

INFLUENCE DE LA TAILLE DE L'INOCULUM BACTERIEN SUR L'ACTIVITE BACTERICIDE ET SUR LA SELECTION DE MUTANTS RESISTANTS LORS DE L'EXPOSITION D'*ESCHERICHIA COLI* A LA MARBOFLOXACINE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement le 26 mars 2007
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Aude, Agnès, Marie FERRAN
Née, le 1^{er} juin 1983 à ALBI (Tarn)

Directeur de thèse : M. le Docteur Alain BOUSQUET-MELOU

JURY

PRESIDENT :
M. Henri DABERNAT

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESSEUR :
M. Alain BOUSQUET-MELOU
M. Pierre-Louis TOUTAIN

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Tableau des enseignants

Tableau des enseignants

Nous adressons nos remerciements,

Au président du jury,

Monsieur le Professeur Henri DABERNAT

Professeur des Universités

Praticien Hospitalier

Bactériologie-Hygiène

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.

Hommages respectueux.

Aux membres du jury,

Monsieur le Docteur Alain BOUSQUET-MELOU

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Physiologie et thérapeutique

Qui nous a guidé tout au long de la réalisation de ce travail.

Qu'il trouve ici l'expression de notre sincère reconnaissance.

Monsieur le Professeur Pierre-Louis TOUTAIN

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Physiologie et Thérapeutique

Qui nous a fait l'honneur de nous accueillir dans son unité de recherche.

Sincères remerciements.

Je dédie ce travail à ma famille et mes amis.

Je remercie les membres de l'UMR181 qui m'ont aidée dans la réalisation de ce travail.

TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	10
GLOSSAIRE	12
INTRODUCTION.....	14
1 PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	16
1.1 METHODES D'ETUDE <i>IN VITRO</i> DE L'ACTIVITE DES ANTIBIOTIQUES	18
1.1.1 Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice.....	18
1.1.2 Courbes de bactéricidie avec des concentrations constantes.....	18
1.1.3 Courbes de bactéricidie avec des concentrations variables.....	19
1.1.3.1 Différentes structures de systèmes in vitro dynamiques	19
1.1.3.2 Débit d'élimination des antibiotiques.....	21
1.1.4 Modélisation de l'action d'un antibiotique sur une population bactérienne	21
1.1.4.1 Croissance d'une population bactérienne sans antibiotique.....	22
1.1.4.2 Evolution d'une population bactérienne sensible en présence d'antibiotiques	23
1.1.4.3 Evolution parallèle de populations sensibles et résistantes aux antibiotiques.....	24
1.2 LA MARBOFLOXACINE	25
1.2.1 Spectre d'activité.....	25
1.2.2 Propriétés chimiques.....	25
1.2.3 Propriétés pharmacodynamiques.....	25
1.2.3.1 Passage membranaire	25
1.2.3.2 Cibles pharmacologiques.....	25
1.2.4 Propriétés pharmacocinétiques.....	26
1.2.4.1 Biodisponibilité	26
1.2.4.2 Distribution	26
1.2.4.3 Elimination	26
1.2.5 Effets indésirables	26
1.2.6 Formulations	26
1.3 PARAMETRES PREDICTIFS DE L'EFFICACITE DES FLUOROQUINOLONES	28
1.3.1 Sensibilité d'une souche à l'antibiotique	28
1.3.2 Pertinence et valeurs seuils de l'indice AUC/CMI.....	29
1.3.2.1 Etudes sur modèles animaux	29
1.3.2.2 Etudes cliniques.....	29
1.3.2.3 Expériences in vitro	29
1.3.3 Pertinence et valeurs seuils de l'indice Cmax/CMI	30
1.3.3.1 Etude sur modèles animaux	30
1.3.3.2 Etudes cliniques.....	30
1.4 RESISTANCES AUX FLUOROQUINOLONES	31
1.4.1 Mécanismes de résistances.....	31
1.4.2 Paramètres prédictifs de l'émergence de résistance corrélés à la CMI.....	32
1.4.2.1 AUC/CMI.....	32
1.4.2.2 Cmax/CMI.....	32
1.4.3 Paramètres prédictifs de l'émergence de résistance corrélés à la MPC	33
1.4.3.1 Définitions.....	33
1.4.3.1.1 Concentration Prévenant les premiers Mutants (MPC)	33
1.4.3.1.2 Fenêtre de sélection des premiers mutants	34
1.4.3.2 Temps dans la fenêtre de sélection	34
1.4.3.3 AUC/MPC	34
1.4.3.4 Applications pratiques.....	34
1.5 INFLUENCE DE LA TAILLE DE L'INOCULUM	36
1.5.1 Sur l'activité bactéricide	36
1.5.2 Sur l'émergence de mutants résistants	36
1.6 CONCLUSION ET PROJET DE THESE	37

2	DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE	39
2.1	MATERIELS ET METHODES	41
2.1.1	<i>Souche bactérienne et antibiotiques</i>	41
2.1.2	<i>Evaluation de la sensibilité</i>	41
2.1.2.1	Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)	41
2.1.2.2	Concentration Prévenant les premiers Mutants (MPC)	41
2.1.3	<i>Courbes de bactéricidie</i>	42
2.1.3.1	En présence de concentrations constantes	42
2.1.3.1.1	Comparaison de 3 inoculums de tailles différentes	42
2.1.3.1.2	Comparaison de 2 inoculums contenant des bactéries à différents stades de croissance	42
2.1.3.2	En présence de concentrations variables	42
2.1.4	<i>Méthodes de dénombrements</i>	43
2.1.4.1	Dénombrements de bactéries vivantes dans une suspension	43
2.1.4.2	Dénombrements de bactéries résistantes dans une suspension	43
2.1.5	<i>Analyses des courbes de bactéricidie</i>	43
2.1.5.1	Effet bactéricide	43
2.1.5.2	Vitesse de bactéricidie	44
2.2	RESULTATS	46
2.2.1	<i>Sensibilité de la souche ATCC 25922 à la marbofloxacin</i>	46
2.2.1.1	Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)	46
2.2.1.2	Concentration Prévenant les premiers Mutants (MPC)	46
2.2.1.3	Fenêtre de sélection	47
2.2.2	<i>Influence de la taille de l'inoculum sur l'activité bactéricide de la marbofloxacin</i>	48
2.2.2.1	Evolution de la population bactérienne sans antibiotique	48
2.2.2.2	Evolution de la population bactérienne avec antibiotiques	48
2.2.3	<i>Influence de la taille de l'inoculum sur la sélection de sous-populations résistantes</i>	51
2.2.3.1	Evolution de la population bactérienne sans antibiotique	51
2.2.3.2	Evolution de la population bactérienne avec antibiotiques	52
2.3	DISCUSSION	55
2.3.1	<i>Influence de la taille de l'inoculum sur l'activité bactéricide de la marbofloxacin</i>	55
2.3.2	<i>Influence de la taille de l'inoculum sur la sélection de sous-populations résistantes</i>	55
	CONCLUSION	58
	RÉFÉRENCES	61

Table des illustrations

Figure 1 : Méthode de détermination de la CMI.....	18
Figure 2 : Représentation schématique de courbes de bactéricidie.....	19
Figure 3 : Structure d'un système in vitro dynamique (1).....	20
Figure 4 : Structure d'un système in vitro dynamique (2).....	20
Figure 5 : Structure d'un système in vitro dynamique (3).....	20
Figure 6 : Structure d'un système in vitro dynamique (4).....	21
Figure 7 : Schéma des entrées et des sorties du compartiment central.....	21
Figure 8 : Représentation schématique de la croissance des bactéries dans un milieu de culture (1).....	22
Figure 9 : Représentation schématique de l'évolution d'une population bactérienne (2).....	22
Figure 10 : Représentation schématique de l'évolution d'une population bactérienne (3).....	23
Figure 11 : Représentation schématique de l'évolution d'une population bactérienne (4).....	23
Figure 12 : Formule chimique de la marbofloxacin.....	25
Figure 13 : Représentation schématique des concentrations en antibiotique au cours du temps.....	28
Figure 14 : Schéma des mécanismes de résistances aux fluoroquinolones d'une bactérie Gram négatif.....	31
Figure 15 : Méthode de détermination de la MPC.....	33
Figure 16 : Schéma d'une fenêtre de sélection.....	34
Figure 17 : Représentation schématique d'administration simultanée de 2 antibiotiques (1).....	35
Figure 18 : Représentation schématique d'administration simultanée de 2 antibiotiques (2).....	35
Figure 19 : Schéma de la structure du système in vitro dynamique.....	42
Figure 20 : Représentation des aires utilisées pour le calcul de l'effet bactéricide.....	44
Figure 21 : Détermination de la CMI de la marbofloxacin pour Escherichia coli ATCC 25922.....	46
Figure 22 : Détermination de la MPC de la marbofloxacin pour Escherichia coli ATCC 25922.....	47
Figure 23 : Schéma de la fenêtre de sélection des premiers mutants.....	47
Figure 24 : Croissance d'Escherichia coli ATCC 25922 à partir d'un inoculum 10^5 CFU/mL.....	48
Figure 25 : Croissance d'Escherichia coli ATCC 25922 à partir d'un inoculum 10^8 CFU/mL.....	48
Figure 26 : Modélisation de la croissance de 3 suspensions bactériennes de 10^5 CFU/mL.....	48
Figure 27 : Croissance des bactéries en incubation à 37°C avant l'ajout de la marbofloxacin.....	49
Figure 28 : Courbes de bactéricidie obtenues à partir d'un inoculum de 10^5 CFU/mL.....	49
Figure 29 : Courbes de bactéricidie obtenues à partir d'un inoculum de 10^7 CFU/mL.....	49
Figure 30 : Courbes de bactéricidie obtenues à partir d'un inoculum de 10^9 CFU/mL.....	49
Figure 31 : Vitesses de bactéricidie de la marbofloxacin en fonction de l'inoculum.....	50
Figure 32 : Effets bactéricides de la marbofloxacin en fonction de l'inoculum.....	50
Figure 33 : Courbes de bactéricidie obtenues à partir d'un inoculum de 10^7 CFU/mL en phase de latence.....	51
Figure 34 : Courbes de bactéricidie obtenues à partir d'un inoculum de 10^7 CFU/mL en phase de croissance exponentielle.....	51
Figure 35 : Vitesses de bactéricidie en fonction du stade de croissance.....	51
Figure 36 : Effets bactéricides en fonction du stade de croissance.....	51
Figure 37 : Croissance des bactéries dans le système in vitro dynamique.....	52
Figure 38 : Concentrations de marbofloxacin en fonction du temps (1).....	52
Figure 39 : Concentrations de marbofloxacin en fonction du temps (2).....	52
Figure 40 : Courbes de bactéricidie de 3 inoculums de tailles différentes (1).....	53
Figure 41 : Courbes de bactéricidie de 3 inoculums de tailles différentes (2).....	53
Figure 42 : Fréquence de bactéries résistantes à différentes concentrations de marbofloxacin.....	54

Tableau 1 : Valeurs minimales de l'indice AUC/CMI prévenant l'émergence de mutants.....	32
Tableau 2 : Valeurs minimales de l'indice Cmax/CMI prévenant l'émergence de mutants.....	32
Tableau 3 : Valeurs des Emax et EC ₅₀ calculés pour les modèles sigmoïdes des effets bactéricides de chaque inoculum (figure 32).....	50
Tableau 4 : Nombre minimal de bactéries et nombre de bactéries après 32 heures d'exposition à la marbofloxacin.....	53
Équation 1.....	21
Équation 2.....	22
Équation 3.....	22
Équation 4.....	23
Équation 5.....	23
Équation 6.....	23
Équation 7.....	24
Équation 8.....	24
Équation 9.....	24
Équation 10.....	43
Équation 11.....	48

Glossaire

AUC	Aire sous la courbe des concentrations
CFU	Unité formant une colonie
Cmax	Concentration maximale en antibiotique
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute
CMB	Concentration Minimale Bactéricide
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
MPC	Concentration prévenant l'émergence des premiers mutants
PK	Pharmacocinétique
PD	Pharmacodynamie
T>CMI	Temps au-dessus de la CMI
T>MPC	Temps au-dessus de la MPC

Introduction

Il existe plusieurs classes d'antibiotiques qui agissent sur différentes cibles bactériennes. La classe des quinolones a été découverte en 1962 avec l'acide nalidixique dont la pénétration dans les bactéries a ensuite été améliorée par l'ajout d'un atome de fluor dans les années 1970. Les antibiotiques de cette classe, très efficaces sur un large nombre de bactéries, ont alors été renommés fluoroquinolones. Diverses infections sont traitées avec ces antibiotiques dont les infections cutanées, respiratoires ou urinaires. Leur usage croissant aussi bien en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire engendre progressivement l'émergence de résistances préoccupantes. La recherche de doses d'antibiotique permettant de prévenir la sélection de mutants résistants lors de traitements curatifs ou préventifs fait donc aujourd'hui l'objet de nombreuses études.

Il existe deux types de thérapies préventives en médecine vétérinaire, la prophylaxie et la métaphylaxie. Cette dernière consiste à traiter tous les animaux d'un troupeau lorsque seulement quelques individus présentent des symptômes. La plupart des animaux traités avec des doses d'antibiotique curatives ne sont alors porteurs que d'une très petite quantité de bactéries, une caractéristique qui pourrait être favorable à un succès de l'antibiothérapie.

L'objectif de cette thèse est d'évaluer l'influence de la charge bactérienne présente au niveau du site infectieux sur l'activité d'une fluoroquinolone à usage vétérinaire, la marbofloxacin. Les expériences ont consisté à exposer *in vitro* trois tailles d'inoculum d'*Escherichia coli* à différentes concentrations d'antibiotique. L'activité bactéricide a été testée en présence de concentrations constantes en antibiotique et des paramètres d'efficacité ont ensuite été évalués afin de faciliter les comparaisons entre les différentes tailles d'inoculum. L'émergence de mutants résistants a été recherchée après l'exposition des bactéries à des concentrations variables en antibiotique ce qui a nécessité le développement d'un système *in vitro* dynamique.

Une première partie bibliographique résumera les différentes méthodes d'étude des antibiotiques *in vitro* ainsi que les propriétés générales de la marbofloxacin. Les principaux critères pharmacodynamiques et pharmacocinétiques qui permettent d'évaluer l'activité des fluoroquinolones et leur capacité à sélectionner des mutants seront également présentés.

Dans une seconde partie expérimentale, nous exposerons les résultats obtenus lors de l'étude *in vitro* de l'activité bactéricide et de la sélection de mutants et nous discuterons de l'importance de la charge bactérienne dans la mise en place d'une antibiothérapie.

1 PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Méthodes d'étude *in vitro* de l'activité des antibiotiques

Il existe actuellement deux méthodes principales pour étudier les antibiotiques *in vitro*.

La détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) est la plus simple. Elle donne des informations sur la sensibilité des bactéries à un antibiotique après exposition à une concentration constante pendant un temps fixé.

Les courbes de bactéricidie permettent de connaître les effets des antibiotiques au cours du temps sur des bactéries exposées :

- soit à des concentrations constantes
- soit à des concentrations variables en antibiotique par le développement de systèmes *in vitro* dynamiques.

Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice

La CMI permet d'évaluer la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. Cette concentration est déterminée selon une méthode standardisée par le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) [12]. Un inoculum de $5 \cdot 10^5$ bactéries est exposé à une gamme de concentrations d'antibiotique obtenue par une série de dilutions au demi. La croissance des bactéries est observée à l'œil nu après 15 à 18 heures d'exposition à l'antibiotique à 35°C. La CMI est alors la concentration la plus faible pour laquelle aucune croissance n'est visible (figure 1).

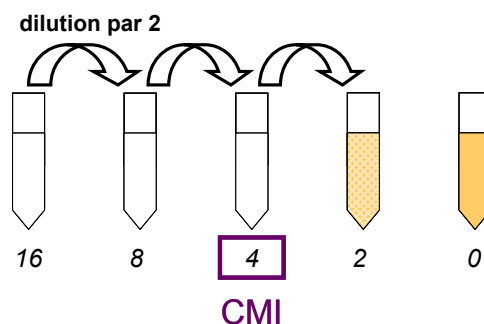


Figure 1 : Méthode de détermination de la CMI.

La CMI est la concentration en antibiotique pour laquelle aucune croissance n'est visible après 18 heures d'incubation à 35°C.

Cette méthode est simple, rapide et standardisée ce qui permet les comparaisons entre laboratoires. Cependant, l'effet de l'antibiotique n'est évalué qu'après un temps d'incubation fixé. Pour connaître l'activité de l'antibiotique au cours du temps, il faut dénombrer les bactéries à intervalles réguliers afin d'obtenir des courbes de bactéricidie.

Courbes de bactéricidie avec des concentrations constantes

Les courbes de bactéricidie sont le plus souvent obtenues par des dénombrements de bactéries exposées à des concentrations constantes en antibiotiques. Ces courbes réalisées pour plusieurs classes d'antibiotiques ont permis de mettre en évidence deux modes d'action. Pour certains antibiotiques, plus la concentration est élevée, plus la mort des bactéries est importante, ils sont dits concentration-dépendants. Pour d'autres, une augmentation de la concentration n'a pas d'effet bactéricide plus important et il faut augmenter le temps d'exposition pour tuer un plus grand nombre de bactéries, ils sont dits temps-dépendants (figure 2). Ces observations ont conduit à une meilleure efficacité des antibiothérapies par une adaptation des schémas posologiques. Ainsi, des administrations

fréquentes ont été préconisées pour les antibiotiques temps-dépendants afin de maintenir longtemps les concentrations au-dessus de la CMI alors que des administrations uniques sont recommandées pour les concentration-dépendants afin d'atteindre des concentrations élevées.

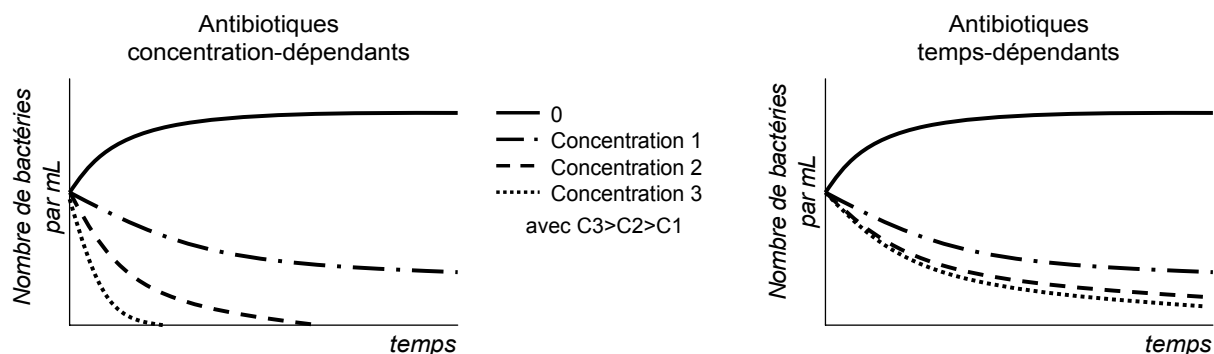


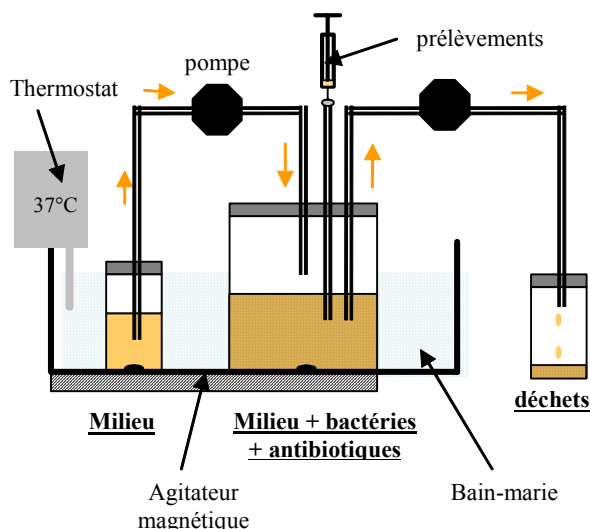
Figure 2 : Représentation schématique de courbes de bactéricidie.
La figure de gauche représente le cas d'un antibiotique concentration-dépendant et celle de droite, le cas d'un antibiotique temps-dépendant.

Les courbes de bactéricidie obtenues avec des concentrations constantes ont permis d'évaluer les effets de différentes concentrations d'antibiotique sur les bactéries. Cependant, cette méthode ne prend pas en compte les variations de concentrations qui sont inévitables *in vivo*. Des systèmes appelés *in vitro* dynamiques ont donc été développés pour permettre d'exposer les bactéries à des concentrations variables au cours du temps.

Courbes de bactéricidie avec des concentrations variables

Différentes structures de systèmes *in vitro* dynamiques

La structure générale des systèmes dynamiques consiste en plusieurs compartiments matérialisés par des béchers immergés dans un bain-marie à 37°C ou placés dans une chambre thermostatée à 37 °C. Le compartiment central contenant du bouillon de culture représente le système vasculaire et l'objectif est d'y retrouver les concentrations plasmatiques observées *in vivo*. Pour mimer une administration intra-vasculaire, les antibiotiques sont injectés directement dans le compartiment central. Pour simuler une administration extra-vasculaire, une pompe prélève les antibiotiques dans un compartiment périphérique et les amène progressivement au compartiment central. Suite à l'arrivée des antibiotiques dans ce compartiment, leur élimination débute. Une pompe apporte du bouillon de culture sans antibiotique au compartiment central afin de diluer les antibiotiques selon le débit choisi (voir paragraphe suivant). Une autre pompe permet de maintenir le volume du compartiment central constant par une élimination de bouillon vers un compartiment déchet. Dans la plupart des systèmes, l'homogénéisation des bactéries est assurée par une agitation magnétique. Cependant, pour certains systèmes avec des structures en dérivation, des pompes assurent l'homogénéisation à l'intérieur des structures contenant les bactéries [7].



La culture bactérienne est réalisée dans différents compartiments selon le degré de complexité du système.

Dans les systèmes les plus simples, les bactéries sont en suspension dans le compartiment central et sont donc éliminées vers le compartiment déchet en même temps que les antibiotiques (figure 3) [1, 19, 48].

Figure 3 : Structure d'un système *in vitro* dynamique (1).
Les bactéries sont mises en contact avec l'antibiotique dans le compartiment central immergé dans un bain-marie thermostaté à 37°C. Une pompe assure la dilution des antibiotiques et l'autre maintient le volume constant. Un agitateur magnétique homogénéise la suspension bactérienne.

Dans les systèmes plus sophistiqués, les bactéries sont isolées du compartiment central pour prévenir leur élimination au cours de l'expérience.

La séparation entre la suspension bactérienne et le compartiment central peut être un filtre (figures 4 et 5) dont les pores, qui ont un diamètre de 0.4 μm , permettent le passage des antibiotiques mais pas celui des bactéries [25, 39].

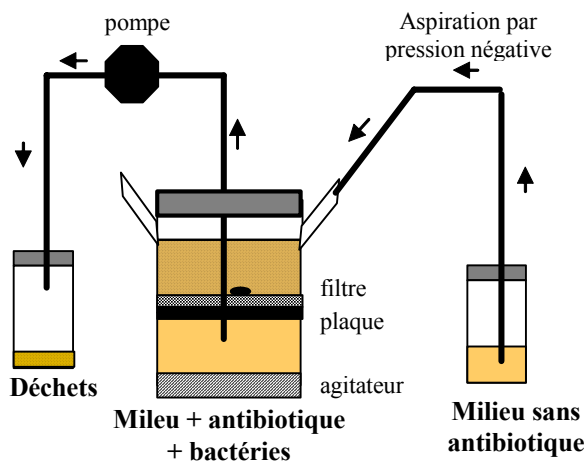


Figure 4 : Structure d'un système *in vitro* dynamique (2)
Les bactéries sont protégées de l'aspiration par un filtre de pores 0.4 μm . Le filtre est maintenu par une plaque perforée.

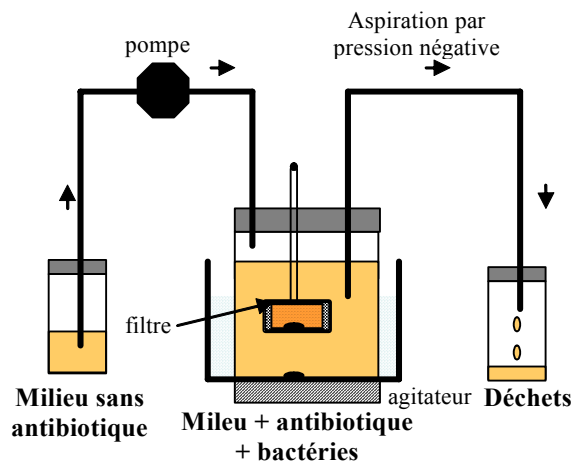


Figure 5 : Structure d'un système *in vitro* dynamique (3)
Les bactéries sont protégées de l'aspiration par des filtres disposés verticalement de pores 0.4 μm .

Dans les systèmes les plus complexes [7, 27], les bactéries sont placées dans des structures isolées en dérivation (figure 6). Le contenu du compartiment central contenant les antibiotiques circule à travers ces structures grâce à une pompe, les bactéries étant maintenues par des filtres de pores de 0.4 μm .

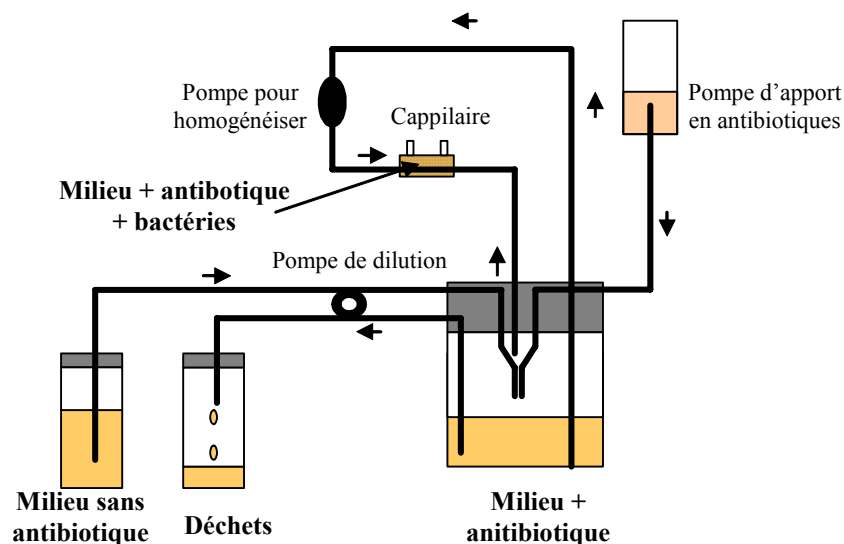


Figure 6 : Structure d'un système *in vitro* dynamique (4)
Les bactéries sont maintenues dans des capillaires par des filtres de pores 0.4 μm . Une pompe assure le passage des antibiotiques dans les capillaires.

Débit d'élimination des antibiotiques

Dans les systèmes *in vitro* dynamiques, les antibiotiques sont éliminés progressivement du compartiment central selon un débit d'élimination choisi. Afin de garder un volume constant, le débit d'apport en bouillon sans antibiotique est identique au débit d'élimination des antibiotiques (figure 7).

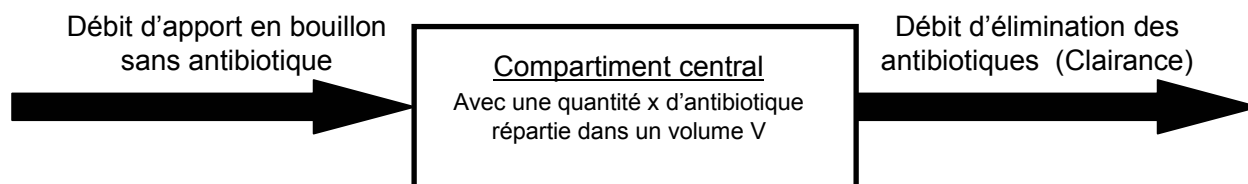


Figure 7 : Schéma des entrées et des sorties du compartiment central.

Le débit d'élimination des antibiotiques correspond à la clairance (Cl) qui peut être déterminée par l'équation 1.

$$Cl = \frac{\ln 2 \times V}{t_{1/2}} \quad \text{Équation 1}$$

où V est le volume du système *in vitro* et $t_{1/2}$ le temps de demi-vie *in vivo* de l'antibiotique, c'est-à-dire le temps nécessaire pour diviser les concentrations plasmatiques par deux.

Le débit calculé est alors appliqué aux pompes situées en amont et en aval du compartiment central afin d'obtenir une décroissance des concentrations en antibiotique similaire à celles observées *in vivo* et de maintenir le volume du compartiment central constant.

Modélisation de l'action d'un antibiotique sur une population bactérienne

Dans le cadre de la microbiologie quantitative, des modèles mathématiques ont été développés pour décrire l'évolution temporelle de populations bactériennes. La croissance des bactéries dans un milieu nutritif a d'abord été modélisée puis des modèles plus complexes ont permis de décrire les effets des antibiotiques.

Croissance d'une population bactérienne sans antibiotique

Une population bactérienne introduite dans un nouveau milieu de culture a une évolution assez caractéristique représentée sur la figure 8.

Trois phases de croissance peuvent être distinguées :

- la phase de latence pendant laquelle les bactéries adaptent leur métabolisme au milieu.
- la phase de croissance exponentielle où les bactéries sont parfaitement adaptées au milieu
- la phase de croissance stationnaire où un équilibre, entre les bactéries qui se multiplient et celles qui meurent, est atteint à cause d'un encombrement volumique, d'un défaut de nutriments ou de la présence de substances toxiques.

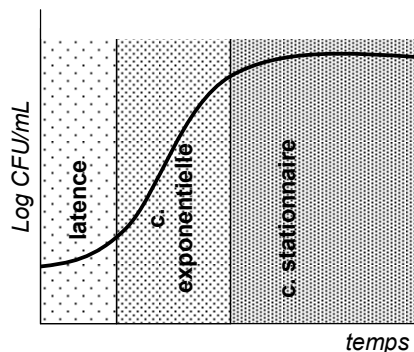


Figure 8 : Représentation schématique de la croissance des bactéries dans un milieu de culture (1).

La phase de croissance exponentielle des bactéries au cours du temps (figure 9) peut être décrite par l'équation 2.

$$\frac{dN}{dt} = A.N \quad \text{Équation 2}$$

où N est le nombre de bactéries à l'instant t, et A une constante de vitesse.

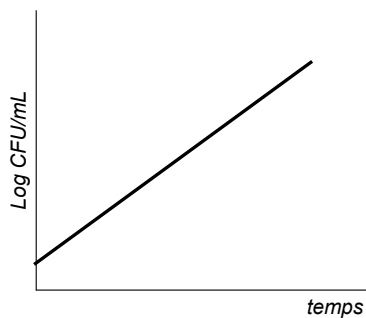


Figure 9 : Représentation schématique de l'évolution d'une population bactérienne (2). d'après l'équation 2.

Dans un milieu de culture, la croissance des bactéries finit toujours par atteindre une phase de croissance stationnaire. Un facteur N_{\max} a donc été ajouté pour tenir compte du nombre maximal de bactéries dans un volume donné (équation 3).

$$\frac{dN}{dt} = A.\left(1 - \frac{N}{N_{\max}}\right).N \quad \text{Équation 3}$$

L'équation indique que lorsque N tend vers N_{\max} , le deuxième facteur tend vers 0. La croissance de la population bactérienne est donc stoppée (figure 10).

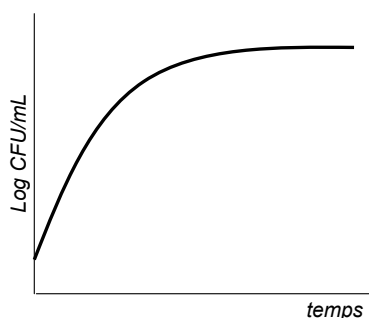


Figure 10 : Représentation schématique de l'évolution d'une population bactérienne (3).
d'après l'équation 3 (Ce modèle permet d'obtenir un plateau).

Enfin, un autre facteur peut être ajouté pour modéliser la phase d'adaptation des bactéries au milieu (figure 11) aussi appelée phase de latence (équation 4).

$$\frac{dN}{dt} = A.(1 - e^{-k(N-N_0)}).(1 - \frac{N}{N_{\max}}).N \quad \text{Équation 4}$$

où N_0 est le nombre initial de bactéries dans le milieu et k une constante.

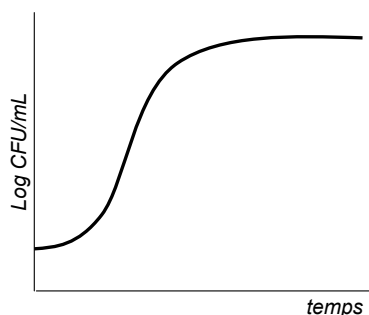


Figure 11 : Représentation schématique de l'évolution d'une population bactérienne (4).
d'après l'équation 4. (Un frein initial permet de mimer l'adaptation des bactéries au milieu).

Evolution d'une population bactérienne sensible en présence d'antibiotiques

La plupart des modèles qui décrivent l'activité des antibiotiques sur les bactéries sont basés sur le modèle de Zhi et *al.* [55]. Les hypothèses de ce modèle sont que les bactéries continuent de se multiplier avec un taux de croissance constant et que le taux de mortalité dépend de la concentration en antibiotiques selon un modèle E_{\max} sigmoïde (équations 5 et 6).

$$\frac{dN}{dt} = (k_0 - k_e).N \quad \text{Équation 5}$$

où k_0 est le taux de croissance constant et k_e le taux de mortalité dépendant de la concentration en antibiotique selon l'équation 6.

$$k_e = \frac{K_{\max} \times C_t^\gamma}{EC_{50}^\gamma + C_t^\gamma} \quad \text{Équation 6}$$

où C_t est la concentration en antibiotique à l'instant t , K_{\max} le taux de mortalité maximal, EC_{50} la concentration nécessaire pour atteindre 50% du taux maximal et γ un exposant appelé coefficient de Hill ou coefficient de sigmoïdité.

De manière identique aux modèles de croissance, un facteur N_{\max} peut être ajouté pour modéliser la saturation du milieu en bactéries (équation 7).

$$\frac{dN}{dt} = [k_0(1 - \frac{N}{N_{\max}}) - k_e].N \quad \text{Équation 7}$$

où N_{\max} est le nombre maximal de bactéries dans le milieu.

Evolution parallèle de populations sensibles et résistantes aux antibiotiques

Les modèles décrits précédemment ont ensuite été adaptés pour décrire l'évolution simultanée des populations sensibles et résistantes (équations 8 et 9) [30].

Dans le modèle décrit ci-dessous, le taux de croissance est considéré plus élevé chez les bactéries sensibles qui ont un métabolisme plus performant que les bactéries résistantes. Pour une même concentration d'antibiotique, le taux de mortalité est supposé plus faible pour les bactéries résistantes. Enfin, le passage de la population sensible à la population résistante dépend du temps et du nombre de bactéries selon une constante de mutation spontanée.

$$\frac{dN_S}{dt} = (K_{g \max S} - \mu) \cdot (1 - \frac{N_S + N_R}{N_{\max}}) \cdot N_S - K_{k \max S} \cdot \frac{C^\gamma}{C^\gamma + EC_{50}^\gamma} \cdot N_S \quad \text{Équation 8}$$

$$\frac{dN_R}{dt} = (K_{g \max R} + \mu) \cdot (1 - \frac{N_S + N_R}{N_{\max}}) \cdot N_R - K_{k \max R} \cdot \frac{C^\gamma}{C^\gamma + EC_{50}^\gamma} \cdot N_R \quad \text{Équation 9}$$

où N_S est le nombre de bactéries sensibles et N_R le nombre de bactéries résistantes à l'instant t . N_{\max} est le nombre maximal de bactéries dans le milieu. $K_{g \max S}$ et $K_{g \max R}$ sont les taux de croissance constants des bactéries sensibles et résistantes. $K_{k \max S}$ et $K_{k \max R}$ sont les taux de mortalité des bactéries sensibles et résistantes. μ est la constante de mutation spontanée.

La marbofloxacin

La marbofloxacin est un anti-bactérien de synthèse, à usage vétérinaire, appartenant à la famille des fluoroquinolones.

Spectre d'activité

La marbofloxacin a un spectre large, elle est indiquée dans le traitement des infections à bactéries Gram négatif ou Gram positif.

Propriétés chimiques

La figure 12 présente la structure de la molécule de marbofloxacin.

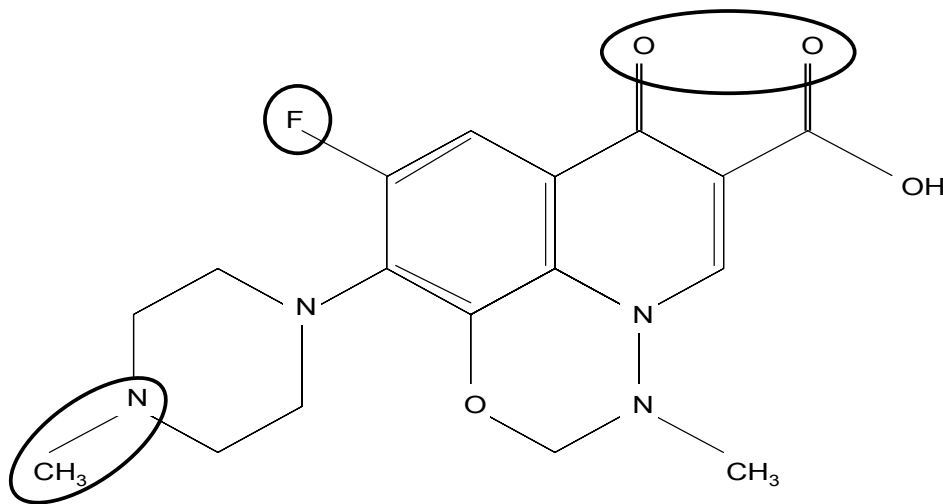


Figure 12 : Formule chimique de la marbofloxacin.

Les 2 atomes d'oxygène permettent la liaison de la molécule à ces cibles bactériennes. Deux autres groupements chimiques de la molécule, le fluor et le méthyl, sont particulièrement intéressants. La présence d'un fluor facilite le passage de la membrane des bactéries Gram positif et le groupement méthyl confère à la marbofloxacin une activité bactéricide sur les *Pseudomonas*.

Propriétés pharmacodynamiques

Passage membranaire

La marbofloxacin pénètre dans le cytoplasme des bactéries Gram positif par diffusion. Le passage de la membrane externe des bactéries Gram négatif se fait par la complexation des ions magnésium qui provoque une désorganisation des lipopolysaccharides ou par un passage actif à travers des protéines transmembranaires appelées porines.

Cibles pharmacologiques

Les cibles intrabactériennes des fluoroquinolones sont deux topoisomérases de type 2 : la gyrase et la topoisomérase IV.

La gyrase a une structure tétramérique composée de 2 sous-unités A codées par le gène *gyrA* et de 2 sous-unités B codées par le gène *gyrB*. Cette enzyme défait les superenroulements de l'ADN en amont de la fourchette de

réplication. La topoisomérase IV a aussi une structure tétramérique dont les 2 sous-unités A sont codées par le gène parC et les 2 sous-unités B par le gène parE. Elle intervient dans la décaténation de l'ADN, c'est-à-dire dans la séparation des brins d'ADN en fin de réplication [29, 31, 49]. L'action de la marbofloxacin sur une enzyme plutôt qu'une autre dépend de la bactérie. Cependant, quelque soit l'enzyme ciblée, le mode d'action est concentration-dépendant.

Propriétés pharmacocinétiques

Biodisponibilité

La biodisponibilité de la marbofloxacin est élevée. Le pourcentage de la dose qui parvient au système vasculaire varie entre 62 à 100 % selon la voie d'administration. Le temps nécessaire pour atteindre le pic de concentration plasmatique est court (inférieur à 2 heures).

Distribution

La marbofloxacin a un bon pouvoir de diffusion dans l'organisme, le volume de distribution à l'équilibre est de 1.13 L/kg. La liaison aux protéines plasmatiques est faible (inférieure à 10% pour les carnivores domestiques et les porcs, inférieure à 30% pour les bovins).

Elimination

La marbofloxacin est éliminée lentement, essentiellement sous forme active, pour 2/3 par voie urinaire et pour 1/3 par voie fécale dans la plupart des espèces animales. Le temps de demi-vie plasmatique est de 4 à 14 heures selon l'espèce.

Effets indésirables

La marbofloxacin est une molécule très sûre d'emploi. Les études de toxicité aiguë ont montré l'apparition d'effets secondaires à 50 mg/kg/j (plus de 10 fois la dose recommandée). Aucun effet toxique n'a été observé lors d'administration prolongée de 4 mg/kg/j à des chiens âgés de 3 mois. Cependant, une étude de pharmacovigilance menée par le laboratoire fabricant a mis en évidence des atteintes ostéo-articulaires principalement sur des chiots de grandes races lors d'un traitement sur 136 000.

Formulations

Des comprimés de 5, 20 et 80 mg ainsi qu'une solution injectable sont disponibles pour les carnivores domestiques. Pour les animaux de rente, les formulations actuellement commercialisées en France sont des solutions injectables à 2 et 10 %. Des comprimés bolus de 50 mg existent pour les jeunes bovins. La dose recommandée est le plus fréquemment de 2 mg/kg une fois par jour pendant 4 jours excepté pour le bolus (1mg/kg/jour). Une nouvelle formulation, Marbocyl S ND, recommandée à la dose de 8 mg/kg en une seule administration est maintenant disponible pour le traitement des bronchopneumonies chez les bovins.

Paramètres prédictifs de l'efficacité des fluoroquinolones

L'efficacité d'un antibiotique sur une bactérie dépend de la sensibilité et de l'exposition de la souche à cet antibiotique.

Des paramètres pharmacodynamiques indiquent la sensibilité de la souche et des paramètres pharmacocinétiques décrivant les concentrations d'antibiotique au contact des bactéries permettent d'évaluer l'exposition des bactéries.

Sensibilité d'une souche à l'antibiotique

En pratique, l'évaluation de la sensibilité d'une souche pour le choix de l'antibiothérapie repose sur un antibiogramme. La technique consiste à imbiber plusieurs antibiotiques sur des pastilles et à les déposer sur une gélose ensemencée avec la souche à tester. Après 24 à 48 heures d'incubation, le diamètre de la zone autour de la pastille où les bactéries ont été tuées (diamètre d'inhibition) est mesuré. Il permet alors de classer les bactéries comme sensibles, intermédiaires ou résistantes à l'antibiotique. Les valeurs de diamètres qui définissent les limites entre les trois classes ont été déterminées à partir d'une relation entre le diamètre d'inhibition et la CMI de la souche pour chaque antibiotique. La CMI est donc indirectement le paramètre de référence pour évaluer la sensibilité d'une souche bactérienne.

Il faut cependant remarquer que la CMI est toujours déterminée après une exposition des bactéries à des concentrations constantes en antibiotiques ce qui diffère des expositions *in vivo*. D'autres paramètres ont donc été choisis pour prendre en compte l'évolution des concentrations en antibiotique au niveau d'un site infectieux.

Trois paramètres pharmacocinétiques (PK) sont généralement utilisés pour décrire l'exposition d'un organisme à un xénobiotique (figure 13):

- $T > C$: le temps au-dessus d'une concentration,
- AUC : l'aire sous la courbe des concentrations,
- C_{max} : la concentration plasmatique maximale.

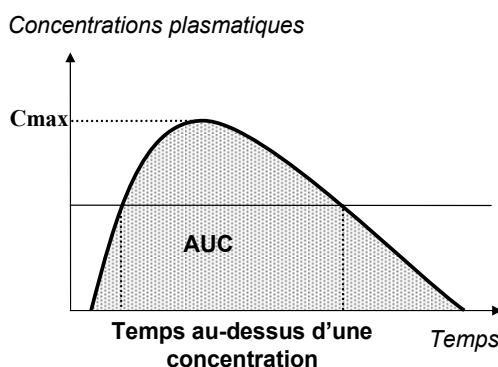


Figure 13 : Représentation schématique des concentrations en antibiotique au cours du temps.
Les paramètres pharmacocinétiques sont notés en gras.

Des indices pharmacocinétiques/pharmacodynamiques (PK/PD), qui tiennent compte de la sensibilité et de l'exposition de la souche à l'antibiotique, sont obtenus en couplant les trois paramètres PK à la CMI de l'antibiotique :

- $T > CMI$ le temps au-dessus de la CMI
- AUC/CMI : l'aire sous la courbe des concentrations divisée par la CMI
- C_{max}/CMI : la concentration plasmatique maximale divisée par la CMI.

La pertinence de ces indices pour prédire l'efficacité des fluoroquinolones a ensuite été testée *in vitro*, sur des modèles animaux et lors d'études cliniques.

Lors d'infections expérimentales de souris traitées avec une fluoroquinolone, la gatifloxacine, les indices AUC/CMI et Cmax/CMI ont montré une forte corrélation avec la guérison microbiologique [5]. Des études plus approfondies ont ensuite été menées pour déterminer des valeurs de ces indices capables de garantir une bonne efficacité des fluoroquinolones.

Pertinence et valeurs seuils de l'indice AUC/CMI

Etudes sur modèles animaux

Une valeur d'AUC/CMI de 100 heures a été nécessaire pour obtenir 100% de survie chez des souris infectées par *Klebsiella pneumoniae* traitées avec de la gatifloxacine [34]. Lors d'infections de cuisses ou de poumons de souris immunodéprimées, le nombre de bactéries a été maintenu constant (bactériostase) avec des AUC/CMI comprises entre 16 et 70 heures. Le système immunitaire a une influence sur cette valeur puisque l'AUC/CMI nécessaire pour obtenir le même effet sur des souris immunocompétentes était 2 fois plus faible [5].

Etudes cliniques

Chez l'homme, lors du traitement d'infections bactériennes par des fluoroquinolones, il a été montré que l'indice AUC/CMI était corrélé positivement à la guérison microbiologique [4, 5, 17, 24]. La guérison clinique des patients, quant à elle, semble dépendre de nombreux autres facteurs dont l'âge et le site d'infection. Une valeur seuil d'AUC/CMI de 125 heures a été déterminée pour obtenir la guérison microbiologique de patients sérieusement infectés [24]. Une autre valeur d'AUC/CMI de 87 heures a permis la guérison microbiologique de patients atteints d'infections nosocomiales à *Streptococcus pneumoniae* [17]. De manière comparable aux données obtenues sur modèles animaux, il semble que les valeurs seuils d'AUC/CMI soient inférieures lorsque le système immunitaire est fonctionnel. En effet, la guérison de patients immunocompétents infectés par *Streptococcus pneumoniae* a été obtenue avec des AUC/CMI de seulement 34 heures [4].

Expériences in vitro

In vitro, les AUC/CMI sont également corrélées aux effets des fluoroquinolones sur les inoculums bactériens [21, 40]. Lors de l'exposition *in vitro* de *Streptococcus pneumoniae* à des fluoroquinolones autres que la ciprofloxacine, qui est moins efficace, les AUC/CMI nécessaires pour éradiquer des inoculums bactériens de 10^6 à 10^8 CFU/mL étaient comprises entre 30 et 60 heures [33, 36, 38, 52]. Bien que ces valeurs d'AUC/CMI soient inférieures à celles recommandées pour la guérison microbiologique de patients, les modèles *in vitro* restent pertinents pour étudier les relations entre les AUC/CMI et l'efficacité des fluoroquinolones. De plus, il a été montré que ces relations étaient identiques pour différentes bactéries exposées à un même antibiotique mais variaient en fonction de l'antibiotique. Par conséquent, le paramètre AUC/CMI est aussi utilisé pour comparer différentes fluoroquinolones *in vitro* [20].

D'après les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo*, la corrélation entre les AUC/CMI et les effets des fluoroquinolones semble être bien établie. Cependant, il a été décrit que l'indice Cmax/CMI pouvait être dans certains cas plus prédictif de l'activité des fluoroquinolones [16].

Pertinence et valeurs seuils de l'indice Cmax/CMI

Etude sur modèles animaux

Une étude sur des rats atteints de septicémies a montré que l'indice Cmax/CMI était plus prédictif de la survie que l'indice AUC/CMI lorsque la valeur de Cmax/CMI était supérieure à 10 [16]. Une autre valeur de Cmax/CMI égale à 10.6 a également permis d'obtenir 100% de survie sur des souris infectées par *Streptococcus pneumoniae* et traitées avec de la ciprofloxacine [50].

Etudes cliniques

Une étude prospective sur les effets de différentes doses de lévofloxacine a montré qu'une valeur de Cmax/CMI supérieure à 12.2 permettait de prédire une guérison clinique et microbiologique [47]. Dans cette étude, 82 % des patients étaient exposés à des Cmax/CMI supérieures à 10.

Résistances aux fluoroquinolones

Mécanismes de résistances

La perte d'efficacité d'un antibiotique, qui se traduit par une résistance de la bactérie à cet antibiotique, peut être due soit à une mutation de ses cibles soit à une diminution de sa concentration intrabactérienne.

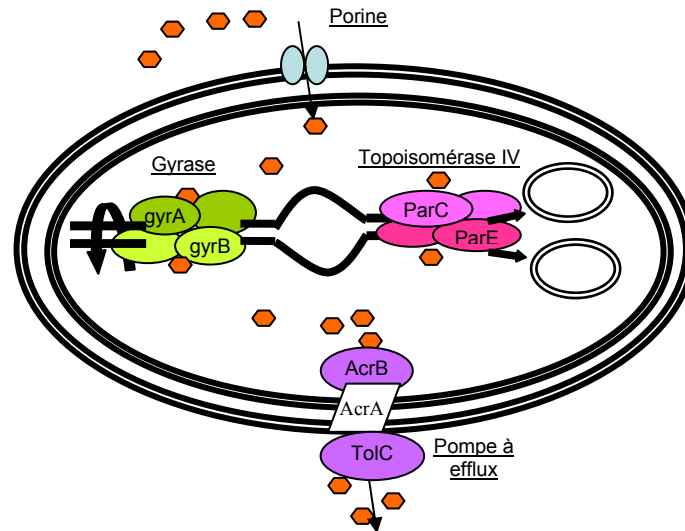


Figure 14 : Schéma des mécanismes de résistances aux fluoroquinolones d'une bactérie Gram négatif (soulignés sur le schéma).

Les résistances dues à une baisse des concentrations intrabactériennes proviennent de variations d'expression des protéines de transports membranaires telles que les porines et les pompes à efflux. Les porines permettent aux fluoroquinolones de franchir la membrane externe des bactéries Gram négatif. Les pompes à efflux, à l'opposé, font sortir l'antibiotique de la cellule par un transport actif. Les variations de l'expression de ces deux transporteurs peuvent être dues à des modifications de transcription de l'opéron *mar* (multiple antibiotic resistance) codant pour *MarA* (activateur), *MarB*, *MarC* et *MarR* (répresseur) qui induisent un phénotype *mar*. Des composés contenant des noyaux phénolés tels que les fluoroquinolones, des mutations sur le gène *marR* ou des régulateurs de transcription peuvent diminuer l'activité répressive de *MarR*. *MarA* est alors surexprimé et entraîne la transcription du gène *micF* qui produit un ARN anti-sens de l'ARN qui code pour *OmpF*, une des 2 porines d'*Escherichia coli*. Cependant, la diminution de la sensibilité aux fluoroquinolones associée à une mutation sur *marA* n'est que partiellement due à une diminution des porines à la surface des bactéries [13]. En effet, *MarA* induit aussi la transcription des gènes *acrA* et *acrB* codant pour les sous-unités d'une pompe à efflux [3, 45]. La diminution des concentrations intrabactériennes en antibiotique sans mutation supplémentaire induit rarement des résistances élevées. Par contre, ce phénomène peut potentialiser des résistances dues à des mutations sur les cibles des fluoroquinolones. Pour *Escherichia coli* et les autres bactéries Gram négatif, la gyrase est la cible préférentielle et la topoisomérase IV est la cible secondaire. Des mutations sur les gènes *gyrA* ou *gyrB* codant pour la gyrase entraînent le franchissement d'un premier palier de résistance chez les bactéries Gram négatif [44]. Les mutations sur les gènes *parC* et *parE* codant pour la topoisomérase IV ne provoquent une diminution de la sensibilité que lorsque la gyrase a été préalablement modifiée [29]. L'ordre des mutations conférant des résistances est inversé pour les bactéries Gram positif pour lesquelles la première mutation est le plus souvent sur la topoisomérase IV et la deuxième sur la gyrase.

Afin de prévenir l'émergence de ces résistances, de nouvelles études ont été menées pour déterminer des schémas posologiques capables de garantir la guérison du patient et aussi de prévenir l'émergence de mutants résistants.

Paramètres prédictifs de l'émergence de résistance corrélés à la CMI

Les indices PK/PD prédictifs de l'efficacité des fluoroquinolones (AUC/CMI et Cmax/CMI) ont été testés lors de nouvelles études pour déterminer des valeurs minimales permettant de prévenir la sélection de mutants résistants.

AUC/CMI

Des valeurs minimales d'indice AUC/CMI à atteindre pour prévenir l'émergence de mutants résistants de *Staphylococcus aureus* lors d'expositions aux fluoroquinolones ont été déterminées par plusieurs équipes. Les valeurs obtenues sont répertoriées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Valeurs minimales de l'indice AUC/CMI prévenant l'émergence de mutants.

Antibiotiques	Bactéries	Valeurs AUC/CMI
Levofloxacin	<i>Staphylococcus aureus</i>	97-201 [22]
		33-64 [10]
Ciprofloxacin	<i>Staphylococcus aureus</i>	123-244 [22]
		160-577 [9]

La différence entre les 2 valeurs seuils d'AUC/CMI pour la lévofloxacin peut être expliquée par la variabilité d'émergence de résistances en fonction de la souche bactérienne. En effet, il a été montré que la valeur d'AUC/CMI prévenant l'émergence de mutants lors de l'exposition à une autre fluoroquinolone, la moxifloxacin, était dépendante de l'espèce et de la souche bactérienne [14].

Cmax/CMI

Des valeurs minimales de Cmax/CMI permettant de prévenir l'émergence de nouveaux mutants ont aussi été recherchées parallèlement aux valeurs d'AUC/CMI. Les différentes valeurs de Cmax/CMI décrites dans la littérature sont notées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Valeurs minimales de l'indice Cmax/CMI prévenant l'émergence de mutants.

Antibiotiques	Bactéries	Valeurs Cmax/CMI
Enoxacin	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8 [8]
	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	
Lomefloxacin	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20 [16]
Levofloxacin	<i>Staphylococcus aureus</i>	3-6 [11]
		4-15 [37]
Ciprofloxacin	<i>Staphylococcus aureus</i>	14-48 [9]

D'après le tableau 2, les valeurs de Cmax/CMI prévenant l'émergence de premiers mutants d'une souche de *Staphylococcus aureus* sont plus élevées pour la ciprofloxacine que pour la lévofloxacine. La valeur minimale serait donc dépendante de la fluoroquinolone.

Les deux indices PK/PD décrits ci-dessus (AUC/CMI et Cmax/CMI) sont déterminés à partir de la CMI qui est la concentration minimale en antibiotique qui inhibe la croissance de $5 \cdot 10^5$ bactéries. Dans un inoculum de cette taille, la probabilité pour qu'une mutation apparaisse est très faible puisque la probabilité de mutation spontanée chez *Escherichia coli* est d'environ 10^{-8} . La CMI ne donne donc des informations que sur les bactéries sauvages. Cependant, le nombre de bactéries au niveau d'un site infectieux peut atteindre 10^{10} CFU ce qui rend probable la présence de bactéries porteuses d'une mutation spontanée chez un individu malade [6, 26]. L'éradication de ces quelques mutants résistants par les antibiotiques doit donc être possible par les doses prescrites afin d'éviter leur sélection au cours du traitement. Une méthode d'évaluation de la sensibilité de ces mutants, qui devait être connue pour déterminer les doses d'antibiotique, a été récemment décrite par Dong et al. [15]. Elle est semblable à la détermination de la CMI mais est réalisée avec 10^{10} bactéries au lieu de $5 \cdot 10^5$. Ce nouveau paramètre permettant de connaître la sensibilité des premiers mutants a été appelé MPC (Concentration Prévenant les premiers Mutants).

Paramètres prédictifs de l'émergence de résistance corrélés à la MPC

Définitions

Concentration Prévenant les premiers Mutants (MPC)

La MPC est déterminée en ensemençant 10^{10} bactéries sur des géloses supplémentées avec différentes concentrations en antibiotique. La MPC correspond à la plus petite concentration en antibiotique qui inhibe la croissance des bactéries après une incubation de 48 heures à 37°C (figure 15).

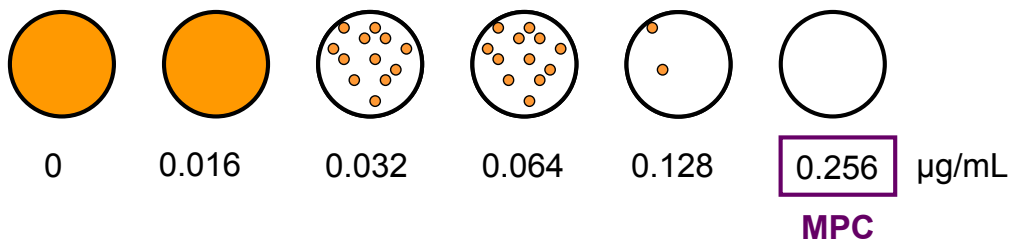


Figure 15 : Méthode de détermination de la MPC.

Les zones grisées correspondent à des colonies de bactéries. La MPC est la concentration pour laquelle aucune bactérie ne s'est développée après 48 h d'incubation à 37°C.

Un inoculum de 10^{10} CFU contient très probablement des bactéries porteuses d'une mutation sur les cibles de l'antibiotique et la MPC donne donc une information sur la sensibilité de ces bactéries. Pour plusieurs bactéries exposées à la ciprofloxacine, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre la CMI qui définit la sensibilité des souches sensibles et la MPC qui définit la sensibilité des premiers mutants [28, 41]. Par exemple, le rapport MPC/CMI est de 5.6 pour *Escherichia coli* exposée à la ciprofloxacine alors qu'il est de 16 pour *Staphylococcus aureus* [51]. La MPC doit donc être connue pour déterminer des doses capables de prévenir l'émergence de résistances puisque la sensibilité des premiers mutants ne peut pas être déduite de la CMI.

Fenêtre de sélection des premiers mutants

La CMI et la MPC déterminent les bornes inférieures et supérieures d'une gamme de concentrations appelée fenêtre de sélection des premiers mutants [54].

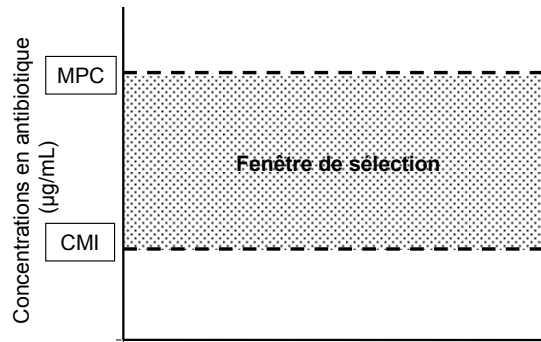


Figure 16 : Schéma d'une fenêtre de sélection.

Lors de l'exposition à des concentrations au-dessus de la CMI, les bactéries sensibles sont incapables de croître. Cependant, si les concentrations sont inférieures à la MPC, la croissance des premiers mutants reste possible et ces derniers peuvent alors devenir majoritaires. Il semble donc qu'une stratégie thérapeutique intéressante pour prévenir l'émergence de mutants soit de prescrire des doses d'antibiotiques capables de maintenir des concentrations au-dessus de la MPC pendant toute la durée du traitement. Afin de définir des schémas posologiques optimaux, des niveaux d'exposition corrélés à la MPC et à la fenêtre de sélection ont été recherchés.

Temps dans la fenêtre de sélection

Certains auteurs [22, 23, 56], ont mis en évidence une corrélation entre la durée pendant laquelle les concentrations en antibiotique se situaient dans la fenêtre de sélection et la réduction de la sensibilité de *Staphylococcus aureus* avant et après exposition à différentes fluoroquinolones. Selon ces auteurs, les concentrations devaient se situer dans cette fenêtre pendant un temps inférieur à 20-25% de l'intervalle d'administration pour éviter la sélection de résistances. Champion et al. [9-11], qui se sont également intéressés à *S. aureus*, ont aussi observé une sélection de bactéries résistantes lorsque les concentrations se situaient dans la fenêtre de sélection mais ils n'ont pu démontrer aucune corrélation entre le temps passé dans la fenêtre et le degré de résistance.

AUC/MPC

Allen et al. [3] ont mis en évidence une corrélation entre l'indice AUC/MPC et l'apparition de résistances pour *Staphylococcus aureus*. Cependant, la même équipe n'a pu déterminer aucune corrélation entre des paramètres basés sur la MPC tels que le temps au-dessus de la MPC ($T > MPC$), l'AUC/MPC ou le C_{max}/MPC et l'apparition de résistances chez *Streptococcus pneumoniae* [2]. Il en résulte que la corrélation entre MPC et résistances semble dépendre de l'espèce mais aussi de la souche bactérienne puisque des résultats différents ont été obtenus avec des *Staphylococcus aureus* sensibles et résistants à la méthicilline [3].

Applications pratiques

Pour prévenir l'émergence de résistances lors d'une antibiothérapie, il faudrait administrer des doses assez élevées pour bloquer la croissance des premiers mutants. Cependant, l'antibiotique étant éliminé progressivement par l'organisme, il est assez fréquent qu'à la fin de l'intervalle d'administration, les

concentrations soient inférieures à la MPC. Il faut donc réduire au maximum la durée pendant laquelle les concentrations sont dans la fenêtre de sélection aussi appelée période de sélection [35]. Il en résulte que les antibiotiques qui ont un rapport MPC/CMI faible et une élimination rapide présentent des caractéristiques potentiellement favorables pour la prévention de l'émergence de résistances [53].

Parfois, la dose nécessaire pour maintenir les concentrations au-dessus de la fenêtre de sélection conduit à des niveaux d'exposition associés à l'apparition d'effets indésirables. Une stratégie alternative consiste à associer un deuxième antibiotique dont les cibles bactériennes sont différentes. En effet, il est très peu probable qu'une bactérie d'un inoculum de 10^{10} bactéries puisse acquérir une mutation spontanée sur chacune des 2 cibles. Ainsi, si les concentrations d'un premier antibiotique se situent dans la fenêtre de sélection, les mutants résistants à cet antibiotique seront éradiqués par le deuxième antibiotique si ses concentrations sont au-dessus de la CMI (figure 17). Pour prévenir l'émergence de résistances, il faut alors éviter que les concentrations d'un antibiotique soient dans la fenêtre de sélection et que les concentrations de l'autre soient au-dessous de la CMI (figure 18) [18, 53].

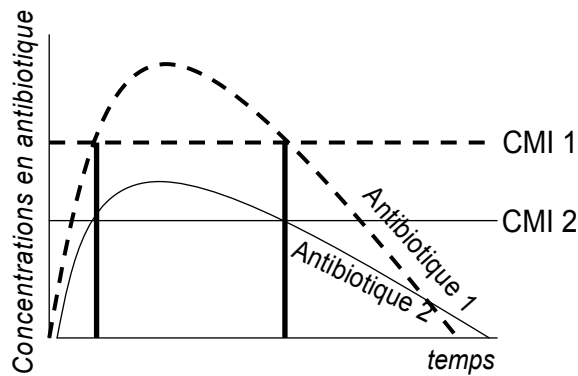


Figure 17 : Représentation schématique d'administration simultanée de 2 antibiotiques (1).
Les concentrations des 2 antibiotiques sont au-dessus de leur CMI pendant la même période.

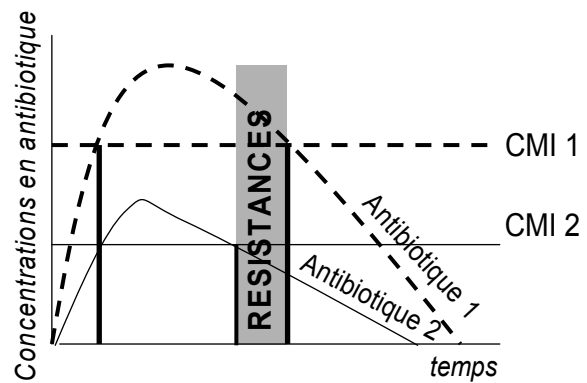


Figure 18 : Représentation schématique d'administration simultanée de 2 antibiotiques (2).
Dans la zone grisée, les concentrations de l'antibiotique 1 sont au-dessus de la CMI alors que celles de l'antibiotique 2 ne le sont pas.

En résumé de ces 2 dernières parties, les paramètres prédictifs de l'efficacité des fluoroquinolones sont calculés à partir de la CMI qui est déterminée avec $5 \cdot 10^5$ bactéries et les paramètres prédictifs l'émergence de résistance sont basés sur la MPC qui est déterminée avec 10^{10} bactéries. Cependant, des études sont encore nécessaires pour déterminer des valeurs de référence capables de toujours garantir une guérison microbiologique et une prévention de l'émergence de résistances.

Influence de la taille de l'inoculum

La plupart des indices d'efficacité décrits dans la partie précédente ont été étudiés avec une seule taille d'inoculum. Or, la taille d'un inoculum bactérien varie au cours de l'infection et il semble qu'elle influe sur l'activité bactéricide et sur la sélection de mutants par des antibiotiques.

Sur l'activité bactéricide

Des travaux ont été réalisés pour comparer l'efficacité de plusieurs classes d'antibiotiques sur deux inoculums de tailles différentes [32]. Un ratio a été calculé entre les CMI mesurées avec 10^8 CFU/mL et les CMI déterminées avec $2 \cdot 10^5$ CFU/mL. Il est apparu que ce ratio était toujours supérieur ou égal à 2 et atteignait une valeur de 128 pour la piperacilline. Les CMB (Concentration Minimale Bactéricide), c'est-à-dire les concentrations nécessaires pour éliminer 99.9 % des bactéries initialement présentes, ont été aussi comparées pour les deux tailles d'inoculums. Les CMB pour le grand inoculum étaient au minimum quatre fois plus élevées que pour le petit inoculum. Une autre étude [43] portant sur l'efficacité de plusieurs fluoroquinolones sur des inoculums de tailles différentes a montré que des concentrations bactéricides (capables de tuer des bactéries) sur un inoculum de 10^6 CFU/mL étaient seulement bactériostatiques (capables d'empêcher la croissance des bactéries) sur un inoculum de 10^{10} CFU/mL. Mizunaga et al. [42] ont fait des observations similaires puisqu'ils ont montré qu'à des concentrations égales à deux fois la CMI, la ciprofloxacine était bactéricide sur un inoculum de 10^6 CFU/mL de *Staphylococcus aureus* ou de *Pseudomonas aeruginosa* alors qu'aucune concentration entre 2 et 16 fois la CMI n'était bactéricide sur un inoculum de 10^8 CFU/mL. En résumé, ces études ont démontré que l'activité antibactérienne pouvait être influencée par la taille de l'inoculum bactérien, avec des différences variables selon l'antibiotique [32, 43].

Sur l'émergence de mutants résistants

L'apparition de bactéries résistantes aux fluoroquinolones est due à des mutations spontanées dont la fréquence est d'environ 10^{-8} . La probabilité de présence de premiers mutants dépend donc de la taille de la population bactérienne au site d'infection avant l'antibiothérapie. Pour les espèces bactériennes Gram négatif, des populations de l'ordre de 10^9 - 10^{10} CFU ont été observées dans le cadre d'infections expérimentales sur rongeurs [26] ou lors de cas cliniques chez l'Homme [6]. Dans ces situations, la présence de premiers mutants est très probable mais celle de doubles mutants très peu probable. Les bactéries sauvages présentant généralement un métabolisme qui les avantage par rapport aux mutants en absence d'antibiotique, c'est en présence de concentrations d'antibiotiques qui tuent les bactéries sauvages, mais pas les premiers mutants, qu'une pression de sélection peut s'exercer. Le développement d'une population nombreuse de premiers mutants peut alors entraîner l'apparition d'une deuxième mutation qui confère à la bactérie un niveau de résistance extrêmement élevé et qui la rend réfractaire à l'action de l'antibiotique. Dans ce contexte, il est crucial que la première antibiothérapie puisse éradiquer non seulement les bactéries sauvages, qui constituent l'essentiel de la population bactérienne au site d'infection, mais également les quelques premiers mutants qui ont pu apparaître. Pourtant, l'influence de la taille de l'inoculum sur l'émergence de mutants résistants ne semble pas avoir été étudiée. L'objectif de cette thèse est donc d'apporter quelques éléments de réponse en s'intéressant à l'influence de la taille de l'inoculum bactérien lors de l'exposition d'*Escherichia coli* ATCC 25922 à la marbofloxacine.

Conclusion et Projet de thèse

La revue bibliographique a montré que de nombreuses études se sont consacrées à la détermination de paramètres PK/PD capables de prédire l'efficacité des fluoroquinolones et leur capacité à prévenir l'émergence de résistances. Il a été montré que plusieurs paramètres dont AUC/CMI et C_{max}/CMI étaient corrélés positivement avec la guérison microbiologique. La détermination d'une concentration préventive des premiers mutants a permis de définir de nouveaux paramètres tels que le temps dans la fenêtre de sélection et l'AUC/MPC qui semblent particulièrement intéressants dans la prédiction de l'émergence de résistances. Cependant, il est important de noter que toutes les études sur la validité des paramètres PK/PD ont été menées avec une seule taille d'inoculum alors qu'il a été montré que l'action des antibiotiques dépendait du nombre de bactéries et que le nombre de mutants augmentait avec la taille de la population.

L'objectif de ce projet est d'étudier l'influence de la taille de la population bactérienne sur les deux paramètres clés de l'action d'un antibiotique, que sont l'efficacité contre la population bactérienne sauvage responsable de l'infection et le risque d'émergence de bactéries résistantes. Nous avons étudié l'action de la marbofloxacin, une fluoroquinolone commercialisée en médecine vétérinaire, sur une souche d'*Escherichia coli*.

2 DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

Le but de l'étude expérimentale était d'étudier l'influence de la taille de l'inoculum bactérien sur l'activité bactéricide et sur la sélection de mutants résistants par la marbofloxacin. L'étude de l'activité bactéricide sur les bactéries sauvages a été réalisée grâce à des courbes de bactériodie obtenues avec des concentrations constantes en antibiotiques. Des paramètres permettant de comparer l'activité des antibiotiques dans différentes conditions d'expérience ont ensuite été calculés. L'étude de l'émergence de mutants résistants a nécessité le développement d'un système *in vitro* dynamique, qui a permis d'exposer les bactéries à des concentrations au-dessus ou à l'intérieur de la fenêtre de sélection des premiers mutants.

Matériels et méthodes

Souche bactérienne et antibiotiques

La souche de référence *Escherichia coli* ATCC 25922 a été conservée à -80°C et a servi pour l'ensemble des études.

La marbofloxacin a été utilisée sous forme injectable à 100 mg/mL (Marbocyl 10 % ND, Vétoquinol) et sous forme de base fournie par le laboratoire Vétoquinol.

Evaluation de la sensibilité

Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

La détermination de la CMI de la marbofloxacin a été réalisée dans du bouillon Mueller-Hinton (MH) selon la méthode de microdilution préconisée par le CLSI [12]. Un inoculum de $5 \cdot 10^5$ bactéries a été mis en contact avec une gamme de concentrations d'antibiotiques obtenue par une série de dilutions au demi. La CMI était la concentration minimale qui a inhibé toute croissance visible après une incubation de 18 heures à 35°C.

Concentration Prévenant les premiers Mutants (MPC)

La concentration prévenant les premiers mutants a été déterminée afin de définir la fenêtre de sélection. Des colonies d'*Escherichia coli* ensemencées la veille sur une gélose MH ont été mises en suspension dans 8 mL de bouillon MH. Après 4 heures d'incubation, lorsque les bactéries étaient en croissance exponentielle, la suspension a été transférée dans 150 mL de MH. Après une incubation à 37°C pendant 18 heures, la suspension a ensuite été centrifugée à 3000 g pendant 10 min. Le surnageant a été éliminé et les bactéries ont été lavées 2 fois dans 20 mL de NaCl à 0.9 % et reprises dans 1.5 mL de NaCl. La suspension obtenue contenait environ 10^{11} CFU/mL. Des fractions de 100 µL (correspondant à un inoculum de 10^{10} CFU) ont ensuite été ensemencées sur des géloses MH supplémentées avec différentes concentrations d'antibiotiques. Après 48 h d'incubation à 37°C, les colonies qui se sont développées sur les géloses ont été dénombrées. La MPC était la concentration minimale en antibiotique nécessaire pour qu'aucune colonie ne se développe. Sur les graphiques représentant le nombre de CFU/gélose, lorsque le nombre de colonies était supérieur à 100, un symbole a été placé directement au-dessus de la limite de détection supérieure. Lorsqu'il n'y avait aucune bactérie sur la gélose, le symbole a été placé sous la limite de détection inférieure.

Courbes de bactéricidie

La relation entre la concentration et l'activité de la marbofloxacin sur les bactéries a été évaluée en réalisant des courbes de bactéricidie. Les concentrations en marbofloxacin au contact de la suspension bactérienne étaient constantes pendant toute la durée de l'incubation.

Des colonies d'*Escherichia coli* ensemencées la veille sur une gélose MH ont été mises en suspension dans 8 mL de bouillon MH. Après une incubation à 37°C pendant une durée comprise entre 0 et 8 h 30, 80 µL de marbofloxacin ou 80 µL de bouillon MH (contrôle) ont été ajoutés aux suspensions de façon à tester sept concentrations finales d'antibiotique comprises entre 0.004 et 0.256 µg/mL. Les suspensions ont ensuite été placées à l'étuve à 37°C et des prélèvements ont été effectués dans chaque tube à 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 et 24 heures pour dénombrer les bactéries vivantes.

En présence de concentrations constantes

Comparaison de 3 inoculums de tailles différentes

Trois inoculums contenant environ 10^5 , 10^7 et 10^9 CFU/mL ont été obtenus à partir d'une même suspension bactérienne incubée à 37°C pendant respectivement 1h30, 4h et 8h30. La marbofloxacin a été ajoutée après ces durées d'incubation.

Comparaison de 2 inoculums contenant des bactéries à différents stades de croissance

Deux inoculums de 10^5 et 10^7 CFU/mL ont été préparés. L'antibiotique a immédiatement été ajouté à l'inoculum de 10^7 CFU/mL. L'inoculum de 10^5 CFU/mL a été incubé à 37°C pendant environ 5 heures pour obtenir 10^7 CFU/mL avant d'ajouter la marbofloxacin.

En présence de concentrations variables

Un système *in vitro* dynamique a été développé pour mimer l'exposition *in vivo* des bactéries aux antibiotiques. Il a été utilisé d'une part, pour étudier la bactéricidie avec des concentrations variables en antibiotiques au contact des bactéries et d'autre part, pour évaluer l'émergence de bactéries résistantes au cours du temps.

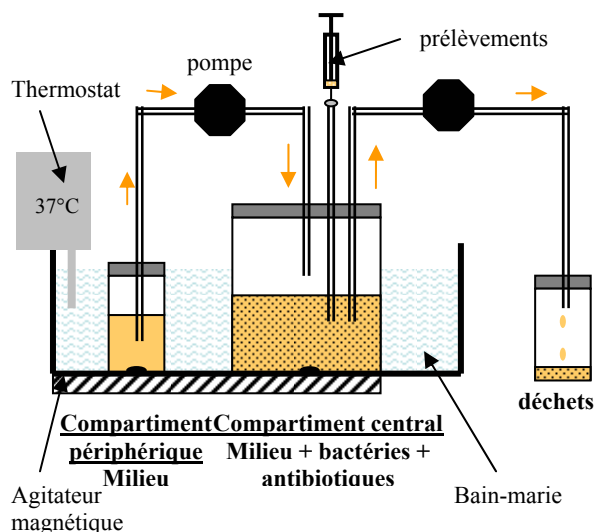


Figure 19 : Schéma de la structure du système *in vitro* dynamique.

La structure du système *in vitro* dynamique consistait en 2 compartiments placés dans un bain-marie thermostaté à 37 °C. La suspension bactérienne contenue dans le compartiment central a été continuellement homogénéisée par une agitation magnétique. En début d'expérience, la marbofloxacin a été injectée dans le compartiment central. Elle a ensuite été diluée pour mimer son élimination par une pompe Masterflex ND qui apportait

bouillon MH sans antibiotique à partir du compartiment périphérique. Le débit de dilution était de 0.7 mL/min pour diviser la concentration par 2 en 9 heures. Le volume du compartiment central a été maintenu constant par une élimination de bouillon MH vers un flacon de déchet au même débit. Des prélèvements de 80 µL ont été effectués à 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 26, 29 et 32 heures dans le compartiment central pour dénombrer les bactéries et mesurer les concentrations en marbofloxacin. La marbofloxacin a été dosée par HPLC dans une gamme de concentration de 0.02 à 1 µg/mL.

Méthodes de dénombrements

Dénombrements de bactéries vivantes dans une suspension

Le dénombrement des bactéries vivantes dans une suspension à un instant donné s'est fait à partir d'un prélèvement de 80 µL qui a été dilué plusieurs fois au 10^{ème}. Dix microlitres de chaque dilution ont ensuite été déposés sur une gélose trypticase soja supplémentée en sulfate de magnésium et en charbon actif utilisé pour piéger l'antibiotique (3 dépôts par dilution). Après une incubation de 18 h à 37°C, les colonies formées à l'emplacement de chaque dépôt ont été comptées si leur nombre était compris entre 0 et 15. La moyenne du nombre de colonies des 3 dépôts issus de la même dilution a ensuite été calculée et multipliée par le facteur de dilution pour obtenir le nombre de bactéries par millilitre. La limite de détection était de 100 CFU/mL.

Dénombrements de bactéries résistantes dans une suspension

Une évaluation de la sensibilité des bactéries contenues dans le compartiment central du système *in vitro* dynamique a été effectuée à 0 et 32 heures pour détecter l'émergence de résistances. Un millilitre de la suspension bactérienne a été prélevé et centrifugé à 3000 g pendant 10 min. Le surnageant a été éliminé et le culot repris dans le même volume de bouillon MH sans antibiotique. Cent microlitres de cette suspension ont été déposés sur des géloses MH supplémentées avec des concentrations de marbofloxacin comprises entre 0.016 et 1.024 µg/mL ainsi que sur une gélose MH sans antibiotique. Les colonies formées sur chaque gélose ont été dénombrées après 48 h et 96 h d'incubation à 37°C si leur nombre était inférieur à 100. Des fréquences de bactéries résistantes ont été calculées en divisant le nombre de colonies observées par le nombre total de bactéries présentes dans la suspension bactérienne du compartiment central. Quand les colonies étaient très nombreuses sur la gélose, la fréquence a été fixée à 1.

Analyses des courbes de bactéricidie

Effet bactéricide

Un indice décrivant l'effet bactéricide des différentes concentrations de marbofloxacin a été construit en utilisant l'équation 10 :

$$\text{Effet}_{\text{bactéricide}}(\%) = 100 \times \left(1 - \frac{AUC_{[0-8h]avecATB}}{AUC_{[0-8h]sansATB}}\right) \quad \text{Équation 10}$$

où AUC correspond à l'aire sous la courbe décrivant le nombre de bactéries (log CFU/mL) en fonction du temps. Les aires sous la courbe ont été calculées à partir des données observées en utilisant la méthode des trapèzes linéaires.

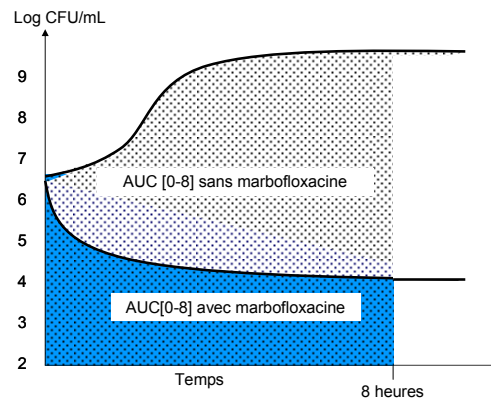


Figure 20 : Représentation des aires utilisées pour le calcul de l'effet bactéricide.
L'aire sous la courbe sans antibiotique entre 0 et 8 heures correspond à la zone en pointillés, celle sous la courbe avec antibiotique correspond à la zone sombre.

Vitesse de bactéricidie

La vitesse de bactéricidie a été définie comme la pente de la droite passant par les dénombrements à 0, 0.5 et 1 heure. Dans certaines situations où le dénombrement à 1 heure était sous le seuil de détection, seuls les points à 0 et 0.5 heures ont été considérés. Enfin, une limite de quantification de la vitesse a été établie pour les cas où tous les dénombrements après l'ajout de la marbofloxacin étaient sous le seuil de détection. Elle correspond à la différence entre le nombre de bactéries avant l'ajout de marbofloxacin et la limite de quantification de 100 CFU/mL divisée par 0.5 heure.

Résultats

Sensibilité de la souche *Escherichia coli* ATCC 25922 à la marbofloxacin

La sensibilité à la marbofloxacin de la souche de référence *Escherichia coli* ATCC 25922 a été évaluée selon les normes internationales du CLSI afin de déterminer la gamme de concentration à utiliser pour les expériences ultérieures.

Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

La détermination de la CMI de la marbofloxacin pour *Escherichia coli* ATCC 25922 a été réalisée lors de 24 expériences indépendantes. Les résultats et leurs fréquences sont représentés sur la figure 21. La valeur modale de 0.008 µg/mL a été retenue comme CMI.

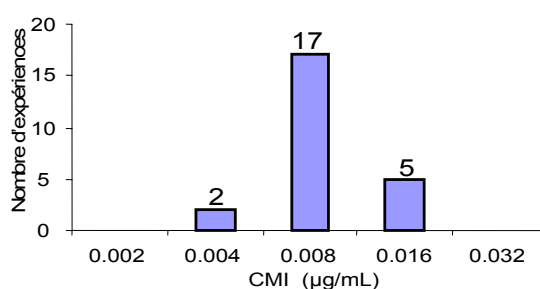


Figure 21 : Détermination de la CMI de la marbofloxacin pour *Escherichia coli* ATCC 25922. Représentation des CMI obtenues et de leur fréquence lors de 24 expériences indépendantes.

Concentration Prévenant les premiers Mutants (MPC)

La MPC de la marbofloxacin pour *Escherichia coli* ATCC 25922 a été déterminée à partir de 4 expériences. La figure 22 représente le nombre de CFU par gélose en fonction des concentrations d'antibiotique contenues dans les géloses après ensemencement de 10^{10} CFU. Les concentrations minimales pour lesquelles aucune colonie ne s'est développée étaient 0.128 µg/mL dans une expérience et 0.256 µg/mL dans les trois autres. La valeur de 0.256 µg/mL a été retenue comme MPC.

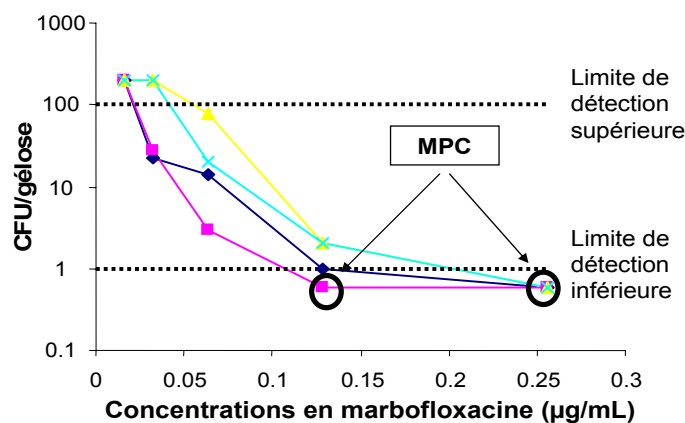


Figure 22 : Détermination de la MPC de la marbofloxacine pour *Escherichia coli* ATCC 25922
Représentation du nombre de colonies en fonction de la concentration en marbofloxacine ajoutée à la gélose (seuil de détection supérieur : 100 CFU/gélose et seuil de détection inférieur : 1 CFU/gélose). Les résultats de 4 expériences sont représentés.

Fenêtre de sélection

La CMI et la MPC obtenues précédemment ont permis de définir les bornes inférieures et supérieures de la fenêtre de sélection des premiers mutants d'*Escherichia coli* ATCC 25922 pour la marbofloxacine (figure 23).

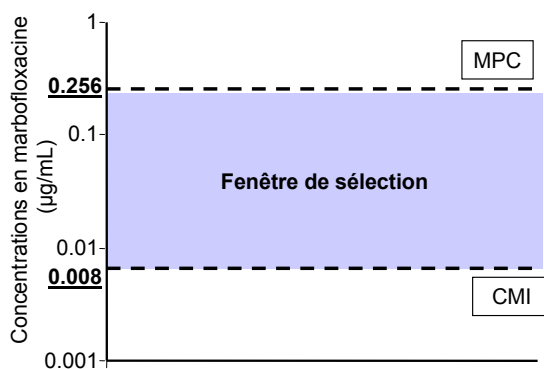


Figure 23 : Schéma de la fenêtre de sélection des premiers mutants d'*Escherichia coli* par la marbofloxacine.
La fenêtre de sélection est représentée en gris. La CMI est de 0.008 µg/mL et la MPC de 0.256 µg/mL.

L'évaluation de la sensibilité de la souche a permis de définir les gammes de concentrations à tester lors des expériences ultérieures.

Pour évaluer l'influence de la taille de l'inoculum sur l'activité bactéricide de la marbofloxacine, les bactéries ont été exposées à des concentrations multiples de la CMI. Pour l'évaluation de l'influence de la taille de l'inoculum sur la sélection de mutants, les concentrations d'antibiotiques ont été choisies pour être au-dessus ou au-dessous de la MPC.

Influence de la taille de l'inoculum sur l'activité bactéricide de la marbofloxacin

Evolution de la population bactérienne sans antibiotique

Trois expériences indépendantes ont été réalisées afin de suivre la croissance d'une population d'*Escherichia coli* pendant 24 heures d'incubation dans du bouillon MH (3 inoculums ont été testés par expérience). Les résultats sont représentés sur les figures 24 et 25 respectivement pour un inoculum initial de 10^5 et 10^8 CFU/mL.

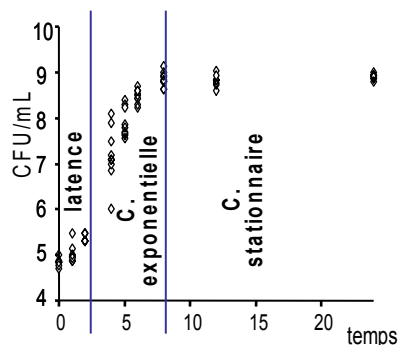


Figure 24 : Croissance d'*Escherichia coli* ATCC 25922 à partir d'un inoculum 10^5 CFU/mL.

Les résultats de 3 expériences sont représentés (3 inoculums ont été suivis par expérience).

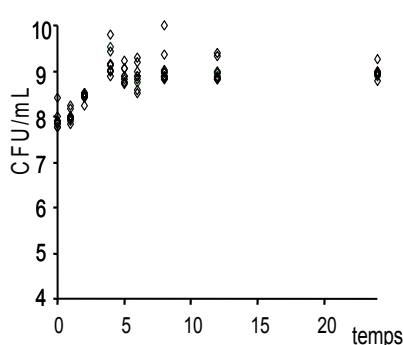


Figure 25 : Croissance d'*Escherichia coli* ATCC 25922 à partir d'un inoculum 10^8 CFU/mL.

Les résultats de 3 expériences sont représentés (3 inoculums ont été suivis par expérience).

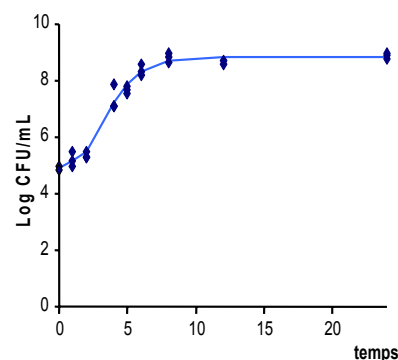


Figure 26 : Modélisation de la croissance de 3 suspensions bactériennes de 10^5 CFU/mL.

Les points ont été déterminés à partir d'une expérience et la courbe a été modélisée sur Winolin ND.

Ces figures montrent que l'évolution de la population d'*Escherichia coli* dans le bouillon MH suit les 3 phases de croissance caractéristiques des bactéries (phases de latence, de croissance exponentielle et de croissance stationnaire). La densité maximale est d'environ 10^9 CFU/mL quelque soit la taille initiale de l'inoculum.

La croissance de la population bactérienne a ensuite été modélisée par l'équation 11 précédemment décrite dans le paragraphe 1.1.4.1.

$$\frac{dN}{dt} = A.(1 - e^{-k(N-N_0)}).(1 - \frac{N}{N_{max}}).N \quad \text{Équation 11}$$

La courbe obtenue a été représentée sur la figure 26 et le temps de doublement de la population bactérienne dans le bouillon MH pendant la phase de croissance exponentielle a pu être estimé à 50 minutes dans nos conditions expérimentales.

Evolution de la population bactérienne avec antibiotiques

La marbofloxacin a ensuite été ajoutée à différents stades de croissance afin d'étudier son activité sur 3 inoculums de tailles différentes provenant d'une même population de départ.

Lors de l'ajout de marbofloxacin après 1h30, 4h ou 8h30 d'incubation à 37°C, les suspensions bactériennes contenaient respectivement 10^5 , 10^7 et 10^9 CFU/mL (figure 27). Les courbes de bactéricidie sont représentées sur les figures 28 à 30.

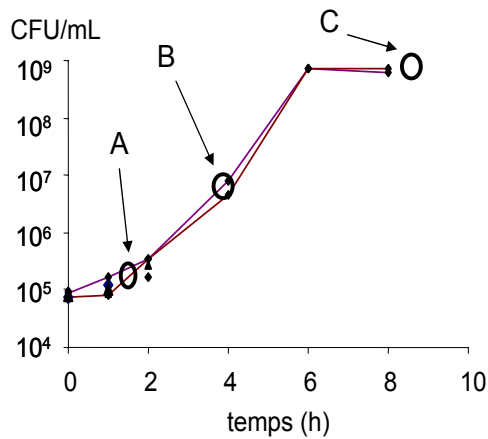


Figure 27 : Croissance des bactéries en incubation à 37°C avant l'ajout de la marbofloxacine. A, B et C indiquent les moments où la marbofloxacine a été ajoutée respectivement aux inoculums 10^5 , 10^7 et 10^9 CFU/mL.

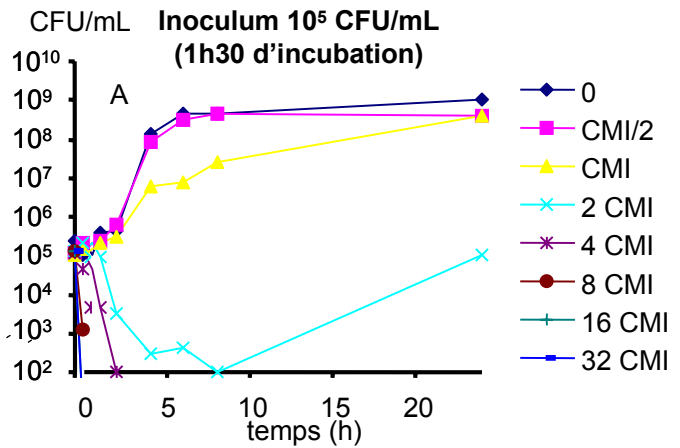


Figure 28 : Courbes de bactéricidie obtenues à partir d'un inoculum de 10^5 CFU/mL. Les concentrations de marbofloxacine testées sont exprimées en multiples de CMI

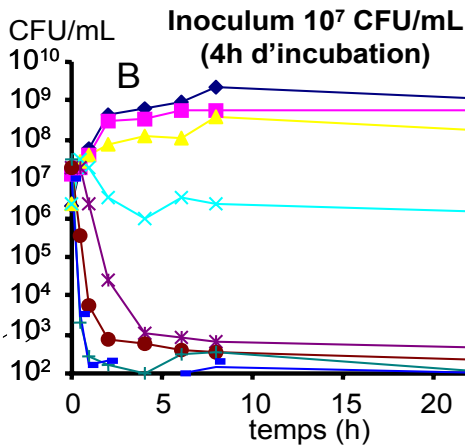


Figure 29 : Courbes de bactéricidie obtenues à partir d'un inoculum de 10^7 CFU/mL. Les concentrations de marbofloxacine testées sont exprimées en multiples de la CMI.

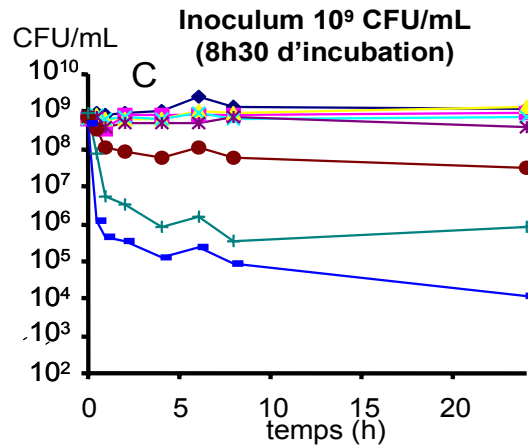


Figure 30 : Courbes de bactéricidie obtenues à partir d'un inoculum de 10^9 CFU/mL. Les concentrations de marbofloxacine testées sont exprimées en multiples de la CMI.

Les figures 28 à 30 montrent une variation de l'activité de la marbofloxacine en fonction de la taille de l'inoculum. Ainsi, les concentrations capables d'éradiquer 99.9% de la population bactérienne (taille de l'inoculum divisée par 1000) sont de 2, 4 et 16 fois la CMI respectivement pour les inoculums de départ 10^5 , 10^7 et 10^9 CFU/mL.

Les figures 31 et 32 représentent les vitesses de bactéricidie obtenues au cours de la première heure et les effets bactéricides sur les 8 premières heures.

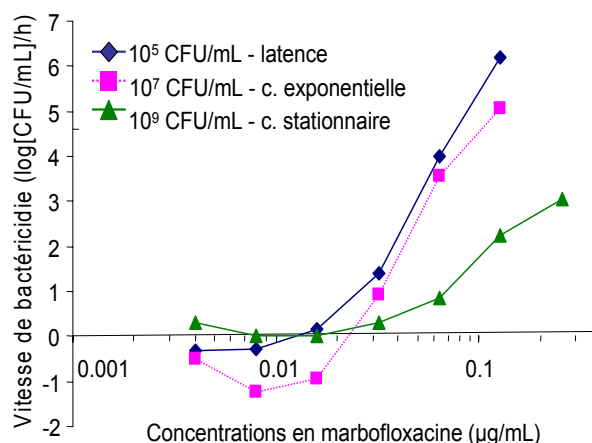


Figure 31 : Vitesses de bactéricidie de la marbofloxacin en fonction de l'inoculum.

Quantité de bactéries tuées par unité de temps pendant la première heure d'exposition à la marbofloxacin. Les résultats sont représentés pour les 3 inoculums de 10^5 , 10^7 et 10^9 CFU/mL.

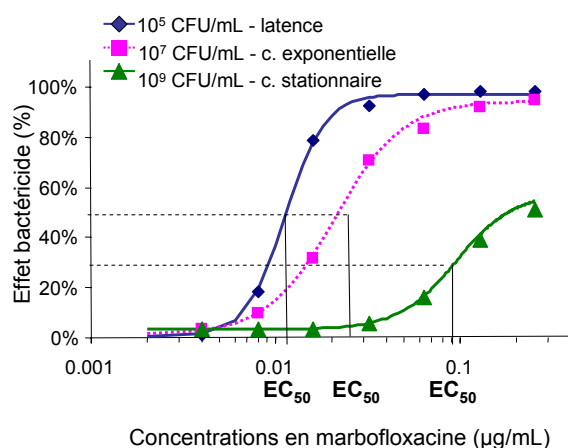


Figure 32 : Effets bactéricides de la marbofloxacin en fonction de l'inoculum.

Les points ont été calculés et les courbes estimées par un modèle sigmoïde. Les résultats sont représentés pour les 3 inoculums de 10^5 , 10^7 et 10^9 CFU/mL.

Tableau 3 : Valeurs des Emax et EC_{50} calculés pour les modèles sigmoïdes des effets bactéricides de chaque inoculum (figure 32).

Taille inoculum	10^5	10^7	10^9
E max (%)	97	93	54
EC_{50} (µg/mL)	0.011	0.021	0.095

La figure 31 montre que pour des concentrations supérieures à $0.032 \mu\text{g/mL}$ (4 fois la CMI), les vitesses de bactéricidie lors de la première heure d'exposition à la marbofloxacin étaient plus faibles dans l'inoculum 10^9 CFU/mL que dans les deux autres inoculums. Les effets bactéricides, représentés sur la figure 32, présentaient des relations de type Emax pour les 3 inoculums. Ces courbes ont alors été ajustées avec un modèle Emax sigmoïde dont les paramètres sont indiqués dans le tableau 3. L'effet bactéricide maximal obtenu avec l'inoculum de 10^9 CFU/mL était 2 fois moins important que celui des 2 autres inoculums. L'inoculum 10^9 CFU/mL se distinguait également par une EC_{50} beaucoup plus élevée.

La marbofloxacin semble avoir un effet bactéricide légèrement plus puissant (EC_{50} légèrement plus faible) sur l'inoculum 10^5 CFU/mL par rapport à l'inoculum 10^7 CFU/mL. Cependant, il faut signaler qu'au moment de l'ajout de la marbofloxacin, les bactéries étaient en phase de latence sur l'inoculum 10^5 CFU/mL et en phase de croissance exponentielle sur l'inoculum 10^7 CFU/mL (figure 27).

Les fluoroquinolones étant décrites comme plus efficaces sur les bactéries en croissance, des essais complémentaires ont été menés pour évaluer l'influence du stade de croissance sur l'activité bactéricide de la marbofloxacin.

Les figures 33 et 34 présentent les courbes de bactéricidie obtenues à partir de 2 inoculums de 10^7 CFU/mL en phase de latence ou en phase de croissance exponentielle

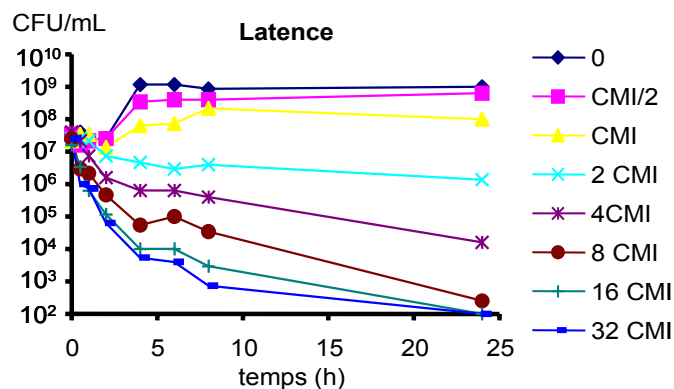


Figure 33 : Courbes de bactéricidie obtenues à partir d'un inoculum de 10^7 CFU/mL en phase de latence au moment de l'ajout de marbofloxacine. Les concentrations testées sont exprimées en multiples de la CMI.

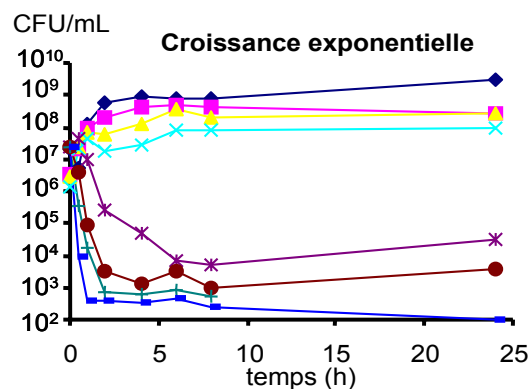


Figure 34 : Courbes de bactéricidie obtenues à partir d'un inoculum de 10^7 CFU/mL en phase de croissance exponentielle au moment de l'ajout de marbofloxacine. Les concentrations testées sont exprimées en multiples de la CMI.

La marbofloxacine a été plus efficace sur l'inoculum en phase de croissance exponentielle que sur l'inoculum en phase de latence. Une concentration de 4 fois la CMI a divisé la population par 1000 en 8 heures dans l'inoculum en phase de croissance alors qu'elle a à peine divisé la population par 100 dans l'inoculum en phase de latence. Les vitesses de bactéricidie pendant la première heure d'exposition à la marbofloxacine et les effets bactéricides sur 8h ont été déterminés pour les 2 stades de croissance (figures 35 et 36).

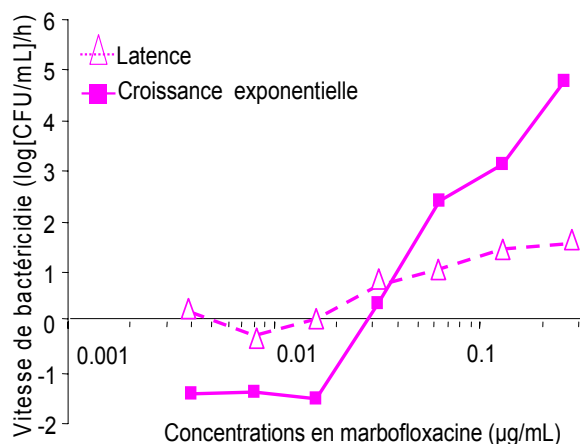


Figure 35 : Vitesses de bactéricidie en fonction du stade de croissance.

Quantité de bactéries tuées par unité de temps pendant la première heure d'exposition à la marbofloxacine.

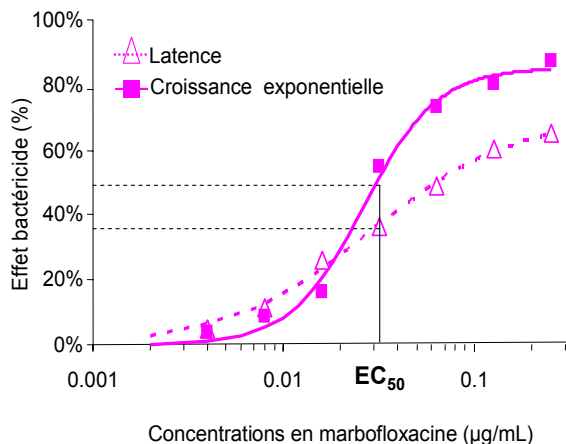


Figure 36 : Effets bactéricides en fonction du stade de croissance. Les points ont été calculés et les courbes estimées par un modèle sigmoïde.

Pour des concentrations de 8 à 32 fois la CMI (0.064 $\mu\text{g/mL}$ à 0.256 $\mu\text{g/mL}$), les vitesses de bactéricidie étaient plus élevées dans l'inoculum en croissance exponentielle que dans l'inoculum en phase de latence. Les effets bactéricides étaient aussi plus importants sur l'inoculum en phase de croissance exponentielle pour lequel l'effet maximal était de 85% alors qu'il était de 70% pour l'inoculum en phase de latence. L' EC_{50} était de 0.03 $\mu\text{g/mL}$ quelque soit le stade.

Influence de la taille de l'inoculum sur la sélection de sous-populations résistantes

Evolution de la population bactérienne sans antibiotique

Une première étude a été réalisée pour évaluer la cinétique de croissance d'un inoculum bactérien dans de nouvelles conditions expérimentales caractérisées par un renouvellement du bouillon MH, qui conduisait à l'élimination de bactéries hors du compartiment central. Les courbes de la figure 37 présentent la croissance de

trois inoculums de tailles différentes. Elles indiquent que l'allure globale de croissance avec les phases de latence, de croissance exponentielle et de croissance stationnaire a été conservée. La densité bactérienne maximale de 10^9 CFU/mL était également identique à celle obtenue en conditions statiques.

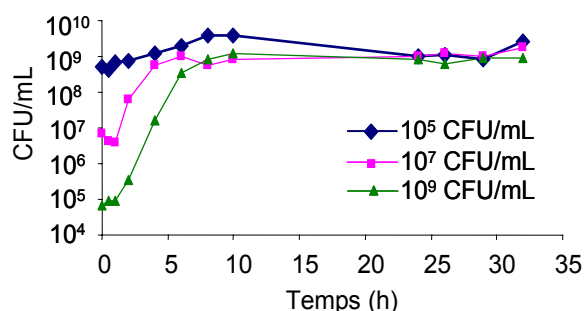


Figure 37 : Croissance des bactéries dans le système in vitro dynamique avec un débit de renouvellement de milieu à 0.7 mL/min. 3 inoculums de 10^5 , 10^7 et 10^9 CFU/mL ont été testés.

L'élimination des bactéries hors du compartiment central était donc négligeable par rapport à la croissance bactérienne. Cette observation était prévisible, puisque le temps de doublement de la population en phase exponentielle était de moins de 50 min et que le temps nécessaire à l'élimination de la moitié des bactéries hors du compartiment central était de 9 heures.

Evolution de la population bactérienne avec antibiotiques

La marbofloxacine a été injectée dans le compartiment central et diluée à un débit de 0.7 mL/min qui correspondait à un temps de demi-vie de 9 heures (la concentration est divisée par 2 en 9 heures) pour un volume de 500 mL. Deux concentrations initiales de marbofloxacine de 1.2 et 0.25 $\mu\text{g/mL}$ ont été testées pour les 3 tailles d'inoculum afin d'apprécier l'impact de la MPC. Dans le premier cas, les concentrations de marbofloxacine ont été maintenues au-dessus de la fenêtre de sélection des premiers mutants pendant environ 18 heures (figure 38) et dans le second, les concentrations de marbofloxacine étaient dans la fenêtre de sélection pendant 32 heures (figure 39).

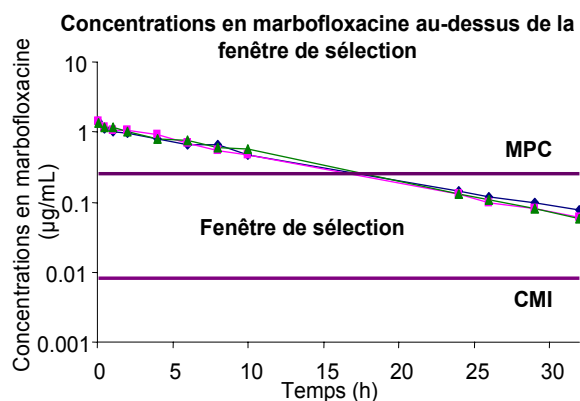


Figure 38 : Concentrations de marbofloxacine en fonction du temps (1). Les concentrations obtenues lors de l'étude des 3 inoculums sont représentées.

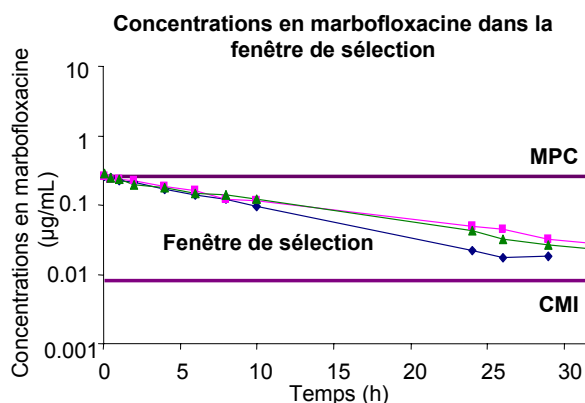


Figure 39 : Concentrations de marbofloxacine en fonction du temps (2). Les concentrations obtenues lors de l'étude des 3 inoculums sont représentées.

Les figures 40 et 41 présentent pour les deux niveaux d'exposition à la marbofloxacine, l'évolution au cours temps du nombre de bactéries provenant d'inoculums de 3 tailles différentes.

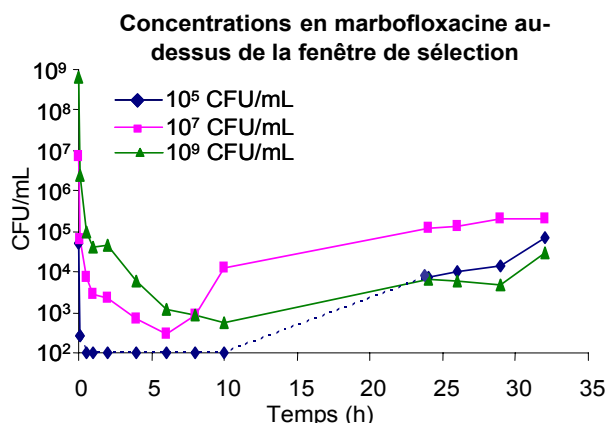


Figure 40 : Courbes de bactéricidie de 3 inoculums de tailles différentes (1) exposés à des concentrations de marbofloxacine au-dessus de la fenêtre de sélection.

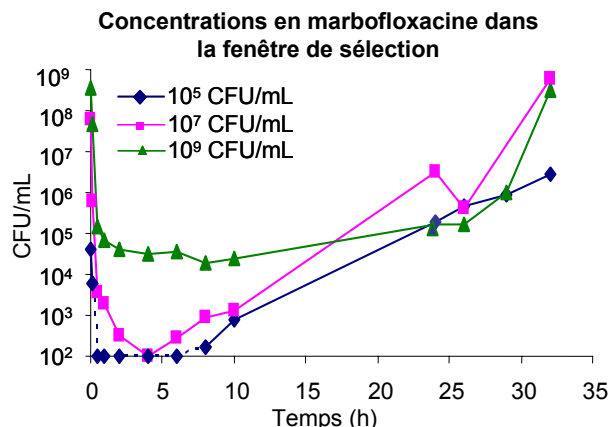


Figure 41 : Courbes de bactéricidie de 3 inoculums de tailles différentes (2) exposés à des concentrations de marbofloxacine à l'intérieur de la fenêtre de sélection.

Tableau 4 : Nombre minimal de bactéries et nombre de bactéries après 32 heures d'exposition à la marbofloxacine pour chaque inoculum exposé à chaque profil de concentrations.

Taille de l'inoculum (CFU/mL)	Exposition à des concentrations au-dessus de la fenêtre de sélection			Exposition à des concentrations dans la fenêtre de sélection		
	10 ⁵	10 ⁷	10 ⁹	10 ⁵	10 ⁷	10 ⁹
Nombre minimal de bactéries (CFU/mL)	<100	300	6.10 ²	<100	100	2.10 ⁴
Nombre de bactéries à 32 heures (CFU/mL)	7.10 ⁴	2.10 ⁵	3.10 ⁴	3.10 ⁶	6.10 ⁸	3.10 ⁸

Dans tous les cas, on a observé une réduction rapide du nombre de bactéries pendant les premières heures d'exposition, puis la vitesse de bactéricidie a diminué et la taille de la population a augmenté à nouveau. Le nombre minimal de bactéries atteint était variable en fonction de la taille de l'inoculum et de la concentration en antibiotique (tableau 4). Les charges bactériennes minimales obtenues à partir d'inoculums initiaux de 10⁵ CFU/mL étaient inférieures à la limite de détection (100 CFU/mL). Au cours de l'exposition à des concentrations de marbofloxacine supérieures à la fenêtre de sélection, le nombre de bactéries présentes à 32 h était compris entre 10⁴ et 10⁵ CFU/mL quelle que soit la taille de l'inoculum de départ. Après 32 heures d'exposition à des concentrations à l'intérieur de la fenêtre de sélection, la population bactérienne était de 10⁸-10⁹ CFU/mL pour les inoculums initiaux de 10⁷ et 10⁹ CFU/mL, alors qu'elle était 100 fois moins importante avec l'inoculum initial de 10⁵ CFU/mL (tableau 4).

La sensibilité des bactéries présentes dans la population a été testée avant l'ajout de marbofloxacine et après 32 heures d'exposition. La figure 42 présente les fréquences des colonies qui se sont développées sur des géloses contenant des concentrations croissantes de marbofloxacine.

Concentrations en marbofloxacine dans la fenêtre de sélection.

A
B
C
10⁵ CFU/mL
10⁷ CFU/mL
10⁹ CFU/mL

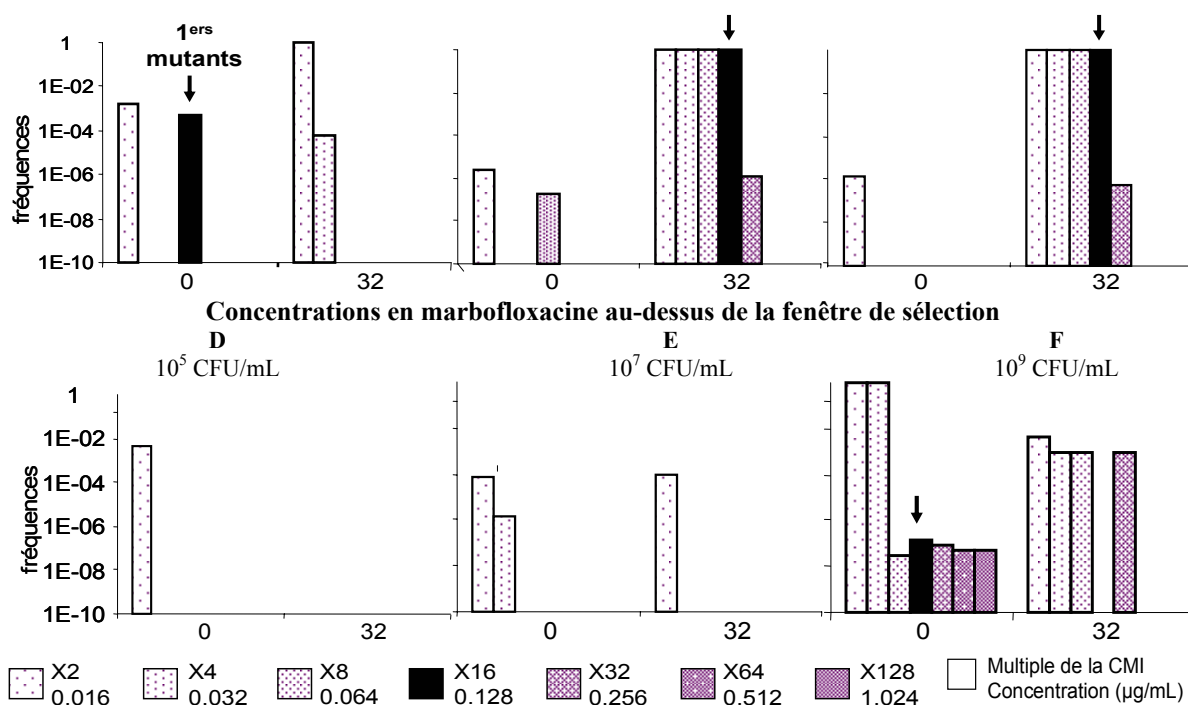


Figure 42 : Fréquence de bactéries résistantes à différentes concentrations de marbofloxacin. La sensibilité a été testée pour chaque inoculum exposé à chaque profil de concentrations après 0 et 32 heures d'exposition.

Des bactéries capables de se développer en présence de 2 fois la CMI ont été retrouvées dans tous les inoculums avant l'ajout de marbofloxacin. Un des deux inoculums de 10⁹ CFU/mL contenait au départ une sous-population très minoritaire (fréquence < 10⁻⁶) capable de se développer en présence de 128 fois la CMI (figure 42 F). Après 32 heures d'exposition à des concentrations situées dans la fenêtre de sélection, la majorité des bactéries des inoculums 10⁷ et 10⁹ CFU/mL était résistante à 16 fois la CMI (figures 42 B et C) et une sous-population très minoritaire (fréquence aux environs de 10⁻⁶) était résistante à 32 fois la CMI. Aucune bactérie issue de l'inoculum de 10⁵ CFU/mL ne s'est développée en présence de 16 fois la CMI (figure 42 A). Pour les bactéries exposées à des concentrations supérieures à la MPC pendant 18 heures, aucune bactérie à sensibilité diminuée n'a été détectée à partir de l'inoculum de 10⁵ CFU/mL (figure 42 D) alors que des sous-populations se développant en présence de 2 et 32 fois la CMI ont été détectées respectivement à partir des inoculums de 10⁷ et 10⁹ CFU/mL (figures 42 E et F).

Discussion

Influence de la taille de l'inoculum sur l'activité bactéricide de la marbofloxacin

Afin d'étudier l'influence de la taille de la population bactérienne sur la bactéricidie, l'antibiotique a été ajouté à trois périodes différentes de la croissance spontanée d'un inoculum : pendant la phase dite de latence pour l'inoculum de petite taille (10^5 CFU/mL), au cours de la phase de croissance exponentielle pour l'inoculum de taille intermédiaire (10^7 CFU/mL) et au début de la phase stationnaire pour l'inoculum de densité maximale (10^9 CFU/mL). Ce protocole n'a pas permis de différencier l'effet « taille » de la population de l'effet « stade de croissance », mais il a été choisi car il rend compte des situations pouvant être rencontrées en clinique selon que l'antibiothérapie est commencée précocement ou tardivement au cours du déroulement d'une l'infection.

Ces expériences ont mis en évidence que la marbofloxacin avait un effet bactéricide d'autant plus important que l'inoculum était de petite taille. Ces observations sont en accord avec les études de Mizunaga *et al.* [42] qui ont montré que la ciprofloxacin était bactéricide (capable de tuer 99.9 % des bactéries présentes au départ) sur *Staphylococcus aureus* à une concentration de 2 fois la CMI sur un inoculum de 10^6 CFU/mL alors qu'une concentration de 16 fois la CMI n'était pas bactéricide sur un inoculum de 10^8 CFU/mL.

La marbofloxacin, comme les autres fluoroquinolones, agit sur l'interaction de la topoisomérase IV et de la gyrase avec l'ADN lors de la réplication [29, 44] et elle est donc principalement toxique pour les bactéries en division. Un essai a alors été réalisé avec deux inoculums de même taille mais dont les bactéries étaient en phase de latence ou en phase de croissance exponentielle. La marbofloxacin a induit des effets bactéricides sur 8 heures, et surtout des vitesses de bactéricidie pendant la première heure, supérieurs pour l'inoculum en phase de croissance exponentielle par rapport à l'inoculum en phase de latence. Ce résultat confirme que les fluoroquinolones ont une activité plus importante sur des bactéries en division. Malgré cela, l'effet bactéricide de la marbofloxacin a été plus important dans l'inoculum de 10^5 CFU/ml, dont les bactéries étaient en phase de latence, que dans l'inoculum de 10^7 CFU/mL où les bactéries étaient en phase de croissance exponentielle. Le facteur « taille » observé au cours de l'étude précédente a ainsi pu être sous-estimé par le stade de croissance (10^5 CFU/mL en phase de latence versus 10^7 CFU/mL en croissance exponentielle).

Au vu de ces premiers résultats, il semblerait intéressant d'administrer l'antibiotique le plus précocement possible lors d'une infection pour favoriser l'éradication de la population bactérienne sensible. L'effet de la charge bactérienne a ensuite été évalué sur la sous-population résistante.

Influence de la taille de l'inoculum sur la sélection de sous-populations résistantes

L'influence de la taille de l'inoculum bactérien sur l'émergence de résistances a été étudiée dans deux conditions. Les bactéries étaient exposées soit à des concentrations supérieures à la MPC pendant 18 heures soit à des concentrations dans la fenêtre de sélection des premiers mutants pour toute la durée d'incubation.

L'exposition des inoculums à des concentrations de marbofloxacin supérieures à la MPC a conduit à une réduction du nombre de bactéries plus importante que lors de l'exposition à des concentrations dans la fenêtre de sélection. Cependant, pour l'ensemble des expériences réalisées, quelque soit la concentration initiale de marbofloxacin et la taille d'inoculum, les bactéries n'ont jamais été totalement éradiquées du compartiment

central. Ces résultats concordent avec les expériences de Firsov et al. [19] qui ont observé que plus les concentrations en ciprofloxacine étaient fortes, plus la réduction du nombre d'*Escherichia coli* était importante et plus la recroissance était tardive. Ces auteurs n'ont obtenu l'éradication totale d'un inoculum de 10^6 CFU/mL qu'avec une concentration initiale de $19.2 \mu\text{g/mL}$, correspondant à 2400 fois la CMI de la ciprofloxacine pour *E. coli*. Cette concentration initiale est 3 à 10 fois supérieure à celles qui sont atteintes chez l'Homme avec les posologies de ciprofloxacine actuellement recommandées. L'ensemble de ces observations *in vitro* mettent en exergue le rôle primordial des défenses immunitaires pour l'éradication des bactéries d'un foyer infectieux. De ce point de vue, une intervention thérapeutique la plus précoce possible permettant d'accéder à un inoculum bactérien de petite taille pourrait être un paramètre crucial de la guérison bactériologique.

La sensibilité des bactéries a été évaluée en fin d'expérience et différait en fonction de l'exposition aux antibiotiques. Dans notre système *in vitro* dynamique, lorsque les bactéries étaient exposées à des concentrations de marbofloxacine à l'intérieur de la fenêtre de sélection, les populations bactériennes issues de la recroissance des inoculums de 10^7 et 10^9 CFU/mL étaient majoritairement composées de bactéries capables de croître en présence de $0.128 \mu\text{g/mL}$ d'antibiotique (colonies indénombrables) mais ne poussant pas en présence de $0.256 \mu\text{g/mL}$ (seule une bactérie sur 10^6 était en croissance en présence de $0.256 \mu\text{g/mL}$). Ces bactéries majoritaires, éradiquées par une concentration correspondant à la MPC, avaient un niveau de sensibilité correspondant à celle des premiers mutants, alors que la sous-population minoritaire plus résistante présentait un niveau de sensibilité pouvant correspondre à des doubles mutants. Malgré une recroissance significative et une sensibilité majoritairement diminuée, le niveau de résistance compatible avec des premiers mutants n'a pas été détecté avec l'inoculum de petite taille (10^5 CFU/mL).

A l'inverse, au cours des expériences menées avec des concentrations de marbofloxacine supérieures à la MPC, les populations bactériennes issues de la recroissance à 32h étaient composées de sous-populations à sensibilité diminuée très minoritaires (fréquences comprises entre 10^{-2} et 10^{-4}). La recroissance d'un inoculum composé majoritairement de bactéries à sensibilité inchangée avait été décrite auparavant [3, 10, 22, 46, 56], mais l'influence de la taille de l'inoculum bactérien de départ sur la taille des sous-populations résistantes minoritaires n'avait pas été envisagée.

Le niveau d'exposition d'*E. coli* à la marbofloxacine peut être exprimé par le rapport de la concentration maximale (initiale) sur la MPC, ce qui facilite les comparaisons entre différents couples bactérie/antibiotique. L'exposition des inoculums de 10^5 et 10^7 CFU/mL à des concentrations supérieures à la MPC ($C_{\text{max}}/MPC = 4.7$) n'a pas conduit à la recroissance significative de bactéries à sensibilité diminuée. Des observations similaires ont été réalisées avec les couples ciprofloxacine / *Escherichia coli* [46] et ciprofloxacine / *Staphylococcus aureus* [9], pour des inoculums de 10^6 - 10^7 CFU/mL et des rapports C_{max}/MPC de 4 et 6, respectivement. Pour le couple levofloxacine / *Staphylococcus aureus*, l'émergence de mutants a été prévenue avec un rapport C_{max}/MPC égal à 1.5 [10]. Enfin l'exposition de l'inoculum de taille 10^9 CFU/mL à des concentrations de marbofloxacine supérieures à la MPC n'a pas permis, dans nos conditions expérimentales, d'éradiquer la sous-population très minoritaire mais hautement résistante.

Cette observation met de nouveau en exergue l'importance des défenses de l'hôte dans l'éradication *in vivo* de ces sous-populations et suggère fortement qu'un schéma posologique capable de prévenir l'émergence de sous-populations résistantes avec des inoculums bactériens de petite taille ne sera pas capable de garantir le même effet en présence d'un inoculum de plus grande taille, en particulier chez des patients présentant un système

immunitaire altéré. Une taille d'inoculum faible et un système immunitaire compétent semblent être les clés du succès d'une antibiothérapie. Ces deux conditions sont souvent réunies au début d'une infection, lorsque les signes cliniques sont faibles voire absents. En antibiothérapie vétérinaire, les cas d'infections débutantes peuvent souvent être détectés dans un groupe d'animaux par la présence d'animaux cliniquement atteints qui indique très souvent que les autres animaux du troupeau sont aussi porteurs de l'agent pathogène et sont très probablement en phase d'incubation. D'après les résultats de cette étude, une administration d'antibiotique précoce à l'ensemble des animaux appelée métaphylaxie semblerait particulièrement intéressante pour prévenir l'émergence de résistances. Des études complémentaires sont cependant nécessaires notamment sur des modèles animaux pour confirmer ces résultats.

Conclusion

Actuellement, les schémas posologiques des antibiotiques ne doivent plus seulement garantir un effet thérapeutique individuel, mais ils doivent surtout prévenir au niveau collectif l'émergence de populations bactériennes résistantes. La taille de la population bactérienne soumise à l'action de l'antibiotique est un facteur de variation de son efficacité, et elle conditionne également le risque d'apparition de bactéries résistantes au sein d'une population sauvage. Cette thèse a donc été menée afin de mieux connaître l'effet de la taille de l'inoculum bactérien sur l'activité de la marbofloxacin et sur la sélection de mutants lors d'exposition à des concentrations constantes ou variables en antibiotiques.

Cette thèse a mis en évidence l'influence de la taille de l'inoculum bactérien à la fois sur l'activité bactéricide et sur la sélection de mutants résistants lors de l'exposition d'*Escherichia coli* à un antibiotique de la famille des fluoroquinolones. Lors de cette étude, la marbofloxacin a montré une activité bactéricide plus importante sur les inoculums bactériens de petite taille et a prévenu plus souvent la sélection de résistances dans ces inoculums.

Les travaux réalisés pour cette thèse vont se poursuivre sur des modèles *in vivo* d'infections expérimentales qui permettront de combiner l'influence de la taille de l'inoculum bactérien et du statut immunitaire du sujet sur l'activité antibactérienne et sur la sélection de résistances. La prise en compte de ces paramètres et de leur variabilité lors de situations cliniques permettrait de proposer des schémas posologiques des antibiotiques garantissant à la fois la guérison clinique et l'absence de sélection de pathogènes résistants.

Agrément administratif

Références

1. **Akins, R. L. and M. J. Rybak.** 2000. In vitro activities of daptomycin, arbekacin, vancomycin, and gentamicin alone and/or in combination against glycopeptide intermediate-resistant *Staphylococcus aureus* in an infection model. *Antimicrob Agents Chemother* **44** [1925-9]
2. **Allen, G. P., G. W. Kaatz and M. J. Rybak.** 2003. Activities of mutant prevention concentration-targeted moxifloxacin and levofloxacin against *Streptococcus pneumoniae* in an in vitro pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother* **47** [2606-14]
3. **Allen, G. P., G. W. Kaatz and M. J. Rybak.** 2004. In vitro activities of mutant prevention concentration-targeted concentrations of fluoroquinolones against *Staphylococcus aureus* in a pharmacodynamic model. *Int J Antimicrob Agents* **24** [150-60]
4. **Ambrose, P. G., D. M. Grasela, T. H. Grasela, et al.** 2001. Pharmacodynamics of fluoroquinolones against *Streptococcus pneumoniae* in patients with community-acquired respiratory tract infections. *Antimicrob Agents Chemother* **45** [2793-7]
5. **Andes, D. and W. A. Craig.** 2002. Pharmacodynamics of the new fluoroquinolone gatifloxacin in murine thigh and lung infection models. *Antimicrob Agents Chemother* **46** [1665-70]
6. **Bingen, E., N. Lambert-Zechovsky, P. Mariani-Kurkdjian, et al.** 1990. Bacterial counts in cerebrospinal fluid of children with meningitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **9** [278-81]
7. **Blaser, J., B. B. Stone and S. H. Zinner.** 1985. Efficacy of intermittent versus continuous administration of netilmicin in a two-compartment in vitro model. *Antimicrob Agents Chemother* **27** [343-9]
8. **Blaser, J., B. B. Stone, M. C. Groner, et al.** 1987. Comparative study with enoxacin and netilmicin in a pharmacodynamic model to determine importance of ratio of antibiotic peak concentration to MIC for bactericidal activity and emergence of resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **31** [1054-60]
9. **Campion, J. J., P. J. McNamara and M. E. Evans.** 2004. Evolution of ciprofloxacin-resistant *Staphylococcus aureus* in in vitro pharmacokinetic environments. *Antimicrob Agents Chemother* **48** [4733-44]
10. **Campion, J. J., P. Chung, P. J. McNamara, et al.** 2005. Pharmacodynamic modeling of the evolution of levofloxacin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **49** [2189-99]
11. **Campion, J. J., P. J. McNamara and M. E. Evans.** 2005. Pharmacodynamic modeling of ciprofloxacin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **49** [209-19]
12. **CLSI.** 2003. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. *Approved standard- Sixth Edition*. Document M7-A6. NCCLS, Wayne, PA.
13. **Cohen, S. P., L. M. McMurry, D. C. Hooper, et al.** 1989. Cross-resistance to fluoroquinolones in multiple-antibiotic-resistant (Mar) *Escherichia coli* selected by tetracycline or chloramphenicol: decreased drug accumulation associated with membrane changes in addition to *OmpF* reduction. *Antimicrob Agents Chemother* **33** [1318-25]
14. **Croisier, D., M. Etienne, E. Bergoin, et al.** 2004. Mutant selection window in levofloxacin and moxifloxacin treatments of experimental pneumococcal pneumonia in a rabbit model of human therapy. *Antimicrob Agents Chemother* **48** [1699-707]
15. **Dong, Y., X. Zhao, B. N. Kreiswirth, et al.** 2000. Mutant prevention concentration as a measure of antibiotic potency: studies with clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **44** [2581-4]
16. **Drusano, G. L., D. E. Johnson, M. Rosen, et al.** 1993. Pharmacodynamics of a fluoroquinolone antimicrobial agent in a neutropenic rat model of *Pseudomonas sepsis*. *Antimicrob Agents Chemother* **37** [483-90]

17. **Drusano, G. L., S. L. Preston, C. Fowler, et al.** 2004. Relationship between fluoroquinolone area under the curve: minimum inhibitory concentration ratio and the probability of eradication of the infecting pathogen, in patients with nosocomial pneumonia. *J Infect Dis* **189** [1590-7]
18. **Epstein, B. J., J. G. Gums and K. Drlica.** 2004. The changing face of antibiotic prescribing: the mutant selection window. *Ann Pharmacother* **38** [1675-82]
19. **Firsov, A. A., S. N. Vostrov, A. A. Shevchenko, et al.** 1997. Parameters of bacterial killing and regrowth kinetics and antimicrobial effect examined in terms of area under the concentration-time curve relationships: action of ciprofloxacin against *Escherichia coli* in an in vitro dynamic model. *Antimicrob Agents Chemother* **41** [1281-7]
20. **Firsov, A. A., S. N. Vostrov, A. A. Shevchenko, et al.** 1998. A new approach to in vitro comparisons of antibiotics in dynamic models: equivalent area under the curve/MIC breakpoints and equiefficient doses of trovafloxacin and ciprofloxacin against bacteria of similar susceptibilities. *Antimicrob Agents Chemother* **42** [2841-7]
21. **Firsov, A. A., S. H. Zinner, S. N. Vostrov, et al.** 2002. AUC/MIC relationships to different endpoints of the antimicrobial effect: multiple-dose in vitro simulations with moxifloxacin and levofloxacin. *J Antimicrob Chemother* **50** [533-9]
22. **Firsov, A. A., S. N. Vostrov, I. Y. Lubenko, et al.** 2003. In vitro pharmacodynamic evaluation of the mutant selection window hypothesis using four fluoroquinolones against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **47** [1604-13]
23. **Firsov, A. A., S. N. Vostrov, I. Y. Lubenko, et al.** 2004. Concentration-dependent changes in the susceptibility and killing of *Staphylococcus aureus* in an in vitro dynamic model that simulates normal and impaired gatifloxacin elimination. *Int J Antimicrob Agents* **23** [60-6]
24. **Forrest, A., D. E. Nix, C. H. Ballow, et al.** 1993. Pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin in seriously ill patients. *Antimicrob Agents Chemother* **37** [1073-81]
25. **Garrison, M. W., K. Vance-Bryan, T. A. Larson, et al.** 1990. Assessment of effects of protein binding on daptomycin and vancomycin killing of *Staphylococcus aureus* by using an in vitro pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother* **34** [1925-31]
26. **Gerber, A. U., S. Kozak, C. Segessenmann, et al.** 1989. Once-daily versus thrice-daily administration of netilmicin in combination therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in a man-adapted neutropenic animal model. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **8** [233-7]
27. **Ginsburg, A. S., J. Lee, S. C. Woolwine, et al.** 2005. Modeling in vivo pharmacokinetics and pharmacodynamics of moxifloxacin therapy for *Mycobacterium tuberculosis* infection by using a novel cartridge system. *Antimicrob Agents Chemother* **49** [853-6]
28. **Hansen, G. T., X. Zhao, K. Drlica, et al.** 2006. Mutant prevention concentration for ciprofloxacin and levofloxacin with *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* **27** [120-4]
29. **Heisig, P.** 1996. Genetic evidence for a role of parC mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **40** [879-85]
30. **Jumbe, N., A. Louie, R. Leary, et al.** 2003. Application of a mathematical model to prevent in vivo amplification of antibiotic-resistant bacterial populations during therapy. *J Clin Invest* **112** [275-85]
31. **Khodursky, A. B., E. L. Zechiedrich and N. R. Cozzarelli.** 1995. Topoisomerase IV is a target of quinolones in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** [11801-5]
32. **Konig, C., H. P. Simmen and J. Blaser.** 1998. Bacterial concentrations in pus and infected peritoneal fluid-implications for bactericidal activity of antibiotics. *J Antimicrob Chemother* **42** [227-32]
33. **Lacy, M. K., W. Lu, X. Xu, et al.** 1999. Pharmacodynamic comparisons of levofloxacin, ciprofloxacin, and ampicillin against *Streptococcus pneumoniae* in an in vitro model of infection. *Antimicrob Agents Chemother* **43** [672-7]

34. **Leggett, J. E., S. Ebert, B. Fantin, et al.** 1990. Comparative dose-effect relations at several dosing intervals for beta-lactam, aminoglycoside and quinolone antibiotics against gram-negative bacilli in murine thigh-infection and pneumonitis models. *Scand J Infect Dis Suppl* **74** [179-84]
35. **Linde, H. J. and N. Lehn.** 2004. Mutant prevention concentration of nalidixic acid, ciprofloxacin, clinafloxacin, levofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, sparfloxacin or trovafloxacin for *Escherichia coli* under different growth conditions. *J Antimicrob Chemother* **53** [252-7]
36. **Lister, P. D. and C. C. Sanders.** 1999. Pharmacodynamics of levofloxacin and ciprofloxacin against *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* **43** [79-86]
37. **Lister, P. D.** 2001. Pharmacodynamics of moxifloxacin and levofloxacin against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in an in vitro pharmacodynamic model. *Clin Infect Dis* **32 Suppl 1** [S33-8]
38. **Lister, P. D.** 2002. Pharmacodynamics of gatifloxacin against *Streptococcus pneumoniae* in an in vitro pharmacokinetic model: impact of area under the curve/MIC ratios on eradication. *Antimicrob Agents Chemother* **46** [69-74]
39. **Lowdin, E., O. Cars and I. Odenholt.** 2002. Pharmacodynamics of amoxicillin/clavulanic acid against *Haemophilus influenzae* in an in vitro kinetic model: a comparison of different dosage regimens including a pharmacokinetically enhanced formulation. *Clin Microbiol Infect* **8** [646-53]
40. **MacGowan, A., C. Rogers, H. A. Holt, et al.** 2000. Assessment of different antibacterial effect measures used in in vitro models of infection and subsequent use in pharmacodynamic correlations for moxifloxacin. *J Antimicrob Chemother* **46** [73-8]
41. **Marcusson, L. L., S. K. Olofsson, P. Komp Lindgren, et al.** 2005. Mutant prevention concentrations of ciprofloxacin for urinary tract infection isolates of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* **55** [938-43]
42. **Mizunaga, S., T. Kamiyama, Y. Fukuda, et al.** 2005. Influence of inoculum size of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* on in vitro activities and in vivo efficacy of fluoroquinolones and carbapenems. *J Antimicrob Chemother* **56** [91-6]
43. **Morrissey, I. and J. T. George.** 1999. The effect of the inoculum size on bactericidal activity. *J Antimicrob Chemother* **43** [423-5]
44. **Nakamura, S., M. Nakamura, T. Kojima, et al.** 1989. *gyrA* and *gyrB* mutations in quinolone-resistant strains of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **33** [254-5]
45. **Okusu, H., D. Ma and H. Nikaido.** 1996. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. *J Bacteriol* **178** [306-8]
46. **Olofsson, S. K., L. L. Marcusson, P. Komp Lindgren, et al.** 2006. Selection of ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* in an in vitro kinetic model: relation between drug exposure and mutant prevention concentration. *J Antimicrob Chemother* **57** [1116-21]
47. **Preston, S. L., G. L. Drusano, A. L. Berman, et al.** 1998. Pharmacodynamics of levofloxacin: a new paradigm for early clinical trials. *Jama* **279** [125-9]
48. **Satta, G., G. Cornaglia, G. Foddìs, et al.** 1988. Evaluation of ceftriaxone and other antibiotics against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Streptococcus pneumoniae* under in vitro conditions simulating those of serious infections. *Antimicrob Agents Chemother* **32** [552-60]
49. **Sugino, A., C. L. Peebles, K. N. Kreuzer, et al.** 1977. Mechanism of action of nalidixic acid: purification of *Escherichia coli* *nalA* gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74** [4767-71]
50. **Sullivan, M. C., B. W. Cooper, C. H. Nightingale, et al.** 1993. Evaluation of the efficacy of ciprofloxacin against *Streptococcus pneumoniae* by using a mouse protection model. *Antimicrob Agents Chemother* **37** [234-9]

51. **Wetzstein, H. G.** 2005. Comparative mutant prevention concentrations of pradofloxacin and other veterinary fluoroquinolones indicate differing potentials in preventing selection of resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **49** [4166-73]
52. **Zhanel, G. G., M. Walters, N. Laing, et al.** 2001. In vitro pharmacodynamic modelling simulating free serum concentrations of fluoroquinolones against multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* **47** [435-40]
53. **Zhao, X. and K. Drlica.** 2001. Restricting the selection of antibiotic-resistant mutants: a general strategy derived from fluoroquinolone studies. *Clin Infect Dis* **33 Suppl 3** [S147-56]
54. **Zhao, X. and K. Drlica.** 2002. Restricting the selection of antibiotic-resistant mutant bacteria: measurement and potential use of the mutant selection window. *J Infect Dis* **185** [561-5]
55. **Zhi, J., C. H. Nightingale and R. Quintiliani.** 1986. A pharmacodynamic model for the activity of antibiotics against microorganisms under nonsaturable conditions. *J Pharm Sci* **75** [1063-7]
56. **Zinner, S. H., I. Y. Lubenko, D. Gilbert, et al.** 2003. Emergence of resistant *Streptococcus pneumoniae* in an in vitro dynamic model that simulates moxifloxacin concentrations inside and outside the mutant selection window: related changes in susceptibility, resistance frequency and bacterial killing. *J Antimicrob Chemother* **52** [616-22]

Toulouse, 2007

NOM : FERRAN

Prénom : Aude

TITRE : Influence de la taille de l'inoculum bactérien sur l'activité bactéricide et sur la sélection de mutants résistants lors de l'exposition d'*Escherichia coli* à la marbofloxacin.

RESUME : Le but de cette thèse était d'étudier *in vitro* les effets de différents niveaux d'exposition d'une fluoroquinolone sur des inoculums bactériens de tailles variables. Nous avons observé que l'effet bactéricide de la marbofloxacin sur *Escherichia coli* était diminué quand la taille de l'inoculum augmentait. Les bactéries ont ensuite été exposées à des concentrations en antibiotique décroissantes au cours du temps grâce au développement d'un système *in vitro* dynamique. Deux profils ont été mimés, exposant les bactéries à des concentrations au-dessus de la concentration prévenant les premiers mutants (MPC) ou comprises entre la Concentration Minimale Inhibitrice et la MPC. L'émergence de mutants résistants a été d'autant plus importante que la taille de l'inoculum était grande quelque soit les concentrations. La prise en compte de l'effet de la charge bactérienne sur l'activité bactéricide et la prévention de résistance pourrait conduire à reconsidérer les modalités de l'antibiothérapie.

MOTS-CLES : Marbofloxacin, *Escherichia coli*, Inoculum bactérien, antibiothérapie, antibiorésistance

ENGLISH TITLE : Effects of the inoculum size on the bactericidal activity and selection of resistant mutants when *Escherichia coli* is exposed to marbofloxacin.

ABSTRACT : The aim of our work was to study *in vitro* the effects of different exposures to a fluoroquinolone of three *Escherichia coli* inoculum sizes. We observed that the bactericidal effect of marbofloxacin decreased when inoculum size increased. Then, a pharmacodynamic *in vitro* model was developed to expose bacteria to varying concentrations of marbofloxacin. Two concentration profiles were mimicked to expose bacteria to concentrations above the mutant preventive concentration (MPC) or between the minimal inhibitory concentration and the MPC. Our results showed that resistant mutants were more often selected when the inoculum size increased whatever the exposition to marbofloxacin. Taking into account the effects of bacterial load on the bactericidal activity and prevention of resistance should lead to reconsider the dosage regimens of antibiotic drugs.

KEYWORDS : Marbofloxacin, *Escherichia coli*, Bacterial inoculum, Bactericidal activity, Antimicrobial resistance.