

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG



THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

ED 414 – Sciences de la vie et de la santé

Pharmacocinétique et pharmacodynamie oculaire des antibiotiques : modèle animal d'étude du linézolide chez le lapin sain et porteur d'endophtalmies bactériennes à *S. aureus*

Présentée par

Maher SALEH

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Strasbourg

Soutenance le 03 novembre 2011

Devant le jury composé de :

- Monsieur le Docteur F. Jehl: directeur de thèse
- Monsieur le Professeur T. Bourcier: directeur de thèse
- Monsieur le Professeur Ch. Chiquet: rapporteur
- Monsieur le Professeur B. Delbosc: rapporteur
- Madame le Docteur J. Caillon: examinatrice
- Monsieur le Professeur Y. Hansmann: examinateur

Mes remerciements s'adressent à :

Monsieur le Professeur Chiquet. Vous avez aimablement accepté de juger ce travail et me faites l'honneur de votre présence. Veuillez trouver ici l'assurance de ma sincère gratitude.

Monsieur le Professeur Bourcier. Vous me faites l'honneur de codiriger cette thèse. Je vous prie de trouver ici l'expression de toute ma reconnaissance pour votre soutien sans faille et ma respectueuse admiration.

Monsieur le Docteur Jehl. Vous m'avez fait l'honneur de diriger ce travail. Je vous remercie pour votre confiance et votre soutien tout au long de la réalisation de cette thèse, et cela malgré les épreuves que vous avez affrontées. Soyez assuré, Monsieur, de ma sincère gratitude et de mon profond respect.

Monsieur le Professeur Delbosc. Vous m'avez fait l'honneur de votre présence. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance. Je vous adresse tous mes remerciements, en souhaitant que ce travail soit le début d'une longue et fructueuse collaboration.

Monsieur le Professeur Hansmann. Vous avez eu la gentillesse d'accepter de juger ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Madame le Docteur Caillon. Vous m'avez fait l'honneur de votre présence. Je vous prie de trouver ici l'expression de ma sincère gratitude.

Monsieur le Docteur Prévost. Vous m'avez aimablement ouvert les portes de votre laboratoire et associé à certains de vos travaux. Soyez assuré, Monsieur, de ma sincère gratitude ; en souhaitant que nous puissions continuer notre fructueuse collaboration.

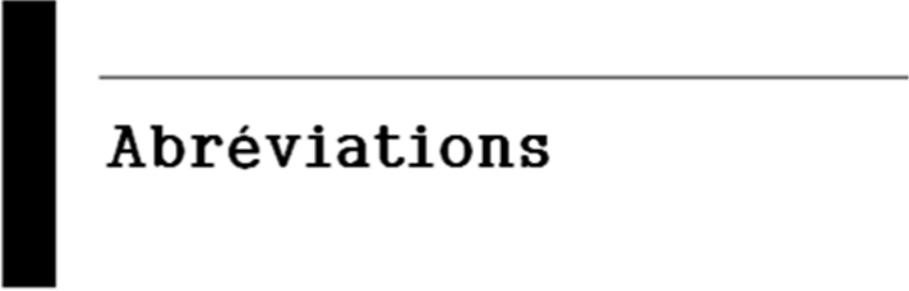
Madame le Professeur Speeg-Schatz. Je vous remercie pour votre confiance et votre soutien tout au long de ma formation. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère admiration.

Mademoiselle Sophie Lefèvre. Je te remercie pour l'aide et la bonne humeur que tu as manifestées tout au long de ce travail en commun.

A Madame Anne Dory. Je te remercie pour ton aide et l'expertise que tu nous as apportées durant ce travail.

A mes amis et collègues, en particulier à David, à qui je témoigne de mon indéfectible amitié.

A mes parents, mon frère, et mon épouse,
A qui je dédie cette thèse.



Abréviations

ASC/CMI : aire sous la courbe rapportée à la CMI

ATB : antibiotique

BHA: barrière hémato-aqueuse

BHR : barrière hémato-rétinienne

CHPL : chromatographie à haute performance liquide

CMI : concentration minimale inhibitrice exprimée en mg/L

IVT : injection intravitréenne

LZD : linézolide

PK/PD : pharmacokinetics/pharmacodynamics

QI : quotient inhibiteur

T1/2: temps de demi-vie d'élimination

VAD: volume apparent de distribution

VEGF: *vascular endothelial growth factor*

Introduction

L'endophtalmie bactérienne aiguë, qui correspond à l'infection des structures endoculaires, représente une complication rare mais potentiellement grave de la chirurgie endoculaire. L'incidence de l'endophtalmie post-opératoire est faible, de l'ordre de 0,011% [1] à 0,22 % [2], mais le nombre important de procédures chirurgicales (environ 600 000 chirurgies de la cataracte par an en France) en fait une complication redoutée de toute chirurgie endoculaire. Bien que des progrès notables aient été réalisés dans les techniques d'identification bactérienne, en particulier par les techniques de PCR, [3] le traitement a peu évolué depuis 10 ans et le pronostic visuel demeure réservé malgré une prise en charge précoce. [4]

Du fait de l'existence d'une barrière hémato-oculaire qui limite le passage des antibiotiques de la circulation générale vers les structures endoculaires, le traitement de l'endophtalmie fait appel aux injections intravitréennes (IVTs) d'antibiotiques. Le choix de l'antibiotique avant l'identification de la bactérie causale est probabiliste. L'association de deux antibiotiques, le plus souvent de la vancomycine et de la ceftazidime, a pour objectif de couvrir un large spectre allant des bactéries à Gram négatif aux bactéries à Gram positif, principales pourvoyeuses d'endophtalmies bactériennes aiguës. [4] [5] Bien que l'administration par voie systémique de l'antibiotique ne soit pas suffisante pour guérir l'endophtalmie, [6] il est fréquent d'associer aux IVTs un traitement antibiotique par voie générale, le plus souvent une fluoroquinolone comme la lévofloxacine. Cependant, depuis quelques années, une augmentation de la résistance des isolats bactériens d'endophtalmie a été rapportée. [7] La résistance des staphylocoques aux fluoroquinolones est ainsi devenue préoccupante, atteignant une proportion de l'ordre de 20 %. [8] Les résistances à la vancomycine ont été rapportées le plus souvent en milieu hospitalier chez le

staphylocoque (de sensibilité diminuée à la vancomycine - VISA, ou aux glycopeptides- GISA) [9] et chez l'entérocoque. [10] Dans ce contexte, un antibiotique actif contre les bactéries à Gram positif, doté d'une bonne biodisponibilité après administration orale, possédant une bonne pénétration oculaire, qui est bien toléré par l'organisme et en particulier qui n'est pas toxique pour l'anatomie et la fonction visuelle aux doses utilisées, représenterait une avancée dans la prise en charge de l'endophtalmie bactérienne aiguë postopératoire. Le linézolide, premier représentant de la classe des oxazolidinones à être commercialisé, est un antibiotique qui bloque l'initiation de la traduction protéique bactérienne. Ce mécanisme d'action particulier rend les résistances croisées à d'autres antibiotiques moins fréquentes. Son spectre d'action est limité aux bactéries Gram positif. Le linézolide demeure actif sur les bactéries à Gram positif résistantes à d'autres antibiotiques comme le *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline ou à l'oxacilline (SARM) [11], les pneumocoques pénicillino-résistants, les staphylocoques de sensibilité diminuée aux glycopeptides (GISA,VISA...), ou encore les *Enterococcus faecium* et *faecalis* résistants à la vancomycine. [12, 13]. De plus, sa biodisponibilité est excellente, et sa tolérance bonne quand il est administré en cure courte.

L'objectif de cette thèse est de déterminer si le linézolide peut représenter une avancée dans le traitement de l'endophtalmie bactérienne aiguë staphylococcique. Afin de répondre à cette question, une approche pharmacocinétique/pharmacodynamie (PK/PD) a été privilégiée. La pharmacocinétique oculaire du linézolide a été étudiée par différentes voies d'administration (topique, orale, intravitréenne). Une étape préalable de mise au point d'une technique fiable de dosage du linézolide dans le sang et le vitré a été

nécessaire. Une technique de chromatographie à haute performance liquide pour doser le linézolide a donc été spécialement développée. La dernière étape a consisté à tester l'efficacité des injections intravitréennes du linézolide dans un modèle expérimental d'endophtalmie aiguë à *S. aureus* chez le lapin *New Zealand*, et à la comparer au traitement de référence que représente l'IVT de vancomycine.

CHAPITRE

1

Rappels anatomiques

Chapitre 1. Rappels anatomiques

1.1 Schéma de l'œil

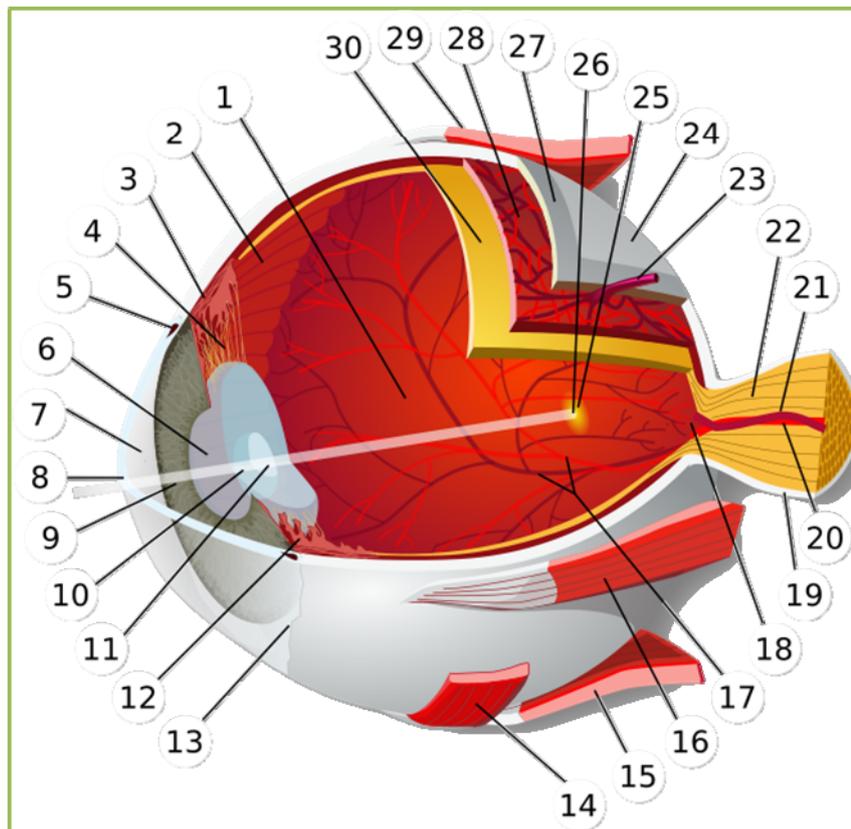


Figure 1. Schéma de l'œil (source : GNU Free Documentation License).

1 Corps vitré. 2 Ora serrata. 3 Muscle ciliaire. 4 Ligament suspenseur. 5 Canal de Schlemm. 6 Pupille. 7 Chambre antérieure (humeur aqueuse). 8 Cornée. 9 Iris. 10 Cristallin cortical. 11 Noyau du cristallin. 12 Corps ciliaire. 13 Conjonctive. 14 Muscle oblique inférieur. 15 Muscle droit inférieur. 16 Muscle droit médian. 17 Veines et artères rétiniennes. 18 Papille optique. 19 Lamelle criblée. 20 Artère ophtalmique. 22 Nerf optique. 23 Veine vortiqueuse. 24 Tenon. 25 Macula. 26 Fovéa. 27 Sclère. 28 Choroïde. 29 Muscle droit supérieur. 30 Rétine.

1.2 Les barrières hémato-oculaires

L'œil se caractérise par l'existence de barrières hémato-oculaires qui jouent un rôle central dans la pénétration et l'élimination des antibiotiques, déterminant ainsi leur demi-vie intraoculaire. L'existence d'une barrière hématoaqueuse [14] est connue depuis les travaux de Davson en 1947. Le terme de barrière indique la difficulté que rencontre une substance pour passer du sang vers les structures intraoculaires. Les deux principaux constituants de cette barrière sont la barrière hémato-aqueuse et la barrière hémato-rétinienne. L'intégrité de ces structures anatomiques varie considérablement selon l'état d'inflammation oculaire rendant difficile toute tentative de modélisation de la pharmacocinétique d'une molécule dans l'œil.

1.2.1 La barrière hémato-aqueuse (BHA)

La BHA est constituée des cellules de l'épithélium ciliaire et des capillaires iriens.

- Les capillaires des procès ciliaires étant larges et fenêtrés, ils sont relativement perméables aux protéines sériques, puisque la composition protéique de l'humeur aqueuse correspond à 1% de la composition protéique du sérum. C'est donc l'épithélium ciliaire qui constitue la BHA. Il est composé d'une couche externe pigmentaire et d'une couche interne de cellules claires. La base des cellules pigmentaires est fortement adhérente à la membrane basale à travers des interdigitations, et les cellules claires sont fixées entre elles à leur partie apicale par des jonctions serrées.
- Au niveau de l'iris, ce sont les capillaires iriens qui forment la barrière hémato-aqueuse. Bien qu'issus du grand cercle artériel de l'iris qui donnent aussi naissance aux vaisseaux ciliaires, les capillaires iriens se rapprochent plus des capillaires de la rétine et du cerveau. Leurs cellules endothéliales sont réunies par des jonctions serrées et ne laissent pas diffuser un marqueur comme la peroxydase.

Le rôle de la barrière hémato-aqueuse est multiple allant de la production de l'humeur aqueuse à un rôle d'épuration. En effet, le corps ciliaire est capable de retirer activement certaines substances de l'humeur aqueuse vers le sang. Ces transports actifs de sodium, chlore, bicarbonates ont pour but de créer une force osmotique servant à la sécrétion de l'humeur aqueuse à un débit variant de 2 à 3 μ L/min (turn-over total en 100 min), et au maintien d'un niveau d'acide ascorbique plus élevé que celui du plasma. Ces transports actifs expliquent la faible efficacité oculaire de certains antibiotiques administrés par voie générale qui sont ainsi résorbés. Cette barrière assure également un rôle de filtre sélectif grâce à des pores de petites tailles (200 nm de diamètre) [15, 16] empêchant les molécules de haut poids moléculaire comme les protéines plasmatiques de traverser la barrière. Les molécules de plus petite taille comme les ions hydrosolubles pénètrent plus aisément à travers cette barrière.

1.2.2 La barrière hémato-rétinienne (BHR)

La barrière hémato-rétinienne [17] sert à la protection et à l'homéostasie de la rétine et du vitré. Elles empêchent les substances extracellulaires de circuler entre les cellules et les obligent à traverser la membrane cytoplasmique selon des mécanismes actifs et passifs très sélectifs.

Elle comporte une composante interne constituée par les cellules endothéliales des capillaires rétiniens non fenêtrés, unies par des jonctions serrées et circulaires. Les transports se font par pinocytose à travers les cellules endothéliales en absence d'inflammation. La composante externe est représentée par les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien unies par des jonctions serrées. La BHR présente des analogies avec la barrière hémato-méningée avec laquelle elle partage la même origine embryologique. Les cellules endothéliales de la rétine et du cerveau semblent

être différentes des autres cellules endothéliales vasculaires de l'organisme. Certaines enzymes y sont présentes à très haute concentration: phosphatases alcalines, monoamine-oxydase, dopa-décarboxylase. Comme dans le cerveau, des cellules gliales, comme les astrocytes et les cellules de Müller, sont en contact avec les parois des capillaires de la rétine et fournissent des signaux qui modulent la perméabilité de cette barrière. [18] La diffusion passive se fait pour les protéines d'un diamètre de moins de 3 nm, diamètre qui correspond à la taille des pores de la *Zonulae adherentes*. [19] Il existe des transports actifs régulant la composition du vitré. Ainsi, le K⁺ est activement transporté vers le sang alors qu'il existe des flux de magnésium en sens inverse. **Figure 2A**. Les composants anioniques (dont font parti les β-lactamines) sont activement transportés en dehors de l'œil à travers cette barrière de même que la ciprofloxacine, comme l'ont montré les essais par probénicide, qui retardent ces transports augmentant la ½ vie intravitréenne de ces médicaments. [20] Au contraire, les composés cationiques comme les aminosides, vancomycine, rifampicine, et érythromycine ne sont pas activement transportés à travers le BHR mais doivent diffuser dans la chambre antérieure avant d'être éliminés. [21]

1.2.3 Conséquences de l'inflammation sur l'état de la barrière hémato-oculaire

La régulation des jonctions serrées est régie par de nombreuses molécules au premier rang desquelles se trouvent les facteurs de croissance comme le vascular endothelium growth factor (VEGF). Toute altération des composants cellulaires (teneur en calcium, activité enzymatique) ou du cytosquelette modifie la perméabilité des jonctions serrées. Ainsi, de nombreux stimuli extracellulaires peuvent également intervenir: les glucocorticoïdes, l'hydrocortisone, les acides gras polyinsaturés peuvent renforcer l'intégrité de la barrière [22, 23] en augmentant l'expression de

certains de leurs protéines des jonctions serrées. D'autres comme l'histamine, les cytokines, les facteurs de croissance (VEGF, TNF, INF gamma, IL 1 bêta, TGF alpha, PDGF..) peuvent augmenter sa perméabilité. La phosphorylation des occludines semble être un système de régulation rapide des jonctions serrées. Le VEGF agirait selon ce mécanisme. **Figure 2B.** En cas d'inflammation, les agents cationiques qui sont dotés d'une $\frac{1}{2}$ vie plus longue en temps normal, voient leur $\frac{1}{2}$ vie diminuer, parfois de moitié, du fait de l'apparition d'un transport par diffusion à travers la rétine qui s'ajoute à la diffusion vers l'humeur aqueuse. A l'inverse, l'inflammation peut endommager les transports actifs de la rétine et augmenter la $\frac{1}{2}$ vie de certains antibiotiques anioniques [21]

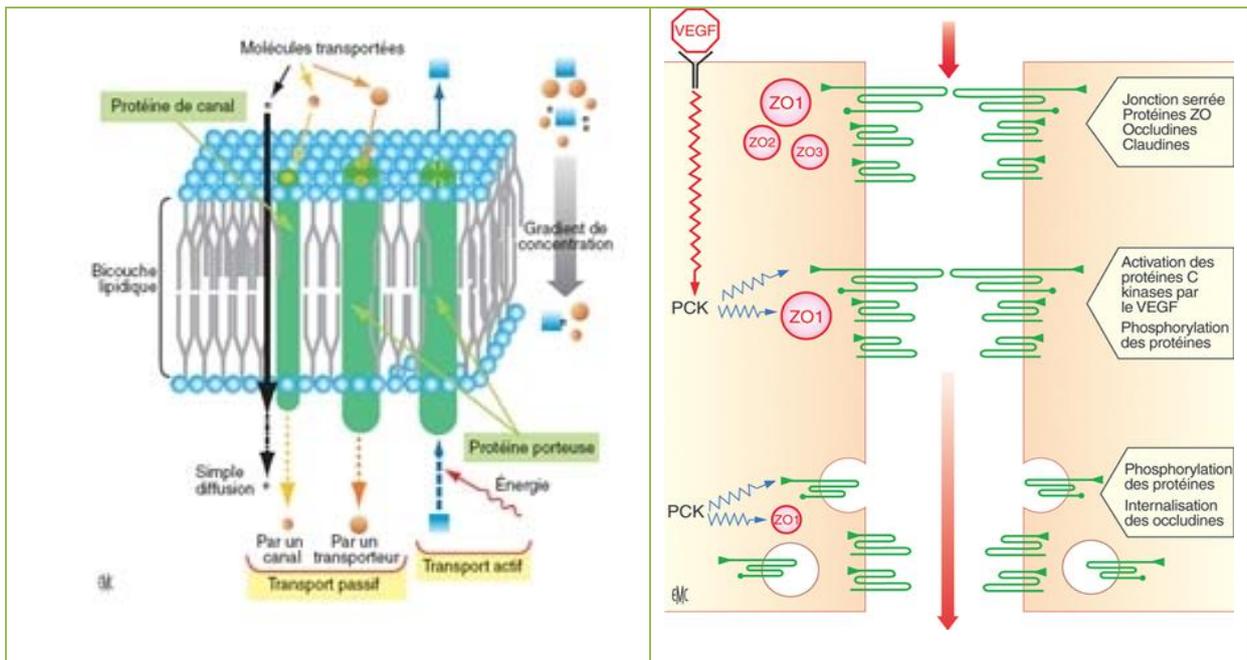


Figure 2A. Différents modes de transport transmembranaire au niveau de la BHR.

Figure 2B. Mode d'action du VEGF : phosphorylation des occludines et augmentation de la perméabilité (D'après Patte *et al*, traité EMC d'Ophtalmologie).

1.3 La barrière cornéenne

L'épithélium cornéen et conjonctival forment également une barrière à part entière. Leur nature est essentiellement lipidique alors que le stroma est de nature hydrophile. Ainsi les molécules de bas poids moléculaire et lipophiles sont celles qui pénètrent le mieux la cornée. Cette pénétration transcornéenne est fortement augmentée en cas d'érosion de l'épithélium cornéen. [24]

1.4 Les différentes voies d'administration des antibiotiques

La présence de barrières hémato-oculaires a donc favorisé la multiplication des voies d'administration des antibiotiques en ophtalmologie comme cela est résumé dans le tableau suivant à partir de la littérature. Le signe + correspond à l'obtention de concentrations intra-oculaires d'ATBs potentiellement thérapeutiques. Le signe – traduit la non utilisation de cette voie d'administration (exemple de la voie orale pour la vancomycine). Le signe ? traduit l'absence de données suffisantes pour conclure. Les antibiotiques sont représentés par familles à l'intérieur desquelles, en pratique, il peut exister une grande variabilité de pénétration intraoculaire à l'intérieur même de ces familles selon la galénique, la concentration, ou encore l'état d'inflammation.

Tableau 1.

Voie d'administration	Antibiotique							
	Compartiment	FQ	Macro	Amin	β-lac	Cycl	Rifa	Gly
Topique (goutte et/ou pommade)	HA	Levo 0.5%, 4 gouttes = 1.14 mg/L [25]	Azithro 1% = 0.06mg/L [26]	Genta 0.2% = 0 [27]	Cefu 10 gouttes 50mg/mL = 0.18mg/L [28]	+/- [29]	Rifa 2.5% = >1mg/L [30]	Vanco 50mg/L = 2.04mgL [31]
	V	Levo 10 gouttes 0.5% = 0 [32]	0	Genta 0.2% = 0 [27]	0	?	?	0 [33]
Injections sous conjonctivale et sous ténionienne	HA	Cipro 1mg = 0.9 mg/L [34]	Erythro 20 mg = NT [35]	Genta 40 mg = 4mg/L [36]	Cefu 125 mg = 20 mg/L [28]	Tetra 20mg = 19mg/L [37]	?	Vanco 20 mg = 24.8mg/L [38]
	V	Cipro 1mg =0 [34]	?	Amika 10mg = 2.6mg/L [39]	Cefta = 13mg/L [40]	?	?	Vanco 25mg = 0 [40]
Orale	HA	Levo 500 mg = 1.6 mg/L [41]	Azithro 1g = <1mg/L [42]	-	-	Doxy 200mg = 6.8 mg/L [43]	Rifa 300mg = 5 mg/L [44]	-
	V	Levo 500mg = 0.32mg/L [45]	Azithro 1g = <1mg/L [42]	-	-	Doxy 10mg/kg = 0.17mg/L [46]	Rifa 300mg = 2.6 mg/L [44]	-
IV	HA	Levo 750 mg = 2.19 [47]	Cf oral	Amika 500mg = 0 [48]	Cefta 2000mg = 3.3 mg/L	Tetra 30mg/kg = 0.6mg/L [49]	Cf oral	Vanco 1000mg = 1.4 mg/L [38]
	V	Levo 750 mg = 1.95 [47]	Cf oral	Genta 1.6mg/kg = 1.8 mg/L [50]	Cefta 50mg/kg= 0 [51]	Tetra 10mg/kg = 0.3mg/L [37]	Cf oral	Vanco 1000mg = 0.4 mg/L [52]
IVT	V	Cipro 200µg	Erythro 500µg	Amika 200µg	Cefta 2250 µg	125µg	-	Vanco 1000µg
Injection intra caméculaire	HA	Moxi 250µg	?	400µg	Cefu 1000µg	?	-	Vanco 1000µg

Tableau 1. Principales voies d'administration en ophtalmologie selon la famille d'antibiotiques. Les concentrations d'antibiotiques ainsi obtenues varient selon la voie d'administration choisie, la posologie, et le tissu étudié. HA= humeur aqueuse et V= vitré. Posologie et pic de concentration correspondant exprimé en mg/L pour des yeux non inflammatoires.

Fluoroquinolone : FQ : Levofloxacin (levo), Ciprofloxacin (cipro), Moxifloxacin (moxi)

Glycopeptide : Gly : Vancomycin (van)

Rifampicine : Rifamycine (rifa)

Macrolide : Macro : Azithromycine (azithro), Erythromycine (erythro)

Aminoside : Amin : Gentamicine (genta), Amikacine (amika)

Cycline : Cycl : Doxycycline (doxy), Tetracycline (tetra)

β -lactamine : β -lact : Ceftazidime (cefta), Cefuroxime (cefu)

Comme le montre ce tableau, la voie topique, bien qu'elle permette dans certains cas d'obtenir des concentrations d'antibiotiques thérapeutiques dans l'humeur aqueuse, ne permet cependant pas d'atteindre des concentrations vitréennes suffisantes. La voie intravitréenne et/ou intracaméculaire, quand elles sont possibles, permettent d'obtenir les concentrations les plus élevées. La pénétration oculaire de l'antibiotique administré par voie générale est quant à elle variable, et dépend fortement de l'état de la BHR. Il faut noter que des doses élevées sont souvent nécessaires et la concentration critique supérieure est souvent atteinte. La voie sous conjonctivale offre un compromis intéressant, mais provoque des effets secondaires notables (hémorragie, fibrose conjonctivale, risque de perforation, ischémie maculaire avec les aminosides).

CHAPITRE

2

Rappels de PK/PD

Chapitre 2. Rappels de pharmacocinétique et de pharmacodynamie

2.1 La PK/PD en ophtalmologie

L'optimisation de l'administration d'un antibiotique aux patients (dose journalière, fréquence d'administration et durée du traitement) passe par une approche scientifique de la caractérisation de la relation entre la dose du médicament et ses effets (souhaités et indésirables). Des progrès considérables ont été accomplis dans ce domaine grâce à une meilleure connaissance de la relation entre la dose et la concentration du médicament (Pharmacocinétique - PK) et entre sa concentration et son effet (Pharmacodynamie - PD). **Figure3.** Cette caractérisation de la relation médicament-cible commence à être appliquée au domaine de l'ophtalmologie comme le prouve le nombre croissant de publications à ce sujet. Ainsi, le clinicien, en plus de se baser sur son expérience clinique et une approche empirique, peut également se baser sur des données scientifiques bien établies pour l'aider à faire un choix thérapeutique.

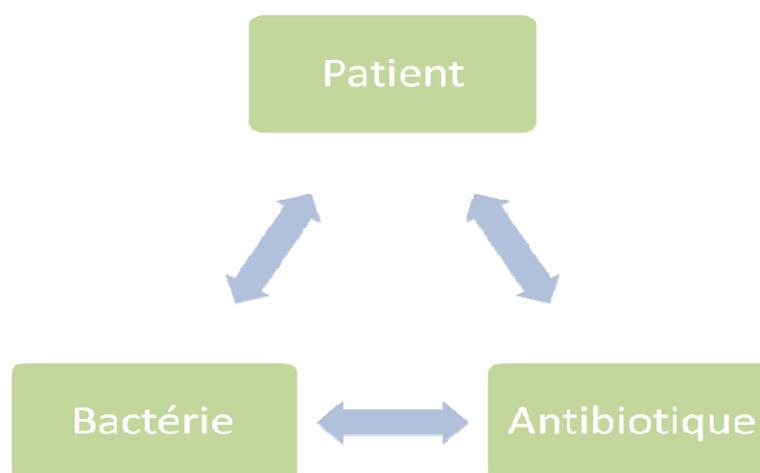


Figure 3. La PK/PD. Une relation à 3 niveaux.

Cependant, comme nous le montrerons tout au long de ce travail de thèse, les paramètres prédictifs de la PK/PD doivent être interprétés avec prudence. En effet, ces paramètres ont été mis au point pour prédire l'efficacité thérapeutique de l'antibiotique dans différentes infections tissulaires, à partir de sa concentration au cours du temps dans le sérum. La possibilité de prédire l'efficacité thérapeutique d'une molécule donnée sur les infections oculaires, basée sur ces paramètres n'est pas encore confirmée. Un tel travail d'évaluation, chez l'Homme et par des modèles expérimentaux, est donc indispensable.

2.2 Principaux paramètres de pharmacocinétique étudiés

Cette étude qualitative et quantitative du devenir d'un médicament après son administration dans l'organisme comporte 4 phases qui se déroulent simultanément.

- Résorption
- Distribution
- Métabolisation
- Excrétion

2.2.1 Phase de résorption

Elle est quantifiée par la biodisponibilité du médicament.

- La **biodisponibilité** est la fraction de principe actif intacte qui arrive dans la circulation générale et la vitesse avec laquelle elle l'atteint. Elle est mesurée en comparant les aires sous la courbe (ASC) obtenues après administration du même médicament par voie intraveineuse et par une autre voie qui est le plus souvent la voie orale. Après administration intraveineuse, l'ASC obtenue correspond à la biodisponibilité qui, par définition, est de 100%. Elle est excellente entre 80 et 100%, mauvaise en dessous de 40%.
- L'**aire sous la courbe**, ASC, ou AUC «*Area under curve*», correspond à

l'intégrale de la concentration plasmatique sur un intervalle de temps défini. En pratique, on utilise l'approximation:

$$ASC = S([C] \times Dt)$$

avec [C] : concentration mesurée et Dt : intervalle de temps entre deux mesures. La précision de l'ASC croît avec le nombre de mesures de concentration effectuées. L'ASC s'exprime en masse (mg, g) x litre⁻¹ x heure.

- **L'état d'équilibre** ou "*steady state*" est atteint au bout d'un certain nombre d'administrations. Pour que la concentration plasmatique augmente lors d'administrations répétées, il faut qu'une concentration résiduelle persiste lors de l'administration suivante. Au plateau, si la dose et la fréquence d'administration restent stables, la concentration obtenue le sera également. Le plateau est obtenu après cinq demi-vies environ.

2.2.2 Phase de distribution

Elle correspond à la fixation aux protéines plasmatiques et à la distribution tissulaire du médicament. Seule la fraction libre du médicament est active d'un point de vue pharmacologique. Deux profils de fixation protéique sont possibles :

Type fixation	Type 1	Type 2
Nature PA	Acide faible	Base faible
Protéine fixatrice	SAH	α1GPA
Affinité	Forte	Faible
Nombre de sites	Petit <4	Important >30
Saturation	Oui	Non
Compétition	Oui	Non
Risques d'interaction	Oui	±

Tableau 2. Fixation protéique (SAH : S-ADENOSYL-L-HOMOCYSTEINE HYDROLASE et α1GPA : A1 ACID GLYCOPROTEINE).

Les médicaments sont ainsi:

-
- Fortement fixés si la fixation > 75%,
 - Moyennement fixés si fixation comprise entre 40 et 75%,
 - Faiblement fixés si fixation < 40%.
- Le terme **compartiment** désigne le volume fictif dans lequel le médicament se distribue. Il peut correspondre à un volume réel, par exemple le volume du sang appelé premier compartiment, ou l'ensemble de l'organisme hormis le sang, appelé deuxième compartiment. L'ensemble des secteurs anatomiques réels dans lesquels le médicament se distribue à des concentrations différentes est représenté par un, deux, rarement trois compartiments virtuels où la concentration du médicament est considérée comme homogène. La notion de compartiment permet ainsi de modéliser le devenir d'un médicament.
 - Le **volume apparent de distribution** (V_d) est le volume fictif, exprimé en litres ou en litres par kilogramme, dans lequel se serait distribué le médicament en supposant que sa concentration soit homogène, c'est-à-dire que la concentration tissulaire moyenne soit identique à celle du plasma. Pour mémoire l'humeur aqueuse fait 450 μ L et le vitré humain de 5 mL en moyenne.

Ainsi :

$$V_d = \text{dose} / C_0 \text{ (concentration initiale)}$$

Pour un médicament donné, la connaissance de sa concentration souhaitée dans le sang et de son volume de distribution permet d'évaluer la dose à administrer.

Le volume apparent de distribution est ainsi considéré:

- Petit si < 1 L/kg,
- Moyen si = 1 L/kg
- Grand si > 1 L/kg.

2.2.3 Phase d'élimination

Cette phase correspond à la métabolisation et à l'excrétion du médicament.

La **métabolisation** fait appel à des phénomènes d'induction ou d'inhibition enzymatiques et à de possibles interactions médicamenteuses.

L'élimination du médicament de l'organisme se fait par le foie (excrétion biliaire) ou les reins (excrétion rénale). Les paramètres pharmacocinétiques correspondant à cette phase d'élimination sont ainsi la demi-vie d'élimination et la clairance :

- La **demi-vie** plasmatique d'un médicament ($T_{1/2}$) est le temps nécessaire pour que la concentration plasmatique diminue de moitié durant la phase d'élimination. La connaissance de la demi-vie permet de prévoir la fréquence d'administration du médicament (nombre de prises journalières) pour obtenir la concentration plasmatique souhaitée. La demi-vie est indépendante de la dose du médicament administré. Dans de rares cas, la $\frac{1}{2}$ vie varie avec la dose : elle peut augmenter ou diminuer en fonction de l'apparition de la saturation d'un mécanisme (élimination, catabolisme, fixation aux protéines plasmatiques etc.). **Figure 4.**

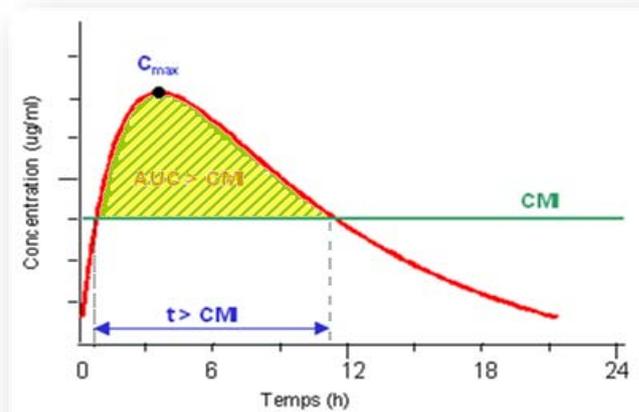


Figure 4. Exemple de calcul de $\frac{1}{2}$ vie d'élimination.

- La **clairance** est la fraction d'un volume théorique totalement épuré (c'est-à-dire ne contenant plus le médicament concerné) par unité de temps. La clairance plasmatique est le volume apparent de plasma épuré par unité de temps. La

clairance globale ou totale (Cl_t) est la fraction du volume apparent de distribution, V_d, qui est totalement épurée par unité de temps. On conçoit que la clairance totale dépend de la constante d'élimination et donc de la T_{1/2} et du V_d. La clairance est une constante en cinétique linéaire.

2.2.4 Facteurs de variation

Les concentrations d'antibiotiques dans l'œil varient selon de nombreux facteurs : le compartiment oculaire étudié -facteurs anatomiques non modifiables comme le volume vitréen- les facteurs anatomiques « modifiables » (inflammation, abrasion cornéenne, état du cristallin et du vitré..) et le mode d'administration de l'antibiotique. Ainsi la pénétration de l'antibiotique est plus ou moins aisée en fonction de la structure considérée

➤ Facteurs anatomiques

Ainsi, la concentration de l'antibiotique varie parfois fortement selon qu'elles soient mesurées dans l'un des différents compartiments de l'œil (larmes, cornée, humeur aqueuse, vitré). La variabilité dans les modes de clairance (transports actifs ou diffusion, par voie antérieure ou postérieure) et dans la vitesse de clairance débouchent sur une demi-vie différente d'un compartiment à l'autre de l'antibiotique. Des variations significatives de cette dernière sont susceptibles de survenir selon des facteurs comme l'inflammation, l'abrasion cornéenne ou encore la présence ou l'absence du cristallin et/ou du vitré. [53]

• Variabilité interindividuelle: exemple du compartiment vitréen

Le volume vitréen varie de 1,7 à 16,5ml [54] pour des globes de longueur axiale allant de 16 mm à 34 mm respectivement. Pour 90% des yeux avec une longueur axiale entre 21 et 26 mm, le volume attendu varie de 4,2 à 9,2ml. Considérant que 75% de ce volume est constitué de vitré, le volume vitréen chez l'homme atteint 4 à

7,5ml. Pour un œil avec une longueur axiale moyenne de 23,5mm, le volume du globe sera de 6,5ml et le volume vitréen de 5,2ml. Il serait donc en théorie licite de diluer l'antibiotique injecté chez l'homme de 38% chez un patient fort myope (26mm - 7D) et d'augmenter la concentration d'antibiotique de 38% chez un hypermétrope (20,5mm +6,6 D). Cela n'est pas fait en pratique. **Tableau 4.**

Fréquence générale	[-----95%-----]/ population									
	[----- 90% -----]									
Longueur axiale (mm)	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34
Volume oculaire (mL)	2,1	3	4,2	5,6	7,2	9,2	11,4	14,1	17,2	20,6
Volume vitréen (mL)	1,7	2,4	3,4	4,5	5,8	7,4	9,1	11,3	13,8	16,5
Réfraction			+10,8	+5,4	0	-5,4	-10,8	-16,2	-20	

Tableau 4. Distribution des volumes du globe oculaire et des volumes vitréens, selon la longueur axiale et la réfraction. [21]

- **Impact de l'inflammation sur la pharmacocinétique oculaire**

Comme nous l'avons vu précédemment, l'existence des barrières hémato-oculaires est un facteur déterminant de la pharmacocinétique oculaire des antibiotiques. En cas de rupture de cette barrière, les concentrations obtenues dans l'œil peuvent varier significativement. L'inflammation a également pour effet de perturber la fonction de pompe rétinienne qui élimine normalement les antibiotiques hydrophiles. C'est ainsi qu'il a été montré chez l'animal que la demi vie vitréenne de la céfazoline passait de 6,5 à 10,4 heures en cas d'inflammation. [55] Il a également été démontré qu'en cas de phakoexérèse associée à une vitrectomie, la demi-vie vitréenne des antibiotiques dans l'œil inflammatoire était raccourcie. **Tableau 5.**

Etat du cristallin/ Présence d'inflammation	½ vie (h)
Œil phake non inflammatoire	6,5
Phake inflammatoire	10,4
Aphake non inflammatoire	8,3
Aphake inflammatoire	9
Aphake non vitréctomisé non inflammatoire	6
Aphake vitréctomisé non inflammatoire	6,7

Tableau 5. Effet de la chirurgie et de l'inflammation sur la demi-vie de l'antibiotique (en heure), exemple de la céfazoline. L'inflammation perturbe la fonction de pompe rétinienne. [55]

La gentamycine et la vancomycine dont l'élimination oculaire ne fait pas intervenir ces pompes rétinienne ont une demi-vie qui n'est pas allongée en cas d'inflammation. [56]

➤ **Mode d'administration**

Une simplification est donc indispensable afin de modéliser la pharmacocinétique des antibiotiques dans l'œil. Une des possibilités serait de s'intéresser au mode d'administration le plus adapté au compartiment concerné par l'infection à traiter : Qu'elle soit superficielle (conjonctivites), cornéenne (kératites), ou profonde (endophtalmies). **Tableau 6.**

Infections	Compartiment	Paramètres pharmacocinétiques	Voie d'administration
Conjonctivites	Larmes, conjonctives	Larmes : V=6.5 µL [57] DC : 0.38 µL/min [58]	Topique
Kératites	Larmes, cornée, humeur aqueuse	HA : V=350µL DC : 1.5µL/min [59]	Topique Sous-conjonctivale Rarement per os
Endophtalmies	Humeur aqueuse, vitré	V : V= 5mL DC : 4-37% des glycoprotéines en 22-85 jours [60]	Intravitréenne Sous-conjonctivale per os ou intraveineuse

Tableau 6. Modélisation de la pharmacocinétique selon le site, siège de l'infection. V=vitré, HA= humeur aqueuse. (DC : Débit de clairance).

Ainsi différents modèles pharmacocinétiques peuvent être individualisés :

- Administration unique par voie intravitréenne directe

Après une administration intravitréenne directe de l'antibiotique, sa concentration vitréenne est immédiatement maximale. Elle diminue ensuite en fonction du temps. Lorsque l'on a une décroissance exponentielle simple, c'est-à-dire linéaire en échelle semi-logarithmique, l'élimination et la métabolisation sont simplement dépendantes de la concentration présente. La variation de la concentration plasmatique est représentée par l'équation suivante :

$$C = C_0 \cdot e^{-k_{el} \cdot t}$$

Dans laquelle C représente la concentration à un moment considéré, C_0 , la concentration initiale, $-K_{el}$, la constante d'élimination apparente et T , le temps.

La constante d'élimination, K_{el} , est principalement déterminée dans ce cas, par la clairance transrétinienne. **Figure 5.**

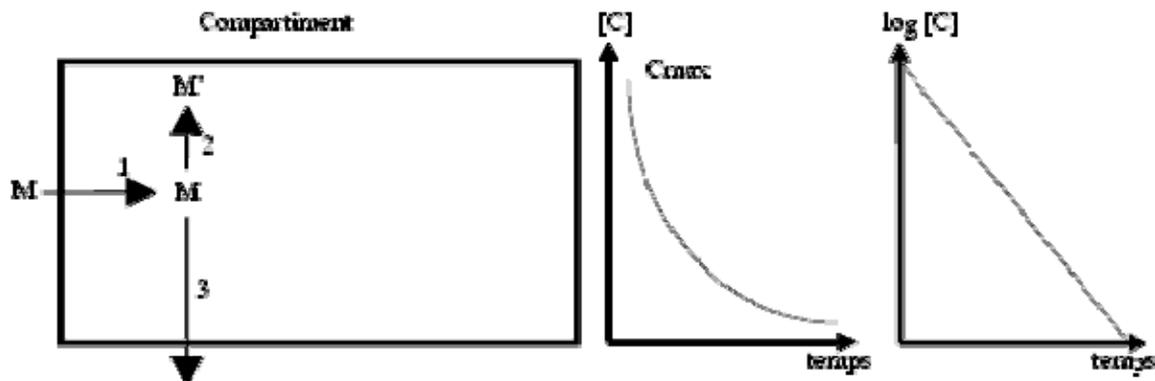


Figure 5. Modélisation des Concentrations oculaires versus temps obtenues par injections intravitréennes (IVT)

1 = Absorption. 2 = Biotransformation. 3 = Elimination.

- Administration par voie orale, IV, topique, sous conjonctivale, latérobulbaire

Après une administration d'un antibiotique par une de ces voies, sa concentration intraoculaire en fonction du temps augmente, atteint un maximum (C_{max}), puis décroît exponentiellement. Lorsque la concentration augmente, la quantité de médicament qui arrive dans l'œil est supérieure à celle qui est éliminée et métabolisée. À l'équilibre, c'est-à-dire au C_{max} , elles sont égales et par la suite, l'élimination et la métabolisation sont prépondérantes. **Figure 6.**

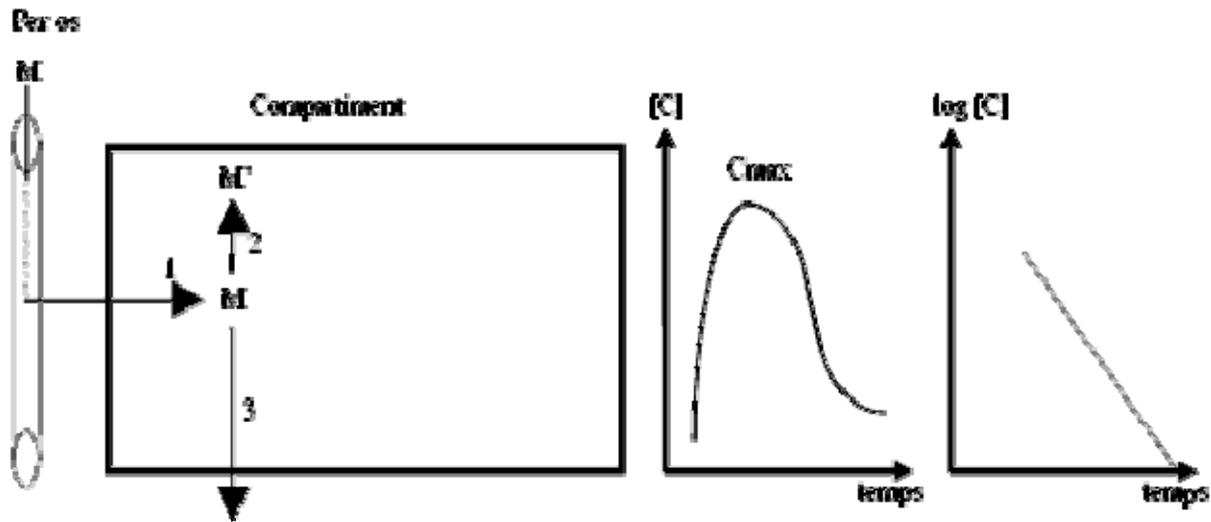


Figure 6. Evolution de la concentration plasmatique d'un médicament administré par voie orale.

1 = Absorption : Courbe croissante : $0 < C_{max} < 1 > 2 + 3$
2 = Biotransformation : $C_{max} < 1 = 2 + 3$
3 = Elimination : Courbe décroissante $1 < 2 + 3$

2.3 Notions de pharmacodynamie oculaire

La pharmacodynamie est l'étude de la relation antibiotique-bactérie en fonction du temps et de la concentration. Elle est prédictive à travers certains paramètres, de l'efficacité clinique de l'antibiotique et de sa capacité à prévenir l'émergence de souches résistantes.

Ces principaux paramètres sont :

- **CMI** : concentration minimale inhibitrice (mg/L). La $CMI_{90/50}$ d'un antibiotique est un paramètre de mesure du **pouvoir bacteriostatique** *in vitro*. Il s'agit de la CMI d'antibiotique inhibant 90/50% des souches d'un effectif important de souches. Un antibiotique est dit bactériostatique s'il empêche la multiplication de la bactérie, en

laissant aux systèmes de défense de l'hôte, le soin de détruire l'intrus (exemple de l'érythromycine, de la tétracycline ou du linézolide).

- **CMB**: concentration minimale bactéricide (mg/L). C'est la plus faible concentration en agent capable d'entraîner la mort d'au moins 99,99% des bactéries d'un inoculum (< 0,01% de survivants). Elle indique le **pouvoir bactéricide**.

Il est à noter qu'un antibiotique bactériostatique, à fortes doses, peut devenir bactéricide.

- **T>CMI** : c'est le temps passé entre deux administrations d'un antibiotique pendant lequel la concentration sérique de l'antibiotique est supérieure à la CMI de la bactérie en cause. (%)
- **ASC/CMI** : c'est l'aire sous la courbe rapportée à la CMI. Il s'agit de la surface sous la courbe des concentrations sériques sur 24 heures. (mg*h*L/L*mg).
- **Quotient inhibiteur** : rapport d'une concentration d'un antibiotique sur la CMI d'une bactérie à cet antibiotique. Le C_{max}/CMI et C_{min}/CMI sont les plus utilisés.
- **Concentrations critiques** : ce sont des concentrations moyennes pondérées établies après administration de la dose usuelle de l'antibiotique (concentration critique inférieure) et la dose maximale tolérée par l'organisme (concentration critique maximale).
- **EPA** ou l'effet post antibiotique : c'est l'existence d'un effet rémanent de l'antibiotique alors que ce dernier a disparu du tissu cible. Il est observé aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. *In vitro*, il se traduit par une absence de croissance des bactéries malgré que l'antibiotique ait été retiré de la culture comme lors de la dilution au 1/1000. L'EPA correspond donc au temps nécessaire pour obtenir une recroissance égale à un log décimal après le retrait de l'antibiotique, intervalle de temps étant comparé à la croissance de la population identique non exposée à l'antibiotique. L'EPA serait la

traduction d'une altération profonde du métabolisme bactérien. Il est par exemple de 2h pour les *S. aureus* exposés aux aminosides. L'effet post-antibiotique croît avec la concentration d'antibiotique initiale et avec le temps d'exposition.

Les modalités de bactéricidie dynamique *in vitro* des antibiotiques en fonction du temps ont dégagé deux types d'antibiotiques :

- **Les ATB temps-dépendants**

C'est le cas pour les β -lactamines ou la vancomycine par exemple. L'objectif du traitement est de maintenir le plus longtemps possible sur l'intervalle thérapeutique, les concentrations plasmatiques au dessus de la CMI de la bactérie ($T > CMI$). Cela a conduit au développement du concept de l'administration en continu des Antibiotiques. Le $T > CMI$ doit être de 100%. Dans le cas contraire il y a un risque de développement de mutants résistants.

- **Les ATB concentration-dépendants**

C'est le cas par exemple pour les aminosides ou les fluoroquinolones. L'augmentation de la concentration s'accompagne d'un accroissement de la bactéricidie. [61] Le pourcentage de succès thérapeutique dépend du rapport C_{max}/CMI (quotient inhibiteur), qui doit être d'au moins 4 à 8. [62] La pénétration tissulaire est dans ce cas favorisée par les fortes doses (gradient de concentration). La PK/PD représente ainsi un outil permettant au clinicien d'adopter une approche rationnelle dans la lutte contre l'endophtalmie bactérienne et de s'adapter aux nombreuses situations cliniques rencontrées.

CHAPITRE

2

L'endophtalmie bactérienne aiguë

Chapitre 3. L'endophtalmie bactérienne aiguë

3.1 Incidence

L'incidence de l'endophtalmie bactérienne aiguë post-opératoire varie selon les sites déclarants et du type de chirurgie. Le recours à la prévention par injection intracaméculaire d'antibiotique en fin d'intervention chirurgicale semble minorer ce risque. [2] [63] Il est de 0.025% (14/56 672 toutes chirurgies endoculaires confondues). [1] Après chirurgie de la cataracte, les taux rapportés sont de 0,22% (15/6805 cataractes), [2] 0.073% (5/6836) [63] ou encore 0.053% (81/151 874), [2] et 0,028% (8/28568). [1] Le taux est de 0.011% après vitrectomie (2/18492), [1] et de 0.1% après kératoplastie transfixiante (3/2788). [1] Ce taux atteint 6,8% après une plaie perforante du globe. [64]

3.2 Signes cliniques

Le début est le plus souvent brutal dans les jours qui suivent l'opération. L'œil est le plus souvent douloureux et photophobe. La baisse de vision (94,3%) est variable. Quatre-vingt six pourcents des patients inclus dans l'étude EVS avait ainsi une acuité visuelle de moins de 1/20^{ème}. A l'examen l'œil est rouge (82,1%), des sécrétions peuvent être présentes. Il existe une réaction inflammatoire importante qui se traduit par un œdème cornéen, un trouble de la chambre antérieure (tyndall qui correspond à la suspension de protéines et de cellules inflammatoires dans la chambre antérieure) et un niveau de pus (hypopion 85,7%) est parfois noté. La pupille est resserrée (myosis) avec parfois des synéchies irido-cristalliniennes. La pression intraoculaire est souvent abaissée. Un œdème palpébral peut exister (34,5%). Le fond d'œil est le plus souvent d'accès difficile (79,1%) du fait de la présence d'une

hyalite dense. Le délai d'apparition de l'infection après une opération de la cataracte varie de 1 à 63 jours avec une médiane à 6 jours. [4]

3.3 Bactéries responsables d'endophtalmies

3.3.1 Bactéries responsables d'endophtalmies bactériennes aiguës postopératoires

L'étude prospective EVS (*Endophthalmitis Vitrectomy Study*) [4] fait référence dans ce domaine. Au cours de l'EVS (de 1990 à 1994), les 420 patients inclus ont subi conjointement un prélèvement d'humeur aqueuse et de vitré. Les cultures ont été positives dans 69,3 % des cas. Des bactéries à Gram positif ont été isolées dans 94,2 % de ces cas comprenant :

- 70 % de *Staphylococcus epidermidis*
- 24,1 % d'autres espèces à Gram positif. Ce dernier groupe (74 cultures) comprenait 32 cultures soit 9,9 % de *Staphylococcus aureus*, 29 cultures soit 9,0 % de *Streptococcus sp.*, 7 cultures soit 2,2 % d'*Enterococcus sp.*
- 5,9 % de bactéries à Gram négatif.

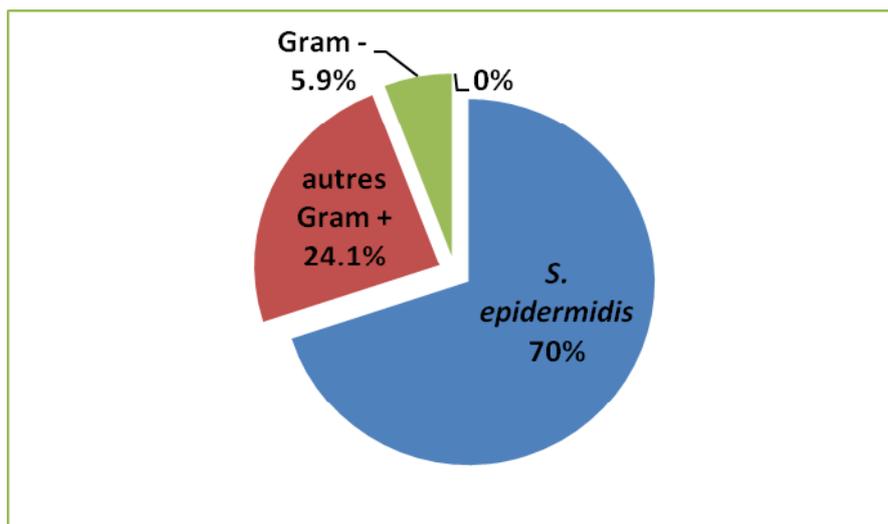


Figure 7. Isolats bactériens rapportés dans l'étude EVS.

De nombreuses autres bactéries sont responsables d'endophtalmies aiguës comme *Enterococcus faecalis*, *Enterobacteriaceae*, *Moraxella sp.* [54] Les sources de contamination sont variées (origine aérienne, tissus environnants, matériel de bloc, contamination des solutés en particulier par *Pseudomonas*). [65] Il est aujourd'hui admis que des bactéries de la flore bactérienne commensale, du cul-de-sac conjonctival du patient, pénètrent dans l'œil au moment de l'acte chirurgical et sont à l'origine des endophtalmies. Bannerman *et al* ont ainsi démontré l'analogie entre les staphylocoques à coagulase négative responsables d'endophtalmies et ceux retrouvées dans les paupières de ces mêmes patients. [66] Speaker *et al* ont comparé par PCR les bactéries prélevées dans le vitré de patients présentant des endophtalmies bactériennes postopératoires et les bactéries de la flore conjonctivale, nasale, et palpébrale de ces mêmes patients et ont retrouvé 82 % d'analogie (14/17). [67]

3.3.2 Autres endophtalmies bactériennes

Les endophtalmies bactériennes postopératoires chroniques surviennent plus de six semaines après la chirurgie, et proviennent de bactéries séquestrées dans le sac lacrymal ou encore dans le sac capsulaire et sont libérées après une capsulotomie au laser. Les bactéries en cause sont *P. acnes*, [68, 69] le staphylocoque à coagulase négative [70] et *Corynebacterium spp.* [71]

Les bactéries en cause dans les endophtalmies endogènes sont principalement les streptocoques, les staphylocoques dorés, [72] et *B. cereus*. [73] Les bactéries à Gram négatif, plus rarement en cause, varient selon les séries.

3.4 Etat des résistances bactériennes en ophtalmologie

L'antibiogramme a pour but de déterminer les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI en mg/L) d'une souche bactérienne vis-à-vis des divers antibiotiques. Les CMI sont le plus souvent interprétées par les laboratoires en termes de possibilité thérapeutique. Cette interprétation consiste à comparer les valeurs des CMI avec les concentrations critiques établies pour les diverses classes d'antibiotiques. Les critères permettant d'établir les valeurs des concentrations critiques sont multiples : critères bactériologiques, critères pharmacocinétiques observés avec les posologies normales et maximales et selon les différentes voies d'administration et critères cliniques permettant de moduler les données pharmacologiques et critères techniques tenant à la reproductibilité des résultats. La prise en compte de ces différents critères permet de dresser un tableau des concentrations critiques pour les principaux antibiotiques. En France, ce tableau est établi, chaque année, par le **Comité de l'Antibiogramme** de la Société Française de Microbiologie. Une souche sensible est une souche pour laquelle la probabilité de succès thérapeutique est forte dans le cas d'un traitement par voie systémique avec la posologie recommandée dans le résumé des caractéristiques du produit (RCP). Une souche de sensibilité intermédiaire est une souche pour laquelle le succès thérapeutique est imprévisible. Ces souches forment un ensemble hétérogène pour lequel les résultats obtenus *in vitro* ne sont pas prédictifs d'un succès thérapeutique. Une souche résistante est une souche pour laquelle il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique quels que soient le type de traitement et la dose d'antibiotique utilisée.

Cependant, la notion de résistance est relative et une souche bactérienne est résistante à un antibiotique lorsqu'une modification de son capital génétique lui permet de tolérer une concentration d'antibiotique notablement plus élevée que la

concentration qu'il est possible d'obtenir *in vivo* à la suite d'un traitement. La notion de sensibilité ou de résistance est à considérer avec précaution. En effet les CMI critiques, élaborées par La Société Française de l'Antibiotique, sont établies à partir des concentrations plasmatiques après administration par voie générale corrélées au résultat clinique correspondant. Il n'existe pas d'étude à grande échelle en ophtalmologie corrélant les concentrations obtenues dans les tissus oculaires et le résultat clinique, permettant d'établir des CMI critiques spécifiques à l'ophtalmologie. Ainsi, pour illustrer les variations existantes dans ce domaine, la concentration de lévofloxacine dans les larmes après une administration d'une goutte à 0.5% atteint le double de celle obtenue après la prise de 750 mg de lévofloxacine par voie orale sans en avoir la même toxicité générale. [25] Une lecture interprétative de l'antibiogramme, fondée sur la connaissance des spécificités anatomiques de l'œil (présence d'une barrière hémato-oculaire, influence de l'inflammation sur la pharmacocinétique des antibiotiques, variétés des voies d'administration et différence de concentrations selon le compartiment oculaire étudié, notion de toxicité oculaire des ATBs.), pourrait être envisagée et permettrait à recatégoriser un résultat "sensible" en un résultat "intermédiaire" ou "résistant" en raison d'un risque d'échec thérapeutique. A l'inverse, un résultat 'résistant' se transforme en 'sensible' si les concentrations de l'antibiotique peuvent être majorées dans l'œil, assurant ainsi une efficacité antibactérienne satisfaisante sans entraîner d'effets systémiques délétères. La lecture interprétative de l'antibiogramme n'est cependant pas encore d'actualité en ophtalmologie.

- EVS (Early Vitrectomy Study)

Antibiotique	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Vancomycine	100 %	100 %
Amikacine	86,1 %	81,3 %
Ciprofloxacine	77,9 %	78,6 %
Oxacilline	62,7 %	
Ceftazidime	62,1 %	77,4 %

Tableau 7. Sensibilité des isolats d'endophtalmie dans l'étude EVS. [4]

- Ocular Tracking Resistance in U.S. Today (O TRUST)

L'étude Ocular TRUST [5] a permis de mesurer la sensibilité aux antibiotiques de bactéries prélevées au niveau de l'œil (*S. aureus*, *S. pneumoniae*, et *H. influenzae*) aux USA entre octobre 2005 et juin 2006. Les antibiotiques testés lors de cette étude étaient les fluoroquinolones (ciprofloxacine, gatifloxacine, lévofloxacine, et moxifloxacine), les β -lactames (pénicilline), les macrolides (azithromycine), les aminoglycosides (tobramycine), l'inhibiteur de la dihydrofolate réductase (triméthoprime), et les polypeptides (polymyxine B).

Ocular TRUST a ainsi retrouvé une sensibilité aux antibiotiques similaire entre 2006 et les isolats de référence collectés en 1996. Toutes les souches de *S. pneumoniae* étaient sensibles à la gatifloxacine, la lévofloxacine, et la moxifloxacine et un peu moins de 15% présentaient une sensibilité diminuée à la ciprofloxacine. Les souches de *H. influenzae* se sont avérées sensibles à tous les antibiotiques excepté le triméthoprime (85,7%). Ces données semblent rassurantes quant à la forte pression de sélection existante en ophtalmologie, du fait de l'utilisation intensive des fluoroquinolones. Concernant *S. aureus*, la sensibilité aux antibiotiques semble stable dans le temps. Les souches Méti-R (18,6% des staphylocoques collectés) présentaient des taux élevés de résistance aux fluoroquinolone puisque près de 80% étaient résistantes aux fluoroquinolones, même les plus récentes, contre 15% de

résistance chez les souches méti-S.

L'étude OCULAR TRUST, qui a le mérite d'être multicentrique (278 prélèvements de 35 centres différents), conclut à la relative stabilité des sensibilités aux antibiotiques des isolats oculaires.

- Plus inquiétant, Miller *et al* ont étudié l'évolution des résistances aux antibiotiques de 111 souches de staphylocoques à coagulase négative, responsables d'endophtalmies sur une durée de 15 ans. Avant 1994, 96,6% des souches de staphylocoques étaient sensibles à la moxifloxacine et à la gatifloxacine. Après 2000, ce taux a chuté pour atteindre 65,4% de souches sensibles à ces antibiotiques, rejoignant le niveau de résistance du staphylocoque aux autres fluoroquinolones testées (ciprofloxacine, lévofloxacine, ofloxacine). La CMI₉₀ est ainsi passé de 0.19 µg/mL et 0.12 µg/mL respectivement, à plus de 32 µg/mL ces dernières années. [7] D'autres études vont dans ce sens. [74] Cette tendance s'expliquerait par l'emploi abusif des fluoroquinolones de dernière génération aux USA. Notons que la sensibilité des staphylocoques au linézolide dans ces études a toujours été de 100%.
- Plus récemment au congrès ARVO 2008, l'équipe de Miller a retrouvé une diminution de la sensibilité des isolats staphylococciques oculaires aux glycopeptides. Bien que les CMI₅₀ et CMI₉₀ soient restées identiques par rapport à la période de référence 1990-1994 (respectivement inférieures ou égales à 1 et à 2 mg/L), seuls 20% des staphylocoques à coagulase négative (n=67) collectés sur la période 2005-2007 étaient sensibles à des concentrations de glycopeptides inférieures à 1 mg/L contre 94% quinze ans auparavant (n=125). 80% des staphylocoques présentaient une résistance de bas niveau aux glycopeptides. [75]

Ces données issues d'un seul centre, nécessitent d'être confirmées par des études multicentriques. Il s'agit néanmoins d'un signe d'alarme annonçant l'émergence de

résistances acquises due à l'utilisation extensive des molécules les plus précieuses, à des buts préventifs comme cela est pratiqué aux USA (exemple des instillations peri-opératoires de fluoroquinolones, des injections intracaméculaires en fin d'intervention de cataracte de moxifloxacin, de gatifloxacin ou encore de vancomycine).

3.5 Prise en charge-type d'une endophtalmie bactérienne aiguë

Compte tenu de ces informations concernant les bactéries responsables d'endophtalmie et étant donné que le temps de génération bactérien est de 20 min, l'approche thérapeutique suivante a été adoptée en cas de suspicion d'endophtalmie bactérienne aiguë. **Tableau 8.**

Injection intravitréenne en urgence de

1 mg/100µL de vancomycine

2.25 mg/100µL de céftazidime

- Ponction de chambre antérieure ou biopsie du vitré pour examen bactériologique (direct et mise en culture) sans retarder l'administration du traitement antibiotique
- **Imipénèm** IV 500mgx4/j + **Lévofloxacine** (per os ou IV) 500mg 1cpx 2/j pendant 5j
- Traitement antibio-corticoïde local (4 gouttes /j) et injection sous conjonctivale de 1mg de bétaméthasone x 2/j).
- Le recours aux IVTs de dexaméthasone et/ou au traitement corticoïdes par voie générale est décidé au cas par cas.
- Surveillance clinique rapprochée les premiers jours (biquotidiennes) et réinjection d'ATB à 72H s'il n'y a pas d'amélioration clinique.
- Vitrectomie après contrôle de l'inflammation oculaire (en général après 10 jours de trt)

Tableau 8. Prise en charge type d'une endophtalmie bactérienne aiguë post-opératoire au service d'ophtalmologie du centre hospitalo-universitaire de Strasbourg en 2011.

Cette prise en charge a ainsi permis d'améliorer le pronostic visuel final en comparaison avec les résultats de l'étude EVS (données non publiés). Cependant, le recours aux injections intravitréennes, effectuées sous une simple anesthésie topique, demeure une épreuve pour les patients souvent âgés, ce qui constitue un argument supplémentaire, en plus des raisons épidémiologiques, pour rechercher une alternative thérapeutique.

CHAPITRE

4

**Le linézolide:
une alternative thérapeutique
dans l'endophtalmie ?**

Chapitre 4. Le linézolide : une alternative thérapeutique dans l'endophtalmie ?

4.1 Présentation générale

Le linézolide dont la composition chimique est les (S)-N-[[3-[3-Fluoro-4-(4-morpholinyl)phenyl]-2-oxo-5-oxazolidinyl] methyl]-acétamide est le premier représentant de la classe des oxazolidinones, à obtenir l'autorisation de mise sur le marché en France le 31/08/2001. [76] **Figure 8.**

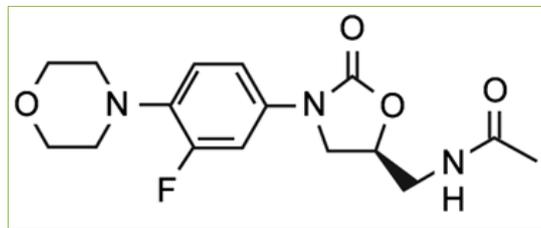


Figure 8. Formule moléculaire du linézolide.

C'est une oxazolidinone substituée obtenue par synthèse chimique en 1987 (et non par extraction à partir d'un microorganisme comme un grand nombre d'autres antibiotiques). L'AMM a été obtenue pour le traitement des pneumonies nosocomiales ou communautaires à bactéries sensibles et dans les infections compliquées de la peau et des tissus mous. Ces principales caractéristiques techniques sont résumées dans le **tableau 9.**

Titulaire de l'AMM	Laboratoires Pfizer®
Formule	C ₁₆ H ₂₀ FN ₃ O ₄
Masse moléculaire	337.346 g/mol
Biodisponibilité	100% (oral)
Liaison protéique	31%
Catabolisme	Hépatique 50–70%
demi-vie	4.2–5.4 heures
Élimination	Rénale 80–85%
Prix journalier	126 euros

Tableau 9. Fiche technique-linézolide.

4.2 Mode d'action

Le mécanisme d'action original de cet antibiotique, par inhibition de la synthèse protéique, empêche en théorie l'apparition de résistance croisée avec d'autres classes d'antibiotiques. [77] Le linézolide inhibe l'initiation de la synthèse protéique bactérienne en empêchant la formation de la sous unité 70S du ribosome bactérien bloquant ainsi l'initiation de la traduction protéique. **Figure 9.** Les autres antibiotiques bloquant la traduction (macrolides, aminosides, chloramphénicol, tétracyclines..) agissent plus en aval stoppant la phase d'élongation.

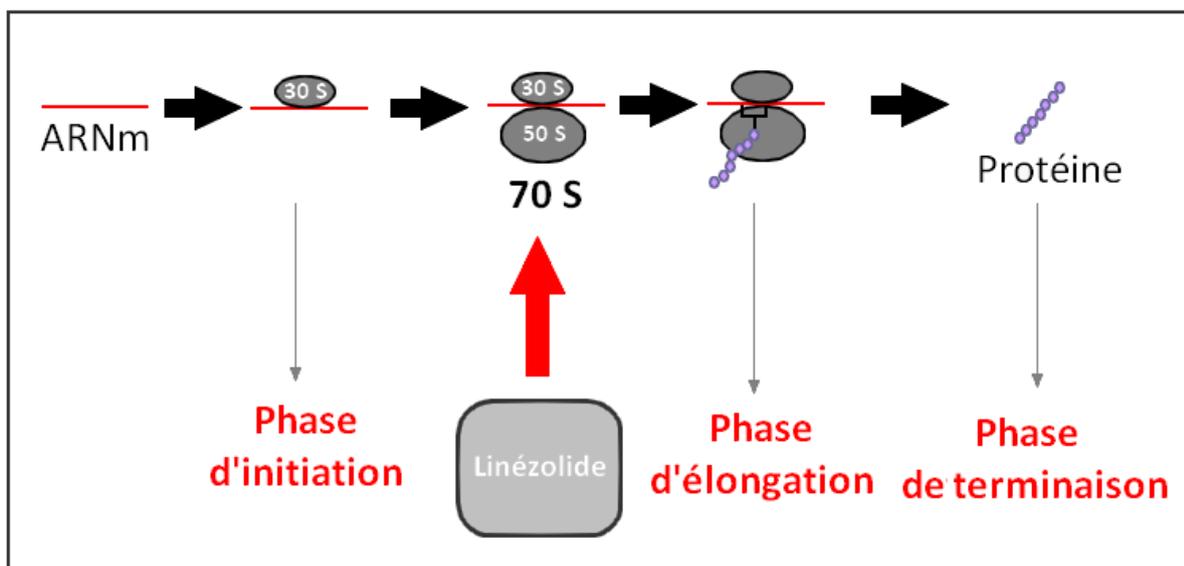


Figure 9. Mode d'action du linézolide.

4.3 Spectre d'action

Le spectre d'action du linézolide est étroit puisqu'il ne concerne que les bactéries à Gram positif comme indiqué dans le tableau ci dessous. **Tableau 10.**

ESPECES HABITUELLEMENT SENSIBLES		ESPECES RESISTANTES
Gram positif aérobie	Gram positif anaérobie	
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	Bactéries à Gram négatif
<i>Staphylococcus</i> coagulase négative	<i>Peptostreptococcus sp</i>	
<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>pyogenes</i> , <i>agalactiae</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	
Streptocoques du groupe B, C et G	<i>Actinomyces spp</i>	
<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>faecium</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>	
<i>Corynebacterium spp</i>		

Tableau 10. Données issues du RCP ZYVOXID® (Dictionnaire Vidal 2004) et Goldstein et al[78]

Le linézolide demeure actif sur les bactéries à Gram positif résistantes à d'autres antibiotiques comme le *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline ou à l'oxacilline (SARM), [11] les pneumocoques pénicillino-résistants, les staphylocoques de sensibilité diminuée aux glycopeptides (GISA,VISA...), ou encore les *Enterococcus faecium* et *faecalis* résistants à la vancomycine. [12, 13]

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) du linézolide contre ces bactéries est de l'ordre de 1–4 mg/L. [79]

De plus, à des concentrations sub-inhibitrices, le linézolide réduit la production de certains facteurs de virulence de *S. aureus* comme les autolysines, la protéine A, les hémolysines ou encore les entérotoxines A et B. [80, 81] Cette action anti-toxinique

pourrait se révéler précieuse dans la lutte contre l'inflammation secondaire au relargage des toxines dans l'endophtalmie bactérienne aiguë.

4.4 Présentation et posologie

Le linézolide est disponible en France sous forme de comprimés de solution intraveineuse et de suspension orale. Aucune utilisation du linézolide en collyre n'a été décrite pour l'instant. **Tableau 12.**

POSOLOGIE		PRESENTATION		
Enfant	Patients >12 ans	ZYVOXID® IV	ZYVOXID® comprimés	ZYVOXID® suspension orale
10 mg/kg IV ou per os /8h	600 mg IV ou per os /12h			
pendant 10 à 14 jours	pendant 10 à 14 jours	2 mg/ml (poche de 300ml)	400 mg comprimé pelliculé 600 mg comprimé pelliculé	100 mg/5 ml

Tableau 12. Galénique et posologie du linézolide.

4.5 Etat des résistances au linézolide

Le programme SENTRY, [82] qui s'est déroulé entre 1998 et 2002 et qui a porté sur l'étude de la sensibilité de 21 688 souches, n'a retrouvé aucune souche de *S. aureus* résistante au linézolide. De rares souches cliniques de *S. aureus* résistantes au linézolide ont été rapportées post-AMM, en particulier chez 2 patients. [83] De même de rares cas d'*Enterococcus faecalis* [83] et d'*Enterococcus faecium* [10] ont été décrits.

Le programme de surveillance de l'émergence de résistance au linézolide (Zyvox Annual Appraisal of Potency and Spectrum Program), [84] après cinq ans de

surveillance de bactéries gram positif en Europe, Asie, Australie et Amérique du sud, a finalement porté sur 4216 souches (*Staphylococcus aureus* (54%), staphylocoque à coagulase négative (14,6%), entérocoques (10%), *Streptococcus pneumoniae* (9,4%), *viridans* (5%), et β -hémolytique (7%)). Les CMI₅₀ et CMI₉₀ du linézolide pour *S. aureus* étaient toutes les deux de 2 μ g/mL, et de 1 μ g/mL pour les staphylocoques à coagulase négative. Plus de 99% des entérocoques étaient sensibles au linézolide avec une CMI₅₀ de 1 μ g/mL. De même, toutes les CMI pour les streptocoques se sont avérées être inférieures à 2 μ g/mL. Deux souches d'entérocoque (Allemagne et Chine) et 3 souches de staphylocoques coagulase négative (Brésil, Italie) étaient finalement résistantes au linézolide. Un seul entérocoque présentait une mutation G2576T documenté.

ANTIBIOTIQUES	PORINES EFFLUX	ENZYME D'INACTIVATION	MODIFICATION DE LA CIBLE
QUINOLONONES	OUI	OUI	OUI (Topo-isomérases)
B-LACTAMINES	OUI	OUI (β -lactamases)	OUI (PLP)
AMINOSIDES	OUI	OUI	OUI (Ribosome)
TETRACYCLINES	OUI	OUI	OUI (Ribosome)
GLYCOPEPTIDES	-	-	OUI (D-Ala-D-Ala)
MACROLIDE	OUI	OUI	OUI (Ribosome)
FOSFOMYCINE	OUI	OUI	-
ACIDE FUSIDIQUE	-	-	OUI
RIFAMPICINE	-	-	OUI (ARN polymérase)
CHLORANPHENICOL	OUI	OUI	-
SULFAMIDES	OUI	-	OUI
OXAZOLIDINONES	OUI (BG-)[85]	NON	Oui (Ribosome, très rare)

Tableau 11. Récapitulatif des mécanismes de résistances naturelles ou acquises au linézolide comparés à ceux des autres antibiotiques : d'après F. Jehl (De l'antibiogramme à la prescription, édition Biomérieux; 2003), modifié.

Plus récemment, des infections nosocomiales à des souches *S. epidermidis* résistantes au linézolide (mutations G2474T, G2576T) en particulier par mutation du domaine V du gène codant pour l'ARN 23 S ont été signalées. [86] [87]

4.6 Utilisation clinique

4.6.1 Hors ophtalmologie

- Panorama de l'utilisation du linézolide en France

ZYVOXID® est autorisé en France, depuis août 2001, selon une procédure de reconnaissance mutuelle (Royaume-Uni, état membre de référence) et est commercialisé depuis décembre 2001.

Il est indiqué dans le traitement des pneumonies nosocomiales et communautaires et les infections compliquées de la peau et des tissus mous lorsqu'elles sont documentées ou suspectées à bactéries Gram positif sensibles. Selon l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (Afssaps), un traitement par linézolide doit être initié uniquement en milieu hospitalier. La durée maximale du traitement recommandée dans le résumé des caractéristiques du produit est de 28 jours.

Un bilan des prescriptions en France a été mené par les laboratoires Pfizer en 2005 afin de mieux préciser les pratiques de prescription du ZYVOXID® par les médecins hospitaliers. Les résultats indiquent que les principaux prescripteurs de linézolide, y compris hors AMM, sont les réanimateurs, les infectiologues et les pneumologues. Les indications principales sont les pneumopathies, les bactériémies/infections sur cathéter, les infections de la peau et des tissus mous, les septicémies, les ostéomyélites et les sepsis sur prothèse ostéo-articulaire, et enfin les endocardites. Les raisons déclarées du choix du linézolide sont principalement un relais *per os* possible (68%), un spectre intéressant sur les bactéries résistantes (62 %), une

prescription possible en cas d'insuffisance rénale (43 %), une bonne diffusion tissulaire de l'antibiotique (38 %) ainsi qu'une bonne efficacité du produit (32%).

	Concentrations critiques
Souches sensibles	≤ 2 mg/l
Souches résistantes	> 4 mg/l

Tableau 12. Concentrations critiques retenues en France en 2008 déterminant si la souche rencontrée est sensible, intermédiaire ou résistante au linézolide.

4.6.2 Utilisation en ophtalmologie

Le linézolide ne disposant pas de l'AMM en ophtalmologie, ce chapitre s'intéresse donc à son utilisation potentielle en ophtalmologie, principalement dans les infections graves que représentent les endophtalmies. **Tableau 13.** Le traitement des kératites bactériennes à bactéries Gram positif pourraient également bénéficier de l'adjonction de linézolide sous forme de collyre renforcé. L'utilisation du linézolide chez l'enfant comme alternative aux fluoroquinolones peut également s'envisager.

Type d'infection oculaire	Principales bactéries en cause	Intérêt potentiel du linézolide	Réf
Endophtalmies postopératoires de cataracte	94.1% Gram + 5.9% Gram -	√ Non	[4]
Endophtalmies postopératoires de chirurgie filtrante	13/42 <i>S. aureus</i> 12/42 <i>S. epidermidis</i> 8/42 Streptocoque 2/42 <i>H. influenzae</i>	√ √ √ Non	Waheed <i>et al</i> , 1998
Endophtalmies secondaires aux plaies perforantes	<i>S. epidermidis</i> 25% <i>Bacillus spp</i> 20% Streptocoques 12% Autre BG-, <i>H. influenzae</i> chez l'enfant	√ Non √ Non	Peymann <i>et al</i> 2004
Endophtalmies postopératoires de vitrectomie	<i>S. epidermidis</i> Streptocoque	√ √	Cohen <i>et al</i> 1995

Tableau 13. Dans ce tableau sont répertoriées les différentes situations de survenue des endophtalmies bactériennes aiguës ainsi que les principales bactéries en cause. Le signe √ correspond à un possible intérêt de l'utilisation du linézolide dans ces situations.

4.7 Tolérance

Basée sur les données françaises de pharmacovigilance, la tolérance du linézolide est satisfaisante. En effet, le bilan des notifications d'effets indésirables (EI), imputables au linézolide jusqu'en novembre 2006, porte sur 192 notifications suffisamment documentées pour pouvoir être retenues, dont 132 cas d'atteintes hématologiques.

Les anémies isolées surviennent le plus souvent après une durée prolongée de traitement (traitement de plusieurs semaines dans le cadre essentiellement d'une infection ostéo-articulaire à staphylocoques). A l'opposé, lorsqu'une thrombopénie survient, sans atteinte associée des autres lignées, le délai de survenue est court dans la majorité des cas (quelques jours). Le nombre des déclarations d'effets

indésirables hématologiques est stable au cours du temps et pourrait même diminuer. Ceci peut s'expliquer soit par des durées de traitement plus courtes, soit par une plus grande sous-notification de ce type d'effets indésirables, désormais bien connus des prescripteurs.

Les atteintes neurologiques sont très largement dominées par les neuropathies périphériques dont 10% de neuropathies optiques. Les autres effets indésirables se rapportent principalement à des atteintes hépatiques correspondant le plus souvent à des élévations asymptomatiques des transaminases, à des acidoses métaboliques, [88] à des angio-œdèmes [89] et à des réactions cutanées non graves ainsi qu'à un cas de syndrome sérotoninergique. Les acidoses lactiques sont vraisemblablement le témoin d'une dysfonction mitochondriale. En effet, des résultats expérimentaux pouvant expliquer ce type d'effet indésirable ont été publiés et rapportent, avec la classe des oxazolidinones, une inhibition de la synthèse de certaines protéines mitochondriales de la chaîne respiratoire susceptible d'altérer l'énergétique mitochondriale. [90, 91] Les neuropathies optiques secondaires à l'utilisation prolongée du linézolide seraient également d'origine mitochondriale. [92]

4.8 Données disponibles sur la pharmacocinétique oculaire

Peu de données sur la pharmacocinétique oculaire du linézolide sont disponibles. Les rares études de pharmacocinétique oculaire du linézolide ont été conduites chez l'homme sur yeux non infectés. **Tableau 14.**

Posologie de Linézolide	N =	Temps écoulé avant prélèvement	Site de prélèvement			Ref
			Serum	Humeur aqueuse	Vitré	
600 mg IV	21	• 1h	11,48	4.94		[93]
1cp (600mg)	29	• <2h	5.0±3.3	0.77±0.6	0.3±0.3	[94]
		• > 2h	7.6±2.7	3.8±1.2	2.3±1.4	
2 cp (600mg)		• 12h	10.3±4.1	6.6±2.7	5.7±2.7	
1cp (600 mg)	12	• <77 min			0.06	[95]
		• > 77min			1.25	
1cp (600mg)	17	• 1-3h		1,9	1,78	[96]
		• 3-6h		4,98	3,29	
		• 6-9h		3,39	3,74	
		• 9-12h		2,82	3,69	
		• > 12h (n=1)		3,58	4,65	

Tableau 14. Études de pharmacocinétique du linézolide chez l'homme- Yeux non inflammatoires.

A l'exception de ces quelques études de pénétration oculaire après administration orale ou intraveineuse, nous n'avons retrouvé aucune étude dans la littérature sur l'efficacité du linézolide dans les infections oculaires, même expérimentales.

**Evaluation de l'utilisation du
linézolide dans un modèle
expérimental d'endophtalmie
à *S. aureus***

Chapitre 5. Evaluation de l'utilisation du linézolide dans un modèle expérimental d'endophtalmie à *S. aureus*

5.1 Planification des expérimentations

Pour évaluer l'utilisation du linézolide dans les infections oculaires graves et en particulier l'endophtalmie bactérienne aiguë, le plan ci-dessous a été suivi :

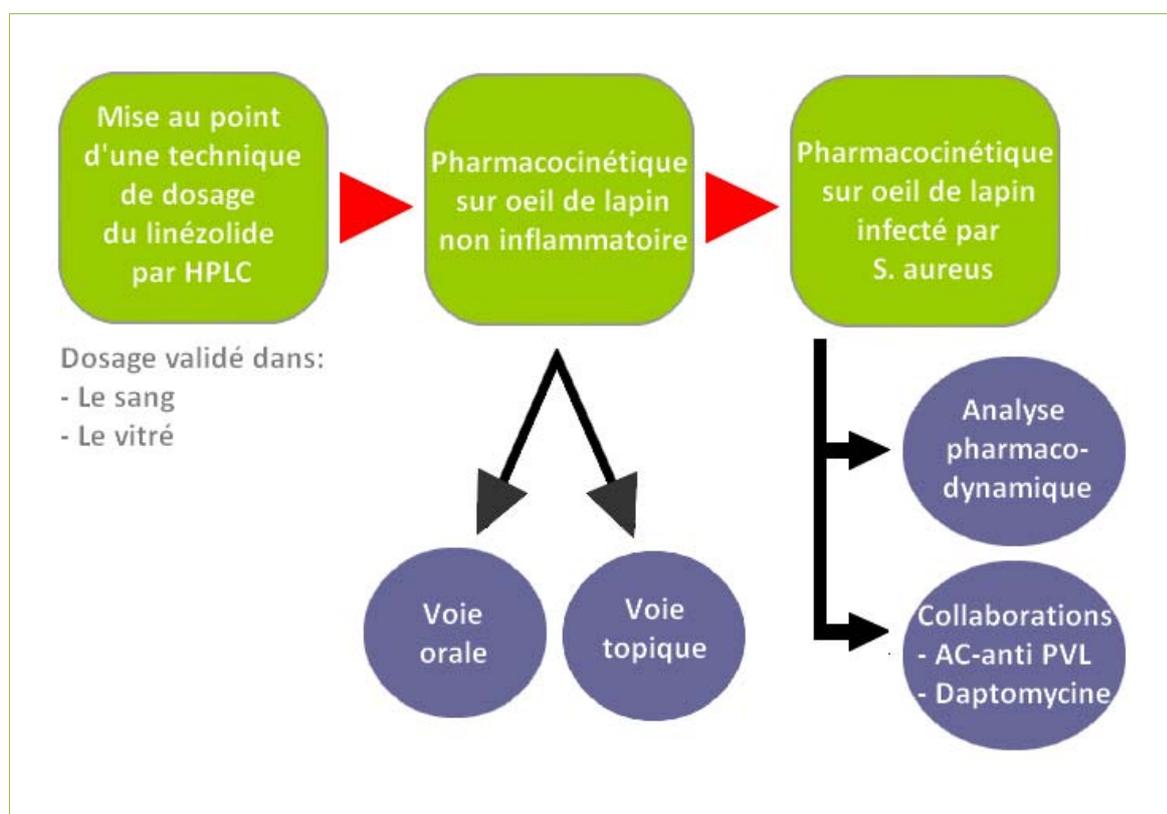


Figure 10. Mise au point de la technique de dosage du linézolide.

5.2 Mise en place et validation d'une technique de dosage du linézolide par chromatographie haute performance liquide (CHPL)

5.2.1 Principes de la chromatographie

La chromatographie est une méthode de séparation des constituants d'un mélange. Le principe de l'CLHP est celui du passage d'un fluide, appelé **phase mobile**, dans une colonne dénommée **phase stationnaire**. Le mélange à séparer ou soluté est injecté dans la

colonne où il se dilue dans la phase mobile et traverse la colonne. En fonction de critères physicochimiques bien définis, la vitesse de traversée, dit temps d'élution, est différent selon les composants. Un détecteur placé à la sortie de la colonne et couplé à un enregistreur permet d'obtenir un tracé, le chromatogramme. Les pics ainsi détectés sont définis par un temps de rétention (temps au bout duquel un composé est élué de la colonne et détecté) ainsi qu'une hauteur et une aire sous la courbe proportionnelles à la concentration du composant ainsi élué. **Figure 11.**

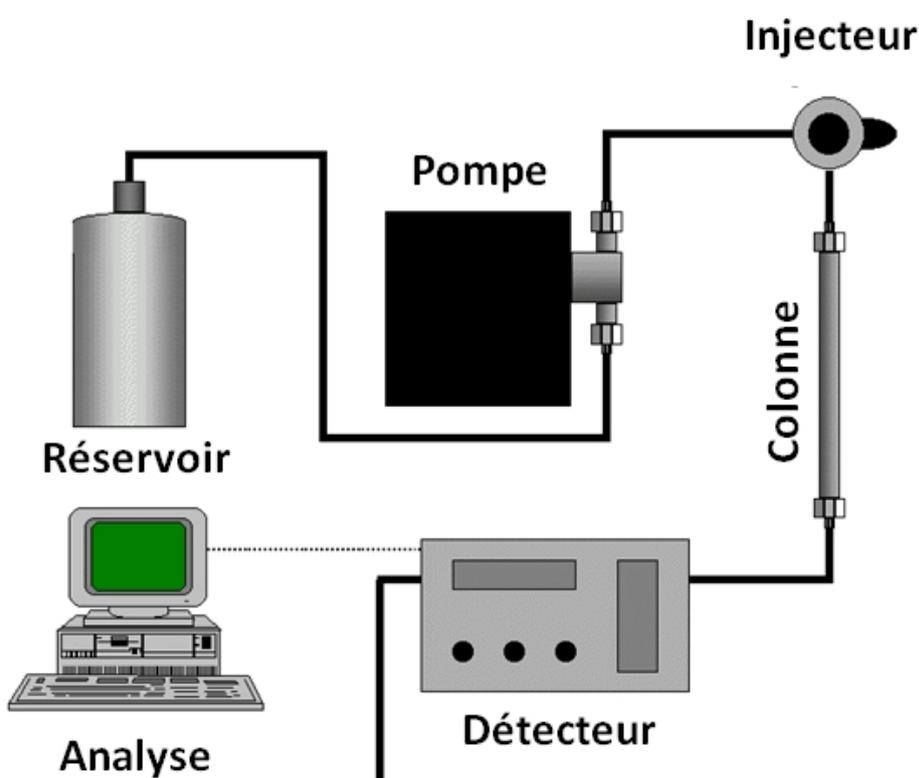


Figure11. Principe de la CHPL.

5.2.2 Caractéristiques techniques

Le réservoir de solvant (éluant) contient la phase mobile constituée d'un gradient d'élution formé d'acétonitrile (76%), d'eau (24%), et ajusté à un PH=5. Le chromatographe liquide (125 solvent delivery module, Beckmann, Fullerton, CA, USA) dispose d'une pompe fonctionnant en mode isocratique (même gradient utilisé dans le temps) avec un débit fixé

à 1ml/min. La vanne d'injection est constituée d'une boucle de 20 μ L (Beckmann Instruments Inc, San Ramon, CA, USA). La colonne en inox (Ultrasphere XL-ODS, Beckmann, Instruments Inc, San Ramon, CA, USA), d'une dimension de 150 x4,6 mm, contient la phase stationnaire en phase inverse :

En **phase normale**, la colonne est remplie de gel de silice. Ce matériau étant très polaire, l'éluant doit être apolaire. Ainsi, lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaire qui sortent en tête. L'inconvénient d'une telle phase est la détérioration rapide au cours du temps du gel de silice qui entraîne un manque de reproductibilité des séparations.

La **phase inverse** est composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C₈ et C₁₈). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire (ACN, MeOH, H₂O). Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier.

Le détecteur à ultraviolets mesure l'absorption de la lumière par le produit à la sortie de la colonne. La lampe à vapeur de mercure fonctionne à la longueur d'onde constante de 254 nm.

5.2.3 Validation de la technique

La validation dans le sérum et dans le corps vitré a porté sur trois concentrations de linézolide : l'une faible (0,5mg/L), l'une moyenne (5mg/L) et l'une considérée comme cliniquement élevée (30 mg/L).

La **répétabilité** a été mesurée en comparant 10 aliquots d'un même échantillon pour chacune des concentrations testées, analysées à la suite dans les mêmes conditions d'expérimentation.

La **reproductibilité** a été évaluée en mesurant la variabilité intra-journalière qui consistait à analyser 10 échantillons différents pour chaque concentration préparés le même jour, ainsi

qu'en mesurant la variabilité inter-journalière en comparant 10 échantillons de chaque concentration préparés à des jours différents selon les mêmes conditions d'expérimentation. Les coefficients de variation, traduisant aussi bien la répétabilité que la reproductibilité de la méthode, étaient tous inférieurs à 8%.

La **linéarité**, testée pour des concentrations allant de 0,1 à 20 mg/L, intervalle jugée correspondant aux valeurs habituelles rencontrées en clinique, était satisfaisante (respectivement 0,99 dans le sérum et $r=0,97$ dans le vitré). Le **taux d'extraction** du linézolide du sérum et du vitré ainsi que la **stabilité** ont également été mesurés et se sont avérés satisfaisants.

La technique de dosage par CHPL du linézolide ainsi mise au point s'est avérée reproductible, précise et facile à mettre en œuvre. **ARTICLE1.**

High-performance liquid chromatographic assay to measure linezolid antibiotic in eye tissues

Maher Saleh^{1,2}, Tristan Bourcier², Gilles Prevost¹, Claude Speeg-Schatz², and François Jehl^{1,*}

¹Department of Microbiology, Laboratory of Antibiology, ²Department of Ophthalmology, University Hospital, Louis Pasteur University, Strasbourg, France

ABSTRACT

Linezolid is a promising drug for treating severe Gram positive bacterial infections of the eye. This is the first eye dedicated and validated high-performance liquid chromatography technique to measure linezolid in vitreous humor. The separation was performed by reversed phase chromatography. The mobile phase consisted of 25 mmol/L ammonium acetate-acetonitrile (76:24, v/v) (pH 5) with an UVdetection procedure. The quantification limit in vitreous was 0.1 mg/L and the method was validated over a concentration range relevant for clinical use (0.2-20 mg/L). The intra- and inter-assay coefficients of variation were both satisfactory (below 8%). Stored at various concentrations for 4 weeks at +4°C and -80°C, linezolid in vitreous humor did not reveal any appreciable degradation. This technique, which already allowed us to study ocular pharmacokinetic of this antibiotic in an experimental rabbit model, could be suitable for human studies too.

KEYWORDS: linezolid, eye, vitreous, high performance liquid chromatography, endophthalmitis

1. INTRODUCTION

Postoperative endophthalmitis (POE) is an infrequent but sight threatening complication of

intraocular surgery [1, 2]. It is most frequently the result of infection with Gram positive bacteria, in particular coagulase negative staphylococci [1]. The main antibiotic therapy of POE is intraocular inoculation of antibiotics, usually vancomycin and either amikacin or ceftazidime [2]. Direct intraocular injection is necessary because antibiotic penetration into the eye from the blood stream is restricted by the blood-ocular barrier. The few antibiotics that may achieve therapeutic concentrations in the aqueous and vitreous humors following systemic administration have mostly Gram negative activity, and cannot reliably treat the Gram positive organisms most frequently implicated in POE. Despite early aggressive treatment, the visual outcome of POE is often poor [1].

An antibiotic with broad spectrum Gram positive activity, which reaches therapeutic concentrations in the eye following intravenous or oral administration, may offer an advance in the early treatment of endophthalmitis, and could result in improved visual outcome. Linezolid, which represents the first new class (oxazolidinone) of antimicrobial agent to be introduced into infectious disease practice in over two decades [3], could play this role. The unique mechanism of action for oxazolidinones *via* inhibition of protein synthesis does not allow for cross-resistance with other protein synthesis inhibitors [4]. Furthermore, *in vitro* studies have shown linezolid to be active against most clinically significant Gram-positive pathogens, and it has been approved for the treatment of

*Corresponding author

Department of Microbiology, Laboratory of Antibiology, University Hospital, 3 rue Koeberlé, 67000 Strasbourg, France.

francois.jehl@medecine.u-strasbg.fr

vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREF) [5], methicillin- or oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [6, 7] and penicillin-resistant pneumococci. Minimal inhibitory concentration (MIC) values of linezolid against these responsible organisms lie in the range of 1-4 mg/L [8]. It can be administered either orally, with 100% bioavailability, or intravenously. Thus, linezolid is a promising drug that can eventually play a key role in the management of endophthalmitis. HPLC methods involving different sample handling, including deproteinization [9, 10] solid-phase extraction [11], and on-line extraction technique [12], were proposed for linezolid determination in plasma, serum, urine, brain heart infusion broth (BHIB) and microdialysis samples. In contrast, no reliable method was validated to measure linezolid in eye tissues. As further ocular pharmacokinetic investigations are needed, we developed a rapid, and sensitive HPLC method using UV detection for the measurement of linezolid in ocular fluids.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Reagents and chemicals

Linezolid was obtained as pure titrated powder from Pfizer Inc (Milwaukee, USA). Stock solution of 2mg/mL were prepared in water and stored at -80°C.

Acetonitrile, ammonium acetate and acetic acid were all of analytical reagent grade (Merck, Darmstadt, Germany). Water was obtained daily from a Milli-Ro-Milli-Q system (Millipore, Molsheim, France).

2.2. Chromatographic conditions

The liquid chromatograph consisted of a 125 solvent delivery module (Beckmann, Fullerton, CA, USA), an injection valve (Beckman Instruments Inc, San Ramon, CA, USA) with a loop of 20µl and a model 166 variable-wavelength detector (Beckmann). Chromatograms were processed by a 32 Karat software version 5 (Beckman Coulter Inc).

Chromatography was performed on a high speed analytical column (150*4.6 mm I.D.) packed with 5 µm diameter particles (Ultrasphere XL-ODS, Beckmann). The mobile phase consisted of 25 mmol/L ammonium acetate-acetonitrile

(76:24, v/v) adjusted to pH 5 with glacial acetic acid. The flow-rate was set at 1.0 mL/min and the eluent was monitored at 251 nm.

2.3. Extraction procedure

2.3.1. Serum

As described previously [9], an aliquot of serum (0.5 mL) was mixed with an equal volume of acetonitrile in a 5 mL screw-capped glass tube on a Vortex mixer (Vortex, Cleveland, OH, USA). The resulting mixture was centrifuged 10 minutes at 3000 g. The supernatant was transferred with a Pasteur pipette to another screw-capped glass tube, and a 20 µL aliquot of the upper aqueous layer was injected into the column.

2.3.2. Vitreous

Sample of vitreous humor was centrifuged 10 minutes at 3000 g, then an aliquot of 400 µl of the supernatant was mixed with an equal volume of acetonitrile in a 5 ml screw-capped glass tube on a Vortex mixer. The mixture was centrifuged again during 10 minutes at 3000 g. 20 µL of the transferred supernatant was injected into the column.

Animals samples were obtained from animals treated according to protocols established by the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO). Human vitreous humor was obtained during routine ocular procedures (surgery for epimacular membranes and retinal detachment) in accordance with the declaration of Helsinki.

2.4. Recovery study

Three samples of serum were spiked with 0.5, 5, 20 mg/L of linezolid. They were assayed and the resulting peak areas were compared with peaks resulting from aqueous solutions at the same concentrations. Three samples of vitreous humor were treated similarly.

2.5. Accuracy and limit of quantification

Quantification was based on peak areas as measured by the software integrator. The limit of quantification was defined as the lowest antibiotic concentration resulting in a signal to noise ratio of 3.

A standard curve was prepared for linezolid by spiking normal sera and vitreous humor with increasing amount of antibiotics. The linearity of the method was assessed from 0.1 to 20 mg/L of antibiotic concentration in the serum and

HPLC assay to measure linezolid in eye tissues

0.2 to 20 mg/L in the vitreous humor. Three samples were analysed for each concentration. Accuracy was evaluated by calculating the mean percent differences between theoretical values and measured values.

2.6. Repetability

Three concentrations of antibiotics were included in this study, the first high (20 mg/L), the second middle (5 mg/L) and the third low (0.5 mg/L). Aliquots of the same sample for each concentration were tested the same day and the resulting C.V indicated the repetability of the assay.

2.7. Precision

Both within and between-day reproducibilities were tested. Ten different samples for each concentration (0.5, 5, 20 mg/L, n=30) were tested on the same day and the resulting coefficient of variation (C.V.) indicated the within-day reproducibility.

Furthermore, ten different samples for the same concentrations (n=30) were tested once a day during ten days and the resulting C.V. indicated the between-day reproducibility.

2.8. Short and long term stability of linezolid in vitreous

Samples of vitreous spiked with increasing concentrations of linezolid (0.5, 5, 20 mg/L) were also analysed in triplicate after preparation, at 2 and 4 weeks after fridge storage at +4°C, and after 4 weeks at -80°C.

3. RESULTS

Representative chromatograms of serum and vitreous containing linezolid are shown respectively in figure 1 and 2. The latter contains a linezolid free vitreous humor trace and chromatograms of both rabbit vitreous spiked with 0,5 mg/L and human vitreous humor spiked with 5 mg/L with a unchanged retention time of 4,2 min.

The lower limit of quantification, defined as the linezolid concentration equivalent to a peak three times the height of the chromatographic baseline noise, was 0.1 mg/L in both the serum and the vitreous humor.

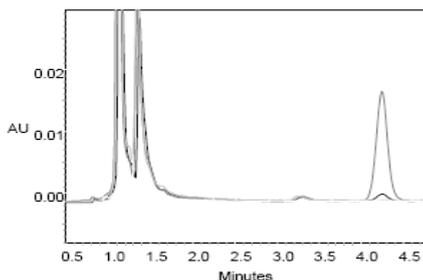


Fig. 1. Chromatograms of linezolid free serum, and serum spiked with 0.5 and 5 mg/L with a detection wavelength of 251nm and a retention time 4.2 minutes.

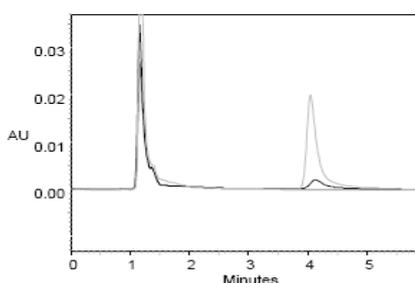


Fig. 2. Chromatograms of linezolid free vitreous (black line), and human vitreous (grey line) spiked with 5 mg/L compared to rabbit vitreous (dots) spiked with 0,5 mg/L of linezolid. Detection wavelength: 251 nm, retention time: 4.2 minutes.

The linearity study was carried out with the full range of concentrations that could be expected to appear in clinical samples, ranging from 0.1 to 20 mg/L. Peak area of linezolid at different concentrations was compared to reciprocal nominal concentrations. The regression analysis performed by SigmaPlot (Systat Software Inc) revealed that the method is linear in both serum and vitreous (fig 3, 4) ($r=0.99$, and $r=0.97$ respectively).

The extraction recovery from serum spiked with linezolid (serum peak area/aqueous peak area $\times 100$) was $93.28 \pm 5.03\%$ and $78.94 \pm 2.8\%$ from vitreous spiked with linezolid (Table 1).

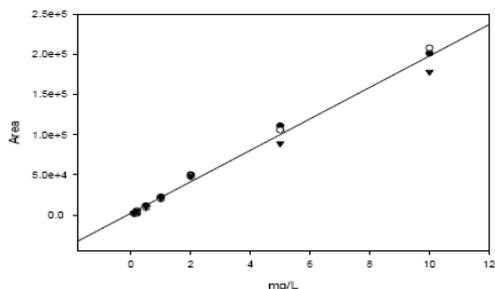


Fig. 3. Peak area of linezolid in serum versus the calibration standard concentrations of linezolid (mg/L), three samples for each concentration (white circle, full circle, and triangle).

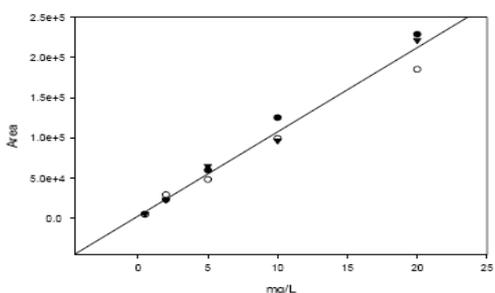


Fig. 4. Peak area of linezolid in vitreous humor versus the calibration standard concentrations of linezolid (mg/L), three samples for each concentration (white circle, full circle, triangle).

Table 1. Extraction recoveries of linezolid from serum and vitreous humor.

Concentration (mg/L)	Recovery (n=9) Serum(%)	Recovery (n=9) Vitreous (%)
0.5	96.88 +/- 5.2	77.70 +/- 0.2
5	89.36 +/- 3.47	82.7 +/- 5.09
20	93.6 +/- 6.42	76.42 +/- 2.51
Mean +/- SD	93.28 +/- 5.03	78.94 +/- 2.6

Concerning the intra-assay precision in serum (Table 2), coefficients of variation (C.V.) reached 6.08% (0.5 mg/L), 7.73% (5 mg/L) and 7.59% (20 mg/L). The values for inter-assay precision respectively were 4.78%, 7.91% and 7.92%. Accuracy for targeted values was below 15% for low and high levels. (Table 3).

The assay stability of linezolid is well documented in serum but not in ocular tissues.

In this work, linezolid is stable in vitreous after sample preparation for at least 4 weeks at 4°C and 4 weeks at -80°C (Table 4). The final mean drug concentrations were all close to 100% of the original showing no drug degradation. The percentages of change compared to day 0 were +0.47% (0.5 mg/L), +9.8% (5 mg/L), and +1.68% (20 mg/L) after 1 month at 4°C, and +13.47% (0.5 mg/L), -2.07% (5 mg/L), and +6.33% (20 mg/L) after freezing at -80°C.

Table 2. Precision of linezolid in serum.

Concentration (mg/L)	Sample (n=30)	Intra-assay C.V.(%)	Inter-assay C.V. (%)	Repetability C.V.(%)
0.5	Serum	6.08	4.78	4.7
5	Serum	7.73	7.91	4.52
20	Serum	7.59	7.92	7.54

Table 3. Accuracy of linezolid in serum and vitreous humor.

Theoretical value (mg/L)	% difference from theoretical value in serum	% difference from theoretical value in vitreous
0.1	27.2	
0.2	0.25	7.8
0.5	16	11.9
1	3.3	
2	8.2	5.1
5	2.6	13.4
10	1.8	10.7
20	2.2	4.1

HPLC assay to measure linezolid in eye tissues

Table 4. Stability of linezolid in vitreous stored for 4 weeks at +4°C and -80°.

Concentration mg/L	Concentration at 2 weeks at 4°C	Concentration at 4 weeks at 4°C	Concentration at 4 weeks at -80°C
0.5	0.57	0.57	0.442
0.5	0.53	0.457	0.61
0.5	0.48	0.48	0.69
5	5.01	5.63	5.09
5	5.3	5.35	4.29
5	5.9	5.49	5.31
20	21.39	19.9	22.07
20	19.55	20.01	19.63
20	22.48	21.1	22.1
Concentration mg/L	% change compared to day 0 at 2 weeks at 4°C	% change compared to day 0 at 4 weeks at 4°C	% change compared to day 0 at 4 weeks at -80°C
0.5	5.33	0.47	13.47
5	8.07	9.80	-2.07
20	5.70	1.68	6.33

4. DISCUSSION

High-performance liquid chromatographic methods for linezolid were developed in a variety of matrices including bacterial growth medium, plasma, serum, urine and microdialysate [13]. Herein we described for the first time a rapid, sensitive and precise technique for quantifying linezolid in the eye.

The preparation procedure of vitreous humor is simple and performs satisfactory with a recovery rate for linezolid of 78.94 + -2.6. The extraction recovery of linezolid from vitreous and serum (93.28 + -5.03) is close to those previously reported: deproteinization with methanol [9], acetonitrile and 5% trichloroacetic acid [13, 14] result all in close to a 100% recovery.

The analytical characteristics of the proposed method and the minimum sample handling are satisfactory for pharmacokinetic and clinical laboratory investigations.

In addition, this technique requires small volumes of vitreous (from 50 µL to 100 µL), which reduces the sampling burden on patients and animals, and decreases the incidence of undesirable effects of the vitreous biopsy such as retinal detachment and uveal effusion.

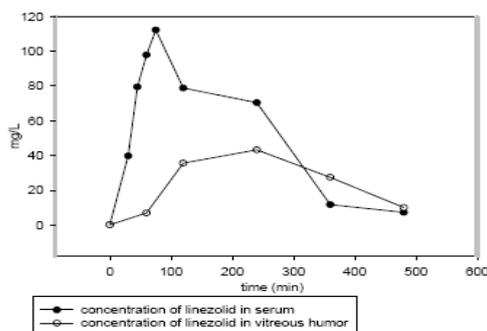


Fig. 5. Pharmacokinetic of linezolid in the serum and the vitreous of rabbit's eye after single oral dose administration of linezolid (600 mg).

Therefore, this eye dedicated HPLC method, allowed us to determine the pharmacokinetic profile of linezolid in rabbit's serum and rabbit's eyes in an experimental model of severe ocular infection (Fig 5) making possible the study of the ocular penetration of this promising antibacterial drug, after a single oral dose of 600 mg (human regimen).

5. CONCLUSION

This HPLC assay measures linezolid antibiotic in ocular tissues. It allows to perform pharmacokinetic experiments in animal models with severe gram positive eye infections and could also be suitable for human studies.

REFERENCES

1. The Endophthalmitis Vitrectomy study group. 1995, *Arch. Ophthalmol.*, 113, 1479.
2. Lemley, C. A., Craig, A., and Han, D. P. 2007, *Retina*, 27, 662.
3. Aoki, H., Ke, L., Poppe, S. M., Poel, T. J., Weaver, E. A., Gadwood, R. C., Thomas, R. C., Shinabarger, D. L., and Ganoza, M. C. 2002, *Antimicrob. Agent Chemother.*, 46, 1080.
4. Swaney, S. M., Aoki, H., Ganoza, M. C., and Shinabarger, D. L. 1998, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42, 3251.
5. Stefani, S., Mezzatesta, M. L., Tempera, G., Debbra, E., Schito, A. M., Nicoletti, G., and Marchère, A. 2002, *Clin. Microbiol. Infect.*, 8, 368.
6. Munoz Bellido, J. L., Gutierrez Zufiaurre, M. N., Sanchez Hernandez, F. J., Yagüe Guirao, G., Segovia Hernández, M., and Garcia-Rodríguez, J. A. 2002, *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 20, 61.
7. Ballow, C. H., Jones, R. N., and Biedenbach, D. J. 2002, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 43, 75.
8. Brauers, J., Kresken M., and Menke A., Orland, A., Weiher, H., and Morrissey, I. 2007, *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 29, 322.
9. Tobin, C. M., Sunderland, J., White, L. O., and MacGowan, A. P. 2001, *J. Antimicrob. Chemother.*, 48, 605.
10. Buerger, C., Joukhadar, C., Muller, M., and Kloft, C. 2003, *J. Chromatogr. B, Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 796, 155.
11. Peng, G. W., Stryd, R. P., Murata, S., Igarashi, M., Chiba, K., Aoyama, H., Aoyama, M., Zenki, T., and Ozawa, N. 1999, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 20, 65.
12. Ba, B. B., Nso, B. B., Quentin, C., and Saux, M. C. 2007, *J. Chromatogr. B, Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 854, 104.
13. Boak, L. M., Li, J., Nation, R. L., and Rayner, C. R. 2006, *Biomed. Chromatogr.*, 20, 782.
14. Li, J., Rayner, C. R., Dixon, S., and Nation, R. S. 2004, *Biomed. Chromatogr.*, 18, 1.

5.3 Pharmacocinétique oculaire du linézolide sur œil sain de lapin

La pénétration du linézolide a été ensuite étudiée après administration topique (gouttes) et par voie orale. Le modèle rabique a été choisi du fait des caractéristiques anatomiques de l'œil du lapin qui possèdent des similarités avec celle de l'Homme, en particulier en termes de turn-over de l'humeur aqueuse et de volume vitréen (1,5 cc chez le lapin vs 5 cc chez l'homme [21]). La majorité des études expérimentales sur la pharmacocinétique oculaire

des antibiotiques sont ainsi menée chez le lapin. Tous les animaux ont été traités selon les règles établies par l'*Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)*.

5.3.1 Pénétration oculaire du linézolide administré par voie topique

Deux régimes ont été administrés pour une étude de la pharmacocinétique oculaire après administration par goutte (s) (dose unique de 50 μ L à 2mg/L et doses multiples d'une goutte toutes les 15 min pendant une heure). Ainsi, nous avons voulu savoir si d'une part le linézolide pénétrait le vitré quand il est administré par voie topique et si d'autre part les concentrations de surface (conjonctive et cornée) obtenues par cette voie étaient suffisantes pour envisager son utilisation dans les abcès de cornée. **ARTICLE 2.**

Chaque groupe était constitué de huit lapins (24 yeux). Après une dose unique, la concentration atteinte dans l'humeur aqueuse était de 0.87mg/L, alors qu'elle atteignait après instillation de doses multiples 2.17 mg/L. Les concentrations dans la cornée et la conjonctive obtenues après administration de doses multiples étaient supérieures à 3 μ g/g reflétant une bonne pénétration dans tout le segment antérieur. A l'inverse, le linézolide ne pénétrait pas dans le vitré après administration topique.

D'après ces résultats pharmacocinétiques, une utilisation du linézolide sous forme de collyre, pouvait s'envisager dans le traitement des kératites bactériennes à bactéries sensibles mais pas dans le traitement curatif de l'endophtalmie.

Ocular penetration of topically applied linezolid in a rabbit model

Maher Saleh, MD, François Jehl, Pharm D, PhD, Anne Dory, Pharm D, Sophie Lefevre, MSc, Gilles Prevost, PhD, David Gaucher, MD, Arnaud Sauer, MD, Claude Speeg-Schatz, MD, PhD, Tristan Bourcier, MD, PhD

PURPOSE: To evaluate ocular penetration of topically applied linezolid, a new antibiotic agent targeted against gram-positive organisms.

SETTING: Laboratory of Pharmacology, University Hospital of Strasbourg, Strasbourg, France.

METHODS: New Zealand White rabbits were divided into 3 equal groups. One drop of 50 μ L (2 mg/mL) linezolid was administered in Group 1. In Group 2, eyes were dosed in accordance with a keratitis protocol (1 drop of 2 mg/mL every 15 minutes for 1 hour). Aqueous humor was sampled 6 times from immediately after to 3 hours after drop delivery. In Group 3, a keratitis protocol was implemented before the animals were humanely killed. Conjunctiva, cornea, vitreous, and blood samples were collected 1 hour and 2 hours after the last drop. Linezolid concentrations were measured by high-performance liquid chromatography.

RESULTS: Each group comprised 8 rabbits. In Group 1 and Group 2, the peak linezolid concentration in the aqueous humor (mean 0.87 mg/L \pm 0.16 [SD] and 2.17 \pm 0.4 mg/L, respectively) was 45 minutes after the last drop delivery. In Group 3, the concentrations 1 hour and 2 hours after the last drop were higher than 3 μ g/g in the conjunctiva samples and higher than 4 μ g/g in the cornea samples. The linezolid concentration in the vitreous and serum was negligible.

CONCLUSIONS: Linezolid levels in the aqueous humor, conjunctiva, and cornea exceeded the minimum inhibitory concentration of most gram-positive organisms that cause bacterial keratitis and endophthalmitis. Linezolid could be a valuable alternative in cases of increased resistance to vancomycin.

Financial Disclosure: No author has a financial or proprietary interest in any material or method mentioned.

J Cataract Refract Surg 2010; 36:488–492 © 2010 ASCRS and ESCRS

Gram-positive pathogens, in particular gram-positive cocci such as coagulase-negative staphylococci and *Staphylococcus aureus*, are often the cause of severe ocular infection including keratitis¹ and endophthalmitis.² Recent studies highlight the growing problem of bacterial resistance to most commonly used antibiotic agents. Up to 25% of isolates from exogenous endophthalmitis are becoming resistant to fluoroquinolones,³ and the past decade has seen the emergence of vancomycin-resistant *S aureus*.^{4,5}

Linezolid is an antibiotic agent in the new class of oxazolidinones that have a narrow activity directed against gram-positive bacteria only. In vitro studies have found linezolid to be active against most clinically significant gram-positive pathogens, including the difficult to eradicate vancomycin-resistant

Enterococcus faecium,⁶ methicillin- or oxacillin-resistant *S aureus*,⁷ and penicillin-resistant pneumococci.⁸ The minimum inhibitory concentration (MIC) values of linezolid against these organisms ranges from 1 to 4 mg/L.⁹ In addition, the unique mechanism of action of this antibiotic agent is via inhibition of protein synthesis, which lowers the risk for cross resistance with other protein-synthesis inhibitors.¹⁰ Significant linezolid concentrations have been achieved in the vitreous and aqueous humor of the noninflamed human eye after intravenous¹¹ and even oral^{12–14} administration of 600 mg.

To our knowledge, topical administration of this new molecule has not been studied in humans or in an animal model. The ocular penetration of linezolid after topical administration could be a significant

advance in the early treatment of severe gram-positive ocular infection. The objective of this study was to evaluate the ocular penetration of linezolid after topical administration in an experimental rabbit model.

MATERIALS AND METHODS

In this study performed at the Laboratory of Pharmacology, University Hospital of Strasbourg, France, New Zealand White rabbits weighing between 3.0 kg and 3.5 kg were divided into 3 equal groups receiving 1 of 2 dosing regimens. Animals were treated in accordance with the Association for Research in Vision and Ophthalmology statement for Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research.

Dosing

Group 1: Single-Drop Protocol In this experiment, the rabbits received a preparation of topical liquid linezolid at a concentration of 2.00 mg/mL. Drops were obtained from a ready-to-use sterile isotonic solution for intravenous infusion. The pH of the preparation was 6.5 because of the presence of a small amount of citric acid. The sodium content of the solution was 0.38 mg/mL. A drop of 50 μ L of the preparation was delivered through a micropipette in the inferior eyelid sulcus of 1 eye of each rabbit; the total amount of linezolid applied was 100 μ g.

Group 2: Multiple-Drop Protocol In this experiment, the following keratitis dosing protocol was used: 1 drop of 2 mg/mL linezolid administered every 15 minutes for 1 hour. Thus, the rabbits received 4 applications for a total dose of 400 μ g per eye.

Group 3 In this group, the keratitis protocol was used in 1 eye of each rabbit. Half the rabbits were humanely killed 1 hour after the last drop and the other half at 2 hours. The overdose was a mixture of ketamine and barbiturate (75 mg/kg) injected in the lateral marginal ear vein.

Sample Collection

In Group 1 and Group 2, aqueous humor samples were collected 0.00, 0.25, 0.50, 0.45, 1.00, 2.00, and 3.00 hours after the last drop was administered. The samples were taken with the rabbits under general anesthesia of ketamine (15 mg/kg of body weight) delivered through an auricular vein catheter. Samples were immediately stored at -80°C . In Group 3, after the rabbits were humanely killed, cornea,

conjunctiva, vitreous, and blood samples were collected at the different endpoints.

Aqueous humor samples were taken after 1 drop of oxybuprocaine was administered; 0.1 mL of aqueous humor was collected using a 30-gauge needle mounted on a 1 mL chamber introduced at the limbus.

Vitreous (0.2 mL) was aspirated with a 25-gauge needle mounted on a 5 mL chamber, introduced at 3.0 mm of the limbus, directed toward the center of the globe. Care was taken to avoid bleeding when the needle was introduced.

For serum samples, 0.5 mL of blood was collected from a catheter placed in the lateral marginal ear vein (different from the one used for inducing anesthesia).

For conjunctiva and cornea samples, solid tissues were separately removed using microsurgical instruments. After their ablation, the samples were washed with a sterile irrigating solution before being dried, weighed, and frozen at -80°C .

Linezolid concentrations were measured using a previously described high-performance liquid chromatography (HPLC) method dedicated to eye tissue.¹⁵

Sample Preparation Before Chromatography

Aqueous Humor, Vitreous, and Serum Briefly, liquid samples (aqueous and vitreous humors, blood) were centrifuged for 10 minutes at 3000g. The supernatant was mixed with an equal volume of acetonitrile in a 5 mL screw-capped glass tube on a vortex mixer. The resulting mixture was centrifuged again for 10 minutes at 3000g. Then, 20 μ L of the aliquot of the upper aqueous layer was injected into the HPLC column.

Corneas and Conjunctivas Solid tissues were crushed in a small pestle using water (1v/3v) as an extraction solvent. After 4-hour contact and centrifugation at 3000g, 20 μ L of the supernatant was injected in the HPLC column for analysis.

High-Performance Liquid Chromatography Method

The linezolid concentration was determined using reverse-phase HPLC. The liquid chromatograph consisted of a 125-solvent delivery module (Beckmann), an injection valve (Beckman Instruments, Inc.) with a loop of 20 μ L, and a model 166 variable wavelength detector (Beckmann). Chromatograms were processed by 32 Karat software (version 5, Beckman Coulter, Inc). Chromatography was performed on a high-speed analytical column (150 \times 4.6 mm I.D.) packed with 5 μ m diameter particles (UltrasphereXL-ODS, Beckmann). The mobile phase consisted of 25 mmol/L ammonium acetate-acetonitrile (76:24, v/v) adjusted to pH 5 with glacial acetic acid. The flow rate was set at 1.0 mL/minute, and the eluent was monitored at 251 nm.

RESULTS

Twenty-four rabbits were used in the study. Each group comprised 8 rabbits.

Antibiotic Levels

Aqueous Humor After a single drop containing 100 μ g of linezolid was applied to the eye surface (Group 1), the concentration in the aqueous humor reached a mean peak of 0.87 mg/L \pm 0.16 (SD); the peak time

Submitted: August 3, 2009.

Final revision submitted: September 25, 2009.

Accepted: September 25, 2009.

From the Departments of Microbiology, Laboratory of Antibiology (Saleh, Jehl, Lefevre, Prevost, Sauer), Ophthalmology (Saleh, Gaucher, Speeg-Schatz, Bourcier), and Pharmacy and Pharmacology (Dory), University Hospital of Strasbourg, Strasbourg, France.

Corresponding author: Maher Saleh, Department of Ophthalmology, University Hospital of Strasbourg, 1 Place de l'Hopital, 67000 Strasbourg, France. E-mail: maher.saleh@chru-strasbourg.fr.

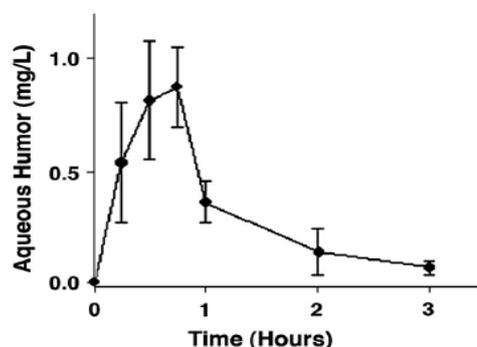


Figure 1. Aqueous humor versus time concentration curve of topical linezolid (100 µg).

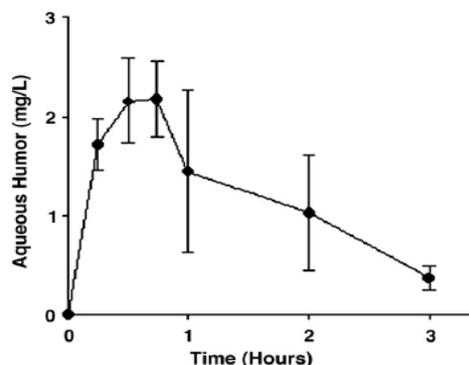


Figure 2. Aqueous humor versus time concentration curve of linezolid (400 µg) after topical administration according to a keratitis protocol (ie, every 15 minutes for 1 hour).

was 45 minutes (Figure 1). In the keratitis group (Group 2), the mean peak value was 2.18 ± 0.39 mg/L and the peak time was 45 minutes (Figure 2). In both groups, aqueous humor concentrations decreased until the detection limit of the method (0.1 mg/L), which occurred approximately 3 hours after the last drop was given (Table 1).

Cornea, Conjunctiva, Vitreous, and Serum Figure 3 shows linezolid concentrations 1 hour and 2 hours after the last drop in the multiple-dose regimen. At 1 hour, the mean linezolid concentration was 4.79 ± 2.93 µg/g in the cornea and 3.05 ± 0.21 µg/g in the conjunctiva, which was 3.3-fold higher and 2.1-fold higher, respectively, than the concentrations in the aqueous humor at the same time. At 2 hours, the mean concentration was 4.32 ± 0.9 µg/g in corneas and 3.15 ± 0.21 µg/g in conjunctivas, which was 4.19-fold higher and 3.06-fold higher, respectively, than in the aqueous humor at the same time. The

penetration in the vitreous was negligible at all endpoints (means: 0.04 ± 0.03 µg/g at 0.5 hour; 0.09 ± 0.08 µg/g at 1.0 hour; 0.07 ± 0.06 at 2.0 hours). Linezolid was undetectable in the serum.

DISCUSSION

The cornea acts as an anatomical barrier that limits antimicrobial penetration to the intraocular structures. Not all available antibiotic agents reach therapeutic concentrations in the corneal stroma and aqueous humor. Linezolid, which has a molecular design that was inspired from that of the fluoroquinolones, shares with

Time (H)	Mean Concentration (mg/L) ± SD	
	Single Dose	Multiple Dose
0.00	0.02 ± 0.01	0.00 ± 0.01
0.25	0.54 ± 0.26	1.72 ± 0.26
0.50	0.81 ± 0.26	2.16 ± 0.43
0.75	0.87 ± 0.17	2.18 ± 0.39
1.00	0.37 ± 0.09	1.45 ± 0.82
2.00	0.15 ± 0.10	1.03 ± 0.59
3.00	0.08 ± 0.03	0.37 ± 0.13

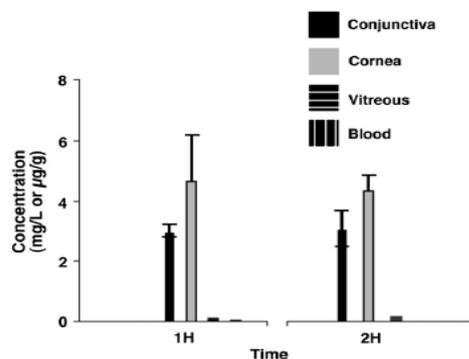


Figure 3. Linezolid concentrations in the conjunctiva, cornea, vitreous, and serum.

Table 2. Inhibitory quotients in aqueous humor for a range of possible MICs (mg/L).

Time (H)	Inhibitory Quotient*				
	MIC 0.1	MIC 0.5	MIC 1.0	MIC 2.0	MIC 4.0
Single-drop protocol					
0.25	5.40	1.08	0.54	0.27	0.13
0.50	8.10	1.62	0.81	0.40	0.20
0.75	8.70	1.74	0.87	0.43	0.21
1.00	3.70	0.74	0.37	0.18	0.09
2.00	1.50	0.30	0.15	0.07	0.03
3.00	0.80	0.16	0.08	0.04	0.02
Keratitis protocol					
0.25	17.20	3.44	1.72	0.86	0.43
0.50	21.60	4.32	2.16	1.08	0.54
0.75	21.80	4.36	2.18	1.09	0.54
1.00	14.50	2.90	1.45	0.72	0.36
2.00	10.30	2.06	1.03	0.51	0.25
3.00	3.70	0.74	0.37	0.18	0.09

MIC = minimum inhibitory concentration

*Quotient higher than 1 predicts potential efficacy against gram-positive pathogens

that class of antibiotic agents a high level of lipophily. This characteristic is associated with the good ocular penetration of fluoroquinolones found in humans and in experimental animal models.¹⁶⁻¹⁸

The inhibitory quotient is one of several pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters used to predict the potential clinicobacteriological efficacy of antibiotic agents.¹⁹ The quotient is defined by the ratio of the concentration to the MIC of the antibiotic agent against the infecting strain. Linezolid is a time-dependant agent, and the approach of its inhibitory quotient may be of interest in evaluating its potency. An adequate therapeutic index is 1 or higher. Higher values for the therapeutic index indicate greater drug potency or efficacy. The Zyvox Annual Appraisal of Potency and Spectrum Program²⁰ measured linezolid MICs in more than 20 000 isolates. The study found that 99.88% of strains in this global collection, including *S aureus*, coagulase-negative staphylococci, enterococci, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus viridans*, and β -hemolytic streptococci, had an MIC value between 0.5 mg/L and 2.0 mg/L. Table 2 shows the inhibitory quotient resulting from the concentration measured in aqueous humor as a function of time and according to various MICs. Clearly, a single drop does not provide efficient antimicrobial concentration in the aqueous humor. The multiple-drop regimen yields concentrations that cover the most common gram-positive strains responsible for clinical infections, with MICs up to 2.0 mg/L.

Although studies suggest that linezolid given orally or intravenously produces high ocular concentrations of the drug, no previous study has provided data on the ocular penetration after topical administration. To determine the penetration level, we chose a rabbit model. Numerous pharmacokinetic studies are performed using rabbits because of the anatomic characteristics of the rabbit eye. In particular, the size of the globe and the turnover rate of the aqueous humor are comparable to those in the human eye. Nevertheless, as with all animal models, there are limitations. For example, unlike in our experimental model, it is likely that corneal epithelial disruption would be present in eyes with keratitis and that this disruption would allow greater drug penetration in the aqueous than in our study. Also, our experiments were performed using healthy animals; the results could vary significantly in eyes with inflammation. In addition, frequent punctures of the relatively small volume of the anterior chamber could result in dilution of the antibiotic agent in the newly secreted aqueous humor or blood-aqueous barrier breakdown. For these reasons, caution must be used when applying results in studies using an animal model to human eyes.

Notwithstanding, we believe that the linezolid penetration in the aqueous humor is highly effective. The concentrations achieved in our study with 1 drop of linezolid 0.2% are comparable to the concentrations obtained with 1 drop of ciprofloxacin 0.3% and even 1 drop of moxifloxacin 0.5%.^{21,22} Penetration in solid eye-surface tissue occurs at even higher levels; for example, the inhibitory quotient for *Staphylococcus epidermidis*, with a common MIC of 1 mg/L, would be 4.79 in the cornea and 3.05 in the conjunctiva, showing that these concentrations would have strong antimicrobial action in these tissues and would prevent emergence of resistance.²³

In summary, linezolid, one of the most effective gram-positive antibiotic agents available, seems to penetrate well in anterior ocular structures after topical administration. In the face of increasing resistance to vancomycin, linezolid could become a precious alternative in ocular infections caused by gram-positive organisms. Further studies of the penetration of and tolerance to linezolid in the human eye are required.

REFERENCES

1. Green M, Apel A, Stapleton F. Risk factors and causative organisms in microbial keratitis. *Cornea* 2008; 27:22-27
2. Ly CN, Pham JN, Badenoch PR, Bell SM, Hawkins G, Raftery DL, McClellan KA. Bacteria commonly isolated from keratitis specimens retain antibiotic susceptibility to fluoroquinolones and gentamicin plus cephalothin. *Clin Exp Ophthalmol* 2006; 34:44-50

3. Miller D, Flynn PM, Scott IU, Alfonso EC, Flynn HW Jr. In vitro fluoroquinolone resistance in staphylococcal endophthalmitis isolates. *Arch Ophthalmol* 2006; 124:479–483
4. Rice LB. Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. *Am J Med* 2006; 119(6 suppl. 1):S11–S19; discussion S62–S70
5. Tenover FC, Weigel LM, Appelbaum PC, McDougal LK, Chaitram J, McAllister S, Clark N, Killgore G, O'Hara CM, Jevitt L, Patel JB, Bozdogan B. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:275–280. Available at: <http://aac.asm.org/cgi/reprint/48/1/275.pdf>. Accessed December 5, 2009
6. Linden PK. Treatment options for vancomycin-resistant enterococcal infections. *Drugs* 2002; 62:425–441
7. Ballou CH, Jones RN, Biedenbach DJ. A multicenter evaluation of linezolid antimicrobial activity in North America; the North American ZAPS Research Group. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 43:75–83
8. Malm A, Korona-Glowniak I, Biernasiuk A, Kalasiewicz A, Juda M. Bacteriostatic or bactericidal effect of linezolid against multiresistant *Streptococcus pneumoniae*. *New Microbiol* 2008; 31:363–370
9. Swaney SM, Aoki H, Ganoza MC, Shinabarger DL. The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein synthesis in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:3251–3255. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC106030/pdf/ac003251.pdf>. Accessed December 4, 2009
10. Aoki H, Ke L, Poppe SM, Poel TJ, Weaver EA, Gadwood RC, Thomas RC, Shinabarger DL, Ganoza MC. Oxazolidinone antibiotics target the P site on *Escherichia coli* ribosomes. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:1080–1085. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC127084/pdf/0439.pdf>. Accessed December 4, 2009
11. Horcajada JP, Aienza R, Sarasua M, Soy D, Adan A, Mensa J. Pharmacokinetics of linezolid in human non-inflamed vitreous after systemic administration. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63:550–552
12. Prydal JI, Jenkins DR, Lovering A, Watts A. The pharmacokinetics of linezolid in the non-inflamed human eye. *Br J Ophthalmol* 2005; 89:1418–1419. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1772914/pdf/bjo08901418.pdf>. Accessed December 3, 2009
13. Fiscella RG, Lai WW, Buerk B, Khan M, Rodvold KA, Pulido JS, Labib S, Shapiro MJ, Blair NP. Aqueous and vitreous penetration of linezolid (Zyvox) after oral administration. *Ophthalmology* 2004; 111:1191–1195
14. Ciulla TA, Comer GM, Peloquin C, Wheeler J. Human vitreous distribution of linezolid after a single oral dose. *Retina* 2005; 25:619–624
15. Saleh M, Bourcier T, Prevost G, Speeg-Schatz C, Jehl F. High-performance liquid chromatographic assay to measure linezolid antibiotic in eye tissues. *Trends Chromatography* 2008; 4:107–112
16. Çekiç O, Batman C, Yaşar Ü, Başcı NE, Bozkurt A, Kayaalp SO. Human aqueous and vitreous humour levels of ciprofloxacin following oral and topical administration. *Eye* 1999; 13:555–558
17. Donnerfeld ED, Schrier A, Perry HD, Aulicino T, Gombert ME, Snyder R. Penetration of topically applied ciprofloxacin, norfloxacin, and ofloxacin into the aqueous humor. *Ophthalmology* 1994; 101:902–905
18. Robertson SM, Curtis MA, Schleich BA, Rusinko A, Owen GR, Dembinska O, Liao J, Dahlin DC. Ocular pharmacokinetics of moxifloxacin after topical treatment of animals and humans. *Surv Ophthalmol* 2005; 50(suppl 1):S32–S45
19. Hyatt JM, McKinnon PS, Zimmer GS, Schentag JJ. The importance of pharmacokinetic/pharmacodynamic surrogate markers to outcome; focus on antibacterial agents. *Clin Pharmacokinet* 1995; 28:143–160
20. Jones RN, Fritsche TR, Sader HS, Ross JE. Zyvox Annual Appraisal of Potency and Spectrum Program Results for 2006: an activity and spectrum analysis of linezolid using clinical isolates from 16 countries. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 59:199–209
21. Solomon R, Donnerfeld ED, Perry HD, Snyder RW, Nedrud C, Stein J, Bloom A. Penetration of topically applied gatifloxacin 0.3%, moxifloxacin 0.5%, and ciprofloxacin 0.3% into the aqueous humor. *Ophthalmology* 2005; 112:466–469
22. Levine JM, Noecker RJ, Lane LC, Herrygers L, Nix D, Snyder RW. Comparative penetration of moxifloxacin and gatifloxacin in rabbit aqueous humor after topical dosing. *J Cataract Refract Surg* 2004; 30:2177–2182
23. Liu P, Müller M, Derendorf H. Rational dosing of antibiotics: the use of plasma concentrations versus tissue concentrations. *Int J Antimicrob Agents* 2002; 19:285–290



First author:
Maher Saleh, MD
*Department of Ophthalmology,
Laboratory of Antibiology, University
Hospital of Strasbourg, France*

5.3.2 Etude de la pharmacocinétique du linézolide administré par voie orale sur œil non inflammatoire

L'étude de la pénétration oculaire du linézolide s'est ensuite portée sur l'administration orale. **ARTICLE 3.**

L'administration par voie orale d'un antibiotique avec une biodisponibilité proche de 100% avec une pénétration vitrénne satisfaisante et un spectre couvrant les bactéries à Gram

positif serait une alternative séduisante dans la prévention et/ou le traitement des endophtalmies bactériennes aiguës. Le linézolide pénètre à des doses efficaces dans une multitude de tissus comme les tissus adipeux, osseux, articulaire ou encore dans le liquide céphalorachidien. [97]

Le linézolide a donc été administré par voie orale et à la dose unique de 120 mg (fournissant des concentrations sériques chez le lapin comparables à celles fournies par une dose de 600 mg chez l'Homme), ainsi qu'à doses multiples (2 fois par jour pendant 3 jours).

Les résultats ont démontré une pénétration intéressante du linézolide délivré oralement dans le vitré aussi bien après une ou plusieurs doses (3 et 4.5 mg/L respectivement). Ces résultats encourageants sont compatibles avec les résultats pharmacocinétiques rapportés par la littérature chez l'Homme après administration entérale ou parentérale du linézolide. [94] [96] Afin de déterminer si ces concentrations de linézolide permettent de traiter une endophtalmie à bactérie à Gram positif, les paramètres de pharmacodynamie correspondant à une activité temps-dépendante d'un antibiotique ont été calculés : le $T > CMI$, le quotient inhibiteur et l'aire sous la courbe rapportée à la CMI (ASIC). Le $T > CMI$ (pour une CMI fixée à 3 mg/L) était ainsi supérieure à 40%. L'interprétation de ces paramètres permettait à penser que les doses orales multiples de linézolide semblaient fournir des concentrations vitréennes de linézolide suffisamment élevées et soutenues dans le temps pour envisager son utilisation dans le traitement curatif de l'endophtalmie bactérienne aiguë.

Ocular Penetration of Linezolid After Oral Administration in Rabbits

Maher Saleh,^{1,2} Sophie Lefevre,¹ Tristan Bourcier,² Gilles Prevost,¹ David Gaucher,² Claude Speeg-Schatz,² and François Jehl¹

Abstract

Purpose: The pharmacokinetics of linezolid (LZD) was investigated in rabbit eyes after single and multiple oral administrations.

Setting: Pharmacology Laboratory, University Hospital of Strasbourg, Strasbourg, France.

Methods: Twelve New Zealand rabbits were divided into 2 groups: an oral dose of 120 mg (35 mg/kg) was administered in group 1 ($n=6$), and a multiple-dose protocol targeting the steady state (120 mg twice a day for 3 days) was given in group 2 ($n=6$). Serum (s) and vitreous (v) samples were collected after 0, 30, and 45 min and after 1, 2, 4, 6, 8, and 12h. LZD concentrations were measured by high-performance liquid chromatography.

Results: LZD exhibited a mean C_{max} in serum of 13.9 ± 4.5 (standard deviation) mg/L after a T_{max} of 1 h in group 1 and 18.0 ± 6.5 mg/L after a T_{max} of 30 min in group 2. The vitreal peak occurred at 2 h in both groups with an intraocular C_{max} of 3.0 ± 1.3 mg/L in group 1 and 4.5 ± 1.4 mg/L in group 2. The resulting area under the concentration-time curve in vitreous at the steady state compared with the area under the concentration-time curve calculated after a single dose increased significantly (28.7 ± 7.7 vs. 18.3 ± 2.1 mg·h/L, respectively, $p < 0.05$). The time that serum concentration exceeded the minimum inhibitory concentrations ($T > MIC$) in group 2 was eventually $> 40\%$ for MIC up to 3 mg/L in rabbit vitreous.

Conclusions: Although a single oral dose produced intraocular concentrations barely sufficient to induce bacterial eradication, a multiple-dose regimen provided intraocular levels exceeding the MICs of most Gram-positive organisms responsible for endophthalmitis.

Introduction

POSTOPERATIVE ENDOPHTHALMITIS (POE) REMAINS a sight-threatening complication.¹ Due to the existence of a blood-ocular barrier that restricts antibiotic penetration into the eye from the blood stream, treatment options are limited, and direct intraocular injections of antibiotics (usually vancomycin and amikacin, or ceftazidime) remain mandatory. The few antibiotics that achieve sufficient concentrations in the eye after systemic administration have mostly anti-Gram-negative activity, whereas Gram-positive bacteria, in particular coagulase negative staphylococci, are most frequently involved in POE. Bacterial resistance to these antibiotics is increasing in a worrisome trend,² highlighting the need for new treatments. An antibiotic penetrating the eye after systemic delivery may improve POE management. Linezolid (LZD), the first oxazolidinone agent introduced into clinical practice for use against Gram-positive bacteria resistant to

beta-lactams and glycopeptides, could play this role. It has a unique mechanism of action that reduces the risk of cross-resistance with other protein synthesis inhibitors.³ Further, it can be administered orally with high bioavailability and shows good tolerance for up to 28 days of treatment.³

The ocular penetration of LZD has been studied in the human eye after intravenous⁴ and oral administration.^{5,6} The results were encouraging, demonstrating the ability of oral LZD to achieve inhibitory concentrations in the aqueous and vitreous fluids. However, in these studies conducted on humans, concentrations were not measured in the same eyes over time for ethical reasons, and it was not possible to draw precise pharmacokinetic/pharmacodynamic conclusions about the ocular penetration of LZD. An animal model could provide accurate information about the ocular PK/PD of this promising antibiotic to determine the most effective regimen for prevention and/or treatment of Gram-positive-related ocular infections.

¹Laboratory of Antibiology, Department of Microbiology, University Hospital of Strasbourg, Strasbourg, France.

²Department of Ophthalmology, University Hospital of Strasbourg, Strasbourg, France.

Methods

Dosing regimen

Twelve adult female New Zealand rabbits weighing between 3 and 3.5 kg were used. The animals were obtained and cared for in accordance with the Association for Research in Vision and Ophthalmology guidelines. One group received a single oral dose of 120 mg of LZD ($n=6$). The other one received 120 mg of oral LZD twice a day (every 12 h) for 3 days ($n=6$). The latter regimen targeted steady-state concentrations. The 120-mg dose was chosen on the basis of preliminary results which showed that a 600-mg tablet of LZD produces concentrations in the rabbit's serum that are 5 times higher than the concentrations that it produces in humans (data not shown). The dose adaptation was allowed by the LZD pharmacokinetics linearity.⁷

Antibiotic administration

LZD presented as a film-coated compressed tablet. The inactive ingredients were corn starch, microcrystalline cellulose, hydroxypropylcellulose, sodium starch glycolate, magnesium stearate, hypromellose, polyethylene glycol, titanium dioxide, and carnauba wax. The sodium content was 2.92 mg per 600-mg tablet. A 600-mg tablet of LZD was ground to powder, and 120 mg were diluted in 10 mL of water and then injected through an intragastric tube, under general anesthesia with ketamine (15 mg/kg of body weight) delivered in the lateral marginal ear vein.

Sample recovery

Serum and vitreous samples were collected after 0, 30, and 45 min and 1, 2, 4, 6, 8, and 12 h after the oral administration. Briefly, a drop of oxybuprocaine hydrochloride 0.4% was instilled before each puncture of the right eye. One hundred microliters of vitreous was aspirated with a 27-gauge needle, introduced 3 mm from the limbus, directed toward the center of the eyeball, cautiously avoiding any bleeding. Serum samples were collected from a 24-gauge angiocatheter inserted into the contralateral marginal ear vein. Samples were stored at -80°C before being processed. Specimens were protected against light and heat during collection, storage, and analysis.

LZD assay

Sample preparation before chromatography. Vitreous and serum samples were centrifuged for 10 min at 3,000 g. The supernatant was mixed with an equal volume of acetonitrile in a 5-mL screw-capped glass tube on a vortex mixer. The resulting mixture was centrifuged again for 10 min at 3,000 g. Then, 20 μL of the aliquot of the upper aqueous layer was injected into the high-performance liquid chromatography (HPLC) column.

HPLC method. LZD concentration was determined using reverse-HPLC dedicated to eye tissues.⁸ The liquid chromatograph consisted of a 125-solvent delivery module (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA), an injection valve (Beckman Instruments, Inc.) with a 20- μL loop, and a model 166 variable wavelength detector (Beckman Instruments, Inc.). Chromatograms were processed by 32 Karat software (version 5; Beckman Coulter, Inc.). Chromatography was

performed on a high-speed analytical column (150 \times 4.6 mm inner diameter) packed with 5- μm -diameter particles (Ultra-sphereXLODS; Beckman Instruments, Inc.). The mobile phase consisted of 25 mM ammonium acetate-acetonitrile (76:24, v/v) adjusted to pH 5 with glacial acetic acid. The flow rate was set at 1.0 mL/min, and the eluent was monitored at 251 nm.

Statistical analyses

Data are shown as means \pm standard deviation. The highest observed serum concentration was taken for peak concentration (C_{max}) and time to peak concentration (T_{max}). The area under the plasma or serum concentration-time curve (AUC) was estimated using the trapezoidal equation. Comparisons were made by calculating the unpaired t -test (GraphPad InStat[®] 3.06), and probabilities <0.05 were considered significant.

Results

Single-dose kinetics

The mean C_{max} reached 13.9 ± 4.5 mg/L in serum (s) and 3.00 ± 1.3 mg/L in vitreous (v) (Fig. 1). Residual concentrations after 12 h were 0.4 (s) and 0.5 (v) mg/L. The vitreous half-life of LZD, defined as the time needed for T_{max} to be divided by 2, reached 4 h. The $\text{AUC}_{(0-12\text{h})}$ after a single dose of LZD was 37.1 ± 7.7 mg \cdot h/L in serum (Fig. 2) and 18.3 ± 2.1 mg \cdot h/L in vitreous (Fig. 3).

Multiple-dose kinetics

At steady state, peak concentrations reached 18.0 ± 6.5 mg/L in serum and 4.5 ± 1.4 mg/L in vitreous (Fig. 1). The T_{max} in serum was at 0.5 h. The $\text{AUC}_{(0-12\text{h})}$ was 53.5 ± 4.1 mg h/L in

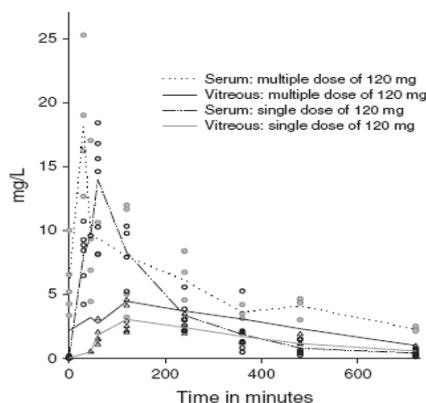


FIG. 1. Blood and ocular concentrations of linezolid (LZD) in mg/L after single (group 1) and multiple doses (group 2) of 120 mg versus time. LZD peaks occurred after 30 min in group 1 and after 1 h after the last administration in group 2. Ocular peaks consistently occurred after 2 h.

INTRAOCCULAR PENETRATION OF LINEZOLID

3

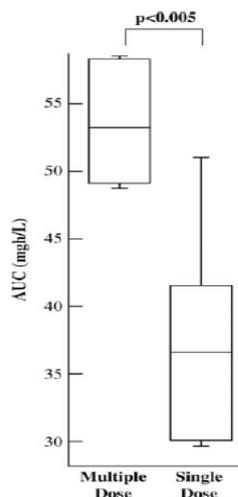


FIG. 2. Area under the concentration-time curve ($AUC_{(0-12h)}$) after a single-dose and a multiple-dose regimen of LZD in serum. $AUC_{S(0-12h)}$ were 37.1 ± 7.7 and 53.5 ± 4.1 mg·h/L, respectively (unpaired *t*-test: $p = 0.0011$).

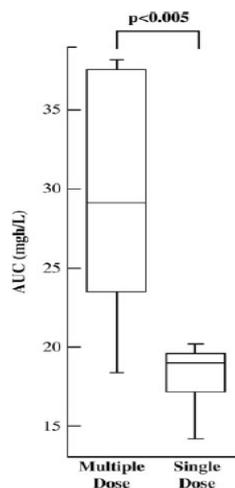


FIG. 3. Area under the concentration-time curve ($AUC_{(0-12h)}$) after a single-dose and a multiple-dose regimen of LZD in vitreous. $AUC_{S(0-12h)}$ were 18.3 ± 2.1 and 28.7 ± 7.7 mg·h/L, respectively (unpaired *t*-test: $p = 0.0054$).

serum (Fig. 2) and 28.7 ± 7.7 mg/h/L in vitreous (Fig. 3). The $AUC_{(0-12h)}$ in vitreous at steady state, compared with the AUC calculated after a single dose, increased significantly (28.7 ± 7.7 vs. 18.3 ± 2.1 mg·h/L respectively, $p = 0.0054$).

Discussion

It appeared in this study that LZD diffused into the rabbit's eyeball after being given orally with penetration ratios ($AUC_{(0-12h)}$ in vitreous/ $AUC_{(0-12h)}$ in serum $\times 100$) of 49.3% after a single-dose regimen and 53.6% after a multiple-dose regimen. The single- and multiple-dose pharmacokinetics of LZD in serum (C_{max} , T_{max}) were similar to those previously reported in humans.⁹

According to MacGovan,⁷ LZD exhibited a time-dependent antibacterial activity, and the best PK/PD parameter to predict outcome was the time that serum concentration exceeded minimum inhibitory concentrations ($T > MIC$). For staphylococci, a target value of 40% was relevant.⁷ In this study, the concentrations measured over 12h in serum and vitreous produced the corresponding $T > MIC$ for various MIC values shown in Fig. 4. In serum, after a single dose, $T > MIC$ reached 50% for MICs up to 3 mg/L, whereas it reached 100% for MIC = 4 mg/L in the steady state. In vitreous, $T > MIC$ reached only 50% for MIC = 1 mg/L, whereas it reached 83% for MICs up to 2 mg/L for the multiple-dose regimen. Considering that the Zyvox Annual Appraisal of Potency and Spectrum program has reported a MIC₉₀ in 20,000 isolates of *Staphylococcus* at 1 mg/L, a single oral dose of 120 mg was barely sufficient to induce intraocular bacte-

rial eradication. On the contrary, a multiple-dose regimen achieved ocular concentrations sufficient to cure Gram-positive-related eye infections.

Another pharmacodynamic parameter considered in this context was the maximum inhibitory quotient at the site of infection (IQ_{max}). According to Craig and Andes,¹⁰ IQ_{max} in otitis media was also predictive of the clinical bacterial outcomes with beta-lactam antibiotics, even if these drugs behaved in a time-dependent manner. The target value for an 80%–100% clinical outcome was an IQ of 5. In the present study, the mean vitreous peak at steady state provided an IQ of 4.5 for an MIC = 1 mg/L, the MIC₉₀ reported by the Zyvox Annual Appraisal of Potency and Spectrum program.

However, even if numerous ocular pharmacokinetic studies were conducted on rabbits because of the anatomic characteristics of the rabbit eye (i.e., globe size and aqueous humor turnover rate are comparable to those of human eyes), there are limitations: the experiments were conducted on healthy animals, and it is likely that the results could vary significantly in inflamed eyes or in other clinical conditions.¹¹ Frequent punctures of the relatively small volume of the rabbit's eye could also result in the dilution of the drug in the newly secreted aqueous humor or could induce a blood-ocular barrier breakdown responsible for a significant variation in antibiotic concentration in the eye. Iterative sampling of the vitreous could have lowered the concentrations of the drug measured over time. Therefore, it is possible that without this dilution, the ocular concentrations of LZD may have been higher than those measured in this experiment. This would strengthen the potential antibacterial effect of

4

SALEH ET AL.

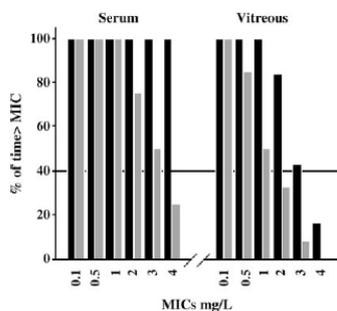


FIG. 4. Time above minimum inhibitory concentration (MIC) ($T > MICs$) for different MICs expressed as a percentage for 12 h, obtained in serum and vitreous after single (gray bars) and multiple doses of 120 mg (black bars). The target value of antibacterial efficiency (40%) is represented by a horizontal line. $T > MICs$ measured after multiple doses is above the target value for MICs up to 3 mg/L in both serum and eye.

LZD in the eye. In contrast, it is possible that repeated sampling could have produced a break in the blood-ocular barrier that enhanced the ocular penetration of the drug. However, this appears unlikely, because caution was taken not to contaminate the vitreous sample with blood, and additionally, the blood-retinal barrier remained unbroken during the experiment.

It is important to note that the levels of LZD measured in the eyeball after oral dosing remain 100 times lower than the concentrations measured after a direct intravitreal injection that shunts the blood-ocular barrier. It appears impossible to significantly increase the amount of the orally delivered dose because of its potential toxicity at higher doses (i.e., myelosuppression, peripheral and optic neuropathy). On the contrary, high levels in the vitreous are well tolerated, as demonstrated by the recording of the retinal electrophysiological activity after intravitreal injection of LZD.¹² Therefore, a scheme including a maiden intravitreal injection, followed by an adjuvant multiple-dose oral therapy, to maintain effective long-term levels in the eye could be proposed.

Conclusion

Although a single oral dose produced intraocular concentrations barely sufficient to induce bacterial eradication, a multiple-dose regimen provided intraocular levels exceeding the MICs of most Gram-positive organisms responsible for Gram-positive bacterial endophthalmitis. These encouraging findings should be confirmed in an experimental model of endophthalmitis.

Author Disclosure Statement

No author has a financial or proprietary interest in any material or method mentioned.

References

- Hatch, W.V., Cernat, G., Wong, D., et al. Risk factors for acute endophthalmitis after cataract surgery: a population-based study. *Ophthalmology* 116:425-430, 2009.
- Miller, D., Flynn, P.M., Scott, I.U., et al. *In vitro* fluor-quinolone resistance in staphylococcal endophthalmitis isolates. *Arch. Ophthalmol.* 124:479-483, 2006.
- Beringer, P., Nguyen, M., Hoem, N., et al. Absolute bio-availability and pharmacokinetics of linezolid in hospital-ized patients given enteral feedings. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:3676-3681, 2005.
- Horcajada, J.P., Aienza, R., Sarasa, M., et al. Pharmacoki-netics of linezolid in human non-inflamed vitreous after systemic administration. *J. Antimicrob. Chemother.* 63:550-552, 2009.
- Fiscella, R.G., Lai, W.W., Buerk, B., et al. Aqueous and vit-reous penetration of linezolid (Zyvox) after oral adminis-tration. *Ophthalmology* 111:1191-1195, 2004.
- Prydal, J.L., Jenkins, D.R., Lovering, A., and Watts, A. The pharmacokinetics of linezolid in the non-inflamed human eye. *Br. J. Ophthalmol.* 89:1418-1419, 2005.
- MacGowan, A.P. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of linezolid in healthy volunteers and patients with Gram-positive infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 51 Suppl 2:ii17-ii25, 2003.
- Saleh, M., Bourcier, T., Prevost, G., et al. High-performance liquid chromatographic assay to measure linezolid antibiotic in eye tissues. *Trends Chromatogr.* 4:107-112, 2008.
- Burkhardt, O., Borner, K., von der Hoh, N., et al. Single- and multiple-dose pharmacokinetics of linezolid and co-amox-iclav in healthy human volunteers. *J. Antimicrob. Chemother.* 50:707-712, 2002.
- Craig, W.A., and Andes, D. Pharmacokinetics and pharma-codynamics of antibiotics in otitis media. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 15:255-259, 1996.
- Di Paolo, A., Malacarne, P., Guidotti, E., et al. Pharmacolo-gical issues of linezolid: an updated critical review. *Clin. Pharmacokinet.* 49:439-447, 2010.
- Albin, S., Lin, T., Ulanski, L., et al. *Ocular Toxicity of In-travitreal Injections of Linezolid and Daptomycin in a Rabbit Model*, vol. E-844. Fort Lauderdale: ARVO, 2008.

Received: November 2, 2010
Accepted: March 11, 2011

Address correspondence to: ◀ AU2

Dr. Maher Saleh
Department of Ophthalmology and Department of Microbiology
University Hospital of Strasbourg
1 place de l'hôpital
Strasbourg 67000
France

E-mail: mahers_fr@yahoo.fr

5.4 Mise au point du modèle expérimental d'endophtalmie à *S. aureus*

Afin de déterminer si le linézolide pouvait efficacement traiter une endophtalmie bactérienne à Gram positif, un modèle expérimental d'endophtalmie a été mis au point. Ce dernier reposait sur :

- **Le lapin** : Comme nous l'avons déjà souligné, la majorité des études expérimentales évaluant l'efficacité d'un antibiotique dans l'endophtalmie ont été réalisées chez cet animal pour des raisons anatomiques et de facilité d'accès à la cavité vitrénne, et d'existence de scores cliniques validés pour mesurer le niveau d'inflammation clinique comme le score de Nussenblatt. **Tableau 15.**

Points	=0	=1	=2	=3	=4
Segment antérieur	Aspect normal	Rougeur au site d'injection	Cercle périkératique de plus de ½ de la circonférence limbique	Œdème cornéen Cercle périkératique Œdème palpébral Secrétions purulentes	Critères 3 + Œdème cornéen et fibrine empêchant la visualisation de l'iris
Points	=0	=1	=2	=3	=4
Segment postérieur	Vitré clair Nerf optique (NO) et rétine visibles	Trouble vitréen Bords NO visibles Rétine visible	Trouble vitréen Bords NO flous Rétine visible	Trouble vitréen Bords NO non visibles Rétine visible mais vaisseaux non individualisables	Trouble vitréen Rétine non visible

Tableau 15. Score d'inflammation clinique de Nussenblatt. Le score correspond à la somme du score d'inflammation du segment antérieur et du score de segment postérieur établi à l'aide d'un ophtalmoscope.

- Infection à *S. aureus* : Le choix de cette bactérie a reposé sur des critères de virulence plutôt que de fréquence. Parmi les bactéries à Gram positif, *S. aureus* est le deuxième microorganisme responsable d'endophtalmie post-opératoires aiguës en

termes de fréquences. [4] Les infections à staphylocoques dorés sont plus sévères, du fait de la virulence de la bactérie. Cette virulence s'explique par la production de protéines de surface augmentant l'adhésion de la bactérie aux épithéliums, fibrinogène, collagène.., et de nombreuses toxines comme la toxine a, trouant la membranes des plaquettes et des monocytes, libérant ainsi des cytokines pro-inflammatoires, de toxine gamma, hématolytique, ou encore des staphylokinases à action fibrinolytique favorisant la dissémination de la bactérie. **Figure 12.**

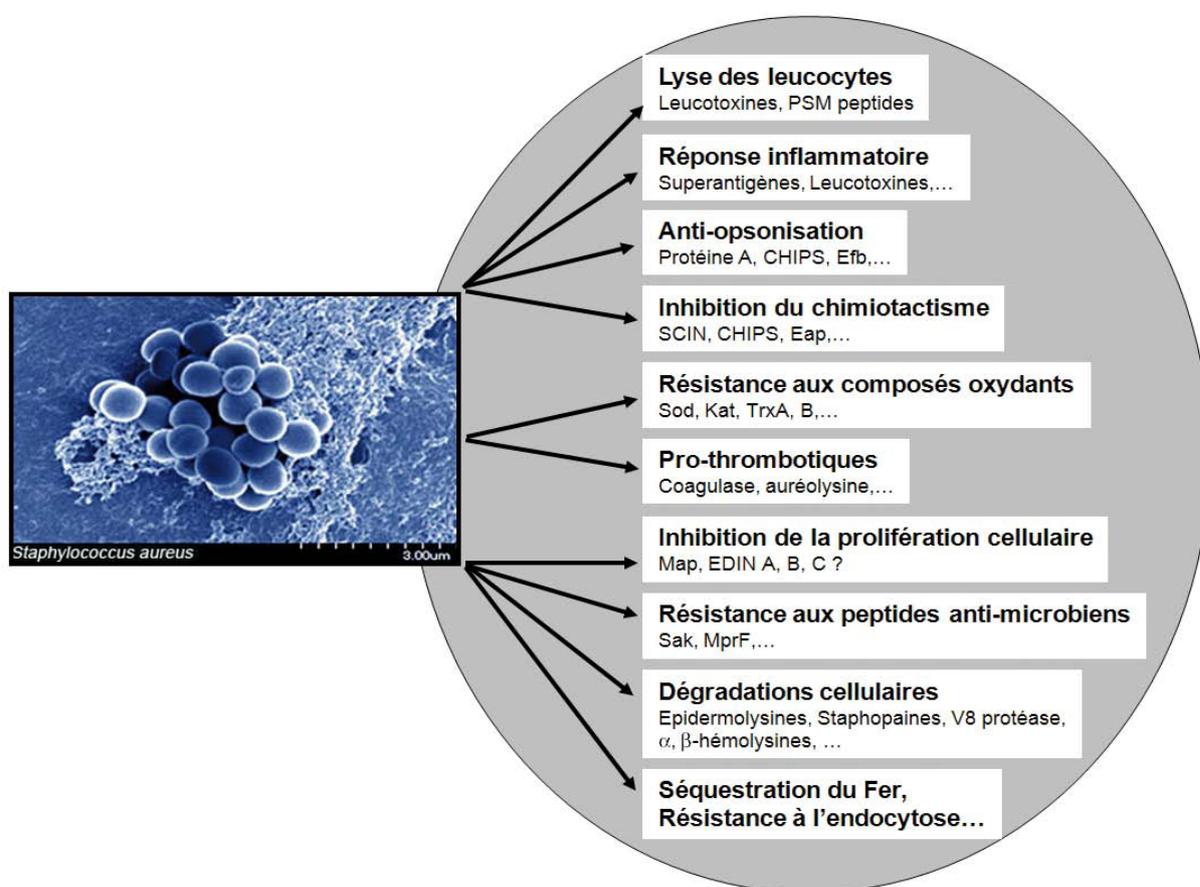


Figure 12. Facteurs de virulence du ***Staphylococcus aureus***. (Vincenot, Saleh, Prevost. Revue Francophone des Laboratoires - 2008 - N°407).

La souche de *S. aureus* que nous avons injectée dans le vitré était isolée à partir d'un grattage d'un abcès cornéen. Le profil toxinique et l'antibiogramme ont été préalablement établis. **Tableau 16 A et B.** Il est a noté que ce staphylocoque ne

produisait pas de Leucocidine de Panton-Valantine (responsable de nécroses cutanées et pulmonaires) ni de Toxine TSST-1 (responsable de choc toxique).

Souche	Phénotype	CMIs (mg/L)	Sensibilité
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29737)	MRSA	Oxacilline > 2	R
	Van-S, Dap-S	Vancomycine < 4	S
		Linézolide < 2	S

Tableau 16 A. Antibiogramme de la souche sélectionnée.

Souche	Toxine	Technique	Présence (+)/ Absence (-)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29737)	LukFPV, LukSPV		-
	EtA	Immuno-précipitation par méthode d' Ouchterlony	-
	EtB		-
	SEA		+
	SEB	Agglutination au latex par kit de détection de toxine (Oxoid [®] , Dardilly France)	-
	SEC		-
	SED		-
			-

Tableau 16 B. Profil toxinique de la souche de *S. aureus* utilisée. (LukFPV et LukSPV = protéines Fet P de la leucocidine de Panton - Valentin. EtA et EtB = toxines exfoliatives A et B. SEA, SEB, SEC and SED, = Enterotoxines A, B, C, D).

En plus des résistances développées vis-à-vis des antibiotiques et certains antiseptiques, *S. aureus* est également l'un des principaux pourvoyeurs d'infections nosocomiales. Des souches épidémiques multi-résistantes en particulier à la méticilline (SAMR), peuvent ainsi se rencontrer dans 30-40% des cas. Elles sont de sensibilité diminuée à la rifampicine, la fosfomycine et à l'acide fusidique; cependant, comme l'est la souche que nous avons sélectionnée, elles restent sensibles aux

glycopeptides, en particulier à la vancomycine qui demeure le traitement de référence des infections à SAMR.

Dans ce modèle expérimental, l'injection de seulement 100 Colony forming units (CFU) a suffi à induire une endophtalmie. La virulence élevée de la bactérie injectée est confirmée par l'examen histologique final des témoins positifs (injectés non traités) qui retrouve des lésions anatomiques majeures aussi bien dans les segment antérieur que postérieur.

- Protocole expérimental

Les lapins *New Zealand* ont été répartis en plusieurs groupes. Trois groupes de 8 ont reçu respectivement une IVT de 1, 10 et 30 mg de linézolide, administrée 24 h après l'inoculation bactérienne, suite à la confirmation clinique et bactériologique (comptage bactérien) de la présence d'une endophtalmie bactérienne aiguë.

Un autre groupe de 8 lapins a reçu une IVT de 1 mg de vancomycine, considéré comme le traitement de référence. Enfin un dernier groupe de 8 a été scindé en deux, pour former le groupe des témoins positifs et le groupe des témoins négatifs (injection d'une solution stérile de BSS à la place de l'antibiotique).

En plus de la clinique et des comptages bactériens, une analyse histologique a été menée à J8 après euthanasie des animaux. Une lecture des lames obtenues a été réalisée en double aveugle, avec l'aide d'un anatomopathologiste confirmé d'après un score histologique préétabli. [98] [99] **Tableau17.**

Points	Cornée	Chambre antérieure	Vitré	Rétine
0	Normale	Vide	Vide	Normal
1	Infiltration partielle (épaisseur) segmentaire (longueur)	Fibrine sans cellules	Infiltrat cellulaire partiel sans abcès	Partiellement infiltrée et nécrotique, rétine normale visible
2	Infiltration de pleine épaisseur, segmentaire	Remplie partiellement de fibrine et de cellules inflammatoires	Partiellement rempli d'infiltrats et abcès	Totalement infiltrée et partiellement nécrotique, rétine normale absente, couches encore distinguable
3	Infiltration de pleine épaisseur et totale	Remplie totalement	Totalement rempli	Totalement nécrotique, pas de couche intacte

Tableau 17. Score histologique utilisé (correspond à la somme de chaque structure, de 0 à 12 points). [98] [99]

5.5 Etude de la PK/PD du linézolide administré par injection intravitréenne dans un modèle d'endophtalmie à *S. aureus*

- Résultats de l'IVT de linézolide vs vancomycine. **ARTICLE 4.**

De façon surprenante, les doses de 1 mg et de 10 mg de linézolide n'ont pas permis la stérilisations des yeux infectés, contrairement à la dose de 30 mg de linézolide et de 1 mg de vancomycine. Ce résultat paraît surprenant sachant que la dose ainsi injectée était bien supérieure à la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la souche pour le linézolide (2mg/L). Les yeux injectés avec 1 mg ne différaient pas en termes d'évolution clinique, de comptage bactérien et de résultat histologique des yeux témoins positifs. **Figure 13 A et B.** La dose de 10 mg semblait apporter une amélioration bactérioclinique transitoire les 2 premiers jours avec une reprise de la croissance bactérienne significative par la suite. La dose de 30 mg, qui est la dose maximale administrable du fait de la limite de solubilité de l'antibiotique, a permis, au contraire de stériliser tous les yeux, apportant ainsi une amélioration clinique significative (**Figure 14**) et préservant l'anatomie oculaire de façon satisfaisante. **Figure 15 A et B.**

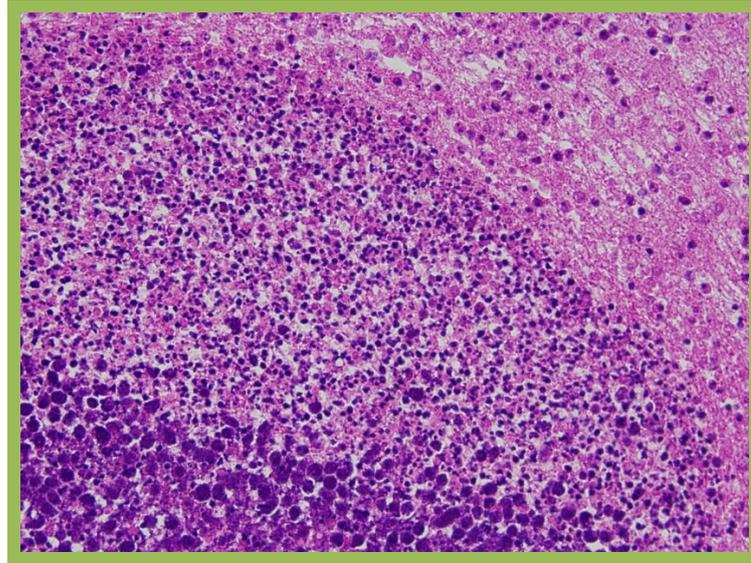


Figure 13A. Coupe oculaire sagittale passant par la rétine d'un œil présentant une endophtalmie à *S. aureus* traitée par IVT de 1 mg de linézolide (J8). Coloration par hématoxyline-éosine, agrandissement x 400. Les couches rétinienne ne sont plus individualisables traduisant la présence d'une nécrose rétinienne associée à la présence de nombreuses cellules inflammatoires polynucléées et de lymphocytes dans le vitré.

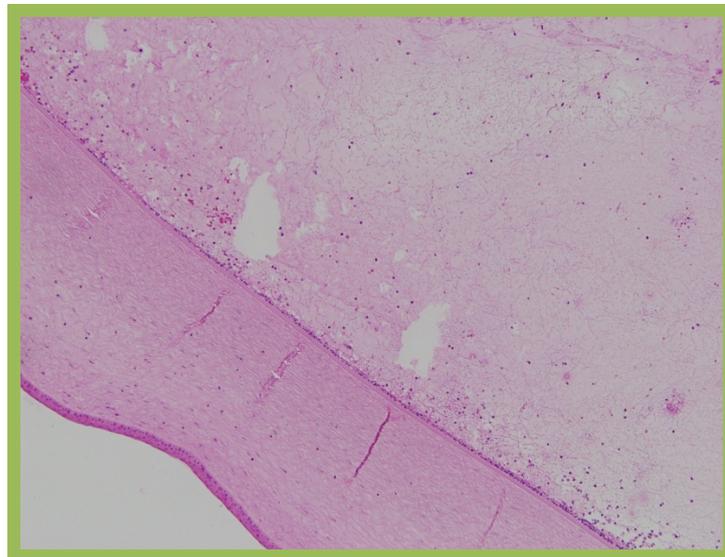


Figure 13B. Coupe oculaire sagittale passant par la cornée d'un œil présentant une endophtalmie à *S. aureus* traitée par une IVT de 1 mg de linézolide (J8). Coloration par hématoxyline-éosine, agrandissement x 100. Alors que la cornée est relativement préservée, il existe un amas massif de fibrine en chambre antérieure associé à la présence de nombreuses cellules inflammatoires.



Figure 14. Aspect clinique de l'endophtalmie au moment de l'IVT de 30 mg de linézolide, et aspect à J5.

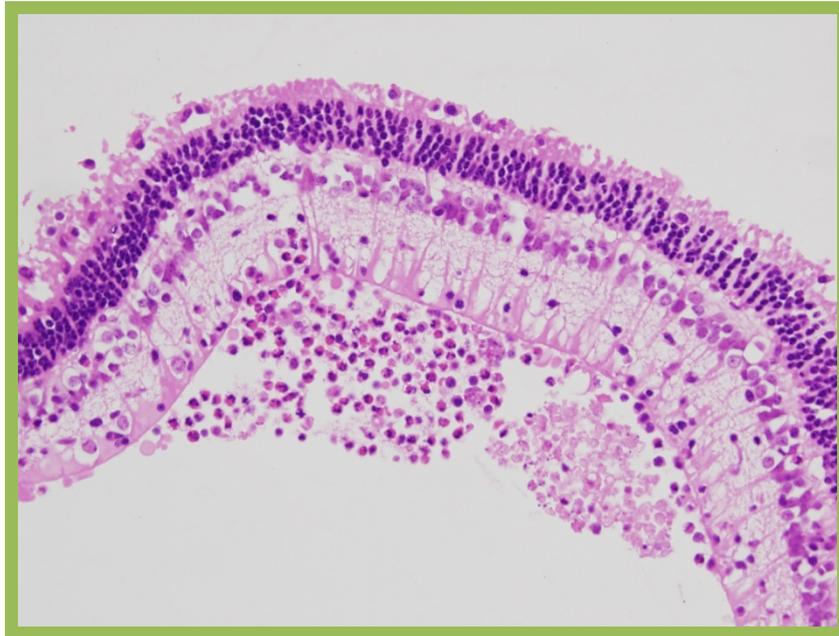


Figure 15A. Coupe oculaire sagittale passant par la rétine d'un œil présentant une endophtalmie à *S. aureus* traitée par une IVT de 30 mg de linézolide (J8). Coloration par hématoxyline-éosine, agrandissement x 400. Les couches rétiniennes sont bien préservées, on note la présence de cellules inflammatoires polynucléées et de lymphocytes dans le vitré et quelques amas de fibrine. Il n'existe pas de micro-abcès.

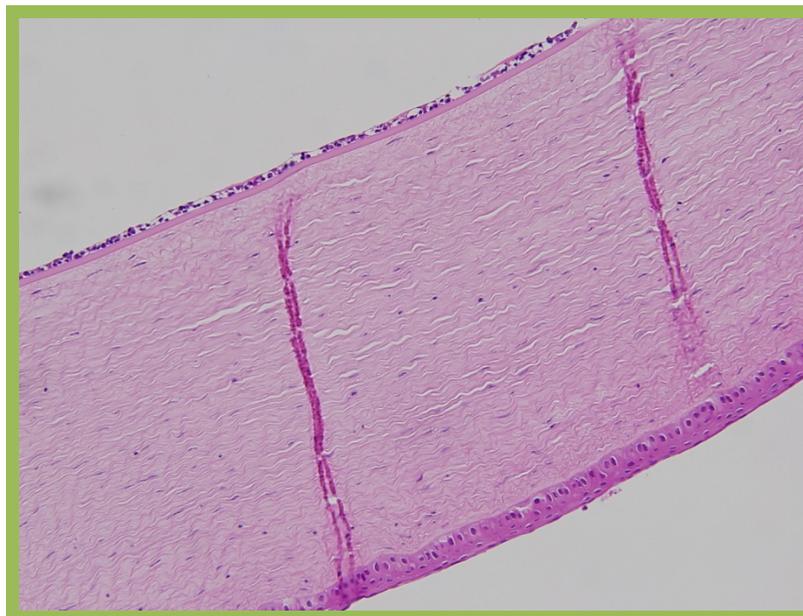


Figure 15B. Coupe oculaire sagittale passant par la cornée d'un œil présentant une endophtalmie à *S. aureus*, traité par une IVT de 30 mg de linézolide (J8). Coloration par hématoxyline-éosine, agrandissement x 200. La cornée est d'aspect normal. Il existe un discret dépôt de fibrine rétro-descémétique associé à de rares cellules inflammatoires dans la chambre antérieure.

Afin de comprendre les raisons de l'apparente absence d'efficacité de certaines doses de linézolide, une étude complémentaire de pharmacocinétique a été réalisée, en mesurant les concentrations de linézolide à différents moments et en calculant les principaux facteurs pharmacodynamiques ($t > CMI$, Aire sous la courbe/ CMI) pour déterminer lesquels sont prédictifs du résultat bactériologique. La même technique de CLHP dédiée aux tissus oculaires a été utilisée.

Il en ressort ainsi que, premièrement, la demi-vie du linézolide dans le vitré de l'œil infecté est réduite de moitié passant de 4 à moins de 2 heures sur œil inflammatoire contre 48 h pour la vancomycine. [100] Secondairement, les paramètres normalement prédictifs de l'activité antibactérienne du linézolide dans le sérum ne

s'appliquent pas à ce modèle expérimental. En effet, le linézolide est un antibiotique temps dépendant, et il est admis que des concentrations supérieures à la CMI pendant plus de 60% de l'intervalle entre deux administrations assuraient une bonne efficacité clinique. La dose de 10 mg s'est avérée insuffisante malgré le fait que la concentration vitrénne qui s'en suivait dépassait la CMI sur 92.9% de l'intervalle. Il en est de même de l'ASC/CMI qui, malgré un ratio élevé, ne s'est pas révélé être un paramètre prédictif fiable de l'efficacité thérapeutique. La conclusion est donc que le linézolide présente, dans l'œil infecté, une activité plutôt concentration-dépendante et que des doses élevées sont nécessaires pour fournir une bactéricidie satisfaisante. Les spéculations quant à cette constatation sont nombreuses : il pourrait s'agir d'un effet bactériostatique qui n'est pas immédiatement suivi par la destruction bactérienne par les défenses de l'hôte, du fait du privilège immunitaire de l'œil et qui conduirait à une recroissance bactérienne rapide ou il pourrait s'agir d'une fixation protéique augmentée du linézolide, du fait de la présence de nombreuses protéines inflammatoires dans le vitré. Des études complémentaires sont nécessaires pour répondre à cette question.

ARTICLE4.

Dear
Editor-in-Chief of IOVS,

August 15th 2011

Please find enclosed the original manuscript entitled "Efficacy of intravitreal administrations of linezolid in an experimental model of *S. aureus* endophthalmitis" that we wish to submit for publication in your journal.

We studied the effects of intravitreal administrations of linezolid in comparison with the reference vancomycin treatment in a rabbit's model of endophthalmitis. We conducted clinical, bacterial and histological assessments to determine whether linezolid could play a role in the treatment of Gram positive related endophthalmitis as suggested by other authors.

We hope that the PK/PD study reported in this manuscript is deemed acceptable for publication in your journal.

Best regards,

The authors

Efficacy of Intravitreal administrations of linezolid in an experimental model of *S. aureus* related endophthalmitis

Maher Saleh ^{1,2}, Sophie Lefèvre ¹, Tristan Bourcier ², Luc Marcellin ³, Gilles Prévost ¹, Audrey Subilia ², David Gaucher ², François Jehl ¹

1 Department of Microbiology, University of Strasbourg

2 Department of Ophthalmology, University of Strasbourg

3 Department of Pathology, University of Strasbourg

*Corresponding author: Maher SALEH (M.D.)

Department of Ophthalmology, University Hospital of Strasbourg.

1 place de l'hôpital. 67000 Strasbourg, France.

E-mail: mahers_fr@yahoo.fr

Phone: (33) 03 90 24 37 81

Fax: (33) 03 90 24 38 08

Short title : Linezolid for treating *S.aureus*-related endophthalmitis.

Keywords : linezolid ; endophthalmitis ; pharmacokinetics ; intravitreal administration ; *S. aureus*.

ABSTRACT

PURPOSE: To evaluate the efficacy of intravitreal administration of linezolid (LZD) in a rabbit's model of *S. aureus* endophthalmitis.

METHODS: forty rabbits were studied. Thirty-six of them received 10^2 colony-forming units of *S. aureus* in their right eye before being randomly assigned to the following groups: four groups of eight animals received 24 h after the bacterial inoculation, 1, 10, 30 mg of LZD (LZD 1, LZD 10 and LZD 30) and 1 mg of vancomycin (V1), respectively. Four other animals had a sham injection in their infected eye (BSS+). The four remaining animals were used as negative controls. Clinical, bacterial and histological assessments were conducted at different endpoints. Animals were euthanized at day 8.

RESULTS: At day 5, the mean inflammatory clinical scores of Nussenblatt were 7.0 ± 1.0 , 3.6 ± 0.7 , 3.1 ± 0.8 , in the LZD 1, LZD 10, LZD 30 groups and 3.4 ± 1.7 , 7.5 ± 0 in the V1 and BSS+ groups, respectively ($p < 0.05$, ANOVA). The corresponding mean bacterial counts in the vitreous (\log_{10} CFU/mL) were 6.2 ± 6.5 , 3.5 ± 3.8 , 0, 3.8 ± 4.2 , 7.8 ± 4.9 , respectively ($p < 0.05$, ANOVA). A 30 mg dose of LZD sterilized all the eyes at day 5 and displayed the lowest (best) histological score (1.5 ± 0.6). Residual LZD concentrations 24h after the administration were between 0.1 and 7.2 mg/L. LZD 30 group. The half time of linezolid in the vitreous was 2 h.

CONCLUSIONS: This is the first evidence of the effectiveness of linezolid for the treatment of experimental staphylococcal endophthalmitis. High ocular concentrations of LZD were needed to obtain a satisfactory bactericidal effect. Linezolid displayed a concentration-dependent killing activity in the eye.

INTRODUCTION

Despite appropriate antibiotic treatment, bacterial endophthalmitis still frequently leads to permanent visual loss in the affected eyes.

The leading causative organisms are cocci gram-positive, with a predominance of coagulase-negative *Staphylococcus* followed by *Staphylococcus aureus* and streptococcal species.^{1 2 3} Because the intravitreal route provides immediate and high local concentrations of the drugs,⁴ intravitreal injection of antibiotics, i.e. vancomycin and/or ceftazidim, is the standard therapy for Gram positive related endophthalmitis. However, the increasing antibiotic resistance among Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) observed in some severe infections⁵ has also been reported to occur in endophthalmitis isolates.⁶ Such a development in bacterial resistance would be an issue of major concern considering that few antibiotics given by the intravitreal route provide both, satisfactory antibacterial efficacy and good tolerance.

An antibiotic targeting Gram-positive bacteria and active against the agents resistant to other antibiotics would be of some interest in the management of endophthalmitis. The oxazolidinones are a recent class of synthetic antibacterial agents which first compound to be commercialized is linezolid (LZD). In vitro and in vivo studies have demonstrated that, linezolid, has significant antimicrobial activity against *Streptococcus pneumoniae*, reported to be responsible of severe endophthalmitis⁷ and against multiresistant Gram-positive pathogens such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*,⁸ and vancomycin resistant *Enterococcus* (VRE).⁹ In addition, linezolid blocks the formation of the 70S subunit, which inhibits the initiation of translation. This specific mechanism of action reduces the risk of cross-resistance with other antimicrobial agents.

Pharmacokinetics of oral,^{10, 11, 12} intravenous¹³ and topical¹⁴ linezolid have been investigated in human and animals' non inflamed eyes. Results have demonstrated an interesting ocular penetration in both the anterior segment of the eye, and into the vitreous body. Therefore, it has been suggested that linezolid could play a role in the treatment of Gram-positive related endophthalmitis.^{10, 11, 12}

However, there is no data available on the efficacy of linezolid administrated in infected eyes. In this study, we compared the efficacy of intravitreal administrations of linezolid versus vancomycin, the treatment of reference in staphylococcal endophthalmitis, in an experimental model of *S. aureus* endophthalmitis.

METHODS

***In vivo* experimental model of *S. aureus* endophthalmitis**

Forty female New Zealand albino rabbits weighing between 3 and 4 kg were obtained from the Animal Experimentation Service of the University of Strasbourg. (Agreement number A-67-482-34). They were maintained on water and standard laboratory chow *ad libitum* throughout the study in rooms with a controlled temperature (21°C) and light cycle (12/24 h). The animals were obtained and cared for in accordance with the recommendations of the ARVO guidelines for the Use of Animals in Ophthalmic and Visual Research (ARVO).

Strain and bacterial preparation

A strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* was isolated from a corneal sample of a patient with a corneal keratitis and its antibiotic susceptibility and toxin profiles were determined. It was cultured for 18h on a 5% (wt/vol) sheep blood agar plate, then colonies were harvested and diluted in 0,9% of NaCl (wt/vol) to achieve the desired bacterial count (i.e, 10² colony-forming units (CFU) per 0,1 ml). Counts

were verified by plating aliquots of the serially diluted samples on 5% (wt/vol) sheep blood agar plates, incubated overnight at 37°C.

Dosing protocol

Rabbits were randomly dispatched in treatment groups: 4 groups of eight animals, received 10^2 of *S. aureus* in their right eye. After the clinical confirmation of the insult of an endophthalmitis (i.e., red ring, conjunctival edema, bogginess of iris, or loss of red reflex), animals were treated with linezolid at different intravitreal doses: 1 mg in group 1 (LZD1), 10 mg in group 2 (LZD10), and 30 mg in group 3 (LZD30). Rabbits of the fourth group (V1) received 1mg of vancomycin, which is considered as the treatment of reference of Gram-positive bacterial endophthamitis. A control group of 4 rabbits had their right eye infected, then injected with balanced salt solution (BSS), 24 h after the inoculum. This group constituted the positive control group (BSS+). The second control group of 4 animals received a sterile physiologic saline injection in place of the bacterial inoculum, then received a BSS injection at 24 h. This group was the negative control group (BSS-). **(table1)**

Intravitreal injections of antibiotics

Linezolid (Zyvox®, Pfizer France, Paris, France) was obtained as pure titrated powder, and diluted in a sterile solution of BSS in order to obtain 1mg, 10 and 30 mg of LZD in a volume of 100µL. Vancomycin (vancomycine Sandoz®, Sandoz SAS, Levallois-Perret, France) was prepared from an injectable powder in order to get a dose of 1mg diluted in 100µL of BSS.

Before each intravitreal injection, rabbits were anesthetized with an intramuscular injection of a mixture of ketamine (Ketamine Virbac®, 30 mg/kg body weight; Carros, France) and xylazine (ROMPUN® 2%, 4 mg/kg body weight; Bayer Pharma, Puteaux, France). A drop of oxybuprocaine (oxybuprocaine Faure® 1,6 mg/0,4 ml, Novartis

Pharma SAS, Rueil Malmaison, France) was instilled prior to each puncture of the eye. The antibiotic was delivered 24 hours after the bacterial inoculation, through a 27 gauges needle mounted on a tuberculin syringe, introduced at 3 mm of the limbus, directed toward the center of the eyeball, avoiding the crystalline lens.

Clinical investigations

Eyes were observed clinically before, and at various time points during the infection (day 1, 3, 5, and 8 after the bacterial inoculation). Clinical modifications were assessed in a masked fashion by an ophthalmologist, according to the criteria of Nussenblatt.¹⁵ Briefly, five increasing levels of severity of damage were scored for the anterior segment and annexes (graded from 0 to 4 points) and five other levels were scored for the posterior segment (0 to 4 points) observed by direct ophthalmoscopy (Heine®). The sum of these two scores, from 0 point (normal) to 8 points (severely damaged), constituted the ocular inflammation score of Nussenblatt.

Samples collection

Fifty to seventy five microliters of vitreous was aspirated with a 25 gauges needle mounted on a 2mL syringe, introduced at 3mm of the limbus, directed toward the center of the eyeball, cautiously avoiding any bleeding. Vitreous samples were collected at day 1 to confirm the presence of an endophthalmitis by a positive culture, and at day 2 to measure the residual concentrations of antibiotic 24 h after the intravitreal administration. Samples were repeated at day 5 and at day 8 to assess the bacterial growth.

Vitreous cultures

A 50 µL aliquot was serially 10-fold diluted in 450 µL of sterile 0,9% (wt.vol) NaCl. A 100 µL volume of each dilution was plated on a 5% (wt/vol) sheep blood agar plate and incubated overnight at 37°C to be counted after 24h.

Histology

Four animals from each groups were euthanatized with 5 ml of sodium pentobarbital (Dolethal[®], Vetoquinol SA, Lure, France) given intravenously and were enucleated after the clinical scoring on day 8. The globes were fixed in 4% buffered formaldehyde (v/v) for at least 48 h, embedded in paraffin, and then cut in 5-µm thick sections. All eyes were sectioned through the optic nerve and any gross abnormalities were recorded. Sections were stained with haematoxylin and eosin, before microscopic observation (X40). Histologic slides were reviewed in a masked fashion by an ophthalmic pathologist and rated according to a predefined score (**Table2**).

Linezolid assay

The linezolid concentrations were determined by reverse-phase High performance liquid chromatography (HPLC) assay, specially dedicated to eye tissues.¹⁸ The liquid chromatograph consisted of a 125 solvent delivery module (Beckmann, Fullerton, CA, USA), an injection valve (Beckman Instruments Inc, San Ramon, CA, USA) with a loop of 20µl and a model 166 variable wavelength detector (Beckmann). Chromatograms have been processed by a 32 Karat software version 5(Beckman Coulter Inc).Chromatography have been performed on a high speed analytical column (150*4.6 mm I.D.), packed with 5 µm diameter particles (UltrasphereXL-ODS, Beckmann). The mobile phase consisted of 25 mmol/L ammonium acetate-acetonitrile (76:24, v/v) adjusted to pH 5 with glacial acetic acid. The flow-rate was set at 1.0 mL/min and the eluent was monitored at 251 nm. Vitreous humor, has

been centrifuged for 10 minutes at 3000 g, and then the supernatant has been mixed with an equal volume of acetonitrile in a 5 ml screw-capped glass tube on a Vortex mixer (Vortex, Cleveland, OH, USA). The resulting mixture has been centrifuged again for 10 minutes at 3000 g. 20 µL of the aliquot of the upper aqueous layer has been injected into the HPLC column.

Statistical analysis

All values represent the mean \pm standard deviation for ≥ 4 eyes per time point assayed unless otherwise specified. For histological score, all values represent the mean \pm standard deviation for 4 eyes. Descriptive statistics and one-tailed, ANOVA assuming equal ($n \geq 5$) or unequal ($n < 5$) variance were used for statistical comparisons between groups. $P \leq 0.05$ was considered significant. A Tukey-Kramer multiple comparisons test was performed if the P value was less than 0.05. Statistics were calculated by using GraphPad InStat (GraphPad InStat, Inc., San Diego, USA).

RESULTS

Antistaphylococcal efficacy

All eyes that received a bacterial inoculum developed an acute endophthalmitis, clinically observed after 24h. There was no significant difference in the size of the injected bacterial inoculum at Day 0 ($p > 0.05$). At Day 1, just before the antibiotic intravitreal administration, groups were comparable in term of clinical scores ($p > 0.05$) (**figure1**) and bacterial counts ($p > 0.05$) from the vitreous of eyes infected with *S. aureus*. (**figure2**)

A 1 mg intravitreal injection of linezolid appeared to be ineffective in treating the endophthalmitis: neither the clinical score (**Figure 1**) nor bacterial count in the vitreous (**Figure2**) were significantly different from those of the BSS + group

($p > 0.05$). In addition, none of the eyes was sterilized at any time point in this group. (**figure3**).

The 10 mg dose of linezolid produced a mixed effect : at day 5, it reduced the bacterial count in comparison to the LZD 1 and the BSS + group ($p < 0.05$) and half of the eyes were sterilized. (**figure 3**) However, at day 8 a bacterial regrowth was noticed in 2/8 eyes and the bacterial count in this group was not anymore different from the ones of the LZD 1 and BSS + groups ($p > 0.05$) (**figure2**). Clinical scores of LZD 10 (**figure1**), which improved at day 5 in comparison with those of LZD 1 and BSS+ ($p < 0.001$) were no more different from these group at day 8 ($p > 0.05$) (**figure1**)

The intravitreal Injection of 30 mg of linezolid demonstrated the most potent antistaphylococcal activity. The clinical features improved significantly in comparison with LZ1 and BSS+ groups at day 5 and 8. ($p < 0.001$) (**figure1**) However there was no difference in clinical scores with the V1 group. At day 5 and 8, a decrease in the bacterial count of LZD 30 group was noticed in comparison with those of the other groups ($p < 0.05$) except the V1 group. (**figure2**) At day 5, 8/8 eyes were sterilized with LZD 30, while 7/8 eyes were sterilized with V1 (**figure3**). At day 8, a bacterial regrowth was noticed in a single eye of both, LZD 30 and V1 groups.

Residual concentrations of linezolid.

The residual concentrations measured 24 h after the intravitreal injection of linezolid were 0.1 ± 0.3 , 1.1 ± 0.6 , 7 ± 1.6 mg/L in the LZD 1, LZD10, LZD30 groups, respectively. The vitreous half time of linezolid was calculated by the formula $(24 \times \log 2) / \log (C_{\max} / C_{24h})$. In consequence according to a first order kinetics elimination, the linezolid estimated half-time in the vitreous was between 1.9 and 2.1 hours.

(**Table 3**)

Histological analysis

There was a significant difference in the histological scores between groups ($p=0.017$, Kruskal-Wallis Test). **(figure4)** Eyes from LZD 30 and V1 groups possessed intact retinal architecture, and few inflammatory cells in the vitreous. Eyes from LZD 10 group exhibited a mild to moderate inflammatory response in the anterior segment and the vitreous. Inflammatory cells and sometimes cocci were observed throughout the vitreous but occurred in greatest numbers at vitreous interfaces and on the posterior surface of the ciliary body. Retinal architecture was disrupted, with retinal detachment, photoreceptor layer folding, and inflammatory cells located within the retinal layers. However, some normal retinal tissue was seen. Inflammatory cells were observed migrating from the vitreous into the retina. **(Figure 5)** In general, these eyes were less inflamed than those of LZD 1 group and from the BSS+ group. LZD 1 and BSS + groups exhibited severe inflammation in all parts of the eye. Inflammatory cells migrated in more significant numbers into the corneal periphery, forming a corneal ring abscess. Inflammatory cells, fibrin and sometimes erythrocytes filled the anterior segment. Retinal structures were indistinguishable, and the posterior chamber was filled with inflammatory cells and fibrin.

DISCUSSION

Linezolid remains a potent anti Gram-positive antibiotic. The linezolid surveillance network ¹⁹ confirmed that LZD retained excellent activity against monitored Gram-positive pathogens at a level of more than 99.6%. ²⁰ A study of the antibiotic susceptibility in bacteria isolated from human endophthalmitis also showed a linezolid susceptibility in 100% of coagulase-negative *Staphylococcus* ²¹ and *S. aureus*. Therefore, linezolid was recently suggested as an alternative in the treatment of

Gram-positive endophthalmitis.^{10, 12, 13} Previous pharmacokinetics studies have focused on the intraocular concentrations obtained by the systemic route, and it appeared that the maximal concentrations of linezolid after systemic administration were 6.8mg/L in the aqueous humor and of 5.7mg/L in the vitreous,^{10, 12, 13} These concentrations were above the Minimal inhibitory Concentrations (MIC) of most causative bacteria (MIC₉₀ = 2 mg/L¹⁹) and it was suggested that these levels could be sufficient to treat the Gram-positive related endophthalmitis. However, There is no data available on the levels obtained after direct vitreal administration which remains the best route of administration of antibiotics in this condition. Indeed, it is important to consider that the pharmacokinetic requirements for efficacy in bacterial endophthalmitis are more stringent compared with those for other tissues such as lungs or the skin because of the presence of a blood ocular barrier. The best route to treat bacterial endophthalmitis remains the intravitreal route, because it shunts the blood-ocular barrier that limits the ocular penetration of antibiotics from the blood stream, providing intravitreal levels of antibiotics higher than the ones obtained after a systemic administration for protracted periods of time.⁴

Vitreous concentrations of LZD obtained by the vitreal route in this experimental model are considered high compared to the concentrations obtained in the serum after systemic administration. However, the failure of the 1 and 10mg intravitreal LZD doses in sterilizing the staphylococcal endophthalmitis was surprising since the peak antibiotic levels (C_{max}), were in all the groups several dilutions greater than the MIC for linezolid of the inoculated *S. aureus* (MIC=2mg/L) (**Table 3**). The failure to sterilize the eye, could be partially explained by the fact that linezolid, which is considered as a time dependant antibiotic²², displayed a very short half-life in the vitreous. Indeed, its half-life in the inflamed eye was around two hours when

vancomycin, displays a half-time of more than 48 hours in the same conditions.²³

This rapid clearance of linezolid from the vitreous could be related to the severe ocular inflammation associated with bacterial endophthalmitis, that enhances the elimination of the drug from the ocular structures as it was previously demonstrated for other antibiotics (i.e, gentamicin²⁴ or vancomycin^{25 23 25}).

Pharmacodynamics parameters determining the efficacy of linezolid against *S. aureus* in the eye are not known. Most of data on linezolid pharmacodynamics are based on serum concentrations and it is admitted that AUC₂₄/MIC ratio²⁶ and t>MIC²⁷ are the most suitable parameters to predict the antistaphylococcal effect of linezolid. In our experimental model of endophthalmitis, AUC₂₄/MIC did not appear to be predictive of antibacterial efficacy, since high ratios reached in the 1 and 10 mg LZD groups (respectively 3999.5 and 39999.6 mg/L.h) were not sufficient to provide a satisfactory bactericidal activity. Increasing doses of linezolid improved the bactericidal efficacy of linezolid in the eye. According to clinical, bacterial and histological criteria, the 30 mg of linezolid, was bactericidal and was at least as effective as the injection of the reference treatment, vancomycin, in curing the endophthalmitis. At this dose, linezolid was also superior to other regimens in preserving the architecture of the ocular structures especially, the retinal structure. Such a concentration-dependent killing of staphylococci exposed to linezolid has been already reported in *in vitro* model.²⁶ However, even if the gross anatomy was found to be intact, there is no data available on the toxicity of such doses of intravitreal linezolid on the retinal function. A study of the visual function, tested by electroretinography, after intravitreal injection of linezolid in rabbits' eyes, was only performed at low doses of linezolid (up to 300µg/0.1 ml).²⁸ It appeared that linezolid was well tolerated at these doses. It is not known if higher doses delivered in the

vitreal could trigger visual dysfunction such as optic neuropathies that have been described in prolonged oral administration of linezolid.²⁹

Even if numerous ocular pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) studies are conducted on rabbits because of the anatomic characteristics of the rabbit eye (i.e., globe size and aqueous humor turnover rate comparable to those of human eyes) caution must be taken before extrapolating these results to humans. One of the limitations of this study is the repeated punctures of the eyeball that could result in relative dilution of the antibiotic in the newly secreted aqueous humor and a breach in the blood ocular barrier. However, the same procedure was performed in the vancomycin group, and it is likely that dilution occurred in the same proportion in both groups. To predict more accurately the parameter predictive of antibacterial efficacy, the relationship of the 24-h ocular concentrations to the intensity of the antimicrobial effect should be explored in a dedicated study. These results emphasize the diversity of factors involved in antibacterial activity *in vivo* and stress the importance of animal models in complement to the *in vitro* spectrum of the antibiotic.

CONCLUSIONS

In conclusion this study demonstrates the first evidence of the effectiveness of linezolid for the treatment of experimental staphylococcal endophthalmitis. High intravitreal levels are needed to ensure an acceptable bactericidal effect.

None of the authors has financial interest in this work.

Transparency section: nothing to declare.

LEGENDS:

Table 1. Animals and treatment regimens. Three different dosages of linezolid were given (group 1 to 3). The standard treatment made of 1mg of vancomycin was given in group 4. Two control groups were also studied.

Table 2. The inflammation was graded in the following ocular structures: cornea, anterior chamber, vitreous and retina of each studied eye. A score from 0 (normal) to 3 points (severely damaged) was attributed for each structures. The histological ocular score^{16 17}, expressed in points (from 0 to 12), corresponded to the sum of the damage scores of each of the ocular structures.

Table 3. Key pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) parameters from the three linezolid groups.

Figure 1. (A) Clinical scores corresponding to the Nussenblatt score just before the treatment (Day 1), and at different time points after the treatment (Day 3, 5, 8). Values are means \pm SD. Asterisk corresponds to a p value lower than 0.05 considered as significant, one-way Analysis of Variance (ANOVA). (B) At day 5, LZD 1 and the BSS+ groups displayed the highest clinical scores traducing the highest damages of ocular structures. LZD 30 displayed the lower clinical scores at all endpoints and the difference was significantly different with the BSS+ group ($p \leq 0.05$, one-way ANOVA, with multiple comparison test).

Figure 2. (A) Mean bacterial counts in the vitreous expressed in log₁₀ CFU/mL, in control and treated eyes. Values are means \pm SD. Asterisk corresponds to $p \leq 0.05$, one-way Analysis of Variance (ANOVA). (B) The multiple comparison test showed a significant decrease in bacterial counts at day 5 and 8, in the LZD 30 and V1 groups in comparison with the LZD1 and BSS+ groups ($p < 0.05$).

Figure 3. Percentage of eyes with viable bacteria from the vitreal taps at the different

time points. LZD 10 sterilized half of the eyes at day 5 but a bacterial regrowth occurred in 2 eyeballs. LZD sterilized all eyes at day 5. At day 8 one regrowth was noticed in both the LZD 30 and the V1 groups.

Figure 4. Histological scores expressed in points. LZD 30 displayed the most conserved ocular anatomical features.

Figure 5. Optic microscopy pictures of haematoxylin-eosin stained rabbit retina slides (x 10 and x 40). The corresponding treatment groups are enclosed in brackets) (A) Normal aspect of the retina with an empty vitreous (BSS-). (B) Partially infiltrated and necrotic retina but some layers are seen (cross) (LZD 10). (C) Totally infiltrated and necrotic retina without any intact retinal layer and with a vitreous filled with inflammatory cells (LZD 1). (D) Some isolated inflammatory cells are visible in the vitreous (LZD 30). (E) Basophilic focal abscesses are found in the vitreous (asterisk) (BSS+). (F) Vitreous Completely filled with infiltrate (LZD 1). (G) Normal aspect of the cornea (BSS-). (H) Cornea partially infiltrated with inflammatory cells (LZD 10). (I) Anterior chamber completely filled with fibrin, some inflammatory cells are present (LZD 1). Intravitreal administration of 1 mg, 10 mg and 30 mg of LZD (LZD 1, LZD 10, LZD 30, respectively). Administration of the treatment of reference made of 1 mg of vancomycin (V1). Positive control group (BSS+) and negative control group (BSS-).

REFERENCES

1. Han DP, Wisniewski SR, Wilson LA et al. Spectrum and susceptibilities of microbiologic isolates in the Endophthalmitis Vitrectomy Study. *Am J Ophthalmol* 1996; **122**: 1-17.
2. Hanscom TA. Postoperative endophthalmitis. *Clin Infect Dis* 2004; **38**: 542-6.
3. Aaberg TM, Jr., Flynn HW, Jr., Schiffman J et al. Nosocomial acute-onset postoperative endophthalmitis survey. A 10-year review of incidence and outcomes. *Ophthalmology* 1998; **105**: 1004-10.
4. Results of the Endophthalmitis Vitrectomy Study. A randomized trial of immediate vitrectomy and of intravenous antibiotics for the treatment of postoperative bacterial endophthalmitis. Endophthalmitis Vitrectomy Study Group. *Arch Ophthalmol* 1995; **113**: 1479-96.

5. Sakoulas G, Moellering RC, Jr. Increasing antibiotic resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Clin Infect Dis* 2008; **46 Suppl 5**: S360-7.
6. Miller D, Flynn PM, Scott IU et al. In vitro fluoroquinolone resistance in staphylococcal endophthalmitis isolates. *Arch Ophthalmol* 2006; **124**: 479-83.
7. Soriano F, Perez-Trallero E, Pallares R et al. *Streptococcus pneumoniae* endophthalmitis: a study of 36 cases with special reference to antibiotic resistance and treatment options. *Clin Microbiol Infect* 2006; **12**: 519-26.
8. Wunderink RG, Rello J, Cammarata SK et al. Linezolid vs vancomycin: analysis of two double-blind studies of patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial pneumonia. *Chest* 2003; **124**: 1789-97.
9. Diekema DJ, Jones RN. Oxazolidinone antibiotics. *Lancet* 2001; **358**: 1975-82.
10. Fiscella RG, Lai WW, Buerk B et al. Aqueous and vitreous penetration of linezolid (Zyvox) after oral administration. *Ophthalmology* 2004; **111**: 1191-5.
11. George JM, Fiscella R, Blair M et al. Aqueous and vitreous penetration of linezolid and levofloxacin after oral administration. *J Ocul Pharmacol Ther*; **26**: 579-86.
12. Prydal JI, Jenkins DR, Lovering A et al. The pharmacokinetics of linezolid in the non-inflamed human eye. *Br J Ophthalmol* 2005; **89**: 1418-9.
13. Horcajada JP, Atienza R, Sarasa M et al. Pharmacokinetics of linezolid in human non-inflamed vitreous after systemic administration. *J Antimicrob Chemother* 2009; **63**: 550-2.
14. Saleh M, Jehl F, Dory A et al. Ocular penetration of topically applied linezolid in a rabbit model. *J Cataract Refract Surg* 2010; **36**: 488-92.
15. Nussenblatt RB, Palestine AG, Chan CC et al. Standardization of vitreal inflammatory activity in intermediate and posterior uveitis. *Ophthalmology* 1985; **92**: 467-71.
16. Park SS, Samiy N, Ruoff K et al. Effect of intravitreal dexamethasone in treatment of pneumococcal endophthalmitis in rabbits. *Arch Ophthalmol* 1995; **113**: 1324-9.
17. Peyman GA, Paque JT, Meisels HI et al. Postoperative endophthalmitis: a comparison of methods for treatment and prophylaxis with gentamicin. *Ophthalmic Surg* 1975; **6**: 45-55.
18. Saleh M, Bourcier T, Prevost G et al. High-performance liquid chromatographic assay to measure linezolid antibiotic in eye tissues. *Trends in Chromatography* 2008; **4**: 107-12.
19. Jones RN, Fritsche TR, Sader HS et al. Zyvox Annual Appraisal of Potency and Spectrum Program Results for 2006: an activity and spectrum analysis of linezolid using clinical isolates from 16 countries. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; **59**: 199-209.
20. Ross JE, Farrell DJ, Mendes RE et al. Eight-year (2002-2009) Summary of the Linezolid (Zyvox(R) Annual Appraisal of Potency and Spectrum; ZAAPS) Program in European Countries. *J Chemother*; **23**: 71-6.
21. Harper T, Miller D, Flynn HW, Jr. In vitro efficacy and pharmacodynamic indices for antibiotics against coagulase-negative staphylococcus endophthalmitis isolates. *Ophthalmology* 2007; **114**: 871-5.
22. Buchanan LV, Dailey CF, LeMay RJ et al. Time-dependent antibacterial effects of linezolid in experimental rabbit endocarditis. *J Antimicrob Chemother* 2002; **50**: 440-2.
23. Park SS, Vallar RV, Hong CH et al. Intravitreal dexamethasone effect on intravitreal vancomycin elimination in endophthalmitis. *Arch Ophthalmol* 1999; **117**: 1058-62.
24. Kane A, Barza M, Baum J. Intravitreal injection of gentamicin in rabbits. Effect of inflammation and pigmentation on half-life and ocular distribution. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981; **20**: 593-7.
25. Coco RM, Lopez MI, Pastor JC et al. Pharmacokinetics of intravitreal vancomycin in normal and infected rabbit eyes. *J Ocul Pharmacol Ther* 1998; **14**: 555-63.

- 26.Strukova EN, Smirnova MV, Vostrov SN et al. Linezolid pharmacodynamics with Staphylococcus aureus in an in vitro dynamic model. *Int J Antimicrob Agents* 2009; **33**: 251-4.
27. Andes D, van Ogtrop ML, Peng J et al. In vivo pharmacodynamics of a new oxazolidinone (linezolid). *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**: 3484-9.
- 28.Duke SL, Kump LI, Yuan Y et al. The safety of intraocular linezolid in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; **51**: 3115-9.
- 29.Frippiat F, Bergiers C, Michel C et al. Severe bilateral optic neuritis associated with prolonged linezolid therapy. *J Antimicrob Chemother* 2004; **53**: 1114-5.

Group	Animals (n)	Intravitreal Injection (100µL)
LZD 1	8	1 mg of linezolid
LZD 10	8	10 mg of linezolid
LZD 30	8	30 mg of linezolid
V 1	8	1 mg of vancomycin
Control + (BSS+)	4	Infected, treated with balanced salt solution
Control - (BSS-)	4	Non infected, treated with balanced salt solution

Table1. Animals and treatment regimens. Three different dosages of linezolid were given (group 1 to 3). The standard treatment made of 1mg of vancomycin was given in group 4. Two control groups were also studied.

Grade of damages in points	Histological parameters			
	Cornea	Anterior chamber	Vitreous	Retina
0	No infiltration of inflammatory cells	Normal	No inflammation	Normal
1	Partial-thickness infiltration of inflammatory cells	Partially filled with fibrin, no inflammatory cells	Inflammatory cells visible, no focal abscesses	Partially infiltrated and necrotic, some normal retina visible
2	Segmental full-thickness infiltration of inflammatory cells	Partially filled with fibrin, and inflammatory cells	Partially filled with abscesses and infiltrate	Totally infiltrated and partially necrotic, no normal retina
3	Total full-thickness infiltration of inflammatory cells	Completely filled with fibrin, and inflammatory cells	Completely filled with infiltrate	Totally necrotic, no retina layer intact

Table2. The inflammation was graded in the following ocular structures: cornea, anterior chamber, vitreous and retina of each studied eye. A score from 0 (normal) to 3 points (severely damaged) was attributed for each structures. The histological ocular score ^{16 17}, expressed in points (from 0 to 12), corresponded to the sum of the damage scores of each of the ocular structures.

Injected dose of LZD	1 mg	10 mg	30 mg
C _{max} (mg/L) :	666.6	6700.6	20003
C _{24h} (mg/L), n=4	0.1	1.1	7.2
Vitreous half-life (h)	1.89	1.91	● 2.09
t>MIC (%)	65.8	92.9	100
AUC _{24h} /MIC (mg/L.h)	3999.5	39999.6	119958

Table 3. Key pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) parameters from the three linezolid groups. Mean Vitreous volume of 1.5±0.3 cc.

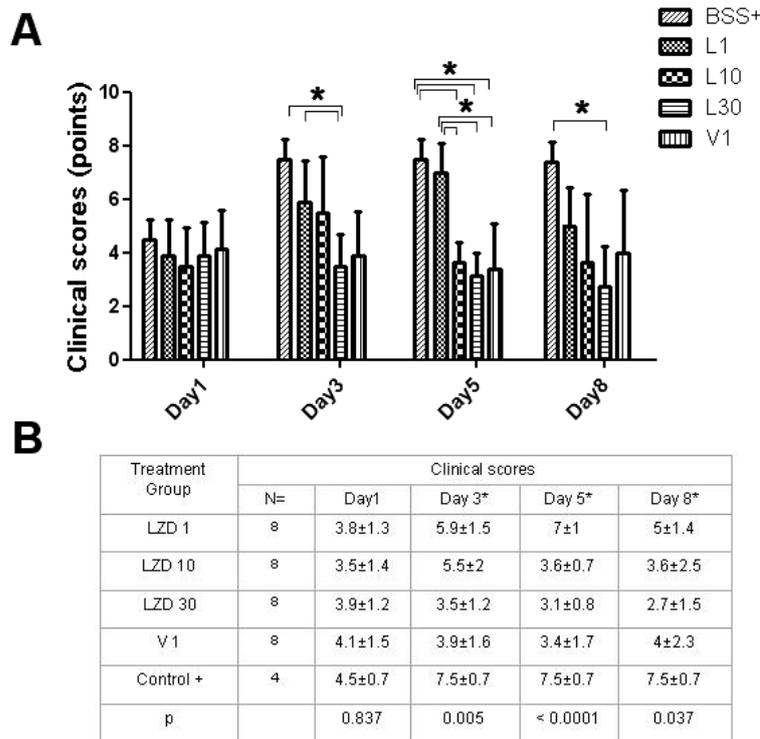


Figure1. (A) Clinical scores corresponding to the Nussenblatt score just before the treatment (Day 1), and at different time points after the treatment (Day 3, 5, 8). Values are means \pm SD. Asterisk corresponds to a p value lower than 0.05 considered as significant, one-way Analysis of Variance (ANOVA). (B) At day 5, LZD 1 and the BSS+ groups displayed the highest clinical scores traducing the highest damages of ocular structures. LZD 30 displayed the lower clinical scores at all endpoints and the difference was significantly different with the BSS+ group ($p \leq 0.05$, one-way ANOVA, with multiple comparison test).

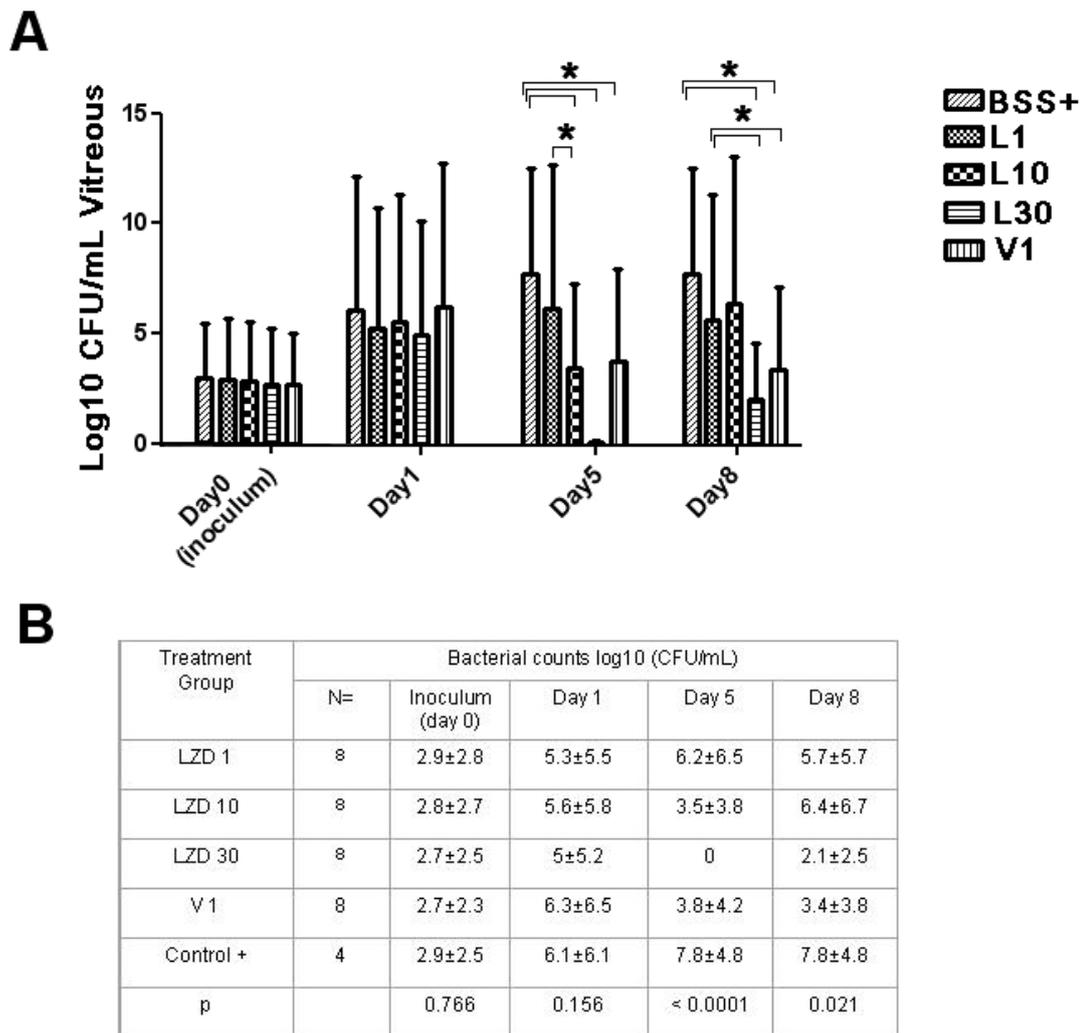


Figure 2. (A) Mean bacterial counts in the vitreous expressed in log₁₀ CFU/mL, in control and treated eyes. Values are means ±SD. Asterisk corresponds to $p \leq 0.05$, one-way Analysis of Variance (ANOVA). (B) The multiple comparison test showed a significant decrease in bacterial counts at day 5 and 8, in the LZD 30 and V1 groups in comparison with the LZD1 and BSS+ groups ($p < 0.05$).

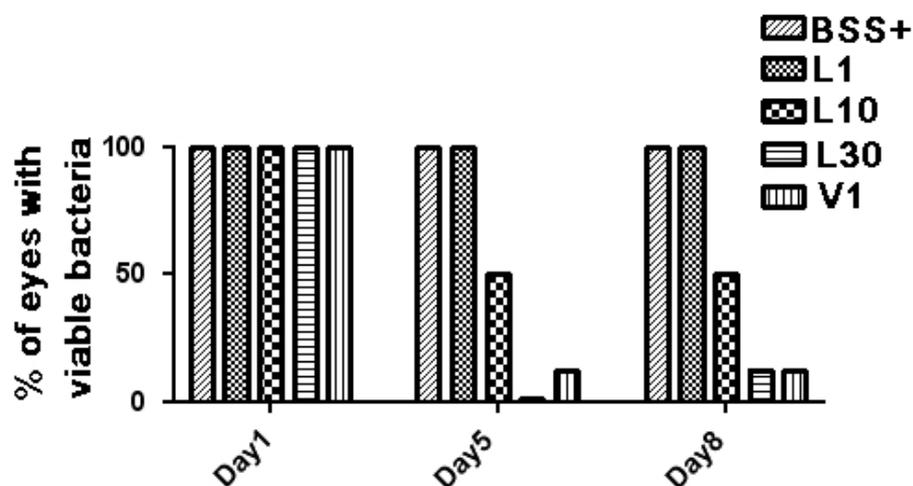


Figure 3. Percentage of eyes with viable bacteria from the vitreal taps at the different time points. LZD 10 sterilized half of the eyes at day 5 but a bacterial regrowth occurred in 2 eyeballs. LZD sterilized all eyes at day 5. At day 8 one regrowth was noticed in both the LZD 30 and the V1 groups.

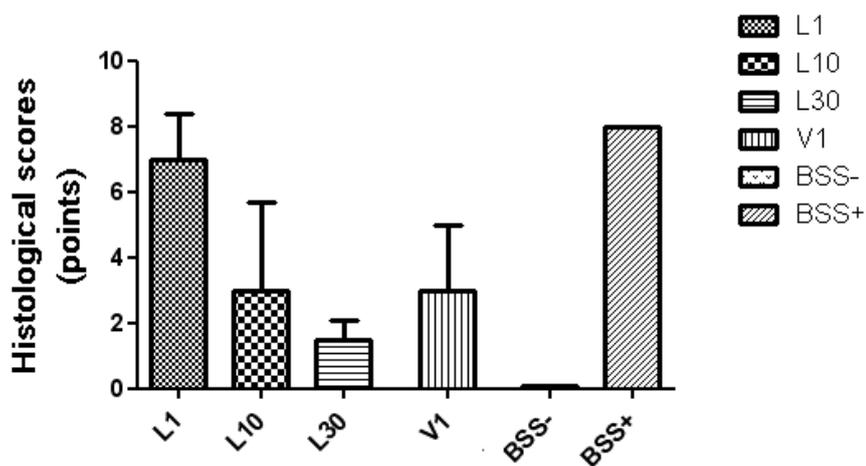


Figure 4. Histological scores expressed in points. LZD 30 displayed the most conserved ocular anatomical features.

Conclusions et perspectives

D'un point de vue thérapeutique, le linézolide semblait représenter une alternative prometteuse dans le traitement des endophtalmies bactériennes aiguës à bactéries sensibles : son activité *in vitro* est remarquable sur les bactéries à Gram positif, et la pénétration oculaire après administration orale est bonne, faisant espérer, à terme, la possibilité de se passer de la voie intravitréenne, inconfortable pour le patient. Il est apparu dans notre modèle expérimental que seules des concentrations élevées, atteignables uniquement par injection intravitréenne, pouvaient stériliser les yeux infectés par du staphylocoque doré résistant à la méticilline. Ces concentrations de linézolide nécessaires pour obtenir une efficacité anatomo-clinique satisfaisante, se sont avérées être plus élevées que celles prédites par les différents paramètres pharmacodynamiques sériques. Ces résultats soulèvent plusieurs interrogations portant sur la toxicité éventuelle des doses requises sur la fonction visuelle, de même que sur la pertinence du recours aux paramètres de PK/PD sériques pour prédire l'efficacité d'un antibiotique au niveau oculaire, ou encore sur l'importance de prendre en compte l'état d'inflammation oculaire dans l'analyse PK/PD au niveau de l'œil infecté. La détermination de la $\frac{1}{2}$ vie du linézolide dans le vitré infecté, qui s'est avérée être très courte par rapport à celle de la vancomycine, est une illustration de l'importance de ces phénomènes inflammatoires associés à l'endophtalmie. Ces résultats rappellent la nécessité de mener un travail de validation *in vivo* de tout nouvel antibiotique avant son introduction en pratique clinique.

Enfin, il ressort de ce modèle expérimental que le traitement de l'endophtalmie bactérienne aiguë ne saurait reposer sur le seul traitement antibiotique, aussi efficace soit-il, mais sur une combinaison de traitements associant une bactéricidie

efficace et rapide d'un coté, et lutte contre les phénomènes inflammatoires associés de l'autre. Des investigations supplémentaires seront à mener pour évaluer l'apport éventuel de traitements existants (exemple des études sur la daptomycine ou sur l'adjonction de corticoïdes) et pour développer des traitements innovants qui agiraient en amont de la cascade inflammatoire (exemple de l'adjonction intravitréenne d'anticorps spécifiquement dirigés contre certaines toxines bactériennes). [101]

Bibliographie

- [1] Wykoff CC, Parrott MB, Flynn HW, Jr., Shi W, Miller D, Alfonso EC. Nosocomial acute-onset postoperative endophthalmitis at a university teaching hospital (2002-2009). *Am J Ophthalmol* 2010 Sep;150(3):392-8 e2.
- [2] Wejde G, Montan P, Lundstrom M, Stenevi U, Thorburn W. Endophthalmitis following cataract surgery in Sweden: national prospective survey 1999-2001. *Acta Ophthalmol Scand* 2005 Feb;83(1):7-10.
- [3] Chiquet C. PCR in acute bacterial endophthalmitis. *Acta Ophthalmol Scand* 2011 sept 2011;89 (Issue supplement s 246):0.
- [4] EVS. Results of the Endophthalmitis Vitrectomy Study. A randomized trial of immediate vitrectomy and of intravenous antibiotics for the treatment of postoperative bacterial endophthalmitis. Endophthalmitis Vitrectomy Study Group. *Arch Ophthalmol* 1995 Dec;113(12):1479-96.
- [5] Asbell PA, Colby KA, Deng S, McDonnell P, Meisler DM, Raizman MB, et al. Ocular TRUST: nationwide antimicrobial susceptibility patterns in ocular isolates. *Am J Ophthalmol* 2008 Jun;145(6):951-8.

-
- [6] Engelbert M, Mino de Kaspar H, Thiel M, Grasbon T, Ta CN, Schulze-Schwering M, et al. Intravitreal vancomycin and amikacin versus intravenous imipenem in the treatment of experimental *Staphylococcus aureus* endophthalmitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2004 Apr;242(4):313-20.
- [7] Miller D, Flynn PM, Scott IU, Alfonso EC, Flynn HW, Jr. In vitro fluoroquinolone resistance in staphylococcal endophthalmitis isolates. *Arch Ophthalmol* 2006 Apr;124(4):479-83.
- [8] Betanzos-Cabrera G, Juarez-Verdayes MA, Gonzalez-Gonzalez G, Cancino-Diaz ME, Cancino-Diaz JC. Gatifloxacin, moxifloxacin, and balofloxacin resistance due to mutations in the *gyrA* and *parC* genes of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from patients with endophthalmitis, corneal ulcers and conjunctivitis. *Ophthalmic Res* 2009;42(1):43-8.
- [9] Liu C, Chambers HF. *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin: epidemiology, clinical significance, and critical assessment of diagnostic methods. *Antimicrob Agents Chemother* 2003 Oct;47(10):3040-5.
- [10] Raad, II, Hanna HA, Hachem RY, Dvorak T, Arbuckle RB, Chaiban G, et al. Clinical-use-associated decrease in susceptibility of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* to linezolid: a comparison with quinupristin-dalfopristin. *Antimicrob Agents Chemother* 2004 Sep;48(9):3583-5.
- [11] Ballow CH, Jones RN, Biedenbach DJ. A multicenter evaluation of linezolid antimicrobial activity in North America. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002 May;43(1):75-83.
- [12] Archuleta S, Murphy B, Keller MJ. Successful treatment of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* endocarditis with linezolid in a renal transplant

recipient with human immunodeficiency virus infection. *Transpl Infect Dis* 2004 Sep;6(3):117-9.

[13] Stefani S, Mezzatesta ML, Tempera G, Debra E, Schito AM, Nicoletti G, et al. Comparative activity of linezolid against staphylococci and enterococci isolated in Italy. *Clin Microbiol Infect* 2002 Jun;8(6):368-72.

[14] Davson H, Quilliam JP. The effects of nitrogen mustard on the permeability of the blood-aqueous barrier Evans blue: An instance of the influence of a lesion in one eye on the susceptibility of the other. *Br J Ophthalmol* 1947 Dec;31(12):717-21.

[15] Dernouchamps JP, Heremans JF. Molecular sieve effect of the blood-aqueous barrier. *Exp Eye Res* 1975 Sep;21(3):289-97.

[16] Dernouchamps JP, Michiels J. Molecular sieve properties of the blood-aqueous barrier in uveitis. *Exp Eye Res* 1977 Jul;25(1):25-31.

[17] Peyman GA, Bok D. Peroxidase diffusion in the normal and laser-coagulated primate retina. *Invest Ophthalmol* 1972 Jan;11(1):35-45.

[18] Risau W. Induction of blood-brain barrier endothelial cell differentiation. *Ann N Y Acad Sci* 1991;633:405-19.

[19] Bunt-Milam AH, Saari JC, Klock IB, Garwin GG. Zonulae adherentes pore size in the external limiting membrane of the rabbit retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985 Oct;26(10):1377-80.

[20] Barza M, Kane A, Baum J. Pharmacokinetics of intravitreal carbenicillin, cefazolin, and gentamicin in rhesus monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983 Dec;24(12):1602-6.

[21] Peyman GA. *Endophthalmitis: Diagnosis and management*. London; 2004.

[22] Antonetti DA, Barber AJ, Hollinger LA, Wolpert EB, Gardner TW. Vascular endothelial growth factor induces rapid phosphorylation of tight junction proteins

occludin and zonula occludens 1. A potential mechanism for vascular permeability in diabetic retinopathy and tumors. *J Biol Chem* 1999 Aug 13;274(33):23463-7.

[23] Antonetti DA, Wolpert EB, DeMaio L, Harhaj NS, Scaduto RC, Jr. Hydrocortisone decreases retinal endothelial cell water and solute flux coincident with increased content and decreased phosphorylation of occludin. *J Neurochem* 2002 Feb;80(4):667-77.

[24] Robert PY, Tassy A. [Bioavailability of antibiotics]. *J Fr Ophtalmol* 2000 May;23(5):510-3; quiz 23.

[25] Raizman MB, Rubin JM, Graves AL, Rinehart M. Tear concentrations of levofloxacin following topical administration of a single dose of 0.5% levofloxacin ophthalmic solution in healthy volunteers. *Clin Ther* 2002 Sep;24(9):1439-50.

[26] Tabbara KF, al-Kharashi SA, al-Mansouri SM, al-Omar OM, Cooper H, el-Asrar AM, et al. Ocular levels of azithromycin. *Arch Ophthalmol* 1998 Dec;116(12):1625-8.

[27] Lehr CM, Lee YH, Lee VH. Improved ocular penetration of gentamicin by mucoadhesive polymer polycarbophil in the pigmented rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994 May;35(6):2809-14.

[28] Jenkins CD, Tuft SJ, Sheridah G, McHugh DA, Buckley RJ. Comparative intraocular penetration of topical and injected cefuroxime. *Br J Ophthalmol* 1996 Aug;80(8):685-8.

[29] Abraham RK, Burnett HH. Tetracycline and chloramphenicol studies on rabbit and human eyes. *AMA Arch Ophthalmol* 1955 Nov;54(5):641-59.

[30] Feldman MF, Moses RA. Corneal penetration of rifampin. *Am J Ophthalmol* 1977 Jun;83(6):862-5.

-
- [31] Alster Y, Herlin L, Lazar M, Loewenstein A. Intraocular penetration of vancomycin eye drops after application to the medial canthus with closed lids. *Br J Ophthalmol* 2000 Mar;84(3):300-2.
- [32] Sakamoto H, Sakamoto M, Hata Y, Kubota T, Ishibashi T. Aqueous and vitreous penetration of levofloxacin after topical and/or oral administration. *Eur J Ophthalmol* 2007 May-Jun;17(3):372-6.
- [33] Fukuda M, Hanazome I, Sasaki K. The intraocular dynamics of vancomycin hydrochloride ophthalmic ointment (TN-011) in rabbits. *J Infect Chemother* 2003 Mar;9(1):93-6.
- [34] Behrens-Baumann W, Martell J. Ciprofloxacin concentration in the rabbit aqueous humor and vitreous following intravenous and subconjunctival administration. *Infection* 1988;16(1):54-7.
- [35] Naib K, Hallett JW, Leopold IH. Observations on the ocular effects of erythromycin. *Am J Ophthalmol* 1955 Mar;39(3):395-9.
- [36] Golden B, Coppel SP. Ocular tissue absorption of gentamicin. *Arch Ophthalmol* 1970 Dec;84(6):792-6.
- [37] Kahan IL, Papai I, Hammer H. Intraocular penetration of tri-tetracyclines after parenteral and subconjunctival administration. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* 1974 May 17;190(3):257-65.
- [38] Souli M, Kopsinis G, Kavouklis E, Gabriel L, Giamarellou H. Vancomycin levels in human aqueous humour after intravenous and subconjunctival administration. *Int J Antimicrob Agents* 2001 Sep;18(3):239-43.
- [39] Kasbeer RT, Peyman GA, May DR, Homer PI. Penetration of amikacin into the aphakic eye. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* 1975 Aug 4;196(1):85-94.

-
- [40] Barza M, Doft B, Lynch E. Ocular penetration of ceftriaxone, ceftazidime, and vancomycin after subconjunctival injection in humans. *Arch Ophthalmol* 1993 Apr;111(4):492-4.
- [41] Herbert EN, Pearce IA, McGalliard J, Wong D, Groenewald C. Vitreous penetration of levofloxacin in the uninflamed phakic human eye. *Br J Ophthalmol* 2002 Apr;86(4):387-9.
- [42] O'Day DM, Head WS, Foulds G, Robinson RD, Williams TE, Ferraina RA. Ocular pharmacokinetics of orally administered azithromycin in rabbits. *J Ocul Pharmacol* 1994 Winter;10(4):633-41.
- [43] Kulshrestha OP, Kurian, Keshwan HH. Penetration of doxycycline in aqueous humour. (After oral administration in humans). *Indian J Ophthalmol* 1981 Oct;29(3):251-2.
- [44] Wong KW, D'Amico DJ, Oum BS, Baker PA, Kenyon KR. Intraocular penetration of rifampin after oral administration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1990;228(1):40-3.
- [45] Fiscella RG, Nguyen TK, Cwik MJ, Phillpotts BA, Friedlander SM, Alter DC, et al. Aqueous and vitreous penetration of levofloxacin after oral administration. *Ophthalmology* 1999 Dec;106(12):2286-90.
- [46] Gilmour MA, Clarke CR, Macallister CG, Dedeo JM, Caudell DL, Morton RJ, et al. Ocular penetration of oral doxycycline in the horse. *Vet Ophthalmol* 2005 Sep-Oct;8(5):331-5.
- [47] George JM, Fiscella R, Blair M, Rodvold K, Ulanski L, Stokes J, et al. Aqueous and vitreous penetration of linezolid and levofloxacin after oral administration. *J Ocul Pharmacol Ther* 2010 Dec;26(6):579-86.

-
- [48] Barrera V, Sinues B, Martinez P, Buatas A, Pinero A. [Penetration of amikacin into the anterior chamber of the human eye]. *Therapie* 1985 Mar-Apr;40(2):135-7.
- [49] Salminen L. Penetration of ocular compartments by tetracyclines. II. An experimental study with doxycycline. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* 1977 Nov 25;204(3):201-7.
- [50] el-Massry A, Meredith TA, Aguilar HE, Shaarawy A, Kincaid M, Dick J, et al. Aminoglycoside levels in the rabbit vitreous cavity after intravenous administration. *Am J Ophthalmol* 1996 Nov;122(5):684-9.
- [51] Aguilar HE, Meredith TA, Shaarawy A, Kincaid M, Dick J. Vitreous cavity penetration of ceftazidime after intravenous administration. *Retina* 1995;15(2):154-9.
- [52] Ferencz JR, Assia EI, Diamantstein L, Rubinstein E. Vancomycin concentration in the vitreous after intravenous and intravitreal administration for postoperative endophthalmitis. *Arch Ophthalmol* 1999 Aug;117(8):1023-7.
- [53] Pflugfelder SC, Hernandez E, Fliesler SJ, Alvarez J, Pflugfelder ME, Forster RK. Intravitreal vancomycin. Retinal toxicity, clearance, and interaction with gentamicin. *Arch Ophthalmol* 1987 Jun;105(6):831-7.
- [54] Peyman GA. *Endophthalmitis: Diagnosis and management*. London; 2004.
- [55] Ficker L, Meredith TA, Gardner S, Wilson LA. Cefazolin levels after intravitreal injection. Effects of inflammation and surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990 Mar 1;31(3):502-5.
- [56] Kane A, Barza M, Baum J. Intravitreal injection of gentamicin in rabbits. Effect of inflammation and pigmentation on half-life and ocular distribution. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981 May;20(5):593-7.

-
- [57] Scherz W, Doane MG, Dohlman CH. Tear volume in normal eyes and keratoconjunctivitis sicca. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* 1974;192(2):141-50.
- [58] Xu KP, Tsubota K. Correlation of tear clearance rate and fluorophotometric assessment of tear turnover. *Br J Ophthalmol* 1995 Nov;79(11):1042-5.
- [59] Woodward DF, Krauss AH, Nilsson SF. Bimatoprost effects on aqueous humor dynamics in monkeys. *J Ophthalmol* 2010;2010:926192.
- [60] Bertazolli Filho R, Laicine EM, Haddad A. Biochemical studies on the secretion of glycoproteins by isolated ciliary body of rabbits. *Acta Ophthalmol Scand* 1996 Aug;74(4):343-7.
- [61] Craig WA, Redington J, Ebert SC. Pharmacodynamics of amikacin in vitro and in mouse thigh and lung infections. *J Antimicrob Chemother* 1991 May;27 Suppl C:29-40.
- [62] 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 Jan;155(1):93-9.
- [63] Barry P, Seal DV, Gettinby G, Lees F, Peterson M, Revie CW. ESCRS study of prophylaxis of postoperative endophthalmitis after cataract surgery: Preliminary report of principal results from a European multicenter study. *J Cataract Refract Surg* 2006 Mar;32(3):407-10.
- [64] Essex RW, Yi Q, Charles PG, Allen PJ. Post-traumatic endophthalmitis. *Ophthalmology* 2004 Nov;111(11):2015-22.
- [65] Allen HF. Postoperative endophthalmitis. Introduction: incidence and etiology. *Ophthalmology* 1978 Apr;85(4):317-9.

-
- [66] Bannerman TL, Rhoden DL, McAllister SK, Miller JM, Wilson LA. The source of coagulase-negative staphylococci in the Endophthalmitis Vitrectomy Study. A comparison of eyelid and intraocular isolates using pulsed-field gel electrophoresis. *Arch Ophthalmol* 1997 Mar;115(3):357-61.
- [67] Speaker MG, Milch FA, Shah MK, Eisner W, Kreiswirth BN. Role of external bacterial flora in the pathogenesis of acute postoperative endophthalmitis. *Ophthalmology* 1991 May;98(5):639-49; discussion 50.
- [68] Aldave AJ, Stein JD, Deramo VA, Shah GK, Fischer DH, Maguire JL. Treatment strategies for postoperative *Propionibacterium acnes* endophthalmitis. *Ophthalmology* 1999 Dec;106(12):2395-401.
- [69] Lai JY, Chen KH, Lin YC, Hsu WM, Lee SM. *Propionibacterium acnes* DNA from an explanted intraocular lens detected by polymerase chain reaction in a case of chronic pseudophakic endophthalmitis. *J Cataract Refract Surg* 2006 Mar;32(3):522-5.
- [70] Ormerod LD, Ho DD, Becker LE, Cruise RJ, Grohar HI, Paton BG, et al. Endophthalmitis caused by the coagulase-negative staphylococci. 1. Disease spectrum and outcome. *Ophthalmology* 1993 May;100(5):715-23.
- [71] Ferrer C, Ruiz-Moreno JM, Rodriguez A, Montero J, Alio JL. Postoperative *Corynebacterium macginleyi* endophthalmitis. *J Cataract Refract Surg* 2004 Nov;30(11):2441-4.
- [72] Okada AA, Johnson RP, Liles WC, D'Amico DJ, Baker AS. Endogenous bacterial endophthalmitis. Report of a ten-year retrospective study. *Ophthalmology* 1994 May;101(5):832-8.
- [73] Greenwald MJ, Wohl LG, Sell CH. Metastatic bacterial endophthalmitis: a contemporary reappraisal. *Surv Ophthalmol* 1986 Sep-Oct;31(2):81-101.

-
- [74] von Eiff C, Peters G. Comparative in-vitro activities of moxifloxacin, trovafloxacin, quinupristin/dalfopristin and linezolid against staphylococci. *J Antimicrob Chemother* 1999 Apr;43(4):569-73.
- [75] Miller D, Alfonso E, Diaz M, Perez E. Reduced Glycopeptide and Mupirocin Susceptibility Among Ocular Staphylococci. ARVO. Fort Lauderdale; 2008.
- [76] Aoki H, Ke L, Poppe SM, Poel TJ, Weaver EA, Gadwood RC, et al. Oxazolidinone antibiotics target the P site on Escherichia coli ribosomes. *Antimicrob Agents Chemother* 2002 Apr;46(4):1080-5.
- [77] Swaney SM, Aoki H, Ganoza MC, Shinabarger DL. The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein synthesis in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1998 Dec;42(12):3251-5.
- [78] Goldstein EJ, Citron DM, Merriam CV, Warren YA, Tyrrell KL, Fernandez HT, et al. Comparative in vitro activities of XRP 2868, pristinamycin, quinupristin-dalfopristin, vancomycin, daptomycin, linezolid, clarithromycin, telithromycin, clindamycin, and ampicillin against anaerobic gram-positive species, actinomycetes, and lactobacilli. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 Jan;49(1):408-13.
- [79] Brauers J, Kresken M, Menke A, Orland A, Weiher H, Morrissey I. Bactericidal activity of daptomycin, vancomycin, teicoplanin and linezolid against *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* using human peak free serum drug concentrations. *Int J Antimicrob Agents* 2007 Mar;29(3):322-5.
- [80] Bernardo K, Pakulat N, Fleer S, Schnaith A, Utermohlen O, Krut O, et al. Subinhibitory concentrations of linezolid reduce *Staphylococcus aureus* virulence factor expression. *Antimicrob Agents Chemother* 2004 Feb;48(2):546-55.
- [81] LaPlante KL, Rybak MJ. Impact of high-inoculum *Staphylococcus aureus* on the activities of nafcillin, vancomycin, linezolid, and daptomycin, alone and in

combination with gentamicin, in an in vitro pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother* 2004 Dec;48(12):4665-72.

[82] Mutnick AH, Biedenbach DJ, Turnidge JD, Jones RN. Spectrum and potency evaluation of a new oxazolidinone, linezolid: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1998-2000. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002 May;43(1):65-73.

[83] Wilson P, Andrews JA, Charlesworth R, Walesby R, Singer M, Farrell DJ, et al. Linezolid resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2003 Jan;51(1):186-8.

[84] Jones RN, Fritsche TR, Sader HS, Ross JE. Zyvox Annual Appraisal of Potency and Spectrum Program Results for 2006: an activity and spectrum analysis of linezolid using clinical isolates from 16 countries. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007 Oct;59(2):199-209.

[85] Schumacher A, Trittler R, Bohnert JA, Kummerer K, Pages JM, Kern WV. Intracellular accumulation of linezolid in *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* and *Enterobacter aerogenes*: role of enhanced efflux pump activity and inactivation. *J Antimicrob Chemother* 2007 Jun;59(6):1261-4.

[86] Kelly S, Collins J, Maguire M, Gowing C, Flanagan M, Donnelly M, et al. An outbreak of colonization with linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* in an intensive therapy unit. *J Antimicrob Chemother* 2008 Apr;61(4):901-7.

[87] Seral C, Saenz Y, Algarate S, Duran E, Luque P, Torres C, et al. Nosocomial outbreak of methicillin- and linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* associated with catheter-related infections in intensive care unit patients. *Int J Med Microbiol* 2011 Apr;301(4):354-8.

-
- [88] Garrabou G, Soriano A, Lopez S, Guallar JP, Giralt M, Villarroya F, et al. Reversible inhibition of mitochondrial protein synthesis during linezolid-related hyperlactatemia. *Antimicrob Agents Chemother* 2007 Mar;51(3):962-7.
- [89] McKee EE, Ferguson M, Bentley AT, Marks TA. Inhibition of mammalian mitochondrial protein synthesis by oxazolidinones. *Antimicrob Agents Chemother* 2006 Jun;50(6):2042-9.
- [90] Duewelhenke N, Krut O, Eysel P. Influence on mitochondria and cytotoxicity of different antibiotics administered in high concentrations on primary human osteoblasts and cell lines. *Antimicrob Agents Chemother* 2007 Jan;51(1):54-63.
- [91] Nagiec EE, Wu L, Swaney SM, Chosay JG, Ross DE, Brieland JK, et al. Oxazolidinones inhibit cellular proliferation via inhibition of mitochondrial protein synthesis. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 Sep;49(9):3896-902.
- [92] Soriano A, Miro O, Mensa J. Mitochondrial toxicity associated with linezolid. *N Engl J Med* 2005 Nov 24;353(21):2305-6.
- [93] Vazquez EG, Mensa J, Lopez Y, Couchard PD, Soy D, Fontenla JR, et al. Penetration of linezolid into the anterior chamber (aqueous humor) of the human eye after intravenous administration. *Antimicrob Agents Chemother* 2004 Feb;48(2):670-2.
- [94] Fiscella RG, Lai WW, Buerk B, Khan M, Rodvold KA, Pulido JS, et al. Aqueous and vitreous penetration of linezolid (Zyvox) after oral administration. *Ophthalmology* 2004 Jun;111(6):1191-5.
- [95] Ciulla TA, Comer GM, Peloquin C, Wheeler J. Human vitreous distribution of linezolid after a single oral dose. *Retina* 2005 Jul-Aug;25(5):619-24.

-
- [96] J.M. Joseph RGF, K.A. Rodvold, M. Blair, L. Ulanski, J. Stokes, M.J. Shapiro, N.P. Blair. Aqueous and Vitreous Penetration of Linezolid and Levofloxacin After Oral Administration. ARVO Fort Lauderdale; 2008
- [97] Stevens DL, Dotter B, Madaras-Kelly K. A review of linezolid: the first oxazolidinone antibiotic. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2004 Feb;2(1):51-9.
- [98] Park SS, Samiy N, Ruoff K, D'Amico DJ, Baker AS. Effect of intravitreal dexamethasone in treatment of pneumococcal endophthalmitis in rabbits. *Arch Ophthalmol* 1995 Oct;113(10):1324-9.
- [99] Peyman GA, Paque JT, Meisels HI, Bennett TO. Postoperative endophthalmitis: a comparison of methods for treatment and prophylaxis with gentamicin. *Ophthalmic Surg* 1975 Spring;6(1):45-55.
- [100] Park SS, Vallar RV, Hong CH, von Gunten S, Ruoff K, D'Amico DJ. Intravitreal dexamethasone effect on intravitreal vancomycin elimination in endophthalmitis. *Arch Ophthalmol* 1999 Aug;117(8):1058-62.
- [101] Laventie B, Rademaker J, Saleh M, De Boer E, Janssens E, Bourcier T, et al. Heavy Chain Only Antibodies and Tetravalent Bi-specific Antibody Neutralizing *Staphylococcus aureus* leucotoxins. *PNAS* 2011:Sous presse, août 2011.

Communications affichées

- Saleh M, Jehl F, Sauer A, Prevost G, Speeg-Schatz C, Bourcier T. High-Performance Liquid Chromatographic Assay for Linezolid in Serum and Vitreous Humor. ARVO annual meeting, Fort Lauderdale, USA. 2008.
- Bourcier T, Jehl F, Sauer A, Prevost G, Speeg-Schatz C, Saleh M. Vitreal Penetration of Linezolid After Oral Administration in Rabbits. ARVO annual meeting, Fort Lauderdale, USA. 2008.
- Lefevre S, Saleh M, Prevost G, Jehl F. Ocular penetration of linezolid. ICAAC, Boston, USA. 2010.
- Saleh M, Lefevre S, Jehl F, Prevost G, Sauer A, Speeg C, Gaucher D, Bourcier T. Intravitreal Injections Of Linezolid To Treat Experimental *S. aureus* Endophthalmitis. ARVO annual meeting, Fort Lauderdale, USA. 2011.
- Saleh M, Lefevre S, Jehl F, Subilia A, Speeg C, Bourcier T. Efficacité de l'injection intra-vitréenne du linézolide dans le traitement de l'endophtalmie expérimentale à *S. aureus*. Congrès de la société Française d'ophtalmologie, Paris. 2011.

Publications dans des revues scientifiques avec comité de lecture

- Article 1
Saleh M, Bourcier T, Prevost G, Speeg C, Jehl F. High-performance liquid chromatographic assay to measure linezolid antibiotic in eye tissues. Trends in Chromatography. 2008 ;4 :108-112.
- Article 2

Saleh M, Jehl F, Dory A, Lefevre S, Prevost G, Gaucher D, Sauer A, Speeg-Schatz C, Bourcier T. Ocular penetration of topically applied linezolid in a rabbit model. J Cataract Refract Surg. 2010 Mar;36(3):488-92.

- Article 3

Saleh M, Lefevre S, Bourcier T, Prevost G, Gaucher D, Speeg-Schatz C, Jehl F. Ocular Penetration of Linezolid After Oral Administration in Rabbits. J Ocul Pharmacol Ther After Oral Administration in Rabbits. J Ocul Pharmacol Ther. 2011 Apr 21. [Epub ahead of print]

- Article 4

Saleh M, Lefevre S, Bourcier T, Marcellin L, Prevost G, A Subilia, D Gaucher, Jehl F. Efficacy of Intravitreal administrations of linezolid in an experimental model of *S. aureus* related endophthalmitis. Soumis IOVS, août 2011.

- Autres publications auxquelles le candidat a participé

- Saleh M, Jehl F, Prevost G, Speeg-Schatz C, Bourcier T. Intérêt des corticoïdes dans la prise en charge de l'endophthalmie postopératoire aiguë bactérienne J Fr Ophtalmol. 2008 Oct;31(8):825-33.

- Laventie B, Rademaker J, Saleh M, De Boer E, Janssens E, Bourcier T, Subilia A, Marcellin L, Van Haperen R, Lebbink J, Chen T, Prévost G, Grosveld F, Drabek D. Heavy Chain Only Antibodies and Tetravalent Bi-specific Antibody Neutralizing *Staphylococcus aureus* leucotoxins. PNAS, 2011. Sous presse.

- Lefevre S, Saleh M, Marcellin L, Bourcier T, Prevost G, Jehl F. Intravitreal daptomycin in a *Staphylococcus aureus* endophthalmitis rabbit model : bactericidal effect, safety and ocular pharmacokinetics. Soumis AAC sept 2011.

- Saleh M, A Dory. Les antiseptiques en ophtalmologie. Rapport annuel des sociétés d'ophtalmologie de France 2010. Infections oculaires : Auteurs: Bodaghi B, Bron A, Bourcier T *et al.* Editeur: Edition L, Groupe CIEL.
- Jehl F, Saleh M. Pharmacocinétique intra-oculaire des antibiotiques : données expérimentales et cliniques. Rapport annuel des sociétés d'ophtalmologie de France 2010. Infections oculaires : Auteurs: Bodaghi B, Bron A, Bourcier T *et al.* Edition L, Groupe CIEL.