

THÈSE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS
UFR de médecine et de pharmacie
Laboratoire pharmacologie des anti-infectieux (Poitiers)
(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

École doctorale : Biologie-santé - Bio-santé (Limoges)
Secteur de recherche : Sciences du médicament

Présentée par :
Anne Jacolot

Apport d'un modèle animal dans l'étude des conditions de traitement des pneumonies à enterobacter cloacae en réanimation

Directeur(s) de Thèse :
Olivier Mimoz, Sandrine Marchand

Soutenue le 08 octobre 2012 devant le jury

Jury :

Président	William Couet	Professeur des Universités, Université de Poitiers
Rapporteur	Pascal Chavanet	Professeur des Universités, Université de Dijon
Rapporteur	Francois Jehl	Maître de conférences, Université de Strasbourg
Membre	Gilles Potel	Professeur des Universités, Université de Nantes
Membre	France Cazenave-Roblot	Professeur des Universités, Université de Poitiers
Membre	Olivier Petitjean	Docteur, CHU Avicenne, Bobigny

Pour citer cette thèse :

Anne Jacolot. *Apport d'un modèle animal dans l'étude des conditions de traitement des pneumonies à enterobacter cloacae en réanimation* [En ligne]. Thèse Sciences du médicament. Poitiers : Université de Poitiers, 2012.
Disponible sur Internet <<http://theses.univ-poitiers.fr>>

HESE

pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

Faculté de Médecine et Pharmacie

(Diplôme National – Arrêté du 7 août 2006)

Ecole Doctorale : BioSanté N°524

Discipline : SCIENCES DU MEDICAMENT

Secteur de recherche : Pharmacologie des Anti-infectieux

Présentée par

Anne JACOLOT

**APPORT D'UN MODELE ANIMAL DANS L'ETUDE
DES CONDITIONS DE TRAITEMENT
DES PNEUMONIES A *ENTEROBACTER CLOACAE*
EN REANIMATION**

Directeurs de thèse : Monsieur le Professeur Olivier MIMOZ

En collaboration avec le Docteur Olivier PETITJEAN

Soutenue le **8 octobre 2012** devant la Commission d'Examen

JURY

Monsieur le Professeur William COUET
Madame le Docteur Sandrine MARCHAND
Monsieur le Professeur Pascal CHAVANET
Monsieur le Docteur François JEHL
Madame le Professeur France CAZENAVE-ROBLOT
Monsieur le Professeur Gilles POTEL

Président
Codirecteur de thèse
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur William COUET

Pour m'avoir très chaleureusement accueillie dans ton unité d'excellence, et permis de réaliser et surtout d'aboutir ce doctorat, je te remercie très sincèrement.

A Monsieur le Docteur Olivier PETITJEAN

Pour m'avoir transmis, dès mes premiers semestres d'interne dans votre service, votre passion pour la recherche, l'écriture et tout ce qui concerne la pharmacologie des Anti-infectieux,

Pour avoir été l'un des deux instigateurs essentiels de ce travail,

Pour votre rigueur scientifique, votre sens littéraire et votre esprit de synthèse critique tout au long de cette thèse,

Enfin, pour m'avoir permis d'être praticien hospitalier à vos côtés,

Soyez assuré de mon amitié et de ma très sincère gratitude.

A Monsieur le Professeur Olivier MIMOZ

Il y a près de 15 ans, tu me souhaitais de réaliser, tout comme toi, un projet de thèse. Grâce à ton soutien infaillible, tout ce temps, de Paris à Poitiers, j'y suis enfin parvenue.

Je te remercie pour ta disponibilité de tous les instants, et ton aide plus que précieuse dans la construction et la finalisation de ce travail.

Ton hyperdynamisme, ta compétence et ta simplicité dans les relations humaines font que je suis très fière d'avoir croisé ton chemin. J'espère que nous réaliserons encore bien d'autres projets ensemble.

Soies assuré de mon amitié et de ma profonde reconnaissance.

A Madame le Docteur Sandrine MARCHAND

Pour le partage de ton expérience dans le domaine des modèles expérimentaux,

Pour ta compétence et ta rigueur scientifique,

Je te remercie bien amicalement.

A Monsieur le Professeur Pascal CHAVANET

Pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail,
Soyez assuré de mes sincères remerciements et de ma reconnaissance.

A Monsieur le Docteur François JEHL

Pour m'avoir fait l'honneur d'apporter un regard critique sur ce travail,
Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude et de ma profonde considération.

A Madame le Professeur France CAZENAVE-ROBLOT

En acceptant de juger ce travail,
Trouvez ici l'expression de mes très sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Gilles POTEL

Pour avoir accepté de participer à ce jury et de l'intérêt que vous portez à ce travail,
Veuillez croire en l'assurance de mes remerciements et de ma profonde considération.

A mes Parents (si Papa m’entendait....)

Pour le bonheur d’être votre fille,
Pour votre soutien et votre confiance de toujours,
Pour m’avoir transmis votre force et votre volonté,

Ce travail vous est dédié.

A Didier, Hugues, et Jocelyne ainsi qu’à toute leur petite et grande famille

Par votre présence à mes côtés et votre cheminement dans la vie,
Chacun, à votre façon, vous m’avez guidé et donné l’envie de réussir.

A tous mes amis, et plus particulièrement :

A Véronique et Edwige, pour votre soutien durant le temps de ce travail, et surtout, pour votre AMITIE sincère de 40 et 20 années chacune : *un GRAND MERCI.*

A la bande des « Meilleurs Amis », qui est un socle solide de mon équilibre.

Avec une mention spéciale à **Caroline et Eric,** pour leur hospitalité pendant certaines manip’ nocturnes.

A Nathalie et Christophe, voilà, je vous ai enfin rejoint ! A notre Trio de toujours.

A Claire et Kamel, sans qui cette thèse n’aurait pas pu se faire.

A Marthe, Vanessa, Laurent et toute l’équipe de la PUI d’Avicenne

Que notre esprit de service légendaire dure encore longtemps !

A Philippe pour son soutien, les fous-rires du co-voiturage et bien sûr tout le reste...

A tous les autres que je n’ai pas cité, mais qui m’entourent de près ou juste d’un peu plus loin.

A toute la famille d’Olivier Mimoz, Valérie et ses enfants, pour leur hospitalité très chaleureuse lors de mes séjours répétés à Saint-Benoit.

*Elle n'aimait que ce qui passe et j'étais la couleur du temps
Et tout même l'Ile Saint Louis n'était pour elle qu'un voyage
Elle parlait d'ailleurs Toujours d'ailleurs Je rêvais l'écoutant
Comme à la mer un coquillage.*

Le Roman Inachevé (1956)

ARAGON

*A l'origine de toute connaissance, nous rencontrons la curiosité !
Elle est une condition essentielle du progrès.*

Alexandra DAVID-NEEL

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS.....	1
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES.....	2
INTRODUCTION.....	4
GENERALITES.....	7
1. LES PNEUMOPATHIES NOSOCOMIALES EN REANIMATION	8
1.1 Définitions	8
1.2 Epidémiologie.....	8
1.3 Micro-organismes en cause	11
2. ENTEROBACTER CLOACAE	13
2.1 Généralités.....	13
2.2 Mécanismes de résistance développés par <i>E. cloacae</i> face aux <i>bêtalactamines</i>	14
2.2.1 Différents types de résistance.....	14
2.2.2 Résistance par production bactérienne de bêtalactamases	15
2.2.2.1 Résistance naturelle : phénotype sauvage producteur de « céphalosporinase de bas niveau »	17
2.2.2.2 Résistance acquise : phénotype producteur de « pénicillinase à large spectre »	18
2.2.2.3 Résistance acquise : phénotype producteur de « céphalosporinase de haut niveau »	18
2.2.2.4 Résistance acquise : phénotype producteur de « bêtalactamase à spectre étendu »	22
2.2.2.5 Résistance acquise : phénotype producteur de carbapénèmase	23

2.3 Evolution de l'activité in vitro des bêtalactamines face à <i>E. cloacae</i>	23
2.4 Emergence de mutants résistants aux céphalosporines de 3 ^{ème} génération : conséquence clinique	26
3. STRATEGIE DU TRAITEMENT ANTIBIOTIQUE D'UNE PNEUMOPATHIE A <i>E. CLOACAE</i> RESISTANT.....	30
3.1 Pharmacodynamie des antibiotiques.....	30
3.1.1 Antibiotiques temps-dépendants : exemple des céphalosporines.....	30
3.1.2 Antibiotiques concentration-dépendants : exemples des aminosides	34
3.1.3 Association d'antibiotiques.....	36
3.1.4 Distribution pulmonaire.....	38
3.2 Principes généraux du traitement antibiotique des PAVM.....	43
OBJECTIFS DU TRAVAIL	50
CHOIX ET PERTINENCE DU MODELE D'INFECTION EXPERIMENTALE	53
1. GENERALITES.....	54
2. CARACTERISTIQUES DU MODELE	56
2.1 Espèce animale.....	56
2.2 Souche bactérienne	60
2.3 Technique d'inoculation.....	61
2.4 Evaluation de l'infection.....	62
2.5 Statut immunitaire	63
Traitement antibiotique.....	64
ARTICLES ET DONNEES EXPERIMENTALES.....	65
ETUDE N°1	
Cefepime and amikacin synergy <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> against a ceftazidime- resistant strain of <i>enterobacter cloacae</i>	66

ETUDE N°2	
Efficacies of cefepime, ceftazidime, and imipenem alone or in combination with amikacin in rats with experimental pneumonia due to ceftazidime-susceptible or-resistant <i>Enterobacter cloacae</i> strains.....	82
ETUDE N°3	
How to solve the problem of spontaneous bacterial clearance when testing new antibiotic treatment: results on experimental pneumonia due to a derepressed cephalosporinase-producing <i>Enterobacter cloacae</i>	98
ETUDE N°4	
Animal Model Methodology: Immunocompetent or Leucopenic Rats, Which Is the Best? <i>Results from a Model of Experimental Pneumonia due to Derepressed Cephalosporinase-Producing Enterobacter cloacae</i>.....	113
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	130
ANNEXE 1.....	143
BIBLIOGRAPHIE.....	144
RESUMES	167

ABREVIATIONS

BLSE : Bêtalactamase à spectre étendu

C1G : Céphalosporine de 1^{ère} génération

C2G : Céphalosporine de 2^{ème} génération

C3G : Céphalosporine de 3^{ème} génération

C4G : Céphalosporine de 4^{ème} génération

C_{max} : Concentration maximale

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CMI₉₀ : Concentration minimale d'antibiotique permettant d'inhiber la croissance de 90% des souches d'une espèce bactérienne.

DUJ : Dose Unique Journalière

LBA : Lavage broncho-alvéolaire

PAVM : Pneumopathie acquise sous ventilation mécanique

PLP : Protéine liant les Pénicillines

PN : Pneumopathie nosocomiale

QI : Quotient inhibiteur

SSC : Surface sous la courbe

UFC : Unités formant colonies

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

TABLEAUX

Tableau I : Distribution et prévalence des sites d'infections nosocomiales réalisées auprès de 358 000 patients. D'après l'Enquête Nationale de Prévalence de 2006 (Thiolet 2007)	9
Tableau II : Surveillance des infections nosocomiales en réanimation adulte, Réseau REA-RAISIN, Résultats 2009 (InVS 2010)	10
Tableau III : Répartition comparée des micro-organismes isolés. D'après les résultats de Chastre 2002 et du réseau REA-RAISIN 2009 (InVS 2010)	12
Tableau IV : Classification simplifiée des bêtalactamases. D'après Livermore 1995 et Bonnet 2011.....	16
Tableau V : Sensibilité et résistance d' <i>Enterobacter cloacae</i> selon le mode d'expression inductible (Ind) ou constitutif (Hyp = hyperproducteur) de la production de la bêtalactamase AmpC. D'après Livermore 1995.....	21
Tableau VI : Concentrations, diamètre critiques des céphalosporines pour <i>Enterobacteriaceae</i> . D'après les recommandations du CASFM 2010.....	24
Tableau VII : Impact d'un traitement antibiotique antérieur sur le pourcentage de bacilles à Gram négatif résistants et ce, pour 5 antibiotiques ou familles d'antibiotiques. D'après Johnson 2011.....	29
Tableau VIII : Mortalité et PAVM : Pourcentage de décès selon que le traitement initial de la PAVM est ou non adéquat. D'après Rello 1997 et Zilberberg 2008.....	45
Tableau IX : Protocole thérapeutique recommandé par l'American Thoracic Society (2005) pour les pneumonies tardives avec facteurs de risque.....	47
Tableau X : Protocole thérapeutique recommandé par l'American Thoracic Society (2005) pour les pneumonies précoces sans facteurs de risque.....	48

Tableau XI : Paramètres pharmacocinétiques de quatre antibiotiques (amikacine, ceftazidime, céfépime, imipénème) injectés par voie intrapéritonéale chez le rat rendu insuffisant rénal après administration sous-cutanée (SC) ou intrapéritonéale (IP) de 1 mg/kg de nitrate d'uranyle : concentrations plasmatiques au pic (30 min après administration) et à la vallée (8 heures après administration).....	59
Tableau XII : Comparaison des différentes voies d'inoculation d'une pneumopathie expérimentale. D'après Mizgerd 2008.....	62
Tableau XIII : Synthèse des résultats des études n°1, 2, 4: Evolution du titre pulmonaire bactérien ($\log_{10}$ UFC/g) au cours du temps : [médiane (extrêmes)] dans le modèle de pneumopathie expérimentale à <i>E. cloacae</i> producteur de céphalosporinase dérégulée traitée par la bithérapie céfépime (FEP) et amikacine (AMK) : groupe contrôle sans traitement antibiotique, groupe traité antibiotique et statut immunitaire immunocompétent et leucopénique.....	138

FIGURES

Figure 1 : Contrôle génétique simplifié de la production de céphalosporinase. D'après Ehrhardt 1993.....	19
Figure 2 : Influence du fractionnement de la dose totale journalière. D'après Jehl 2011.....	31
Figure 3 : Représentation schématique de la barrière « alvéolo-capillaire». D'après Kiem 2008.....	39
Figure 4 : Evolution des titres pulmonaires bactériens d' <i>E. cloacae</i> chez le rat selon son statut immunitaire (immunocompétent ou leucopénique) et le traitement antibiotique.....	137

INTRODUCTION

Les pneumopathies acquises à l'hôpital représentent la 2^{ème} cause d'infections nosocomiales en France (Thiolet 2007) et aux Etats Unis (American Thoracic Society 2005). Lorsqu'elles sont acquises sous ventilation mécanique, elles surviennent dans les services de réanimation avec une incidence de près de 25%. Elles sont associées à une morbidité élevée et, bien que diversement rapportée, à plus de 30% de mortalité attribuée (American Thoracic Society 2005). Au-delà de ce constat, elles sont la raison d'environ 50 % des antibiothérapies prescrites en réanimation, génèrent des durées d'hospitalisations prolongées et un surcoût pour l'hôpital. Parallèlement, la diminution de sensibilité des micro-organismes aux antibiotiques actuellement disponibles, la relative pénurie de nouvelles molécules anti-infectieuses ainsi qu'un mauvais approvisionnement de plus anciennes (fosfomycine, colimycine...) expliquent que le traitement des infections nosocomiales soit devenu un problème de santé publique. Des recommandations sur le bon usage des antibiotiques ont été publiées dès 1997 par l'Agence nationale d'accréditation des établissements de santé (ANAES 1997) puis plus récemment en 2008 par la Haute Autorité de Santé (HAS 2008), qui énoncent la stratégie d'antibiothérapie et la prévention des résistances bactériennes à appliquer dans les établissements de santé. Ceci inclut notamment l'optimisation du choix, du dosage et de la durée du traitement de ces infections. Dans un tel contexte, l'évaluation des meilleures associations antibiotiques disponibles pour le réanimateur reste nécessaire.

Alors que les études cliniques sont assez informatives, les modèles animaux d'infection expérimentale sont toujours utilisés dans l'évaluation des antibiotiques. Leur impact sur la compréhension de la physiopathologie et de la pharmacologie antimicrobienne est indiscutable, en particulier pour définir la dose ou les index pharmacodynamiques à cibler pour obtenir l'efficacité maximale d'un traitement (Andes 2002, Craig 1988).

Ce travail présente, pas à pas, la réflexion menée dans le cadre d'une démarche d'optimisation d'un modèle animal, dans le but d'en améliorer la qualité méthodologique et de faire en sorte que le modèle devienne contributif à l'évaluation des antibiotiques utilisés en clinique humaine, comme par exemple en réanimation.

Dans une première partie bibliographique, seront présentées les caractéristiques de la pneumopathie en réanimation, celles du germe étudié, *Enterobacter cloacae*, ainsi que les principes du traitement antibiotique à mettre en oeuvre. Puis dans une seconde partie, seront justifiés les objectifs de ce travail ainsi que la pertinence du modèle d'infection expérimentale mis au point. Alors, les travaux personnels seront décrits, enfin une discussion ainsi que des perspectives seront apportées.

GENERALITES

1. LES PNEUMOPATHIES NOSOCOMIALES EN REANIMATION

1.1 Définitions

Les pneumopathies nosocomiales (PN) sont définies comme des infections pulmonaires acquises lors de la prise en charge d'un patient en structure médicale, non présentes au moment de son admission, et se développant après au moins 48 heures d'hospitalisation. Dans le cadre de la définition des infections associées aux soins, on différencie deux catégories de pneumopathies acquises (CTNILS 2007) :

- les pneumopathies acquises sous ventilation mécanique notamment celles des patients de réanimation. Il s'agit de « toute pneumonie survenant chez un malade dont la respiration est assistée de manière invasive ou non invasive » dans les 48 heures précédant la survenue de l'infection ;
- les pneumopathies survenant en l'absence de ventilation mécanique dont le diagnostic microbiologique ou radiologique reste difficile à poser. Des facteurs de risque ont été cependant établis : une hospitalisation d'au moins 2 jours durant les 3 derniers mois, une perfusion d'antibiotiques, des soins de pansement, ou une dialyse chronique durant le mois précédent, ainsi qu'un séjour dans un établissement d'hébergement pour personnes âgées dépendantes (American Thoracic Society 2005).

Cette revue s'intéressera particulièrement aux pneumopathies acquises sous ventilation mécanique (PAVM), qui représentent la préoccupation première des réanimateurs.

1.2 Epidémiologie

En France, l'enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales (Thiolet 2007), en incluant près de 358 000 patients a évalué à 0.79% la prévalence des PN. La répartition des sites infectieux montre que le foyer pulmonaire est à l'origine de la seconde cause

d'infections acquises à l'hôpital (14.7%) après les infections urinaires (30.3%) et devant les infections du site opératoire (14.2%) (tableau I).

Tableau I : Distribution et prévalence des sites d'infections nosocomiales réalisées auprès de 358 000 patients. D'après l'Enquête Nationale de Prévalence de 2006 (Thiolet 2007).

Site infectieux	N	Part relative (%)	Prévalence (%)
Infection urinaire	5854	30.3	1.63
<u>Pneumopathie</u>	<u>2833</u>	<u>14.7</u>	<u>0.79</u>
Infection du site opératoire	2733	14.2	0.76
Infection peau/tissus mous	1961	10.2	0.55
Infection respiratoire autre	1318	6.8	0.37
Bactériémie/septicémie	1232	6.4	0.34
Infection ORL/stomatologie	697	3.6	0.20
Infection du tractus gastro-intestinal	569	3.0	0.16
Infection sur cathéter	539	2.8	0.15
Autres sites	1475	7.6	0.41
Non documenté	83	0.4	0.02
TOTAL	19294	100.0	5.38

Le risque d'infections nosocomiales en réanimation est 3 fois supérieur à celui encouru par les patients en hospitalisation conventionnelle (14.4% *versus* 5.4%) (Thiolet 2007). Ceci résulte de deux facteurs : les facteurs endogènes propres au malade (défaillance viscérale, immunodépression d'intensité variable, pathologies chroniques sous jacentes), et les facteurs exogènes : mise en place de dispositifs respiratoires, de cathéters vasculaires et de sondes urinaires.

Le réseau de surveillance des infections nosocomiales en réanimation adulte, REA-RAISIN (InVs 2010), a publié les dernières données épidémiologiques de 2009 en suivant près de 25 000 patients provenant de 176 unités. Le tableau II présente le taux de patients infectés, la répartition des sites infectieux, le pourcentage de mise en route d'un traitement anti-infectieux, et le délai d'apparition de l'infection en réanimation pour les pneumopathies

et les autres infections nosocomiales. Ces données montrent bien la part importante des pneumopathies en réanimation.

Tableau II : Surveillance des infections nosocomiales en réanimation adulte.
Réseau REA-RAISIN, Résultats 2009 (InVS 2010).

	Pneumopathies	Infections urinaires	Bactériémies	ILC/BLC* associée
Taux d'attaque des patients infectés (%) (n=24 459)	9.6	4.7	4.0	1.5
Répartition par site infectieux (%)	44.0	20.4	17.4	18.2
Recours à traitement anti-infectieux (%)	95.2	78.5	94.3	39.6
Délai d'apparition en réanimation en jours (médiane)	9	12	13	13

* ILC/BLC : Infection Liée au Cathéter central/Bactériémie Liée au Cathéter central

Pour plus de 80 % des cas, il s'agit de pneumopathies vraies c'est-à-dire pour lesquelles des critères microbiologiques fiables (prélèvements protégés ou non protégés semi-quantitatifs) ont été utilisés. En effet, avant le développement de ces techniques diagnostiques, le diagnostic clinique manquait de signes spécifiques.

Dans 90% des cas, la pneumopathie est liée à l'intubation, ce qui donne alors un taux d'attaque de 13.27 pneumopathies pour 100 patients intubés et un taux d'incidence de 15.21 pneumopathies pour 1000 jours d'intubation.

A noter que cette enquête a été réalisée, dans près de 90% des cas, dans des unités de réanimation à orientation chirurgicale (InVS 2010).

1.3 Micro-organismes en cause

Les PN sont plutôt d'origine bactérienne, polymicrobienne, rarement virale ou fongique, excepté chez les patients immunodéprimés. Les bacilles à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* et la famille des Enterobacteriaceae) sont le plus souvent responsables de ces infections. Les cocci à Gram positif, *Staphylococcus aureus*, et notamment ceux résistant à la méticilline, sont également impliqués. Selon le délai de survenue de la PN ou de la PAVM, les germes en cause ainsi que le pronostic sont différents : quand la pneumopathie survient précocément, dans les 4 premiers jours de l'hospitalisation, elle est principalement due à des bactéries sensibles d'origine extra-hospitalière. A l'inverse, quand elle est d'apparition plus tardive, à partir de 5 jours, des bactéries multirésistantes d'origine hospitalière en sont responsables. La conséquence immédiate doit être alors la mise en route d'une antibiothérapie probabiliste adaptée (American Thoracic Society 2005, Torres 2009).

Jusqu'à la moitié des années 80, l'espèce *Enterobacter* n'était pas considérée comme importante dans la survenue de ces infections. Ainsi, en 1983, une enquête de surveillance montre qu'*Enterobacter* ne représente que 9.5% des germes en cause dans les PN (Hughes 1983).

Dans l'enquête de surveillance REA-RAISIN 2009 (InVS 2010), parmi les 176 unités de réanimation interrogées, les entérobactéries sont les premiers germes retrouvés dans les PN, avec 32.1% des isolats identifiés, devant *Pseudomonas aeruginosa* et *S. aureus*, en nette augmentation comparativement à 2002 (Chastre 2002) (Tableau III).

Tableau III : Répartition comparée des micro-organismes isolés. D'après les résultats de Chastre 2002 et du réseau REA-RAISIN 2009 (InVS 2010).

	Chastre 2002	REA-RAISIN 2009
Répartition (%)		
Entérobactéries	14.1	32.1
<i>Escherichia coli</i>	24.1	31.2
<i>Enterobacter</i> spp	18.8	21.7
<i>Klebsiella</i> spp	15.6	18.3
<i>Serratia</i> spp	12.1	8.5
<i>Proteus</i> spp	22.3	7
<i>Citrobacter</i> spp	5	6.2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24.4	21.2
<i>Staphylococcus aureus</i>	20.4 (dont 44.3% SARM)	17.6
<i>Haemophilus</i> spp	9.8	4.9
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1.7	3.2
<i>Acinetobacter</i> spp	7.9	2.6
Autres	21.7	18.4
Nb de PN liées à l'intubation	1689	2120
Nb isolats	2490	3359

Dans l'analyse REA-RAISIN 2009, *Enterobacter cloacae* représente la 5^{ème} cause des germes identifiés lors des PN en réanimation (4.1% soit 137/3359 isolats) (ANNEXE 1).

Pour une prise en charge adaptée des patients, la surveillance de l'écologie locale des unités de réanimation ainsi que les niveaux de résistance des germes habituellement retrouvés sont importants à connaître.

2. ENTEROBACTER CLOACAE

2.1 Généralités

La famille des entérobactéries, ou *Enterobacteriaceae*, regroupe un grand nombre de bacilles à Gram négatif, largement répandus dans l'environnement mais aussi dans le tube digestif de l'homme et des animaux. Elles font parties de la flore commensale du tube digestif de l'homme. Dans certaines conditions pathologiques (immunodéprimés, patients de réanimation) et/ou pendant un traitement antibiotique, les entérobactéries peuvent d'abord coloniser des sites superficiels comme la peau, les muqueuses des voies aériennes supérieures, l'épithélium urétral, puis secondairement, sans avoir initialement de facteurs de virulence, coloniser ou infecter des sites plus profonds normalement stériles ou des dispositifs médicaux implantables. Ces bactéries sont alors à l'origine d'infections diverses comme des bactériémies, des pyélonéphrites, des péritonites, des ostéites ou encore des pneumopathies. En règle générale, les infections dues à *Enterobacter* spp ne diffèrent pas des autres infections à bacilles à Gram négatif, si ce n'est qu'elles se développent davantage dans un contexte nosocomial.

Le genre *Enterobacter* comprend 16 espèces connues à ce jour. Hoffmann et coll. (2003) montrent dans une étude génétique et phylogénétique qu'il existe une grande hétérogénéité au sein de ces espèces. Sur 200 isolats d'origine humaine initialement identifiés comme étant *E. cloacae*, seules 3 souches ont été confirmées comme appartenant à cette espèce.

Plusieurs molécules antibiotiques de mode d'action différent peuvent être utilisées seules ou en association dans le traitement d'une infection à *E. cloacae*. Toutefois, les bêtalactamines restent toujours une composante clé de l'arsenal thérapeutique de ces infections bactériennes. C'est pourquoi nous décrivons seulement les mécanismes de

résistance de cette espèce, face à cette famille d'antibiotiques, dans la mesure où notre modèle de pneumonie expérimentale était centré sur l'évaluation du couple *E. cloacae*-céfépime.

2.2 Mécanismes de résistance développés par *E. cloacae* face aux bêtalactamines.

2.2.1 Différents types de résistance

Comme pour toutes les entérobactéries, la résistance naturelle ou acquise d' *E. cloacae* aux bêtalactamines peut s'expliquer par plusieurs mécanismes. Le mécanisme principal est la production bactérienne de bêtalactamases, qui sera seule développée ci-après.

La diminution de perméabilité de la membrane externe de la bactérie par délétion de porines, et l'expression de pompes d'efflux actif sont deux autres mécanismes qui peuvent diminuer l'accès des bêtalactamines aux protéines cibles situées sur la membrane cytoplasmique. Associés à la production de certaines bêtalactamases, ces mécanismes entraînent une diffusion rapide de la résistance de certaines bactéries à Gram négatif, ce qui a déjà été observé pour *Enterobacter aerogenes* vis-à-vis du céfépime et de l'imipénème (Fernandez-Cuenca 2006) ainsi que pour *P. aeruginosa* et *A. baumannii* face aux carbapénèmes (Li 2009). Toutefois, *E. cloacae* n'est pas encore trop concerné par ce type de mécanisme.

La modification d'affinité par altération de la cible antibiotique, que sont les protéines de liaison aux pénicillines (PLP), est plus fréquente chez les bactéries à Gram positif et son rôle parmi les bactéries à Gram négatif est restreint à quelques espèces comme *Haemophilus influenzae* ou *Proteus mirabilis*.

2.2.2 Résistance par production bactérienne de bêtalactamases

Les bêtalactamases sont des enzymes qui ont une structure chimique apparentée aux PLP. Ces enzymes ont la capacité d'hydrolyser et d'inactiver le cycle bêtalactame dans l'espace périplasmique. Ce processus repose sur un résidu sérine actif chez les enzymes les plus fréquentes ou sur un ion métallique. D'une extrême diversité, elles ont une affinité différente pour les pénicillines, les céphalosporines ou les inhibiteurs de bêtalactamases.

La production de bêtalactamases peut être programmée dans le génome bactérien et être présente chez toutes les souches d'une même espèce. Il s'agit alors de résistance naturelle. La résistance acquise résulte, quant à elle, d'une modification du capital génétique ce qui permet à la bactérie de tolérer une concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe les souches sensibles de la même espèce lorsque notamment la bactérie fait face à une pression de sélection. Ces modifications génétiques peuvent être chromosomiques, car secondaires à une mutation portant sur le chromosome, ou extra-chromosomiques par acquisition de gènes à la suite de transferts génétiques de plasmides, d'intégrons ou d'éléments transposables.

La classification des bêtalactamases est complexe et peut se faire selon différents critères (tableau IV) : leur structure (classification de Ambler 1980), leur spectre d'activité par substrat et leur profil d'inhibition par les inhibiteurs (classification de Bush-Jacoby-Medeiros 1995), leur caractère génétique (chromosomique, plasmidique ou transposon) ou encore leur mode de production (constitutive ou inducible).

Tableau IV : Classification simplifiée des bêtalactamases. D’après Livermore 1995 et Bonnet 2011.

Ambler	Bush	Bactéries impliquées	Activité principale (substrat)
<i>Enzymes à serine active</i>			
C	1	Gram négatif	Céphalosporinase (péni, C1G, C2G, C3G±) (AmpC chromosomique)
A	2a	Gram positif	Pénicillinase à spectre restreint* (péni, carb)
	2b	Gram négatif	Pénicillinase à large spectre* (péni, carb, oxa±, C1G) (TEM-1, TEM-2, SHV-1)
	2be	Gram négatif	BLSE* (péni, carb, oxa±, C1G, C3G, C4G, azt)
	2c	Gram négatif	Carbenicillinase (péni, carb, oxa±, C1G±)
	2e	Gram négatif	Cefuroximase* (péni, carb, C1G, C3G±)
	2f	Gram négatif	Carbapénèmase (péni, carb, C1G, C3G, azt, imp)
		Gram négatif	Oxacillinase (péni, carb, oxa, C1G)
<i>Metallo-enzymes à zinc</i>			
B	3	Gram négatif	Carbapénèmase (péni, carb, oxa, C1G, C3G, imp)

Péni (Pénicillines = Pénig, amoxicilline...), C1G, C2G, C3G, C4G (céphalosporines de 1^{ère}, 2^{ème}, 3^{ème}, 4^{ème} génération), carb : carbénicilline (+ uréidopénicillines) ; azt : aztréonam ; oxa : oxacilline ; imp : imipénème, *enzymes inactivées par l’acide clavulanique, BLSE (bêtalactamase à spectre étendu)

Depuis plus de 15 ans face à l’introduction de bêtalactamines plus stables comme les céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G), l’aztréonam, et les carbapénèmes, une émergence continue de nouvelles enzymes le plus souvent plasmidiques est observée chez les bacilles à Gram négatif, et notamment les entérobactéries (Philippon 2006).

La présentation ci-après tiendra d’abord compte du caractère naturel ou acquis de la résistance, puis pour la résistance acquise énumérera selon un ordre chronologique d’apparition les différentes adaptations de la bactérie face à la pression de sélection des antibiotiques utilisés.

2.2.2.1 Résistance naturelle : phénotype sauvage producteur de « céphalosporinase de bas niveau »

E. cloacae appartient au groupe 3 des enterobactéries qui inclut les genres des *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus indologènes*, *Providencia*, et *Serratia*. Toutes ces bactéries sont productrices d'une céphalosporinase chromosomique inductible par les bêtalactamines elles-mêmes (céfoxitine, imipénème et clavulanate étant les molécules fortement inductrices). Le phénotype « sauvage » de ces espèces, souvent appelé producteur de « céphalosporinase de bas niveau » se traduit par une résistance naturelle aux aminopénicillines (amoxicilline) associés ou non à l'acide clavulanique, ainsi qu'aux céphalosporines de 1^{ère} génération (C1G) (céfalotine). Face aux céphalosporines de 2^{ème} génération (C2G), *E. cloacae* est une espèce plus résistante à la céfoxitine qu'au céfuroxime (Bonnet 2011). Les souches sauvages restent sensibles aux carboxypénicillines (ticarcilline), aux uréidopénicillines (pipéracilline), aux oxy-imino céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) (céfotaxime, ceftazidime, ceftriaxone), aux monobactames (aztréonam), aux oxy-imino céphalosporines de 4^{ème} génération (C4G) (céfépime, cefpirome) ainsi qu'aux carbapénèmes (imipénème).

Cette bêtalactamase « AmpC » appartient à la classe « C » de la classification structurale d'Ambler et au groupe « 1 » de la classification fonctionnelle de Bush. L'expression phénotypique de cette résistance est chez *E. cloacae* essentiellement inductible, qui est le mode d'expression normale. En présence de bêtalactamines inductrices comme la céfoxitine ou l'imipénème, la production de la céphalosporinase augmente [x 100 à 600 quand les concentrations sont inférieures à la concentration minimale inhibitrice (CMI), (Curtis 1986)] puis revient à un niveau basal lorsque l'inducteur disparaît. Il s'agit d'un phénomène transitoire et réversible. Le niveau de résistance à chaque antibiotique dépend alors de sa stabilité à l'hydrolyse et de son pouvoir d'induction ; ceci caractérise *E. cloacae* et toutes les

bactéries du groupe 3 des entérobactéries. Les C4G ont un pouvoir inducteur plus faible que les inhibiteurs des bêtalactamases (acide clavulanique). L'induction en tant que telle, n'implique pas nécessairement de risque clinique puisque les inducteurs puissants comme les carbapénèmes produisent des quantités importantes d'enzymes sans effet significatif sur la CMI initiale en raison de leur action bactéricide rapide avant la production induite d'enzymes.

2.2.2.2 Résistance acquise : phénotype producteur de « pénicillinase à large spectre »

Cette activité pénicillinase d'expression « de haut niveau » est responsable chez *Enterobacter* spp d'une résistance aux aminopénicillines, à leurs associations, aux carboxypénicillines, aux ureïdopénicillines associés ou non à des inhibiteurs de bêtalactamases, ainsi qu'aux C1G et aux C2G. Ce phénotype n'est toutefois pas majoritaire chez *E. cloacae* et *Klebsiella pneumoniae* (10% des souches) contrairement à ce qui est observé chez *Escherichia coli* et de *Proteus mirabilis* (40 à 55%) (Bonnet 2011). Les bêtalactamases impliquées sont les pénicillinases plasmidique de classe A à large spectre (groupe fonctionnel 2b) : TEM-1, TEM-2, SHV-1.

2.2.2.3 Résistance acquise : phénotype producteur de « céphalosporinase de haut niveau »

Comme *P. aeruginosa*, *Citrobacter*, et *Serratia*, *Enterobacter* peut perdre, par mutation de son système de régulation de la synthèse de bêtalactamase, le contrôle de sa production ; la bêtalactamase est produite alors abondamment et la souche est considérée comme déréprimée. L'expression phénotypique de cette résistance est dite constitutive à haut niveau, à l'origine de la présence de mutants hyperproducteurs (Jones 1997, Livermore 1995).

La production de la bêtalactamase AmpC est régulée par un système régulateur complexe dépendant de 4 gènes ampC, ampR, ampD et ampG. Le premier gène, ampC code pour la céphalosporinase AmpC ; le deuxième, ampR, situé au voisinage de ampC induit la sécrétion d'une protéine AmpR appartenant à la famille des activateurs et régulateurs transcriptionnels, et qui a pour fonction soit d'inhiber le promoteur de ampC et donc réprimer la synthèse de la bêtalactamase AmpC, soit en présence d'un inducteur puissant comme l'imipénème, la céfoxitine, ou l'acide clavulanique, d'augmenter l'expression de ampC et donc la synthèse de céphalosporinases, en entraînant alors la dégradation des céphalosporines enzymatiquement labiles. Enfin, le gène ampD est le gène répresseur de synthèse de la production de bêtalactamases mais aussi de d'autres systèmes enzymatiques (figure 1). Une mutation sur le gène ampD entraîne une libération de la synthèse de la bêtalactamase par dérégulation avec des taux de production d'enzymes de 10 à 200 fois supérieures à ce que l'on observe chez les souches sauvages. Ce mécanisme est stable, à la différence de l'induction, c'est-à-dire qu'il est persistant après l'élimination de la bêtalactamine.

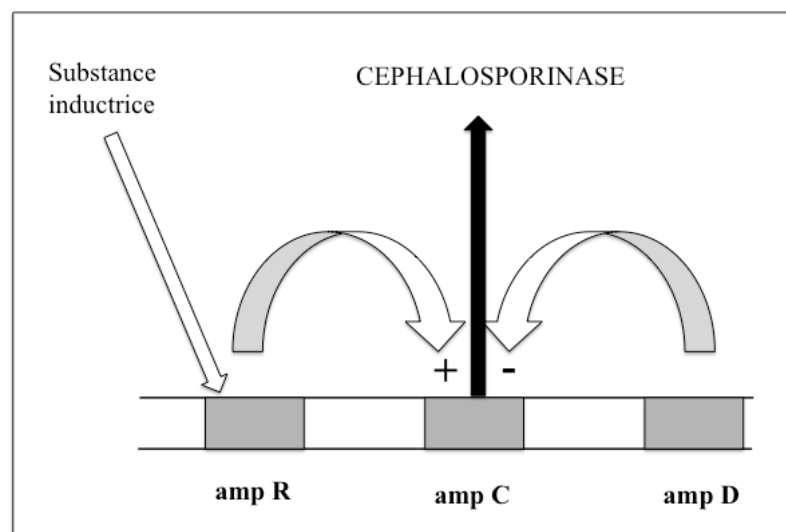


Figure 1 : Contrôle génétique simplifié de la production de céphalosporinase. D'après Ehrhardt 1993.

Ces mutants dérégulés apparaissent à une fréquence élevée, estimée entre 10^{-5} et 10^{-6} (Ehrhardt 1993). L'émergence de telles souches a été initialement rapportée dans les années 80 après l'introduction en thérapeutique des bêtalactamines réputées stables aux céphalosporinases. Cette hyperproduction s'accompagne d'une augmentation du niveau de résistance à toutes les bêtalactamines, y compris vis-à-vis des C3G (céfotaxime, ceftazidime), des monobactames mais aussi des céphamycines ainsi que des inhibiteurs de bêtalactamases. Le céfépime, le ceftiofime et les carbapénèmes sont les molécules les plus stables vis-à-vis de cette hyperproduction. Ce risque est moindre, car en raison de leur structure chimique particulière, une forme zwitterion doublement chargée, le céfépime et le ceftiofime ont une pénétration rapide et accrue à travers la paroi des bactéries à Gram négatif, 5 à 6 fois plus vite que le céfotaxime. Ceci conduit à des concentrations antibiotiques plus élevées que celles obtenues par le céfotaxime dans l'espace périplasmique (Hancock 1992) qui entraîne un accès aux PLP plus facile même si le céfépime et le ceftiofime n'ont pas de meilleure affinité pour ces molécules cibles (Bellido 1991).

Le tableau V compare les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de différentes bêtalactamines selon le mode d'expression inductible ou constitutive de la bêtalactamase AmpC chez *E. cloacae*, respectivement 0.12 et 256 mg/l pour le céfotaxime, 0.25 et 64 mg/l pour la ceftazidime et 0.12 et 2 mg/l pour le céfépime.

Tableau V : Sensibilité et résistance d'*Enterobacter cloacae* selon le mode d'expression inductible (Ind) ou constitutif (Hyp = hyperproducteur) de la production de la bêtalactamase AmpC. D'après Livermore 1995.

CMI (mg/l) pour :

Antimicrobial agent	<i>E. coli</i>		<i>E. cloacae</i>	
	Basal	Hyp	Ind	Hyp
Ampicillin ^b	2	512	512	2,048
Ticarcillin ^c	2	<i>16</i>	2	256
Ticarcillin-clavulanate	2	<i>16</i>	8	256
Piperacillin ^d	1	32	2	256
Piperacillin/tazobactam	1	8	2	64
Temocillin	2	2	1	16
Cephalothin ^e	8	512	2,048	2,048
Cefoperazone	0.25	32	0.25	128
Cefuroxime	4	32	<i>16</i>	512
Cefotaxime ^f	0.03	<i>4</i>	0.12	256
Ceftazidime	0.06	<i>4</i>	0.25	64
Cefpirome	0.03	0.12	0.06	<i>4</i>
Cefepime	0.03	0.12	0.12	2
Cefoxitin	4	256	256	512
Moxalactam	0.015	2	0.06	32
Aztreonam	0.03	2	0.06	16
Imipenem	0.12	0.12	0.25	0.25
Meropenem	0.03	0.03	0.06	0.06

Quelques rares souches produisent des enzymes Amp mutantes ayant une activité accrue sur les C3G et les C4G. Cette résistance émerge depuis peu en clinique, en particulier en France. Ces souches cliniques isolées (*E. cloacae*, *E. aerogenes*, *Serratia marcescens*) associent souvent un mécanisme d'hyperproduction de la céphalosporinase chromosomique par ailleurs modifiée et un autre mécanisme de résistance, notamment d'imperméabilité (Philippon 2006).

Ainsi, Barnaud et coll. ont isolé en France la première souche clinique d'*E. cloacae* résistante au céfépime et au cefpirome (CMI = 128 mg/l) chez un patient préalablement traité par le céfépime (2001). Il montre que cette extension du spectre de résistance aux C4G est liée à des mutations dans le gène ampC qui conduisent à des modifications structurales de la céphalosporinase, et augmentent la flexibilité de l'enzyme.

En 2006, à partir d'une aspiration bronchique d'un patient traité par ceftriaxone puis céfépime, une souche clinique d'*E. aerogenes* est apparue résistante à l'imipénème et au céfépime : les CMI du céfépime ont augmenté de 0.5 à 2 mg/l et celle de l'imipénème de 0.5 à 8 mg/l à la suite de l'exposition au traitement. L'étude des mécanismes de résistance a montré que cette résistance était due à deux mécanismes, la diminution de l'expression d'une porine et l'hyperproduction d'une céphalosporinase modifiée (Fernandez-Cuenca 2006).

2.2.2.4 Résistance acquise : phénotype producteur de « bêtalactamase à spectre étendu »

Les bêtalactamases plasmidiques à spectre de substrat étendu (BLSE) sont de plus en plus fréquemment identifiées et deviennent actuellement une préoccupation majeure dans la diffusion des infections nosocomiales, notamment celles dues à *K. pneumoniae* et à *P. aeruginosa* car leur résistance aux C3G et à l'aztréonam est préoccupante.

Ces enzymes dérivent, par mutation ponctuelle, des bêtalactamases à large spectre (TEM-1, TEM-2 et SHV-1) et sont à l'origine d'une résistance dite étendue au céfotaxime, ceftriaxone, céfépime et aztréonam. Les céphamycines (céfoxitine) et carbapénèmes sont toujours sensibles. La première BLSE, SHV-2, produite par *S. marcescens*, a été isolée en 1983 en Allemagne. Depuis, une centaine de mutants de SHV ont été décrits. La première BLSE dérivée de TEM, TEM-3 ou CTX-1, a été isolée en 1984 en France d'une souche de *K. pneumoniae*. On connaît aujourd'hui plus de 150 variants de TEM.

Elles ont, depuis 1995, évolué par mutation large en générant un plus haut niveau de résistance à la ceftazidime, comme par exemple CTX-M-15 (CTX-M pour Céfotaximase-Munich) (Philippon 2006). On a décrit à ce jour une centaine de CTX-M. D'autres BLSE caractérisées par un haut niveau de résistance à la ceftazidime et à l'aztréonam ont une localisation géographique différente (IBC-1 en Grèce, VEB-1 en Thaïlande) peu retrouvée en

France avec *E. cloacae*, mais le manque d'enquêtes épidémiologiques ne permettent pas de préciser la part de ces nouvelles enzymes (de Champs 2004).

2.2.2.5 Résistance acquise : phénotype producteur de carbapénémase

Près de 98% des entérobactéries sont sensibles aux carbapénèmes (Bonnet 2011). La résistance a été décrite pour de rares souches cliniques d'*E. cloacae* qui produisent des carbapénémases de classe A chromosomiques et inductibles par les bêtalactamines (Nmc-A et Imi-1, groupe fonctionnel 2f). Elles se caractérisent par une activité d'hydrolyse élevée vis-à-vis des carbapénèmes et une sensibilité à l'inhibition par l'acide clavulanique. Génétiquement, elles sont plus proches des bêtalactamases de classe A (type TEM, SHV par exemple) que des enzymes chromosomiques de classe C.

2.3 Evolution de l'activité in vitro des bêtalactamines face à E. cloacae

Les concentrations critiques définissent, pour chaque antibiotique, les classes « sensible, intermédiaire et résistant » des espèces en fonction de ses caractéristiques pharmacologiques, et notamment les valeurs des concentrations sériques obtenues aux posologies recommandées. Cette information permet de prédire le succès ou l'échec thérapeutique.

En France depuis 2009, le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM 2010) a abaissé les concentrations critiques des céphalosporines de 3^{ème} génération ainsi que de l'aztréonam pour les entérobactéries : la valeur basse est passée de 4 à 1 mg/l (tableau VI). Ainsi, quand la CMI du germe est inférieure ou égale à 1 mg/l, une souche est catégorisée comme sensible. Des arguments pharmacocinétiques et pharmacodynamiques ont justifié cette modification. En effet, les bêtalactamines sont dits temps-dépendants (concept décrit ci-après) et l'index pharmacodynamique retenu pour

prédire un succès thérapeutique est « le temps T entre deux administrations pendant lequel les concentrations sériques restent supérieures à un certain nombre de fois la CMI ». En cas d'infections sévères, chez un patient fragilisé ou immunodéprimé, ou encore dues à certaines espèces comme *P. aeruginosa*, ou à des enterobactéries de groupe 3, cela peut se traduire par l'index $T > 8 \times \text{CMI} = 100\%$ (Jehl 2011). Or, une concentration sérique résiduelle à 32 mg/l (soit $T > 8 \times 4 \text{ mg/l} = 100\%$) pour ces antibiotiques était difficile à atteindre sauf si les posologies étaient élevées et avec un rythme d'administration optimisé. C'est pourquoi, la concentration critique a été abaissée pour permettre de traiter par des C3G ou par l'aztréonam des infections dues à des souches qui ont un mécanisme de résistance acquise (BLSE ou hyperproduction de bêtalactamases chromosomiques) mais dont la CMI pour ces antibiotiques est toujours $\leq 1 \text{ mg/l}$ (CA-SFM 2011). Cependant, la distribution des CMI montre que l'abaissement de cette concentration critique a conduit à ce que la majorité des espèces ayant acquis ces mécanismes de résistance soient maintenant catégorisées comme souches intermédiaires ou résistantes.

Tableau VI : Concentrations, diamètre critiques des céphalosporines pour *Enterobacteriaceae*. D'après les recommandations du CA-SFM 2010.

Antibiotique	Charge du disque	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)	
		S	R	S	R
Céfalotine	30 µg	≤ 8	> 32	≥ 18	< 12
Céfuroxime	30 µg	≤ 8	> 8	≥ 22	< 22
Céfamandole	30 µg	≤ 8	> 32	≥ 22	< 15
Céfoxitine	30 µg	≤ 8	> 32	≥ 22	< 15
Céfotétan	30 µg	≤ 4	> 32	≥ 23	< 17
Latamoxef	30 µg	≤ 4	> 32	≥ 23	< 17
Céfotaxime	30 µg	≤ 1	> 2	≥ 26	< 23
Ceftriaxone	30 µg	≤ 1	> 2	≥ 26	< 23
Ceftazidime	30 µg	≤ 1	> 8	≥ 26	< 19
Céfépime	30 µg	≤ 1	> 8	≥ 24	< 17
Cefpirome	30 µg	≤ 1	> 8	≥ 24	< 17
Céfixime	10 µg	≤ 1	> 2	≥ 25	< 22

L'évolution des résistances est largement rapportée dans de nombreuses études ainsi que dans des programmes de surveillance nationaux et internationaux. Même si les valeurs

critiques varient d'un pays à l'autre et d'une période à l'autre, l'analyse de leur contenu permet de caractériser une tendance dans l'évolution. Ainsi, Tumah (2005) a comparé l'activité *in vitro* de 93 souches cliniques nosocomiales d'*Enterobacter* : dans cette étude, la ceftazidime et le céfotaxime ($S = CMI \leq 8 \text{ mg/l}$) ont inhibé chacun près de 75% des souches alors que pour le céfépime et le ceftiofime ($S = CMI \leq 8 \text{ mg/l}$), cela a été bien davantage, soit respectivement 99 et 97% des souches. Parmi les 26 souches résistantes au cefopérazone, à la ceftazidime et au céfotaxime, la sensibilité a été conservée dans 96% des cas pour le céfépime, à 88% pour le ceftiofime et la ciprofloxacine alors qu'elle l'a été totalement pour l'imipénème.

Suite à Jones et coll. (2003), Sader et coll. (2005) ont rapporté l'évolution des résistances dans le programme de surveillance, SENTRY, étendu aux Etats-Unis et au Canada entre 1998 à 2003. Provenant de 48 centres, 65 746 souches (44% hémocultures, 41% infections respiratoires) y ont été étudiées. *Enterobacter spp* a représenté 4.3% des isolats ($n=2836$), et seulement 0.4% et 0.1 % de ces souches, ont été identifiées comme résistantes au céfépime ($CMI_{90} = 2 \text{ mg/l}$) et à l'imipénème ($CMI_{90} = 1 \text{ mg/l}$). A noter également que, ces valeurs de CMI_{90} , qui sont de bons marqueurs de la résistance acquise à un antibiotique par une espèce bactérienne, sont ici assez faibles. Les activités du céfépime et de la ceftazidime sont restées stables durant la période étudiée avec une sensibilité face à *Enterobacter spp* variant sur ces 6 années de 97.3% à 99.4% pour le céfépime et une sensibilité un peu inférieure pour la ceftazidime (77.1 à 83.6%).

Dans un autre programme de surveillance SENTRY (1998-2004), l'activité antimicrobienne du céfépime a été étudiée sur des souches cliniques à Gram négatif résistantes à la ceftazidime (Pfaller 2006). *Enterobacter spp* a représenté 7.8 % des souches isolées (dont 71% par *E. cloacae*) et près de 21% étaient résistantes à la ceftazidime ($CMI \geq 16 \text{ mg/l}$). Parmi ces souches, la résistance croisée n'est apparue que dans moins de

0.5% des cas avec l'imipénème (CMI $\geq$ 16 mg/l) et dans moins de 3% pour le céfépime (CMI $\geq$ 32 mg/l) alors qu'elle a atteint 44% des souches pour ceftriaxone, 31% pour l'association pipéracilline-tazobactam et 82% pour ticarcilline-clavulanate.

En France, les résultats du réseau REA-RAISIN, en 2009 (InVS 2010), ont montré une proportion d'entérobactéries résistantes aux C3G en augmentation de 2004 à 2009, respectivement 17.8 et 23.7%, correspondant notamment à l'augmentation des souches productrices de BLSE (de 7.4 à 13.9% entre ces deux années).

2.4 Emergence de mutants résistants aux céphalosporines de 3^{ème} génération : conséquence clinique

Il y a une vingtaine d'années, la résistance des entérobactéries vis-à-vis des bêtalactamines existantes (pénicillines à large spectre, C1G) était principalement due aux enzymes plasmidiques de la classe A (comme TEM-1 et SHV-1) et de la classe D (comme OXA-1). Puis de nouvelles bêtalactamines stables à ces enzymes ont été introduites, et sous une nouvelle pression de sélection, de nouveaux mécanismes de résistance ont fait leur apparition, notamment d'enzymes hyperproduites (Philippon 2006).

Les mutants, correspondant aux bactéries qui ont un taux élevé de mutations, sont considérés comme élément facilitant pour une souche bactérienne à s'adapter aux facteurs environnementaux auxquels elle doit faire face, notamment les antibiotiques présents.

Dès 1991, Chow et coll. ont montré l'émergence de résistance post-traitement chez 6% (7/118) de patients bactériémiques à *Enterobacter* spp. Le délai d'apparition entre le premier isolement sensible et le second résistant a été en moyenne de 9 jours. Dans 19% des cas (6/31), les isolats d'*Enterobacter* résistants proviennent de patients ayant reçu un traitement antibiotique par C3G. Cette proportion est la plus importante comparativement à celle pouvant survenir après traitement par les aminosides (1%) ou par d'autres bêtalactamines

(imipénème, pipéracilline, ticarcilline, aztréonam). L'isolement d'une souche multirésistante (29%, 37/129) dans l'hémoculture initiale est associée à un taux de mortalité plus élevé que lorsqu'un isolat sensible est caractérisé. C'est ainsi, que, malgré un effectif faible (37 patients dont le germe était initialement résistant), le germe initialement sensible est devenu résistant aux C3G secondairement pour 6 patients. Chow proposait déjà en conclusion de limiter la prescription de ces C3G, quelle que soit la sensibilité *in vitro*.

De fait, selon Kaye et coll. (2001), traiter une bactériémie à *E. cloacae* par une C3G expose au risque de sélection d'un mutant résistant dans près de 20% des cas. Dans cette étude rétrospective sur 477 patients, en analysant à partir des souches initialement sensibles les différents facteurs de risque pouvant conduire à l'émergence de résistance aux C3G, il apparaît que l'association avec les fluoroquinolones a un effet protecteur significatif alors que celle avec les aminosides reste non prouvée. Or, ceci s'explique sûrement davantage, comme il sera traité plus loin, par un mésusage des aminosides, souvent administrés à des doses trop faibles et à des rythmes d'administration conduisant à des concentrations sous-efficaces. Séjour en réanimation et acte chirurgical ont été également des facteurs de risque significatifs associés à l'émergence de résistance.

Dans le même hôpital, et durant quasiment la même période, Schwaber et coll. (2003) ont, quant à eux, cherché à comparer l'effet de l'association pipéracilline-tazobactam à celui des C3G sur l'émergence de souches multirésistantes d'*Enterobacter*. Bien que des différences existent à propos des comorbidités entre les deux groupes de patients, aucune différence n'est mise en évidence dans l'apparition de souches d'*Enterobacter* résistantes après traitement : moins de 2% des souches dans chaque groupe. A noter que cet auteur caractérise le nombre d'isolement d'*Enterobacter* initialement résistants à partir d'une population de patients traités. L'écart observé avec l'étude de Kaye et coll. (2001) peut s'expliquer par le fait que les C3G peuvent sélectionner davantage de mutants déréprimés que

l'association pipéracilline-tazobactam mais que, une fois que ces mutants sont présents, ils sont résistants sur toutes les classes de bêtalactamines.

Le réseau de surveillance américain NNIS (National Nosocomial Infections Surveillance), auquel participent environ 300 hôpitaux, met en évidence entre 1992 et 2004 une augmentation du niveau de résistance des bactéries à Gram négatif dans les infections en réanimation : dans cette étude, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp sont apparus en 2003 comme étant résistants aux C3G à hauteur de, respectivement, 5,8, 21 et 31% (CDC NNIS System 2004).

Plus récemment, dans une étude prospective (Choi 2008), réalisée auprès de 732 patients présentant une infection par un germe appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* et producteur d'une bêtalactamase AmpC, l'émergence de résistance bactérienne post-traitement antibiotique est évaluée à 1,9% (=14/732), avec respectivement 5% (=11/218) vis-à-vis des C3G (céfotaxime, ceftazidime, ceftriaxone), 2% (2/100) pour les pénicillines à spectre étendu (pipéracilline-tazobactam), 1,1% pour les aminosides (1/89), et 0% pour le céfépime (0/20), pour les carbapénèmes (0/226), et pour la ciprofloxacine (0/153). Cette résistance est survenue dans près de 93% des cas lors d'infections à *Enterobacter* (13/14), et 71% (=10/14) avec *E. cloacae*.

Dans une série de sepsis sévères ou de chocs septiques à bacilles à Gram négatif (n=754) étudiée par Johnson (2011), l'exposition préalable à un traitement antibiotique, au cours d'une hospitalisation précédente par exemple, a augmenté significativement le niveau de résistance aux antibiotiques utilisés secondairement (tableau VII). Ceci a eu pour conséquence une antibiothérapie initiale inadéquate plus importante (45,4% *versus* 21,2%) et un pourcentage de décès également supérieur (51,3% *versus* 34%) chez ces patients comparativement à ceux non exposés.

Tableau VII : Impact d'un traitement antibiotique antérieur sur le pourcentage de bacilles à Gram négatif résistants et ce, pour 5 antibiotiques ou familles d'antibiotiques. D'après Johnson 2011.

	Traitement antibiotique antérieur	Pas de Traitement antibiotique antérieur
céfépime	29	7
pipéracilline – tazobactam	31.9	11.5
carbapénèmes	20	2.5
ciprofloxacine	39.7	17.6
gentamicine	26.1	7.9

Comme dans des études antérieures (Chow 1991, Lee 2002), la bithérapie n'a pas montré d'avantage sur la monothérapie en matière de prévention des risques d'émergence de résistance (Choi 2008). Toutefois les recommandations (American Thoracic Association 2005, Torres 2009) préconisent l'utilisation d'une association antibiotique tout au moins comme traitement initial (48h) dans le but de diminuer le risque de traitement inadéquat, démontré pour être à l'origine d'une surmortalité (Johnson 2011, Rello 1997, Zilberberg 2008).

3. STRATEGIE DU TRAITEMENT ANTIBIOTIQUE D'UNE PNEUMOPATHIE A *E. CLOACAE* RESISTANT

Les posologies, la voie, les modalités et le rythme d'administration doivent tenir compte des propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des antibiotiques, ainsi que des capacités d'excrétion du patient, des contre-indications et des interactions avec les autres médicaments administrés au malade.

Cette optimisation est d'autant plus nécessaire qu'il s'agit d'une infection grave, avec un germe à CMI élevée, survenant chez un patient avec des facteurs de risque.

Un rappel sur les notions de pharmacodynamie des antibiotiques est au préalable à considérer.

3.1 Pharmacodynamie des antibiotiques

3.1.1 Antibiotiques temps-dépendants : exemple des céphalosporines

Ce sont des antibiotiques dont l'effet bactéricide n'est pas majoré par l'augmentation de concentration ; lorsque la concentration-seuil est atteinte (en général de 1 à 4 fois la CMI), la décroissance des populations bactériennes en leur présence ne dépend que du temps de contact antibiotique-bactérie.

Alors que pour une infection communautaire peu grave, en considérant le couple antibiotique-bactérie, le maintien des concentrations circulantes au dessus de la CMI pendant 40 à 70 % du temps ($T > 1 \times \text{CMI} = 40 \text{ à } 70\%$) paraît satisfaisant, il est, en revanche, retenu aujourd'hui que pour une infection sévère chez un sujet à risque, quel que soit le schéma thérapeutique choisi, ces mêmes concentrations circulantes devront être maintenues entre 4 - 6 $\times$ CMI durant tout le nycthémère (c'est-à-dire $T > (4 \text{ ou } 6) \times \text{CMI} = 100\%$) (MacGowan 1998, Mouton 1997). En utilisant le concept de quotient inhibiteur (QI) correspondant dans le

cas des bêtalactamines au rapport de la concentration sérique résiduelle/CMI, ceci revient également à obtenir un QI entre 4 - 6 (voire 8 - 10 selon certains auteurs, Jehl 2011).

Lors de l'administration discontinue en 3 fois par jour de ceftazidime ou de céfépime, les concentrations résiduelles habituellement obtenues ne permettent pas d'atteindre cet objectif, ou seulement pour des CMI inférieures à 0.5 mg/l (Jehl 2009, Jehl 2011, Taccone 2010a.). Or des valeurs de CMI bien supérieures sont rencontrées dans les infections sévères du patient de réanimation.

Pour obtenir cet objectif (QI =6), le clinicien a alors le choix de réaliser :

1/ le fractionnement important des doses jusqu'à 4 à 6 administrations : l'influence du fractionnement sur la dose totale journalière est illustrée dans la figure 2 ;

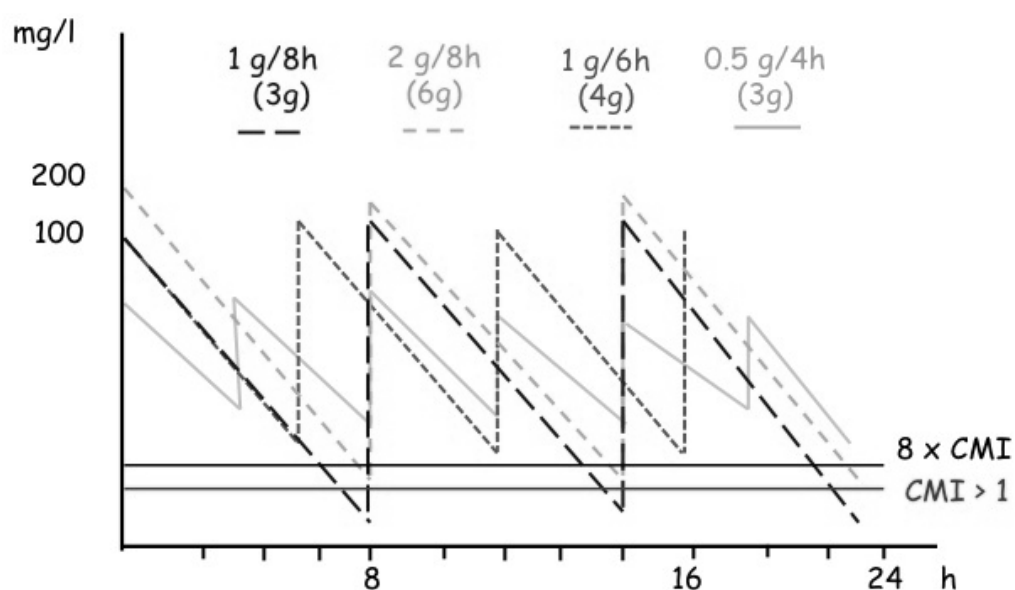


Figure 2 : Influence du fractionnement de la dose totale journalière. D'après Jehl 2011.

Notons que dans cet exemple, le fractionnement optimal (0.5 g/4h) autorise une baisse de la posologie totale (3g en 6 prises *versus* 6g en 3 prises ou 4g en 4 prises). En terme de pratique hospitalière et de déroulement des soins, ce rythme d'administration est peu compatible avec les moyens infirmiers actuellement disponibles.

2/ une perfusion continue à hauteur de la concentration-cible visée au plateau correspondant à 4 - 6 x CMI ; afin d'alimenter rapidement le compartiment tissulaire et atteindre rapidement l'état d'équilibre, il est d'usage de proposer l'administration d'une dose de charge immédiatement avant la perfusion continue.

3/ des perfusions fractionnées : par exemple, une administration toutes les 8 heures d'une perfusion de 3 heures (méropénème, céfépime), ou de 4 heures (doripénème, pipéracilline/tazocilline) d'antibiotiques.

4/ ou encore le recours à un antibiotique à demi-vie longue comme la ceftriaxone (demi-vie égale à 8 heures).

Les céphalosporines, principalement celles de 3^{ème} génération, ont fait l'objet de nombreuses études ou méta-analyses comparant leur administration pluriquotidienne ou continue. Le bénéfice de la perfusion continue y est souvent conclu en raison d'une concentration sérique à l'équilibre 3 à 4 fois supérieure à la valeur résiduelle d'une administration fractionnée toutes les 6 à 8 heures, ces valeurs élevées permettant ainsi d'atteindre l'objectif fixé précédemment (Carlet 2002, Kasiakou 2005, Lipman 1999, Roberts 2007). En raison de la variabilité des paramètres pharmacocinétiques du sujet de réanimation (Georges 2009, Gómez 1999, Padoin 2000), le suivi thérapeutique est à proposer quel que soit le mode d'administration de la bêtalactamine, soit en évaluant la concentration résiduelle lorsque l'administration est fractionnée, soit à n'importe quel moment du plateau lors de la perfusion continue ce qui paraît plus simple (Aubert 2010, Jehl 2011, Roberts 2010). D'un point de vue pratique, Petitjean et coll. (2012) propose un calcul simplifié de la dose de charge et de la dose de maintenance à administrer, notamment basé sur la corrélation des paramètres pharmacocinétiques entre les bêtalactamines et les aminosides (Delattre 2010, Delattre 2012, Panomvana 2007).

En plus du critère d'efficacité, la perfusion continue permettrait de répondre également favorablement au critère de prévention de l'émergence de résistance.

Toutefois le facteur limitant pour l'usage de la perfusion continue reste la stabilité de la solution antibiotique pendant la durée de 24 heures. Les données de stabilité doivent être validées à une température de l'ordre de 25°C correspondant aux conditions ambiantes (Jehl 2009).

Concernant l'imipénème et le céfépime, parfois considéré comme ayant un comportement concentration-dépendant vis-à-vis des bactéries comme *E. cloacae*, *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa*, en phase stationnaire, une administration fractionnée toutes les 8 heures pour l'imipénème ou toutes les 12 heures pour le céfépime avec une résiduelle suffisante atteignant 1 à 2 x CMI pourrait permettre de profiter des caractéristiques particulières de ces molécules tout en se préservant du cas d'une souche répondant davantage au comportement temps-dépendant. Des études récentes ont comparé deux rythmes d'administration pour le céfépime (4g/jour en continu *versus* 2g toutes les 12 heures pendant 48 heures) : en considérant le caractère bactéricide temps-dépendant du céfépime et des valeurs de CMI des bactéries bacilles à Gram négatif comprises entre 4 et 8 mg/l, les concentrations sériques ont été obtenues supérieures à 4 - 5 x CMI lors de la perfusion continue ($T > 4 - 5 \times \text{CMI} = 100\%$) alors qu'elles ne l'ont été qu'à 70-80 % de l'intervalle entre 2 administrations (Boselli 2003, Boselli 2008, Georges 2005, Jaruratanasirikul 2002, Tam 2002).

En conclusion, ces études, malgré des paramètres pharmacodynamiques variés et des associations pas toujours comparables, tendent à montrer que la perfusion continue ou l'administration répétée sur un intervalle étendu sont deux modes d'administration au moins cliniquement égales dans le cadre particulier des pénèmes et du céfépime. Par contre, la perfusion continue serait à privilégier dans les situations les plus à risque, comme le patient de réanimation infecté à *P. aeruginosa* ou par des bactéries avec des CMI supérieures à 2-4

mg/l, lorsque l'on fait le choix de prescrire une pénicilline ou une céphalosporine (Jehl 2009, Petijean 2012).

3.1.2 Antibiotiques concentration-dépendants : exemples des aminosides

Un antibiotique est dit concentration-dépendant quand son effet bactéricide dépend principalement de la concentration réalisée, la vitesse et la profondeur de bactéricidie étant d'autant plus importantes que la concentration mise en œuvre est grande ; il s'agit d'antibiotiques à forte vitesse bactéricide.

Pour un antibiotique concentration-dépendant comme les aminosides, l'objectif est :

- d'obtenir *in situ* des concentrations élevées de manière à favoriser leur effet, c'est-à-dire une réduction rapide de l'inoculum qui favorisera alors celui des bêtalactamines associées, qui pourront rapidement prendre le relai, ce qu'autorisent des traitements courts par aminosides (Afssaps 2011, Beaucaire 1991) ;
- de réduire le risque d'émergence de variants résistants
- d'assurer un effet post-antibiotique (EPA) maximum et de limiter la résistance adaptative.

Maintenant bien établi, le paramètre pharmacodynamique clé des aminosides prédictif d'une efficacité bactériologique et clinique est un rapport $C_{\max}$ sérique/CMI compris entre 8 à 10 voir 12 (Kashuba 1999, Moore 1987, Zelenetsky 2003). La $C_{\max}$ sérique est à mesurer par convention au temps 60 minutes, soit 30 minutes après la fin de la perfusion dont la durée est habituellement fixée à 30 minutes. Cela amène à proposer comme valeur cible, un pic minimal de 64 mg/l pour l'amikacine et de 32 mg/l pour la tobramycine et la gentamicine, étant données les valeurs critiques de 8 et 4 mg/l pour ces 2 groupes d'aminosides. Or de telles valeurs ne peuvent être facilement atteintes qu'à condition de

recourir à la dose unique journalière (DUJ), soit 25-30 mg/kg d'amikacine (Tod 1998) et 6-8 mg/kg de tobramycine ou de gentamicine.

A noter que dans la série « historique » de Marik (1991), étude qui a largement contribué à la démonstration de l'intérêt de la DUJ d'amikacine, en terme de guérison bactériologique et clinique, le choix de la posologie (15 à 20 mg/kg), n'était pourtant pas très favorable puisque l'objectif était d'obtenir un pic sérique autour de 30 à 40 mg/l pour la DUJ et de 20 à 30 mg/l pour le schéma biquotidien. Face maintenant à un objectif supérieur d'un pic au moins égal à 64 mg/l d'amikacine, l'échec des doses faibles a, récemment, été confirmé pour 90% des patients atteints de sepsis sévère ou en choc septique pour lesquels ce pic n'était pas atteint, ni même pour des doses plus élevées de 25 mg/kg ou 30 mg/kg, où seuls 70% à 80% de ce groupe obtiennent un pic sérique satisfaisant, et ce malgré l'ajustement posologique effectué (Taccone 2010b). Dans une autre étude portant sur une population de patients très comparable, Gálvez et coll. recommandent pour leur part, la dose de 30 mg/kg/j d'amikacine pour laquelle une valeur satisfaisante au pic est obtenue dans 76% des cas sans risque néphrotoxique supplémentaire, contrairement au groupe à 25 mg/kg/j qui ne l'atteint que dans 40% des cas (2011).

Concernant la gentamicine ou la tobramycine, administrée à la dose de 7 mg/kg, seuls 20% ou 40% de patients de réanimation respectivement atteignent le rapport pic/CMI ≥ 10 (Rea 2008).

Ceci montre, une nouvelle fois, que, face aux altérations pharmacocinétiques des patients de réanimation, volume de distribution augmenté notamment, le suivi thérapeutique est nécessaire pour l'ajustement posologique (Padoin 2000). Comme pour les bêtalactamines, Petitjean et coll. (2012) proposent une nouvelle approche simple et pragmatique d'adaptation posologique chez cette population de patients.

D'un point de vue de la toxicité, le mode d'administration en DUJ, et ce durant un traitement court, permet également d'améliorer la tolérance des aminosides en réduisant significativement la capture rénale (Tulkens 1991). En ne dépassant pas 5 jours de traitement, la DUJ permet de s'affranchir du problème de tolérance puisque le délai moyen d'apparition d'une atteinte rénale serait de 10-12 jours pour la DUJ *versus* 7-9 jours pour des administrations à 2 ou 3 injections quotidiennes (Prins 1993, ter Braak 1990).

3.1.3 Association d'antibiotiques

L'association d'antibiotiques est proposée pour deux objectifs : à la fois élargir le spectre d'activité de chaque antibiotique mais également augmenter l'activité bactéricide du traitement.

D'un point de vue théorique, cette forte bactéricidie doit permettre de diminuer rapidement l'inoculum, et ainsi (Petitjean 2000a) :

1/ réduire le risque de sélection de mutants résistants : à la fois vis-à-vis de l'antibiotique concentration dépendant que de celui associé temps-dépendant ;

2/ restaurer l'activité du partenaire associé (bêtalactamine par exemple) au concentration-dépendant choisi (aminoside) : en effet, les bêtalactamines étant particulièrement sensibles à l'effet inoculum, l'association avec un aminoside (ou une fluoroquinolone) pendant 3 à 5 jours est particulièrement utile. Ceci explique qu'au delà de ce délai, il soit possible d'abandonner l'aminoside, car on a alors quasiment écarté le risque de sélection de mutants résistants et la bêtalactamine est devenue pleinement active ;

3/ normaliser la durée de l'effet postantibiotique de l'aminoside, qui *in vitro* est réduit en cas d'inoculum lourd ; en effet, avec une association amikacine-C3G face à *P. aeruginosa*, la synergie va s'exprimer dans une phase précoce, l'amikacine imposant sa vitesse de bactéricidie alors que dans une phase tardive, c'est la bêtalactamine qui va prendre le relais

en bloquant les recroissances secondaires, ceci s'ajoutant à l'effet postantibiotique de l'amikacine par exemple.

Malgré ces considérations, l'utilisation de l'association plutôt que celle de la monothérapie reste toujours controversée aujourd'hui, que ce soit en terme de réduction de la mortalité, d'efficacité clinique, d'éradication bactériologique ou de limitation de l'émergence de résistance. De nombreuses études et méta-analyses n'ont pas démontré d'avantages à utiliser la bithérapie chez des patients atteints d'infections sévères à Gram négatif, même à *P. aeruginosa* (Carmeli 1999, Chamot 2003, Cometta 1994, Damas 2006, Sieger 1997). Trois méta-analyses ont été publiées par l'équipe de Leibovici et coll. (Marcus 2011, Paul 2004, Paul 2006). Si dans les deux premières méta-analyses (Paul 2004, Paul 2006) ou encore celle de Bliziotis et coll. en 2005, le fait que dans les études sélectionnées, la bêtalactamine n'était pas toujours identique dans les deux bras constitue un biais important, la méta-analyse la plus récente (Marcus 2011) s'en est affranchie.

C'est pourquoi, il est intéressant de souligner que l'analyse de certains sous-groupes (Marcus 2011), notamment «pneumonie, neutropénie fébrile et sepsis», montre au global moins d'échecs au traitement (c'est-à-dire nécessitant un changement antibiotique) dans le groupe bêtalactamine-aminoside comparativement au groupe bêtalactamine seul. Cependant, en terme de mortalité à 30 jours, quel que soit le groupe considéré, aucune différence significative n'apparaît. Toutefois, et ceci peut largement remettre en cause les conclusions de cette étude, on peut relever que l'administration des aminosides n'est pas optimisée. Une posologie faible est très souvent utilisée, associée majoritairement à une administration pluriquotidienne et non en dose unique journalière (DUJ seulement dans 6/55 études dans la méta-analyse de Marcus 2011) mais surtout sans effectuer un suivi thérapeutique nécessaire à une adaptation posologique. Tous ces éléments ne permettent pas de faire face aux variations

inter- et intra-individuelles du patient de réanimation ou du patient chirurgical (Jacolot 2000, Padoin 2000).

Or, lorsque cette surveillance est réalisée, l'intérêt de l'association est démontré (Hilf 1989). De même, quand l'aminoside est administré, sans ajustement posologique mais à dose fixe élevée (amikacine : 0.5g x 2/j soit près de 15 mg/kg/j) associé à du céfépime (2g x 2/jour), l'efficacité clinique (92% *versus* 46%) et l'éradication bactériologique du *P. aeruginosa* (91% *versus* 71%) est en faveur de la bithérapie (Chaudhary 2008).

Même si l'effet postantibiotique des aminosides est particulièrement intéressant au cours d'une association antibiotique synergique, le suivi thérapeutique et l'adaptation posologique qui peut en découler, en contrôlant l'effet maximal des aminosides ($\text{Conc}_{\text{max}} \text{ sérique} / \text{CMI} \geq 8-10$), permet d'évaluer, à lui seul, la bithérapie, et non pas comme dans beaucoup des études citées, les conditions d'une monothérapie.

3.1.4 Distribution pulmonaire

Pour être efficaces au site de l'infection, les antibiotiques doivent s'y trouver en concentration suffisante. Outre les conditions physico-chimiques locales, l'infection peut se situer à différents niveaux du poumon (parenchyme pulmonaire, muqueuse bronchique...), en intra ou extra-cellulaires selon les micro-organismes.

La pénétration des antibiotiques dans le tissu pulmonaire est un processus dynamique qui dépend de la dose, du mode d'administration, du transport actif ou de la diffusion passive des molécules au sein même du tissu pulmonaire ainsi qu'à l'état des fonctions d'élimination, hépatique ou rénale, du patient, modalités fortement liées à leurs propriétés physico-chimiques (Boselli 2001).

Au niveau bronchique, l'accès à partir de la circulation systémique vers la lumière des bronches est relativement facile. Alors que l'endothélium des capillaires bronchiques est une

barrière plutôt perméable, l'épithélium respiratoire cilié avec ses nombreuses jonctions serrées est ensuite une barrière assez imperméable qui a tendance à retarder la diffusion des médicaments mais qui n'en diminue pas toujours l'importance (Petitjean 2000b). A l'opposé, au niveau alvéolaire, les cellules non fenestrées de l'endothélium des capillaires alvéolaires sont susceptibles de ralentir le passage des antibiotiques vers l'interstitium. Ensuite, la membrane de l'épithélium alvéolaire se comporte comme une membrane cellulaire intacte, qui limite le passage dans le film alvéolaire ou tout au moins le retarde fortement (figure 3). Une telle pénétration retardée au site de l'infection a non seulement un impact sur l'efficacité clinique mais peut aussi augmenter la probabilité d'émergence de résistance (Ambrose 2010).

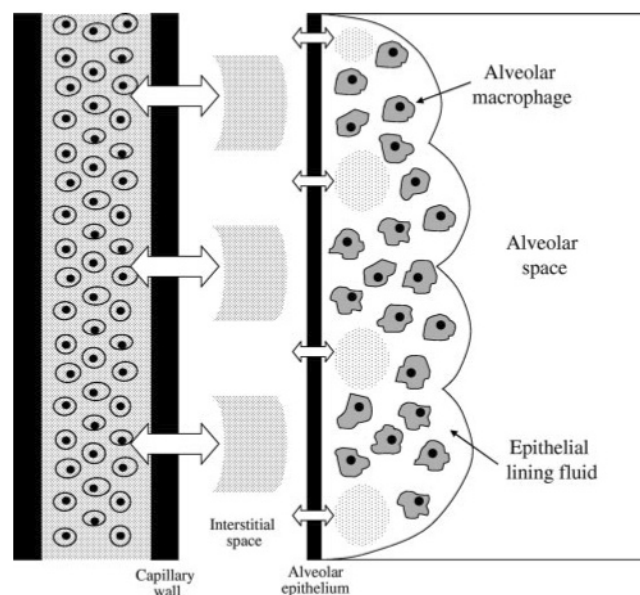


Figure 3 : Représentation schématique de la barrière « alvéolo-capillaire». Cette barrière est composée de deux membranes, la paroi capillaire et la paroi alvéolaire séparées par un espace interstitiel. Les antibiotiques doivent diffuser à travers ces barrières pour atteindre le film alvéolaire. D'après Kiem 2008.

D'un point de vue théorique, l'importance de la liaison aux protéines plasmatiques peut retentir sur l'importance de la distribution tissulaire. Or, il faut différencier les liaisons

permissives des liaisons restrictives qui peuvent, seules, constituer un réel obstacle mécanique au passage extravasculaire. Toutefois ce caractère est assez rare. Le système est, en fait, en permanence en situation d'association-dissociation, les équilibres ne sont pas figés. Si le mouvement se fait dans le sens d'un déplacement vers le secteur interstitiel, la liaison aux protéines plasmatiques est dite permissive. En réalité les liaisons sont souvent permissives (itraconazole, rifampicine) ou essentiellement permissives (cloxacilline, teicoplanine). D'autres ont un comportement mixte. Aussi, la corrélation est souvent mauvaise entre le pourcentage de liaison et la concentration tissulaire. Ainsi, pour les bêtalactamines, les concentrations tissulaires (comme le V_D) sont sensiblement de même importance que l'on s'adresse aux molécules à forte liaison (ceftriaxone, céfopérazone, cloxacilline) ou aux autres. De la même manière, on observe qu'il n'existe pas de relation entre l'importance de la liaison protéique et la pénétration tissulaire des macrolides.

Par contre, la liposolubilité des molécules est une propriété facilitant le passage des membranes cellulaires. Les antibiotiques liposolubles (macrolides, certaines fluoroquinolones) sont davantage à pénétration intracellulaire alors que les antibiotiques hydrosolubles (bêtalactamines) se distribuent préférentiellement dans le milieu extracellulaire. Quant aux aminosides, ces molécules fortement ionisées entrent lentement dans les cellules par endocytose (Boselli 2001).

De nombreuses méthodes existent pour estimer la concentration locale d'antibiotique à différents endroits de l'arbre respiratoire : expectorations, sécrétions bronchiques, parenchyme pulmonaire, liquide pleural. Par le développement du lavage broncho-alvéolaire (LBA), le film alvéolaire (« epithelial lining fluid = ELF » des anglosaxons) ainsi que les macrophages alvéolaires sont devenus accessibles. Le film alvéolaire et les macrophages alvéolaires sont particulièrement intéressants à explorer car ils représentent *in situ* le milieu extracellulaire et intracellulaire où l'agent pathogène réside selon son tropisme. Bien que

soumise à certaines erreurs d'évaluation qui doivent être prises en compte par une procédure bien standardisée, notamment l'utilisation de marqueurs endogènes comme l'urée (Baldwin 1992) ou à des controverses favorisant à juste titre la technique de microdialyse (Kiem 2008), la mesure de la concentration d'antibiotiques dans ces deux sites reste une donnée intéressante pour prévoir l'efficacité du traitement anti-infectieux dirigé contre des germes intra- et extracellulaires (Ambrose 2010, Rodvold 2011).

Deux revues de synthèse (Boselli 2001, Rodvold 2011) ont rassemblé des données sur les concentrations tissulaires de nombreux antibiotiques dans les différents milieux pulmonaires accessibles (exacerbations, sécrétions bronchiques, muqueuse bronchique, fluide alvéolaire). Les résultats sont extrêmement variables d'une classe antibiotique à l'autre et semblent non corrélés avec le taux de fixation aux protéines plasmatiques. D'autre part, les mesures dans les exacerbations et les sécrétions bronchiques ne semblent pas optimales en raison du risque de dilution ou de contamination par la salive. Quant aux valeurs obtenues à partir de la muqueuse bronchique lors d'une biopsie pulmonaire, elles ne préjugent en rien de la distribution à travers les compartiments pulmonaires, intra ou extracellulaires.

Ainsi, l'analyse des concentrations obtenues dans le fluide alvéolaire semble plus intéressante. La diffusion des céphalosporines parentérales dans le tissu pulmonaire est souvent évaluée entre 5 à 20%, mais il est nécessaire de noter que nombreuses sont les études qui ont été réalisées après l'administration d'une dose unique (Boselli 2001).

L'utilisation d'une technique plus simple (Baldwin 1991, Boselli 2007), le mini-lavage alvéolaire, chez le patient de réanimation, montrent qu'en perfusion continue à l'état d'équilibre, le céfépime aurait un pourcentage médian de diffusion ($=SSC_{LBA}/SSC_{serum}$) de 100%, *versus* 20% pour la ceftazidime (Boselli 2003). Comparativement, l'ertapenem fortement lié aux protéines plasmatiques (90%) aurait un taux de diffusion de 30% (Boselli 2006).

Les aminosides sont connus pour avoir une diffusion tissulaire médiocre, excepté au niveau rénal où l'accumulation dans le cortex rénal s'effectue tout au long du traitement. Outre des variabilités inter- et intraindividuelles, les concentrations tissulaires sont fortement dépendantes des modalités d'administration. Chez des patients sévères, la nécessité d'obtenir des concentrations élevées concerne tout autant le sérum que les tissus infectés. Ainsi, en dehors bien sûr de toute altération de la barrière pulmonaire, d'inactivation due à des changements de pH, de pO₂ ou enzymatiques, les concentrations sériques plus élevées obtenues après administration d'une dose unique journalière des aminosides doivent permettre une plus grande pénétration pulmonaire. Un tel phénomène a été retrouvé dans les sécrétions bronchiques (Santré 1995) et le parenchyme pulmonaire (Nicolas 1994).

Santré et coll. (1995) l'ont montré dans une série de 10 patients atteints de PAVM où 3 heures après une première dose le pic moyen d'amikacine dans les sécrétions bronchiques atteint une concentration de $13.6 \pm 9.3 \mu\text{g/g}$ après administration unique journalière *versus* $4.3 \pm 2.6 \mu\text{g/g}$ en 2 prises quotidiennes. Toutefois, cette valeur élevée associée à la DUJ représente à peine 3 fois la valeur de la CMI limite (4 mg/l) ou le double pour des espèces comme *P. aeruginosa* et *Acinetobacter* spp (CMI > 6mg/l) ce qui peut paraître insuffisant. De même, après administration intraveineuse de tobramycine et d'amikacine, deux études montrent que la pénétration de ces deux aminosides dans le fluide alvéolaire est faible, respectivement 12 et 32% avec des pics de concentration inférieures à 10 fois la CMI des germes habituellement retrouvés (Boselli 2007, Panidis 2005). Ce rationnel est notamment à l'origine de l'utilisation de l'administration locale en aérosols ou en instillations de ces antibiotiques. Alors que cette voie d'administration est déjà bien validée chez le sujet atteint de mucoviscidose (Ryan 2003, Ryan 2011), elle l'est moins chez le patient de réanimation atteint d'infections pulmonaires sévères. L'administration intrapulmonaire biquotidienne de 400 mg d'amikacine en aérosol chez 28 patients atteints de PAVM a conduit à des

concentrations d'amikacine dans le film alvéolaire très élevées et bien supérieures aux CMI des bacilles à Gram négatif retrouvées dans ces infections. L'efficacité clinique a été évaluée récemment, en comparant l'administration parentérale ou par nébulisation de l'association ceftazidime-amikacine dans le traitement d'une PAVM à *P. aeruginosa*. Ces deux voies d'administration ont été jugées comparables en termes de guérison après 9 jours, et de mortalité à 28 jours. D'un point de vue microbiologique, l'administration sous la forme d'aérosols pourrait permettre en réduisant rapidement et plus précocément la croissance bactérienne comparativement à la voie parentérale habituelle, de prévenir l'émergence de résistance au cours du traitement (Lu 2011).

3.2 Principes généraux du traitement antibiotique des PAVM

La mise en route du traitement antibiotique d'une pneumopathie nosocomiale est complexe. Elle doit faire face à l'état sévère des patients infectés, à la présence de prélèvements polymicrobiens, de bactéries souvent résistantes, ainsi qu'à une pression de sélection au sein des unités de réanimation qui favorise l'émergence de bactéries multirésistantes.

Le traitement antibiotique des PAVM est influencé par deux principes :

- d'une part, le fait que le pourcentage de décès est étroitement dépendant du choix antibiotique initial qui, selon la sensibilité du (ou des) germe(s) en cause est ou non d'emblée adéquat,
- et d'autre part, que le bon choix antibiotique, à lui seul, n'est efficace qu'à la condition de mettre en route le traitement dans un délai suffisamment court.

Selon ces deux principes, de nombreuses études concluent que le traitement initial des PAVM est inadéquat dans environ 25 à 30, voire 35% des cas (Dupont 2003, Rello 1997, Zilberberg 2008). Et ceci, lorsque le traitement mis en route, notamment en Amérique du

Nord, est une monothérapie (28%), une bithérapie (46%), une trithérapie (23%) ou une quadrithérapie (1-2%) (Kollef 2006a).

Or, d'un point de vue pragmatique, le traitement proposé a davantage de chance d'être d'emblée adéquat (c'est-à-dire de comporter au moins un antibiotique sur le (ou les) germe(s) responsables) si le prescripteur choisit une association. Heyland (2008) montre, sur une série de 740 PAVM traitées dans les 4 premières heures, une différence très significative ($p < 0.001$) en terme de probabilité de traitement adéquat selon qu'il s'agisse d'une mono- ou d'une bithérapie : 18.8% *versus* 84.2% ; de même, Micek et coll. (2005), non pas sur des PAVM, mais sur des bactériémies à *P. aeruginosa* ($n = 305$) montrent de la même manière que la chance est plus grande d'avoir un traitement initial adéquat après prescription d'une association plutôt qu'en faisant le choix d'une monothérapie (79.4% *versus* 65.5%, $p = 0.01$).

C'est pourquoi les associations sont à recommander lorsqu'il y a un risque d'infection par un germe suspecté multirésistant ou de sensibilité diminuée comme *P. aeruginosa*, *Acinetobacter*, ou encore d'*Enterobacter* spp (Harbarth 2002, Heyland 2008) et plus généralement lorsque les conditions de sélection de tels germes (Garnacho-Montero 2003, Trouillet 1998) sont réunis c'est-à-dire :

- présence d'une ventilation mécanique d'au moins 7 jours ;
- présence d'un traitement antibiotique dans les 15 ou 30 jours précédant l'hospitalisation, tout particulièrement en cas d'utilisation d'antibiotiques à spectre large du type C3G, fluoroquinolones ou pénèmes : dans ce cas, le risque de traitement inapproprié peut être multiplié par un facteur 2 (Johnson 2011) ;
- passage dans une unité de long séjour dans les 90 jours précédant l'hospitalisation (Aliberti 2012).

Le choix d'une association dans une de ces situations se traduit à la fois par :

- une amélioration significative de l'éradication bactérienne (64.1% *versus* 29.4%) (Heyland 2008) ;
- une réduction du pourcentage de décès (à J28) ;
- une réduction de la durée de séjour (10 jours *versus* 15 jours) (Johnson 2011) ;
- ainsi qu'une réduction de la période de ventilation.

Cependant, concernant la durée de traitement des pneumonies nosocomiales en réanimation qui est habituellement recommandée entre 7 et 8 jours (Chastre 2003, Kollef 2006b, Kollef 2006c), elle peut être prolongée à 15 jours si on veut se placer dans de meilleures conditions pour éviter les rechutes [40.6% (26/64) de rechute pour 8 jours *versus* 25.4% (16/63) pour 15 jours), (Chastre 2003)].

Même si le problème du choix entre monothérapie et association a longtemps fait débat, face à ces situations de bactéries multirésistantes où le risque de prescription d'un traitement inadéquat se traduit par un risque de décès fortement majoré (tableau VIII), il paraît raisonnable de privilégier l'association antibiotique.

Tableau VIII : Mortalité et PAVM : Pourcentage de décès selon que le traitement initial de la PAVM est ou non adéquat. D'après Rello 1997 et Zilberberg 2008.

	Rello 1997	Zilberberg 2008
Traitement adéquat	15.4	18.3
Traitement inadéquat	37	29.9

Le lien entre mortalité accrue et un traitement antibiotique inadapté a déjà été mis en évidence chez les patients de réanimation atteints de sepsis sévère : le risque de décès est

multiplié par 1.3 à 2 (Ibrahim 2000, Johnson 2011, Leibovici 1998, MacArthur 2004, Micek 2005, Shorr 2011), voire 3 (Harbarth 2002) et même 8 selon Garnacho-Montero et coll. (2003) où le risque est majoré à la fois par la présence de co-morbidités et par l'importance du score de gravité.

D'autre part, l'issue thérapeutique est, dans le traitement des PAVM, totalement dépendante du choix initial. Selon Kollef et coll. (2006a), alors que le pourcentage de décès est comparable lorsqu'à réception de l'antibiogramme, on est amené à maintenir le traitement de départ ou à réduire le spectre (23.7% *versus* 17%), preuve dans les deux cas que le traitement initial était adéquat, le risque de décès est doublé (42.6%) quand une modification est nécessaire (notamment un élargissement du spectre). Selon Luna et coll. (1997) et Zilberberg et coll. (2008) tout serait même joué dès la prescription initiale puisque ces auteurs montrent qu'en cas de traitement initial inapproprié, le pourcentage de décès est alors le même que le traitement soit ou non modifié par la prise en compte des résultats microbiologiques.

Enfin, le délai de mise en place du traitement initial efficace est lui-même déterminant. Kollef et coll. (2006a, n = 398 PAVM, score APII = 23) montrent que surviennent 23.1% de décès en cas de traitement adéquat initié dans les 12 heures *versus* 30.9% lorsqu'on dépasse les 24 heures ; dans cette série, la distribution des délais était la suivante : 27.6% dans les 4 heures, 40.2% entre 4 et 12 heures et 10.8% au-delà de 24 heures. Même si l'élément délai n'est pas aussi aiguë que dans le traitement du choc septique (Kumar 2006), plus court sera la mise en route d'un traitement approprié, plus grandes seront les chances de survie du patient. Ceci souligne que le bénéfice maximal ne peut être obtenu qu'à la condition de parfaitement protocoliser les modalités de prise en charge à l'hôpital et ceci vaut, bien entendu, autant pour le choc septique que pour les PAVM (Barochia 2010, Thiel 2009). La probabilité de survie pourrait être ainsi multipliée par un facteur pratiquement de 2 (Barochia 2010). La formation,

initiale et régulière, de l'ensemble des équipes médicales et non médicales favoriserait sûrement la mise en œuvre de cette démarche (Ferrer 2008).

Les recommandations américaines (American Thoracic Society 2005) et européennes (Torres 2009) proposent des protocoles thérapeutiques pour la prise en charge des PAVM (tableaux IX et X) en distinguant deux situations, la présence ou non des facteurs de risques suivants : un traitement antibiotique dans les 3 mois précédents, une hospitalisation actuelle depuis au moins 5 jours, ventilation mécanique mise en œuvre depuis 5 à 7 jours, une prise en charge dans un centre de dialyse ou dans un centre de soins de suite et réadaptation dans les 3 mois précédents, une écologie locale montrant un taux élevé de résistance aux antibiotiques et enfin une pathologie ou un traitement associé diminuant la réponse immunitaire.

Tableau IX : Protocole thérapeutique recommandé par l'American Thoracic Society (2005) pour les pneumonies tardives avec facteurs de risque.

Micro-organismes responsables	Antibiotiques
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> (BLSE) <i>Acinetobacter species</i>	Céphalosporines avec activité antityocyannique (céfépime, ceftazidime) ou Carbapénèmes antityocianiques (imipénème, méropénème) ou Bêtalactamine + inhibiteur bêtalactamase (pipéracilline-tazobactam) plus Ciprofloxacin, Lévofoxacin, ou Aminocyclitol (amikacin, gentamicin ou tobramycin)
<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline	plus Linezolid ou vancomycin

Tableau X : Protocole thérapeutique recommandé par l’American Thoracic Society (2005) pour les pneumonies précoces sans facteurs de risque.

Micro-organismes responsables	Antibiotiques
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Céphalosporines de 2 ^{ème} ou 3 ^{ème} génération sans activité antipyrétique (céfotaxime, ceftriaxone)
<i>Haemophilus influenzae</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i> sensible à la méticilline	ou Lévofoxacine, moxifloxacine
Entérobactéries à Gram négatif <i>E. Coli</i> , <i>Klebsiella species</i> , <i>Enterobacter species</i> , <i>Serratia marcescens</i>	ou Amoxicilline/acide clavulanique ou Ampicilline/ sulbactam ou Ertapénème

Ce problème de souches difficiles à traiter a incité un certain nombre d’équipes à développer des scores cliniques de risque, comme le « Clinical Pulmonary Infection Score » (CPIS) de manière à mieux identifier ces situations. Toutefois, ces scores sont souvent mis en défaut par le bon sens clinique. Des marqueurs biologiques sont également de plus en plus étudiés dans l’aide au diagnostic, ou comme marqueur de sévérité, ou encore comme outil d’aide à l’arrêt du traitement antibiotique. Mais ils restent encore controversés : la procalcitonine, alors qu’elle serait un marqueur plus sensible que la C-Reactive Protein (CRP) dans le diagnostic des sepsis sévères et des états de chocs septiques (Uzzan 2006) ainsi qu’un bon facteur prédictif de la mortalité (Seligman 2011), elle n’aurait qu’une faible valeur diagnostique dans les pneumonies nosocomiales en réanimation (Dallas 2011). Cependant, elle pourrait apporter une aide à l’arrêt du traitement antibiotique notamment quand sa valeur est < 0.5 ng/ml ou quand elle diminue de 80% ou plus de sa valeur initiale (Luyt 2011). D’autres marqueurs comme la coceptine, ou le MR-proANP sont encore en évaluation (Seligman 2011).

Pour conclure, la mise en route d'une antibiothérapie initiale adéquate devrait prochainement s'améliorer grâce au développement, en routine, dans les laboratoires de microbiologie, de nouvelles techniques d'amplification moléculaire. Ces techniques de détection rapide utilisent le principe de réaction en chaîne par polymérase (Polymerase chain Reaction en anglais, PCR) et permettent en un temps court, moins de 6 à 8 heures, d'identifier un agent pathogène et de cibler son profil de résistance (Endimiani 2011). En considérant les 48 heures que nécessitent les cultures bactériennes « classiques », le gain de temps dans la détection est donc important. Ces nouveaux tests, faciles à utiliser, seront un outil majeur dans l'aide au diagnostic, et pourront permettre, comme dans les cas de sepsis sévères, de réduire la mortalité attribuable par le « simple fait » d'initier plus rapidement le traitement antibiotique. Secondairement, ils pourront diminuer les coûts d'hospitalisation de ces patients lourds, et ce, malgré le coût élevé d'un test (300 euros) (Lehman 2010). Toutefois, il reste encore à valider précisément leur utilisation dans le diagnostic des PAVM, et notamment de comparer les résultats obtenus à partir des différents types de prélèvements pulmonaires possibles (expectorations, aspiration, LBA...) (Tenover 2011).

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Le but de ce travail est expérimental et thérapeutique.

Le point commun des quatre études présentées est l'utilisation du modèle de pneumopathie expérimentale à *E. cloacae* chez le rat précédemment mis au point dans notre laboratoire. Ce modèle initialement testé sur une souche sauvage d'*E. cloacae* se caractérise par l'utilisation d'un inoculum lourd en phase stationnaire, et d'une pharmacocinétique des antibiotiques chez l'animal proche de chez l'homme (Mimoz 1997).

Nous avons dans un premier temps, chez le rat immunocompétent, comparé les effets d'un traitement antibiotique sur une paire isogénique d' *E. cloacae* (souche sauvage et son mutant hyperproducteur de céphalosporinase) afin de confronter les données *in vitro* et *in vivo*. Le traitement a été initié 12 heures après l'inoculation bactérienne. Ce temps est long et retardé, et donc être considéré comme discriminant ; les antibiotiques, céfépime et amikacine administrés seuls ou en association, ont été évalués sur une durée courte de 24 heures (**Etude n°1**).

Dans un deuxième temps, nous avons comparé, toujours en utilisant le modèle précédent, les effets de trois bêtalactamines (céfépime, ceftazidime et imipénème) associés ou non à l'amikacine sur cette même paire isogénique (souche sauvage et son mutant hyperproducteur de céphalosporinase). La ceftazidime a été retenue comme C3G utilisée habituellement dans le traitement probabiliste des infections nosocomiales et l'imipénème comme carbapénème de référence efficace contre les bactéries productrices à haut niveau de céphalosporinases. Le céfépime restait, au moment de cette étude, en cours d'évaluation clinique. Comparativement à celui de l'étude n°1, le traitement antibiotique a été initié plus précocément (3 heures) pour permettre une durée d'étude plus longue (2.5 jours) (**Etude n°2**).

Puis, une clairance bactérienne spontanée ayant été observée dans les deux études précédentes, ce qui pouvait remettre en cause les résultats obtenus, nous avons cherché à optimiser notre modèle de pneumopathie expérimentale chez le rat, en induisant une immunodépression a minima par le cyclophosphamide dans le but de permettre une meilleure implantation bactérienne, sans mortalité supplémentaire. La recherche de la dose de cyclophosphamide ainsi que sa séquence d'administration a alors été menée (**Etude n°3**).

Enfin, nous avons comparé les effets du traitement antibiotique (céfépime et amikacine) sur le modèle de pneumopathie expérimentale chez le rat immunocompétent et le rat immunodéprimé (**Etude n°4**).

**CHOIX ET PERTINENCE DU MODELE D'INFECTION
EXPERIMENTALE**

1. GENERALITES

Les études précliniques dans le domaine de l'infectiologie utilisent les modèles animaux pour mieux connaître la pathophysiologie des maladies infectieuses, les réponses immunitaires et inflammatoires associées, les interactions hôte-pathogène, la recherche de vaccins ou encore pour évaluer l'efficacité prophylactique ou thérapeutique des antibiotiques (Bakker-Woudenberg 2003, Mizgerd 2008).

La place des modèles d'infection expérimentale dans l'optimisation des traitements des états infectieux graves chez l'homme continue à se poser (Barza 1978, Zak 1991). On pourrait, en effet, considérer que les données *in vitro* associées aux données pharmacocinétiques de phase I chez l'homme suffisent pour définir la meilleure stratégie d'utilisation des antibiotiques dans le traitement des infections bactériennes sévères. Toutefois, les données *in vitro*, comme les valeurs de CMI notamment, nous fournissent seulement une information à un instant donné à propos d'une concentration, et ne nous permettent en aucun cas de prendre en compte les variations de concentrations antibiotiques au cours du temps, ni d'identifier si les effets antibactériens persistent après le temps d'exposition (effet postantibiotique).

Dès 1981, Sande écrit que les modèles animaux peuvent nous aider à répondre aux questions suivantes :

- *Un antibiotique bactériostatique est-il aussi efficace qu'un antibiotique bactéricide ?*
- *A quel moment la vitesse de bactéricidie est-elle importante ?*
- *Dans quelles situations, une concentration sérique bactéricide élevée est-elle nécessaire ?*
- *Quel est le schéma thérapeutique optimal pour un antibiotique ?*
- *Quelle est l'importance d'un effet postantibiotique ?*

Actuellement, il est reconnu que les modèles expérimentaux dans le domaine infectieux permettent :

- par une approche pharmacocinétique et pharmacodynamique de l'action des antibiotiques, de déterminer la relation entre leurs concentrations sanguines et tissulaires, et de caractériser ainsi les index pharmacodynamiques liés à leur efficacité (Andes 2002) ;
- d'évaluer une nouvelle molécule antibiotique, même si c'est un fait de plus en plus rare ces dernières années : avec des modèles plutôt discriminants, l'activité antibactérienne du nouvel antibiotique est comparée à celle du traitement de référence et sa diffusion tissulaire peut être étudiée ;
- de rechercher l'impact d'un mécanisme de résistance sur l'activité d'une antibiothérapie ;
- de corréler les concentrations critiques préalablement définies par le CA-SFM ou le NCCLS (National Committee for clinical Laboratory Standards) à des échecs ou des succès thérapeutiques (Fantin 2006) ;
- d'améliorer la connaissance d'une association d'antibiotiques en recherchant une synergie d'action *in vivo*, son rôle dans la prévention de l'émergence de variants résistants ou dans l'élargissement du spectre antibactérien lors d'infection polymicrobienne (Carbon 1989, Fantin 1992).

Ces modèles sont ainsi contributifs à l'évaluation des antibiotiques en ce qui concerne leur activité de bactéricidie, le choix d'une association, le mode d'administration et le contrôle de la dose. A noter toutefois que l'aide à la désescalade et la durée de traitement, deux autres critères importants à considérer dans le bon usage, ne peuvent pas être explorées par de tels modèles (Potel 2010).

Dans les travaux présentés ci-après, le modèle animal de pneumopathie expérimentale chez le rat a été choisi pour étudier l'effet synergique entre une bêtalactamine, le céfépime, et un aminoside, l'amikacine, sur une souche d'*Enterobacter cloacae* productrice de bêtalactamase dérégulée.

2. CARACTERISTIQUES DU MODELE

2.1 Espèce animale

Même si, parmi les rongeurs, la souris est très souvent considérée comme étant l'espèce la plus sensible aux agents pathogènes humains (Bakker-Woudenberg 2003), le rat a été choisi dans notre modèle en raison de son volume de sang important (environ 16 ml) qui facilite la réalisation d'études pharmacocinétiques nécessaires pour ajuster les posologies ainsi que les rythmes d'administration des médicaments utilisés.

Toutefois toute tentative de transposition des résultats à l'homme, implique que l'on ait, au préalable et au minimum, placé l'animal de laboratoire dans une situation cinétique qui lui permette de bénéficier au site infectieux d'une durée de contact antibiotique-bactérie la moins éloignée possible de celle qui est observée chez l'homme.

Comme chez la souris (Craig 1991), l'élimination des antibiotiques chez le rat est rapide avec respectivement une demi-vie d'élimination pour le céfépime de 0.6-0.7 heures (Forge 1987, Mimoz 1996) et d'environ 0.9 heures pour l'amikacine (Mimoz 1996), soient des valeurs plus courtes que celles observées chez l'homme (2 heures pour le céfépime et 2-3 heures pour l'amikacine). Ceci conduit ainsi à un temps d'exposition à l'antibiotique réduit, ce qui peut induire pour des antibiotiques temps-dépendant comme les bêtalactamines un risque de bactéricidie diminuée, ainsi qu'une recroissance secondaire plus rapide étant donné

que l'effet postantibiotique, lorsqu'il est présent, est ordinairement dépendant à la fois de la concentration et de la durée (Gerber 1986, Gerber 1989).

Les clairances rénales élevées chez les petits animaux de laboratoire produisent de ce fait une différence majeure entre les pharmacocinétiques humaines et animales. Il existe trois méthodes pour pallier à ce problème et mimer ainsi chez l'animal une pharmacocinétique proche de celle obtenue chez l'homme (Mizen 1999) :

- l'administration de doses réitérées au minimum toutes les demi-vies (Gerber 1989) ;
- l'administration par perfusion continue ou prolongée en utilisant par exemple des pompes électriques pilotées par ordinateur qui permettent de faire varier les débits de perfusion (Bugnon 1996, Bugnon 1998, Woodnutt 1992). Dans un modèle d'endocardite chez le lapin, la simulation de la pharmacocinétique humaine montre que, pour l'administration de 30 mg/kg/j d'amikacine, la dose unique journalière est équivalente à celle réalisée trois fois par jour en ce qui concerne l'éradication de *S. marcescens* dans les végétations (Bugnon 1996). Dans le même modèle, impliquant cette fois *Enterococcus faecalis* et la gentamicine, le groupe « humanisé » montre une efficacité antimicrobienne plus grande comparativement au groupe sans pharmacocinétique simulée (Dubé 2003) ;

Ces deux premières méthodes sont difficiles à mettre en œuvre sur des effectifs importants d'animaux (n=60), car ceci nécessite une infrastructure que nous n'avons pas au laboratoire.

- la réalisation d'une insuffisance rénale lorsque le médicament à évaluer s'élimine principalement par cette voie. Elle peut s'effectuer chimiquement par administration de molécules néphrotoxiques comme le nitrate d'uranyle qui crée une néphropathie interstielle aigüe en 4 jours (Giacomini 1981), ou comme le cisplatine (Mahmood

1994) même s'il semble que cette dernière molécule ne permette pas d'obtenir une élimination suffisamment rapide du céfépime (Máthé 2006). L'insuffisance rénale peut également être réalisée mécaniquement par ligature urétérale, ou par néphrectomie partielle créant ainsi une insuffisance rénale chronique (Burtin 1994).

C'est la première solution que nous avons retenue en choisissant d'administrer aux rats du nitrate d'uranyle par voie sous-cutanée d'abord puis par voie intra-péritonéale. Au cours des études, le changement de voie d'administration du nitrate d'uranyle s'explique par le fait que la voie historique sous-cutanée entraînait une douleur importante au point d'injection ce qui a fait préféré la voie intra-péritonéale, sachant l'inconvénient majeur, quand elle n'est pas bien maîtrisée, qu'une injection dans une anse intestinale est toujours possible et à l'origine d'un retard dans l'absorption systémique du produit.

Cette administration a lieu 4 jours avant le début du traitement antibiotique afin que l'atteinte de la fonction rénale soit stable pendant toute la durée de l'étude. La dose retenue a été de 1 mg/kg. Le tableau XI présente les paramètres pharmacocinétiques des antibiotiques injectés par voie intrapéritonéale chez le rat rendu insuffisant rénal par administration sous-cutanée ou intrapéritonéale de 1 mg/kg de nitrate d'uranyle.

Tableau XI : Paramètres pharmacocinétiques de quatre antibiotiques (amikacine, ceftazidime, céfépime, imipénème) administrés par voie intraperitonéale chez le rat rendu insuffisant rénal après administration sous-cutanée (SC) ou intrapéritonéale (IP) de 1 mg/kg de nitrate d'uranyle : concentrations plasmatiques au pic (30 min après administration) et à la vallée (8 heures après administration).

			Administration de nitrate d'uranyle par voie SC			Administration de nitrate d'uranyle par voie IP		
			Concentration plasmatique [médiane (extrêmes), mg/l]		Demi-vie (h)	Concentration plasmatique [médiane (extrêmes), mg/l]		Demi-vie (h)
Antibiotique	Nombre d'animaux	Dose (mg/kg)	Pic	Vallée		Pic	Vallée	
Amikacine	6	25	80 (60-115)	15 (10-30)	2.2 (1.9–2.6)	92 (64-121)	18 (13-35)	2.5 (2.1–3.2)
Ceftazidime	4	60	197 (139-214)	15 (5-24)	1.9 (1.4–2.9)	nd	nd	nd
Céfépime	6	60	160 (125-220)	12 (6-28)	2.0 (1.4–2.8)	180 (140-240)	12 (6-26)	2.2 (1.8–2.7)
Imipénème	5	30	83 (66-104)	<0.5 (<0.5-1)	1.0 (0.7–1.3)	nd	nd	nd

Les animaux sont placés 5 jours avant le début de chaque série d'expérience dans des locaux adaptés et dans un environnement jour-nuit de 12 heures. Ceci permet par cette période d'acclimatation de minimiser un état de stress lié à leur arrivée, état qui est connu pour modifier la pharmacocinétique des médicaments (Shyu 1987). Durant cette période et jusqu'à l'anesthésie, les animaux ont un accès libre à la nourriture et à l'eau : le jeûne pré-anesthésique n'est pas nécessaire chez les petits rongeurs (Flecknell 1993). Une fois l'inoculation des bactéries réalisée, pour des raisons de sécurité microbiologique, l'expérience a lieu dans un laboratoire dédié et les rats infectés sont placés dans des cages individuelles munies de filtres antimicrobiens.

La mise au point de ce modèle a toujours été effectuée dans le respect des règles dictées par les comités d'éthique en vigueur (National Institutes of Health 1985).

2.2 Souche bactérienne

Il s'agit d'une souche d'*E. cloacae* qui est un mutant déréprimé hyperproducteur de céphalosporinase (obtenue à partir d'une souche clinique par l'équipe de J. Caillon - H. Drugeon, Nantes). La virulence du mutant a été maintenue par passages réguliers chez l'animal. L'inoculum, d'environ 8 log₁₀ unités formant colonies (UFC)/ml caractérisant un inoculum lourd particulièrement difficile à traiter, est obtenu en phase stationnaire.

Afin de diminuer la clairance bactérienne spontanée, notamment pour des modèles d'infection pulmonaire chronique à *P. aeruginosa* chez le rat, modèles utilisés pour mimer la mucoviscidose, l'inoculum bactérien est souvent incorporé dans des billes d'agar ou de gélatine (Bakker-Woudenberg 2003). Des études récentes cherchent même à calibrer ces billes avec un surfactant non-ionique (Growcott 2011). Nous n'avons pas fait appel à ce type de préparations dans nos études.

2.3 Technique d'inoculation

Trois techniques d'administration sont habituellement utilisées pour produire des infections pulmonaires expérimentales : l'inoculation intranasale, ou par aérosol, ou encore par instillation directe dans l'arbre respiratoire (réalisée par voie intrachéale ou par voie intrabronchique). Même si les deux premières techniques sont sans doute celles qui ressemblent le plus à la manière dont une infection pulmonaire est acquise chez l'homme, l'inoculation intrachéale ou intrabronchique se réalise avec davantage de précision et permet d'obtenir une bonne reproductibilité du modèle (Bakker-Woudenberg 2003). En effet, par voie intranasale, la quantité de bactéries arrivant dans les poumons peut ne pas être parfaitement maîtrisée en raison d'une variabilité interindividuelle de la fréquence respiratoire des animaux, ainsi que par l'absorption digestive possible. Par aérosol, la quantité exacte de bactéries initialement présentes n'est jamais garantie et la validation du modèle nécessite toujours le sacrifice d'animaux après exposition à l'aérosol pour quantifier à l'aide de cultures pulmonaires la taille de l'inoculum initial (Mizgerd 2008). Toutefois les autres techniques ne permettent pas souvent de s'astreindre de cette contrainte. Un des prérequis de cette technique par aérosol est également la nécessité de s'assurer de la survie des bactéries durant l'aérosolisation, contrairement à d'autres comme *S. pneumoniae* incompatible avec cette technique. Quant à la troisième technique, l'instillation directe dans l'arbre pulmonaire, elle a lieu par voie intrachéale ou par voie intrabronchique. La voie intrachéale peut se faire en injectant l'inoculum dans la trachée après incision et fermeture chirurgicale, ou par voie orale sans abord invasif nécessaire. Par voie intrabronchique, la technique permet, si besoin, l'induction d'une pneumonie unilatérale. L'avantage d'utiliser une de ces trois techniques est le contrôle précis de l'inoculum et de limiter ainsi la variabilité interindividuelle des animaux. Les inconvénients sont le recours parfois nécessaire à l'anesthésie des animaux et à l'usage de techniques chirurgicales.

Le tableau XII présente les avantages et les inconvénients de ces techniques (Mizgerd 2008).

Tableau XII : Comparaison des différentes voies d'inoculation d'une pneumopathie expérimentale. D'après Mizgerd 2008.

Méthode	Avantages	Inconvénients
<i>Aérosol</i>	- Mime la transmission naturelle des infections respiratoires - Infection simultanée de plusieurs groupes d'animaux - Dépôt pulmonaire uniforme d'un animal à l'autre - Infection bilatérale symétrique - Anesthésie pas nécessaire	- Coût important - Dépôt au niveau oculaire et cutané - Survie faible de certains pathogènes dans l'aérosol - Taille de l'inoculum limité
<i>Inoculation transtrachéale</i>	- Mime l'aspiration oropharyngée - Quantité précise injectée dans l'arbre respiratoire - Infection unilatérale possible - Non invasif	- Anesthésie générale souvent nécessaire - Incision chirurgicale - Dépôt non uniforme et asymétrique - Début de l'expérience décalé selon les groupes
<i>Inoculation intranasale</i>	- Mime l'aspiration oropharyngée - Modèle d'infections respiratoires des voies hautes et basses - Procédure simple	- Anesthésie générale souvent nécessaire - Dépôt pulmonaire très variable - Dépôt non uniforme et asymétrique - Risque de contamination par la flore digestive

Dans nos études, l'infection a été induite par administration intratrachéale directe d'une suspension bactérienne d'*E. cloacae* selon la méthode décrite par Pennington et Stone (1979) ne nécessitant pas d'anesthésie au moment de l'inoculation.

2.4 Evaluation de l'infection

De nombreux paramètres permettent de surveiller l'infection pulmonaire, sa sévérité ainsi que l'efficacité du traitement antibiotique testé. L'observation montre toujours un comportement de l'animal qui se caractérise par une léthargie, des poils hérissés et une perte de la vigilance visuelle. Une perte de poids (pouvant aller au delà de 25% du poids initial), une fièvre et un écoulement nasal sont souvent associés. Les signes pulmonaires peuvent montrer une détresse respiratoire avec une fréquence respiratoire réduite (les animaux

« gaspent ») et une respiration sifflante assez caractéristique (les animaux « sifflent »). Des complications peuvent également survenir même si elles ne sont pas toujours attendues, comme une pleurésie, une péricardite, une septicémie voire la mort de l'animal. Chez les animaux dont les défenses immunitaires sont diminuées par déplétion en leucocytes (après administration de cyclophosphamide) ou par déplétion du complément, ces deux dernières complications surviennent plus fréquemment.

Après euthanasie des animaux et prélèvement des organes, une augmentation du poids des poumons infectés comparativement à ceux non infectés est observée, le caractère inflammatoire de l'infection peut également être caractérisé au niveau tissulaire par la présence d'infiltrats de cellules de l'inflammation.

A la suite du prélèvement des poumons, des cultures quantitatives sont réalisées et assurent un comptage précis du titre bactérien, permettant la comparaison de différents protocoles antibiotiques. Dans notre modèle, dès la troisième heure après l'inoculation, les études anatomopathologiques ont permis de mettre en évidence, au niveau des poumons des animaux, une broncho-pneumopathie bilatérale intéressant l'ensemble des lobes. La numération bactérienne des poumons réalisée à ce moment a montré que le modèle est reproductible et que le titre bactérien était élevé et $\geq 7 \log_{10}$ UFC/g de parenchyme, ce qui correspond à une concentration bactérienne fréquente dans l'infection pulmonaire basse du sujet de réanimation (Rouby 1992).

2.5 Statut immunitaire

Les premières études (études n°1 et n°2) ont été réalisées sur un animal immunocompétent. En effet, ceci a été retenu pour ne pas compromettre l'effet postantibiotique des molécules, effet dont la durée est dépendante du nombre de granulocytes présents au foyer infectieux (Craig 1988, Craig 1996).

Dans un second temps, afin d'améliorer le modèle précédent pour lequel une clairance bactérienne spontanée avait été observée, l'objectif a été d'améliorer l'implantation bactérienne en rendant les animaux immunodéprimés. Pour ce faire, les animaux sont souvent rendus neutropéniques avec différents médicaments immunosuppresseurs comme le 5-fluorouracile, le methotrexate, l'aracytine, l'azathioprine (Kumar 1989, Zuluaga 2006), mais le plus souvent avec le cyclophosphamide. Bien que de fortes doses de cyclophosphamide (350-450 mg/kg) aient déjà été bien décrites chez la souris (Bedos 1998, Ikeda 2000, Rusnak 1984, Van't Wout 1989), des doses plus faibles comme celles utilisées dans le modèle historique d'infection de cuisse et de poumon chez la souris neutropénique développés par Gerber et Craig (Gerber 1983, Hatano 1994, Leenders 1996, Tokunaga 1993, Zhi 1988, Zuluaga 2006) sont actuellement préférées (200-300 mg/kg). Dans tous ces modèles, la voie intrapéritonéale, dont la reproductibilité reste variable (Gaines Das 2007), a été utilisée et les doses ont toujours été très élevées mimant ainsi davantage une situation d'aplasie. Enfin, le choix des doses et celui du schéma de réadministration utilisés n'étaient que rarement explicités. C'est pourquoi, dans notre étude n°3, nous avons recherché la séquence et la dose de cyclophosphamide IV optimales à utiliser pour induire une leucopénie capable de minimiser la clairance bactérienne spontanée. Cette adaptation du modèle permet également par ailleurs de se rapprocher des patients de réanimation aux défenses immunitaires amoindries.

2.6 Traitement antibiotique

Pour des raisons de faciliter d'accès, les antibiotiques ont été administrés par voie intrapéritonéale ; ce mode d'administration permet de reproduire assez fidèlement les concentrations observées chez l'homme après administration intraveineuse. Le délai de mise en route du traitement a été variable selon les études (3 à 12 heures), de même que la durée de traitement a varié de 24 heures à 2.5 jours.

ARTICLES ET DONNEES EXPERIMENTALES

ETUDE n°1

Cefepime and amikacin synergy *in vitro* and *in vivo* against a ceftazidime-resistant strain of *Enterobacter cloacae*

**Olivier Mimoz^{a*}, Anne Jacolot^b, Christophe Padoin^b, Michel Tod^{b,c}, Kamran Samii^a
and Olivier Petitjean^{b,c}**

^a Service d'Anesthésie – Réanimation Chirurgicale, Hôpital Bicêtre, 94275 Le Kremlin-Bicêtre Cedex;

^b Département de Pharmacologie – Toxicologie Hospitalière, Hôpital Avicenne, 93009 Bobigny Cedex;

^c Crépit 93, Centre de Recherche en Pathologie Infectieuse et Tropicale, Hôpital Avicenne, 93009 Bobigny Cedex, France

*Corresponding author

Key-words: *Enterobacter cloacae*, stably-derepressed cephalosporinase, pneumonia, animal models, cefepime, ceftazidime.

ABSTRACT

The activities of cefepime and amikacin alone or in combination against an isogenic pair of *Enterobacter cloacae* strains (wild type and stably derepressed, ceftazidime-resistant mutant) were compared using an experimental model of pneumonia in non-leukopaenic rats. Animals were infected by administering $8.4 \log_{10}$ cfu of *E. cloacae* intratracheally, and therapy was initiated 12 h later. At that time, the animals' lungs showed bilateral pneumonia and contained more than $7 \log_{10}$ *E. cloacae* cfu/g tissue. Because rats eliminate amikacin and cefepime much more rapidly than humans, renal impairment was induced in all animals to simulate the pharmacokinetic parameters of humans. *In-vitro* susceptibilities showed an inoculum effect with cefepime proportional to the bacterial titre against the two strains, but more pronounced with the stably derepressed mutant strain, whereas with bacterial concentrations of up to $7 \log_{10}$ cfu/mL, no inoculum effect was observed with amikacin. *In-vitro* killing indicated that antibiotic combinations were synergic only at intermediate concentrations. At peak concentrations, the combination was merely as effective as amikacin alone. At trough concentrations, a non-significant trend towards the superiority of the combination over each antibiotic alone was noted. Moreover, cefepime was either bacteriostatic or permitted regrowth of the organisms in the range of antibiotic concentrations tested. Although each antibiotic alone failed to decrease bacterial counts in the lungs, regardless of the susceptibility of the strain used, the combination of both antibiotics was synergic and induced a significant decrease in the lung bacterial count 24 h after starting therapy when compared with tissue bacterial numbers in untreated animals or animals treated with either antibiotic alone. No resistant clones emerged during treatment with any of the antibiotic regimens studied.

INTRODUCTION

The incidence of infections caused by *Enterobacter* spp. is increasing in clinical practice. A recent analysis of the National Nosocomial Infection Study data collected between 1986 and 1989 showed that these bacteria are now among the five most common nosocomial pathogens isolated in American hospitals, being responsible for about 9% of the infections in intensive care unit patients and 11% of lower respiratory tract infections (1). In Europe, the incrimination of *Enterobacter* spp. in nosocomial infections is also increasing, accounting for about 8% of all nosocomial infections (2).

These bacteria are also becoming more resistant. Their chromosomally encoded, inducible betalactamase renders them intrinsically resistant to aminopenicillins and early cephalosporins. The greater enzyme stabilities and lower inducer activities of newer cephalosporins and the monobactams, however, made these drugs highly active against *Enterobacter* spp. The organisms responded to these newer agents essentially by further increasing their enzyme levels through chromosomal mutations which led to the constitutive expression of very large amounts of enzymes of chromosomal origin. The organisms spontaneously mutate at a frequency of 10^6 to 10^8 within the susceptible bacterial populations (3). The stably derepressed mutants produce enough betalactamase to resist all currently available lactams except carbapenems. Alterations of outer membrane permeability, by favouring hydrolysis of third-generation cephalosporins and thus diminishing the amount of antibiotic in contact with the enzyme (3) are also associated with bacterial resistance.

Cefepime is a new fourth-generation cephalosporin that exhibits a broader spectrum of antimicrobial activity than the other new members of this drug family. It appears to have low *in vitro* affinity for major chromosomally derived beta-lactamases and good stability against enzymatic hydrolysis (4). Again in comparison with older cephalosporins, cefepime was

shown to cross the outer membrane more quickly (5). Overall, in a given time, more cefepime molecules penetrate into the periplasmic space, avoid betalactamase attack and obtain access to the target molecules for which cefepime does not show better affinity (6). Finally, when cefepime was used to treat infections due to *Enterobacter cloacae* resistance emerged significantly less frequently than with older cephalosporins (7). To date, there are few *in vivo* data confirming the efficacy of cefepime alone or in combination against stably derepressed mutants of *Enterobacter* spp.

The purpose of the present study was to compare the bactericidal activities of human regimens of cefepime and amikacin alone or in combination against an isogenic pair of *E. cloacae* strains (wild type and stably derepressed mutant) using a previously developed model of pneumonia in nonneutropenic rats (8).

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains

An isogenic pair of *E. cloacae* strains (wild type, strain 474S; stably derepressed mutant, strain 474R, resistant to ceftazidime) kindly provided by Dr J. Caillon (Bacteriology Laboratory, Hôpital Nord, Nantes, France) was used for these studies. Each strain was stored at -70°C in Mueller–Hinton broth (BioMérieux, Marcy-l’Etoile, France) supplemented with 10% glycerol; fresh inocula were prepared for each experiment from cultures grown for 24 h in 10 mL of trypticase soy broth (BioMérieux).

Antibiotics

Cefepime and amikacin were purchased from Bristol–Myers Squibb (Paris, France). Antibiotics were kept in powder form and were freshly diluted with saline before each experiment in accordance with the manufacturer’s instructions. Cefepime and amikacin

laboratory standards were used for *in-vitro* studies.

In vitro studies

The MIC of each antibiotic was determined in Mueller-Hinton broth by means of a microtube dilution method using geometric two-fold serial dilutions and inocula of $5 \log_{10}$, $6 \log_{10}$, $7 \log_{10}$ and $8 \log_{10}$ cfu/mL. The mean of four separate determinations performed on different days was used to calculate the MIC of each antibiotic. *In-vitro* time–kill curves for each antibiotic alone and in combination were determined in duplicate using cultures grown in Mueller–Hinton broth at 37°C. Three sets of drug doses were chosen to simulate those obtained in the animal lungs 1, 6 and 24 h after starting therapy. Stationary-phase organisms were obtained from a culture grown for 24 h in 10 mL of trypticase soy broth; the bacterial suspension was diluted 1/10 to obtain a final concentration of $7.8 \log_{10}$ cfu/mL. Aliquots (0.1 mL) were removed 0, 3, 6 and 24 h after adding antibiotic solutions and quantitatively cultured using a Spiral Système plater (Interscience, Saint-Nom-la-Breteche, France) after serial dilutions (up to $1/10^4$) to minimize the effect of antibiotic carryover (9). *In-vitro* antibiotic synergy was defined as a ≥ 100 -fold increase of bacterial killing by the antibiotic combination relative to that achieved by the most active single agent.

Antibiotic assay

The cefepime concentration was determined using a modified version of an HPLC assay described elsewhere (10). The lower detection limit of the assay was 1 mg/L and the inter-day coefficient of variation ranged from 7% at 1 mg/L to 6% at 50 mg/L. The amikacin concentration was determined using an immunoenzyme assay (Emit; Syva, Dardilly, France). The lower detection limit of the assay was 1 mg/L and the coefficients of variation were 8% over the entire range of measurement.

Pneumonia model

We used an animal model previously developed by us and described in detail elsewhere (8). Briefly, animals were rendered renally insufficient by administering 1 mg/kg of uranyl nitrate (Merck, Darmstadt, Germany) subcutaneously, so as to simulate the pharmacokinetics of cefepime and amikacin in humans (both $t_{1/2} = 2$ h), and infected 72 h later by administering a bacterial suspension of $8.4 \log_{10}$ *E. cloacae* cfu intratracheally. Previous studies had shown that, 12 h after bacterial inoculation, all animals had developed bilateral pneumonia with similar bacterial densities ($7.5 \log_{10}$ cfu/g tissue) in both lungs and an intense inflammatory reaction (data not shown).

Treatment regimens

Each strain used to induce pneumonia was studied separately. Of the total 150 animals studied (75 rats in each group), 59 wild type and 55 stably derepressed mutant strain recipients were still alive 12 h after bacterial inoculation; at this time, six from each group were killed to document that pneumonia had been established. The remaining rats were randomly assigned to one control (*i.e.* no antibiotic) group and three treatment groups. Treatment groups received intraperitoneal injections of cefepime alone (50 mg/kg, bd), amikacin alone (18 mg/kg, od) or a combination of both antibiotics given at the same dosages for a total of 24 h. We chose these dosages in order to obtain serum concentrations close to those observed in humans.

Evaluation of antibiotic treatment

Subgroups of four to eight animals from the control group and each treatment group were killed 6 h and 24 h after therapy started. Blood was obtained by aortic puncture and the serum was stored in three aliquots at -20°C for determination of antibiotic and creatinine

concentrations. Serum creatinine levels were determined to document that renal impairment was well established. Right lungs were removed aseptically, weighed and placed in 15 mL of an ice-cold mixture of Mueller–Hinton broth and glycerol (50:50) and homogenized (Ultraturax, Staufen, Germany) to obtain a suspension. The homogenate was quantitatively cultured after serial dilution on Drigalski agar (BioMérieux) using a Spiral Système plater. After overnight incubation at 37°C, viable bacteria were counted and expressed as log₁₀ cfu/g lung (lower limit of bacterial detection was 2.5 log₁₀ cfu/g lung). *In-vivo* antibiotic synergy was defined as a bactericidal effect of the drug combination statistically significantly more pronounced than the sum of the bactericidal effects of each agent alone in comparison with untreated animals (11). Emergence of resistance during therapy was examined by plating the lung homogenates on to agar containing either cefepime (32 mg/L) or amikacin (16 mg/L). After incubation in air for 24 h at 37°C, emergence of resistant strain(s) was defined as growth of at least two colonies of *E. cloacae*. Left lungs were gently blotted with absorbent paper to remove blood and immediately placed in preweighed containers to prevent evaporation of water, the containers were then reweighed and the contents frozen at -20°C for later determination of antibiotic levels. After thawing and homogenization in 1 mL of saline, each sample was centrifuged at approximately 1000g for 10 min at 3°C and the supernatant was then assayed. Antibiotic measurements were not corrected for blood contamination as blood represents 6% of lung weight and neither antibiotic accumulates in red blood cells; therefore, the presence of blood does not lead to substantial errors in the evaluation of tissue cefepime or amikacin concentrations (12).

Data analysis

Results are expressed as medians and their ranges. Antibiotic concentrations and lung bacterial counts in the control and treatment groups were compared using one way non-

parametric analysis of variance (Kruskal–Wallis test); when the value of this test was statistically significant, each treatment group was compared with the control group and each of the other treatment groups using the Mann–Whitney U-test. For all tests, a P value of <0.05 was considered significant.

RESULTS

In-vitro studies

The MICs of cefepime and amikacin at various initial bacterial concentrations are given in Figure 1. As expected, an inoculum effect proportional to the bacterial titre was observed with cefepime against the two strains, but more pronounced with the stably derepressed mutant strain, whereas with bacterial concentrations of up to 7 log₁₀ cfu/mL, no inoculum effect occurred with amikacin. Amikacin bacterial killing was very fast only at peak concentration, whereas cefepime was either bacteriostatic or allowed regrowth of the organisms in the range of concentrations tested (Figure 2). Significantly increased killing by the combination was obtained only with the intermediate concentrations of antibiotics (cefepime 16 mg/L, amikacin 4 mg/L; at peak concentrations (cefepime 64 mg/L, amikacin 16 mg/L), the combination was merely as effective as amikacin alone and at trough concentrations (cefepime 4 mg/L, amikacin 1 mg/L), an insignificant trend towards the superiority of the combination over each antibiotic alone was noted (Figure 2).

Pharmacokinetic analysis

Serum creatinine levels measured 6 h and 24 h after starting therapy were not statistically different between the four study groups, indicating that renal impairment was identical, regardless of the treatment given (data not shown). Lung and plasma concentrations of both antibiotics, 6 h and 24 h after beginning therapy, did not differ significantly when each

antibiotic was administered alone or in combination. Results for each antibiotic used alone or in combination were then pooled to simplify the presentation (Table I).

Efficacy of therapy

The six animals from each study group killed at the start of therapy (0 h) had bilateral pneumonia, with mean *E. cloacae* counts of log₁₀ 7.9 (range 7.5–8.3) and 8.2 (range 7.5–8.4) cfu/g lung for the wild type and the stably derepressed mutant strains, respectively (Table II). All untreated animals showed slight decreases in their numbers of bacteria and 24 h after the theoretical start of therapy. All treatment groups had the same or slightly lower bacterial counts than untreated animals. This decrease was significant only at 6 and 24 h for animals receiving cefepime and amikacin in combination. Significantly decreased bacterial titres were also observed at 24 h for animals receiving combined antibiotic therapy, compared with those receiving each antibiotic alone. *In vivo* synergy between cefepime and amikacin was observed at the two times studied. No clone resistant to cefepime or amikacin was detected in any of the antibiotic-treated animals.

DISCUSSION

We used our experimental model of *E. cloacae* pneumonia developed in non-neutropenic rats (8) to study the *in vivo* efficacy of cefepime alone or in combination with amikacin against an isogenic pair of *E. cloacae* strains (wild type and stably derepressed mutant). Because cefepime and amikacin pharmacodynamics are highly dependent upon residence time, renal impairment was induced in all the animals so as to simulate conditions observed in humans (13). This model has previously been shown to confront the antibiotics with the most difficult conditions (8): initial bacterial concentrations in the lungs are high, and initiation of therapy is delayed after bacterial inoculation, when a predominance of the bacterial population is in

the stationary phase of growth.

Comparing the bactericidal activity of human regimens of cefepime, amikacin and combined antibiotic therapy for a total period of 24 h, we found that, regardless of the strain used, each antibiotic alone failed to decrease lung bacterial counts, while combined therapy significantly reduced the number of viable organisms. Failure of monotherapy has already been reported in other animal models, especially when therapy was delayed, and was also observed in our previous study, despite the use of a wild-type strain of *E. cloacae* (8). A number of hypotheses have been advanced but bacterial persistence during single antibiotic treatment remains to be explained satisfactorily (8). A lack of activity against slowly growing bacteria is unlikely for both antibiotics (8). Emergence of resistant clones during therapy with each antibiotic alone was ruled out in this study and was not observed by others (14,15). An inoculum effect could have occurred with both antibiotics because of the elevated initial bacterial concentrations in the lungs. Indeed, a decrease of susceptibility inversely proportional to bacterial concentrations was observed with cefepime by us (Figure 1) and others, (14-16) and probably represents more hydrolysis by the cumulative activity of beta-lactamase; such an effect occurred with amikacin when the bacterial titre was $7 \log_{10}$ cfu/mL (Figure 1). This phenomenon has previously been reported (17,18). Reduction of the bactericidal activities of both antibiotics due to this inoculum effect at higher bacterial titre could be favoured by the low antibiotic concentration measured in the lungs (Table I); such low cefepime and amikacin concentrations have previously been observed in the lungs of critically ill animals (19). Both the inoculum effect and low antibiotic concentration could explain the weak *in-vivo* reduction of the lung bacterial titre, even when both antibiotics were used in combination, and could be predicted by our time-kill curves (Figure 2). These two phenomena could be important factors in the management of infections involving high bacterial concentrations, suggesting that increasing the antibiotic dose and using antibiotic

combinations could be advantageous when treating such infections.

To date, there are not enough data to propose cefepime as first-line therapy against stably derepressed mutant strains of *E. cloacae*. However, the bactericidal activity of cefepime alone or in combination with amikacin against the wild-type and stably derepressed mutant strains was comparable in our study, despite a lower *in-vitro* susceptibility of the resistant strain to cefepime. These encouraging results are supported by a recent clinical study (20), in which 15 of 17 infections due to *Enterobacter* spp with low susceptibility or resistance to ceftazidime, but susceptible to cefepime, were successfully treated with cefepime; in particular, cefepime was successfully used in the management of chronic infections that had responded poorly to repeated therapy with imipenem, aminoglycosides or ciprofloxacin. Further larger studies are warranted to confirm these preliminary results before the use of cefepime alone or in combination with amikacin be proposed for the treatment of such infections.

ACKNOWLEDGEMENT

The work was supported in part by a grant from Bristol–Myers Squibb, Paris, France.

REFERENCES

1. Schaberg, D. R., Culver, D. H. & Gaynes, R. P. (1991). Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *American Journal of Medicine* **91**, Suppl. 3B, 72S–5S.
2. Vincent, J. L. (1994). Preliminary results of the European Study on Prevalence of Infection in Intensive Care. In *Update in Intensive Care and Emergency Medicine*, (Vincent, J.L., Ed.), pp. 222–7. Springer-Verlag, Berlin.
3. Marchou, B., Bellido, F., Charnas, R., Lucain, C. & Pechère, J. C. (1987). Contribution of beta-lactamase hydrolysis and outer membrane permeability to ceftriaxone resistance in *E. cloacae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **31**, 1589–95.

4. Phelps, D. J., Carlton, D. D., Farrell, C. A. & Kessler, R. E. (1986). Affinity of cephalosporins for beta-lactamases as a factor in antibacterial efficacy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **29**, 845–8.
5. Bellido, F., Pechère, J. C. & Hancock, R. E. W. (1991). Novel method for measurement of outer membrane permeability to new beta-lactams in intact *E. cloacae* cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **35**, 68–72.
6. Bellido, F., Pechère, J. C. & Hancock, R. E. W. (1991). Reevaluation of the factors involved in the efficacy of new beta-lactams against *E. cloacae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **35**, 73–8.
7. Pechère, J. C. & Vladoianu, I. R. (1992). Development of resistance during ceftazidime and cefepime therapy in a murine peritonitis model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **29**, 563–73.
8. Mimoz, O., Jacolot, A., Padoin, C., Caillon, J., Louchahi, K., Tod, M., Samii, K. & Petitjean, O. (1997). Cefepime and amikacin synergy against a céfotaxime-susceptible strain of *Enterobacter cloacae* *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **39**, 363–9.
9. Drugeon, H., Legallou, F. & Caillon, J. (1991). Méthodes d'études de l'activité bactéricide. In *Bactéricidie. Aspects Théoriques et Thérapeutiques* (Courvalin, P., Drugeon, H., Flandrois, J. P. & Goldstein F., Eds), pp. 113–26. Maloine, Paris.
10. Barbhaiya, R. H., Forgue, S. T., Shyu, W. C., Papp, E. A. & Pittman, K. A. (1987). High pressure liquid chromatographic analysis of BMY-28142 in plasma and urine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **31**, 55–9.
11. Fantin, B. & Carbon, C. (1992). *In vivo* antibiotic synergism: contribution of animal models. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **36**, 907–12.
12. Nix, D. E., Goodwin, D., Peloquin, C. A., Rotella, D. L. & Schentag, J. J. (1991).

Antibiotic tissue penetration and its relevance: models of tissue penetration and their meaning. *Anti- microbial Agents and Chemotherapy* **35**, 1947–52.

13 . Craig, W.A., Redington J., & Ebert, S.C. (1991). Pharmacodynamics of amikacin *in vitro* and in mouse thigh and lung infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **27**, Suppl. C, 29–40.

14. Johnson, C. C., Livornese, L., Gold, M. J., Pitsakis, P. G., Taylor, S. & Levison, M. E. (1995). Activity of cefepime against ceftazidime-resistant Gram-negative bacilli using low and high inocula. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **35**, 765–73.

15. Palmer, S. M., Kang, S. L., Cappelletty, D. M. & Rybak, M. J. (1995). Bactericidal killing activities of cefepime, ceftazidime, ceftazidime, and ceftriaxone against *Staphylococcus aureus* and beta-lactamase-producing strains of *Enterobacter aerogenes* and *Klebsiella pneumoniae* in an *in vitro* infection model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **39**, 1764–71.

16. Bodey, G. P., Ho, D. H. & LeBlanc, B. (1985). *In vitro* studies of BMY-28142, a new broad-spectrum cephalosporin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **27**, 265–9.

17. Lortholary, O., Tod, M., Cohen, Y. & Petitjean, O. (1995). Aminoglycosides. *Medical Clinics of North America* **79**, 761–87.

18. Davis, B. D. (1987). Mechanism of the bactericidal action of aminoglycosides. *Microbiological Reviews* **51**, 341–50.

19. Mimoz, O., Jacolot, A., Padoin, C., Quillard, J., Louchahi, K., Tod, M. *et al.* (1996). Influence of experimental rat model of multiple organ dysfunction on cefepime and amikacin pharmacokinetics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **40**, 819–21.

20. Sanders, W. E., Tenney, J. H. & Kessler, R. E. (1996). Efficacy of cefepime in the treatment of infections due to multiply resistant *Enterobacter* species. *Clinical Infectious Diseases* **23**, 454–61.

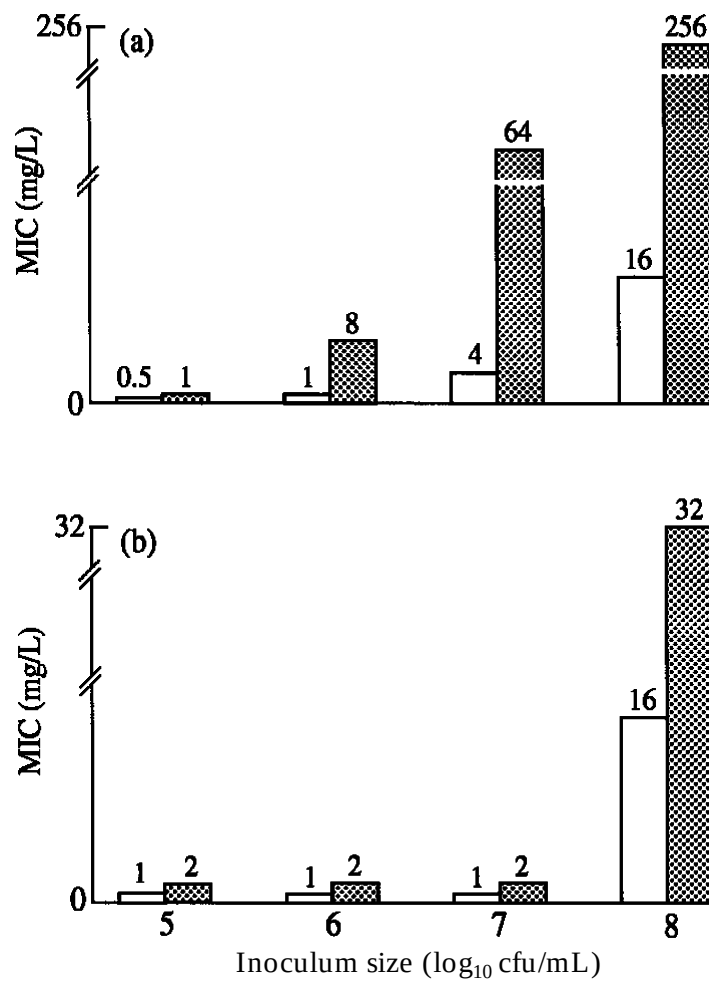


Figure 1. MICs of cefepime (a) and amikacin (b) against an isogenic pair of *E. cloacae* (□, wild type; ▨ stably derepressed mutant) using various initial bacterial concentrations. Breakpoints for determination of resistance are as follows: cefepime > 32 mg/L, amikacin > 16 mg/L.

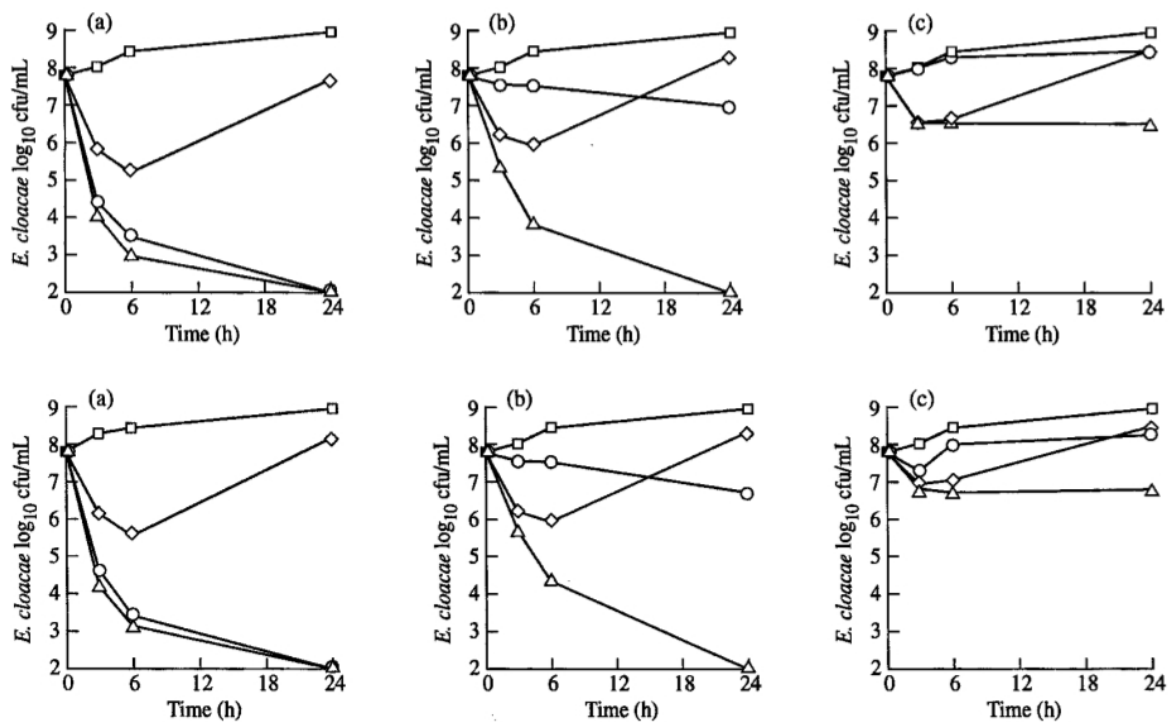


Figure 2. Time–kill curves for the isogenic pair of *E. cloacae* (top, wild type; bottom, stably derepressed mutant) with test antibiotics at three set drug concentrations. A total of $7.8 \log_{10}$ cfu/mL were incubated for 24 h with no antibiotic ($\square$), cefepime alone ($\square$), amikacin alone ($\square$), and combined antibiotic therapy (Δ) given at the following concentrations: (a) cefepime 64 mg/L and amikacin 16 mg/L; (b) cefepime 16 mg/L and amikacin 4 mg/L; (c) cefepime 4 mg/L and amikacin 1 mg/L.

Table I. Drug concentrations in plasma (mg/L) and lung tissue (mg/kg) at various times after intraperitoneal administration of cefepime (50 mg/kg, bd) and/or amikacin (18 mg/kg, od) to infected rats with impaired renal function

Time (h) after starting therapy	Cefepime						Amikacin					
	plasma			lung tissue			plasma			lung tissue		
	n	median	range	n	median	range	n	median	range	n	median	range
6	20	16	6–50	20	6	<1–15	21	7	2–36	21	1	<1–3
24	26	2	<1–10	26	3	<1–6	24	<1	<1–2	24	<1	<1

Table II. Bacterial counts observed in untreated animals and in those receiving either cefepime alone (50 mg/kg, bd), amikacin alone (18 mg/kg, od) or both antibiotics

Treatment regimen	Lung titre ($\log_{10}$ <i>E.coliace</i> cfu/g tissue) at the indicated time after starting therapy																	
	Ceftazidime-susceptible strain									Ceftazidime-resistant strain								
	0h			6h			24h			0h			6h			24h		
	n	median	range	n	median	range	n	median	range	n	median	range	n	median	range	n	median	range
None	6	7.9	7.5-8.3	5	7.7	7.7-8.1	6	7.1	6.7-7.4	6	8.2	7.5-8.4	5	8.2	7.1-8.4	6	7.6	7.1-8.3
Cefepime	6	7.9	7.5-8.3	6	7.6	7.3-8.1	6	7.1	6.9-7.3	6	8.2	7.5-8.4	4	8.2	8.0-8.3	5	7.6	7.0-7.7
Amikacin	6	7.9	7.5-8.3	5	7.5	7.2-7.8	6	6.9	6.5-7.2	6	8.2	7.5-8.4	5	7.7	7.3-8.0	5	7.5	7.4-7.6
Combination	6	7.9	7.5-8.3	6	7.4	7.0-7.8 ^a	6	6.5	6.0-6.8 ^b	6	8.2	7.5-8.4	5	7.5	7.1-7.9 ^a	8	6.8	6.5-7.2 ^b

^a Significantly lower bacterial titres than untreated animals

^b Significantly lower bacterial titres than untreated animals or animals treated with each antibiotic alone

ETUDE n°2

Efficacies of cefepime, ceftazidime, and imipenem alone or in combination with amikacin in rats with experimental pneumonia due to ceftazidime-susceptible or-resistant *Enterobacter cloacae* strains

Olivier Mimoz,^{1*} Anne Jacolot,² Sophie Leotard,³ Nadia Hidri,³ Kamran Samii,¹ Patrice Nordmann,³ and Olivier Petitjean²

¹ Service d'Anesthésie - Réanimation, Hôpital Paul Brousse, Assistance Publique- Hôpitaux de Paris, 94804 Villejuif Cedex,

² Crepit 93, Centre de Recherche en Pathologie Infectieuse et Tropicale, Hôpital Avicenne, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, 93009 Bobigny Cedex, and

³ Service de Bactériologie - Virologie, Hôpital de Bicêtre, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, 94275 Le Kremlin-Bicêtre Cedex, France

*Corresponding author

Key-words: *Enterobacter cloacae*, stably-derepressed cephalosporinase, pneumonia, animal models, cefepime, ceftazidime, imipenem-cilastatin, amikacin.

ABSTRACT

The antibacterial activities of human regimens of cefepime, ceftazidime, and imipenem alone or in combination with amikacin against an isogenic pair of *Enterobacter cloacae* strains (wild type and its corresponding derepressed cephalosporinase mutant) were compared by using our nonlethal model of pneumonia with 180 immunocompetent rats. Compared with untreated animals, all beta-lactam-treated rats, except those inoculated with the mutant isolate and receiving ceftazidime, had significantly lower bacterial counts in their lungs 60 h after the onset of therapy. Although the combination of a beta-lactam and amikacin was more bactericidal than each corresponding antimicrobial agent alone, true synergy was noted only with cefepime and imipenem against the constitutive derepressed strain.

Stably derepressed mutant strains of *Enterobacter* spp. resist most available beta-lactams, including ceftazidime, except for the carbapenems (15). Cefepime, a newly extended-spectrum cephalosporin, retains *in vitro* efficacy against these mutants, but few *in vivo* data have confirmed these results. Comparing the bactericidal activities of cefepime and amikacin against an isogenic pair of *Enterobacter cloacae* strains (wild type and its ceftazidime-resistant mutant) in induced experimental pneumonia with rats, we previously reported that each antibiotic alone failed to decrease bacterial counts in the lungs, while combined therapy significantly reduced the number of viable microorganisms (12). The short duration of therapy in these experiments (24 h) as well as the absence of groups treated with a carbapenem or an expanded-spectrum cephalosporin does not permit the definitive proposal of cefepime as the first choice for therapy against stably derepressed cephalosporinase-producing enterobacterial strains. Therefore, the purpose of the present study was to compare the bactericidal activities of 60-h human regimens of cefepime, ceftazidime, and imipenem-cilastatin alone or in combination with amikacin with the same animal model.

Tested organisms. An isogenic pair of *E. cloacae* strains (wild type [474S] and its ceftazidime-resistant mutant [474R]) identical to those inoculated into rats in our previous experiments (12) was used for these studies. Each strain was stored at -70°C in Mueller-Hinton broth (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, France) supplemented with 10% glycerol. Fresh inocula were prepared for each experiment from cultures grown for 24 h in 10 ml of Trypticase soy broth (bioMerieux) and then rinsed twice and suspended in normal saline prior to use.

Antimicrobial agents. Cefepime and amikacin were from Bristol-Myers Squibb (Paris, France), ceftazidime was from Glaxo Wellcome (Evreux, France), and imipenem-cilastatin was from Merck Sharp and Dohme-Chibret (Paris, France). Antibiotic powders were freshly

diluted with saline before each experiment according to the manufacturer's instructions.

Beta-lactamase assay. Beta-lactamase activity was assayed by UV spectrometry as previously reported (17), with cephalothin as the substrate, and expressed as units of specific activity. One unit of specific activity was defined as the amount of enzyme that hydrolyzed 1 nmol of cephalothin per min/mg of protein.

***In vitro* studies.** MICs were determined by an agar dilution technique with Mueller-Hinton agar (bioMerieux) and an inoculum of 4 log₁₀ CFU per spot.

Pharmacokinetics. Preliminary drug-dosing studies were run in uninfected rats as described elsewhere (11) to determine if the subcutaneous dose of 1 mg of uranyl nitrate (Merck, Darmstadt, Germany) per kg of body weight that was previously recommended (11, 12) was optimal to impair their renal function so as to simulate the pharmacokinetics of cefepime, ceftazidime, imipenem, and amikacin in healthy humans. Briefly, 4 days after the uranyl nitrate injection, each rat received a single 1-ml intraperitoneal injection of each antimicrobial agent studied. Multiple blood samples were collected via a femoral catheter during the 8 h following antibiotic administration and immediately centrifuged to separate the plasma. Plasma samples were stored at -70°C and assayed within 7 days. Individual antibiotic pharmacokinetic parameters were determined with the Siphar software package (Simed, Creteil, France).

Antibiotic assay. Imipenem, ceftazidime, and cefepime concentrations in plasma were determined by using modified versions of high-pressure liquid chromatography assays described elsewhere (1, 6, 7). The amikacin concentration was determined by an

immunoenzyme assay (Emit; Syva, Dardilly, France). The lower detection limits of the assays were 0.5, 5, 1, and 1 µg/ml for imipenem, ceftazidime, cefepime, and amikacin, respectively.

Pneumonia model. The animal model used was previously developed in our laboratory (11, 12). Briefly, male Wistar rats weighting 280 to 300 g were rendered renally insufficient by the subcutaneous administration of 1 mg of uranyl nitrate per kg and intraperitoneally anesthetized 93 h later with phenobarbital (60 mg/kg). Each rat trachea was exposed by a vertical midline incision. A 0.5-ml portion of a bacterial suspension containing $8.9 \pm 0.1 \log_{10}$ CFU (mean $\pm$ standard deviation) of *E. cloacae* was injected intratracheally. Following inoculation, animals were gently shaken for 15 s to help distribute the inoculum in the lungs. Previous studies had shown that, 3 h after bacterial inoculation, all animals had developed bilateral pneumonia with bacterial densities ($> 7.5 \log_{10}$ CFU/g of tissue) in both lungs and an intense inflammatory reaction.

Treatment regimens. Each strain used to induce pneumonia was studied separately. Among the 180 animals utilized in this study, 64 of the 80 wild-type and 90 of the 100 ceftazidime-resistant mutant strain recipients were still alive 3 h after bacterial inoculation; at this time, 8 rats from each study group were killed to document the existence of pneumonia. The remaining rats were randomly assigned to one control group (*i.e.* no antibiotic) and seven treatment groups. Treatment groups received intraperitoneal injections of either imipenem-cilastatin (30 mg/kg/8 h), ceftazidime (60 mg/kg/8 h), cefepime (60 mg/kg/12 h), or amikacin (25 mg/kg, once a day) or a combination of each beta-lactam with amikacin given at the same dosages. These dosages were retained so that plasma concentrations could be obtained close to those observed in adult humans receiving 1 g of imipenem three times a day, 2 g of

ceftazidime three times a day, 2 g of cefepime twice a day, or 25 mg of amikacin per kg once a day. Therapy was started 3 h after bacterial inoculation and continued for 2.5 days.

Evaluation of antibiotic treatment. Animals were sacrificed 60 h after the onset of therapy. Blood was obtained by aortic puncture, put in a tube containing EDTA, and centrifuged. The plasma was stored in two or three aliquots at -70°C for determination of antibiotic concentrations and creatinine levels within 7 days after sampling. The plasma containing imipenem was immediately mixed after sampling 1:1 with a stabilizing buffer containing equal volumes of 1 M morpholino-ethane sulfonate and ethylene glycol before freezing. Creatinine levels in plasma were determined to document the fact that renal impairment was well established. The lungs were aseptically removed, gently blotted with sterile absorbent paper to remove blood, weighed, placed in 25 ml of ice-cold saline, and homogenized (Ultraturax, Staufen, Germany). The homogenate was quantitatively cultured after serial dilution on Drigalski agar (bioMérieux) with a Spiral Systeme plater (Interscience, Saint-Nom-La-Breteche, France). After overnight incubation at 37°C, viable bacteria were counted and expressed as log₁₀ CFU/g of lung. When no bacterial growth was noted, the value of the detection limit for the specific animal was entered into the statistical analysis.

Determination of emergence of antibiotic resistance during therapy. Emergence of resistance during beta-lactam therapy was examined at the end of each experiment by plating 2 × 200 µl of the lung homogenates onto agar containing imipenem (1 µg/ml), cefepime (1 µg/ml), or ceftazidime (8 µg/ml) for the wild-type strain group and imipenem (2 µg/ml) or cefepime (4 µg/ml) for the ceftazidime-resistant mutant strain group. After incubation in air for 48 h at 37°C, emergence of a resistant strain(s) was defined as growth of at least one colony of *E. cloacae*.

Statistical analysis. Results are expressed as medians and their ranges. Bacterial counts in the lungs of the control and treatment groups were compared by one-way nonparametric analysis of variance (Kruskal-Wallis test); when the value of this test was statistically significant, each treatment group was compared to the control group and to each of the other treatment groups by using the Mann-Whitney U test without modifications. For all tests, a *P* value of < 0.05 was considered significant.

The susceptibilities of both organisms to the antimicrobial agents studied are presented in Table 1. The isolates remained susceptible to the four antibiotics tested, except for the stably derepressed cephalosporinase-producing mutant, which was highly resistant to ceftazidime. The cephalosporinase level in the mutant strain was 16,900 U of specific activity, *i.e.*, 110-fold higher than the level determined in the wild-type strain. Such results clearly indicated that overproduction of cephalosporinase was the molecular mechanism explaining resistance to ceftazidime.

The pharmacokinetic parameters of the antibiotics tested in renally insufficient rats simulated those reported in healthy humans given high doses of the same antibiotics (Table 2). Creatinine levels in plasma measured at sacrifice were not statistically different between the study groups, indicating that renal impairment was identical regardless of the treatment received (Table 3). Antibiotic concentrations in plasma observed 60 h after the beginning of therapy did not differ significantly when the antibiotics were administered to animals infected with the two strains. Results for each antibiotic for each strain were then pooled to simplify presentation, and the data are shown in Table 3. Antibiotic levels measured in the plasma of rats were broadly similar to those usually reported in adult humans given high doses of the same antibiotics.

The eight animals from each study group killed at the beginning of therapy presented with

bilateral pneumonia, with median *E. cloacae* counts of log₁₀ 8.3 (range, 7.8 to 8.5) and log₁₀ 8.1 (range, 8.0 to 8.5) CFU/g of lung for the wild-type strain and its ceftazidime-resistant mutant, respectively. Nine animals died during the antibiotic treatment period (seven rats inoculated with the wild-type strain and two with the mutant strain). At sacrifice, all untreated animals showed a spontaneous decrease in the number of bacteria 60 h after therapy was begun in the treated animals (Fig. 1). Compared with untreated animals, all beta-lactam-treated rats, except those inoculated with the mutant isolate and receiving ceftazidime, had significantly ($P \leq 0.02$) lower bacterial counts in their lungs 60 h after the onset of therapy. Significantly decreased bacterial titers were also observed in the lungs of animals inoculated with the mutant strain and receiving antibiotic therapy combined with amikacin and imipenem or cefepime compared to those in the lungs of animals receiving each corresponding antimicrobial agent alone (Fig. 1). No *E. cloacae* isolate resistant to either of the beta-lactam agents tested was detected in any of the antibiotic-treated animals.

Imipenem has been reported to be stable in the presence of chromosomally mediated cephalosporinase and is considered the therapy of choice for infections due to enterobacterial strains which constitutively overproduce beta-lactamase (5, 10, 14, 15). Although they were initially regarded as stable, most broad-spectrum cephalosporins such as ceftazidime are hydrolyzed to some extent by high levels of enzyme, rendering them useless against derepressed strains (5, 8, 9). Cefepime retains *in vitro* activity toward these strains, possibly because of a combination of factors, including faster penetration of the outer membrane of gram-negative bacteria, poor affinity for most beta-lactamases, and increased resistance to hydrolysis (2, 8, 9, 16). Using an *in vitro* infection model to compare the bactericidal activities of human regimens of various beta-lactams against a ceftazidime-resistant *Enterobacter* strain, Palmer and colleagues reported a reduction in bacterial titer over the first 6 h that was similar for all regimens, but significant regrowth occurred with ceftazidime,

céfotaxime, and ceftriaxone, whereas no regrowth was observed with cefepime during the 48 h of therapy (13). In this study, performed in immunocompetent animals, the antimicrobial activities of human regimens of cefepime and imipenem were broadly similar against the wild-type *E. cloacae* strain as well as its corresponding stably derepressed mutant, and their bactericidal effects were reduced against the latter. These encouraging results were recently supported by a clinical study in which 15 of 17 infections due to *Enterobacter* spp. with low susceptibility or resistance to ceftazidime but with susceptibility to cefepime were successfully treated with cefepime. In particular, cefepime was successfully used to manage chronic infections that had responded poorly to repeated therapy with imipenem, aminoglycosides, or ciprofloxacin (19). However, more clinical experience is required before cefepime can be systematically used in this setting.

Antibiotic combinations including a beta-lactam and an aminoglycoside have frequently produced an increased bactericidal effect *in vivo* in experimental models of aerobic gram-negative bacillary infections that has generally paralleled an increased rate of killing observed *in vitro* (3). It has been suggested that such combinations are necessary in order to prevent the emergence of resistance during therapy; however, recent clinical experience with older cephalosporins, such as cefotaxime, indicates that the addition of an aminoglycoside does not always prevent resistance (4). Selection of resistance was not observed with any antimicrobial regimen in our model. It is possible that our inoculum was too low to detect resistant subpopulations, as these mutants are reported to occur in 1 of 10^5 to 10^8 wild-type strains possessing inducible cephalosporinase (18). In addition, the duration of our experiments (60 h) may not have been sufficient for the selection of such resistant clones.

This work was supported in part by a grant-in-aid from Bristol- Myers Squibb, Paris, France.

REFERENCES

1. Barbhaiya, R. H., S. T. Forgue, W. C. Shyu, E. A. Papp, and K. A. Pittman. 1987. High pressure liquid chromatographic analysis of BMY 28142 in plasma and urine. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31:55–59.
2. Bellido, F., J. C. Pechere, and R. E. W. Hancock. 1991. Reevaluation of the factors involved in the efficacy of new beta-lactams against *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:73–78.
3. Calandra, T., and M.P.Glauser.1986.Immunocompromised animal models for the study of antibiotic combinations. *Am. J. Med.* 80(Suppl. 5C):45– 52.
4. Chow, J. W., M. J. Fine, D. M. Shlaes, J. P. Quinn, D. C. Hooper, M. P. Johnson, R. Ramphal, M. M. Wagener, D. K. Miyashiro, and V. L. Yu. 1991. *Enterobacter* bacteremia: clinical features and emergence of antibiotic resistance during therapy. *Ann. Intern. Med.* 115:585–590.
5. de Champs, C., D. Guelon, D. Joyon, D. Sirot, M. Chanal, and J. Sirot. 1991. Treatment of a meningitis due to an *Enterobacter aerogenes* producing a derepressed cephalosporinase and a *Klebsiella pneumoniae* producing an extended-spectrum beta-lactamase. *Infection* 19:181–183.
6. Gravallese, D. A., D. G. Musson, L. T. Pauliukonis, and W. F. Bayne. 1984. Determination of imipenem (N-formimidoyl thienamycin) in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography: comparison with microbiological methodology and stability. *J. Chromatogr.* 310:71–84.
7. Jehl, F., C. Gaillon, and H. Monteil. 1990. High-performance liquid chromatography of antibiotics. *J. Chromatogr.* 531:509–548.

8. Jones, R. N., and P. C. Flushs. Activity of cefepime (BMY-28142) and cefpirome (HR 810) against gram-negative bacilli resistant to céfotaxime or ceftazidime. *J. Antimicrob. Chemother.* 23:163–165.
9. Knapp, C. C., and J. A. Washington. 1989. Activity of cefepime, ceftazidime, and ceftizoxime against mutants of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* derepressed for Class I beta-lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.* 24: 1011–1012.
10. Martinez-Beltran, J., C. Calderon, M. P. Sierra, M. Alvarez, and R. Canton. 1997. *In vitro* activity of carbapenems against *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* hyperproducers of group 1 chromosomal beta-lactamases. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 15(Suppl. 1): 20–26.
11. Mimoz, O., A. Jacolot, C. Padoin, J. Caillon, K. Louchahi, M. Tod, K. Samii, and O. Petitjean. 1997. Cefepime and amikacin synergy against a cefotaxime- susceptible strain of *Enterobacter cloacae* *in vitro* and *in vivo*. *J. Antimicrob. Chemother.* 39:363–369.
12. Mimoz, O., A. Jacolot, C. Padoin, M. Tod, K. Samii, and O. Petitjean. 1998. Cefepime and amikacin synergy *in vitro* and *in vivo* against a ceftazidime-resistant strain of *Enterobacter cloacae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 41:367– 372.
13. Palmer, S. M., S. L. Kang, D. M. Cappelletty, and M. J. Rybak. 1995. Bactericidal killing of cefepime, ceftazidime, cefotaxime and ceftriaxone against *Staphylococcus aureus* and beta-lactamase-producing strains of *Enterobacter aerogenes* and *Klebsiella pneumoniae* in an *in vitro* infection model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1764–1771.
14. Pechere, J. C. 1991. Why are carbapenems active against *Enterobacter cloacae* resistant to third generation cephalosporins? *Scand. J. Infect. Dis.* 78 (Suppl.):17–21.

15. Pfaller, M. A., R. N. Jones, S. A. Marshall, S. L. Coffman, R. J. Hollis, M. B. Edmond, and R. P. Wenzel. 1997. Inducible Amp C beta-lactamase producing Gram-negative bacilli from blood-stream infections: frequency, antimicrobial susceptibility, and molecular epidemiology in a national surveillance program (SCOPE). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 28:211–219.
16. Phelps, D. J., D. D. Carlton, C. A. Farrell, and R. E. Kessler. 1986. Affinity of cephalosporins for beta-lactamases as a factor in antibacterial efficacy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29:845–848.
17. Philippon, L. N., T. Naas, A. T. Bouthors, V. Barakett, and P. Nordmann. 1997. Oxa-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:2188–2195.
18. Sanders, C. C., and W. E. Sanders, Jr. 1986. Type I beta-lactamases of Gram-negative bacteria: interactions with beta-lactam antibiotics. *J. Infect. Dis.* 154:792–806.
19. Sanders, W. E., J. H. Tenney, and R. E. Kessler. 1996. Efficacy of cefepime in the treatment of infections due to multiply resistant *Enterobacter* species. *Clin. Infect. Dis.* 23:454–461.

TABLE 1. *In vitro* susceptibility of the isogenic pair of *E. cloacae* strains (wild type and stably-derepressed cephalosporinase- producing mutant) to the antibiotics studied

Antimicrobial agent	MIC (µg/ml) of antibiotic for indicated strain	
	Wild type	Mutant
Amikacin	2	2
Ceftazidime	1	128
Cefepime	0.125	1
Imipenem	0.25	0.50

TABLE 2. Pharmacokinetics for antibiotics given intraperitoneally to noninfected rats with uranyl nitrate-induced renal impairment

Antimicrobial agent	No. of animals	Dose (mg/kg)	Median (range) antibiotic level		Half-life (h)	Area under curve ($\mu\text{g} \times \text{h/ml}$)
			in plasma ($\mu\text{g/ml}$)			
			Peak	Through		
			(30 min after dosing)	(8 h after dosing)		
Amikacin	6	25	80 (60-115)	15 (10-30)	2.2 (1.9–2.6)	288 (224–408)
Ceftazidime	4	60	197 (139-214)	15 (5-24)	1.9 (1.4–2.9)	346 (266–382)
Cefepime	6	60	160 (125-220)	12 (6-28)	2.0 (1.4–2.8)	422 (188–615)
Imipenem	5	30	83 (66-104)	<0.5 (<0.5-1)	1.0 (0.7–1.3)	112 (95–145)

TABLE 3. Creatinine and antibiotic levels in plasma observed at sacrifice

Antimicrobial agent	No. of animals	Creatinine level in plasma (μmol/liter)	Median (range) antibiotic level plasma concn (μg/ml)	
			β-Lactam ^a	Amikacin ^b
None	18	217 (83–469)	—	—
Amikacin	14	169 (72–353)	—	1 (<1–10)
Ceftazidime	11	157 (80–346)	26 (<5–57)	—
Ceftazidime + amikacin	12	215 (89–425)	31 (13–57)	1 (<1–13)
Cefepime	18	162 (72–288)	24 (12–48)	—
Cefepime + amikacin	19	234 (42–559)	27 (10–39)	4 (<1–24)
Imipenem	18	194 (60–446)	1 (<1–15)	—
Imipenem + amikacin	19	219 (102–436)	1 (<1–12)	3 (<1–17)

^a Time from the last beta-lactam administration to sacrifice was 4 to 6 h.

^b Time from the last amikacin administration to sacrifice was 13 to 14 h.

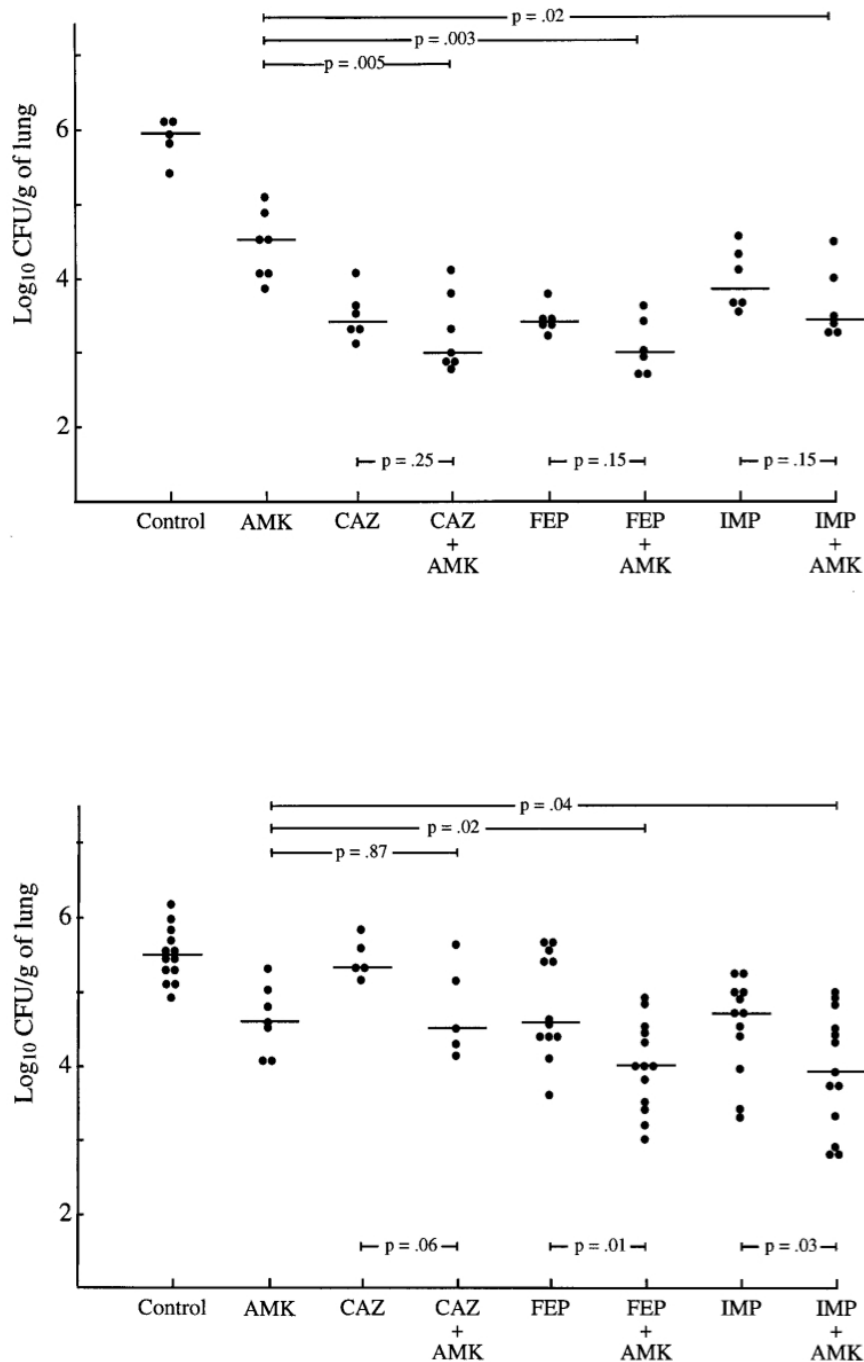


FIG. 1. Lung CFU/gram of the isogenic pair of *E. cloacae* (top panel, wild type; bottom panel, stably-derepressed cephalosporinase-producing mutant) in rats treated with either amikacin (AMK), ceftazidime (CAZ), cefepime (FEP), or imipenem (IMP) or with each beta-lactam in combination with amikacin. Each mark represents a single animal. The horizontal bar indicates the median for each group.

ETUDE n°3

How to solve the problem of spontaneous bacterial clearance when testing new antibiotic treatment: results on experimental pneumonia due to a derepressed cephalosporinase-producing *Enterobacter cloacae*

Anne Jacolot ^{a,b*}, Claire Judel ^a, Kamel Louchahi ^a, Michel Tod ^c, Sandrine Marchand ^{b, d}, Olivier Petitjean ^a, Olivier Mimoz ^{b, e}

^a CREPIT, CHU Avicenne, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (APHP), Bobigny, France

^b INSERM ERI-23, Université de Poitiers, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Poitiers, France

^c Pharmacie, Hôpital de la Croix-Rousse, Lyon, France

^d Laboratoire de Toxicologie et de Pharmacocinétique, CHU de Poitiers, Poitiers, France

^e Réanimation Chirurgicale, CHU de Poitiers, Poitiers, France

*Corresponding author.

Keywords : Experimental pneumonia, spontaneous bacterial clearance, immunosuppression, cyclophosphamide

ABSTRACT

Because the magnitude of spontaneous bacterial clearance can be similar or even higher than treatment effect, depending upon experimental model and bacterial strain used, this work investigated the value of rendering rats immunosuppressed in order to facilitate bacterial implantation and reduce spontaneous bacterial clearance. In a first step, rats received a single intravenous cyclophosphamide dose 4 days before infection. Three different doses were tested: 10, 20 and 40 mg/kg. After modelling with NONMEM V, the cyclophosphamide dose required to maintain white blood cell count $< 1.0 \times 10^3/\mu\text{L}$ from day 4 to day 5 was 30 mg/kg. In a second step, influence of immunosuppression on lung bacterial titers was characterized. Rats were given one of three intravenous cyclophosphamide dose (0, 10, 30 mg/kg) and after 4 days, they were infected by tracheal injection of $8.9 \pm 0.1 \log_{10}$ cfu *E. cloacae* before being sacrificed at different times. Bacteria in homogenized lungs were quantitatively cultured on Drigalski agar. Bacterial lung count was closely influenced by the grade of induced leukopaenia. A single intravenous 30 mg/kg cyclophosphamide dose 4 days before infection suppressed the spontaneous clearance of *E. cloacae* for at least 30 h without significantly increasing animal mortality; this result seems to be linked to a white blood cell count maintained lower than $1.0 \times 10^3/\mu\text{L}$ for all the time. This modified animal model could be contributive in the evaluation of antibacterial agents, especially to simulate the behavior of ICU immunocompromised patients.

INTRODUCTION

Although animal models have long been used to evaluate efficacy of antimicrobial agents, there are few guidelines for the conduct of these studies [1]. Before using such models, all the factors responsible for drug effect must be under control, except the one under evaluation.

A few years ago, an original model of pneumonia due to an *Enterobacter cloacae* [2-3] was developed with high bacterial inoculum in stationary phase and immunocompetent status of animals to simulate conditions observed in intensive care unit (ICU) patients. *In vivo* synergism of antibiotic therapy could be established in spite of a significant spontaneous bacterial clearance introducing an undesirable lack of confidence in the reliability of the results.

To reduce spontaneous bacterial clearance, animals are commonly rendered neutropenic with different immunosuppressive drugs [4-5] most often cyclophosphamide. Although high doses of cyclophosphamide (350-450 mg/kg) have already been well described in mice [6-9], lower doses as those used in the historic neutropenic mouse thigh and lung infection models developed by Gerber and Craig [5, 10-14] are preferred nowadays (200-300 mg/kg). In all these models, intraperitoneal route was used and doses were always very high mimicking aplasia situation, and finally the dose and regimen choices were not often explained.

The purpose of this study was to investigate the best cyclophosphamide schedule in the experimental pneumonia model necessary to induce an appropriate immunosuppression level to minimize spontaneous clearance and simulate the behavior of ICU immunocompromised patients.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male Wistar rats weighing 280 to 300 g were obtained from Charles River Laboratories (Saint Germain sur l'Arbresle, France). All animals were acclimatized in wire individual cages in a 12-h light-dark cycle for a minimum of 5 days before the beginning of the experiment to allow them to adjust to the new environment. During that period, they had free access to food and water. This work was done in accordance with Principles of laboratory animal care [15].

Bacterial strain

A stably-derepressed cephalosporinase-producing strain of *E. cloacae* identical to the one inoculated into rats in our previous experiments [2-3] was used for this study. The strain was stored at -70 °C in Mueller Hinton broth (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) supplemented with 10 % glycerol. Fresh inocula were prepared for each experiment from cultures grown for 24 h in 10 mL of Trypticase soy broth (bioMérieux) and then rinsed twice and suspended in normal saline prior to use.

Experimental model

Leukopenia was induced 96 h before induction of pneumonia in anesthetized animals (60 mg/kg of sodium thiopental intraperitoneally) by infusing a single cyclophosphamide dose (Asta-Medica, Mérignac, France) through the penile vein. For a matter of reproducibility, intravenous route was preferred because intraperitoneally injection has a failure rate of 10-20 % [16]. Immunocompetent animals received saline alone.

Rats were rendered renally insufficient to simulate cefepime and amikacin elimination in humans (both $t_{1/2\beta} = 2$ h) [2-3]. A unique intraperitoneally dose of 1 mg of uranyl nitrate (Merck, Darmstadt, Germany) per kg of body weight was given in rats 24 h after cyclophosphamide administration to allow total elimination of immunosuppressive drug.

As described in detail elsewhere [2-3], pneumonia was induced in anesthetized animals (60 mg/kg of thiopental intraperitoneally), by injecting intratracheally, with a 25-gauge syringe, a 0.5-mL portion of a bacterial suspension containing $8.9 \pm 0.1 \log_{10}$ cfu (mean $\pm$ standard deviation) of *E. cloacae*. Following inoculation, animals were gently shaken for 15 s to equally distribute bacterial inoculum into the lungs. Previous studies had shown that, 6 h after bacterial inoculation, all animals had developed bilateral pneumonia with bacterial densities $> 7 \log_{10}$ cfu/g of tissue in both lungs associated with an intense inflammatory reaction.

Dose-effect relationship of cyclophosphamide

A dose-effect study was realized to determine the lowest dose of cyclophosphamide able to induce a leukopenic effect with minimal mortality. Three cyclophosphamide doses (10, 20, 40 mg/kg) were tested in infected rats ($n=10$ per group). Multiple blood samples (1-3 per rat) were collected via penile vein on anesthetized animals (60 mg/kg of sodium thiopental intraperitoneally), at predose, 96, 120, 144 and 168 min after cyclophosphamide injection. Each sample was put in a tube containing EDTA, before being analyzed within 24 h. White blood cells counts were realized by Advia 1200 system (Siemens Healthcare Diagnostics, Saint Denis, France), whose quantification limit is 30 cells per μL .

White blood cell count modelisation was performed using a nonlinear mixed-effects modelling software (NONMEM V 2.0; Globomax LLC, Ellicott City, MD). An empirical model was used to link leukopenia kinetics to cyclophosphamide dose. Cyclophosphamide

was supposed to have a delayed activity, *that is*, to have a lag time before onset of leukopenia. This model results in a symmetrical bell shaped curve. The parameters were assumed to arise from a lognormal distribution whose median and variance were to be estimated by a population approach. The likelihood ratio test was used to compare reduced to full model.

Influence of leukopenia on lung bacterial titers.

One hundred and twenty rats were randomly assigned to three groups (0, 10 or 30 mg/kg of cyclophosphamide) and after 96 h animals were infected according to the present experiment. Eight animals of each dose group were sacrificed at 6, 12, 18, 30 and 54 h after bacterial inoculation ($n = 8$ per time) using overdoses of thiopental. Blood was obtained by aortic puncture and put in an EDTA-containing tube for white blood cell counts. The lungs were aseptically removed, gently blotted with sterile absorbent paper to remove blood, weighted, placed in 25 mL of ice-cold saline and homogenised (Ultraturax, Staufen, Germany). The homogenate was quantitatively cultured after serial dilution on Drigalsky agar (BioMérieux) with a Spiral System Plater (Interscience, Saint-Nom-La-Bretèche, France). After an overnight incubation at 37 °C, viable bacteria were counted and expressed as $\log_{10}$ cfu/g of lung. When no bacterial growth was noted, the value of the half of detection limit for the specific animal was entered into the statistical analysis (*i.e.* 3 $\log_{10}$ cfu/mL).

Statistical analysis

Results are expressed as medians and range. White blood cell counts and lung bacterial titers in the immunocompetent and leukopaenic groups were compared over time using one way non-parametric analysis of variance (Kruskal-Wallis test); when the value of this test was significant, each group was compared with the control group and with the other

treatment group using the Mann-Whitney *U*-test (JMP, version 5.01.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). A *P* value below 0.05 was considered to be significant.

RESULTS

Dose effect relationship of cyclophosphamide

Using NONMEM modelisation, the best likelihood ratio was obtained and a good correlation between the individual predictions *versus* observations white blood cells counts was found (data not shown). A simulation (based on median parameters) of white blood cell counts *versus* time for a cyclophosphamide dose of 10, 20 or 40 mg/kg is presented in *Figure 1*.

The nadir appeared between day 4 and day 5 and seemed to be stable during that time. This period corresponds exactly to the therapeutic evaluation period.

Mortality was higher in the 40 mg/kg cyclophosphamide group comparatively to the two other groups: 43% *versus* 8% and 0% for the 10 and 20 mg/kg cyclophosphamide groups, respectively. This modeling approach showed that the 30 mg/kg dose could induce a white blood cell count $< 1.0 \times 10^3/\mu\text{L}$ for at least 24 h like the 40 mg/kg dose (*Figure 1*). This dose was chosen in order to suppress spontaneous bacterial clearance while being better tolerated than the higher dose.

Influence of leukopaenia on lung bacterial titers

Rats receiving the highest cyclophosphamide dose (30 mg/kg) had higher bacterial counts at 6 h, 12 h and 30 h after inoculation compared to the two other study groups

(Figure 2). Immunocompetent animals and animals receiving the lowest cyclophosphamide dose (10 mg/kg) had similar bacterial counts at all study points.

At 30 h post-bacterial inoculation, only the 30 mg/kg cyclophosphamide group showed a stable lung bacterial titer ($8.8 \log_{10}$ cfu/g lung), result which is associated with a leukopaenia of less than 1.0×10^3 white blood cells / μ L. At that time, the lung titers were respectively 5.77 and $6.27 \log_{10}$ cfu/g lung for the immunocompetent group 0 and the 10 mg/kg cyclophosphamide group, respectively, in relation with white blood cells of 3.92 and $3.41 \times 10^3/\mu$ L. Then, the grade of bacterial lung development was closely influenced by the grade of induced leukopenia.

Mortality was comparable in the three study groups, being 8 %, 10 % and 7.5 % after administration of a cyclophosphamide dose of 0, 10 and 30 mg/kg, respectively.

DISCUSSION

The aim of the study was to determine the best cyclophosphamide dose and administration schedule to induce an appropriate immunosuppression to simulate the altered immune status of ICU patients and to reduce spontaneous bacterial clearance observed in our previous models [2-3] without inducing an excessive animal mortality. Spontaneous bacterial clearance explains why the immunocompetent status contributes to reduce infectious pulmonary complications, whereas nosocomial infections occurred most often in immunocompromised patients with a maximal risk for hematologic diseases.

Bacterial spontaneous clearance is dependent on bacterial strain or animal model used. Thereby recently, in a mouse thigh infection model with a high bacterial burden (from 6.5 to $8.5 \log_{10}$ cfu per thigh), a moderate bacterial growth was observed after 24 or 48 h in

immunocompetent mice infected with a methicillin-susceptible, *Staphylococcus aureus* strain [17-18] while it seems higher for those infected with *Pseudomonas aeruginosa* [17]. Bacterial clearance was only present for a low bacterial burden and the authors concluded that bacterial kill by granulocytes could be saturable [17].

Many animal models used an administration schedule of one or two high cyclophosphamide doses to obtain a severe immunosuppression status [10]. But the profound leukopaenia achieved is close to that observed in haematologic patients, but far from what is usually observed in ICU patients. Thus, a single intravenous low dose of cyclophosphamide was chosen.

Firstly, three doses (10, 20, 40 mg/kg) were tested 96 hours before bacterial inoculation. By modelization, the final model showed an important decrease of white blood cell count in relation to the cyclophosphamide dose. The nadir appeared 4 or 5 days after the administration, for the three doses tested, and seemed stable. This period corresponds to the period of antibiotic evaluation.

Administration of low cyclophosphamide dose (10 or 20 mg/kg) was associated with a low leukopaenic effect. The 40 mg/kg cyclophosphamide dose results in a more profound leukopaenic state but was associated with an important lethal effect (43%). Therefore, a single intravenous dose of 30 mg/kg cyclophosphamide was chosen to induce a still noticeable immunosuppression while minimizing animal mortality.

The 30 mg/kg cyclophosphamide dose allows suppression of the spontaneous *E. cloacae* clearance in the lungs of animals during the first 30 h following bacterial inoculation corresponding to the period of antibiotic treatment evaluation. Interestingly, at that cyclophosphamide dose, animal mortality was not different from those observed in the immunocompetent rats group (7.5 % versus 8 %).

If initially, our works were realized on immunocompetent rats because the post-antibiotic effect is dependent on granulocytes numbers, especially for aminoglycosides [19-20], a better bacterial implant was a necessary step to continue to improve the reliability of our model. In a subsequent work using this experimental pneumonia caused by derepressed cephalosporinase-producing *E. cloacae*, antibiotic therapy will be started 6 h after bacterial inoculation with the combination of cefepime (60 mg/kg, twice-a-day) and amikacin (25 mg/kg, once-a-day). Lung's inocula should be stable in the placebo arm during the whole length of the study and differences favoring the antibiotic combination should be demonstrated with more reliability than previously.

Our findings suggest that this modified model could be contributive in the evaluation of antibacterial agents.

REFERENCES

1. Barza M. A critique of animal models in antibiotic research. Scand. J. Infect. Dis Suppl (1978) **14** 109-117.
2. Mimoz O., Jacolot A., Padoin C., Tod, M., Samii K., Petitjean O. Cefepime and amikacin synergy *in vitro* and *in vivo* against a ceftazidime-resistant strain on *Enterobacter cloacae*. J. Antimicrob. Chemother. (1998) **41** 367-372.
3. Mimoz O., Jacolot A., Leotard S., Hidri N., Samii K., Nordmann P., Petitjean O. Efficacies of cefepime, ceftazidime, and imipenem alone or in combination with amikacin in rats with experimental pneumonia due to ceftazidime-susceptible or -resistant *Enterobacter cloacae* strains. Antimicrob. Agents Chemother. (1998) **42** 3304-3308.

4. Kumar A., Leonard M.C., Cleveland R.P. Development of a leukocytopenic baby guinea pig model with azathioprine and cyclophosphamide. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* (1989) **12** 91-94.
5. Zuluaga A.F., Salazar B.E., Rodriguez C.A., Zapata A.X., Agudelo M., Vesga O. Neutropenia induced in outbred mice by a simplified low-dose cyclophosphamide regimen: characterization and applicability to diverse experimental models of infectious diseases. *BMC Infect. Dis.* (2006) **6** 55.
6. Bedos J.P., Rieux V., Bauchet, J., Muffat-Joly M., Carbon C., Azoulay-Dupuis E. Efficacy of trovafloxacin against penicillin-susceptible and multi-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae* in a mouse pneumonia model. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1998) **42** 862-867.
7. Ikeda F., Wakai Y., Matsumoto S., Maki K., Watabe E., Tawara S., Goto T., Watanabe Y., Matsumoto F., Kuwahara S. Efficacy of FK463, a new lipopeptide antifungal agent, in mouse models of disseminated candidiasis and aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2000) **44** 614-618.
8. Rusnak M.G., Drake T.A., Hackbarth C.J., Sande, M.A. Single *versus* combination antibiotic therapy for pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa* in neutropenic guinea pigs. *J. Infect. Dis.* (1984) **149** 980-985.
9. Van't Wout J.W., Linde I., Leijh P.C., van Furth R. Effect of irradiation, cyclophosphamide, and etoposide (VP-16) on number of peripheral blood and peritoneal leukocytes in mice under normal conditions and during acute inflammatory reaction. *Inflammation* (1989) **1** 1-14.
10. Gerber A.U., Craig W.A., Brugger H.P., Feller C., Vastola A.P., Brandel, J. Impact of dosing intervals on activity of gentamicin and ticarcillin against *Pseudomonas aeruginosa* in granulocytopenic mice. *J. Infect. Dis.* (1983). **147** 910-917.

11. Hatano K., Wakai Y., Watanabe Y., Mine, Y. Simulation of human plasma levels of β -lactams in mice by multiple dosing and the relationship between the therapeutic efficacy and pharmacodynamic parameters. *Chemotherapy* (1994) **40** 1-7.
12. Leenders A.C., de Marie S., ten Kate M.T., Bakker-Woudenberg I. A., Verbrugh H.A. Liposomal amphotericin B (AmBisome) reduces dissemination of infection as compared with amphotericin B deoxycholate (Fungizone) in a rat model of pulmonary aspergillosis. *J. Antimicrob. Chemother.* (1996) **38** 215-225.
13. Tokunaga S., Ohkhawa M., Takashima M. An experimental model of ascending pyelonephritis due to *Candida albicans* in rats. *Mycopathologica* (1993) **123** 149-154.
14. Zhi J., Nightingale C. H., Quintiliani R. Microbial pharmacodynamics of piperacillin in neutropenic mice of systematic infection due to *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Pharmacokin. Biopharm.* (1998) **16** 355-375.
15. National Institutes of Health. Principles of laboratory animal care. NIH publication 85-23. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA. 1985.
16. Gaines Das R.E., North D. Implications of experimental technique for analysis and interpretation of data from animal experiments: outliers and increased variability resulting from failure of intraperitoneal injection procedures. *Lab. Anim.* (2007) **41** 312-320.
17. Drusano G.L., Fregeau C., Liu W., Brown D.L., Louie A. Impact of burden on granulocyte clearance of bacteria in a mouse thigh infection model. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2010) **54** 4368-4372.
18. Drusano G.L. Liu W., Kulawy R., Louie A. Impact of granulocytes on the antimicrobial effect of tedizolid in a mouse thigh infection model. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2011) **55** 5300-5305.

- 19.** Craig W.A., Legett J., Totsuka K., Vogelman B. Key pharmacokinetic parameters of antibiotic efficacy in experimental animal infections. *J. Drug Dev.* (1988) **1** (Suppl 3) 7-15.
- 20.** Craig W.A., Gudmundsson S. The postantibiotic effect, in: V. Lorian. (Eds). *Antibiotics in Laboratory Medicine* 4th ed., Williams and Wilkins, Baltimore, USA. 1996, pp 296-329.

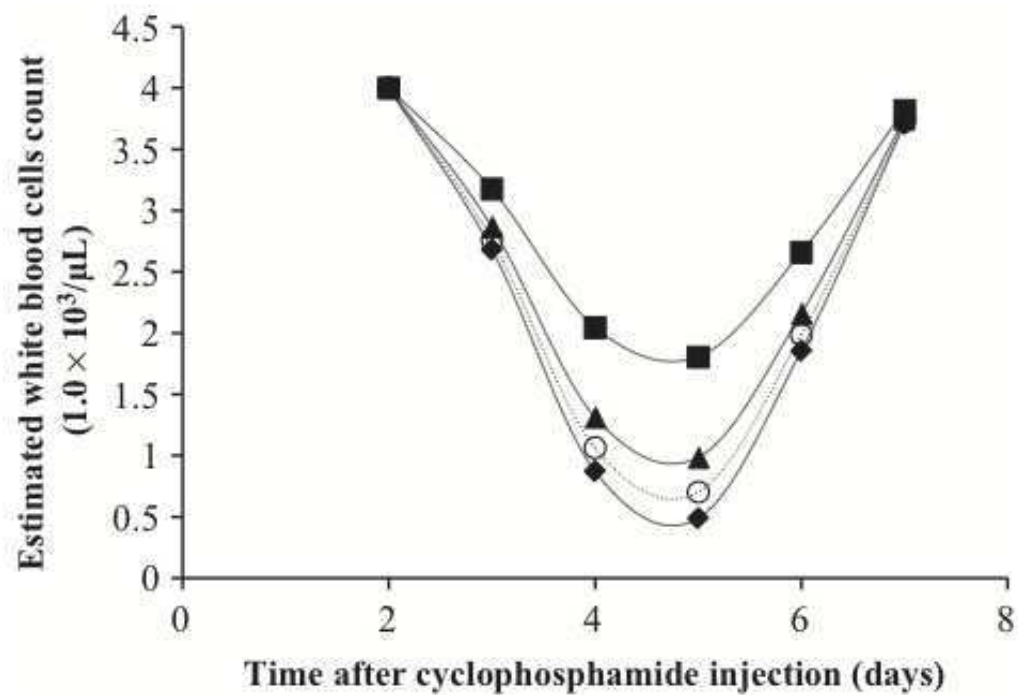


Figure 1. Simulation (based on median parameters) of white blood cell counts *versus* time for a dose of 10 mg/kg (■), 20 mg/kg (▲) or 40 mg/kg (◆) of cyclophosphamide in thirty infected Wistar rats by NONMEM V. Modelisation with 30 mg/kg cyclophosphamide (○).

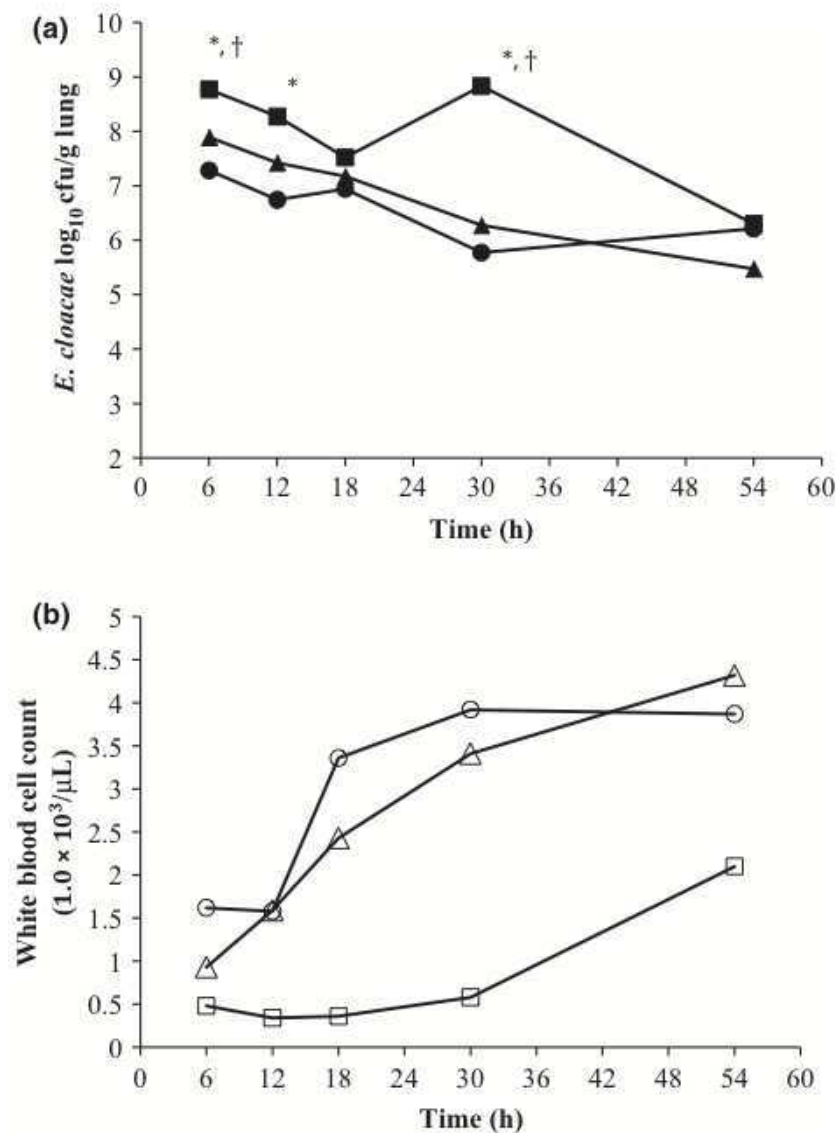


Figure 2. Comparative evolution of bacterial counts (a) and white blood cells counts (b) after iv cyclophosphamide dose of 0 (a, ○; b, ●), 10 mg/kg (a, △; b, ▲), 30 mg/kg (a, □; b, ■) in rats infected by tracheal injection of a suspension containing 8.9 log₁₀ cfu *E. cloacae* (H0) and sacrificed on H6, H12, H18, H30, and H54. Each data point represents the median (n = from 3 to 8).

(a): * Significantly increased bacterial titers compared with immunocompetent animals ($P < 0.02$);

† Significantly increased bacterial titers compared with immunosuppressed animals (10 mg/kg) ($P < 0.03$).

ETUDE n°4

Animal Model Methodology: Immunocompetent or Leucopenic Rats, Which Is the Best? *Results from a Model of Experimental Pneumonia due to Derepressed Cephalosporinase-Producing Enterobacter cloacae*

**Anne Jacolot ^{a-c*}, Claire Judel ^a, Marie-Camille Chaumais ^a, Kamel Louchahi ^a,
Patrick Nicolas ^a, Sandrine Marchand ^{b-d}, Olivier Petitjean ^a, Olivier Mimoz ^{b, c, e}**

^a CREPIT, CHU Avicenne, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Bobigny ,

^b INSERM ERI-23, ^c Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université de Poitiers, et ^d
Laboratoire de Toxicologie et de Pharmacocinétique et ^e Service de Réanimation
Chirurgicale, CHU de Poitiers, Poitiers , France

*Corresponding author

Key Words: Experimental pneumonia - Spontaneous clearance - Immunosuppression -
Antibiotic synergism - *Enterobacter cloacae*.

Abstract

Background: The aim of this study was to compare the bactericidal activity of cefepime plus amikacin against experimental pneumonia induced by a stably derepressed cephalosporinase- producing *Enterobacter cloacae* strain in immunocompetent and leucopenic rats. **Methods:** Sixty Wistar rats were used. Leucopenia was induced in half of them by a single intravenous administration of 30 mg/kg cyclophosphamide, while the remaining rats received the same volume of saline. All rats were infected 96 h later by tracheal instillation of $8 \log_{10}$ colony-forming units of *E. cloacae*. Twelve rats (6 immunocompetent and 6 leucopenic) were sacrificed 6 h later to assess the initial bacterial burden to the lungs. Then, the remaining 48 rats received a combination of 60 mg/kg cefepime twice a day and 25 mg/kg amikacin once a day given intraperitoneally or the same volume of saline. Six rats per group (leucopenic or not, treated or not) were sacrificed 12 and 30 h after therapy started. **Results:** Spontaneous bacterial clearance with time was observed only in immunocompetent rats. Compared to untreated animals, antibiotic administration induced a decrease in lung bacterial titres in immunocompetent and leucopenic rats. The difference was statistically significant only in leucopenic rats. **Conclusions:** The use of leucopenic rats reduced spontaneous bacterial clearance in the lungs and increased the bactericidal effect of the antibiotic combination and ultimately the confidence in the reliability of the results.

Introduction

Animal models have been extensively used in the evaluation of antibiotics to define the dose level or pharmacokinetic-pharmacodynamic parameters necessary for treatment efficacy, which are usually similar for drugs within the same class and for most pathogens and different infection sites [1, 2]. However, improvement of an animal model or a clinical protocol design contributes ‘in its own way’ to a better assessment of the potential clinical utility of drugs for human diseases.

A few years ago, we developed an original model of experimental pneumonia with non-neutropenic rats with the following characteristics: high bacterial inoculum in the stationary phase of growth and humanised pharmacokinetics using uranyl nitrate-induced renal impairment. These characteristics were chosen to mimic pneumonia in severely ill patients. The model was used to evaluate the efficacy of cefepime and amikacin given alone or in combination against a stably derepressed cephalosporinase producing *Enterobacter cloacae* strain. In the first study [3], therapy was given for 24 h; spontaneous bacterial clearance was observed in the lungs of the animals, and the efficacy of the antibiotics was modest, with a significant reduction in the lung bacterial count only observed with the antibiotic combination. Lengthening the duration of antibiotic treatment increased drug efficacy but also bacterial lung clearance [4], introducing an undesirable lack of confidence in the reliability of the results. Because most severely ill patients are considered as having reduced host defenses and to avoid spontaneous bacterial clearance, a dose-effect relationship study of cyclophosphamide was performed to determine the best cyclophosphamide schedule necessary to induce an appropriate and transient leucopenic state able to avoid lung bacterial clearance [5].

The aim of the present study was to assess the value of using leucopenic animals to improve the reliability of the *E. cloacae* pneumonia model for the evaluation of antibiotic regimens. Using the model, the bactericidal activities of cefepime and amikacin in combination were compared in immunocompetent and leucopenic rats.

Materials and Methods

Bacterial Strains

A stably derepressed cephalosporinase-producing strain of *E. cloacae* identical to the one inoculated into rats in our previous experiments [3, 4] was used for this study. The strain was stored at -70°C in Mueller-Hinton broth (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) supplemented with 10% glycerol. Fresh inocula were prepared for each experiment from cultures grown for 24 h in 10 ml of trypticase soy broth (bioMérieux) and then rinsed twice and suspended in normal saline prior to use. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of cefepime and amikacin were determined by the E test method, before and after the experiments, from aliquots of lung homogenates to examine the possible emergence of antibiotic resistance during therapy.

Antimicrobial Agents

Cefepime and amikacin were obtained from Bristol-Myers-Squibb (Paris, France). All drugs were kept in powder form and were freshly diluted with saline before each experiment in accordance with the manufacturer's instructions.

Animals

Sixty male Wistar rats weighing 280–300 g, obtained from Charles River Laboratories (Saint Germain sur l'Arbresle, France), were handled in accordance with the National Institutes of Health's principles of laboratory animal care [6]. The rats were acclimatised in

wire cages on a 12-hour light/dark cycle for a minimum of 5 days before the beginning of the experiment to allow them to adjust to the new environment. During that period, they had free access to food and water. The rats were randomly assigned to a leucopenic group (n = 30) and an immunocompetent group (n = 30).

Experimental Model

Leucopenia was induced 96 h before induction of pneumonia in anaesthetised animals (60 mg/kg sodium thiopental intraperitoneally) by infusing a bolus dose of 30 mg/kg cyclophosphamide (Asta-Medica, Mérignac, France) through the penile vein [7]. Immunocompetent animals received saline alone. The dose of cyclophosphamide was determined from former studies establishing the leucopenic level allowing successful minimisation of spontaneous bacterial clearance (leucocyte count $< 1 \times 10^3/\mu\text{l}$ of blood after 96–120 h) [5]. White blood cell counts were determined in all animals at sacrifice to document the cyclophosphamide-induced immunosuppression from blood samples put in EDTA-containing tubes and analysed within 24 h using an Advia 1200 system (Siemens Healthcare Diagnostics, Saint Denis, France). The rats were rendered renally insufficient by administering 1 mg/kg uranyl nitrate (Merck, Darmstadt, Germany) intraperitoneally to simulate cefepime and amikacin elimination in humans (both half lives of 2 h) [8, 9]. Uranyl nitrate was given 24 h after cyclophosphamide administration to allow total elimination of the immunosuppressive drug.

Pneumonia was induced in anaesthetised animals (60 mg/kg thiopental intraperitoneally) by injecting a 0.5-ml portion of a bacterial suspension containing $8 \log_{10}$ colony-forming units (CFU) of *E. cloacae* intratracheally with a 25-gauge syringe. Following inoculation, animals were gently shaken for 15 s to equally distribute the bacterial inoculum in the lungs. Previous studies had shown that, 6 h after bacterial inoculation, all animals had developed

bilateral pneumonia with bacterial densities $> 7 \log_{10}$ CFU/g of tissue in both lungs, associated with an intense inflammatory reaction [3, 5].

Treatment Regimens

All 60 infected animals were still alive 6 h after bacterial inoculation. At that time, 12 rats (6 from each group) were sacrificed by administration of a lethal dose of sodium thiopental to ensure that pneumonia was well established. The remaining rats were randomly assigned to 4 groups (12 animals each) according to their immune status (leucopenic or not) and whether they received antibiotics or not. Treated rats received a combination of 60 mg/kg cefepime twice a day and 25 mg/kg amikacin once a day, both given intraperitoneally, while untreated rats received the same volume of saline. This antibiotic combination is recommended by most guidelines for the treatment of nosocomial pneumonia [10–12], especially against emerging resistant Gram-negative aerobic bacilli infections [13]. Antibiotic dosages were chosen to achieve concentrations in plasma close to those observed in humans [14]. The antibiotic treatment lasted 30 h, because the dose of 30 mg/kg cyclophosphamide causes suppression of spontaneous *E. cloacae* clearance in the lungs of animals, which was demonstrated during this time [5].

Evaluation of Antibiotic Treatment

Five or 6 animals per group were sacrificed 12 and 30 h after therapy started. Animals sacrificed 12 h after therapy started received only 1 dose of cefepime and amikacin, while those killed after 30 h received 3 cefepime and 2 amikacin doses. Blood was obtained by aortic puncture and placed in 4 separate EDTA-containing tubes; one tube was used to document the presence of immunosuppression; the second was used to assess the creatinine concentration in plasma to document the presence of renal impairment, and the last two tubes were stored at -20°C to measure antibiotic concentrations. Lungs were aseptically

removed, gently blotted with sterile absorbent paper to remove blood, weighed, placed in 25 ml of ice-cold saline and homogenised (Ultraturrax, Staufen, Germany). The homogenate was quantitatively cultured after serial dilution on Drigalski agar (BioMérieux) with a Spiral Plater System (Interscience, Saint-Nom-La-Bretèche, France). These serial dilutions avoided any carry-over effect of antibiotics on bacterial cultures. After an overnight incubation at 37 °C, viable bacteria were counted and expressed as log₁₀ CFU per gram of lung. When no bacterial growth was noted, the value of half the detection limit was entered into the statistical analysis (i.e. 3 log₁₀ CFU/ml).

Antibiotic Assay

Cefepime concentrations were determined using a modified HPLC assay described elsewhere [15]. The lower limit of detection of the assay was 1 mg/l, and the inter-day coefficient of variation ranged from 7% at 1 mg/l to 6% at 50 mg/l. Amikacin concentrations were determined using an immunoenzyme assay (Emit, Siemens Healthcare Diagnostics). The lower limit of detection of the assay was 1 mg/l, and the coefficients of variation were < 8% over the entire range of measurement.

Statistical Analysis

All results are expressed as medians and their range. Creatinine levels, white blood cell counts, antibiotic concentrations in plasma and lung bacterial titres in the treated and untreated groups were compared using the non-parametric Mann-Whitney U test. For all tests, a p value of < 0.05 was considered significant.

Results

Bacterial Strains

Cefepime and amikacin MICs for the *E. cloacae* strain used to inoculate rats were 0.5 and 1.5 mg/l, respectively. Similar values were obtained in rat lungs at sacrifice, indicating that no resistance developed during treatment in any of the experimental groups.

Biological Analysis

White blood cell counts were lower in leucopenic rats than in immunocompetent rats and increased only in immunocompetent rats (table 1). Serum creatinine levels did not differ between the groups, indicating that renal impairment was identical regardless of the animals' immune status and treatment received (table 1). Therefore, plasma concentrations of both antibiotics were similar between the immunocompetent and leucopenic groups 6 and 12 h after the last drug administration (table 2) and broadly similar to those usually reported in adult humans given high doses of the same antibiotics [14]. The 12-hour cefepime concentrations were around 4-fold the MIC, and the 6-hour amikacin concentrations were in the range of 10- to 13-fold the MIC (table 2).

Efficacy of Antibiotic Treatment

The 6 immunocompetent and leucopenic rats sacrificed before therapy started had bilateral pneumonia, with comparable *E. cloacae* lung titres (table 3). Mortality was low during the 30-hour antibiotic treatment period, with only 1 rat dying in each group. In untreated rats, lung bacterial titres remained stable in leucopenic rats during the 30-hour treatment period and decreased significantly in immunocompetent rats. Compared to untreated rats, the reduction in lung bacterial titres induced by antibiotic therapy was statistically significant only in leucopenic rats.

Discussion

Experimental models of infection are used to determine the pharmacokinetic-pharmacodynamic parameters able to predict *in vivo* efficacy and therefore to give first recommendations for the optimal dosing of antimicrobial agents in humans [16]. There are very few guidelines for the conduct of these experimental studies [17], but all known and relevant accessible factors responsible for drug effects should be controlled for before using such animal models, except the one under investigation.

In the present study, an experimental model of *E. cloacae* pneumonia was developed with leucopenic rats to avoid spontaneous bacterial clearance. Giving a single 30-mg/kg cyclophosphamide dose intravenously 4 days before bacterial inoculation resulted in a stable and appropriate immunosuppression during the 30 h of antibiotic therapy without increasing the animal death rate. Concurrently, and for the first time in the development of the model, the lung burden of derepressed cephalosporinase- producing *E. cloacae* remained constant at about 8 log₁₀ CFU/g during the entire experimental period; no self-cure nor spontaneous bacterial clearance was observed as it had been previously, increasing the reliability of the results [3, 4].

Another important issue that should be taken into consideration is to achieve antibiotic concentrations close to those observed in patients. Underexposure to one antibiotic compound (or both) can lead to erroneous conclusions, especially when antibiotic combinations are compared to monotherapies or when antibiotics are used for the treatment of difficult-to-treat pathogens. Actually, it is well accepted that for the maximal clinical effect to be obtained, an aminoglycoside peak over the MIC higher than 8–12 is required [18–20], otherwise the combinations tested can easily turn into *de facto* monotherapies with an additional risk of inappropriate initial treatment [21, 22]. The same constraints are

observed with cefepime as well as all other β -lactams [23–25]; in a cohort of 36 patients with severe Gram-negative infections, microbiological success was significantly correlated with the proportion of the dosing interval that cefepime concentrations exceeded levels 4-fold the MIC [26]. In the present study, the administration of 1 mg/kg uranyl nitrate was optimal to impair the renal function of rats so as to simulate the pharmacokinetics of cefepime and amikacin in healthy humans [3, 4]; indeed, amikacin concentrations obtained 6 h after dosing were 10- to 13-fold the MIC, and cefepime concentrations 12 h after dosing, corresponding to the trough drug concentration, were maintained above 4-fold the MIC. Even if the number of samplings was limited, without assessment of the peak concentration for amikacin and with only two determinations for cefepime, antibiotic exposure was similar between the groups, comparable to that previously observed in similar situations [3, 4] and appropriate to be effective.

When controlling for spontaneous bacterial clearance and adequate antibiotic concentrations, it was possible to reliably demonstrate the potential efficacy of cefepime and amikacin given in combination for the treatment of pneumonia due to a derepressed cephalosporinase-producing *E. cloacae* strain. The present work indicates that when using strains not easily implantable to develop an experimental pneumonia model in rodents, it could be useful to render animals moderately immunosuppressed; this has the added benefit of being able to simulate a situation of immunosuppression as observed in intensive care unit patients with severe infections. These findings remind us that we all should be made aware of the limitations of experimental models; in that way, this modified model could contribute to the evaluation of antibacterial agents.

References

- 1 Andes D, Craig WA: Animal model pharmacokinetics and pharmacodynamics: a critical review. *Int J Antimicrob Agents* 2002; 19: 261–268.
- 2 Craig WA, Legett J, Totsuka K, Vogelmann B: Key pharmacokinetic parameters of antibiotic efficacy in experimental animal infections. *J Drug Dev* 1988; 1(suppl 3): 7–15.
- 3 Mimoz O, Jacolot A, Padoin C, Tod M, Samii K, Petitjean O: Cefepime and amikacin synergy in vitro and in vivo against a ceftazidime-resistant strain of *Enterobacter cloacae*. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41: 367–372.
- 4 Mimoz O, Jacolot A, Leotard S, Hidri N, Samii K, Nordmann P, Petitjean O: Efficacies of cefepime, ceftazidime, and imipenem alone or in combination with amikacin in rats with experimental pneumonia due to ceftazidime-susceptible or -resistant *Enterobacter cloacae* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 3304–3308.
- 5 Jacolot A, Judel C, Louchahi K, Tod M, Marchand S, Petitjean O, Mimoz O: How to solve the problem of spontaneous bacterial clearance when testing new antibiotic treatment: results on experimental pneumonia due to a derepressed cephalosporinase-producing *Enterobacter cloacae*. *Fundam Clin Pharmacol* 2012, E-pub ahead of print.
- 6 National Institutes of Health: Principles of Laboratory Animal Care; Publication 85-23. Bethesda, National Institutes of Health, 1985.
- 7 Gaines Das RE, North D: Implications of experimental technique for analysis and interpretation of data from animal experiments: outliers and increased variability resulting from failure of intraperitoneal injection procedures. *Lab Anim* 2007; 41: 312–320.
- 8 Giacomini KM, Roberts SM, Levy G: Evaluation of methods for producing renal dysfunction in rats. *J Pharm Sci* 1981; 70: 117–121.
- 9 Mahmood I, Waters DH: A comparative study of uranyl nitrate and cisplatin-induced renal failure in rat. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1994; 19: 327–336.

- 10** American Thoracic Society; Infectious Diseases Society of America: Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 388–416.
- 11** Bodmann KF: Current guidelines for the treatment of severe pneumonia and sepsis. *Chemotherapy* 2005; 51: 227–233.
- 12** Torres A, Ewig S, Lode H, Carlet J; European HAP working group: Defining, treating and preventing hospital acquired pneumonia: European perspective. *Intensive Care Med* 2009; 35: 9–29.
- 13** Kunz AN, Brook I: Emerging resistant gramnegative aerobic bacilli in hospital-acquired infections. *Chemotherapy* 2010; 56: 492–500.
- 14** Barbhaiya RH, Knupp CA, Pfeiffer M, Pittman KA: Lack of pharmacokinetic interaction between cefepime and amikacin in humans. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 1382–1396.
- 15** Barbhaiya RH, Forgue ST, Shyu WC, Papp EA, Pittman KA: High-pressure liquid chromatographic analysis of BMY-28142 in plasma and urine. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31: 55–59.
- 16** Dalhoff A, Ullmann U: Correlation between pharmacokinetics, pharmacodynamics and efficacy of antibacterial agents in animal models. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990; 9: 479–487.
- 17** Barza M: A critique of animal models in antibiotic research. *Scand J Infect Dis* 1978; 14: 109–117.
- 18** Kashuba AD, Nafziger AN, Drusano G, Bertino JS Jr: Optimizing aminoglycoside therapy for nosocomial pneumonia caused by Gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 623–629.

- 19** Moore RD, Lietman PS, Smith CR: Clinical response to aminoglycoside therapy: importance of the ratio of peak concentration to minimal inhibitory concentration. *J Infect Dis* 1987; 155: 93–99.
- 20** Zelenetsky SA, Harding GK, Sun S, Ubhi K, Ariano RE: Treatment and outcome of *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia: an antibiotic pharmacodynamic analysis. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52 668–674.
- 21** Micek ST, Lloyd AE, Ritchie DJ, Reichley RM, Fraser VJ, Kollef MH: *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection: importance of appropriate initial antimicrobial treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 1306–1311.
- 22** Van Delden C: *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: how should we treat them? *Int J Antimicrob Agents* 2007; 30S: S71–S75.
- 23** Furno P, Bucaneve G, Del Favero A: Monotherapy or aminoglycoside-containing combinations for empirical antibiotic treatment of febrile neutropenic patients: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 231–242.
- 24** Pereira CA, Petrilli AS, Carlesse FA, Luisi FA, da Silva KV, de Martino Lee ML: Cefepime monotherapy is as effective as ceftriaxone plus amikacin in pediatric patients with cancer and high-risk febrile neutropenia in a randomized comparison. *J Microbiol Immunol Infect* 2009; 42: 141–170.
- 25** Tamura K, Matsuoka H, Tsukada J, Masuda M, Ikeda S, Matsuishi E, Kawano F, Izumi Y, Uike N, Utsunomiya A, Saburi Y, Shibuya T, Imamura Y, Hanada S, Okamura S, Gondoh H; Kyushu Hematology Organization for Treatment (K-HOT) Study Group: Cefepime or carbapenem treatment for febrile neutropenia as a single agent is as effective as a combination of 4th-generation cephalosporin + aminoglycosides: comparative study. *Am J Hematol* 2002; 71: 248–255.

26 Tam VH, Mc Kinnon PS, Akins RL, Rybak MJ, Drusano GL: Pharmacodynamics of cefepime in patients with Gram-negative infections. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 425–428.

Table 1. Creatinine levels and white blood cell counts in rats plasma observed 0, 12 and 30 h after therapy initiation according to immune status and treatment received.

Immune Status	Median creatinine level in plasma (μmol/l)	Median white blood cell count in plasma (x 10 ³ /μl)
<i>Immunocompetent</i>		
Treated		
0 h (6) ^a	156 (141-195)	1.25 (0.95-1.52)
12 h (6)	226 (152-275)	3.02 (2.30-3.47)
30 h (5)	209 (57-470)	3.01 (2.65-3.49)*
Untreated		
0 h (6) ^a	156 (141-195)	1.25 (0.95-1.52)
12 h (6)	220 (138-363)	3.17 (1.24-3.73)
30 h (6)	301 (57-386)	2.80 (2.53-3.14)*
<i>Leucopenic</i>		
Treated		
0 h (5) ^a	153 (134-212)	0.33 (0.14-0.70)
12 h (6)	200 (52-354)	0.23 (0.16-0.40)
30 h (6)	294 (157-334)	0.56 (0.27-0.85)
Untreated		
0 h (5) ^a	153 (134-212)	0.33 (0.14-0.70)
12 h (5)	185 (51-241)	0.26 (0.05-0.39)
30 h (6)	263 (239-292)	0.24 (0.01-0.48)

Figures in parentheses represent numbers of animals or ranges, as appropriate

^a: Same animals for treated and untreated groups at time 0 h.

* p < 0.05: significantly increased white blood cell count compared with immunocompetent animals at initiation treatment (i.e 6 hours after inoculation)

Table 2. Median antibiotics concentrations in plasma observed at various times after intraperitoneal administration of cefepime and amikacin to infected rats ($n=5$ to 6) with impaired renal function.

Group	Cefepime, mg/l		Amikacin, mg/l	
	6 h ^a	12 h ^b	6 h ^c	12 h ^b
Immunocompetent	51 (10-127)	2 (1-7)	16 (< 1-37)	4 (< 1-7)
Leucopenic	43 (8-68)	2 (1-13)	22 (6-31)	1 (< 1-13)

Figures in parentheses represent ranges.

^a after the third administration, ^bafter the first administration, ^c after the second administration

Table 3. Titres of *E. cloacae* in rat lungs according to their immune status and whether or not they received antibiotic treatment.

Time after therapy	Median lung bacterial titres (log ₁₀ CFU/g)			
	immunocompetent		leucopenic	
	untreated	treated	untreated	treated
0 h	8.2 (7.0-8.6)	8.2 (7.0-8.6)	7.9 (7.5-9.5)	7.9 (7.5-9.5)
12 h	7.2 (6.4-7.7)	6.9 (4.9-7.3)	8.6 (7.4-9.0)	8.1 (5.6-8.2)*
30 h	6.5 (4.1-7.2)	5.5 (4.7-6.5)	7.5 (7.2-9.9)	6.3 (5.6-6.5)**

Animals (n=5 or 6 per group) were sacrificed at 0, 12 h and 30 h after the start of therapy.

* p <0.05, ** p <0.01: significantly decreased bacterial titres compared with leucopenic untreated animals

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les modèles d'infection expérimentale contribuent à fournir des informations essentielles sur le bon usage des antibiotiques et le traitement des infections bactériennes.

Les modèles simples, comme ceux notamment d'infection de la cuisse ou du poumon chez la souris, ont largement été utilisés pour définir les valeurs critiques permettant de classer les souches bactériennes en sensibles ou résistantes, ou pour évaluer le risque potentiel d'émergence d'une souche résistante après traitement, ou encore pour déterminer les paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques capables de prédire l'efficacité *in vivo* des antibiotiques chez l'homme (Craig 1988, Dalhoff 1990).

Des modèles plus discriminants, comme celui de l'endocardite, de l'ostéomyélite, de la pneumonie ou de la méningite chez le rat ou le lapin se sont davantage intéressés à évaluer la distribution tissulaire des antibiotiques et l'efficacité anti-bactérienne de nouveaux traitements, tout en étudiant aussi l'impact d'un mécanisme de résistance sur l'activité antimicrobienne et l'émergence de mutants résistants après traitement.

C'est pourquoi, l'approche expérimentale reste un bon moyen d'étude pour évaluer l'intérêt d'une association d'antibiotiques (ou celle d'un antibiotique avec un traitement non antibiotique) dans une pathologie infectieuse donnée (Fantin 1992). Peu de recommandations existent sur la conduite de ces études (Barza 1978). Il est cependant nécessaire, avant toute conclusion définitive, de s'assurer que tous les paramètres connus, pertinents, accessibles et concourants à l'effet antibiotique, soient contrôlés, excepté bien sûr celui qui doit être évalué.

C'est pourquoi l'objectif commun de ces travaux a consisté à mettre au point et à optimiser un modèle animal dans l'étude des conditions de traitement des pneumopathies en réanimation.

Les premiers travaux réalisés par notre équipe, ont permis **de développer un modèle de pneumopathie expérimentale à *Enterobacter cloacae* chez le rat immunocompétent dont les caractéristiques décrites ci-après** en ont fait un modèle original et utilisé également lors de collaborations ultérieures sur d'autres souches bactériennes, *E. cloacae* ou *P. aeruginosa* toutes deux productrices de carbapénémases (Bellais 2002, Mimoz 1999, Mimoz 2000) :

- une induction de la pneumopathie réalisée par *ponction directe dans la trachée* d'un *inoculum bactérien « lourd » en phase de croissance lente*, dite stationnaire ; la méthode, adaptée de celle de Pennington et coll. (1979), assure une bonne reproductibilité ($\geq 7 \log_{10}$ UFC/g poumon), et place ainsi le traitement antibiotique dans des conditions difficiles. La densité bactérienne élevée est observée dans les deux poumons, et s'accompagne d'une réaction inflammatoire dès la 3^{ème} heure après l'inoculation bactérienne.

- une *humanisation de la pharmacocinétique des antibiotiques administrés* : l'animal est rendu insuffisant rénal par administration de nitrate d'uranyle ce qui permet d'obtenir une relation antibiotique-bactérie chez l'animal proche de celle observée chez l'homme. La technique est également reproductible (Giacomini 1981), et ce, quel que soit le mode d'administration du nitrate d'uranyle par voie sous-cutanée ou intrapéritonéale. Lors de chaque série d'expériences, la mesure de la clairance de la créatinine entre les différents groupes a été réalisée pour vérifier le niveau comparable

de la fonction rénale entre les groupes traités et non traités par les antibiotiques et l'immunosuppresseur.

Ce modèle a permis d'évaluer l'efficacité du céfépime et de l'amikacine administrés seuls ou en association sur une souche d'*Enterobacter cloacae* sensible et sur son mutant isogénique producteur d'une céphalosporinase dérégulée. Après un **traitement « court » de 24 heures (Etude n°1)**, l'efficacité des antibiotiques a été modeste mais avec toutefois une réduction significative dans le comptage bactérien pulmonaire. Une **clairance bactérienne a été** cependant, **observée** dans les poumons des animaux ce qui a conduit, pour certains, à leur guérison en l'absence même de tout traitement anti-infectieux. **Une durée prolongée du traitement antibiotique (60 heures, Etude n°2)** a augmenté l'efficacité mesurable des antibiotiques mais également la clairance bactérienne spontanée.

Cette clairance bactérienne spontanée explique notamment que le statut immunocompétent permette de réduire les complications pulmonaires infectieuses. C'est pourquoi aussi, les infections nosocomiales surviennent plus souvent chez les patients immunodéprimés et que ce risque est maximum chez les patients hématologiques neutropéniques ou en post-transplantation, leur risque de mortalité augmentant également significativement comparativement à ceux non neutropéniques (Lin 2008, Lyman 2010, Offner 1996).

Récemment, des modèles mathématiques ont été proposés pour prédire chez l'animal, tout au moins chez la souris, le titre bactérien dans un tissu infecté en prenant en compte l'effet de la réponse immunitaire sur la clairance ou la recroissance bactérienne (Drusano 2010, Guo 2011). Chez la souris immunocompétente, dans un modèle d'infection de la cuisse (Drusano 2010) et dans un modèle de pneumonie (Drusano 2011a), toutes deux à *P. aeruginosa*, les auteurs montrent en testant plusieurs tailles d'inoculum que la clairance

bactérienne spontanée, et ainsi la capacité d'action des granulocytes, seraient saturables à partir d'un certain seuil de la charge microbienne inoculée. En deçà, les défenses immunitaires opérant, une clairance bactérienne spontanée significative serait observée ; au delà, les défenses seraient saturées et une recroissance bactérienne surviendrait. Appliqué à un modèle d'infection de la cuisse de la souris à *S. aureus* (Drusano 2010, Drusano 2011b), cette recroissance bactérienne apparaît plus modérée à 24 ou 48 heures. Ceci n'a pas été observé dans notre modèle dont la taille de l'inoculum était élevée. Il semble donc que la clairance bactérienne spontanée soit dépendante de plusieurs facteurs : le modèle d'infection, l'espèce animale et la souche bactérienne utilisée.

Lors de l'évaluation d'un traitement antibiotique, la clairance bactérienne spontanée et l'effet thérapeutique varient au cours du temps sans que l'on puisse, en dehors de ces études récentes, déterminer la part de chacun. Ceci conduit à une interprétation difficile des résultats. C'est pourquoi nous avons cherché dans un 2^{ème} temps d'étude, à **minimiser cette clairance spontanée de manière reproductible (Etude n°3)**. En rendant les animaux immunodéprimés, l'implantation bactérienne dans les poumons a été améliorée. La leucopénie a été induite par administration intraveineuse de cyclophosphamide, qui reste la voie d'administration la plus reproductible. Par modélisation, la dose retenue a été une dose unique de 30 mg/kg de cyclophosphamide 4 jours avant l'inoculation bactérienne : le nadir observé a été compatible avec la période d'étude, c'est-à-dire entre l'inoculation bactérienne, l'instauration et la durée du traitement antibiotique.

La cinétique de la leucopénie chez le rat a été bien caractérisée avec une allure de courbe dite « en cloche » c'est-à-dire symétrique montrant que l'insuffisance rénale induite 24 heures après l'administration du cyclophosphamide ne perturbera pas l'activité de l'immunosupresseur. Ceci s'explique notamment par sa demi-vie courte de 0.5 heures [200 mg/kg, IP, Rat Wistar (Talha 1980)] à 1 heure [100 mg/kg, IP, Rat Sprague-Dawley,

(Sladek 1984)] et par le fait que sa métabolisation hépatique est l'étape limitante de l'élimination de ses métabolites actifs. Ainsi, le cyclophosphamide est totalement éliminé quand le nitrate d'uranyle est administré.

L'administration intraveineuse d'une dose unique de 30 mg/kg a permis d'obtenir une immunodépression avec un nombre de globules blancs $\leq 1.0 \times 10^3/\mu\text{l}$, qui a été stable pendant 30 heures, avec un taux de mortalité comparable entre les groupes traités et non traités. Alors que des doses plus élevées (200 à 300 mg/kg) sont habituellement utilisées dans de nombreux modèles expérimentaux, une dose faible de cyclophosphamide a été retenue dans nos études n°3 et 4, et ce, lors d'une administration en dose unique. Ces deux particularités ont permis l'obtention d'une leucopénie a minima durant la période étudiée sans mortalité supplémentaire. La voie intraveineuse a été préférée à la voie intrapéritonéale dans le but de prévenir la variabilité de résorption du cyclophosphamide (Gaines Das 2007) ainsi que de s'affranchir de la variabilité pouvant survenir après l'injection accidentelle dans une anse intestinale.

En ajoutant à notre modèle d'infection expérimentale cette immunodépression a minima, **la clairance bactérienne spontanée a bien été supprimée** : la charge bactérienne pulmonaire d' *E. cloacae* est restée constante avec près de 8 log₁₀ dans le groupe « leucopénique contrôle » durant tout le temps de l'évaluation.

Ce facteur confondant écarté, nous avons pu poursuivre l'évaluation du traitement antibiotique dans des conditions plus discriminantes (**Etude n°4**).

Les titres pulmonaires bactériens peuvent être comparés entre les différents groupes à l'aide d'un test non paramétrique de Mann et Withney (utilisé dans l'étude n°4). Une autre approche permet de comparer les réductions du titre pulmonaire bactérien de chaque groupe expérimental au cours du temps au moyen d'un modèle linéaire (log titre pulmonaire bactérien en fonction du temps). Ceci est représenté sur la figure 4 (General Linear Model, JMP, version 5.01.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) :

- pour le groupe « leucopénique contrôle », cette réduction exprimée par la pente de la droite de régression, est proche de zéro (pente = -0.007 h^{-1} , $r^2 = 0.013$), suggérant bien que les titres pulmonaires bactériens sont stables durant les 30 heures d'évaluation. En revanche, le titre bactérien dans le groupe « immunocompétent contrôle » a significativement diminué au cours de cette période ($r^2 = 0.538$) avec un taux de réduction nettement supérieur à celui du groupe leucopénique (-0.063 h^{-1} *versus* -0.007 h^{-1} , $P < 0.01$) ;
- concernant l'effet de la bithérapie antibiotique, une diminution de 9.5% supplémentaire du taux de réduction bactérienne est observée entre le groupe « leucopénique traité » et le groupe « immunocompétent contrôle » (-0.069 h^{-1} *versus* -0.063 h^{-1} , respectivement) ; ce gain atteint 23.8%, et a une tendance à la significativité, lorsque l'on compare ce taux entre le groupe « immunocompétent traité » et le « immunocompétent contrôle » (-0.078 h^{-1} *versus* -0.063 h^{-1} , $P = 0.07$). C'est ainsi que, de toute évidence, les deux groupes traités montrent des réductions importantes du titre pulmonaire bactérien comparativement à celle du groupe « leucopénique contrôle ».

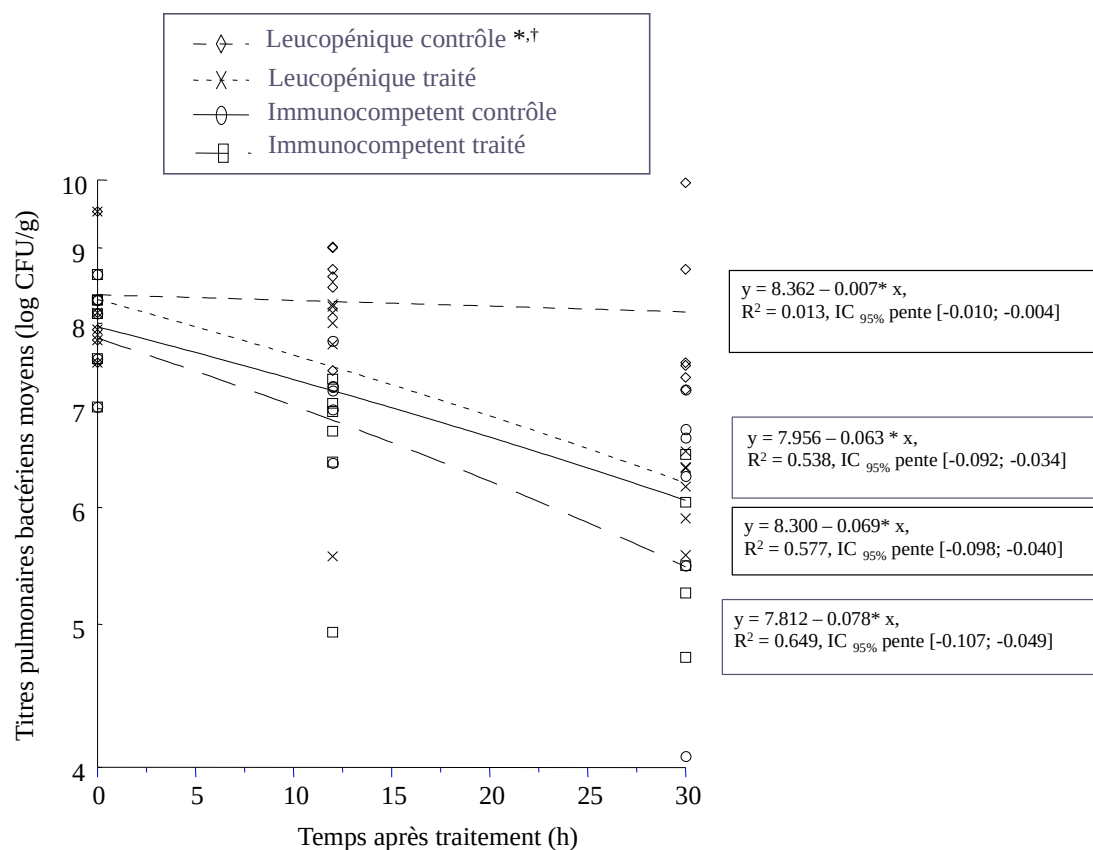


Figure 4 : Evolution des titres pulmonaires bactériens d' *E. cloacae* chez le rat selon son statut immunitaire (immunocompétent ou leucopénique) et le traitement antibiotique. Les animaux ont été sacrifiés aux temps 0, 12 et 30 heures après le début de la thérapie. Chaque marque représente un seul animal. Pour chaque groupe, la régression linéaire a été ajustée selon le General Linear Model (JMP, version 5.01.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

*: $P < 0.01$; entre le groupe « leucopénique contrôle » versus le groupe « immunocompétent contrôle »,

†: $P < 0.01$; entre le groupe « leucopénique contrôle » versus le groupe « leucopénique traité »

L'analyse des résultats de l'étude n°4 avec ceux des séries précédentes (tableau XIII) montre que l'efficacité de la bithérapie antibiotique n'est pas clairement mise en évidence dans le modèle immunocompétent. Seul le modèle leucopénique montre une réduction du titre bactérien pulmonaire dans le groupe traité par céfépime et amikacine tout en conservant une charge bactérienne pulmonaire stable dans le groupe contrôle.

Tableau XIII : Synthèse des résultats des études n°1, 2, 4: Evolution du titre pulmonaire bactérien (log₁₀ UFC/g) au cours du temps : [médiane (extrêmes)] dans le modèle de pneumopathie expérimentale à *E. cloacae* producteur de céphalosporinase déréprimée traitée par la bithérapie céfépime (FEP) et amikacine (AMK) : groupe contrôle sans traitement antibiotique, groupe traité antibiotique et statut immunitaire immunocompétent et leucopénique.

Statut immunitaire	Groupe	Temps après le début du traitement (heures)					
		0	6	12	24	30	60
Animal immuno-compétent	Etude n°1 ^a						
	Contrôle	8.2 (7.5-8.4)	8.2 (7.1 – 8.4)	nd	7.6 (7.1 – 8.3)	nd	nd
	FEP +AMK [*]	8.2 (7.5-8.4)	7.5 (7.1 – 7.9)	nd	6.8 (6.6 – 7.2) [#]	nd	nd
	Etude n°2 ^b						
	Contrôle	8.1 (8.0-8.5)	nd	nd	nd	nd	5.5 (4.8 – 6.2)
	FEP +AMK ^{**}	8.1 (8.0-8.5)	nd	nd	nd	nd	4 (2.8 – 5) [#]
	Etude n°4 ^c						
	Contrôle	8.2 (7.0-8.6)	nd	7.2 (6.4-7.7)	nd	6.5 (4.1-7.2)	nd
	FEP +AMK ^{**}	8.2 (7.0-8.6)	nd	6.9 (4.9-7.3)	nd	5.5 (4.7-6.5)	nd
	Animal leucopénique	Contrôle	7.9 (7.5-9.5)	nd	8.6 (7.4-9.0)	nd	7.5 (7.2-9.9)
FEP +AMK ^{**}		7.9 (7.5-9.5)	nd	8.1 (5.6-8.2) [#]	nd	6.3 (5.6-6.5) [#]	nd

Temps de mise en route du traitement après inoculation bactérienne ^a: 12h, ^b: 3h, ^c: 6h. * FEP 50 mg/kg 2x/j, AMK 18 mg/kg 1 x/j.

** FEP 60 mg/kg 2x/j, AMK 25 mg/kg 1 x/j.

[#] p<0.05 comparativement au groupe non traité.

Ceci démontre bien que dans un modèle expérimental infectieux, de la même manière que la pharmacocinétique humanisée des antibiotiques est à privilégier, **la clairance bactérienne spontanée doit être maîtrisée**. C'est seulement en s'affranchissant de ce dernier facteur confondant que l'évaluation de l'efficacité antibactérienne d'un traitement antibiotique, quand elle est réalisée en point final c'est-à-dire au moment du sacrifice, donne des résultats interprétables.

Dans tous nos travaux expérimentaux, les **concentrations plasmatiques antibiotiques ont été mesurées** chez tous les animaux au moment du sacrifice. Malgré une variabilité à la fois interindividuelle mais aussi liée à une hétérogénéité des doses, du nombre d'administration et du moment de prélèvement, ces **concentrations plasmatiques ont toujours montré une exposition adéquate** en accord avec les index pharmacologiques admis :

- un intervalle posologique $T > 4 \times \text{CMI}$ pour le céfépime, bon élément prédictif du succès microbiologique (Tam 2002) et,
- une valeur de $\text{Pic/CMI} \geq 8-12$ pour l'amikacine (Kashuba 1999, Moore 1987, Zelenetsky 2003). En effet, seule cette condition peut garantir un effet antibiotique maximal et faire considérer l'association comme une véritable bithérapie et non pas comme une monothérapie de fait. Le manque de suivi thérapeutique ou d'adaptation posologique des aminosides selon l'état physiologique du patient a trop souvent conduit certaines études cliniques à conclure à l'absence d'intérêt de l'association chez les patients atteints d'infections sévères à Gram négatif (Bliziotis 2005, Carmeli 1999, Chamot 2003, Cometta 1994, Paul 2004, Paul 2006, Sieger 1997).

En conclusion, la mise au point de notre modèle de pneumopathie expérimentale a suivi une démarche scientifique « pas à pas ». La bithérapie antibiotique « céfépime-amikacine »

a d'abord été évaluée en comparant une souche sauvage et son mutant hyperproducteur de céphalosporinase dérégulée, ensuite en comparant les résultats à ceux d'antibiotiques de référence (ceftazidime et imipénème), et enfin en comparant l'animal immunocompétent et immunodéprimé. Ce travail montre les limites possibles des modèles expérimentaux pour lesquels une analyse critique des résultats doit toujours être faite.

Notre dernier modèle optimisé, où sont associées **une clairance bactérienne spontanée minimisée et des concentrations antibiotiques adéquates**, confirme **l'efficacité de la bithérapie céfépime–amikacine dans le traitement d'une pneumopathie à *Enterobacter cloacae* producteur de céphalosporinase dérégulée**. Dans ces seules conditions, ce modèle expérimental devient pertinent et contributif à l'évaluation des antibiotiques utilisés en clinique humaine, comme par exemple en réanimation. En effet, le **niveau de la leucopénie induite** permet de rapprocher le modèle expérimental déjà complexe à la situation d'**immunodépression** observée chez certains de ces patients sévères (InVS 2010).

Cette immunodépression a minima, induite par une dose unique de cyclophosphamide, pourra également être utilisée dans d'autres modèles d'infection expérimentale où l'implantation bactérienne est difficile. Une réadministration de l'immunosuppresseur serait sans doute à considérer si l'évaluation antibiotique devait être testée sur une durée plus longue que les 30 heures de traitement évaluées dans notre dernière étude.

D'autre part, le fait que notre modèle expérimental soit mis en œuvre sans ventilation mécanique peut apparaître comme un point discutable dans l'étude des conditions de traitement antibiotique des pneumopathies en réanimation. En effet, les modèles expérimentaux qui l'associent sont en théorie plus représentatifs du patient de réanimation (Luna 2009). Un modèle de pneumonie chez le lapin, en comparant un groupe avec ventilation mécanique et l'autre sans, a montré que 12 et 24 heures après l'instillation

d'un inoculum calibré d'*Enterobacter aerogenes*, les titres pulmonaires bactériens étaient comparables. Par contre, 48 heures après l'inoculation, le comptage bactérien apparaît plus faible en l'absence de ventilation mécanique, la clairance bactérienne spontanée ayant prédominé (Charles 2002). Toutefois, dans notre modèle animal déjà complexe, la mise en place d'une ventilation mécanique aurait difficilement été applicable. En effet, même si elle est habituellement rencontrée dans des modèles de pneumonie chez le singe, le lapin ou le porcelet (Charles 2002, Goldstein 2002, Luna 2009), elle reste exceptionnelle chez le rat (Marchand 2005a).

Enfin, ce travail ouvre à d'autres perspectives, notamment à l'étude des facteurs de variation de la réponse à une antibiothérapie dans le cas des pneumonies bactériennes :

- variation liée aux particularités bien connues du patient de réanimation, qui peuvent influencer le comportement des médicaments et modifier leur effet : les apports liquidiens, les pertes hémorragiques, l'hypoalbuminémie, l'altération des fonctions rénales ou hépatiques, l'existence d'un syndrome inflammatoire ou d'un état de choc (Mimoz 1996) sont autant de situations pouvant affecter la biodisponibilité, la distribution et le métabolisme des antibiotiques. La technique de microdialyse constitue dorénavant un outil privilégié pour les études pharmacocinétiques-pharmacodynamiques des antibiotiques dans cette population à risque (Dahyot 2008, Müller 2004). Elle a largement été expérimentée pour les bêtalactamines et les carbapénèmes dans notre laboratoire, chez l'animal ou chez l'homme, au niveau musculaire, pulmonaire ou encore péritonéal (Dahyot 2006, Dahyot 2008, Dahyot 2010, Karjagin 2008, Lefeuvre 2008, Marchand 2005a, Marchand 2005b, Marchand 2005c). La mise au point de la mesure en continu par microdialyse des concentrations

libres d'amikacine a déjà été réalisée dans le muscle squelettique chez le rat sain.

L'exploration chez l'animal infecté puis le patient reste à poursuivre ;

- variation à partir de la voie d'administration : quelques études tant expérimentales (Goldstein 2002) que cliniques (Lu 2011) ont déjà évalué la pénétration tissulaire ainsi que l'efficacité des antibiotiques administrés par voie aérosol. Dans un modèle de porcelet ventilé sain ou infecté, les concentrations antibiotiques sont, au niveau pulmonaire, bien supérieures après administration par aérosol qu'après une perfusion intraveineuse (Goldstein 2002). Chez le patient de réanimation atteint de PAVM à *P. aeruginosa*, l'efficacité clinique de la ceftazidime et de l'amikacine quel que soit le mode d'administration IV ou aérosol a été comparable, avec cependant une moins grande émergence de souches résistantes après traitement par voie aérosol quand il s'agit d'une souche à sensibilité diminuée (Lu 2011). D'autres antibiotiques face à d'autres germes seraient à tester par cette voie d'administration ;

- variation à partir du type de médicaments antibiotiques administrés, génériques et médicament princeps : depuis la publication récente de Vesga et coll. en 2010 qui a mis en cause le principe de bioéquivalence des génériques de vancomycine face au médicament princeps dans un modèle d'infection de cuisse à *S. aureus* chez la souris immunodéprimée, il serait intéressant de tester cette problématique dans un modèle expérimental plus exigeant comme la pneumopathie expérimentale.

ANNEXE 1

Répartition détaillée des micro-organismes isolés (tous épisodes).

D'après InVS 2010 (tableau 42-REA RAISIN 2009).

Micro-organismes	Codes	Pneumop.	
		n	%
Cocci Gram +		880	26,2
<i>Staphylococcus aureus</i>	STA AUR	592	17,6
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	STA EPI	41	1,2
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	STA HAE	11	0,3
Staph. coag. nég.: autre espèce identifiée	STA AUT	21	0,6
Staph. coag. nég. non spécifié	STA NSP	20	0,6
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (pneumocoque)	STR PNE	79	2,4
<i>Streptococcus agalactiae</i> (B)	STR AGA	4	0,1
<i>Streptococcus pyogenes</i> (A)	STR PYO	1	0,0
<i>Streptococcus</i> hémolytique: autres (C, G)	STR HCG	16	0,5
<i>Streptococcus</i> (viridans) non groupable	STR NGR	19	0,6
<i>Streptococcus</i> autres	STR AUT	37	1,1
<i>Enterococcus faecium</i>	ENC FAC	7	0,2
<i>Enterococcus faecalis</i>	ENC FAE	29	0,9
<i>Enterococcus</i> autres	ENC AUT	1	0,0
<i>Enterococcus</i> non spécifié	ENC NSP	2	0,1
Cocci Gram+: autres	CGP AUT		
Cocci Gram-		25	0,7
<i>Moraxella</i>	MOR SPP	12	0,4
<i>Neisseria meningitidis</i>	NEI MEN	2	0,1
<i>Neisseria</i> autres	NEI AUT	8	0,2
Cocci Gram-: autres	CGN AUT	3	0,1
Bacilles Gram+		8	0,2
<i>Corynebactéries</i>	COR SPP	6	0,2
<i>Bacillus</i>	BAC SPP		
<i>Lactobacillus</i>	LAC SPP	1	0,0
<i>Listeria monocytogenes</i>	LIS MON		
Bacilles Gram+: autres	BGP AUT	1	0,0
Entérobactéries		1 078	32,1
<i>Citrobacter freundii</i>	CIT FRE	21	0,6
<i>Citrobacter koseri</i> (ex. diversus)	CIT KOS	37	1,1
<i>Citrobacter</i> autres	CIT AUT	9	0,3
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ENT AER	91	2,7
<i>Enterobacter cloacae</i>	ENT CLO	137	4,1
<i>Enterobacter</i> autres	ENT AUT	6	0,2
<i>Escherichia coli</i>	ESC COL	337	10,0
<i>Hafnia</i>	HAF SPP	36	1,1
<i>Klebsiella oxytoxa</i>	KLE OXY	62	1,8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KLE PNE	132	3,9
<i>Klebsiella</i> autres	KLE AUT	3	0,1
<i>Morganella</i>	MOG SPP	33	1,0
<i>Proteus mirabilis</i>	PRT MIR	61	1,8
<i>Proteus</i> autres	PRT AUT	14	0,4
<i>Providencia</i>	PRV SPP	4	0,1
<i>Salmonella typhi</i> ou paratyphi	SAL TYP		
<i>Salmonella</i> autre	SAL AUT		
<i>Serratia</i>	SER SPP	92	2,7
<i>Shigella</i>	SHI SPP		
Entérobactéries: autres	ETB AUT	3	0,1
Bacilles Gram-non entérobactéries		1 087	32,4
<i>Achromobacter</i>	ACH SPP	5	0,1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ACI BAU	79	2,4
<i>Acinetobacter</i> autres	ACI AUT	6	0,2
<i>Aeromonas</i>	AEM SPP		
<i>Agrobacterium</i>	AGR SPP		
<i>Alcaligenes</i>	ALC SPP	2	0,1
<i>Burkholderia cepacia</i>	BUR CEP	1	0,0
<i>Campylobacter</i>	CAM SPP		
<i>Flavobacterium</i>	FLA SPP		
<i>Gardnerella</i>	GAR SPP		

Micro-organismes	Codes	Pneumop.	
		n	%
<i>Haemophilus</i>	HAE SPP	165	4,9
<i>Helicobacter pylori</i>	HEL PYL	1	0,0
<i>Legionella</i>	LEG SPP	1	0,0
<i>Pasteurella</i>	PAS SPP	1	0,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PSE AER	713	21,2
<i>Pseudomonas</i> autres et apparentés	PSE AUT	4	0,1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	STE MAL	106	3,2
Bacille Gram- non entérobactérie: autres	BGN AUT	3	0,1
Anaérobies stricts		15	0,4
<i>Bacteroides fragilis</i>	BAT FRA	2	0,1
<i>Bacteroides</i> autres	BAT AUT	1	0,0
<i>Clostridium difficile</i>	CLO DIF	1	0,0
<i>Clostridium</i> autres	CLO AUT		
<i>Prevotella</i>	PRE SPP	4	0,1
<i>Propionibacterium</i>	PRO SPP	5	0,1
<i>Anaérobies</i> : autres	ANA AUT	2	0,1
Autres bactéries		5	0,1
<i>Actinomyces</i>	ACT SPP		
<i>Chlamydia</i>	CHL SPP		
Mycobactérie atypique	MYC ATY		
Mycobactérie complexe <i>tuberculosis</i>	MYC TUB		
<i>Mycoplasma</i>	MYP SPP		
<i>Nocardia</i>	NOC SPP		
Bactéries: autres	BCT AUT	5	0,1
Champignons/parasites		165	4,9
<i>Candida albicans</i>	CAN ALB	104	3,1
<i>Candida</i> autres	CAN AUT	29	0,9
<i>Aspergillus fumigatus</i>	ASP FUM	16	0,5
<i>Aspergillus</i> autres	ASP AUT	5	0,1
Levures: autres	LEV AUT	8	0,2
Filaments: autres	FIL AUT	2	0,1
Parasites: autres	PAR AUT	1	0,0
Virus		5	0,1
Adenovirus	VIRADV		
CMV (cytomégalovirus)	VIRCMV	1	0,0
Enterovirus (polio, coxsackie, echo)	VIRENT		
Grippe (influenzae)	VIRINF	1	0,0
Hépatite virale A	VIRHAV		
Hépatite virale B	VIRHBV		
Hépatite virale C	VIRHCV		
Rotavirus	VIRROT		
VIH (virus de l'immunodéficience humaine)	VIRVIH		
Herpès simplex virus	VIRHSV	3	0,1
Varicello-zona virus	VIRVZV		
VRS (virus respiratoire syncytial)	VIRVRS		
Virus: autres	VIRAUT		
Non retrouvé ou non recherché	NON IDE	54	1,6
Examen non effectué	NON EFF	29	0,9
Examen stérile	EXA STE	8	0,2
Total		3 359	100,0

BIBLIOGRAPHIE

Afssaps – Mise au point sur le bon usage des aminosides par voie injectable ; gentamicine, tobramycine, nétilmicine, amikacine et isépamicine. Mars 2011

Agence Nationale d'accréditation et d'évaluation en santé (ANAES). Recommandations sur le bon usage des antibiotiques. 1997.

Aliberti S., Di Pasquale M., Zanaboni A.M., Cosentini R., Brambilla A.M., Seghezzi S., Tarsia P., Mantero M., Blasi F. Stratifying risk factors for multidrug-resistant pathogens in hospitalized patients coming from the community with pneumonia. *Clin Infect Dis.* 2012 ; 54: 470-78.

Ambler R.P. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980 ; 289: 321-31.

Ambrose P.G., Bhavnani S.M., Ellis-Grosse E.J., Drusano G.L. Pharmacokinetic-pharmacodynamic considerations in the design of hospital-acquired or ventilator-associated bacterial pneumonia studies: Look before you leap !. *Clin Infect Dis.* 2010 ; 51: S103-S110.

American Thoracic Society. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005 ; 171: 388-416.

Andes D., Craig W.A. Animal model pharmacokinetics and pharmacodynamics: a critical review. *Int J Antimicrob Agents.* 2002 ; 9: 261-68.

Aubert G., Carricajo A., Coudrot M., Guyomarc'h S., Auboyer C., Zeni F. Prospective determination of serum ceftazidime concentrations in intensive care units. *Ther Drug Monit.* 2010 ; 32: 517-19.

Bakker-Woudenberg I.A. Experimental models of pulmonary infection. *J Microbiol Methods.* 2003 ; 54: 295–313.

Baldwin D.R., Wise R., Andrews J.M., Honeybourne D. Microlavage: a technique for determining the volume of epithelial lining fluid. *Thorax.* 1991 ; 46: 658-62.

Baldwin D.R., Honeybourne D., Wise R. Pulmonary disposition of antimicrobial agents: Methodological considerations. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992 ; 36: 1171-75.

Barnaud G., Labia R., Raskine L., Sanson-Le Pors M.J., Philippon A., Arlet G. Extension of resistance to cefepime and ceftazidime associated to a six amino acid deletion in the H-10 helix of the cephalosporinase of an *Enterobacter cloacae* clinical isolate. FEMS Microbiol Lett. 2001 ; 195: 185-90.

Barochia A.V., Cui X., Vitberg D., Suffredini A.F., O'Grady N.P., Banks S.M., Minneci P., Kern S.J., Danner R.L., Natanson C., Eichacker P.Q. Bundled care for septic shock: an analysis of clinical trials. Crit Care Med. 2010 ; 38: 668-78.

Barza M. A critique of animal models in antibiotic research. Scand J Infect Dis. 1978 ; 14 Suppl: 109-17.

Beaucaire G., Leroy O., Beuscart C., Karp P., Chidiac C., Caillaux M. Clinical and bacteriological efficacy, and practical aspects of amikacin given once daily for severe infections. J Antimicrob Chemother. 1991 ; 27 Suppl C: 91-103.

Bedos J.P., Rieux V., Bauchet J., Muffat-Joly M., Carbon C., Azoulay-Dupuis E. Efficacy of trovafloxacin against penicillin-susceptible and multi-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae* in a mouse pneumonia model. Antimicrob Agents Chemother. 1998 ; 42: 862-67.

Bellais S., Mimoz O., Léotard S., Jacolot A., Petitjean O., Nordmann P. Efficacy of beta-lactams for treating experimentally induced pneumonia due to a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase-producing strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2002 ; 46: 2032-34.

Bellido F., Pechère, J.C., Hancock R.E.W. Reevaluation of the factors involved in the efficacy of new beta-lactams against *E. cloacae*. Antimicrob Agents Chemother. 1991 ; 35: 73-8.

Bliziotis I.A., Samonis G., Vardakas K.Z., Chrysanthopoulou S., Falagas M.E. Effect of aminoglycoside and beta-lactam combination therapy *versus* beta-lactam monotherapy on the emergence of antimicrobial resistance: a meta-analysis of randomized, controlled trials. Clin Infect Dis. 2005 ; 41: 149-58.

Bonnet R. Bêtalactamines et entérobactéries. In « AntibioGramme 3^{ème} édition », Courvalin P., Leclercq R. (Eds), 2011 ; Editions Eska, Paris, France. pp 165-188.

Boselli E., Allaouchiche B. Diffusion pulmonaire des antibiotiques. Analyse critique de la littérature. Ann Fr Anesth Reanim. 2001 ; 20: 612-30.

Boselli E., Breilh D., Duflo F., Saux M.C., Debon R., Chassard D., Allaouchiche B. Steady-state plasma and intrapulmonary concentrations of cefepime administered in continuous infusion in critically ill patients with severe nosocomial pneumonia. Crit Care Med. 2003 ; 31: 2102-06.

Boselli E., Breilh D., Saux M.C., Gordien J.B., Allaouchiche B. Pharmacokinetics and lung concentrations of ertapenem in patients with ventilator-associated pneumonia. Intensive Care Med. 2006 ; 32: 2059-62.

Boselli E., Beilh D., Djabarouti S., Guillaume C., Rimmele T., Gordien J.B., Xuereb F., Saux M.C., Allaouchiche B. Reliability of mini-bronchoalveolar lavage for the measurement of epithelial lining fluid concentrations of tobramycin in critically ill patients. Intensive Care Med. 2007 ; 33: 1519-23.

Boselli E., Breilh D., Rimmelé T., Guillaume C., Xuereb F., Saux M.C., Bouvet L., Chassard D., Allaouchiche B. Alveolar concentrations of piperacillin/tazobactam administered in continuous infusion to patients with ventilator-associated pneumonia. Crit Care Med. 2008 ; 36: 1500-06.

Bugnon D., Potel G., Xiong Y.Q., Caillon J., Kergueris M.F., Le Conte P., Baron D., Drugeon H. *In vivo* antibacterial effects of simulated human serum profiles of once-daily versus thrice-daily dosing of amikacin in a *Serratia marcescens* endocarditis experimental model. Antimicrob Agents Chemother. 1996 ; 40: 1164-69.

Bugnon D., Potel G., Caillon J., Baron D., Drugeon H.B. *In vivo* simulation of human pharmacokinetics in the rabbit. Bull Mathemat Biol. 1998 ; 60: 545-67.

Burtin M., Laouari D., Kindermans C., Kleinknecht C. Glomerular response to acute protein load is not blunted by high-protein diet or nephron reduction. Am J Physiol. 1994 ; 266: F746-F755.

Bush K., Jacoby G.A., Medeiros A.A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995 ; 39: 1211-33.

Carbon C. L'utilisation des modèles expérimentaux animaux dans l'étude des associations d'antibiotiques. *Med Mal Infect.* 1989 ; 19: 685-90.

Carlet J. Intérêt clinique de l'administration intraveineuse continue de la ceftazidime. *Antibiotiques.* 2002 ; 4: 5-8.

Carmeli Y., Troillet N., Eliopoulos G.M., Samore M.H. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999 ; 43: 1379-82.

CDC NNIS System. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued october 2004. *Am J Infect Control.* 2004 ; 32: 470-85.

Chamot E., Boffi El Amari E., Rohner P., Van Delden C. Effectiveness of combination antimicrobial therapy for *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 ; 47: 2756-64.

Charles P.E., Piroth L., Desbiolles N., Lequeu C., Martin L., Portier H., Chavanet P. New model of ventilator-associated pneumonia immunocompetent rabbits. *Crit Care Med.* 2002 ; 30: 2278-83.

Chastre J., Fagon J.Y. Ventilator-associated Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 ; 165: 867-903.

Chastre J., Wolff M., Fagon J.Y., Chevret S., Thomas F., Wermert D., Clementi E., Gonzalez J., Jusserand D., Asfar P., Perrin D., Fieux F., Aubas S., for the PneumA Trial Group. Comparison of 8 vs 15 days of antibiotic therapy for ventilator-associated pneumonia in adults: a randomized trial. *JAMA.* 2003 ; 290: 2588-98.

Chaudhary M., Shrivastava S.M., Varughese L., Seghal R. Efficacy and safety evaluation of fixed dose combination of cefepime and amikacine in comparison with cefepime alone in treatment of nosocomial pneumonia patients. *Curr Clin Pharmacol.* 2008 ; 3: 118-22.

Choi S.H., Lee J.E., Park S.J., Choi S.H., Lee S.O., Jeong J.Y., Kim M.N., Woo J. H., Kim Y.S. Emergence of antibiotic resistance during therapy for infections caused by Enterobacteriaceae producing AmpC beta-lactamase: Implications for antibiotic use. Antimicrob Agents Chemother. 2008 ; 52: 995-1000.

Chow J. W., Fine M. J., Shlaes D. M., Quinn J.P., Hooper D.C., Johnson M.P., Ramphal R., Wagener M.M., Miyashiro D.K., Yu V.L. Enterobacter bacteremia: clinical features and emergence of antibiotic resistance during therapy. Ann Intern Med. 1991 ; 115: 585-90.

Cometta A., Baumgartner J.D., Lew D., Zimmerli W., Pittet D., Chopart P., Schaad U., Herter C., Eggiman P., Huber O., Ricou B., Suter P., Auckenthaler R., Chiolero R., Bille J., Scheidegger C., Frei R., Glauser M.P. Prospective randomized comparison of imipenem monotherapy with imipenem plus netilmicin for treatment of severe infections in non neutropenic patients. Antimicrob Agents Chemother. 1994 ; 38:1309-13.

Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Comité 2010. <http://www.sfm.asso.fr>

Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Comité 2011. <http://www.sfm.asso.fr>

Craig W.A., Legett J., Totsuka K., Vogelmann B. Key pharmacokinetic parameters of antibiotic efficacy in experimental animal infections. J Drug Dev. 1988 ; 1 (Suppl 3): 7-15.

Craig, W.A., Redington J, Ebert S.C. Pharmacodynamics of amikacin *in vitro* and in mouse thigh and lung infections. J Antimicrob Chemother. 1991 ; 27 Suppl C: 29-40.

Craig W.A., Gudmundsson S. The postantibiotic effect. In «Antibiotics in Laboratory Medicine 4th ed. », V. Lorian. (Eds). 1996 ; Williams and Wilkins, Baltimore, USA. pp 296-329.

CTNILS. Ministère de la sante, de la jeunesse et des sports Définitions des Infections associées aux soins. Mai 2007.

Curtis N.A.C., Eisenstadt R.L., Rudd C., White A.J. Inducible Type 1 beta-lactamases of Gram-negative bacteria and resistance to beta-lactam antibiotics. J Antimicrob Chemother. 1986 ; 17: 51-61.

Dalhoff A., Ullmann U. Correlation between pharmacokinetics, pharmacodynamics and efficacy of antibacterial agents in animal models. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1990 ; 9: 479-87.

Dallas J, Brown S.M., Hock K., Scott M.G., Skrupky L.P., Boyle W.A. 3rd, Kollef M.H. Diagnostic utility of plasma procalcitonin for nosocomial pneumonia in the intensive care unit setting. *Respir Care.* 2011 ; 56: 412-19.

Damas P., Garweg C., Monchi M., Nys M., Canivet J.L., Ledoux D., Preiser J.C. Combination therapy *versus* monotherapy: a randomised pilot study on the evolution of inflammatory parameters after ventilator associated pneumonia. *Crit Care.* 2006 ; 10: R52.

Dahyot C., Marchand S., Pessini G.L., Pariat C., Debaene B., Couet W., Mimoz O. Microdialysis study of imipenem distribution in skeletal muscle and lung extracellular fluids of *Acinetobacter baumannii*-infected rats. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 ; 50: 2265-67.

Dahyot C., Marchand S., Bodin M., Debaene B., Mimoz O., Couet W. Application of basic pharmacokinetic concepts to analysis of microdialysis data: illustration with imipenem muscle distribution. *Antimicrob Chemother.* 2008 ; 47 :181-9.

Dahyot-Fizelier C., Lefeuvre S., Laksiri L., Marchand S., Sawchuk R.J., Couet W., Mimoz O. Kinetics of imipenem distribution into the peritoneal fluid of patients with severe peritonitis studied by microdialysis. *Clin Pharmacokinet.* 2010 ; 49 :323-34.

De Champs C., Chanal C., Sirot D, Baraduc R., Romaszko J.P., Bonnet R., Plaidy A., Boyer M. Carroy E., M.C. Gbadamassi, S. Laluque, O. Oules, M.C. Poupart, M.Villemain, J. Sirot. Frequency and diversity of class A extended-spectrum beta-lactamases in hospitals of the Auvergne, France: a 2 year prospective study. *J Antimicrob Chemother.* 2004 ; 54: 634-39.

Delattre I.K., Musuamba F.T., Verbeeck R.K., Dugernier T., Spapen H., Laterre P.F., Wittebole X., Cumps J., Taccone F.S., Vincent J.L., Jacobs F., Wallemacq P.E. Empirical models for dosage optimization of four beta-lactams in critically ill septic patients based on therapeutic drug monitoring of amikacin. *Clin Biochem.* 2010 ; 43: 589-98.

Delattre I.K., Musuamba F.T., Jacqmin P., Taccone F.S., Laterre P.F., Verbeeck R.K., Jacobs F., Wallemacq P. Population pharmacokinetics of four β -lactams in critically ill septic patients comedicated with amikacin. Clin Biochem. 2012 ; 45:780-86.

Dupont H., Montravers P., Gauzit R., Veber B., Pouriat J.L., Martin C. Club d'Infectiologie en Anesthésie-Reanimation. Outcome of postoperative pneumonia in the Eole study. Intensive Care Med. 2003 ; 29: 179-88.

Drusano G.L., Fregeau C., Liu W., Brown D.L., Louie A. Impact of burden on granulocyte clearance of bacteria in a mouse thigh infection model. Antimicrob Agents Chemother. 2010 ; 54: 4368-72.

Drusano G.L., VanScoy B., Liu W., Fikes S., Brown D., Louie A. Saturability of granulocyte kill of *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of pneumonia. Antimicrob Agents Chemother. 2011a ; 55: 2693-95.

Drusano G.L., Liu W., Kulawy R., Louie A. Impact of granulocytes on the antimicrobial effect of tedizolid in a mouse thigh infection model. Antimicrob Agents Chemother. 2011b ; 55: 5300-05.

Dubé L., Caillon J., Gras-Le Guen C., Jacqueline C., Kergueris M.F., Granry J.C., Potel G., Bugnon D. Simulation of human gentamicin pharmacokinetics in an experimental *Enterococcus faecalis* endocarditis model. Antimicrob Agents Chemother. 2003 ; 47: 3663-66.

Ehrhardt A.F., Sanders C.C. Beta-lactam resistance amongst Enterobacter species. J Antimicrob Chemother. 1993 ; 32 Suppl B, 1-11.

Endimiani A., Hujer K.M., Hujer A.M., Kurz S., Jacobs M.R., Perlin D.S., Bonomo R.A. Are we ready for novel detection methods to treat respiratory pathogens in hospital-acquired pneumonia? Clin Infect Dis. 2011 ; 52 Suppl 4:S373-83.

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

Fantin B. Modèles expérimentaux : quels modèles peuvent encore apporter des informations dans le traitement des infections bactériennes ? Réanimation. 2006 ; 15: 214-20.

Fernandez-Cuenca F., Rodriguez-Martinez J.M., Martinez-Martinez L., Pascual A. *In vivo* selection of *Enterobacter aerogenes* with reduced susceptibility to cefepime and carbapenems associated with decreased expression of a 40 kDa outer membrane protein and hyperproduction of AmpC beta-lactamase. *Int J Antimicrob Agents*. 2006 ; 27: 549-52.

Ferrer R., Artigas A., Levy M.M., Blanco J., González-Díaz G., Garnacho-Montero J., Ibáñez J., Palencia E., Quintana M., de la Torre-Prados M.V. Edusepsis Study Group. Improvement in process of care and outcome after a multicenter severe sepsis educational program in Spain. *JAMA*. 2008 ; 299: 2294-303.

Flecknell P.A. Anaesthesia of animals for biomedical research. *Br J Anaesth*. 1993 ; 71: 885-94.

Forgue S.T., Shyu W.C., Gleason C.R., Pittman K.A., Barbhaiya R.H. Pharmacokinetics of the novel cephalosporin cefepime (BMY-28142) in rats and monkeys. *Antimicrob Agents Chemother*. 1987 ; 31: 799-804.

Gaines Das R.E., North D. Implications of experimental technique for analysis and interpretation of data from animal experiments: outliers and increased variability resulting from failure of intraperitoneal injection procedures. *Lab Anim*. 2007 ; 41: 312-20.

Gálvez R., Luengo C., Cornejo R., Kosche J., Romero C., Tobar E., Illanes V., Llanos O., Castro J. Higher than recommended amikacin loading doses achieve pharmacokinetic targets without associated toxicity. *Int J Antimicrob Agents*. 2011 ; 38: 146-51.

Garnacho-Montero J., Garcia-Garmendia J.L., Barrero-Almodovar A., Jimenez-Jimenez F.J., Perez-Paredes C., Ortiz-Leyba C. Impact of adequate empirical antibiotic therapy on the outcome of patients admitted to the intensive care unit with sepsis. *Crit Care Med*. 2003 ; 31: 2742-51.

Georges B., Conil J.M., Cougot P., Decun J.F., Archambaud M., Seguin T., Chabanon G., Virenque C., Houin G., Saivin S. Cefepime in critically ill patients: continuous infusion vs an intermittent dosing regimen. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2005 ; 43: 360-69.

Georges B., Conil J.M., Seguin T., Ruiz S., Minville V., Cougot P., Decun J.F., Gonzalez H., Houin G., Fourcade O., Saivin S. Population pharmacokinetics of ceftazidime in intensive care unit patients: influence of glomerular filtration rate, mechanical ventilation, and reason for admission. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 ; 53: 4483-89.

Gerber A.U., Craig W.A., Brugger H.P., Feller C., Vastola A.P., Brandel J. Impact of dosing intervals on activity of gentamicin and ticarcillin against *Pseudomonas aeruginosa* in granulocytopenic mice. *J Inf Dis.* 1983 ; 147: 910-17.

Gerber A.U., Brugger H.P., Feller C., Stritzko T., Stalder B. Antibiotic therapy of infections due to *Pseudomonas aeruginosa* in normal and granulocytopenic mice: comparison of murine and human pharmacokinetics. *J Infect Dis.* 1986 ; 153: 90-97.

Gerber A.U., Kozak S., Segessenmann C., Flückiger U., Bangerter T., Greter U. 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.* 1989 ; 8: 233-37.

Giacomini K.M., Roberts S.M., Levy G. Evaluation of methods for producing renal dysfunction in rats. *J Pharm Sci.* 1981 ; 70: 117-21.

Goldstein I., Wallet F., Robert J., Becquemin M.H., Marquette C.H., Rouby J.J., and the experimental ICU Study Group. Lung tissue concentrations of nebulized amikacin during mechanical ventilation in piglets with healthy lungs. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 ; 165: 171-75.

Gómez C.M., Cordingley J.J., Palazzo M.G. Altered pharmacokinetics of ceftazidime in critically ill patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 ; 43: 1798-802.

Growcott E.J., Coulthard A., Amison R., Hardaker E.L, Saxena V., Malt L., Jones P., Grevot A., Poll C., Osborne C., Banner K.H. Characterisation of a refined rat model of respiratory infection with *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of ciprofloxacin. *J Cyst Fibros.* 2011 ; 10: 166-74.

Guo B., Abdelraouf K., Ledesma K.R., Chang K.T., Nikolaou M., Tam V.H. Quantitative impact of neutrophils on bacterial clearance in a murine pneumonia model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 ; 55: 4601-05.

Hancock R.E., Bellido F. Factors involved in the enhanced efficacy against gram-negative bacteria of fourth generation cephalosporins. *J Antimicrob Chemother.* 1992 ; 29 (Sup A): 1-6.

Harbarth S., Ferrière K., Hugonnet S., Ricou B., Suter P., Pittet D. Epidemiology and prognostic determinants of bloodstream infections in surgical intensive care. *Arch Surg.* 2002 ; 137: 1353-59.

Hatano K., Wakai Y., Watanabe Y., Mine Y. Simulation of human plasma levels of β -lactams in mice by multiple dosing and the relationship between the therapeutic efficacy and pharmacodynamic parameters. *Chemotherapy.* 1994 ; 40: 1-7.

Haute Autorité de Santé (HAS). Stratégie d'antibiothérapie et prévention des résistances bactériennes en établissement de santé. 2008.

Heyland D.K., Dodek P., Muscedere J., Day A., Cook D. Canadian Critical Care Trials Group. Randomized trial of combination *versus* monotherapy for the empiric treatment of suspected ventilator-associated pneumonia. *Crit Care Med.* 2008 ; 36: 737-44.

Hilf M., V.L. Yu, Sharp J., Zuravleff J.J., Korvick J.A., Muder R.R. Antibiotic therapy for *Pseudomonas aeruginosa* bacteriemia: outcome correlations in a prospective study of 200 patients. *Am J Med.* 1989 ; 87: 540-46.

Hoffmann H., Roggenkamp A. Population genetics of the nomenspecies *Enterobacter cloacae*. *Appl Environ Microbiol.* 2003 ; 69: 5306-18.

Hughes J.M., Culver D.H., White J.W. Nosocomial infection surveillance, 1980-1982. *MMWR CDC Surveill Summ.* 1983 ; 32: 188.

Ibrahim E.H., Sherman G., Ward S., Fraser V.J., Kollef M.H. The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Chest.* 2000 ; 118: 146-55.

Ikeda F., Wakai Y., Matsumoto S., Maki K., Watabe E., Tawara S., Goto T., Watanabe Y., Matsumoto F., Kuwahara S. Efficacy of FK463, a new lipopeptide antifungal agent, in mouse models of disseminated candidiasis and aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000 ; 44: 614-18.

Institut de veille sanitaire (InVs). Surveillance des infections nosocomiales en réanimation adulte – Réseau REA-RAISIN, France, résultats 2009. Saint-Maurice (France) : octobre 2010, 43 p. Disponible sur : www.invs.sante.fr.

Jacolot A., Mimoz O., Nicolas P., Petitjean O. In « Infections et antibiothérapie en réanimation, aux urgences et en chirurgie » Martin C., Gouin F. (Eds), 2000 ; Arnette, Rueil-Malmaison, France. pp. 1001-1027.

Jaruratanasirikul S., Sriwiriyan S., Ingviya N. Continuous infusion *versus* intermittent administration of cefepime in patients with Gram-negative bacilli bacteraemia. J Pharm Pharmacol. 2002 ; 4: 1693-96.

Jehl F., Levêque D. Perfusion continue des bêtalactamines : intérêts, inconvénients, modalités pratiques. Réanimation. 2009 ; 18: 343-52.

Jehl F., Koebel C. Antibiotiques-bactéries : une relation pharmacodynamique. Revue Francophone des Laboratoires. 2011 ; 41: 45-56.

Johnson M.T., Reichley R., Hoppe-Bauer J., Dunne W.M., Micek S., Kollef M. Impact of previous antibiotic therapy on outcome of Gram-negative severe sepsis. Crit Care Med. 2011 ; 39: 1859-65.

Jones R.N., Baquero F., Privitera G., Inoue M., Wiedemann B. Inducible beta-lactamase-mediated resistance to third generation cephalosporins. Clin Microbiol Infect. 1997 ; 3: S7-S20.

Jones R.N., Biedenbach D.J., Gales A.C. Sustained activity and spectrum of selected extended-spectrum betalactams (carbapenems and cefepime) against *Enterobacter* spp. and ESBL-producing *Klebsiella* spp.: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (USA, 1997-2000). Int J Antimicrob Agents. 2003 ; 21: 1-7.

Karjagin J., Lefeuvre S., Oselin K., Kipper K., Marchand S., Tikkerberi A., Starkopf J., Couet W., Sawchuk R.J. Pharmacokinetics of meropenem determined by microdialysis in the peritoneal fluid of patients with severe peritonitis associated with septic shock. Clin Pharmacol Ther. 2008 ; 83: 452-9.

Kashuba A.D., Nafziger A.N., Drusano G.L., Bertino J.S. Jr. Optimizing aminoglycoside therapy for nosocomial pneumonia caused by Gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 ; 43: 623-29.

Kasiakou S.K., Sermaides G. J., Michalopoulos A., Soteriades E.S., Falagas M.E. Continuous *versus* intermittent intravenous administration of antibiotics: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Lancet Infect Dis.* 2005 ; 5: 581-89.

Kaye K.S., Cosgrove S., Harris A., Eliopoulos G.M., Carmeli Y. Risk factors for emergence of resistance to broad-spectrum cephalosporins among *Enterobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 ; 45: 2628-30.

Kiem S., Schentag J. J. Interpretation of antibiotic concentration ratios measured in epithelial lining fluid. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 ; 52: 24-36.

Kollef M.H., Morrow L.E., Niederman M.S., Leeper K.V., Anzueto A., Benz-Scott A., Rodino F.J. Clinical characteristics and treatment patterns among patients with ventilator-associated pneumonia. *Chest.* 2006a ; 129: 1210-18.

Kollef M.H. Providing appropriate antimicrobial therapy in the intensive care unit: surveillance vs. de-escalation. *Crit Care Med.* 2006b ; 34: 903-5.

Kollef M.H. Microbiological diagnosis of ventilator-associated pneumonia: using the data to optimize clinical outcomes. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006c ; 173: 1182-84.

Kumar A., Leonard M.C., Cleveland R.P. Development of a leukocytopenic baby guinea pig model with azathioprine and cyclophosphamide. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 1989 ; 12: 91-94.

Kumar A., Roberts D., Wood K.E., Light B., Parrillo J.E., Sharma S., Suppes R., Feinstein D., Zanotti S., Taiberg L., Gurka D., Kumar A., Cheang M. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med.* 2006 ; 34: 1589-96.

Lee S.O., Kim Y.S., Kim B.N., Kim M.N., Woo J.H., Ryu J. Impact of previous use of antibiotics on development of resistance to extended-spectrum cephalosporins in patients with *Enterobacter* bacteremia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002 ; 21: 577-81.

Leenders A.C., de Marie S., ten Kate M.T., Bakker-Woudenberg I.A., Verbrugh H.A. Liposomal amphotericin B (AmBisome) reduces dissemination of infection as compared with amphotericin B deoxycholate (Fungizone) in a rat model of pulmonary aspergillosis. *J Clin Pharmacokinet.* 1996 ; 38: 215-25.

Lefevre S., Marchand S., Pariat C., Lamarche I., Couet W. Microdialysis study of imipenem distribution in the peritoneal fluid of rats with experimental acute pancreatitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 ; 52: 1516-18.

Lehmann L.E., Herpichboehm B., Kost G.J., Kollef M.H., Stüber F. Cost and mortality prediction using polymerase chain reaction pathogen detection in sepsis: evidence from three observational trials. *Crit Care.* 2010 ; 14: R186.

Leibovici L., Shraga I., Drucker M., Konigsberger H., Samra Z., Pitlik S.D. The benefit of appropriate empirical antibiotic treatment in patients with bloodstream infection. *J Intern Med.* 1998 ; 244: 379-86.

Li X.Z., Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria : an update. *Drugs.* 2009 ; 69: 1555-623.

Lin M.Y., Weinstein R.A., Hota B. Delay of active antimicrobial therapy and mortality among patients with bacteremia: impact of severe neutropenia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 ; 52: 3188-94.

Lipman J., Gomersall C.D., Gin T., Joynt G.M., Young R.J. Continuous infusion ceftazidime in intensive care: a randomized controlled trial. *J Antimicrob Chemother.* 1999 ; 43: 309-11.

Livermore D.M. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1995 ; 8: 557-84.

Lu Q., Yang J., Liu Z., Gutierrez C., Aymard G., Rouby J.J., and the Nebulized Antibiotics Study Group. Nebulized ceftazidime and amikacin in ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011 ; 184: 106-15.

Luna C.M., Vujacich P., Niederman M.S., Vay C., Gherardi C., Matera J., Jolly E.C. Impact of BAL data on the therapy and outcome of ventilator-associated pneumonia. *Chest*. 1997 ; 111: 676-85.

Luna C.M., Sibila O., Agusti C., Torres A. Animal models of ventilator-associated pneumonia. *Eur Respir J*. 2009 ; 33: 182-88.

Luyt C.E., Combes A., Trouillet J.L., Chastre J. Biomarkers to optimize antibiotic therapy for pneumonia due to multidrug-resistant pathogens. *Clin Chest Med*. 2011 ; 32: 431-38.

Lyman G.H., Michels S.L., Reynolds M.W., Barron R., Tomic K.S., Yu J. Risk of mortality in patients with cancer who experience febrile neutropenia. *Cancer*. 2010 ; 116 : 5555-63.

MacArthur R.D., Miller M., Albertson T., Panacek E., Johnson D., Teoh L., Barchuk W. Adequacy of early empiric antibiotic treatment and survival in severe sepsis: experience from the MONARCS trial. *Clin Infect Dis*. 2004 ; 38: 284-88.

MacGowan A.P., Bower K.E. Continuous infusion of beta-lactam antibiotics. *Clin Pharmacokinet*. 1998 ; 35: 391-402.

Mahmood I., Waters D.H. A comparative study of uranyl nitrate and cisplatin- induced renal failure in rat. *Eur J Drug Metabol Pharmacokin*. 1994 ; 19: 327-36.

Marchand S., Dahyot C., Lamarche I., Mimoz O., Couet W. Microdialysis study of imipenem distribution in skeletal muscle and lung extracellular fluids of noninfected rats. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005a ; 49: 2356-61.

Marchand S., Chenel M., Lamarche I., Couet W. Pharmacokinetic modeling of free amoxicillin concentrations in rat muscle extracellular fluids determined by microdialysis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005b ; 49: 3702-06.

Marchand S., Dahyot C., Lamarche I., Plan E., Mimoz O., Couet W. Lack of effect of experimental hypovolemia on imipenem muscle distribution in rats assessed by microdialysis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005c ; 49: 4974-79.

Marcus R., Paul M., Elphick H., Leibovici L. Clinical implications of beta-lactam-aminoglycoside synergism: systematic review of randomised trials. *Int J Antimicrob Agents*. 2011 ; 37: 491-503.

Marik P.E., Lipman J., Kobilski S., Scribante J. A prospective randomized study comparing once- versus twice-daily amikacin dosing in critically ill adult and paediatric patients. *J Antimicrob Chemother.* 1991 ; 28: 753-64.

Máthé A., Komka K., Forczig M., Szabo D., Anderlik P., Rosgonyi F. The effect of different doses of cisplatin on the pharmacokinetic parameters of cefepime in mice. *Lab Anim.* 2006 ; 40: 296-300.

Micek, S.T., Lloyd A.E., Ritchie D.J., Reichley R.M., Fraser V.J., Kollef M.H. *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection: importance of appropriate initial antimicrobial treatment. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 ; 49: 1306-11.

Mimoz O., Jacolot A., Padoin C., Quillard J., Louchahi K., Tod M., Samii K., Petitjean O. Influence of experimental rat model of multiple organ dysfunction on cefepime and amikacin pharmacokinetics. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996 ; 40: 819–21.

Mimoz O., Jacolot A., Padoin C., Caillon J., Louchahi K., Tod M., Samii K., Petitjean O. Cefepime and amikacin synergy against a cefotaxime-susceptible strain of *Enterobacter cloacae* *in vitro* and *in vivo*. *J Antimicrob Chemother.* 1997 ; 39: 363-69.

Mimoz O., Elhelali N., Léotard S., Jacolot A., Laurent F., Samii K., Petitjean O., Nordmann P. Treatment of experimental pneumonia in rats caused by a PER-1 extended-spectrum beta-lactamase-producing strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 1999 ; 1: 91-97.

Mimoz O., Leotard S., Jacolot A., Padoin C., Louchahi K., Petitjean O, Nordmann P. Efficacies of imipenem, meropenem, cefepime, and ceftazidime in rats with experimental pneumonia due to a carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase-producing strain of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 ; 44: 885-90.

Mizen L. Methods for obtaining human-like pharmacokinetic patterns in experimental animals. In « Handbook of Animal models of infection », Zak O., Sande M.A. (Eds), 1999, Academic Press, London, UK. pp 93-103.

Mizgerd J.P., Skerrett S.J. Animal models of human lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008 ; 294: L387-L398.

Moore R.D., Lietman P.S., Smith C.R. Clinical response to aminoglycoside therapy: importance of the ratio of peak concentration to minimal inhibitory concentration. *J Infect Dis.* 1987 ; 155: 93-99.

Mouton J.W., Vinks A.A., Punt N.C. Pharmacokinetic–pharmacodynamic modeling of activity of ceftazidime during continuous and intermittent infusion. *Antimicrob Agents Chemother* 1997 ; 41: 733-38.

Müller M., de la Pena A., Derendorf H. Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents: distribution in tissue. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 ; 48: 1441-53.

National Institutes of Health. Principles of laboratory animal care. NIH publication 85-23. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA. 1985.

Nicolas P. Petitjean A., Azorin J., Tod M., Petitjean O. Separate pharmacokinetics of ceftriaxone and of gentamicin in the lungs as rationale for better drug combination regimen in pneumopathy. *Am J Resp Crit Care Med* .1994 ; 149: A346.

Offner F., Schoch L., Fisher D., Torok-Storb B., Martin P.J. Mortality hazard function as related to neutropenia at different times after marrow transplantation. *Blood.* 1996 ; 88: 4058-62.

Padoin C., Mimos O., Petitjean O. Pharmacocinétique chez le patient de réanimation. In « Infections et antibiothérapie en réanimation, aux urgences et en chirurgie », Martin C., Gouin F. (Eds), 2000 ; Arnette, Rueil-Malmaison, France. pp. 963-1000.

Panidis D., Markantonis S.L., Boutzouka E., Karatzas S., Baltopoulos G. Penetration of gentamicin into the alveolar lining fluid of critically ill patients with ventilator-associated pneumonia. *Chest.* 2005 ; 128: 545-52.

Panomvana D., Kiatjaroensin S.A., Phiboonbanakit D. Correlation of the pharmacokinetic parameters of amikacin and ceftazidime. *Clin Pharmacokinet.* 2007 ; 46: 859-66.

Paul M., Benuri-Silbiger I., Soares-Weiser K., Leibovici L. Beta-lactam monotherapy vs beta lactam-aminoglycoside combination therapy for sepsis in immunocompetent patients: systematic review and meta-analysis of randomized trials. *BMJ.* 2004 ; 328: 668-81.

Paul M., Silbiger I., Grozinsky S., Soares-Weiser K., Leibovici L. Beta-lactam antibiotic monotherapy *versus* beta-lactam-aminoglycoside antibiotic combination therapy for sepsis. 2006. Cochrane Database Syst. Rev. 1:CD003344.

Pennington J.E., Stone R.M. Comparison of antibiotic regimens for treatment of experimental pneumonia due to *Pseudomonas*. J Infect Dis. 1979. 140: 881-89.

Petitjean O., Nicolas P., Tod M. Pharmacodynamie des antibiotiques. In « Infections et antibiothérapie en réanimation, aux urgences et en chirurgie ». Martin C., Gouin F. (Eds). 2000a ; Arnette, Rueil-Malmaison, France. pp.13-81.

Petitjean O., Jehl F., Tod M. Pénétration tissulaire des antibiotiques. In « Infections et antibiothérapie en réanimation, aux urgences et en chirurgie », Martin C., Gouin F. (Eds), 2000b ; Arnette, Rueil-Malmaison, France. pp.1053-1103.

Petitjean O., Gauzit R. Objectifs PK/PD et adaptation posologique des antibiotiques chez le patient de réanimation : vers une approche pratique. In « Infectiologie en réanimation », Charbonneau P., Wolff M. (Eds), 2012 ; Springer Verlag, Paris, France. A paraître.

Pfaller M.A., Sader H.S., Fritsche T.R, Jones R.N. Antimicrobial activity of cefepime tested against ceftazidime-resistant Gram negative clinical strains from North American Hospitals: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1998-2004). Diagn Microbiol Infect Dis. 2006 ; 56: 63-68.

Philippon A., Arlet G. Bêtalactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel ! Ann Biol Clin. 2006 ; 64: 37-51.

Potel G., Jacqueline C., Caillon J., Amador del Valle G., Batard E. Les modèles expérimentaux animaux peuvent-ils contribuer à la bonne utilisation des antibiotiques. Antibiotiques. 2010 ; 12: 131-135.

Prins J.M., Büller H.R., Kuijper E.J., Tange R.A., Speelman P. Once *versus* thrice daily gentamicin in patients with serious infections. Lancet. 1993 ; 341: 335-39.

Rea R.S., Capitano B., Bies R., Bigos K.L., Smith R., Lee H. Suboptimal aminoglycoside dosing in critically ill patients. Ther Drug Monit. 2008 ; 30 : 674-81.

Rello J., Gallego M., Mariscal D., Soñora R., Valles J. The value of routine microbial investigation in ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 ; 156: 196-200.

Roberts J.A., Paratz J., Paratz E., Krueger W.A., Lipman J. Continuous infusion of β -lactam antibiotics in severe infections: a review of its role. *Int J Antimicrob Agents.* 2007 ; 30 : 11-18.

Roberts J.A., Ulldemolins M., Roberts M.S., McWhinney B., Ungerer J., Paterson D.L., Lipman J. Therapeutic drug monitoring of beta-lactams in critically ill patients: proof of concept. *Int J Antimicrob Agents.* 2010 ; 36: 332-39.

Rodvold K.A., George J.M., Yoo L. Penetration of anti-infective agents into pulmonary epithelial lining fluid: focus on antibacterial agents. *Clin Pharmacokinet.* 2011 ; 50: 637-64.

Rouby J.J., Martin de Lasalle E., Poete P. Nicolas M.H., Bodin L., Jarlier V., Le Charpentier Y., Grosset J., Viars P. Nosocomial bronchopneumonia in the critically ill. Histologic and bacteriologic aspects. *Am Rev Respir Dis.* 1992 ; 146: 1059-66.

Rusnak M.G., Drake T.A., Hackbarth C.J., Sande M.A. Single *versus* combination antibiotic therapy for pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa* in neutropenic guinea pigs. *J Infect Dis.* 1984 ; 149: 980-85.

Ryan G., Mukhopadhyay S., Singh M. Nebulised anti-pseudomonal antibiotics for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003; 3: CD001021.

Ryan G., Singh M., Dwan K. Inhaled antibiotics for long-term therapy in cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011 ; 3: CD001021.

Sader H.S., Fritsche T.R., Jones R.N. Potency and spectrum trends for cefepime tested against 65746 clinical bacterial isolates collected in North American medical centers: Results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998–2003). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005 ; 52: 265-73.

Sande M.A. Animal models in the evaluation of antimicrobial agents. *Infect Dis.* 1981 ; 4 : 4-20.

Santré C., Georges H., Jacquier J.M., Leroy O., Beuscart C., Buguin D., G Beaucaire G. Amikacin levels in bronchial secretions of 10 pneumonia patients with respiratory support treated once daily *versus* twice daily. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995 ; 39: 264-67.

Schwaber M.J., Graham C.S., Sands B.E., Gold H.S., Carmeli Y. Treatment with a broad-spectrum cephalosporin *versus* piperacillin-tazobactam and the risk for isolation of broad-spectrum cephalosporin-resistant *Enterobacter* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 ; 47: 1882-86.

Seligman R., Seligman B.G., Teixeira P.J. Comparing the accuracy of predictors of mortality in ventilator-associated pneumonia. *J Bras Pneumol.* 2011 ; 37: 495-503.

Shorr A.F., Micek S.T., Welch E.C., Doherty J.A., Reichley R.M., Kollef M.H. Inappropriate antibiotic therapy in Gram-negative sepsis increases hospital length of stay. *Crit Care Med.* 2011 ; 39:46-51.

Shyu W.C., Mordenti J.J., Nightingale C.H., Tsuji A, Quintiliani R. Effect of stress on the pharmacokinetics of amikacin and ticarcillin. *J Pharm Sci.* 1987 ; 76: 265-66.

Sieger B., Berman S. J., Geckler R.W., Farkas S.A. Empiric treatment of hospital-acquired lower respiratory tract infection with meropenem or ceftazidime with tobramycin: a randomized study. *Crit. Care Med.* 1997 ; 25: 1663-70.

Sladek N.E., Powers J.F., Grage G.M. Half-life of oxazaphosphorines in biological fluids. *Drug Metab Dispos.* 1984 ; 12: 553-59.

Taccone F.S., Laterre P.F., Dugernier T., Spapen H., Delattre I., Wittebole X., De Backer D., Layeux B., Wallemacq P., Vincent J.L., Jacobs F. Insufficient β -lactam concentrations in the early phase of severe sepsis and septic shock. *Crit Care.* 2010a ; 14: R126.

Taccone F.S., Laterre P.F., Spapen H., Dugernier T., Delattre I., Layeux B., De Backer D., Wittebole X., Wallemacq P., Vincent J.L., Jacobs F. Revisiting the loading dose of amikacin for patients with severe sepsis and septic shock. *Crit Care.* 2010b ; 14: R53.

Talha M.R., Rogers H.J., Trounce J.R. Distribution and pharmacokinetics of cyclophosphamide in the rat. *Br J Cancer.* 1980 ; 41: 140-43.

Tam V.H., Mc Kinnon P.S., Akins R.L., Rybak M.J., Drusano G.L. Pharmacodynamics of cefepime in patients with Gram-negative infections. J Antimicrob Chemother. 2002. 50: 425-28.

Tenover F.C. Developing molecular amplification methods for rapid diagnosis of respiratory tract infections caused by bacterial pathogens. Clin. Infect. Dis. 2011 ; 52 Suppl 4: S338-45.

ter Braak E.W., de Vries P.J., Bouter K.P., van der Vegt S.G., Dorrestein G.C., Nortier J.W., van Dijk A., Verkooyen R.P., Verbrugh H.A. Once-daily dosing regimen for aminoglycoside plus beta-lactam combination therapy of serious bacterial infections: comparative trial with netilmicin plus ceftriaxone. Am J Med. 1990 ; 89: 58-66.

Thiel S.W., Asghar M.F., Micek S.T., Reichley R.M., Doherty J.A ., Kollef M.H. Hospital-wide impact of a standardized order set for the management of bacteremic severe sepsis. Crit Care Med. 2009 ; 37: 819-24.

Thiolet J.M., Lacave L., Tronel H., Jarno P., Metzger M.H., L'Hériteau F., Gautier C., Coignard B. Pour le groupe de travail RAISIN - ENP 2006. Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales 2006. Bull Epidemiol Hebd. 2007 ; 51-52: 429-32.

Tod M., Lortholary O., Seytre D., Semaoun R., Uzzan B., Guillevin L., Casassus. P., Petitjean O. Population pharmacokinetic study of amikacin administered once or twice daily to febrile, severely neutropenic adults. Antimicrob Agents Chemother. 1998 ; 42: 849-56.

Tokunaga S., Ohkhawa M., Takashima M. An experimental model of ascending pyelonephritis due to *Candida albicans* in rats. Mycopathologica 1993 ; 123:149-154.

Torres A., Ewig S., Lode H., Carlet J., European HAP working group. Defining, treating and preventing hospital acquired pneumonia: European perspective. Intensive Care Med. 2009 ; 35: 9-29.

Trouillet J.L., Chastre J., Vuagnat A., Joly-Guillou M.L., Combaux D., Dombret M.C., Gibert C. Ventilator-associated pneumonia caused by potentially drug-resistant bacteria. Am J Respir Crit Care Med. 1998 ; 157: 531-39.

Tulkens P.M. Pharmacokinetic and toxicological evaluation of a once-daily regimen *versus* conventional schedules of netilmicin and amikacin. J Antimicrob Chemother. 1991 ; 27 Suppl C: 49-61.

Tumah H. Fourth-generation cephalosporins: *in vitro* activity against nosocomial gram-negative bacilli compared with betalactam antibiotics and ciprofloxacin. Chemotherapy. 2005 ; 51: 80-85.

Uzzan B., Cohen R., Nicolas P., Cucherat M., Perret G.Y. Procalcitonin as a diagnostic test for sepsis in critically ill adults and after surgery or trauma: a systematic review and meta-analysis. Crit Care Med. 2006 ; 34: 1996-2003.

Van't Wout J.W., Linde I., Leijh P.C., van Furth R. Effect of irradiation, cyclophosphamide, and etoposide (VP-16) on number of peripheral blood and peritoneal leukocytes in mice under normal conditions and during acute inflammatory reaction. Inflammation. 1989 ; 1: 1-14.

Vesga O., Agudelo M., Salazar B.E., Rodriguez C.A., Zuluaga A.F. Generic vancomycin products fail *in vivo* despite being pharmaceutical equivalents of the innovator. Antimicrob Agents Chemother. 2010 ; 54: 3271-79.

Woodnutt G., Berry V., Mizen L. Simulation of human serum pharmacokinetics of cefazolin, piperacillin, and BRL 42715 in rats and efficacy against experimental intraperitoneal infections. Antimicrob Agents Chemother. 1992 ; 36: 1427-31.

Zak O., Sande M.A., O'Reilly T. The role of animal models in the evaluation of new antibiotics. In « Handbook of animal models of infection », Zak O., Sande M.A. (Eds). 1991 ; Academic Press, London, UK. pp XXI-XXIV.

Zelenetsky S.A., Harding G.K., Sun S., Ubhi K., Ariano R.E. Treatment and outcome of *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia: an antibiotic pharmacodynamic analysis. J Antimicrob Chemother. 2003 ; 52: 668-74.

Zhi J., Nightingale C. H., Quintiliani R. Microbial pharmacodynamics of piperacillin in neutropenic mice of systematic infection due to *Pseudomonas aeruginosa*. J Pharmacokin Biopharm. 1988 ; 16: 355-75.

Zilberberg M.D., Shorr A.F., Micek S.T., Mody S.H., Kollef M.H. Antimicrobial therapy escalation and hospital mortality among patients with health-care-associated pneumonia: a single-center experience. *Chest*. 2008 ; 134: 963-8.

Zuluaga A.F., Salazar B.E., Rodriguez C.A., Zapata A.X., Agudelo M., Vesga O. Neutropenia induced in outbred mice by a simplified low-dose cyclophosphamide regimen: characterization and applicability to diverse experimental models of infectious diseases. *BMC Infect Dis*. 2006 ; 6: 55.

RESUMES

Les pneumopathies nosocomiales sont toujours en 2012 une préoccupation de Santé Publique d'abord en raison de leur morbi-mortalité et de la consommation des médicaments antibiotiques qu'elles génèrent, mais aussi parce que les bactéries à l'origine de ces infections deviennent de plus en plus résistantes aux antibiotiques actuels sans que de nouvelles molécules soient disponibles. C'est pourquoi, améliorer les conditions de traitement, en évaluant les associations antibiotiques, reste intéressant.

Ce travail présente, pas à pas, la réflexion menée dans le cadre d'une démarche d'optimisation d'un modèle animal, dans le but d'en améliorer la qualité méthodologique et de faire en sorte que le modèle devienne contributif à l'évaluation des antibiotiques utilisés en clinique humaine, comme par exemple en réanimation. Le modèle de pneumopathie expérimentale chez le rat a été choisi pour étudier l'effet synergique d'une bêtalactamine, le céfépime, et d'un aminoside, l'amikacine, sur une souche d'*Enterobacter cloacae* productrice de bêtalactamase déréprimée. La 1^{ère} et la 2^{ème} étude ont consisté à la mise au point du modèle animal original. Il se caractérise par l'injection intra-trachéale d'un inoculum lourd en phase stationnaire, et par l'humanisation de la pharmacocinétique des antibiotiques administrés. Une synergie d'action entre la bêtalactamine et l'aminoside a été mise en évidence, avec cependant une clairance spontanée bactérienne au niveau pulmonaire rendant difficile l'interprétation des résultats. La 3^{ème} et la 4^{ème} étude ont permis de minimiser cette clairance spontanée de manière reproductible pendant 30 heures par l'induction d'une immunodépression à minima après injection IV d'une dose unique de cyclophosphamide. Sous ces seules conditions, l'efficacité de la bithérapie céfépime–amikacine dans le traitement d'une pneumopathie à *Enterobacter cloacae* producteur de céphalosporinase déréprimée a été confirmée.

Ce travail montre que la mise au point d'un modèle expérimental passe nécessairement par le contrôle de tous les facteurs responsables de l'effet du médicament étudié, excepté celui que l'on souhaite évaluer.

Mots-clés : modèle animal, pneumopathie, antibiotique, réanimation

Nosocomial pneumonia are still in 2012 a public health problem because of their morbimortality and their use of antibiotic drugs they generate, but also because the bacteria causing these infections are becoming more increasingly multiresistant to current antibiotics without new molecules are available. That is why treatment improvement, including the assessment of antibiotic combinations, is useful.

This work presents, step by step, an optimization approach of experimental model, in order to improve the methodological quality and to contribute in the evaluation of antibacterial agents used in intensive care patients. Experimental pneumonia in rats was chosen to study the bactericidal activity of a combination with a betalactam, cefepime, and an aminoglycoside, amikacin, on a strain of *Enterobacter cloacae* producing derepressed betalactamase. The 1st and 2nd study described the development of our original animal model: high bacterial inoculum in the stationary phase of growth and humanised pharmacokinetics using uranyl nitrate-induced renal impairment. Combination of both antibiotics was synergic ; however, bacterial spontaneous clearance was observed in the lungs introducing an undesirable lack of confidence in the reliability of the results. The aim of the 3rd and 4th study was to suppress the spontaneous clearance in a reproducible manner for at least 30 hours inducing an appropriate and transient leucopenic state after IV injection of a single dose of 30 mg/kg of cyclophosphamide. Under these conditions, the efficacy of cefepime-amikacin combination in the treatment of pneumonia due to *Enterobacter cloacae* producing derepressed cephalosporinase was confirmed.

In conclusion, this work shows that before using such models, all the factors responsible for drug effect must be under control, except the one under evaluation.

Key words : animal model, pneumonia, antibiotic, intensive care

