set, VPC, pcVPC and observed versus simulated concentrations plots proved to be adequate (Figure S1 and S2). Estimations of pharmacokinetic parameters were similar to those in the first dataset and are presented in Table 2.

PTA and dosing nomogram

The dosing nomogram for cefazolin is presented in Figure 5 and includes equations to directly calculate the daily dose required to achieve the targeted concentration with a PTA of 90 %, given the patient's aGFR. For example, for a cefazolin concentration target at 40 mg/L and an aGFR at 30, 60, 90 and 120 mL/min, the daily dose needed is 2.6, 4.6, 6.6 and 8.6 g/day to achieve the target with a 90 % success rate.

Discussion

The objective of this work was to use population pharmacokinetics analysis in a population of patients with bacteremia and/or infective endocarditis to provide a dosing nomogram for cefazolin adaptation, considering renal function. Patient characteristics were heterogeneous, with a broad range of daily dose administered (500 mg/day to 12,000 mg/day) considering a priori and a posteriori dose adaptation.

In previous works, cefazolin pharmacokinetics were simulated with two or more compartments models when administered as an IV bolus.²⁴⁻²⁷ In our study, the one-compartment model was selected because of the continuous infusion administration, which

allowed cefazolin to reach steady state and thus achieving equilibrium between the central and peripheral compartments.²⁸

Similar to previous works, renal function was found to have a high impact on cefazolin pharmacokinetics.²⁴⁻²⁶ CKD-EPI was used as the estimator of glomerular filtration rate (GFR) because it is more accurate overall.^{13,29,30} However, GFR estimated by CKD-EPI formula is indexed by BSA. While this normalization is useful for allowing comparisons between population, it can be misleading at the individual level for patients with BSA outside the normal range, where larger differences can be observed between the indexed value and the absolute value.³¹ The National Kidney Disease Education Program recommends the calculation of aGFR for drug dosing considerations.³² In this work, the patients had BSA ranging from 1.36 to 2.56. Therefore, using aGFR instead of eGFR allowed for a better estimation of the renal elimination of cefazolin. This was confirmed by the pharmacokinetic modelling, where aGFR proved to be a better covariate than eGFR for the elimination constant. Considering these results, patients with impaired renal function should be treated carefully, given that delayed cefazolin clearance can lead to higher plasma concentrations and therefore increases the risk of neurological toxicity.³³ On the other hand, high GFR can accelerate cefazolin elimination and lead to treatment failure. Therefore, initial dosage should be adapted accordingly.³⁴ It is important to keep in mind that aGFR is an estimator of renal function in the context of drug clearance, and does not reflect either chronic or acute kidney injury.

Several studies have found a relationship between total body weight and volume of the central compartment.^{24,26,35} In this work, we did not find such an association. In morbidly obese patients, volume of the central compartment range from 7.06 L to 13.0 L whereas in studies including patients with lower weights, values from 4.04 L to 8.94 L have been reported.^{24-26,35,36} Our estimation (4.12 L) falls within those last values.

Several limitations are present in this work. First, the data was collected retrospectively from routine clinical practice, and thus were more susceptible to imprecision. Secondly, cefazolin free fractions were not measured. A 80 % protein-bound fraction was used based on literature, but data suggest that the binding of cefazolin to proteins is saturable, with higher proportion of free fraction when total cefazolin concentration increases.³⁷ Moreover, influence of serum albumin concentration on cefazolin free fraction remains to be determined. In their population pharmacokinetics model for cefazolin in post-trauma patients,

Roberts *et al.* identified serum albumin as a covariate for the central compartment volume.²⁶ Finally, a prospective evaluation of the nomogram should also be performed to assess its efficacy.

aGFR is important to consider when initiating cefazolin treatment. However, determining the optimal dose can be difficult. Dosing nomograms are simple tools that can provide the clinician a quick answer to this problem. Several nomograms have been established for multiple antibiotics, like vancomycin or gentamicin, but to our knowledge, there are no existing nomograms for cefazolin or for other beta-lactam antibiotics (with the exception of meropenem).³⁸⁻⁴¹

When we compare cefazoline dosing recommendations with the present nomogram, multiple observations can be made: for a 6,000 mg/day dose, PTA will be less than 90 % for the 40 mg/L target when patient's aGFR is higher than 80 mL/min. Conversely, patients with an aGFR less than 40 mL/min, the probability to have a concentration of at least 80 mg/L (associated with a higher risk of toxicity) is superior to 90 %. In the same manner, the application of the French guidelines (80 – 100 mg/kg/day) on the dosing nomogram highlights the risk of under-dosing for a patient weighting 75 kg (the median of the population studied) when aGFR is higher than 105 mL/min, and the risk of toxicity when aGFR is less than 40 mL/min.

Since simulations for the conception of the nomogram were performed at steady state, the influence of giving a loading dose of cefazolin prior to the start of the continuous infusion was not assessed. However, given the short half-life of cefazolin (about 2 hours),⁴² steady state should be attained within 12 hours after the start of the infusion, whether or not a loading dose was administered.

In conclusion, this nomogram can be a useful tool for physicians to assist in the individualization of the initial prescription of cefazolin in patients with infective endocarditis or bacteremia, with the systematic calculation of aGFR as a requirement. After treatment initiation, TDM should be privileged to adapt dose regimen for each patient regardless of renal function.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge Thierry Bompoil for his advices.

Funding

This work was supported by the University Hospital of Nantes.

Transparency declarations

None to declare.

References

1. Selton-Suty C, Célard M, Le Moing V, *et al.* Preeminence of *Staphylococcus aureus* in infective endocarditis: a 1-year population-based survey. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2012; 54: 1230–9.
2. Asgeirsson H, Thalme A, Weiland O. *Staphylococcus aureus* bacteraemia and endocarditis – epidemiology and outcome: a review. *Infect Dis* 2018; 50: 175–92.
3. Habib G, Lancellotti P, Antunes MJ, *et al.* 2015 ESC Guidelines for the management of infective endocarditis: The Task Force for the Management of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC) Endorsed by: European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), the European Association of Nuclear Medicine (EANM). *Eur Heart J* 2015; 36: 3075–128.
4. Baddour LM, Wilson WR, Bayer AS, *et al.* Infective Endocarditis in Adults: Diagnosis, Antimicrobial Therapy, and Management of Complications: A Scientific Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association. *Circulation* 2015; 132: 1435–86.
5. McDanel JS, Roghmann M-C, Perencevich EN, *et al.* Comparative Effectiveness of Cefazolin Versus Nafcillin or Oxacillin for Treatment of Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Infections Complicated by Bacteremia: A Nationwide Cohort Study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2017; 65: 100–6.
6. Bidell MR, Patel N, O'Donnell JN. Optimal treatment of MSSA bacteraemias: a meta-analysis of cefazolin versus antistaphylococcal penicillins. *J Antimicrob Chemother* 2018; 73: 2643–51.
7. Roberts JA, Paul SK, Akova M, *et al.* DALI: defining antibiotic levels in intensive care unit patients: are current β -lactam antibiotic doses sufficient for critically ill patients? *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2014; 58: 1072–83.
8. SPILF. Propositions d'alternatives à l'oxacilline ou la cloxacilline par voie IV chez l'adulte et l'enfant en contexte de rupture de stock. Available at: <http://www.infectiologie.com/fr/ressources-sur-les-antibiotiques.html>. Accessed February 1, 2018.
9. Jacobs A, Taccone FS, Roberts JA, *et al.* β -Lactam Dosage Regimens in Septic Patients with Augmented Renal Clearance. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; 62. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6125556/>. Accessed September 24, 2018.
10. Du Bois D, Du Bois EF. A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. 1916. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif* 1989; 5: 303–11; discussion 312–313.
11. Devine BJ. Gentamicin Therapy. *Ann Pharmacother* 1974; 8: 650–5.
12. Robinson JD, Lupkiewicz SM, Palenik L, Lopez LM, Ariet M. Determination of ideal body weight for drug dosage calculations. *Am J Hosp Pharm* 1983; 40: 1016–9.
13. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, *et al.* A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. *Ann Intern Med* 2009; 150: 604–12.

14. Neely MN, van Guilder MG, Yamada WM, Schumitzky A, Jelliffe RW. Accurate detection of outliers and subpopulations with Pmetrics, a nonparametric and parametric pharmacometric modeling and simulation package for R. *Ther Drug Monit* 2012; 34: 467–76.
15. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2018. Available at: <https://www.R-project.org/>.
16. Burnham KP, Anderson DR. Model Selection and Multimodel Inference: A Practical Information-Theoretic Approach. 2nd ed. New York: Springer-Verlag; 2002. Available at: <https://www.springer.com/la/book/9780387953649>. Accessed July 5, 2018.
17. Bergstrand M, Hooker AC, Wallin JE, Karlsson MO. Prediction-corrected visual predictive checks for diagnosing nonlinear mixed-effects models. *AAPS J* 2011; 13: 143–51.
18. Ron Keizer. vpc: Create Visual Predictive Checks. 2018. Available at: <https://CRAN.R-project.org/package=vpc>.
19. EUCAST. Antimicrobial wild type distributions of microorganisms - Antimicrobial: Cefazolin (Method: MIC). Available at: <https://mic.eucast.org/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=performSearch&BeginIndex=0&Micdif=mic&NumberIndex=50&Antib=237&Specium=-1>. Accessed September 4, 2018.
20. Société Française d'Anesthésie et de Réanimation. Optimization of beta-lactam treatment in critical care patients. 2018. Available at: <https://sfar.org/optimisation-du-traitement-par-beta-lactamines-chez-le-patient-de-soins-critiques/>. Accessed October 12, 2018.
21. Wong G, Briscoe S, Adnan S, *et al.* Protein binding of β -lactam antibiotics in critically ill patients: can we successfully predict unbound concentrations? *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 6165–70.
22. Manduru M, Mihm LB, White RL, Friedrich LV, Flume PA, Bosso JA. In vitro pharmacodynamics of ceftazidime against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2053–6.
23. Beumier M, Casu GS, Hites M, *et al.* Elevated β -lactam concentrations associated with neurological deterioration in ICU septic patients. *Minerva Anesthesiol* 2015; 81: 497–506.
24. Naik BI, Roger C, Ikeda K, *et al.* Comparative total and unbound pharmacokinetics of cefazolin administered by bolus versus continuous infusion in patients undergoing major surgery: a randomized controlled trial. *Br J Anaesth* 2017; 118: 876–82.
25. Grégoire M, Dumont R, Ronchi L, *et al.* Prophylactic cefazolin concentrations in morbidly obese patients undergoing sleeve gastrectomy: Do we achieve targets? *Int J Antimicrob Agents* 2018.
26. Roberts JA, Udy AA, Jarrett P, *et al.* Plasma and target-site subcutaneous tissue population pharmacokinetics and dosing simulations of cefazolin in post-trauma critically ill patients. *J Antimicrob Chemother* 2015; 70: 1495–502.
27. Dallmann A, Ince I, Solodenko J, *et al.* Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling of Renally Cleared Drugs in Pregnant Women. *Clin Pharmacokinet* 2017; 56: 1525–41.

28. Zheng H. Intravenous Infusion. In: Shargel L, Yu ABC, eds. Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics. 7th ed. McGraw-Hill Education, 2015; 150–67.
29. White CA, Akbari A, Doucette S, Fergusson D, Knoll GA. Estimating glomerular filtration rate in kidney transplantation: is the new chronic kidney disease epidemiology collaboration equation any better? Clin Chem 2010; 56: 474–7.
30. Michels WM, Grootendorst DC, Verduijn M, Elliott EG, Dekker FW, Krediet RT. Performance of the Cockcroft-Gault, MDRD, and New CKD-EPI Formulas in Relation to GFR, Age, and Body Size. Clin J Am Soc Nephrol CJASN 2010; 5: 1003–9.
31. Redal-Baigorri B, Rasmussen K, Heaf JG. The use of absolute values improves performance of estimation formulae: a retrospective cross sectional study. BMC Nephrol 2013; 14: 271.
32. National Kidney Disease Education Program. CKD & Drug Dosing: Information for Providers. Natl Inst Diabetes Dig Kidney Dis 2015. Available at: <https://www.niddk.nih.gov/health-information/professionals/clinical-tools-patient-education-outreach/ckd-drug-dosing-providers>. Accessed October 25, 2018.
33. Chow KM, Hui AC, Szeto CC. Neurotoxicity induced by beta-lactam antibiotics: from bench to bedside. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol 2005; 24: 649–53.
34. Carrie C, Petit L, D’houdain N, *et al.* Association between augmented renal clearance, antibiotic exposure and clinical outcome in critically ill septic patients receiving high doses of β -lactams administered by continuous infusion. a prospective observational study. Int J Antimicrob Agents 2017.
35. Brill MJE, Houwink API, Schmidt S, *et al.* Reduced subcutaneous tissue distribution of cefazolin in morbidly obese versus non-obese patients determined using clinical microdialysis. J Antimicrob Chemother 2014; 69: 715–23.
36. van Kralingen S, Taks M, Diepstraten J, *et al.* Pharmacokinetics and protein binding of cefazolin in morbidly obese patients. Eur J Clin Pharmacol 2011; 67: 985–92.
37. Vella-Brincat JWA, Begg EJ, Kirkpatrick CMJ, Zhang M, Chambers ST, Gallagher K. Protein binding of cefazolin is saturable in vivo both between and within patients. Br J Clin Pharmacol 2007; 63: 753–7.
38. Minichmayr IK, Roberts JA, Frey OR, Roehr AC, Kloft C, Brinkmann A. Development of a dosing nomogram for continuous-infusion meropenem in critically ill patients based on a validated population pharmacokinetic model. J Antimicrob Chemother 2018.
39. Pea F, Viale P, Cojutti P, Furlanut M. Dosing nomograms for attaining optimum concentrations of meropenem by continuous infusion in critically ill patients with severe gram-negative infections: a pharmacokinetics/pharmacodynamics-based approach. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56: 6343–8.
40. Shino N, Uchida T, Yoshida M, Nomura Y. Development and Assessment of a Nomogram to Propose the Initial Dosage Regimen of a Meropenem Infusion Based on Serum Creatinine and Age Using a Monte Carlo Simulation. Chem Pharm Bull (Tokyo) 2015; 63: 986–91.

41. Roberts JA, Kumar A, Lipman J. Right Dose, Right Now: Customized Drug Dosing in the Critically Ill. *Crit Care Med* 2017; 45: 331–6.
42. Bergan T, Brodwall EK, Ørjavik O. Pharmacokinetics of cefazolin in patients with normal and impaired renal function. *J Antimicrob Chemother* 1977; 3: 435–43.

Table 1. Summary of patient characteristics (median and interquartile range)

Characteristic (unit)	Patients for model development (n = 94)	Patients for model validation (n = 68)	p value (significance)
Sex (% male)	64	62	0.869
Infective endocarditis (%)	26	13	0.075
Age (years)	67 [54 – 80]	69 [54 – 81]	0.602
Height (cm)	169 [162 – 175]	170 [161 – 175]	0.611
Weight (kg)	75 [62 – 89]	72 [63 – 82]	0.450
BMI (kg/m ²)	26 [23 – 30]	25 [21 – 29]	0.244
LBW (kg)	61 [54 – 66]	65 [54 – 71]	0.026 *
IWR (kg)	60 [55 – 64]	64 [55 – 69]	0.007 *
BSA (m ²)	1.88 [1.67 – 2.00]	1.80 [1.68 – 1.95]	0.451
Serum creatinine (µmol/L)	74.5 [56.0 – 118.8]	73.5 [58.3 – 92.8]	0.506
eGFR (mL/min/1.73 m ²)	81.4 [48.0 – 105.1]	87.3 [58.9 – 106.8]	0.496
aGFR (mL/min)	91.5 [51.5 – 112.8]	90.6 [60.9 – 108.7]	0.719

BMI: body mass index defined as $\frac{weight (kg)}{height (m)^2}$, LBW: lean body weight calculated with the

Devine formula $LBW = \frac{50 (if\ male)}{45.5 (if\ female)} + 2.3 \times \frac{height (cm) - 152.4}{2.54}$; IWR: ideal weight calculated

with the Robinson formula $IWR = \frac{52 (if\ male)}{49 (if\ female)} + \frac{1.9 (if\ male)}{1.7 (if\ female)} \times \frac{height (cm) - 152.4}{2.54}$; BSA:

body surface area calculated with the Du Bois formula

$BSA = 0.007184 \times weight (kg)^{0.425} \times height (cm)^{0.725}$; eGFR: estimation of glomerular filtration

rate with the CKD-EPI formula

$eGFR = 141 \times \min(\frac{Scr}{\kappa}, 1)^\alpha \times \max(\frac{Scr}{\kappa}, 1)^{-1.209} \times 0.993^{Age} \times \frac{1.018 (if\ female)}{1.159 (if\ black)}$ where *Scr* is

serum creatinine, κ is 0.7 for females and 0.9 for males, α is -0.329 for females and -0.411

for males, *min* indicates the minimum of $\frac{Scr}{\kappa}$ or 1, and *max* indicates the maximum of $\frac{Scr}{\kappa}$ or

1; aGFR: absolute estimation of glomerular filtration rate calculated as $aGFR = \frac{eGFR \times BSA}{1.73}$.

Qualitative characteristics were compared using a two-tailed Fisher's exact test and

quantitative data with a Mann-Whitney-Wilcoxon test. Significance level was set to 0.05.

Statistically significant results are marked with an asterisk.

Table 2. Population parameters estimates

Parameter	Estimation (first dataset)	Estimation (second dataset)	Range
K_e1			
Median [95 % CI]	0.955 [0.742 – 1.257]	0.850 [0.786 – 1.001]	0.01 – 3.00
MAWD [95 % CI]	0.211 [0.002 – 0.356]	0.032 [0.000 – 0.158]	
V			
Median [95 % CI]	4.119 [4.091 – 4.795]	4.016 [3.671 – 4.676]	1 – 15
MAWD [95 % CI]	0.660 [0.016 – 0.748]	0.315 [0.000 – 0.621]	

CI: confidence interval; MAWD: median absolute weighted deviation, used as an estimate of the variance for a nonparametric distribution.

In the model, $K_e = \left(\frac{aGFR}{79.988}\right)^{K_e1}$, where K_e is the elimination rate constant from the central compartment (h^{-1}), $\frac{aGFR}{79.988}$ is the absolute estimation of glomerular filtration rate (mL/min) normalized with the population mean, K_e1 the power factor used to scale aGFR to the elimination rate constant; V is the volume of the central compartment (L).

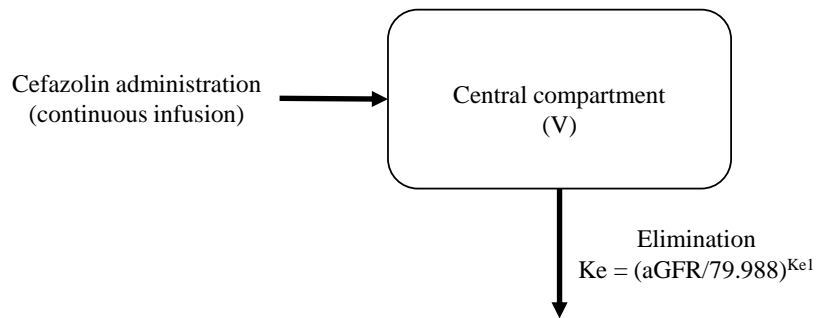


Figure 1. Final structural model for continuous-infusion cefazolin. A one-compartment model with absolute value of estimated glomerular filtration rate (CKD-EPI formula) integrated as a covariate for elimination rate.

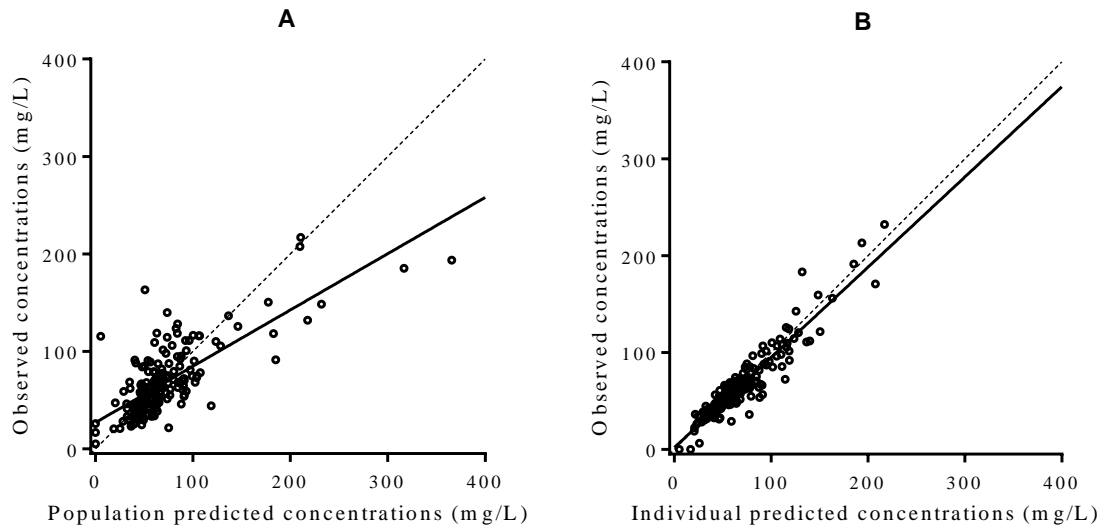


Figure 2. Observed versus population predicted cefazolin concentrations (A) and individual predicted cefazolin concentrations (B). The dashed line represents identity. The full line is the linear regression line ($R^2 = 0.56$ for A and $R^2 = 0.89$ for B).

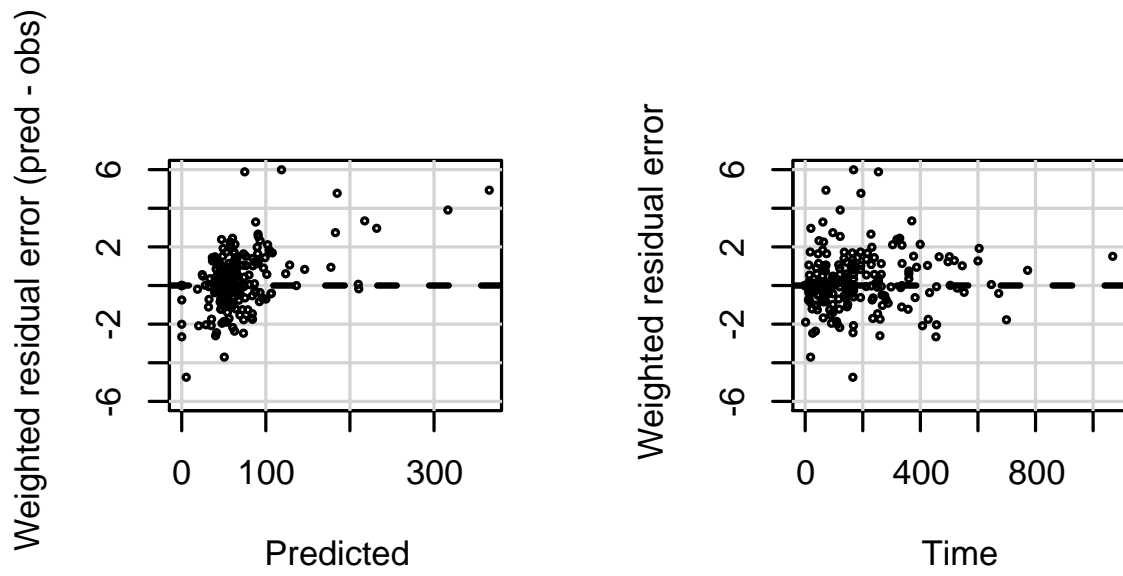


Figure 3. Weighted residual error plotted against predicted concentrations (mg/L) (left) and time (h) (right).

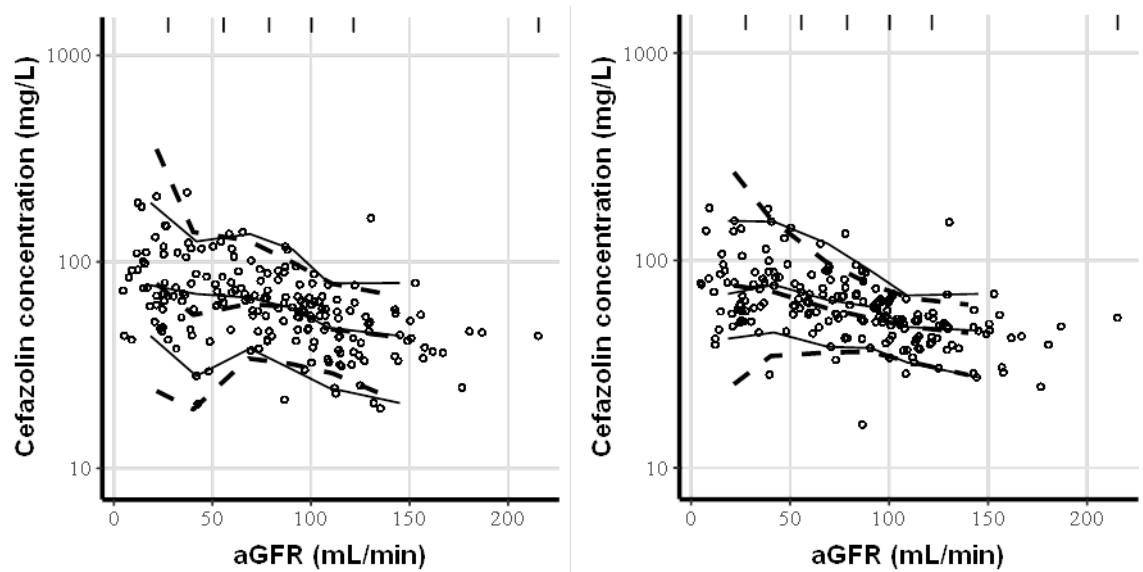


Figure 4. Visual predictive checks (left) and prediction corrected visual predictive checks (right) of cefazolin concentrations against absolute values of glomerular filtration rate (aGFR). Open circles are observed cefazolin concentrations. Solid lines represent the 5th, 50th and 95th percentiles for observed concentrations. Dashed lines represent the 5th, 50th and 95th percentiles for simulated concentrations. Vertical lines at the top of the plots are bin separators.

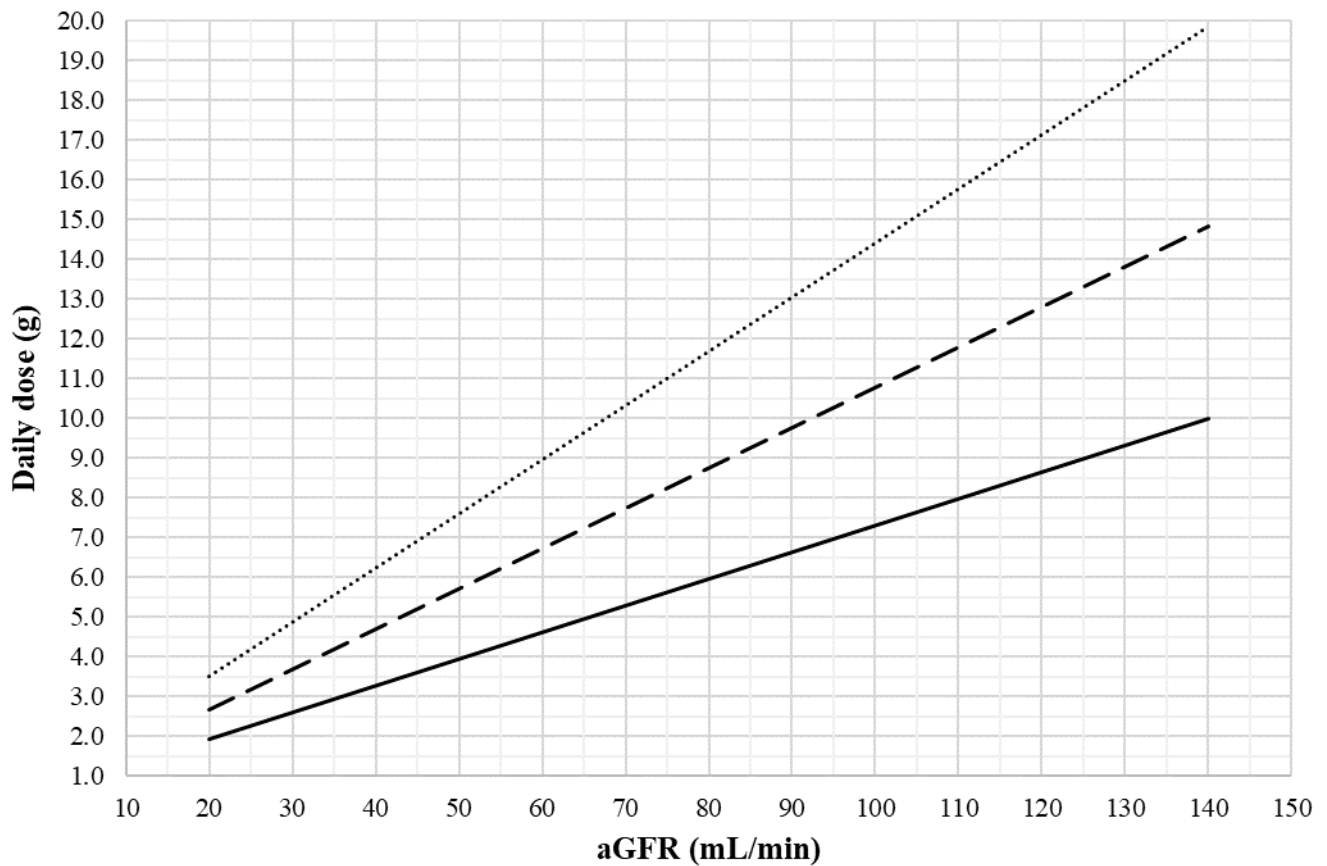


Figure 5. Nomogram of daily dose of continuous-infusion cefazolin to be administered to attain steady state plasma concentration targets of 40 mg/L (full line), 60 mg/L (dashed line) and 80 mg/L (dotted line) in 90 % of the studied population, accounting for renal function estimated by the CKD-EPI formula and expressed as an absolute value (aGFR). Equations were defined as $y = 0.067x + 0.59$ for the 40 mg/L target, $y = 0.10x + 0.66$ for the 60 mg/L target and $y = 0.14x + 0.78$ for the 80 mg/L target, with x as aGFR (mL/min) and y as the cefazolin daily dose (g).

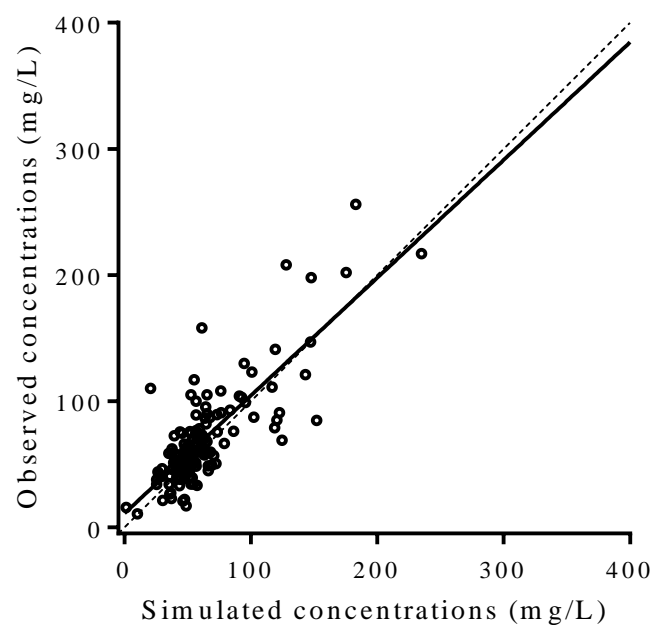


Figure S1. Observed versus simulated cefazolin concentrations for the external dataset using estimations of the pharmacokinetic parameters of the first dataset. The dashed line represents identity. The full line is the linear regression line ($R^2 = 0.64$).

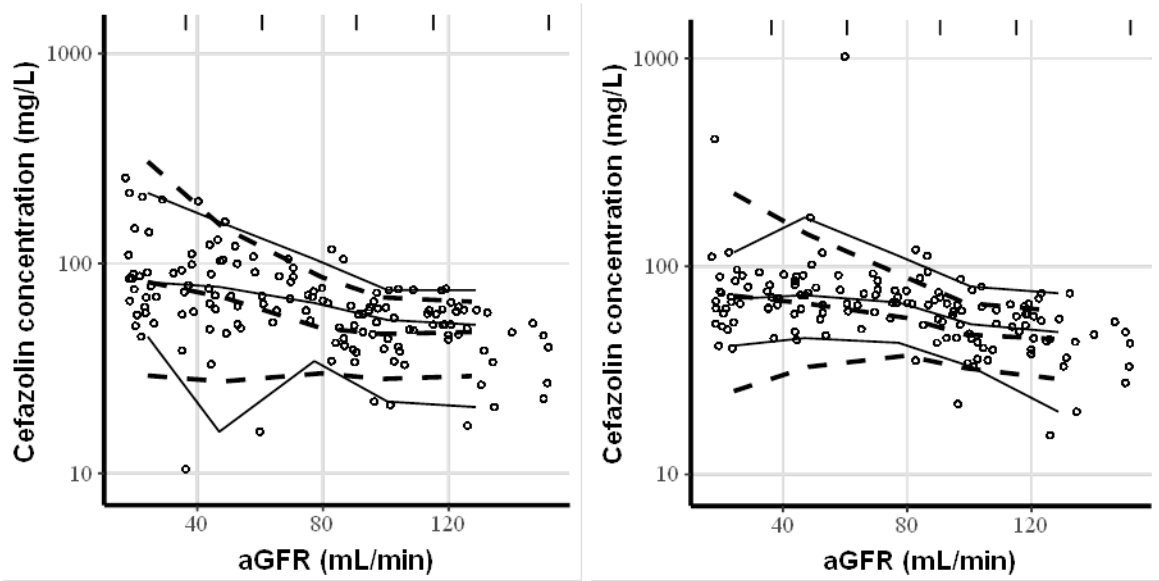


Figure S2. Visual predictive checks (left) and prediction corrected visual predictive checks (right) of cefazolin concentrations against absolute values of glomerular filtration rate (aGFR) for model validation with the external dataset. Open circles are observed cefazolin concentrations from the external dataset. Solid lines represent the 5th, 50th and 95th percentiles for observed concentrations. Dashed lines represent the 5th, 50th and 95th percentiles for simulated concentrations. Vertical lines at the top of the plots are bin separators.

Annexe III

CLINICAL INVESTIGATION

Cefazolin tissue concentrations with a prophylactic dosage administered before sleeve gastrectomy in obese patients: a single centre study in 116 patients

R. Cinotti¹, R. Dumont¹, L. Ronchi¹, A. Roquilly^{1,2}, V. Atthar¹, M. Grégoire^{2,3}, L. Planche⁴, E. Letessier⁵, E. Dailly^{2,3} and K. Asehnoune^{1,2,*}

¹Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine, Hôtel Dieu-PTMC, Centre Hospitalo-Universitaire de Nantes, 1 place Alexis Ricordeau 44093, Nantes Cedex 1, France, ²UPRES EA 3826 Laboratory 'Thérapeutiques expérimentales des infections', Faculté de médecine de Nantes, 1 rue Gaston Veil, 44000 Nantes, France, ³Department of Clinical Pharmacology and Toxicology, Hôtel Dieu, Centre Hospitalo-Universitaire de Nantes, 9 quai Moncoussu 44093, Nantes Cedex 1, France, ⁴Clinical Research Division, Promotion Department, Centre Hospitalo-Universitaire de Nantes, 1 place Alexis Ricordeau 44093, Nantes Cedex 1, France and ⁵Department of Abdominal and Endocrinal Surgery, Hôtel Dieu, Centre Hospitalo-Universitaire de Nantes, 1 place Alexis Ricordeau 44093, Nantes Cedex 1, France

*Corresponding author. E-mail: karim.asehnoune@chu-nantes.fr

Abstract

Background: In obese patients undergoing sleeve gastrectomy, the blood and fatty-tissue concentrations of cefazolin required for adequate antibiotic prophylaxis are uncertain.

Methods: This was a single centre prospective study in obese (Group A: $40 \leq \text{BMI} \leq 50 \text{ kg m}^{-2}$) and severely obese (Group B: $50 < \text{BMI} \leq 65 \text{ kg m}^{-2}$) patients undergoing bariatric surgery. Blood and fatty-tissue samples were collected after a cefazolin 4 g i.v. injection. The primary aim was to compare cefazolin concentrations in subcutaneous fatty tissue with a targeted tissue concentration of $4 \mu\text{g g}^{-1}$ according to *Staphylococcus aureus* resistance breakpoint.

Results: One hundred and sixteen patients were included: 79 in Group A and 37 in Group B. At the beginning of the surgery, cefazolin concentration in subcutaneous fatty tissue was $12.2 (5.4) \mu\text{g g}^{-1}$ in Group A and $12 (6.1) \mu\text{g g}^{-1}$ in Group B ($P=0.7$). At the end, the cefazolin concentrations in subcutaneous fatty tissue were $9.0 (4.9)$ and $7.8 (4.2) \mu\text{g g}^{-1}$ in Groups A and B, respectively ($P=0.2$). The plasma concentration of free cefazolin during surgery was higher in Group A than in Group B ($P<0.0001$). Fatty-tissue concentrations of 95% and 83% patients in Groups A and B, respectively, were above *S. aureus* resistance breakpoint.

Conclusions: After a 4 g dose, the concentrations of cefazolin in fatty tissue were above the $4 \mu\text{g g}^{-1}$ tissue concentration target, providing adequate antibiotic tissue concentrations during bariatric surgery. As cefazolin concentration in fatty tissue is a surrogate end point, the results should be considered in conjunction with the results on free cefazolin concentrations in subcutaneous tissue.

Clinical trial registration: NCT01537380.

Editorial decision: October 24, 2017; Accepted: October 24, 2017

© 2017 British Journal of Anaesthesia. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
For Permissions, please email: permissions@elsevier.com

Keywords: bariatric surgery; cefazolin; pharmacology

Key points

- *Staphylococcus aureus* is a common cause of surgical site infection.
- For cefazolin, the minimum inhibitory concentration is $4 \mu\text{g g}^{-1}$.
- Guidelines commonly recommend prophylactic administration of cefazolin 4 g i.v. in moderately and severely obese patients.
- In this study, subcutaneous tissue concentrations at the end of bariatric surgery in obese patients were above the minimum inhibitory concentration.

Obesity has increased substantially worldwide over the past two decades, affecting an estimated 36.9% of men and 38% of women across the globe in 2013.¹ Bariatric surgery is the only efficient long-term treatment for obesity.² Obesity is a risk factor for surgical site infection (SSI), which is a source of morbidity and increased healthcare costs.^{3,4} In thoracic surgery, the rate of superficial SSI was 2.2% and deep SSI was 1.8%, and obesity was an independent factor of SSI.⁵ In a monocentric study regarding general surgery, the rate of SSI was up to 10% in obese patients.⁶ In sleeve gastrectomy, the SSI rate ranges between 2.3 and 4.6%,⁷ depending on post-operative complications.

Antibiotic prophylaxis reduces the occurrence of SSI.^{8,9} In obese patients, antibiotic pharmacokinetics are likely to be impaired, as renal and hepatic clearance and volume of distribution are significantly modified.¹⁰ These modifications could affect the pharmacokinetics of antibiotics and, therefore, impair their efficacy profile in SSI prophylaxis. Some authors have also reported that cefazolin distribution was impaired in subcutaneous tissues along with an increased volume of distribution.¹¹ The American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, the Surgical Infection Society, and the Society for Healthcare Epidemiology of America currently recommend cefazolin 2 g before surgery, and a second dose after 4 h, in patients weighing more than 80 kg, and 3 g before surgery followed by a second dose after 4 h in patients weighing more than 120 kg.¹² The French Society of Anesthesia and Critical Care Medicine [Société Française d'Anesthésie et de Réanimation (SFAR)] recommends cefazolin 4 g before surgery followed by a second dose of 2 g after 4 h.¹³ The discrepancies concerning cefazolin administration during bariatric surgery highlight the controversies that have emerged in the current literature. Moreover, although data in the current literature suggest reduced cefazolin subcutaneous tissue concentrations, data regarding subcutaneous fatty-tissue concentrations in severely obese patients are lacking.

We studied the blood and fatty-tissue pharmacokinetics of cefazolin in sleeve gastrectomy surgery in moderately to severely obese patients after an initial 4 g injection, as recommended by the guidelines of the SFAR.¹³ The primary outcome was to study subcutaneous fatty-tissue concentration of cefazolin at the end of surgery, and to compare this

concentration to *Staphylococcus aureus* minimum inhibitory concentration (MIC), which is one of the main pathogens causing SSI.

Methods

This was a single centre observational study conducted at Nantes Teaching Hospital, a reference centre in bariatric surgery, between May 1, 2012 and March 1, 2015. The study was registered as NCT01537380. This study was approved by the ethics committee at Tours Teaching Hospital (no. BRD 11/6-R). Patients eligible to participate in this study received information and gave their written consent.

Inclusion criteria

Patients scheduled for sleeve gastrectomy surgery were eligible if they were ≥ 18 yr old, with a BMI ≥ 40 and $\leq 65 \text{ kg m}^{-2}$, and they also had to have French health insurance cover.

Exclusion criteria

Patients were excluded in case of pregnancy, mild to moderate chronic renal failure (calculated creatinine clearance $\leq 65 \text{ ml min}^{-1}$ with the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) formula), and hypersensitivity to cephalosporin.

Study protocol

In the operating room, an initial 4 g dose of cefazolin was administered intravenously according to the guidelines of the SFAR.¹³ The general anaesthesia protocol combined the i.v. administration of propofol ($3\text{--}5 \text{ mg kg}^{-1}$) and remifentanyl ($2\text{--}4 \mu\text{g kg}^{-1}$). A cisatracurium bolus 0.5 mg kg^{-1} was set up before intubation and was administered by continuous perfusion during surgery ($0.3\text{--}0.5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Drug dosages were adapted to ideal body weight. After initiation of the general anaesthesia, a perfusion line devoted to the pharmacological dosages was inserted in the patient's contralateral arm.

The same surgeon performed all surgical procedures (E.L.). The surgeon performed subcutaneous fatty tissue and perigastric tissue biopsy just after surgical incision and at the end of the procedure just before skin closure. Four fatty-tissue samples were taken per patient. Free cefazolin plasma concentrations during surgery in each group were also studied according to the following time frame: T_0 (surgical incision); 15, 30, 60 min post-incision; and surgical closure. The patients received cefazolin during surgery. Antibiotics were discontinued at the end of surgery.

Determination of free cefazolin plasma concentration

Free-plasma cefazolin concentrations were determined according to a previously validated method.¹⁴ The plasma samples were thawed and incubated at 37°C for 20 min. One millilitre of plasma was then transferred into a Millipore 4104

Centrifree YM-30 cup (Millipore Merck, Cork, Ireland), and the cups were centrifuged for 30 min at 1000 *g*. Fifty microlitres of the clear filtrate was injected into the high-performance-liquid-chromatography system (1200 Series; Agilent, Palo Alto, CA, USA). Separation was performed on a Symmetry C18, 5 μm column (250 \times 4.6 mm i.d.) from Waters (Milford, MA, USA). Cefazolin plasma concentration peaks were detected by ultraviolet absorbance at 265 nm.

Determination of cefazolin concentration in subcutaneous and perigastric fatty tissues

Tissue samples were rinsed with saline solution and were blotted to remove residual blood. Blood contamination was checked by visual examination of each sample. After removing residual blood from the fatty tissue, tissue fractions were weighed, sonicated, and centrifuged at 13 000 *g* for 5 min. Five hundred microlitres of supernatant was mixed with 500 μl acetonitrile and centrifuged at 13 000 *g* for 5 min. Eight hundred microlitres of the supernatant was added to dichloromethane (4 ml). The tubes were shaken horizontally for 10 min and centrifuged at 1800 *g* for 5 min at +4°C. Fifty microlitres of the upper aqueous layer was injected into the high-performance-liquid-chromatography system in the chromatographic conditions described previously. In our study, the cefazolin tissue concentration in the fatty tissue was considered as the total cefazolin concentration.

The limits of quantitation were 1 mg litre⁻¹ in the plasma and 1 $\mu\text{g g}^{-1}$ in the fatty tissue. The methods were accurate (inter-day and intra-day inaccuracy <15%) and showed good precision (inter-day and intra-day imprecision <15%).

Data collection

Patient-characteristic data were recorded: age, gender, BMI, body surface area, baseline creatinine, and creatinine clearance calculated with the MDRD formula. During surgery, the time of cefazolin injection and blood and fatty-tissue sample collection was recorded. Perioperative blood loss and vascular expansion were recorded. We then recorded the occurrence of SSI in the 30 days after surgery.¹⁵

Primary outcome

We divided the population into two groups: the first group (Group A) was that of patients with $40 \leq \text{BMI} \leq 50 \text{ kg m}^{-2}$, whilst the second group (Group B) was that of patients with severe obesity ($50 < \text{BMI} \leq 65 \text{ kg m}^{-2}$). The primary outcome of our study was subcutaneous fatty-tissue cefazolin concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$) at the end of surgery (T_{end}) in both groups. To determine the efficacy of prophylactic free-plasma cefazolin, currently the time of cefazolin concentration above the MIC between the opening and closure of the wound is used as the pharmacokinetic/pharmacodynamic index. According to this index, cefazolin fatty concentration at closure (end of surgery) was finally used. The concentrations were compared with the target tissue concentrations (4 $\mu\text{g g}^{-1}$ in adipose tissue). The target is based on the MIC 90 (MIC at which 90% of tested strains were inhibited) of methicillin-sensitive *S. aureus* isolates, the most common pathogens in wound infections. The MIC 90 is usually $\leq 2 \text{ mg litre}^{-1}$;¹⁶ however, higher values (4 mg litre⁻¹) have been described in previous studies after cefazolin administration for the prevention of surgical infection.^{11,17}

Secondary outcomes

The perigastric fatty-tissue cefazolin concentrations at incision and at the end of surgery in both groups were also evaluated. The areas under the cefazolin concentration curve in subcutaneous tissue and perigastric fatty-tissue time curve (AUC) were determined using the trapezoidal rule during the time between incision and wound closure. The free-plasma cefazolin concentrations were compared with the MIC 90 for *S. aureus*. Finally, we evaluated the incidence of SSI and the occurrence of cefazolin side-effects. SSI¹⁸ occurs in bariatric surgery as a skin abscess and could theoretically occur on the site of gastrectomy, which is why we recorded subcutaneous and perigastric fatty-tissue infections.

Statistical analysis

After checking the data for normality (Kolmogorov–Smirnov test), continuous data were expressed as mean [standard deviation (SD)] and nominal data as *n* (%). The continuous data were analysed with Student's *t*-test and nominal data were analysed with the χ^2 test accordingly. The primary objective was to study subcutaneous fatty-tissue cefazolin concentration at T_{end} in both groups. According to previous data,¹⁹ the SD for cefazolin concentration in fatty tissues was 4.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ in patients with $40 \leq \text{BMI} \leq 50$ and 3.5 in patients with $50 \leq \text{BMI} \leq 65$. With an accuracy of 1 for the confidence interval, 78 patients needed to be included in Group A and 48 in Group B. We estimated that 5% of patients would not be analysed for the primary outcome because of missing data. Therefore, we chose to include 82 patients at most in Group A and 51 in Group B. The cefazolin plasma concentrations in Group A to Group B were compared by analysis of variance (ANOVA). Statistical significance was reached at $P < 0.05$.

Results

Between May 1, 2012 and March 1, 2015, we included 116 patients: 79 in Group A and 37 in Group B (11 patients were missing as referred to in the statistical plan, as the surgeon no longer performed bypass surgery). In Group A, the mean age was 42.7 (10.9) and the mean BMI was 44.5 (3). In Group B, the mean age was 44 (2.5) and the mean BMI was 54.3 (4.1). The duration of surgery was 72 (21.3) (min) in Group A and 79.6 (26.1) (min) in Group B ($P=0.1$). The patient-characteristic data are provided in Table 1.

Primary outcome

At T_{end} , the cefazolin concentration in subcutaneous fatty tissue in Group A was 9.0 (4.9) $\mu\text{g g}^{-1}$ of fatty tissue. In Group B, the cefazolin concentration in subcutaneous fatty tissue was 7.8 (4.2) $\mu\text{g g}^{-1}$ of fatty tissue at T_{end} ($P=0.2$). Considering a 4 $\mu\text{g g}^{-1}$ tissue concentration target, the fatty-tissue cefazolin concentrations were maintained above this target throughout the surgical procedure for 95% (Group A) and 83.3% (Group B) of the patients.

Secondary outcomes

Regarding Group A, the cefazolin concentration in subcutaneous fatty tissue was 12.2 (5.4) $\mu\text{g g}^{-1}$ at T_0 . The cefazolin concentration in perigastric fatty tissue was 9.9 (4.9) $\mu\text{g g}^{-1}$ at T_0 and $8 \pm 4.3 \mu\text{g g}^{-1}$ at T_{end} . Regarding Group B, the cefazolin concentration in perigastric fatty tissue was 9.9 (5.4) $\mu\text{g g}^{-1}$ at

Table 1 Patient-characteristic data in a cohort of 116 obese patients. Comparison of a cohort of obese patients (Group A: $40 < \text{BMI} \leq 50 \text{ kg m}^{-2}$) and severely obese patients (Group B: $50 < \text{BMI} \leq 65 \text{ kg m}^{-2}$). Continuous data are expressed as mean (standard deviation) and nominal data as n (%) accordingly

	Group A, n=79	Group B, n=37	P-value
Male/female	21 (26.6)/58 (73.4)	9 (24.3)/28 (75.7)	
Age	42.7 (10.9)	41.8 (10.5)	0.6
Height (cm)	170 (10)	160 (10)	0.03
Weight (kg)	124.3 (14.7)	143.2 (16)	<0.0001
BMI (kg m^{-2})	44 (2.5)	54.3 (4.1)	<0.0001
Body area (m^2)	2.3 (0.2)	2.4 (0.2)	0.02
Albuminaemia (g litre^{-1})	38.2 (3.5)	36.7 (3)	0.02
Creatinine ($\mu\text{mol litre}^{-1}$)	66.2 (12.7)	63.6 (13.9)	0.3
Duration of surgery (min)	72 (21.3)	79.6 (26.1)	0.1

T_0 and $7.3 (4.3) \mu\text{g g}^{-1}$ at T_{end} (Table 2). There were no differences in cefazolin concentration in subcutaneous and perigastric fatty tissue between the two groups (Table 2). There was no difference in the AUC for subcutaneous and perigastric fatty-tissue cefazolin concentrations (Table 2). During surgery, the free-plasma cefazolin concentrations exceeded the MIC 90 of the *S. aureus* resistance breakpoint (Fig. 1). The free-plasma cefazolin concentrations were significantly higher in Group A than in Group B ($P < 0.0001$) (Fig. 1). There were no differences regarding the intraoperative management between Group A and Group B (Table 3). Finally, no SSI and no side-effects from cefazolin were recorded.

Discussion

This study discusses the largest cohort of moderately to severely obese patients, in which the blood and fatty-tissue concentrations of cefazolin were studied. A single injection of cefazolin 4 g i.v. appears to provide high cefazolin concentrations in fatty tissues and plasma in moderately obese patients undergoing a moderate-duration surgery.

Several important conclusions can be drawn from our study. Firstly, there was no significant difference in perigastric fatty-tissue cefazolin concentrations between moderately to severely obese patients, even if the free-plasma cefazolin

concentrations for the active form of cefazolin were lower in severely obese patients in comparison with obese patients. Although there is no obvious explanation for this finding, low albumin plasma concentrations could induce an increase in the volume of distribution,¹¹ leading to lower cefazolin plasma concentrations. Nevertheless, in both groups, the concentration of free plasma was drastically higher than the *S. aureus* resistance breakpoint.

Previous studies have mentioned that cefazolin administration significantly decreased SSI after bariatric surgery.⁹ However, the exact dosage to be administered in moderately and severely obese patients remains controversial. Edmiston and colleagues²⁰ suggested that the administration of cefazolin 2 g may be insufficient in patients with $\text{BMI} \geq 50 \text{ kg m}^{-2}$ during bypass surgery, and this finding was also corroborated in severely obese patients after Caesarean delivery.¹⁹ Conversely, others suggested that a 2 g injection should be enough to provide adequate antibiotic coverage, provided the surgery lasts less than 5 h.²¹ In a retrospective cohort study, obese and non-obese patients displayed similar rates of SSI with cefazolin 2 g coverage.²² On the other hand, during Caesarean delivery, the administration of cefazolin 2 g did not provide adequate adipose concentrations, especially in women with a $\text{BMI} > 40 \text{ kg m}^{-2}$, and a 3 g injection could therefore be proposed in this setting.²³ Recent results pointed out that a cefazolin 2 g injection would provide adequate coverage in obese patients,²⁴ but too few severely obese patients were included to verify this finding in this subgroup of patients. These results explain the discrepancies between North American¹² and French guidelines.¹³ The dosages of cefazolin used in this specific setting are, therefore, highly variable and range from 2 to 4 g. We, therefore, provide data in a large cohort of patients with a BMI of between 40 and 65 kg m^{-2} .

Some authors²⁵ have pointed out that a pharmacokinetic study involves evaluation of antibiotic dosages in tissues, and interstitial space fluid or muscles. Owing to modifications of blood volume, general and local blood flow, or renal clearance because of obesity or surgery,^{26–28} the diffusion of antibiotics could be altered, rendering their efficacy on pathogens unknown. In our study, the concentration of cefazolin in the interstitial space fluid was not studied. The only technique allowing measurement of free cefazolin concentrations in the interstitial fluid is microdialysis, which remains the gold standard.²⁹ We did not perform a microdialysis pharmacokinetic analysis, which has nonetheless several drawbacks: it

Table 2 Pharmacokinetic data of fatty-tissue cefazolin concentrations in a cohort of 116 obese patients. Cefazolin concentration in subcutaneous and deep fatty tissue expressed as $\mu\text{g g}^{-1}$ of fatty tissue. The results are displayed as the mean (standard deviation) during the surgical procedure. Student's t-test. AUC was calculated with the trapezoidal rule. AUC, area under the cefazolin concentration in fatty tissue–time curve

Cefazolin concentration	Group A, n=79	Group B, n=37	P-value
Subcutaneous fatty tissue T_0 ($\mu\text{g g}^{-1}$)	12.2 (5.4)	12 (6.1)	0.7
Subcutaneous fatty tissue T_{end} ($\mu\text{g g}^{-1}$)	9.0 (4.9)	7.8 (4.2)	0.2
AUC subcutaneous fatty tissue ($\mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$)	10 (5.3)	9.3 (3.9)	0.6
Perigastric fatty tissue T_0 ($\mu\text{g g}^{-1}$)	9.9 (4.9)	9.9 (5.4)	0.7
Perigastric fatty tissue T_{end} ($\mu\text{g g}^{-1}$)	8 (4.3)	7.3 (4.3)	0.4
AUC deep fatty tissue ($\mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$)	8.4 (4.5)	8.2 (4.4)	0.9
AUC _{perigastric fatty tissue} /AUC _{free plasma}	0.34 (0.21)	0.42 (0.22)	0.17
AUC _{subcutaneous fatty tissue} /AUC _{free plasma}	0.40 (0.24)	0.48 (0.27)	0.25

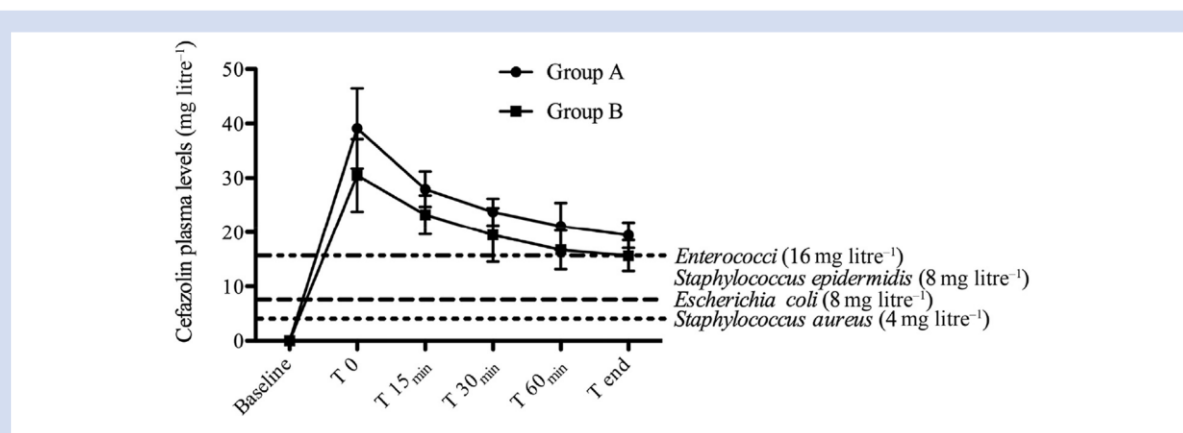


Fig 1. Plasma free cefazolin concentrations during surgery in the group of obese (Group A) and severely obese patients (Group B). The figure shows free cefazolin plasma concentrations during surgery between the patients in Group A ($40 \leq \text{BMI} \leq 50 \text{ kg m}^{-2}$) and in Group B ($50 < \text{BMI} \leq 65 \text{ kg m}^{-2}$). Data are shown with mean and $\text{IC}_{95\%}$. The antibiotic resistance breakpoints of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus*, and *Staphylococcus epidermidis* to cefazolin are also shown. A 4 g injection could be insufficient in case of microorganisms with an elevated minimum inhibitory concentration, especially Gram-negative bacilli, for longer-duration surgery, and in morbidly obese patients. Cefazolin plasma concentrations are significantly higher in Group A compared with Group B ($P < 0.0001$; two-way analysis of variance).

Table 3 Intraoperative management between obese (Group A: $40 \leq \text{BMI} \leq 50 \text{ kg m}^{-2}$) and severely obese patients (Group B: $50 < \text{BMI} \leq 65 \text{ kg m}^{-2}$)

	Group A, n=79	Group B, n=37	P-value
Cefazolin infusion time (min)	8.9 (5)	9.1 (4.4)	0.8
Time between the end of cefazolin infusion and surgical incision (min)	39.7 (19.8)	35.4 (14.8)	0.2
Estimated blood loss (ml)	42.4 (80.5)	68.9 (100)	0.2
Vascular expansion (ml)	731 (229)	840 (311)	0.1

requires a time-consuming calibration and a skilled operator, and usually deals with subcutaneous fatty tissue¹¹ and not perigastric fatty tissue. Because of the number of patients and the time in the operating theatre, microdialysis was not possible. The concentration of cefazolin in the fatty tissue cannot be considered as free (i.e. active) cefazolin concentration at the site of infection, which is the main limit of our study. The samples were obtained by grinding up fatty tissues. As a consequence, the dilution of cefazolin induced by mixing intracellular and extracellular fluids results in the underestimation of cefazolin concentration, which is usually located in the extracellular compartment.³⁰ Thus, the cefazolin concentration measured in fatty tissues is only a surrogate value of active cefazolin concentration. More specifically, we did not study muscles and interstitial space concentrations to ascertain that a cefazolin 4 g administration is sufficient, especially in severely obese patients. This is a clear limitation, but the active concentration of cefazolin in tissues should be above this target with this dosage. We, therefore, believe that a preoperative cefazolin 4 g administration, in accordance with the French recommendations,¹³ should provide an adequate

antibiotic coverage in obese patients undergoing a moderate duration of surgery, considering a $4 \mu\text{g g}^{-1}$ tissue concentration target. Recent studies suggest that continuous infusion can increase the achievement of target plasma concentrations with even lower total doses of cefazolin in surgical patients.³¹

The pharmacokinetic target was cefazolin concentrations above the MIC of pathogens involved in SSI throughout the surgery. The cefazolin concentrations exceeded the MIC 90 of *S. aureus* resistance breakpoint for nearly all patients in subcutaneous fatty tissue and all patients in the plasma. For a tissue target of $2 \mu\text{g g}^{-1}$ instead of $4 \mu\text{g g}^{-1}$, based on the MIC 90 $\leq 2 \text{ mg litre}^{-1}$ usually observed,²³ 100% of patients in Groups A and B had subcutaneous fatty-tissue cefazolin concentrations above this target at the end of the surgery. Other pathogens involved in SSI, such as *Staphylococcus epidermidis* or the Enterobacteriaceae may exhibit a higher MIC to cefazolin.¹⁶ In this context, the administration of cefazolin 4 g could be insufficient. Nevertheless, in our study, no SSI was recorded and no cefazolin-related side-effects noted. Our data suggest that an administration of cefazolin 4 g provides high antibiotic tissue concentrations for Methicillin susceptible *Staphylococcus Aureus*, Gram-negative bacilli with low MIC, in short-duration surgery, and non-severely obese patients.

There is a sampling bias in our study, but was limited, as one surgeon performed all procedures. Extrapolation to longer surgery and simulation of a different dosage regimen scheme allowing higher coverage to more resistant strains should be performed by calculating the population pharmacokinetic model mean from these data. We included 79 patients in Group A as per the power calculation, but we did not achieve our goal in Group B. However, this remains the largest cohort to date in obese and severely obese patients.

Although we do not provide cefazolin extracellular concentrations, this study suggests that cefazolin 4 g administered before operation provides a high fatty-tissue antibiotic concentration, for short-duration surgery, in moderately obese patients. In severely obese patients, longer surgery, or

bacterial strains with elevated MIC, such as some Gram-negative bacilli, this injection could remain insufficient.

Authors' contributions

Study design: R.D., L.R., E.D., M.G., A.R., K.A.
 Patient inclusion: E.L., L.R., V.A., R.D., A.R.
 Sample collection: E.L., L.R., V.A., R.D., A.R.
 Data analysis: R.C., K.A., E.D., M.G.
 Statistical analysis: L.P.
 Pharmacological sample analysis: E.D., M.G.
 Writing paper: R.C., E.D., M.G., K.A.
 Manuscript approval: R.C., K.A., R.D., L.R., L.P., E.L., E.D., M.G., A.R.

Declaration of interest

K.A. has received honoraria from Laboratoire Français du fractionnement et des Biotechnologies, Fresenius, and Baxter.

Funding

University Hospital of Nantes (grant number BRD 11/6-R).

References

- Ng M, Fleming T, Robinson M, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2014; **384**: 766–81
- Sjöström L, Lindroos A-K, Peltonen M, et al. Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery. *N Engl J Med* 2004; **351**: 2683–93
- Burke JP. Infection control—a problem for patient safety. *N Engl J Med* 2003; **348**: 651–6
- Falagas ME, Kompoti M. Obesity and infection. *Lancet Infect Dis* 2006; **6**: 438–46
- Crabtree TD, Codd JE, Fraser VJ, Bailey MS, Olsen MA, Damiano Jr RJ. Multivariate analysis of risk factors for deep and superficial sternal infection after coronary artery bypass grafting at a tertiary care medical center. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2004; **16**: 53–61
- Tjeertes EEKM, Hoeks SSE, Beks SSBJC, Valentijn TTM, Hoofwijk AAGM, Stolker RJR. Obesity—a risk factor for postoperative complications in general surgery? *BMC Anesthesiol* 2015; **15**: 200–7
- Spaniolas K, Kasten KR, Mozer AB, et al. Synchronous ventral hernia repair in patients undergoing bariatric surgery. *Obes Surg* 2015; **25**: 1864–8
- van Kasteren MEE, Manniën J, Ott A, Kullberg BJ, de Boer AS, Gyssens IC. Antibiotic prophylaxis and the risk of surgical site infections following total hip arthroplasty: timely administration is the most important factor. *Clin Infect Dis* 2007; **44**: 921–7
- Pories WJ, van Rij AM, Burlingham BT, Fulghum RS, Meelheim D. Prophylactic cefazolin in gastric bypass surgery. *Surgery* 1981; **90**: 426–32
- Tucker CE, Lockwood AM, Nguyen NH. Antibiotic dosing in obesity: the search for optimum dosing strategies. *Clin Obes* 2014; **4**: 287–95
- Brill MJE, Houwink API, Schmidt S, et al. Reduced subcutaneous tissue distribution of cefazolin in morbidly obese versus non-obese patients determined using clinical microdialysis. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 715–23
- Bratzler DW, Dellinger EP, Olsen KM, et al. Clinical practice guidelines for antimicrobial prophylaxis in surgery. *Surg Infect (Larchmt)* 2013; **14**: 73–156
- Société française d'anesthésie et. Antibioprophylaxie en chirurgie et médecine interventionnelle (patients adultes). Actualisation 2010 Antibioprophylaxie in surgery and interventionnelle medicine (adult patients). Actualization 2010. *Ann Fr Anesth Reanim* 2011; **30**: 168–90
- van Kralingen S, Taks M, Diepstraten J, et al. Pharmacokinetics and protein binding of cefazolin in morbidly obese patients. *Eur J Clin Pharmacol* 2011; **67**: 985–92
- Bruce J, Russell EM, Mollison J, Krukowski ZH. The measurement and monitoring of surgical adverse events. *Health Technol Assess* 2001; **5**: 1–194
- European committee on antimicrobial susceptibility testing [Internet]. Available from: <http://www.eucast.org> [Accessed 27 September 2016].
- Koopman E, Nix DE, Erstad BL, et al. End-of-procedure cefazolin concentrations after administration for prevention of surgical-site infection. *Am J Health Syst Pharm* 2007; **64**: 1927–34
- Définition des Infections Associées aux Soins. 2007. p. 1–11. Available online: solidarite-sante.gouv.fr/IMG/pdf/rapport_vcourte.pdf
- Pevzner L, Swank M, Krepel C, Wing DA, Chan K, Edmiston CE. Effects of maternal obesity on tissue concentrations of prophylactic cefazolin during cesarean delivery. *Obstet Gynecol* 2011; **117**: 877–82
- Edmiston Jr CE, Krepel C, Kelly H, et al. Perioperative antibiotic prophylaxis in the gastric bypass patient: do we achieve therapeutic levels? *Surgery* 2004; **136**: 738–47
- Ho VP, Nicolau DP, Dakin GF, et al. Cefazolin dosing for surgical prophylaxis in morbidly obese patients. *Surg Infect (Larchmt)* 2012; **13**: 33–7
- Unger NR, Stein BJ. Effectiveness of pre-operative cefazolin in obese patients. *Surg Infect (Larchmt)* 2014; **15**: 412–6
- Swank ML, Wing DA, Nicolau DP, McNulty JA. Increased 3-gram cefazolin dosing for cesarean delivery prophylaxis in obese women. *Am J Obstet Gynecol* 2015; **213**: 415.e1–8
- Chen X, Brathwaite CEM, Barkan A, et al. Optimal cefazolin prophylactic dosing for bariatric surgery: no need for higher doses or intraoperative redosing. *Obes Surg* 2017; **27**: 626–9
- Barbour A, Schmidt S, Rout WR, Ben-David K, Burkhardt O, Derendorf H. Soft tissue penetration of cefuroxime determined by clinical microdialysis in morbidly obese patients undergoing abdominal surgery. *Int J Antimicrob Agents* 2009; **34**: 231–5
- Brunner M, Pernerstorfer T, Mayer BX, Eichler HG, Müller M. Surgery and intensive care procedures affect the target site distribution of piperacillin. *Crit Care Med* 2000; **28**: 1754–9
- Kennedy JM, Riji AM. Effects of surgery on the pharmacokinetic parameters of drugs. *Clin Pharmacokinet* 1998; **35**: 293–312
- Sladen RN. Effect of anesthesia and surgery on renal function. *Crit Care Clin* 1987; **3**: 373–93
- Schmidt S, Banks R, Kumar V, Rand KH, Derendorf H. Clinical microdialysis in skin and soft tissues: an update. *J Clin Pharmacol* 2008; **48**: 351–64

30. Mouton JW, Theuretzbacher U, Craig WA, Tulkens PM, Derendorf H, Cars O. Tissue concentrations: do we ever learn? *J Antimicrob Chemother* 2008; **61**: 235–7
31. Naik BI, Roger C, Ikeda K, et al. Comparative total and unbound pharmacokinetics of cefazolin administered by bolus versus continuous infusion in patients undergoing major surgery: a randomized controlled trial. *Br J Anaesth* 2017; **118**: 876–82

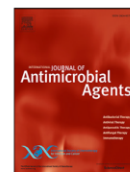
Handling editor: A.R. Absalom

Annexe IV



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Antimicrobial Agents

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijantimicag

Prophylactic cefazolin concentrations in morbidly obese patients undergoing sleeve gastrectomy: do we achieve targets?

Matthieu Grégoire^{a,b,*}, Romain Dumont^c, Ludovic Ronchi^c, Jean-Baptiste Woillard^{d,e}, Vincent Atthar^c, Eric Letessier^f, Raphaël Cinotti^c, Antoine Roquilly^{b,c}, Guillaume Deslandes^a, Pascale Jolliet^a, Karim Asehnoune^{b,c}, Eric Dailly^{a,b}

^a Clinical Pharmacology Department, University Hospital of Nantes, Nantes, France

^b EA 3826 Thérapeutiques Cliniques et Expérimentales des Infections, University of Nantes, Nantes, France

^c Intensive Care Unit, Anaesthesia and Critical Care Department, University Hospital of Nantes, Nantes, France

^d Department of Pharmacology and Toxicology, CHU Limoges, Limoges, France

^e INSERM UMR 850, University of Limoges, Limoges, France

^f Digestive Diseases Institute, University Hospital of Nantes, Nantes, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 October 2017

Accepted 24 February 2018

Available online xxx

Keywords:

Population pharmacokinetics

Surgical prophylaxis

Bariatric surgery

Cefazolin

ABSTRACT

Morbid obesity is known to increase the risk of surgical site infections. Optimal concentrations of prophylactic antibacterial drugs are required. Using Monte Carlo simulations, the aim of this work was to build a population pharmacokinetics model for a morbidly obese population to assess a 4000-mg dose of cefazolin recommended by the guidelines and to propose new administration schemes. One hundred and seventeen morbidly obese patients (mean body mass index, 46.95 kg/m²) received 4000 mg of cefazolin intravenously before sleeve gastrectomy. Using population pharmacokinetics modelling and Monte Carlo simulations, probabilities of target attainment (PTAs) (subcutaneous tissue concentration of cefazolin above the minimum inhibitory concentration (MIC) throughout the surgical procedure was targeted) were determined. For *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp., which are the most frequent species isolated from post-surgical infections in bariatric surgery (MIC usually ≤ 2 mg/L), PTA remains greater than 0.9 until 2 h after administration of 4000 mg of cefazolin. For MIC up to 4 mg/L, efficient prophylaxis was checked until 1 h after the initial administration. A 3000-mg regimen followed by a continuous infusion (1000 mg/h) achieves these two targets until 4 h after the loading dose. A 2000-mg and a 3000-mg regimen do not achieve sufficient concentrations. According to the duration of surgery and MIC values, an initial administration of 4000 mg should be sufficient, but for extended surgeries continuous infusion can be considered.

© 2018 Elsevier B.V. and International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

1. Introduction

The incidence of morbid obesity has reached epidemic levels in many parts of the world [1]. Bariatric surgery is the only efficient strategy to treat it [2,3]. Bariatric surgery is offered to overweight patients to reduce the burden of their pathology, but this type of intervention increases the risk of infection [4]. Obesity is known to increase infectious morbidity and mortality and to be an independent risk factor for surgical site infections (SSIs) [5]. SSIs, defined as infections occurring within 30 days after a surgical operation, are classified as either superficial or deep wound infections or infections involving organs or body spaces [6,7]. Most SSIs

are superficial wound infections [8]. For antimicrobial prophylaxis for bariatric procedures, cefazolin, a first-generation cephalosporin, was one of the first agents to show proven efficiency [4]. Currently, it is the most commonly used agent because of its broad spectrum, safety and experience of use [7,9]. Despite its extensive use in obese patients, there are limited data available describing cefazolin pharmacokinetics in this patient population. Previous studies suggest that this patient group may experience altered pathophysiology [10,11]. The usual dosing strategy (2000 mg administered before surgery) may fail to provide adequate perioperative prophylaxis in different bariatric surgeries [10–12]. One study found that a 2000-mg dose was sufficient in obese patients to prevent SSIs with no significant differences from non-obese patients [13]. However, in this study, the rate of SSIs remained relatively high in the two groups (7 of 99 patients in the obese group). Another study, based on tissue concentrations, showed that 2000 mg before surgery

* Corresponding author. Laboratoire de Pharmacologie clinique, Hôtel Dieu, 9 Quai Moncoussu, 44093 Nantes Cedex, France.

E-mail address: matthieu.gregoire@chu-nantes.fr (M. Grégoire).

<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.02.015>

0924-8579/© 2018 Elsevier B.V. and International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

Please cite this article as: M. Grégoire et al., Prophylactic cefazolin concentrations in morbidly obese patients undergoing sleeve gastrectomy: do we achieve targets? International Journal of Antimicrobial Agents (2018), <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.02.015>

allowed coverage for bacteria with minimum inhibitory concentration (MIC) <1 mg/L, especially because of the post-antibiotic effect [14]. These results based on a few patients should be confirmed. The American Society of Health-System Pharmacists (ASHP), the Infectious Diseases Society of America (IDSA), the Surgical Infections Society (SIS) and the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) currently recommend 2000 mg of cefazolin before surgery followed by a second dose 4 h after the first for patients weighing more than 80 kg, and 3000 mg before surgery followed by a second dose 4 h after the first for patients weighing more than 120 kg. The French Society of Anaesthesia and Reanimation (SFAR) recommends 4000 mg of cefazolin before surgery followed by a second dose of 2000 mg 4 h after the first [9,15]. These guidelines are based on very few pharmacokinetics data and, to our knowledge, these dosing strategies for sleeve gastrectomy have not been investigated previously despite the increasing popularity of bariatric surgery [7]. Here, we aimed to investigate the pharmacokinetics parameters of cefazolin in obese patients undergoing sleeve gastrectomy who received an intravenous dose of cefazolin of 4000 mg before surgery. From these data, the duration of prophylaxis cover and the most appropriate doses were determined using a population pharmacokinetics approach and Monte Carlo simulations. The results obtained were then compared with current guidelines.

2. Materials and methods

2.1. Patients and ethics

This open-label, prospective study was conducted between 1 May 2012 and 1 March 2015 at Nantes University Hospital.

Morbidly obese patients aged 18–70 years, with a body mass index (BMI) ≥ 40 and ≤ 65 kg/m² and undergoing sleeve gastrectomy were considered for inclusion in the study. Patients were excluded from the study in cases of pregnancy, ongoing treatment by cefazolin, moderate or severe renal impairment defined by a Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) estimated glomerular filtration rate (eGFR) ≤ 60 mL/min or known β -lactam allergy.

Written informed consent was obtained from all patients enrolled in the study. The study design and consent form were approved by the local human research and ethics committee of Tours (no. BRD 11/6-R), and the study was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki (22 October 2008 version) and in accordance with French legislation. A license was issued by Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé (ANSM). This study was registered at ClinicalTrials.gov under identifier NCT01537380.

2.2. Study protocol

Patients received cefazolin 4000 mg intravenously 30 min before the incision according to the SFAR guidelines [15]. Patients received remifentanyl/propofol associated with cisatracurium adjusted for ideal body weight for general anaesthesia. A perfusion line devoted to the pharmacological doses was then inserted in the patient's contralateral arm.

The same surgeon performed all surgical procedures (E.L.). Blood samples for determination of total and unbound cefazolin concentrations were collected at incision time and 15 min, 30 min, 60 min (if the surgery was longer than 60 min) after incision and at the time of wound closure. Samples were centrifuged for 15 min to obtain plasma samples and then stored immediately at -20°C until analysis. In addition, the surgeon performed subcutaneous fatty tissue biopsy just after the surgical incision and at the end of the procedure just before skin closure.

2.3. Quantification of cefazolin concentrations

Total cefazolin plasma concentrations were measured using a high-performance liquid chromatography (HPLC) assay coupled with ultraviolet detection. A 1-mL aliquot of plasma was added to 1 mL of acetonitrile for protein precipitation. The mixture was then mixed in a vortex and centrifuged at $1800 \times g$ for 5 min at 4°C . The supernatant layer (1.6 mL) was extracted with 8 mL of dichloromethane. The tubes were shaken horizontally for 10 min and centrifuged at $1800 \times g$ for 5 min at 4°C . Fifty microlitres of the upper aqueous layer was injected into the HPLC system (Agilent 1200 Series, Agilent, Palo Alto, CA). The separation was performed on a Symmetry C18, 5- μm column (250×4.6 mm inner diameter) (Waters, Milford, MA, USA). The absorbance peak for cefazolin was detected by ultraviolet absorbance at 265 nm.

Unbound cefazolin plasma concentrations were determined according to a previously validated method [10]. Plasma samples were thawed and incubated at 37°C for 20 min. A 1-mL sample of plasma was then transferred into a Millipore 4104 Centrifree YM-30 cup (Millipore Merck, Cork, Ireland), and the cups were centrifuged for 30 min at $1000 \times g$. Fifty microlitres of the clear filtrate were injected into the HPLC system under the chromatographic conditions described above.

Whole tissue samples were rinsed with saline solution and blotted to remove superficial residual blood. Blood contamination was checked by visual examination of each sample. Three fragments were then taken from different locations in each sample and weighed. These fragments were sonicated individually and centrifuged at $13000 \times g$ for 5 min. Five hundred microlitres of supernatant were mixed with 500 μL of acetonitrile and centrifuged at $13000 \times g$ for 5 min. Eight hundred microlitres of the supernatant were added to dichloromethane (4 mL). The tubes were shaken horizontally for 10 min and centrifuged at $1800 \times g$ for 5 min at 4°C . Fifty microlitres of the upper aqueous layer was injected into the HPLC system under the chromatographic conditions described above. The tissue concentration for each sample was determined as the mean of the concentrations of the three fragments.

The limits of quantitation were 1 mg/L in plasma and 1 $\mu\text{g/g}$ in fatty tissue. The methods were accurate (inter-day and intra-day inaccuracy <15%) and showed good precision (inter-day and intra-day imprecision <15%).

2.4. Population pharmacokinetics analysis

Cefazolin pharmacokinetics analysis was performed using a non-parametric method implemented in Pmetrics (Laboratory of Applied Pharmacokinetics, University of Southern California, CA, USA) [16]. Pmetrics is a library package for R using Fortran.

The relationship between total and unbound plasma cefazolin was explored by regression analysis using WinReg 4.0 (Jean Debord, Limoges, France). Linear, polynomial, exponential and saturation regression models were tested.

An initial analysis was conducted to estimate the parameters of the structural model without covariates. Three kinds of structural model were tested: a one-compartment model, a two-compartment model and a three-compartment model. For each model, a linear and a saturation protein binding model were assessed.

The selection of the structural model was based on the Akaike information criterion (AIC value) and Bayesian information criterion (BIC value). The model displaying the lowest AIC and BIC values was chosen. Models were also assessed by visual examination of the diagnostic plots (observed concentration vs. individual predicted concentrations, weighted residuals vs. time or individual predicted concentrations, visual predictive checks). Convergence of all runs was required to investigate them.

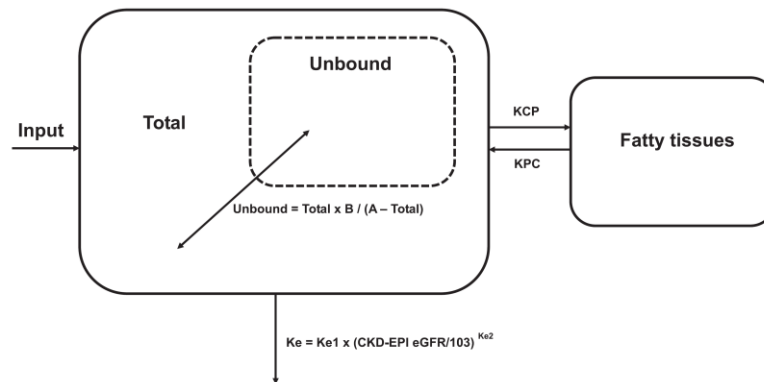


Fig. 1. Representation of the population pharmacokinetics model. A two-compartment model integrating a saturation protein binding model was chosen. Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) estimated glomerular filtration rate (eGFR) was integrated as a covariate of the elimination constant (K_e). K_{CP} , constant for transfer from the peripheral compartment to the central compartment; K_{PC} , constant of transfer from the central compartment to the peripheral compartment; K_{eC} , constant of transfer from the peripheral compartment to the central compartment.

The influence of covariates on the parameters was assessed using a backward stepwise process and visual examination of the parameter vs. covariate plot. Linear, exponential, power associations and allometric scaling were assessed. The following covariates were tested: age, sex, total body weight, BMI, body surface area estimated by the formula of Dubois, ideal body weight by the formula of Hammond, creatinine serum concentration measured by enzymatic assay (Roche, Basel, Switzerland), serum albumin concentration, the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) eGFR and MDRD eGFR [17,18].

The assay error polynomial equation was defined as $C0: 0.50$, $C1: 0.05$, $C2$ and $C3: 0.00$ for each output equation with an additive coefficient (lambda with 0.5 as starting value).

2.5. Monte Carlo simulations of dosage regimens

The final population pharmacokinetics validated model was used to perform Monte Carlo simulations. Cefazolin pharmacokinetics profiles (including total, unbound and subcutaneous tissue concentrations) from 1000 patients were simulated and the simulated subcutaneous tissue concentrations were analysed after 4 different administration schemes: 2000 mg before surgery as prescribed by American guidelines for patients weighing between 80 and 120 kg, 3000 mg before surgery as prescribed by American guidelines for patients weighing more than 120 kg, 4000 mg before surgery as prescribed by French guidelines and 3000 mg before surgery followed by a 1000 mg/h continuous infusion. In all dosing schemes, a loading dose administered in 9 min was simulated.

For each simulated patient, simulated subcutaneous fatty tissue concentrations were compared with seven different values of MIC (0.25, 1, 2, 4, 8, 16, 32 $\mu\text{g/g}$) at three different times from the initial administration of cefazolin (1 h, 2 h and 4 h) during surgery. Fatty tissue density was considered to be 1 g/mL according to Martin et al. [19] so MIC values, usually expressed in mg/L, were converted to $\mu\text{g/g}$ with a 1:1 ratio for comparison with data simulated in fatty tissues. For effective prophylaxis, subcutaneous fatty tissue cefazolin concentrations above MIC should be targeted for the duration of the surgical procedure with a $\text{PTA} \geq 0.9$.

3. Results

One hundred and seventeen morbidly obese patients with a mean body weight of 129.9 kg (range, 95–182 kg) were included (Table 1). Four hundred and thirty-four total concentrations, 380

Table 1
Demographic data in a cohort of 117 obese patients.

Variable (unit)	Mean (SD) or n (%)	Range
Age (years)	41.97 (10.60)	23–68
Female gender	88 (75.21%)	
Height (m)	1.66 (0.09)	1.28–1.95
Weight (kg)	129.91 (17.63)	95–182
Ideal body weight (kg)	61.70 (10.901)	25.20–97.50
BMI (kg/m^2)	46.95 (5.39)	40.1–65
Body surface area (m^2)	2.31 (0.20)	1.76–2.98
Serum creatinine concentration ($\mu\text{mol/L}$)	65.37 (12.51)	36–111
MDRD eGFR ($\text{mL/min per } 1.73 \text{ m}^2$)	103.10 (22.11)	58–186
CKD-EPI eGFR ($\text{mL/min per } 1.73 \text{ m}^2$)	103.13 (16.00)	55.8–132.8
Serum albumin concentration (g/L)	37.62 (3.33)	28.7–45.5
Wound closure post dose (min)	104.90 (28.38)	60–227

Ideal body weight (IBW) was estimated by the formula of Hammond ($\text{IBW} = 48 + 1.1 \times (\text{height} - 150 \text{ cm})$ [if male] or $45 + 0.9 \times (\text{height} - 150 \text{ cm})$ [if female]). Body surface area (BSA) was estimated by the formula of Dubois ($\text{BSA} = \text{weight} \times \text{height} \times 71.84 / 10\,000 \text{ m}$ where height is expressed in cm). MDRD eGFR, glomerular filtration rate estimated by the MDRD equation ($\text{eGFR} = 175 \times (\text{Scr})^{-1.154} \times (\text{age})^{-0.203} \times 0.742$ [if female] $\times 1.212$ [if African American]) where Scr is serum creatinine in mg/dL. CKD-EPI eGFR, glomerular filtration rate estimated by the CKD Epidemiology Collaboration equation ($\text{eGFR} = 141 \times \min(\text{Scr}/\kappa, 1)^{\alpha} \times \max(\text{Scr}/\kappa, 1)^{-1.209} \times 0.993^{\text{age}} \times 1.018$ [if female] $\times 1.159$ [if Black], where Scr is serum creatinine in mg/dL, κ is 0.7 for females and 0.9 for males, α is -0.329 for females and -0.411 for males, min indicates the minimum of Scr/κ or 1, and max indicates the maximum of Scr/κ or 1). BMI, body mass index; SD, standard deviation.

unbound concentrations and 238 subcutaneous fatty tissue concentrations were used to build the model.

A two-compartment model including a saturation binding model was chosen as the basic pharmacokinetics model (Fig. 1). The relationship between unbound and total concentrations was best described by a saturable binding model as follows: total concentration = (unbound concentration $\times A$) / (unbound concentration + B). This relationship was obtained from the classic ligand-receptor relationship after approximations assuming that unbound concentrations are negligible compared with $A \times$ unbound concentrations. Thus, A could be considered as the total density of binding sites and B as the equilibrium dissociation constant.

GFR estimated by the CKD-EPI formula was the only covariate that significantly affected the pharmacokinetics of ceftriaxone. This covariate was integrated into the elimination constant K_e using a power model where eGFR is weighted by the median of the population (103 mL/min per 1.73 m^2). The estimates of the population pharmacokinetics parameters are presented in Table 2.

Table 2
Population pharmacokinetics parameter estimates.

Parameter (unit)	Final model parameter estimate, median (range)	95% confidence interval of the median	Variance	95% confidence interval of the variance
K_{e1} (/h)	0.885 (0.2–2)	0.706–1.150	0.364	0.280–0.437
K_{e2} (/h)	1.599 (0.001–5)	1.091–2.088	0.869	0.663–1.118
K_{CP} (/h)	105.950 (0.2–200)	82.520–126.665	47.365	36.966–59.283
K_{PC} (/h)	113.121 (5–200)	91.657–129.516	51.426	40.074–60.583
V (L)	7.061 (2–22)	6.499–8.152	2.099	1.443–2.765
A (mg/L)	20872.999 (1–60000)	19796.590–22255.750	7376.171	5477.790–8941.266
B (mg/L)	3415.898 (1–5000)	2818.043–3713.673	929.265	595.679–1179.914
V_p (L)	131.213 (20–250)	109.446–152.154	45.302	35.290–56.045

A, constant A of the binding equation; B, constant B of the binding equation; K_{CP} , constant of transfer from the central compartment to the peripheral compartment; K_e , constant of elimination from the central compartment; K_{PC} , constant of transfer from the peripheral compartment to the central compartment; V, volume of the central compartment; V_p , volume of the peripheral compartment. Median (Min – Max) value of unbound fraction from individual data was 14.07 % (5.16 – 25.15).

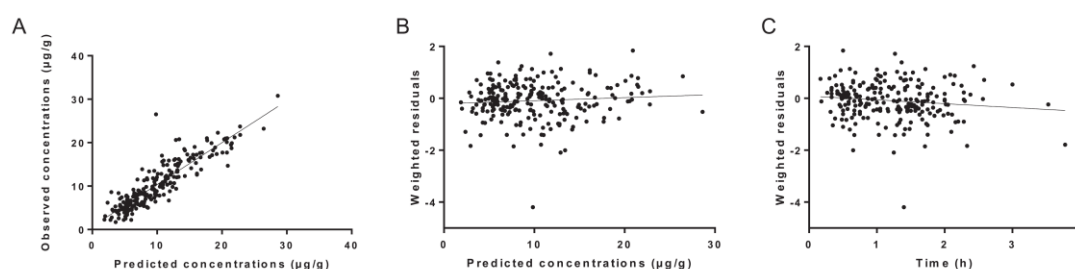


Fig. 2. Graphical representations for validation of the population pharmacokinetics model of subcutaneous tissue cefazolin concentrations. (A) Observed concentrations were plotted against individual predicted concentrations (mg/L), $R^2 = 0.8041$. (B) Weighted residuals were plotted against individual predicted concentrations (mg/L). (C) Weighted residuals were plotted against time post-administration (h).

Diagnostic plots for subcutaneous tissue concentrations are shown in Fig. 2. Equations established by linear regression of observed concentrations vs. individual predicted concentrations are close to the identity line and analysis of residuals appears to be satisfactory. Diagnostic plots for total and unbound concentrations are represented in supplementary data Fig. S1. Figure 3 shows the visual predicted checks obtained for 1000 simulated patients for total (A), unbound (B) and subcutaneous tissue (C) concentrations. Proportion of concentrations between the 0.05 and the 0.95 quantiles was 0.901 for subcutaneous tissue concentrations, showing that the model correctly described the observed concentrations.

From the validated model, 1000 subcutaneous tissue concentration simulations were performed with 4 different administration schemes at 3 times after cefazolin administration. Median of the population CKD-EPI eGFR (103 mL/min per 1.73 m^2) was chosen for the simulations. Simulations show that the four regimens display concentrations above 2 µg/g 1 h after the beginning of administration but only the 4000-mg scheme and the continuous-infusion scheme achieve concentrations above 4 µg/g (probabilities of 0.936 and 0.953, respectively) (Fig. 4A). Two hours after the beginning of administration, only the 4000-mg scheme and the continuous-infusion scheme achieved concentrations above 2 µg/g (probabilities of 0.940 and 0.978, respectively, vs. 0.895 for the 3000-mg scheme and 0.771 for the 2000-mg scheme) and the continuous-infusion scheme is the only one to exceed 4 µg/g (probability of 0.936 vs. 0.771 for the 4000-mg scheme) (Fig. 4B). For the extended time intervention (4 h), the continuous-infusion scheme is the only one to approach these two targets (probabilities of 0.973 for 2 µg/g and 0.907 for 4 µg/g); the probabilities of the 4000-mg scheme are 0.609 and 0.339 for 2 or 4 µg/g , respectively (Fig. 4C).

As the model included the renal function, the influence of this covariate on PTA was studied. Three different levels of renal function (median, first and third quartiles of the population CKD-EPI eGFR: 103.0, 95.0 and $116.3 \text{ mL/min per } 1.73 \text{ m}^2$, respectively) were simulated and compared for each administration scheme. Conclusions of the PTA are the same at the three levels of renal function

for the 2000-mg scheme. For the 3000-mg scheme, probability of achieving 2 µg/g goes from 0.895 to 0.923 2 h after infusion in the case of $95 \text{ mL/min per } 1.73 \text{ m}^2$ CKD-EPI eGFR and conclusions do not differ at other times. After a 4000-mg scheme or a continuous-infusion scheme, probabilities of achieving 2 µg/g decrease, respectively, from 0.94 to 0.88 and from 0.936 to 0.894 2 h after the beginning of infusion in the case of $116.3 \text{ mL/min per } 1.73 \text{ m}^2$ CKD-EPI eGFR. Conclusions do not differ at other times except in the continuous-infusion scheme where probability of achieving 4 µg/g also decreases from 0.907 to 0.843 in the case of $116.3 \text{ mL/min per } 1.73 \text{ m}^2$ CKD-EPI eGFR.

4. Discussion

The first objective of this work was to generate a population pharmacokinetics model describing the pharmacokinetics of cefazolin in a morbidly obese population. The second objective was to assess the suitability of an intravenous cefazolin dose of 4000 mg before incision, as recommended by French guidelines, to achieve tissue concentrations of cefazolin above the MIC of the most commonly encountered bacteria in SSIs throughout the surgery [20].

This is the largest trial assessing pharmacokinetics of cefazolin for antibacterial prophylaxis of bariatric surgery. One hundred and seventeen morbidly obese patients were included to build the model, whereas 3 previously published studies included less than 40 patients [10–12]. These works evaluated a 2000-mg preoperative regimen, which does not seem to be sufficient to achieve targeted concentrations. Based on these results and according to the French guidelines, we decided to assess a dose of 4000 mg, which has not been evaluated in the context of bariatric surgery [15]. For prophylaxis of caesarean delivery in morbidly obese patients, the use of high doses of cefazolin has been discussed. A recent study reported on a dose of 3000 mg for BMI greater than 30 kg/m^2 ; another study showed no clinical or microbiological superiority of a 4000-mg dose compared with 2000 mg [21,22]. But a recent population study modelled with Pmetrics showed that a 2000-mg dose probably achieved sufficient penetration in adipose tissues [23].

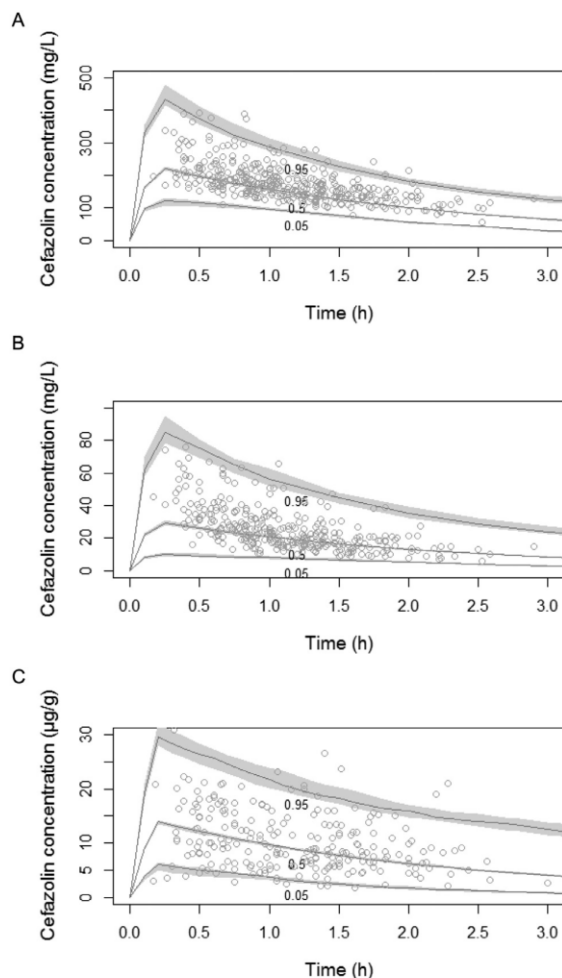


Fig. 3. Visual predictive checks for total (A), unbound (B) and subcutaneous tissue (C) concentrations of cefazolin after an initial dose of 4000 mg administered in 9 min. The 5th, the median and the 95th percentiles of the simulated concentrations in 1000 Monte Carlo simulated patients are presented with the 95% confidence interval. Observed concentrations (open circles) are superimposed on simulated values. For total, unbound and tissue concentrations, 97.1%, 99.4% and 90.1% of patients, respectively, were between the 5th and the 95th percentiles.

Confounding for all types of surgery, another recent study showed no increase in the number of SSIs in obese patients undergoing antibiotic prophylaxis provided by 2000 mg of cefazolin [13].

In accordance with the only published model on a set of antibacterial prophylaxis in bariatric surgery, a two-compartment model was chosen [11]. The medians and the means of the pharmacokinetics parameters estimated by the model were consistent with the results obtained previously using a non-parametric approach population analysis in a morbidly obese patient population undergoing caesarean delivery; the slight differences can be explained by pregnancy, which may modify the parameters (volume of the central compartment = 11.8 L vs. 7.1 L, volume of the peripheral compartment = 80.12 L vs. 131.2 L, clearance = 7.38 L/h vs. 6.25 L/h). However, median values for K_{CP} (constant for transfer from the central compartment to the peripheral compartment) and K_{PC} (constant for transfer from the peripheral compartment to the central compartment) were high (more than 100/h), suggesting that the peripheral compartment is useless for describing plasma cefazolin kinetics, but a two-compartment model was neverthe-

less chosen in order to represent the tissue concentrations. Moreover, VPC (Visual Predictive Checks) values showed overprediction of the variability by the model for predictions of total and unbound concentrations. This limitation appears to be irrelevant for simulations because VPC values are satisfactory for tissue concentrations. In the population used to build the model, we demonstrate the influence of CKD-EPI eGFR on the elimination constant. This influence was expected because cefazolin is almost exclusively eliminated unchanged by the kidneys [24,25]. No other covariates have been found to influence pharmacokinetics parameters, especially weight on the volume of distribution. This could be explained by the fact that cefazolin, like all the β -lactam drugs, is a particularly hydrophilic compound. Adipose tissues contain about 30% water, therefore the volume of distribution of cefazolin is not much influenced by the amount of fat [26]. The homogeneity of the patient population may also explain this finding because the population was exclusively patients with morbid obesity with small weight differences. Similar observations have been described previously in a population of obese women who underwent a caesarean delivery [27]. Inversely, Brill et al. [11], in a study comparing eight morbidly obese patients with seven non-obese patients, reported the influence of total body weight on the volume of distribution. The work of Brill et al. is based on microdialysis, which is the gold standard for sampling unbound drug fractions directly into interstitial space fluids. Moreover, this model included obese and non-obese patients, therefore the population is more heterogeneous than ours and is difficult to compare with our data because of differences in population size, biological values, anthropometric characteristics or age. Serum albumin concentrations surprisingly did not show any impact on binding parameters A and B. This is a possible limitation of the model. This may be due to the particular homogeneity of the study population (mean (standard deviation) serum albumin concentration: 65.37 (12.51) μ mol/L) with no case of undernourishment.

In our study, concentrations of cefazolin in interstitial space fluid were not studied. The only technique allowing measurement of unbound concentrations in the interstitial fluid is microdialysis, which remains the gold standard [28]. We did not perform a microdialysis pharmacokinetics analysis, which has several limitations: it requires a time-consuming calibration and a skilled operator [11]. Because of the number of patients and the time in the operating theatre, microdialysis was not possible. Concentrations of cefazolin in fatty tissue cannot be considered as unbound cefazolin concentrations at the site of infection, which is the main limitation of our study. However, cefazolin is distributed mainly extracellularly in tissues, and cefazolin concentrations in our study were obtained by grinding up fatty tissues. As a consequence, the dilution of cefazolin induced by mixing intracellular and extracellular fluids probably results in an underestimation of concentrations at the site of infection, which are usually located in the extracellular compartment [29].

The most commonly encountered species in wound infections in the context of bariatric surgeries are *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp. [30,31]. The proportion of Gram-negative bacilli is negligible. Cefazolin has a broad antibacterial spectrum but is particularly effective in prevention of infections caused by Gram-positive cocci including *S. aureus*. The MIC level has been used as the pharmacodynamics target in fatty tissues even though its predictive value is discussed. It has been demonstrated that for β -lactam antibacterials such as cefazolin, the stationary concentration (an in vivo susceptibility indicator) is close to the MIC value, which may explain why concentrations in vivo need to be above the MIC, while regrowth of bacteria occurs when concentrations decline below the MIC [32]. Moreover, we considered that the MIC was the easiest susceptibility indicator to obtain. The MIC of methicillin-susceptible *S. aureus* and Streptococci is usually

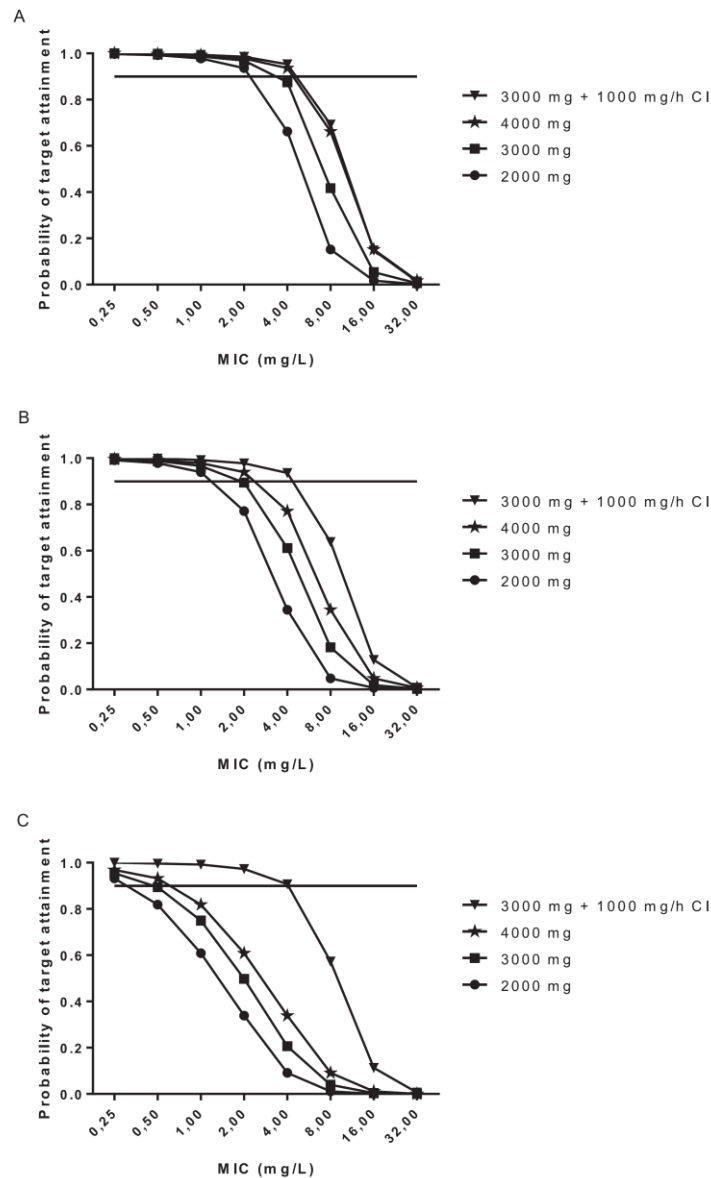


Fig. 4. Probabilities of target attainment 1 h (A), 2 h (B) and 4 h (C) after the initial dose with four different administration schemes: 2000 mg, 3000 mg or 4000 mg in a 9-min infusion as recommended by guidelines or 3000 mg in 9 min followed by a 1000-mg/h continuous infusion. The horizontal line represents a probability of 0.9.

≤ 2 mg/L; the MIC of coagulase-negative Staphylococci is higher (≤ 4 mg/L) [21,33,34].

Our results indicate that the administration of 4000 mg of cefazolin is sufficient for prophylaxis of SSIs caused by sensitive organisms (MIC ≤ 2 mg/L) for at least 2 h. However, the susceptibility of the targeted germs may differ between countries and care facilities, and higher MIC values of 4 mg/L are taken for reference in previous studies [11,35]. As shown in Fig. 4, 2 h after the first administration of 3000 mg, concentrations were not sufficient for prophylaxis of bacteria with MIC of 2 mg/L. These findings validate the French recommendations concerning the dose to be administered before the procedure. However, if tissue concentrations are not sufficient with a targeted MIC value of 4 mg/L, another solution can be proposed. A loading dose of 3000 mg followed by continuous infusion of 1000 mg/h has been assessed and showed adapted

tissue concentrations even when MIC ≤ 4 mg/L, as reported in a recent study [28]. Moreover, this solution results in tissue concentrations above 4 $\mu\text{g/g}$ for at least 4 h. The doses recommended by American guidelines appear to be insufficient for intervention lasting for more than 1 h.

However, as shown in the results, renal function may influence these PTA and an extended eGFR could decrease efficacy of the 4000-mg and the continuous-infusion schemes while a reduced eGFR increase efficacy of the 3000-mg scheme. The renal function is likely to be taken into account in the choice of the dose, in particular in the case of prolonged intervention.

In our work, the mean duration between the first administration and wound closure was around 100 min because the method used (sleeve gastrectomy) allows short interventions. However, in other types of bariatric surgery, such as gastric bypass surgery, the

duration of the intervention can be extended. This type of bariatric surgery affects the same population of morbidly obese patients, so this model could also be used for this [11,12]. However, it seems to be complicated to transpose this model to other surgeries in obese patients such as critically ill patients or women undergoing caesarean delivery [21–23,27,36,37].

In the future, the strategy of continuous infusion proposed here based on simulations needs to be assessed in real life to evaluate the rate and the type of wound infections and to demonstrate a potential clinical superiority for the prevention of SSI in bariatric surgery [31].

Funding

This study was funded by the University Hospital of Nantes. The design and conduct of the trial, as well as the analysis of the trial data and opinions, conclusions and interpretation of the data, are the responsibility of the authors. The authors retained full control of the manuscript content and its conclusions.

Competing interests

None.

Ethical approval

Written informed consent was obtained from all patients enrolled in the study. The study design and consent form were approved by the local human research and ethics committee of Tours (no. BRD 11/6-R) and the study was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki (22 October 2008 version) and in accordance with French legislation. A license was issued by ANSM. This study has been registered at ClinicalTrials.gov under identifier NCT01537380.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ijantimicag.2018.02.015.

References

- World Health Organization. Global database on body mass index accessed 24 June. accessed 24 June <http://apps.who.int/bmi/index.jsp>.
- DeMaria EJ. Bariatric surgery for morbid obesity. *N Engl J Med* 2007;356:2176–83.
- Sjöström L, Lindroos A-K, Peltonen M, Torgerson J, Bouchard C, Carlsson B, et al. Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery. *N Engl J Med* 2004;351:2683–93.
- Pories WJ, van Rij AM, Burlingham BT, Fulghum RS, Meelheim D. Prophylactic cefazolin in gastric bypass surgery. *Surgery* 1981;90:426–32.
- Falagas ME, Kompoti M. Obesity and infection. *Lancet Infect Dis* 2006;6:438–46.
- Chopra T, Zhao JJ, Alangaden G, Wood MH, Kaye KS. Preventing surgical site infections after bariatric surgery: value of perioperative antibiotic regimens. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res* 2010;10:317–28.
- Mangram AJ, Horan TC, Pearson ML, Silver LC, Jarvis WR. Guideline for prevention of surgical site infection, 1999. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. *Am J Infect Control* 1999;27:97–132 quiz 133–134; discussion 96.
- Réseau d'alerte, d'investigation et de surveillance. Surveillance des infections du site opératoire France, 1999 à 2006. Institut de veille sanitaire; 2008 http://www.invs.sante.fr/publications/2008/iso_raisin/iso_raisin_rapport.pdf.
- Bratzler DW, Dellinger EP, Olsen KM, Perl TM, Auwaerter PG, Bolon MK, et al. Clinical practice guidelines for antimicrobial prophylaxis in surgery. *Am J Health Syst Pharm* 2013;70:195–283.
- van Kralingen S, Taks M, Diepstraten J, van de Garde EM, van Dongen EP, Wiezer MJ, et al. Pharmacokinetics and protein binding of cefazolin in morbidly obese patients. *Eur J Clin Pharmacol* 2011;67:985–92.
- Brill MJE, Houwink API, Schmidt S, Dongen EPAV, Hazebroek EJ, Ramshorst Bvan, et al. Reduced subcutaneous tissue distribution of cefazolin in morbidly obese versus non-obese patients determined using clinical microdialysis. *J Antimicrob Chemother* 2014;69:715–23.
- Edmiston CE, Krepel C, Kelly H, Larson J, Andris D, Hennen C, et al. Perioperative antibiotic prophylaxis in the gastric bypass patient: do we achieve therapeutic levels? *Surgery* 2004;136:738–47.
- Unger NR, Stein BJ. Effectiveness of pre-operative cefazolin in obese patients. *Surg Infect* 2014;15:412–16.
- Chen X, Brathwaite CEM, Barkan A, Hall K, Chu G, Cherasard P, et al. Optimal cefazolin prophylactic dosing for bariatric surgery: no need for higher doses or intraoperative redosing. *Obes Surg* 2017;27:626–9.
- SFAR. Antibiotoprofylaxie en chirurgie et médecine interventionnelle http://sfar.org/wp-content/uploads/2015/10/2_AFAR_Antibiotoprofylaxie-en-chirurgie-et-medecine-interventionnelle.pdf.
- Neely MN, van Guilder MG, Yamada WM, Schumitzky A, Jelliffe RW. Accurate detection of outliers and subpopulations with Pmetrics, a nonparametric and parametric pharmacometric modeling and simulation package for R. *Ther Drug Monit* 2012;34:467–76.
- Levey AS, Coresh J, Greene T, Stevens LA, Zhang YL, Hendriksen S, et al. Using standardized serum creatinine values in the modification of diet in renal disease study equation for estimating glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2006;145:247–54.
- Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009;150:604–12.
- Martin AD, Daniel MZ, Drinkwater DT, Clarys JP. Adipose tissue density, estimated adipose lipid fraction and whole body adiposity in male cadavers. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1994;18:79–83.
- Roberts JA, Kirkpatrick CMJ, Lipman J. Monte Carlo simulations: maximizing antibiotic pharmacokinetic data to optimize clinical practice for critically ill patients. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:227–31.
- Swank ML, Wing DA, Nicolau DP, McNulty JA. Increased 3 gram cefazolin dosing for cesarean delivery prophylaxis in obese women. *Am J Obstet Gynecol* 2015;213 415.e1-8.
- Stitely M, Sweet M, Slain D, Alons L, Hollis W, Hochberg C, et al. Plasma and tissue cefazolin concentrations in obese patients undergoing cesarean delivery and receiving differing pre-operative doses of drug. *Surg Infect* 2013;14:455–9.
- Grupper M, Kuti JL, Swank ML, Maggio L, Hughes BL, Nicolau DP. Population pharmacokinetics of cefazolin in serum and adipose tissue from overweight and obese women undergoing cesarean delivery. *J Clin Pharmacol* 2017;57:712–19.
- Brogard JM, Pinget M, Brandt C, Lavillaureix J. Pharmacokinetics of cefazolin in patients with renal failure; special reference to hemodialysis. *J Clin Pharmacol* 1977;17:225–30.
- Craig WA, Welling PG, Jackson TC, Kunin CM. Pharmacology of cefazolin and other cephalosporins in patients with renal insufficiency. *J Infect Dis* 1973;128(Suppl):S347–53.
- Wurtz R, Itokazu G, Rodvold K. Antimicrobial dosing in obese patients. *Clin Infect Dis* 1997;25:112–18.
- Maggio L, Nicolau DP, DaCosta M, Rouse DJ, Hughes BL. Cefazolin prophylaxis in obese women undergoing cesarean delivery: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* 2015;125:1205–10.
- Pevzner L, Swank M, Krepel C, Wing DA, Chan K, Edmiston CE. Effects of maternal obesity on tissue concentrations of prophylactic cefazolin during cesarean delivery. *Obstet Gynecol* 2011;117:877–82.
- Mouton JW, Theuretzbacher U, Craig WA, Tulkens PM, Derendorf H, Cars O. Tissue concentrations: do we ever learn? *J Antimicrob Chemother* 2008;61:235–7.
- Fischer MI, Dias C, Stein A, Meinhardt NG, Heineke I. Antibiotic prophylaxis in obese patients submitted to bariatric surgery. A systematic review. *Acta Cir Bras* 2014;29:209–17.
- Chopra T, Marchaim D, Lynch Y, Kosmidis C, Zhao JJ, Dhar S, et al. Epidemiology and outcomes associated with surgical site infection following bariatric surgery. *Am J Infect Control* 2012;40:815–19.
- Mouton JW, Vinks AA. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling of antibacterials in vitro and in vivo using bacterial growth and kill kinetics: the minimum inhibitory concentration versus stationary concentration. *Clin Pharmacol* 2005;44:201–10.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S24 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement; 2014 http://ncipd.org/control/images/NCIPD_docs/CLSI_M100-S24.pdf.
- EUCAST. Antimicrobial wild type distributions of microorganisms. <http://mic.eucast.org/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=performSearch&BeginIndex=0&MicId=mic&NumberIndex=50&Antib=237&Specium=-1> [accessed 6 November 2015].
- Koopman E, Nix DE, Erstad BL, Demeure MJ, Hayes MM, Ruth JT, et al. End-of-procedure cefazolin concentrations after administration for prevention of surgical-site infection. *Am J Health Syst Pharm* 2007;64:1927–34.
- Roberts JA, Udy AA, Jarrett P, Wallis SC, Hope WW, Sharma R, et al. Plasma and target-site subcutaneous tissue population pharmacokinetics and dosing simulations of cefazolin in post-trauma critically ill patients. *J Antimicrob Chemother* 2015;70:1495–502.
- Schmitz MJ, Blumer JL, Cetnarowski W, Rubino CM. Determination of appropriate weight-based cutoffs for empiric cefazolin dosing using data from a phase 1, pharmacokinetics and safety study of cefazolin administered for surgical prophylaxis in pediatric patients aged 10 to 12 years. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:4173–80.

Please cite this article as: M. Grégoire et al., Prophylactic cefazolin concentrations in morbidly obese patients undergoing sleeve gastrectomy: do we achieve targets? *International Journal of Antimicrobial Agents* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.02.015>

Titre : Optimisation de l'utilisation des céphalosporines en curatif et préventif d'infections bactériennes à partir de données PK/PD, de la pharmacocinétique de population, de simulations et d'une analyse du microbiote intestinal

Mots clés : Céphalosporine, pharmacocinétique de population, microbiote digestif

Résumé : Les céphalosporines, découvertes au milieu du 20^{ème} siècle, appartiennent à la classe des bêta-lactamines et agissent en inhibant la synthèse du peptidoglycane bactérien. De nombreux facteurs peuvent impacter leur efficacité mais aussi leurs effets indésirables. Ce travail de Thèse articulé en 3 parties s'est intéressé à la pharmacocinétique de ces molécules mais également à leur cible pharmacodynamique au sein du microbiote digestif. Le premier volet traitait de l'antibioprophylaxie de la chirurgie bariatrique par céfazoline. Cette étude de population a permis de démontrer la supériorité des recommandations françaises sur les recommandations américaines et de proposer un schéma d'administration innovant en perfusion continue associant praticité d'utilisation et niveau d'efficacité élevé.

Le second volet traitait de l'utilisation de la ceftriaxone à posologie élevée dans le traitement des infections neuro-méningées. Cette étude de population a conclu à l'intérêt d'adapter le schéma d'administration à la fonction rénale du patient avec une administration quotidienne pour les insuffisants rénaux contre 2 pour les normo-rénaux.

Le dernier volet a permis de démontrer dans un modèle murin que la ceftriaxone sélectionnait plus d'entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi que le céfotaxime et que le profil métagénomique sélectionné par les 2 antibiotiques expliquait cette différence.

L'ensemble de ces travaux s'intègre dans la dynamique actuelle de personnalisation des thérapies antibiotiques à chaque patient et permet d'optimiser l'utilisation des céphalosporines.

Title : Optimization of the curative and preventive use of cephalosporins in bacterial infections from PK/PD data, population pharmacokinetics, simulations and an analysis of the gut microbiota

Keywords : Cephalosporin, population pharmacokinetics, gut microbiota

Abstract : Cephalosporins, discovered in the middle of the 20th century, belong to the beta-lactam class and act by inhibiting the synthesis of bacterial peptidoglycan. Many factors can affect their effectiveness but also their adverse effects. This thesis work articulated in 3 parts was interested in the pharmacokinetics of these molecules but also their pharmacodynamics targets within the digestive microbiota.

The first part dealt with the antibiotic prophylaxis of bariatric surgery with cefazolin. This population study has demonstrated the superiority of the French recommendations on American recommendations and to propose an innovative administration plan in continuous infusion combining practicality of use and high level of efficiency.

The second part dealt with the use of high dose ceftriaxone in the treatment of meningeal infections. This population study concluded that it is useful to adapt the administration plan to the patient's renal function with once daily administration in case of renal insufficiency compared with twice in case of normorenal function.

The last part of these work demonstrated in a mouse model that ceftriaxone selected more extensive-spectrum beta-lactamase-producing *enterobacteriaceae* than cefotaxime and that the metagenomics profile selected by the two antibiotics explained this difference.

All of this work fits into the current dynamics of personalization of antibiotic therapies for each patient and optimizes the use of cephalosporins.