



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG



ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

EA 4438 – Physiopathologie et médecine translationnelle

THÈSE présentée par

Sophie LEFEVRE

soutenue le : **25 octobre 2012**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Bactériologie médicale**

ETUDE PK/PD DU LINEZOLIDE ET DE LA DAPTOMYCINE ET INTERET DE L'IRM
ASSOCIEE AUX USPIOs DANS DEUX MODELES D'INFECTIONS
EXPERIMENTALES A *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* CHEZ LE LAPIN :
ENDOPHTALMIE ET ARTHRITE AIGÜES

DIRECTEUR DE THESE :

Monsieur le Docteur JEHL François

MCU, PH, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Monsieur le Professeur Eric SENNEVILLE

PU-PH, Université de Lille II

Madame le Docteur Jocelyne CAILLON

MCU-PH, Université de Nantes

Monsieur le Docteur Yves HANSMANN

PU-PH, Université de Strasbourg

EXAMINATEURS :

Monsieur le Professeur Bernard DELBOSC

PU-PH, Université de Franche-Comté

Monsieur le Docteur Dominique LEVEQUE

PH, Université de Strasbourg

REMERCIEMENTS

A **Monsieur le Docteur François JEHL**. Tu as dirigé mon travail de recherche tout au long de cette thèse. Je tiens à te remercier pour la confiance que tu m'as témoignée et pour m'avoir appris à prendre du recul sur mes résultats afin d'atteindre une vision globale de mon travail. Je te prie de croire en ma reconnaissance et en ma respectueuse admiration.

A **Monsieur le Docteur Dominique LEVEQUE**. Je vous remercie d'avoir posé votre regard critique et expérimenté sur mon travail ces dernières années, ainsi que pour tous les conseils avisés que vous m'avez apporté. Soyez assuré de ma sincère gratitude et de mon profond respect.

A **Monsieur le Professeur HANSMANN**. Je vous remercie pour les conseils que vous m'avez apportés au cours de mon bilan à mi-parcours de thèse, ainsi que pour l'intérêt et la curiosité que vous portez à ce travail de recherche. Veuillez croire en ma sincère reconnaissance.

A **Monsieur le Professeur SENNEVILLE**. Je vous remercie d'avoir accepté de juger cette thèse et de me faire l'honneur de votre présence. Veuillez croire en l'expression de ma sincère gratitude.

A **Monsieur le Professeur DELBOSC**. Vous me faites l'honneur de votre présence. Soyez assuré, Monsieur, de ma sincère gratitude.

A **Madame le Docteur CAILLON**. Vous me faites l'honneur de votre présence. Je vous remercie d'avoir accepté de juger cette thèse, ainsi que pour votre expertise en PK/PD des antibiotiques ayant éclairé à plusieurs reprises mon travail. Je vous prie de croire en ma sincère reconnaissance.

A **Monsieur le Professeur Benoit JAULHAC**. Merci de m'avoir donné les moyens de réaliser cette thèse, en parallèle de mon internat. Je tiens à vous remercier pour la confiance que vous me témoignez au sein de votre laboratoire. Soyez assuré de ma gratitude et de mon profond respect.

A **Monsieur le Docteur Gilles PREVOST**. Merci pour votre implication dans notre unité de recherche. Je vous remercie très sincèrement pour votre disponibilité durant toutes ces années de thèse.

A **Messieurs les Docteurs Maher SALEH et Guillaume BIERRY**. Merci de m'avoir fait découvrir une partie de vos univers respectifs (œil et IRM) et merci pour le partage de vos connaissances et de votre expérience. C'était un réel plaisir travailler avec vous.

A **Messieurs les Docteurs Yves Salmon, Michael REBER, Yannick GOUMONT, Luc GIGOU, Laurent PERELLO et François DELALANDE**. Merci pour votre disponibilité et pour votre regard critique sur mon travail de recherche. Je vous remercie pour vos conseils avisés et expérimentés. Veuillez croire en ma reconnaissance la plus sincère.

A **Christelle, Vanessa, Valérie et Aurélie**. Merci pour votre soutien, votre amitié et votre présence féminine indispensable au laboratoire.

A **Wardi**, merci pour nos pauses cafés et nos discussions si agréables tout au long de nos thèses respectives. Merci pour ton amitié et pour tes histoires que j'aime tant.

A **Elodie, Cathy, Benoît, Mira, Daniel, et Raymonde**. Merci pour votre présence dans l'équipe de recherche et nos échanges ces dernières années.

A **mes amis**, et tout spécialement à ceux sans qui ma vie strasbourgeoise ne serait pas la même. A **Emilie, Caroline, Jérôme, Stéphanie, Jennifer ...**

A **ma famille**, à la richesse de notre soutien mutuel.

“Only those who will risk going too far can possibly find out how far one can go”

T.S. Eliot, prix Nobel de littérature 1948.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	8
INTRODUCTION GENERALE	10
PARTIE 1: LINEZOLIDE, DAPTOMYCINE ET ENDOPHTALMIE BACTERIENNE AIGUË	12
I. RAPPELS ANATOMO-PHYSIOLOGIQUES DE L'OEIL.....	14
I.1. Les structures de l'œil	14
<i>I.1.1 Les différentes tuniques de l'œil.....</i>	<i>14</i>
<i>I.1.2 Les différents compartiments et liquides de l'œil.....</i>	<i>15</i>
I.2 Les barrières hémato-oculaires.....	16
<i>I.2.1 La barrière hémato-aqueuse (BHA).....</i>	<i>16</i>
<i>I.2.2 La barrière hémato-rétinienne (BHR).....</i>	<i>18</i>
II. PHARMACOCINETIQUE/PHARMACODYNAMIE OCULAIRE.....	20
II.1 Les paramètres PK/PD usuels.....	20
II.2 Les spécificités de la PK/PD oculaire.....	24
<i>II.2.1 Les barrières hémato-oculaires</i>	<i>24</i>
<i>II.2.2 Impact de l'inflammation</i>	<i>25</i>
<i>II.2.3 Variations interindividuelles</i>	<i>26</i>
<i>II.2.4 Toxicité oculaire.....</i>	<i>27</i>
III. ENDOPHTALMIE BACTERIENNE AIGUË	29
III.1 Définition.....	29
III.2 Signes cliniques.....	29
III.3 Epidémiologie	29
III.4 Prise en charge thérapeutique.....	31
<i>III.4.1 Les principales voies d'administration</i>	<i>31</i>
<i>III.4.1 Les principales classes d'antibiotiques utilisées en ophtalmologie.....</i>	<i>32</i>
<i>III.4.3 Recherche et développement de nouvelles classes antibactériennes</i>	<i>36</i>
IV. LINEZOLIDE (LZD).....	37
IV.1 Découverte et présentation de la molécule.....	37
IV.2 Mécanisme d'action.....	38
IV.3 Spectre d'activité et de résistance	40
IV.4 Indications cliniques.....	42
IV.5 Tolérance.....	43
IV.6 PK/PD.....	44
V. DAPTOMYCINE (DAP)	48
V.I Découverte et présentation de la molécule.....	48
V.2 Mécanisme d'action.....	51
V.3 Spectre d'activité et résistance	52
V.4 Indications cliniques.....	55

V.5	Tolérance.....	55
V.6	PK/PD.....	57
VI.	ETUDES EXPERIMENTALES	61
VI.1	Introduction et objectifs.....	61
VI.2	Etude de la pénétration intraoculaire du linézolide chez le lapin sain.....	64
	ARTICLE N°1 : LINEZOLIDE ADMINISTRE PAR VOIE TOPIQUE.....	64
	ARTICLE N°2 : LINEZOLIDE ADMINISTRE PAR VOIE ORALE.....	65
VI.3	Etude de l'efficacité et de la toxicité du LZD et de la DAP dans un modèle d'endophtalmie aiguë à <i>S. aureus</i> chez le lapin.....	68
	ARTICLE N°3 : LINEZOLIDE ADMINISTRE PAR VOIE INTRAVITREENNE.....	76
	ARTICLE N°4 : DAPTOMYCINE ADMINISTREE PAR VOIE INTRAVITREENNE	78
VI.4	Discussion et perspectives de la partie 1.....	81
PARTIE 2 : IRM, USPIO ET ARTHRITE BACTERIENNE AIGUË.....		88
I.	IRM ET RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE.....	89
I.1.	Le principe	89
I.2.	Les temps de relaxation	91
I.3	Le contraste intrinsèque en IRM	93
I.4	La machinerie d'IRM	94
II.	AGENTS DE CONTRASTE.....	96
II.1	Les composés paramagnétiques (effet T1)	96
II.2	Les composés superparamagnétiques (effet T2).....	98
	<i>II.2.1. Superparamagnétisme</i>	<i>98</i>
	<i>II.2.2. Structure</i>	<i>98</i>
	<i>II.2.3. Propriétés biologiques.....</i>	<i>99</i>
	<i>II.2.4. SPIO / USPIO</i>	<i>101</i>
	<i>II.2.5. Applications générales de l'imagerie associée aux SPIOs/USPIOs</i>	<i>102</i>
III.	ARTHRITE BACTERIENNE AIGUE	103
III. 1	Epidémiologie.....	103
III.2	Physiopathologie	103
III.3	Diagnostic	105
III.4	Prise en charge thérapeutique	106
III.5	Suivi de la guérison.....	107
III.6	Place de l'IRM conventionnelle.....	107
IV.	IMAGERIE DES MACROPHAGES ET ARTHRITE BACTERIENNE.....	109
V.	ETUDES EXPERIMENTALES	110
V.1	Introduction et objectifs.....	110
V.2	Matériel et méthodes	112
V.3	Etude de l'IRM associée aux USPIOs dans un modèle expérimental d'arthrite aiguë du genou à <i>S. aureus</i> chez le lapin	115

ARTICLE N°5 : MISE EN EVIDENCE DE L'INFECTION BACTERIENNE....	115
ARTICLE N°6 : EVALUATION DU SUIVI D'UNE ANTIBIOTHERAPIE.....	118
V.4 Discussion et perspectives de la partie 2.....	122
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	123
RESUME	141

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxy-ribonucléique

AFSSAPS : Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé

ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé

ARN : Acide ribonucléique

ASC : Aire sous la courbe concentration-*versus*-temps

ASIC : Aire sous la courbe concentration-*versus*-temps /CMI

ATCC : American Type Culture Collection

BHA : Barrière hémato-aqueuse

BHR : Barrière hémato-rétinienne

BMR : Bactérie multi-résistante

BSS : Balt saline solution

CA-SFM : Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie

CLHP : Chromatographie liquide à haute performance

C_{max} : Concentration maximale

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CPK : Créatine phosphokinase

CRP : Protéine C réactive

CYP450 : Cytochromes P450

DAP : Daptomycine

EI : Endocardite infectieuse

GP : Coloration de Gram positive

GN : Coloration de Gram négative

HUS : Hôpitaux universitaires de Strasbourg

ICPTM : Infection compliquée de la peau et des tissus mous

IM : Voie d'administration intramusculaire

IRM : Imagerie à Résonance Magnétique

IV : Voie d'administration intraveineuse

IVT : Voie d'administration intravitréenne

LZD : Linézolide

PK/PD : Pharmacocinétique/pharmacodynamie

QI_{\max} : C_{\max}/CMI : Quotient inhibiteur au pic

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RPM : Rotation par minute

SAMR : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

SPM : Système phagocytaire mononucléé

$T_{1/2el}$: Demi-vie d'élimination

UFC : Unités formant colonies

USPIO : Ultrasmall superparamagnetic iron oxide

VAN : Vancomycine

VISA : *Vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus*

INTRODUCTION GENERALE

Les staphylocoques, cocci à coloration de Gram positive, sont des bactéries commensales de la peau et des muqueuses de l'homme. Ils peuvent toutefois devenir des pathogènes opportunistes responsables d'infections suppuratives superficielles cutanéomuqueuses ou d'infections invasives et profondes plus ou moins sévères. *Staphylococcus aureus* occupe encore aujourd'hui une place importante en pathologie humaine, de part son caractère ubiquitaire, sa virulence élevée et sa résistance aux antibiotiques usuels. Les sites réservoirs essentiels de *S. aureus* chez l'homme sont les fosses nasales antérieures et les zones humides de la peau. La prévalence du portage nasal permanent est ainsi comprise dans la population générale entre 20 et 25 % tandis que la colonisation transitoire par cette bactérie affecte au moins 60 % de la population restante (146). *S. aureus* est aussi bien impliqué dans des infections de type communautaire que nosocomiale. Selon l'enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales 2006 publiée par l'Institut National de Veille Sanitaire (INVS), *S. aureus* était le deuxième germe (18,9%) isolé des infections nosocomiales en France, juste après *Escherichia coli* (24,7%).

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à deux types d'infections profondes à *S. aureus* : l'endophtalmie aiguë et l'arthrite aiguë du genou. Dans ces deux situations, si l'infection n'est pas prise en charge en urgence et de manière adéquate, des séquelles irréversibles de type cécité et destruction de l'articulation peuvent être observées chez les patients.

Dans la première partie de nos travaux, nous avons étudié des alternatives thérapeutiques au traitement actuel de référence des endophtalmies aiguës à *S. aureus*.

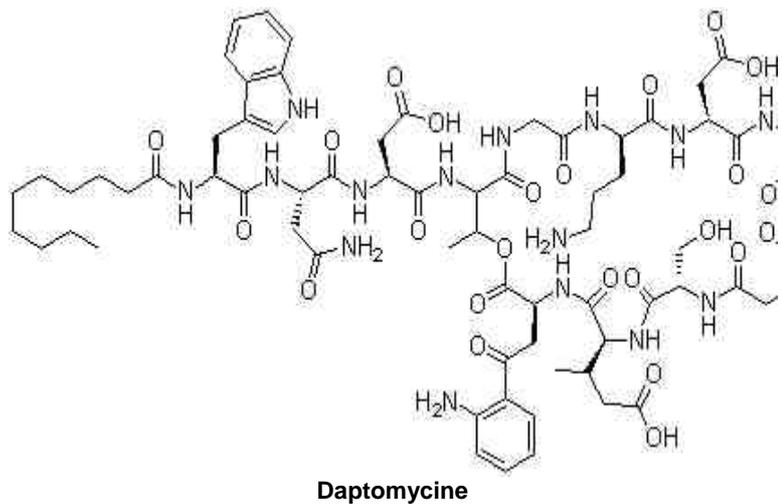
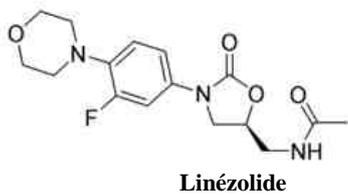
Ce dernier consiste en une injection intravitréenne de vancomycine directement dans l'œil infecté. Bien que l'on observe en France une diminution importante de la prévalence des

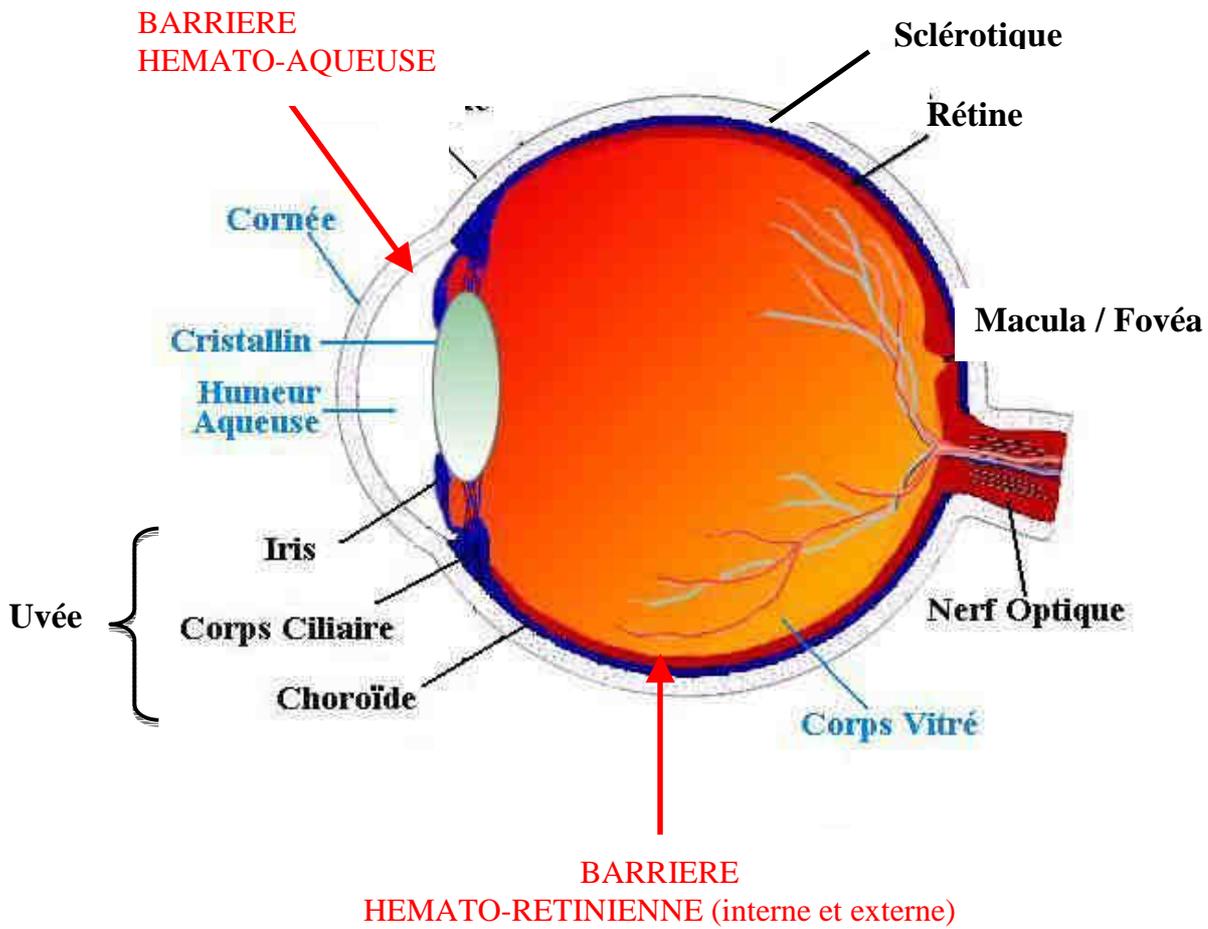
infections à *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) (diminution de plus de 40% des infections nosocomiales à SARM entre 2001 et 2006 en France, selon l'enquête INVS 2006), on assiste parallèlement à l'émergence de souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides (91), voir résistantes à la vancomycine (49, 67). L'utilisation exclusive de la vancomycine dont les propriétés pharmacocinétiques/pharmacodynamiques sont peu adaptées à ces souches est remise en cause (91) et le besoin de nouvelles molécules anti-staphylococciques insensibles à ces mécanismes de résistance se renforce de jour en jour. L'arsenal thérapeutique a accueilli ces dernières années deux molécules ayant démontré leur activité sur les bactéries à Gram positif : le linézolide et la daptomycine. Nous présentons dans la première partie de ce manuscrit les résultats d'études de pharmacocinétique et de pharmacodynamie oculaire du linézolide et de la daptomycine réalisées chez le lapin, dans l'œil sain puis dans un modèle expérimental d'endophtalmie à *S. aureus*.

Dans la deuxième partie de nos travaux nous avons étudié l'intérêt d'une nouvelle technique d'IRM utilisant des agents de contraste particuliers, les USPIOs (Ultrasmall Particles Iron Oxide), dans la prise en charge de l'arthrite bactérienne aiguë. A ce jour l'IRM est considérée comme une technique de choix pour diagnostiquer les infections articulaires. Des agents de contraste à base de gadolinium sont utilisés et les images obtenues mettent en évidence des modifications de l'articulation, non spécifiques et persistantes après résolution de l'infection. Les USPIOs, quant à eux, sont captés par les macrophages et permettent un marquage cellulaire au niveau des tissus infectés. Nous présentons dans cette deuxième partie nos résultats sur l'utilisation de l'IRM du macrophage en tant qu'outil innovant d'aide au diagnostic et au suivi de la guérison de l'arthrite bactérienne aiguë à l'aide d'un modèle expérimental d'arthrite aiguë du genou chez le lapin.

PARTIE 1 :

Linézolide, daptomycine et endophtalmie bactérienne aiguë





[Figure 1](#). Représentation schématique des structures de l'œil et des barrières hémato-oculaires.

I. RAPPELS ANATOMO-PHYSIOLOGIQUES DE L'OEIL

(voir [Figure 1](#))

I.1. Les structures de l'œil

I.1.1 Les différentes tuniques de l'œil

L'œil est formé de la juxtaposition de trois couches concentriques se succédant de l'extérieur vers l'intérieur : la sclérotique, l'uvée et la rétine.

La sclérotique, tunique la plus externe de l'œil, est une coque peu vascularisée et constituée essentiellement de fibres de collagène et de quelques fibres élastiques. Elle est opaque et blanche sauf dans sa partie antérieure, correspondant à la cornée, transparente et totalement avasculaire. Son rôle est de protéger l'œil des agressions extérieures et de maintenir la forme du globe oculaire.

L'uvée est la tunique intermédiaire de l'œil comprenant dans la partie postérieure du globe, la choroïde, et dans la partie antérieure, l'iris et le corps ciliaire. La choroïde est une membrane brune pigmentée par des mélanocytes et constituant une chambre noire. Elle est richement vascularisée par des vaisseaux sanguins fenestrés et très perméables, assurant l'apport des besoins énergétiques importants de la rétine en glucose et en oxygène. Le corps ciliaire est une structure circulaire en continuité avec la choroïde. Au niveau histologique, le corps ciliaire est revêtu en surface par une double couche d'épithélium. La couche d'épithélium superficielle est non pigmentée contrairement à la couche profonde très pigmentée. Son épaisseur, correspond à un tissu conjonctif très vascularisé, essentiellement constitué de fibres musculaires lisses responsables de sa capacité de modification de la forme du cristallin, permettant le phénomène d'accommodation. A la surface du corps ciliaire, se trouvent des petites expansions épithéliales, non pigmentées, correspondant aux procès ciliaires et responsables de la production de l'humeur aqueuse. Enfin L'iris correspond à l'expansion antérieure du corps ciliaire. C'est la partie colorée de l'œil formant un diaphragme

devant le cristallin et contrôlant la taille de la pupille, l'ouverture centrale de l'œil. D'un point de vue histologique, il s'agit d'un tissu conjonctif, très vascularisé et riche en mélanocytes.

La tunique interne est la **rétine**, une mince membrane composée de deux couches (Figure 2). La couche pigmentaire, externe et en contact avec la choroïde, empêche la lumière de diffuser dans l'œil. La couche interne est une structure nerveuse, composée d'un empilement de couches dans le sens radial, comprenant de nombreux photorécepteurs (cônes et bâtonnets) capables de transformer l'énergie lumineuse en un signal électrique. Les cônes ont besoin d'une forte intensité lumineuse pour fonctionner (vision de jour ou photopique). Les bâtonnets sont responsables essentiellement de la vision nocturne (scotopique). Ces cellules visuelles sont également capables d'établir un contact, à l'aide de leur terminaison synaptique, avec les autres cellules nerveuses traitant et acheminant l'information visuelle vers le cerveau. Les fibres nerveuses efférentes sortent de l'œil par le nerf optique. Au niveau de ce point de sortie, la rétine s'interrompt: c'est la tâche aveugle appelée disque optique ou encore papille. A proximité de cette tâche aveugle se trouve la macula, la région centrale de la rétine, avec une fossette centrale, la fovéa. Cette dernière est la zone de la rétine avec la densité de photorécepteurs la plus importante et qui correspond donc au point auquel l'acuité visuelle est la meilleure. Le cristallin est une capsule mince et élastique, composée de cellules anucléées et de fibres spécifiques. Il est maintenu par les corps ciliaires qui l'entourent et joue le rôle de lentille biconvexe.

1.1.2 Les différents compartiments et liquides de l'œil

A l'avant de l'œil on délimite deux zones principales. La chambre antérieure, correspondant à l'espace entre la cornée et l'iris, est remplie de l'humeur aqueuse. L'humeur aqueuse est un liquide transparent produit en continu par les corps ciliaires. Il fournit oxygène et nutriments à la cornée et au cristallin et son flux est drainé dans le flux sanguin au niveau de canaux situés sur les pourtours de l'iris. La chambre postérieure est quant à elle délimitée par l'iris et le cristallin et contient de l'humeur vitrée. A l'arrière de l'œil se trouve le segment postérieur, correspondant à l'espace entre le cristallin et la rétine. Il est également rempli d'humeur vitrée.

L'humeur vitrée de l'œil (ou corps vitré) est un gel transparent qui maintient la rétine et le cristallin en place et assure la forme sphérique du globe oculaire. Il se renouvelle très lentement grâce aux échanges à travers son enveloppe, la hyaloïde, et se compose d'eau (99%), d'électrolytes (potassium, sodium, calcium, chlore), de protéines (glycoprotéines), d'hydrates de carbone, d'acide pyruvique, d'acide lactique et d'acide hyaluronique.

I.2 Les barrières hémato-oculaires

L'œil se caractérise par l'existence de barrières hémato-oculaires, responsables d'une relative inaccessibilité de l'œil sain au système immunitaire, dans un but de protection de la transparence de l'axe visuel de toute inflammation qui serait délétère pour la vision (4). Ces barrières filtrent le passage des substances de la circulation générale vers l'intérieur du globe oculaire et jouent un rôle central dans la pénétration et l'élimination oculaire des antibiotiques.

I.2.1 La barrière hémato-aqueuse (BHA)

La BHA se situe au niveau du corps ciliaire et de l'iris. Cette barrière est formée par l'endothélium des capillaires iriens et la couche non pigmentée de l'épithélium du corps ciliaire. A ce niveau se trouvent des jonctions serrées entre les cellules influençant le passage des molécules du sang vers l'humeur aqueuse, en établissant une perméabilité sélective aux différentes substances en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Le passage du sodium, du chlore et des bicarbonates nécessite un mécanisme de transport actif et crée une force osmotique impliquée dans la sécrétion de l'humeur aqueuse à un débit variant de 2 à 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ (turn-over total en 100 min). Cette barrière assure également un rôle de filtre sélectif grâce à la présence de pores de petite taille (200 nm de diamètre) (58) empêchant les molécules de haut poids moléculaire comme les protéines plasmatiques d'atteindre le segment antérieur de l'œil.

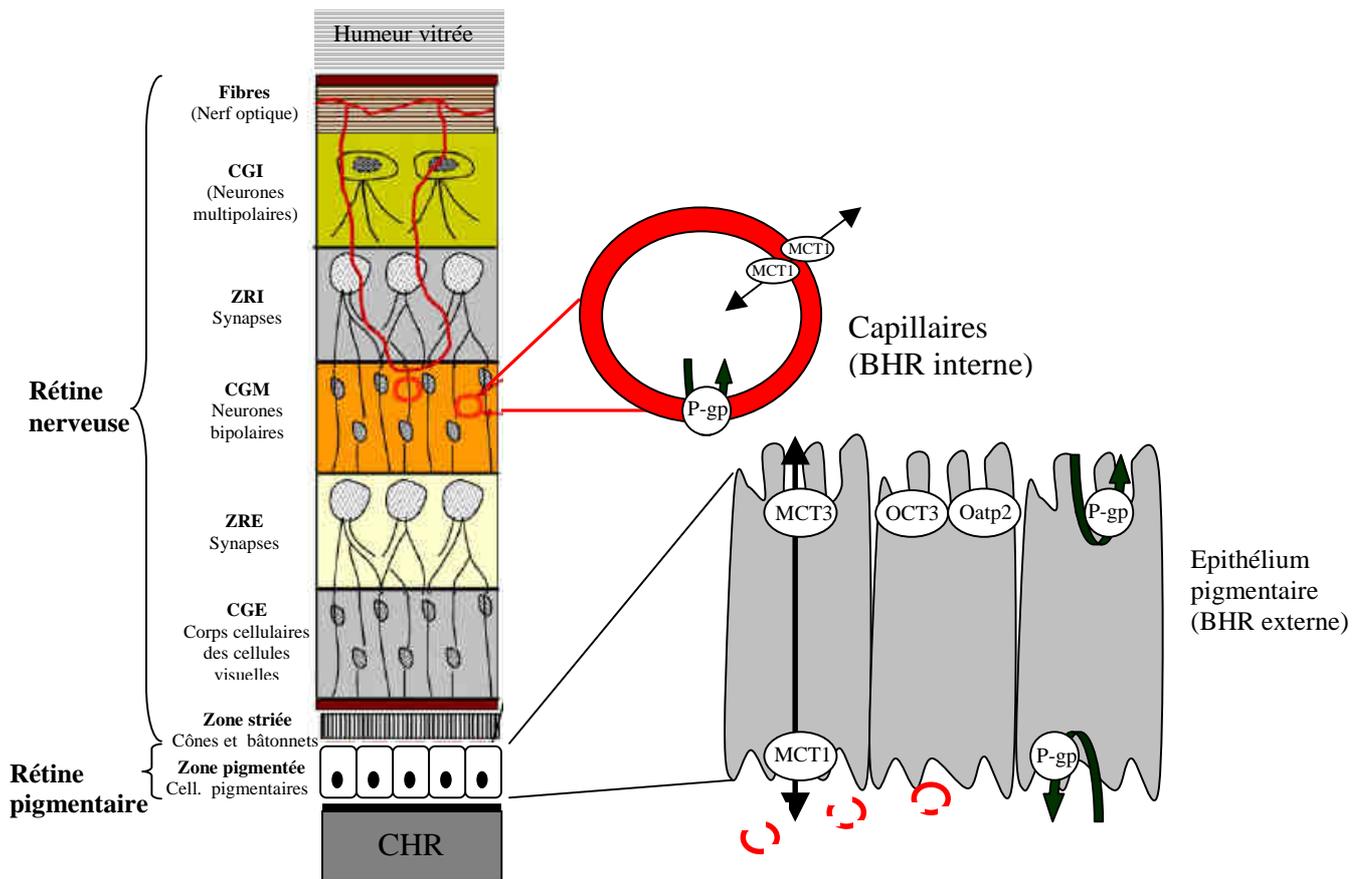


Figure 2. Représentation schématique de la structure de la rétine (composée d'une couche nerveuse et d'une couche pigmentaire) et exemple de transporteurs des barrières hémato-rétiniennes (BHR) interne et externe. La localisation et la direction d'action des transporteurs représentés sont basées sur les données de la littérature. CGE : couche granuleuse externe, CGI : couche granuleuse interne, CGM : couche granuleuse moyenne, CHR : choroïde, MCT : transporteur de monocarboxylate (lactate), MRP : protéine associée à des résistances médicamenteuses multiples, OATP : transporteur d'anions organiques, OCT : transporteur de cations organiques, P-gp : glycoprotéine P, ZRI : zone réticulée interne, ZRE : zone réticulée externe. D'après Mannermaa et al. (124).

1.2.2 La barrière hémato-rétinienne (BHR)

La BHR (Figure 2) restreint quant à elle les déplacements des molécules au niveau du segment postérieur de l'œil. Elle a pour but de protéger cette zone intérieure de l'œil en conservant l'homéostasie de la rétine et du vitré. La BHR se décompose en deux parties : la barrière hémato-rétinienne interne, située au niveau de l'endothélium des capillaires rétiniens, et la barrière hémato-rétinienne externe qui se trouve au niveau de l'épithélium pigmentaire rétinien et qui régule les échanges entre la rétine et la choroïde. Les jonctions entre les cellules y sont également serrées. Dans cette situation, le poids moléculaire, la liposolubilité, le caractère ionisé ou non des molécules et leur liaison aux protéines plasmatiques deviennent des éléments déterminants pour traverser de façon satisfaisante la BHR. Le passage est passif pour l'eau ainsi que pour les molécules liposolubles et de faible poids moléculaire, selon des gradients de pression. Il est actif, à l'aide de transporteurs spécifiques consommateurs d'énergie, pour les ions (K^+ , Mg^{2+}) et pour certains acides aminés, tels que glutamate et GABA (les principaux neurotransmetteurs excitateurs et inhibiteurs de la rétine) ainsi que L-phénylalanine, leucine, cystéine et taurine (impliqués dans la synthèse protéique et la protection de la rétine contre le stress oxydatif). A ce jour une trentaine de transporteurs ont été détectés comme étant exprimés au niveau de la BHR (126). Les transporteurs sont des protéines attachées aux membranes, saturables en présence de hautes concentrations de médicaments, contrairement au mécanisme de simple diffusion passive, non saturable. Ils sont de deux types :

Les transporteurs d'efflux dirigent les molécules vers l'extérieur du cytoplasme et des membranes cellulaires. Nous citerons l'exemple de la glycoprotéine P (P-gp) dont l'expression et l'activité fonctionnelle ont été identifiées au niveau de la BHR (Figure 2) (126). La P-gp appartient à la superfamille des transporteurs ABC (ATP binding cassette) et se retrouve également au niveau des cellules du tubule contourné proximal du rein, des cellules intestinales et de l'endothélium de la barrière hémato-encéphalique.

Les transporteurs d'influx, quant à eux, facilitent la translocation de nutriments essentiels (tels que des acides-aminés, peptides, vitamines, glucose, lactate...) et de xénobiotiques à travers

les membranes biologiques. Nous citerons les transporteurs monocarboxylate (MCT) jouant un rôle dans le transport du lactate depuis la rétine vers la circulation sanguine et *vice versa* (Figure 2). Le lactate est fortement produit au niveau de la rétine et est utilisé en tant que source d'énergie en présence d'un faible taux de glucose.

II. PHARMACOCINETIQUE/PHARMACODYNAMIE OCULAIRE

Au cours du processus de développement d'un médicament, la caractérisation de la relation entre la dose de médicament administrée et ses effets (pharmacologiques et toxiques) est critique dans la détermination du schéma thérapeutique optimal à administrer (posologie et durée de traitement). L'évaluation de cette relation dose-effet dépend des résultats des études de pharmacocinétique (rapport entre la dose administrée et la concentration dans l'organisme en fonction du temps) et de pharmacodynamie (rapport entre la concentration dans l'organisme et l'effet) de la molécule. Les anglo-saxons parlent de PK/PD (PharmacoKinetics/PharmacoDynamics). En ce qui concerne les antibiotiques, il s'agit en fait de la variation de leur effet bactéricide, au site infectieux, en fonction du temps et en fonction de la concentration de l'antibiotique. **L'objectif clé de la PK/PD est de définir les paramètres prédictifs de l'efficacité bactério-clinique, associés à une tolérance optimale chez les patients.** L'étude de la PK/PD des anti-infectieux a pris une ampleur grandissante au cours des trois décennies passées permettant une reprise du développement des antibiotiques et la redéfinition du processus de sélection et d'optimisation des doses à administrer chez l'homme.

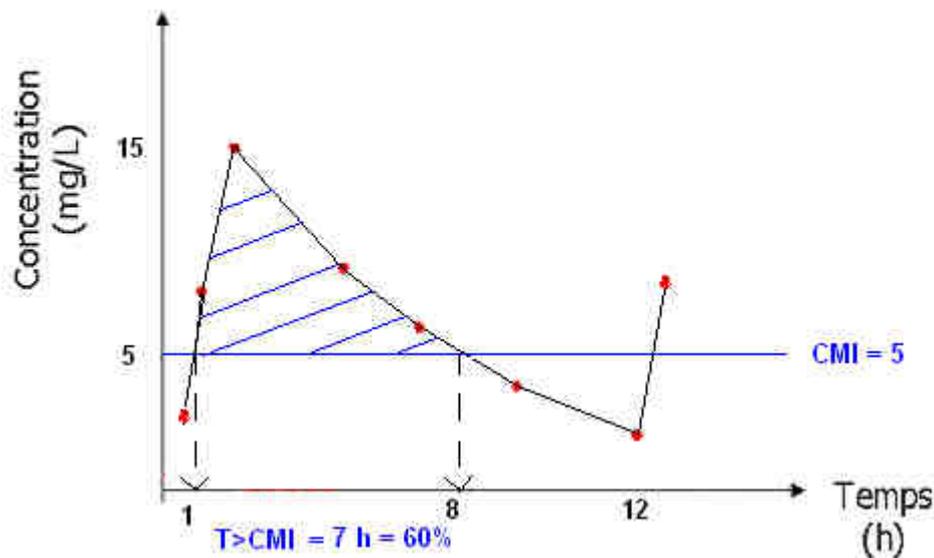
II.1 Les paramètres PK/PD usuels

La pharmacodynamie des antibiotiques est une approche prenant en compte leur activité antibactérienne aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Elle considère ainsi, de façon concomitante, l'activité intrinsèque *in vitro* de l'antibiotique sur des bactéries isolées (activité antibactérienne caractérisée par la concentration minimale inhibitrice, ou CMI) et ses caractéristiques pharmacocinétiques *in vivo* au niveau du site infectieux. Cette approche a pour origine la constatation que les modalités de bactéricidie dynamique des antibiotiques ne sont pas les mêmes pour tous les antibiotiques : lorsque l'augmentation des concentrations d'un antibiotique se traduit par une augmentation proportionnelle de la vitesse de bactéricidie et de la profondeur de bactéricidie vis à vis d'une souche bactérienne, on parle de

bactéricidie concentration-dépendante. A l'inverse, lorsque l'augmentation des concentrations d'un antibiotique, n'améliore la profondeur de la bactéricidie qu'à hauteur d'une concentration égale à environ une fois la CMI, et qu'au-delà de cette valeur, l'amélioration de la profondeur de bactéricidie n'est proportionnelle qu'au temps écoulé au contact de l'antibiotique à une valeur au moins égale à une fois la CMI, on parle de **bactéricidie temps dépendante.**

De nombreux paramètres dits pharmacodynamiques ont été développés, prédictifs de l'efficacité bactérioclinique des antibiotiques et/ou de leur capacité à prévenir l'émergence de résistance. Les paramètres usuels sont les suivants :

- **T>CMI (Figure 3)** : temps pendant lequel les concentrations sériques de l'antibiotique se situent au dessus de la CMI. Ce paramètre est évalué dans l'intervalle de temps entre deux administrations et il est exprimé en % de l'intervalle entre deux administrations afin de comparer des valeurs de T>CMI pour des antibiotiques ayant des rythmes d'administration différents. Ce paramètre est prédictif de l'efficacité bactérioclinique des antibiotiques temps-dépendants, tels que les bêta-lactamines et les glycopeptides.

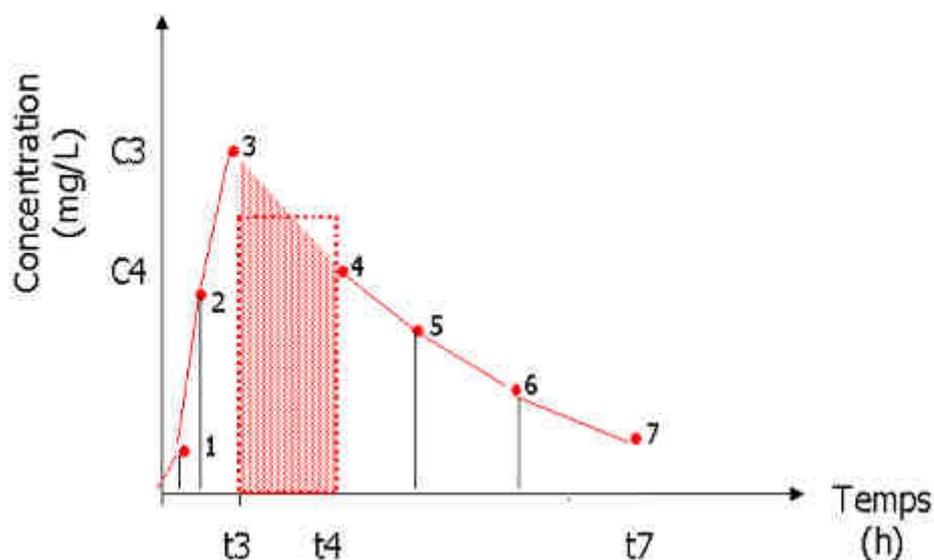


[Figure 3.](#) T>CMI.

- Quotients inhibiteurs (QI).** Il s'agit de rapports concentration/CMI. Différentes concentrations peuvent être utilisées : concentrations sériques ou tissulaires, concentrations au pic (C_{\max}) ou résiduelle ($C_{\text{rés}}$). Ainsi par exemple, le $QI_{\max \text{ sérique}}$ correspond au rapport $C_{\max \text{ sérique}} / \text{CMI}$. Ce paramètre est utilisé pour évaluer l'efficacité bactéricide des antibiotiques concentration-dépendants tels que les aminosides. Le $QI_{\text{résiduel sérique}}$ correspond quant à lui au rapport $C_{\min \text{ sérique}} / \text{CMI}$, et est corrélé à l'efficacité bactério-clinique des bêta-lactamines et des glycopeptides.
- ASIC.** Il s'agit du rapport de l'aire sous la courbe* des concentrations supérieures à la CMI calculée sur 24 h, divisée par la CMI (ASC_{0-24h}/CMI). Ce paramètre tend à devenir le paramètre universel de l'évaluation des potentialités d'un antibiotique. Il est utilisé pour les antibiotiques temps et concentration-dépendants.

*L'aire sous la courbe concentration-temps, ou ASC ([Figure 4.](#)), correspond à l'intégrale de la concentration plasmatique sur un intervalle de temps défini. Plusieurs méthodes existent pour

la calculer mais, en pratique, on utilise le plus souvent l'approximation de la méthode des trapèzes, qui est une estimation numérique simple :



[Figure 4](#). Dans cet exemple, $ASC_{3-4} = (C3 - [C3 - C4] / 2) \times (t4 - t3)$

L'ASC correspond à la somme des ASC de zéro à l'infini (correspondant en pratique au temps à partir duquel l'aire n'est plus significative). La précision de l'ASC croît avec le nombre de mesures de concentration effectuées. L'ASC s'exprime en mg/L.h.

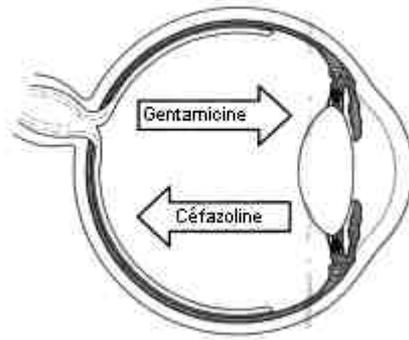
Il est important de noter que la pharmacodynamie est toujours spécifique d'un couple antibiotique-bactérie. Pour un antibiotique donné, la détermination du (ou des) paramètre(s) PK/PD les mieux corrélés à l'efficacité bactérioclinique dépend du germe responsable de l'infection et de la localisation de cette infection.

II.2 Les spécificités de la PK/PD oculaire

Le traitement des infections intra-oculaires est un **challenge thérapeutique** pour plusieurs raisons. Tout d'abord l'antibiotique doit franchir les barrières hémato-oculaires pour atteindre le site de l'infection. Ces barrières sont responsable d'une différence de distribution de l'antibiotique selon les compartiments de l'œil et elles peuvent être modifiées suite à la présence d'une inflammation oculaire. Ensuite les différences anatomiques inter-individus de l'œil sont responsables d'une possible variation de la concentration locale de l'antibiotique.

II.2.1 Les barrières hémato-oculaires

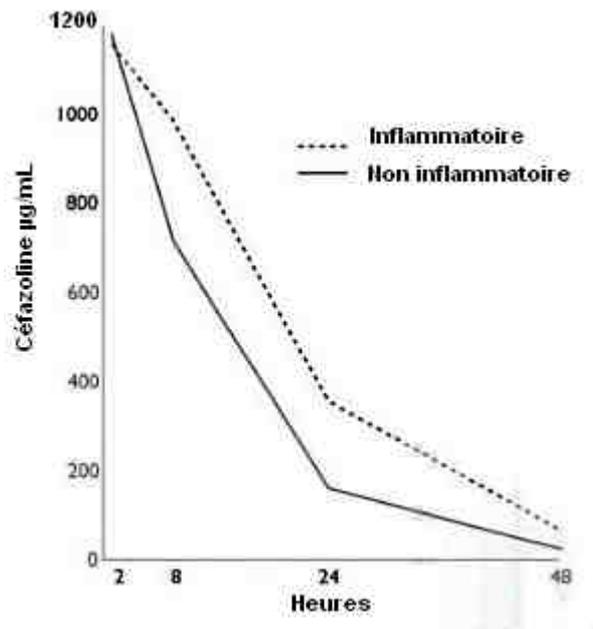
Les barrières hémato-oculaires peuvent limiter l'entrée et l'activité des médicaments antimicrobiens et anti-inflammatoires depuis la circulation générale. Au niveau des BHR, certains transporteurs ont, en plus de leur rôle physiologique, un rôle dans le transport de médicaments compliquant leur délivrance vers le segment postérieur de l'œil. Par exemple, les bêta-lactamines sont activement transportées en dehors de l'humeur vitrée via des transporteurs polypeptidiques d'anions (OATPs) localisés dans la rétine, expliquant une demi-vie intravitréenne courte pour ces antibiotiques (95). Une étude chez des singes rhésus sains a montré que le probénicid (inhibiteur des transporteurs d'anions) augmentait significativement la demi-vie intravitréenne de la carbénicilline et de la céfazoline. Les demi-vies passant respectivement de 10h à 20h pour la carbénicilline et de 7h à 30h pour la céfazoline. Au contraire, les composés cationiques tels que les aminosides (gentamicine et tobramycine), la vancomycine, l'érythromycine et la rifampicine, ne sont pas activement transportés à travers le BHR mais quittent l'humeur vitrée par diffusion dans la chambre antérieure et l'humeur aqueuse avant d'être éliminés, ce qui leur confèrent une longue demi-vie intravitréenne (33h pour la gentamicine selon cette même étude) (29) (Figure 5).



[Figure 5.](#) Transport actif (céfazoline) et passif (gentamicine) des antibiotiques en dehors de l'œil. D'après (9).

II.2.2 Impact de l'inflammation

Le processus inflammatoire intra-oculaire mis en place chez l'homme au cours d'une endophtalmie bactérienne, peut également impacter la pharmacocinétique oculaire des antibiotiques. En effet l'inflammation peut entraîner des modifications de la **perméabilité des jonctions serrées**. La régulation des jonctions serrées est régie par de nombreuses molécules et toute altération des composants cellulaires (teneur en calcium, activité enzymatique) ou du cytosquelette modifie la perméabilité de ces jonctions. De nombreux stimuli extra-cellulaires peuvent également intervenir: ainsi il a été montré que les glucocorticoïdes et les acides gras poly-insaturés pouvaient renforcer l'intégrité de la barrière en augmentant l'expression de certaines des protéines des jonctions serrées (23). D'autres comme l'histamine, les cytokines, les facteurs de croissance (VEGF, TNF, IL-1 ...) peuvent augmenter sa perméabilité (22). Les jonctions serrées de la barrière hémato-aqueuse ont toutefois une perméabilité induite par l'inflammation beaucoup plus importante que celles de la barrière hémato-rétinienne (44). En cas d'inflammation, **les transports actifs de la rétine** peuvent également être endommagés et la demi-vie d'élimination des molécules éliminées par ces transporteurs peut être augmentée. Ainsi il a été montré chez le lapin que la demi-vie d'élimination intravitréenne de la céfazoline passait de 6,5 h à 10,4 h en cas d'inflammation (66) (Figure 6).



[Figure 6.](#) Concentrations vitréennes de céfazoline dans des yeux phakes inflammatoires et non inflammatoires, après administration intravitréenne de céfazoline chez le lapin. D'après (9).

Les aminosides, dont l'élimination oculaire ne fait pas intervenir ces transporteurs actifs, n'ont pas une demi-vie allongée en cas d'inflammation (106).

II.2.3 Variations interindividuelles

Enfin, les concentrations intra-oculaires d'antibiotiques varient selon le compartiment étudié (larmes, cornée, humeur aqueuse et vitré) et selon les individus. Ainsi par exemple l'organisation de l'humeur vitrée est différente selon les patients : le volume vitréen varie de 1,7 à 16,5 mL pour des globes de longueur axiale allant de 16 à 34 mm respectivement. En moyenne, chez 90% des patients le volume vitréen serait de 4 à 7,5 mL (Tableau 1) (9). Il faudrait en théorie diluer l'antibiotique injecté chez un patient fort myope et le diluer chez un patient hypermétrope. Cela n'est pas fait en pratique.

Fréquence	← 95% →									
	← 90% →									
Longueur axiale (mm)	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34
Volume externe de l'œil (mL)	2,1	3,0	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

[Tableau 1](#). Fréquence du volume des globes oculaires et du volume vitréen chez l'homme par rapport à la longueur axiale. D'après (9).

II.2.4 Toxicité oculaire

Enfin parallèlement à l'étude de l'efficacité antibactérienne des antibiotiques dans les différents compartiments oculaires, un autre challenge doit être relevé : il s'agit de considérer la nature délicate des tissus intraoculaires au cours d'études de toxicité oculaire. En effet, les structures internes de l'œil, essentiellement les photorécepteurs et autres cellules de la rétine, sont extrêmement sensibles et fragiles aux modifications de leur environnement. Il a été démontré que la production de certains facteurs de virulence par les micro-organismes, comme des exotoxines (alpha-toxines, leucotoxines) sécrétées par *S. aureus* (39, 40), mais aussi l'influx de cellules inflammatoires induit par différents constituants bactériens (peptidoglycane, acide lipoteichoïque) (46) contribuent à la sévérité de l'endophtalmie et sont impliqués dans les dommages rétiniens responsables de la perte d'acuité visuelle. Les hautes doses d'agents antimicrobiens nécessaires à la stérilisation de l'œil peuvent également avoir des effets toxiques directs sur les tissus de la vision.

En résumé, l'œil présente plusieurs compartiments et plusieurs barrières hémato-oculaires. Ces caractéristiques anatomo-physiologiques confèrent aux molécules une PK/PD oculaire particulière pouvant être sensiblement différente de celle rencontrée dans les autres compartiments de l'organisme. De plus la pharmacocinétique d'un antibiotique dans un œil sain et dans un œil inflammé peut être différente. Ainsi, l'œil impose des contraintes d'efficacité et d'innocuité particulièrement exigeantes.

III. ENDOPHTALMIE BACTERIENNE AIGUË

III.1 Définition

L'endophtalmie est une inflammation des tissus (rétine, uvée) et des fluides (humeur aqueuse, humeur vitrée) intraoculaires. Elle peut être aussi bien aiguë (l'endophtalmie aiguë survient en règle générale dans les dix premiers jours suivant un acte chirurgical) que chronique (présence de germes moins virulents sur une prothèse intra-oculaire par exemple). Dans tous les cas, les risques de destruction de la rétine, membrane visuelle, et du vitré sont élevés et peuvent donner lieu à une cécité irréversible pour le patient. Il s'agit donc d'une urgence thérapeutique.

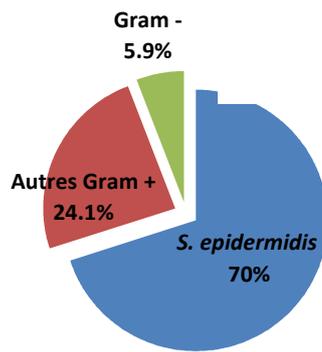
III.2 Signes cliniques

L'endophtalmie bactérienne présente un début le plus souvent brutal. L'œil est le plus souvent douloureux et photophobe. A l'examen, l'œil est rouge (82,1%) et des sécrétions peuvent être présentes. Il existe une réaction inflammatoire importante qui se traduit par un œdème cornéen, un trouble de la chambre antérieure (correspondant à la suspension de protéines et de cellules inflammatoires) et la présence de pus est parfois relevée (hypopion 85,7%). La pupille est resserrée (myosis) et 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'un trouble vitréen dense.

III.3 Epidémiologie

Les principales causes d'endophtalmie bactérienne sont exogènes, liées à la pénétration de bactéries dans l'œil, suite à une opération chirurgicale de l'œil (post-opératoire) ou à une perforation par l'introduction d'un corps étranger (post-traumatique). Elle peut aussi, dans de rares cas, avoir une origine endogène (2 à 8% des endophtalmies), par diffusion intraoculaire de bactéries issues d'un foyer infectieux, principalement chez les immunodéprimés (47). Bien que l'incidence de l'endophtalmie post-opératoire ait considérablement diminué du fait des précautions d'asepsie, la contamination per-opératoire n'a pas pu être totalement éliminée et

reste à ce jour un sujet de préoccupation pour les chirurgiens ophtalmologistes. Ainsi, au cours de ces dix dernières années, les résultats de diverses études rétrospectives suggèrent que le risque d'endophtalmie post-opératoire bactérienne aiguë varie entre 0,01% et 0,1%, selon l'établissement de santé concerné et le type de chirurgie (110, 136, 188). Les bactéries retrouvées pénètrent dans l'œil lors d'une chirurgie à globe ouvert à partir de la conjonctive ou des tissus environnants. L'étude prospective EVS (*Endophthalmitis Vitrectomy Study*) fait référence dans ce domaine (16). Au cours de cette étude (1990-1994), 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 coloration de Gram positive (BGP) ont été isolées dans 94,2 % de ces cas, dont 70 % de *Staphylococcus epidermidis*. Les autres espèces comprenaient majoritairement *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp.* et *Enterococcus sp.*. Les infections par des bactéries à coloration de Gram négative (BGN) comme *Pseudomonas sp.*, *Proteus sp.* et *Klebsiella sp.* étaient moins fréquentes (5,9%) (14) (voir Figure 7). La cataracte étant la plus fréquente des interventions ophtalmologiques, la plupart des endophtalmies post-opératoires succèdent à cette chirurgie (188). 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 (16).



[Figure 7.](#) Isolats bactériens de l'étude EVS (16)

L'endophtalmie bactérienne est une complication imprévisible, un risque infectieux hypothétique mais très sérieux nécessitant une prise en charge adaptée et efficace en urgence.

III.4 Prise en charge thérapeutique

III.4.1 Les principales voies d'administration

Les principales voies d'administration utilisées pour le traitement de l'endophtalmie bactérienne post-opératoire sont les suivantes :

- **La voie intra-vitréenne (IVT)**, est la voie d'administration à privilégier. En effet, les injections IVT, malgré de nombreuses controverses (geste invasif, risque de toxicité locale, précision de la dose injectée), n'en demeurent pas moins aujourd'hui le seul moyen de délivrer rapidement dans le site de l'infection des produits efficaces. Ceux-ci pourraient ne jamais atteindre l'humeur vitrée par voie systémique à des concentrations aussi élevées, en raison de la difficulté de passage des barrières hémato-oculaires. Cependant le problème de la toxicité rétinienne des antibiotiques persiste et il est nécessaire de trouver le meilleur compromis entre une efficacité optimale et une toxicité minimale pour la rétine.

- **La voie systémique** est également utilisée dans le traitement des endophtalmies. Le problème de l'administration des antibiotiques par voie systémique, *per os* ou injectable, est d'obtenir une concentration efficace au niveau du site de l'infection. Pour cela, des antibiotiques avec un spectre d'action adapté aux bactéries en cause et traversant le mieux possible les barrières hémato-oculaires sont souhaités. Or, les antibiotiques hydrophiles (aminosides, bêta-lactamines et glycopeptides) présentent une diffusion du plasma vers la cavité vitréenne insuffisante pour obtenir une efficacité clinique. Un des moyens utilisés pour augmenter leur concentration *in situ* consiste à administrer de fortes doses d'antibiotiques. Cela a pour conséquence d'augmenter le risque de survenue d'effets secondaires généraux ou locaux plus ou moins graves, comme la néphrotoxicité et l'ototoxicité bien connues des aminosides. Par conséquent, les molécules à retenir pour un usage systémique sont essentiellement la pipéracilline, la ceftazidime, l'imipénème, les fluoroquinolones et la fosfomycine.
- **La voie locale** peut être utilisée dans le cadre du traitement des endophtalmies, mais uniquement en complément des injections IVT ou systémiques. En effet le passage des barrières oculaires pour atteindre le segment postérieur de l'œil ne permet pas d'obtenir des concentrations finales suffisantes d'antibiotique dans ce compartiment et les collyres, mêmes renforcés, ne sont à ce jour que des thérapies adjuvantes.

III.4.1 Les principales classes d'antibiotiques utilisées en ophtalmologie

- **Bêta-lactamines**

De nombreuses pénicillines existent mais ne sont pas employées en ophtalmologie du fait de leur faible pénétration oculaire et de la présence de mécanismes d'efflux mettant en jeu des transporteurs les expulsant hors de l'œil (95). En ce qui concerne les céphalosporines, une injection dans la chambre antérieure (intracaméculaire) de céfuroxime 1mg/0,1mL (céphalosporine de deuxième génération) a démontré son efficacité dans la prévention des endophtalmies post-opératoires et présente à ce jour le meilleur rapport coût-efficacité dans

cette situation (164). La ceftazidime est quant à elle l'antibiotique de choix pour le traitement des infections graves de l'œil à BGN (48, 98). Sa pénétration oculaire est faible après injection parentérale (17, 19, 139). Le recours à la voie IVT est donc incontournable dans ce type d'infection (18, 28, 182) avec une posologie recommandée de 2,25 mg/0,1 mL. Les carbapénèmes possèdent un large spectre d'action et sont réservés aux infections sévères à bactéries multi-résistantes. Ils présentent une excellente pénétration intra-oculaire et l'activité de l'imipénème-cilastatine (Tienam®) en tant que traitement adjuvant systémique curatif des endophtalmies bactériennes aiguës à bactéries sensibles a été établie grâce à des modèles expérimentaux (64). L'administration d'injections IV (500 à 750 mg x 4/j) ne dispense cependant pas du recours aux injections IVT d'antibiotiques en parallèle (65).

Aux posologies recommandées les différentes bêta-lactamines ne présentent pas de toxicité oculaires et sont bien tolérées (83, 108, 135, 194).

- **Fluoroquinolones**

Les fluoroquinolones, molécules lipophiles et de faible poids moléculaire, sont plébiscitées en ophtalmologie du fait de leur très bonne pénétration oculaire après administration par voie systémique (50) ou topique (180), et de leur large spectre d'activité antibactérienne. Leur utilisation a débuté dans les années 90s aux Etats-Unis avec l'introduction de préparations topiques de ciprofloxacine, d'ofloxacine et de norfloxacine, largement utilisées dans le traitement et la prophylaxie des infections oculaires. Cependant, leur activité *in vitro* a sensiblement diminué depuis leur introduction (96). En France et à ce jour, la lévofloxacine et la moxifloxacine sont utilisées hors AMM sous forme orale dans le traitement des infections profondes de l'œil (149). L'administration des fluoroquinolones par injections directes dans l'humeur vitrée est limitée à ce jour en raison d'une toxicité potentielle qui est cependant controversée. (172, 190).

- **Aminosides**

Bien que possédant un faible poids moléculaire (400-600 Da), les aminosides sont très hydrophiles et traversent mal les barrières hémato-oculaires, ils ont donc été utilisés par voie IVT dans le traitement des endophtalmies (62). Historiquement, l'amikacine était l'un des antibiotiques les plus utilisés, jusqu'à ce que sa toxicité rétinienne soit établie (56, 87) (20, 109, 163). Les doses thérapeutiques étant proches des doses toxiques et les erreurs de dilutions possibles, les aminosides ont progressivement été remplacés par les céphalosporines de 3^{ème} génération pour les infections à BGN : l'amikacine et la ceftazidime présentent approximativement le même taux de succès contre les BGN (89%) (85). Actuellement l'injection IVT d'aminosides conserve de rares indications, principalement les infections à BGN résistantes aux céphalosporines et les patients allergiques aux bêta-lactamines. L'administration d'amikacine en IVT s'effectue à la dose de 0,4 mg/0,1 mL.

- **Glycopeptides**

Les glycopeptides sont indiqués dans le traitement hospitalier des infections bactériennes sévères à BGP résistantes aux β -lactamines ou en cas d'allergie à ces dernières. La voie parentérale ne permettant pas d'atteindre des concentrations oculaires suffisantes, cette voie n'est pas utilisée dans le cadre du traitement des infections oculaires sévères (43). Comme pour les céphalosporines et les aminosides, la vancomycine s'administre donc en injection IVT dans les cas d'endophtalmie (84). Chez l'animal, l'utilisation de la vancomycine en IVT aux doses thérapeutiques (1 mg/0,1 mL) ne s'est pas compliquée d'effets indésirables cliniques ou histopathologiques. La demi-vie oculaire de la vancomycine est beaucoup plus courte dans des yeux inflammés aphaques (sans cristallin) et aphaques + vitrectomisés, (de l'ordre de 9 heures) que dans des yeux inflammés phiques (environ 25h). Lors d'une rupture postérieure de la capsule, l'œil est considéré aphake. Ceci pourrait expliquer la répétition parfois nécessaire d'injection IVT de vancomycine au cours du traitement des endophtalmies bactériennes post-opératoires. Il a été montré qu'il n'y avait pas de risque d'augmenter la toxicité rétinienne

lorsqu'un intervalle de 48 h ou plus séparent deux injections (195). Selon les données de l'EVS, environ 7% des patients nécessitent une deuxième injection IVT de vancomycine.

Pour conclure, le traitement antibiotique empirique actuel des endophtalmies bactériennes aiguës post-opératoires en l'absence de documentation bactérienne consiste en une injection IVT en urgence de vancomycine (1 mg/0,1 mL) et de ceftazidime (2,25 mg/0,1 mL). Aux HUS, une antibiothérapie systémique est également mise en place pendant cinq jours avec lévofloxacine TAVANIC® 500 mg, un comprimé 2 fois par jour (ou IV) et imipénème-cilastatine (TIENAM®) 500mg/500mg, 4 injections IV par jour. La situation doit être réévaluée deux fois par jour. En cas d'aggravation et selon les résultats de l'antibiogramme, une deuxième injection IVT est à envisager à 72 heures, plus ou moins associée à une vitrectomie après contrôle de l'inflammation oculaire (en général après 10 jours de traitement). Cette prise en charge a permis d'améliorer le pronostic visuel final en comparaison avec les résultats de l'étude EVS (données non publiées).

- **Les traitements adjuvants**

La lutte contre l'inflammation intra-oculaire associée à l'endophtalmie a longtemps été négligée et l'utilisation de corticostéroïdes dans ce contexte demeure un sujet de controverse. L'injection IVT de dexaméthasone parallèlement à une antibiothérapie a été étudiée dans le but de minimiser le mécanisme inflammatoire. Selon les études expérimentales animales et les essais cliniques réalisés, l'intérêt de l'association antibiotique-corticoïde est variable: positive, négative ou sans effet (161). Malgré ces controverses, la dexaméthasone (0.4 mg en IVT) est fréquemment utilisée en tant qu'adjuvant aux antibiotiques dans le traitement de l'endophtalmie. La vitrectomie est quant à elle un traitement adjuvant utilisé pour débrider et éliminer le foyer infectieux dans les cas d'endophtalmie sévère.

III.4.3 Recherche et développement de nouvelles classes antibactériennes

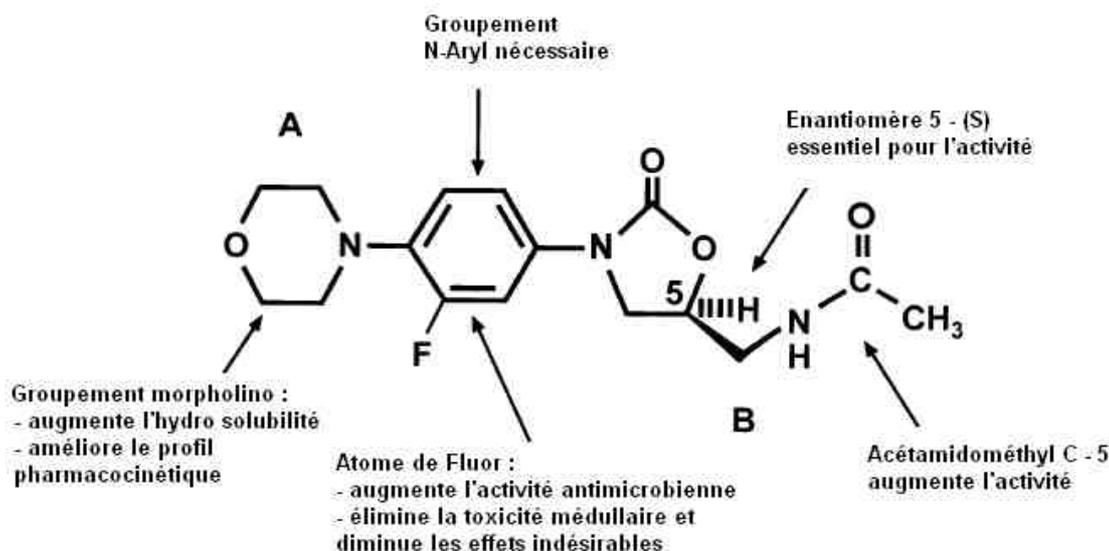
L'émergence actuelle de bactéries multi-résistantes (BMR), qui ne sont sensibles qu'à un très petit nombre d'antibiotiques, est particulièrement préoccupant. Cette « multi-résistance » s'explique par l'addition de plusieurs mécanismes de résistance, qu'ils soient naturels et/ou acquis. Ces différentes BMR se dispersent selon un mode épidémique et trouver des traitements bactéricides efficaces pour leur prise en charge est un véritable problème de santé publique. Les données d'un réseau de surveillance américain comprenant plus de 200 laboratoires aux Etats-Unis, montrent que la proportion de SAMR dans les infections oculaires a augmenté de 29,5% en 2000 à 41,6% en 2005, et que les souches résistantes à la méticilline seront plus courantes que les souches méticilline-sensibles dans les cas d'infections oculaires sévères, dans les 2 ou 3 années à venir. De plus, les souches oculaires de SAMR présentaient une résistance à au moins trois autres classes d'antibiotiques (25, 71). Bien qu'aucune résistance à la vancomycine n'ait été rapportée dans un contexte d'infection intra-oculaire, il existe une tendance générale à une diminution de la sensibilité à la vancomycine dans les autres types infections à SAMR (166). De plus, 85% des SARM sont résistants aux fluoroquinolones (incluant les fluoroquinolones de dernière génération, gatifloxacine et moxifloxacine) (131). La résistance aux fluoroquinolones parmi les autres bactéries oculaires ne cesse d'augmenter et influera sur l'utilisation future de cette classe d'antibiotique dans le traitement de ces infections.

La recherche et le développement d'alternatives thérapeutiques sont donc une priorité urgente dans la prévention du risque d'échec thérapeutique des cas d'endophtalmie à staphylocoques. Parmi les nouvelles molécules anti-staphylococciques sorties sur le marché ces dernières décennies, **notre intérêt s'est porté sur le linézolide et la daptomycine et sur leur rôle potentiel dans le traitement des endophtalmies aiguës à *S. aureus*.**

IV. LINEZOLIDE (LZD)

IV.1 Découverte et présentation de la molécule

En 1987, l'entreprise américaine E.I. Du Pont de Nemours and Company annonce la découverte d'une nouvelle classe d'antibiotiques de synthèse, les oxazolidinones. Les molécules DuP 105 et DuP 721 présentent alors des CMI respectives de 4-16 µg/mL et 1-4 µg/mL, pour les espèces bactériennes suivantes : *S. aureus* (SARM et SASM), *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* ; Streptocoques groupes A, B et D ; *Bacteroides spp.*, *Fusobacterium spp.* (bactéries anaérobies à coloration de Gram négative). Ces molécules se révèlent inactives vis-à-vis des entérobactéries et des espèces fongiques (171). Au cours de tests de sécurité réalisés sur des rats, une toxicité médullaire a été observée (12) et le développement des molécules est arrêté. L'entreprise Pharmacia and Upjohn reprendra par la suite l'étude de cette famille d'antibiotique et elle déposera en 1996 un brevet pour deux dérivés chimiques d'oxazolidinones : U-100592 (éperézolide) and U-100766 (linézolide) (42). Seul le linézolide se révélera applicable cliniquement et sera développé jusqu'à sa commercialisation. La Figure 8 représente la structure chimique de base des oxazolidinones. Le groupement B acétamide est responsable de l'activité antimicrobienne la plus puissante. L'altération de ce groupement diminue significativement l'activité antimicrobienne (81). Des études *in vivo* ont reporté que la modification de la structure chimique du groupement A morpholino et l'addition d'un substitut fluoré sur le phényl en position 3 élimineraient les effets de toxicité médullaire, diminuerait les effets secondaires et augmenterait l'activité antimicrobienne. La taille du substituant en position 3 est très importante : plus celui-ci est large, plus l'activité anti-microbienne diminue (42).



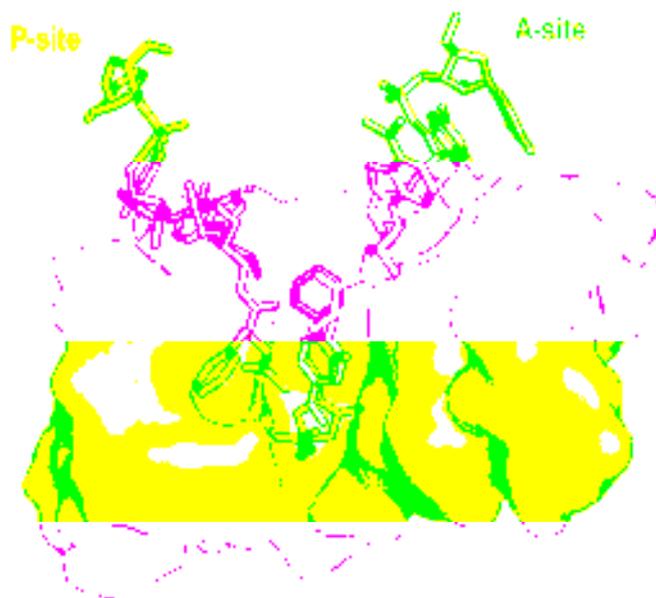
[Figure 8](#). Relation structure-activité du linézolide. D'après (196)

IV.2 Mécanisme d'action

Les ribosomes bactériens sont composés d'ARN ribosomiaux (ARNr) et de protéines et sont structurés sous forme de deux sous-unités : une grande sous-unité (50S) et une petite sous-unité (30S). La sous-unité 30S est constituée d'un ARNr 16S (1541 nucléotides) et de 21 protéines. La sous-unité 50S est constituée des ARNr 23S (2904 nucléotides) et 5S (120 nucléotides) ainsi que de 32 protéines. Enfin le ribosome bactérien comporte trois sites spécifiques : le **site A** (site de fixation des amino-acyl-ARNt), le site P (site de fixation du peptide-ARNt) et le site E (site de sortie du peptide nouvellement formé). La synthèse protéique bactérienne (ou traduction) se déroule en trois étapes principales au niveau du ribosome bactérien : l'initiation, l'élongation et la terminaison. A ce jour de nombreuses classes d'antibiotiques agissent en inhibant la synthèse protéique : ainsi par exemple les macrolides, lincosamides et synergistines se fixent au niveau de l'ARN 23S de la sous-unité 50S (site P) du ribosome bactérien et inhibent la phase d'élongation de la synthèse protéique par blocage de la translocation ou des transferts peptidiques. Les tétracyclines ainsi que l'acide fusidique empêchent la fixation des amino-acyl-ARNt. Les aminosides se fixent à l'ARN 16S

de la sous-unité 30S du ribosome bactérien et altèrent toutes les étapes de la synthèse protéique.

Un mécanisme d'action unique (Figure 9) : Il a été montré que le linézolide s'attachait à l'ARN 23S de la sous-unité 50S du ribosome de *S. aureus*. Le site A du centre peptidyltransférase du ribosome bactérien serait le site principal de liaison du linézolide (114).



[Figure 9](#). Site de liaison du linézolide (site A) dans la sous-unité 50S du ribosome bactérien.

D'après (114)

Il a été montré que le linézolide se liait également aux ribosomes mitochondriaux des cellules humaines (au niveau du site A de la grosse sous-unité de ces ribosomes). Le linézolide peut donc inhiber la synthèse protéique mitochondriale, pouvant expliquer les effets secondaires de myélosuppression observés suite à une thérapie au long cours de linézolide (114).

IV.3 Spectre d'activité et de résistance

- Spectre d'activité

Le linézolide est hautement actif contre les bactéries à Gram positif (GP) aérobies, dont *S. aureus*, mais il est également actif vis-à-vis de certaines bactéries GP anaérobies. Il est aussi actif contre certaines bactéries anaérobies à Gram négatif (GN) et plusieurs espèces de mycobactéries (*Mycobacterium tuberculosis* et *M. avium* dont l'efficacité clinique reste à démontrer). En contraste, les bactéries GN aérobies semblent être naturellement résistantes au linézolide (Tableau 2).

Espèces habituellement sensibles	Concentrations critiques (CA-SFM 2012)
Bactéries GP aérobies	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Sensible ≤ 4 mg/L Résistant > 4 mg/L
Staphylocoques à coagulase négative	
<i>E. faecalis, E. faecium</i>	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
<i>Streptococcus sp.</i>	Sensible ≤ 2 mg/L Résistant > 4 mg/L
<i>Listeria monocytogenes</i>	
<i>Corynebacterium spp.</i>	
<i>Bacillus spp.</i>	
<i>Rhodococcus equi</i>	
<i>Nocardia spp.</i>	
Bactéries GP et GN anaérobies	
<i>Peptostreptococcus sp.</i>	Sensible ≤ 2 mg/L Résistant > 4 mg/L
<i>Actinomyces spp.</i>	
<i>Clostridium difficile, C. perfringens</i>	
<i>Fusobacterium spp.</i>	
<i>Bacteroides fragilis</i>	

[Tableau 2.](#) Spectre d'activité du linézolide et concentrations critiques 2012 du CA-SFM.

- **Résistance**

Le mécanisme d'action unique du linézolide permet d'envisager à priori que la résistance croisée avec les autres classes d'antibiotiques est peu probable. Cependant des cas de résistance ont été publiés dès les essais de phase III (6) et plus encore depuis son utilisation clinique. Un réseau de surveillance de l'émergence de résistance au linézolide (Zyvox® Annual Appraisal of Potency and Spectrum Program, ou ZAAPS Program) a été créé afin de suivre l'évolution, chaque année, de l'activité et de la sensibilité *in vitro* (CMI₅₀ et CMI₉₀) du linézolide sur des bactéries à Gram positif en Europe, au Canada, dans la région Asie-pacifique et en Amérique du Sud. Entre 2002 et 2009, plus de 20 000 souches ont été testées et les valeurs des CMI₉₀ obtenues sont restées constantes sur toute cette période pour les différents groupes d'espèces pathogènes étudiées : *S. aureus* (2 µg/mL), SCN (1µg/mL), *Enterococcus spp.* (2 µg/mL) et *Streptococcus spp.* (1µg/mL) (35, 101-103). Le rapport le plus récent concernant les pays européens a été publié en 2011 (158). Il résume les résultats observés sur la période 2002-2009 dans 11 pays européens: aucune souche résistante n'a été documentée entre 2002 et 2005. Depuis 2006, ont émergé en Europe quelques souches résistantes de *S. aureus* (mutant isolée en Irlande en 2007), *S. epidermidis* (France et Italie, de 2006 à 2009), *E. faecium* (Allemagne, 2006, 2008 et 2009) et *E. faecalis* (Suède en 2008, Royaume-Uni en 2008 et Allemagne en 2009). Cependant le taux de sensibilité au linézolide sur la totalité des 13 404 souches pathogènes testées était respectivement > 99,9, 99,7 et 99,6% pour les souches de *S. aureus*, les staphylocoques à coagulase négative et les entérocoques. Toutes les souches de streptocoques étaient sensibles (CMI₉₀, 1 mg/l).

Le premier mécanisme de résistance identifié concernait des mutations au niveau du site de liaison du linézolide dans la sous-unité 50S ribosome bactérien (ARN 23S ou protéines ribosomales L3 et L4) et était lié à une exposition prolongée au linézolide. Plus récemment, le gène *cfr* a émergé en tant que nouveau mécanisme de résistance au linézolide ainsi qu'à d'autres classes d'antimicrobiens (35).

IV.4 Indications cliniques

- **Présentation et posologie**

Le linézolide est commercialisé en France depuis 2001 par le laboratoire Pfizer. Il est disponible sous trois formes galéniques différentes :

ZYVOXID[®] 2mg/mL, solution pour perfusion IV, poche de 300 mL.

ZYVOXID[®] 600 mg, comprimés pelliculés.

ZYVOXID[®] 100 mg/5mL, granulés pour suspension buvable. Flacon 66g.

- **Indications AMM et hors-AMM**

En France, le linézolide possède à ce jour une AMM pour les indications suivantes : traitement des pneumonies communautaires et nosocomiales, lorsqu'elles sont documentées ou suspectées à bactéries à Gram positif sensibles. Et traitement des infections compliquées de la peau et des tissus mous, uniquement lorsqu'elles sont microbiologiquement documentées à bactéries à Gram positif sensibles. La posologie recommandée est de 600mg /12h, par voie orale ou intra-veineuse, pour une durée maximale de traitement recommandée de 28 jours. Le linézolide n'a pas reçu d'approbation pour l'utilisation dans les cas de septicémie à point de départ d'un cathéter, d'infection du site d'implantation du cathéter ou pour le traitement des infections à bactéries à Gram négatif. En effet une note d' « information importante de pharmacovigilance » a été publiée par Pfizer, en date du 22 mars 2007, afin de communiquer les résultats d'une étude clinique de phase III chez des patients présentant une septicémie à Gram positif sur cathéter. Cette note a conduit à une restriction d'indication du linézolide indiquée sur le RCP de la manière suivante : « En cas d'infection bactérienne à Gram positif compliquée de la peau et des tissus mous associée à une infection à Gram négatif documentée ou suspectée, le linézolide ne doit être utilisé qu'en l'absence d'alternative thérapeutique. Dans de telles circonstances, un traitement couvrant les germes à Gram négatif doit être initié de façon concomittante. » La même mention a été rajoutée concernant les pneumonies nosocomiales et communautaires.

IV.5 Tolérance

Le ZYVOXID[®] présente une bonne tolérance générale. Cependant en mars 2006, une lettre d'information de pharmacovigilance a été envoyée par le laboratoire Pfizer, en accord avec l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (Afssaps), à tous les prescripteurs susceptibles de prescrire du ZYVOXID[®] : réanimateurs, infectiologues, microbiologistes, pneumologues, hématologues, ophtalmologues (de ville et hospitaliers), internistes, pharmaciens hospitaliers, neurologues (de ville et hospitaliers). Cette lettre précisait que de rares cas de neuropathie périphérique, de neuropathie optique évoluant parfois vers une perte de la vision, d'anémie nécessitant une transfusion sanguine et d'acidose lactique avaient été rapportés. L'incidence réelle de ces effets indésirables est cependant difficile à établir du fait des limites de la notification spontanée. Ces cas ont été essentiellement observés chez des patients traités au-delà de la durée maximale recommandée de 28 jours, c'est pourquoi le laboratoire Pfizer annonce une modification du RCP pour renforcer l'information sur les risques liés à l'utilisation au long cours : « Une surveillance étroite de la numération formule sanguine et des plaquettes est recommandée pour des traitements se prolongeant au delà de 10 à 14 jours. » De plus il est précisé que « le rapport efficacité/effets indésirables du linézolide dans des pathologies infectieuses requérant une antibiothérapie prolongée (supérieure à 28 jours) tels que les infections ostéo-articulaires n'est pas établi ».

En 2012, selon le site de l'Agence National de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM, agence remplaçant l'Afssaps), le ZYVOXID[®] fait partie des médicaments sur la liste du suivi national renforcé de surveillance pour le motif suivant : « risque d'atteintes hématologiques et risque d'acidose lactique associés à une utilisation prolongée hors AMM ».

IV.6 PK/PD

- **Pharmacocinétique**

Le linézolide est rapidement absorbé par voie intestinale et présente une biodisponibilité orale de presque 100% chez des volontaires sains. Cette caractéristique est très intéressante car elle permet, après administration de linézolide par voie intraveineuse, un relais précoce par voie orale sans aucun ajustement de dose. Un traitement initié directement par voie orale est également envisageable. Après administration de doses de 600 mg toutes les 12 heures par voie orale, les concentrations plasmatiques maximales à l'équilibre (C_{max}) sont de 15-27 mg/L et sont atteintes entre 0,5 et 2 h après administration (59). La prise orale de linézolide en même temps qu'un repas riche en graisse diminue C_{max} d'environ 20% et prolonge T_{max} de 1-2 h, mais n'affecte pas l'ASC. L'absorption orale n'est pas affectée par une co-administration d'anti-acides. Une étude récente chez 8 adultes présentant une mucoviscidose a montré que la biodisponibilité du linézolide était réduite à 85% chez ces patients, en raison d'une déficience en enzymes pancréatiques.

L'état d'équilibre est atteint trois jours après administration du schéma d'administration biquotidien. L'administration *per os* ou IV de 375, 500 et 625 mg de linézolide toutes les 12h, ont montré que les C_{max} et les ASC du linézolide étaient proportionnelles à la dose administrée : la pharmacocinétique du linézolide est donc linéaire (125).

Le linézolide est faiblement lié aux protéines plasmatiques (30%). Il est métabolisé via une oxydation hépatique mais n'est ni un inhibiteur, ni un substrat des cytochromes P450 (196) Le volume de distribution est d'approximativement de 40 – 50 L ce qui correspond approximativement au contenu total en eau du corps. Le linézolide possède une très bonne pénétration tissulaire permettant une grande diversité d'applications cliniques autorisées ou encore hors AMM. En effet, après administration, le linézolide est distribué à tous les compartiments d'eau du corps et est trouvé dans différents tissus et fluides biologiques incluant la salive, le liquide céphalo-rachidien, le liquide broncho-alvéolaire, la graisse, les os et les muscles (125, 196). Le linézolide présente une demi-vie d'élimination plasmatique

d'environ 5-7 h.. 30% de la dose administrée est sécrétée de manière inchangée dans les urines. Le reste est métabolisé au niveau extra-rénal et rénal en deux métabolites principaux inactifs. Environ 55% sont excrétés dans les urines et 10% dans les fécés sous forme de métabolites. Aucun ajustement de dose n'est nécessaire que ce soit lors d'une insuffisance rénale ou hépatique (134, 196). 30 à 40% de la dose sont éliminés par hémodialyse nécessitant une administration post-hémodialyse (21, 72). Aucune intoxication au linézolide chez l'homme n'a été reportée dans la littérature à ce jour mais dans de tels circonstances, une hémodialyse serait efficace.

- **Pharmacodynamie**

Le linézolide est un antibiotique bactériostatique temps-dépendant, lorsqu'il est administré aux concentrations cliniques recommandées (600mg/12h en perf continue), avec une diminution de l'inoculum bactérien de 1-2 log/24h. En ce qui concerne la pharmacodynamie du linézolide, Mac Gowan (125) et Buchanan et al (45) ont montré que le paramètre T>CMI était le paramètre PK/PD capable de prédire le mieux l'efficacité antibactérienne du linézolide. Ce résultat est le fruit de l'analyse de données d'études réalisées **chez l'animal**. Ainsi, pour un modèle d'infection de la cuisse à *S. aureus* chez la souris, une valeur T>CMI égale à 40% a produit un effet bactériostatique net pendant 24h. Dans un modèle de pneumonie à *S. pneumoniae* chez le rat, les résultats ont démontré que T>CMI >45% était le meilleur paramètre prédictif de la guérison.

Comme il peut être attendu pour un antibiotique pour lequel T>CMI détermine la guérison clinique, l'utilisation de perfusion continue a été étudiée et comparée à la perfusion discontinue réalisée toutes les 12 heures. Ainsi J. Caillon et al. ont montré dans un modèle d'endocardite à *S. aureus* chez le lapin (99) qu'une perfusion continue à débit constant permettait d'observer une activité bactéricide sur des souches de SARM avec un gain de 2 à 4 log UFC/g de végétations par rapport à la perfusion discontinue, avec la même posologie

(dose simulant l'administration de 10mg/kg/12h chez l'homme). La perfusion discontinue ne présentant qu'une activité bactériostatique.

Chez l'homme, l'équipe de *Rayner et al.* (155) publia en 2003 une étude évaluant les paramètres PK/PD les mieux corrélés à l'efficacité bactérioclinique du linézolide. Cette analyse rétrospective, a été réalisée chez des patients adultes fortement débilisés, présentant des complications infectieuses avec de nombreux facteurs de co-morbidités associés et inclus dans un programme compassionnel (n=288). Ces patients recevaient une dose de 600mg de linézolide *per os* ou IV toutes les 12 heures. Les résultats de cette étude ont montré que l'éradication bactérienne et la guérison clinique étaient le plus souvent corrélées de manière similaire aux paramètres: T>CMI et ASC/CMI. Cependant on pouvait observer des différences spécifiques selon les tissus infectés, voir [Tableau 3](#) :

	Eradication bactérienne	Guérison clinique
Septicémies	ASC/CMI et T>CMI	ASC/CMI et T>CMI
Infections de la peau et des tissus mous	ASC/CMI et T>CMI	
Infections des voies respiratoires basses	ASC/CMI et T>CMI	ASC/CMI et T>CMI
Infections osseuses	ASC/CMI	

[Tableau 3](#). Pharmacodynamie du linézolide chez l'homme (155)

Enfin le taux de guérison clinique le plus élevé a eu lieu pour des valeurs de ASC/CMI situées entre 80 et 120 et lorsque T>CMI était égal à 100 %.

Le linézolide ne possède pas d'effet inoculum à la différence de la vancomycine et il présente un effet post-antibiotique court de 2 à 4 h pour les infections à *S. aureus*, à entérocoques et à *S. pneumoniae*.

Enfin à des concentrations sub-inhibitrices, le linézolide présente des caractéristiques immunomodulatrices : il agit sur les facteurs de virulence, tels que coagulase et hémolysine produits par *S. aureus*, en modifiant leur expression et il augmente la sensibilité à la phagocytose (33).

V. DAPTOMYCINE (DAP)

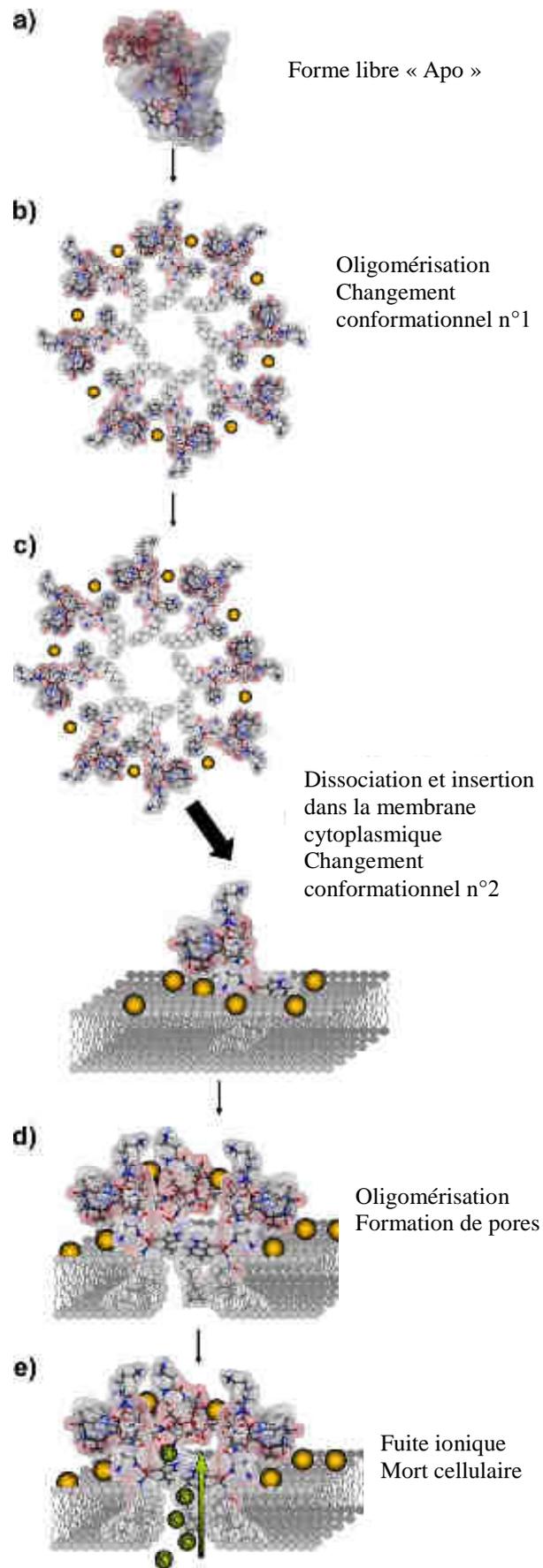
V.I Découverte et présentation de la molécule

La daptomycine est un produit naturel provenant d'un actinomycète du sol, comme la plupart des antibiotiques utilisés en clinique à ce jour (érythromycine, vancomycine, teicoplanine, tétracyclines, céphalosporines, rifamycine...) (5). Le micro-organisme à l'origine de la daptomycine, *Streptomyces roseosporus*, a été isolé à partir d'un échantillon du sol du mont Ararat (Turquie), par des scientifiques de l'entreprise pharmaceutique Eli Lilly. Cet actinomycète sporulant produit un complexe d'antibiotiques lipopeptidiques. Des modifications au cours d'un mécanisme de fermentation, par clivage enzymatique de la longue chaîne peptidique naturelle de ces molécules, puis réacylation par une chaîne d'acide décanoïque et formation d'un cœur peptidique cyclique, ont permis d'obtenir la daptomycine. La figure 4 présente la structure particulière de ce composé macrocyclique comprenant 13 acides aminés (partie hydrophile), dont 10 formant un cycle, et une chaîne d'acide gras linéaire n-decanoyl (partie hydrophobe) (175).



Figure 10. Structure de la daptomycine

Il s'agit donc d'une molécule amphiphile avec une charge moléculaire totale anionique à pH neutre (quatre résidus acides : trois acides aspartiques et un acide glutamique 3-méthylé ; un résidu basique : ornithine) et un haut poids moléculaire (1621 g/mol). Suite aux résultats des premiers tests d'efficacité *in vivo* et de faible toxicité chez l'animal (3)(63), Eli Lilly décida de lancer le développement clinique de cette molécule. Les premiers essais cliniques chez l'homme commencèrent dans les années 1980 et 1990 sur l'étude de la daptomycine administrée par IV. Après administration de 4 mg/kg deux fois par jour, des effets indésirables sévères impliquant le système musculo-squelettique, avec mise en évidence d'une augmentation des taux de créatine phosphokinase (CPK), décidèrent la firme à suspendre les essais cliniques (176). En raison d'une trop petite fenêtre entre efficacité et sécurité, la direction du service de recherche et développement en maladies infectieuses d'Eli Lilly stoppa le développement générale de la molécule et l'antibiotique fut mis « sur le banc de touche ». En 1997, l'entreprise Cubist Pharmaceuticals, racheta la licence de développement de la daptomycine ainsi que les droits de commercialisation et reprit les essais. Des études chez le chien montrèrent alors qu'une administration unique quotidienne de daptomycine IV était capable de minimiser les effets indésirables impliquant le système musculo-squelettique (143). Sur la base des résultats de nouveaux essais cliniques de phase 1, 2 et 3, la daptomycine est alors considérée par l'agence de sécurité sanitaire des produits de santé des Etats-Unis (Food and Drug Administration, ou FDA) comme efficace et non toxique aux posologies de 4 et 6 mg/kg, en une administration quotidienne, dans le traitement respectif des infections compliquées de la peau et des tissus mous (approbation en 2003) et des bactériémies (approbation en 2006) (1)(70).



[Figure 11](#). Schéma représentant le mécanisme d'action de la daptomycine. D'après (138, 174).

V.2 Mécanisme d'action

La daptomycine, premier représentant de la classe des lipopeptides cycliques à être utilisé en pratique clinique, présente un mécanisme d'action unique totalement dépendant du calcium. Il a été clairement établi que le calcium permet à la daptomycine de s'insérer et de s'accrocher à la membrane cytoplasmique des bactéries, étape essentielle pour l'activité antimicrobienne de cet antibiotique (63). En l'absence de calcium, la daptomycine a une concentration minimale inhibitrice (CMI) supérieure à 64 µg/mL tandis qu'en présence de 0,34 mM, 2 mM et 5 mM de Ca²⁺ les CMI diminuent progressivement de 2 à 1 et 0,625 µg/mL (105). Les ions divalents Ca²⁺ créent un pont entre les charges acides de la daptomycine lui permettant d'agir comme un peptide cationique capable de se lier aux acides gras de la membrane cytoplasmique bactérienne par des liaisons électrostatiques. (104, 174). A ce jour les connaissances sur le mécanisme d'action de la daptomycine sont les suivantes (93, 138, 174) : la daptomycine pénètre le peptidoglycane de la paroi puis les ions Ca²⁺ se lient à l'antibiotique et entraînent une première oligomérisation et la formation de micelles qui jouent un rôle de véhicule délivrant de hautes concentrations de daptomycine jusqu'à la membrane cytoplasmique de la bactérie. Au niveau de cette membrane bactérienne l'interaction daptomycine/Ca²⁺ avec les charges négatives des phospholipides de membrane induit un second changement conformationnel de la daptomycine qui induit une oligomérisation et une insertion plus profonde dans la membrane avec formation de pores et altération de l'intégrité de cette membrane, entraînant une fuite des ions K⁺ intra-cellulaires aboutissant à une dépolarisation membranaire. Ce mécanisme mène à l'inhibition de la synthèse des protéines, ARN et ADN et finalement à une mort rapide de bactérie sans lyse bactérienne (Figure 11).

L'action directe sur la bicouche lipidique membranaire suggère que la daptomycine pourrait agir indépendamment de la phase de croissance bactérienne ou de l'activité métabolique cellulaire. Les premiers résultats d'études *in vitro* de l'activité bactéricide de la daptomycine sur des bactéries en phase stationnaire, en arrêt de croissance chimique, ou dans un contexte de biofilm bactérien confirment cette hypothèse et permettent d'envisager fortement l'utilisation

future de cet antibiotique dans le traitement et/ou la prévention des infections associées à des dispositifs médicaux tels que des cathéters ou des prothèses (119, 129)(2).

V.3 Spectre d'activité et résistance

- **Spectre d'activité**

La plupart des bactéries GP sont habituellement sensibles à la daptomycine: *Staphylococcus aureus* (incluant les souches méticilline-résistantes et les souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides), staphylocoques à coagulase négative, *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* (incluant les souches résistantes aux pénicillines), *Enterococcus faecium* et *E. faecalis* (incluant les souches d'entérocoques résistantes aux glycopeptides). La daptomycine est également active sur les bactéries GP anaérobies comme les *Clostridium sp.* ou *Propionibacterium acnes* (162). En 2012, le CA-SFM renseigne un seuil critique de sensibilité uniquement pour les souches de *S. aureus* : CMI ≤ 1 mg/L.

- **Résistance**

Les bactéries GN sont naturellement résistantes à la daptomycine en raison du haut poids moléculaire de la molécule empêchant le passage à travers les porines de la membrane externe de ces bactéries. En ce qui concerne les BGP, une étude *in vitro* a été réalisée pour déterminer l'émergence de la résistance à la daptomycine. Le taux d'apparition spontanée de mutants résistants était très faible ($<10^{-10}$ pour *S. aureus*, $<10^{-9}$ pour *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* et $<10^{-8}$ pour *Streptococcus pneumoniae*), et les CMI des mutants sélectionnés présentaient une augmentation relativement modeste par rapport à la souche parentale (CMI 8 à 32 fois supérieure) en comparaison avec les données des autres antibiotiques. La daptomycine restait bactéricide contre tous les mutants à 8 fois la CMI et ces mutants ne présentaient pas de résistance croisée à la vancomycine ou à l'ampicilline (169). Depuis le début de son utilisation en pratique clinique en 2003, quelques cas de souches non sensibles à la daptomycine ont été observées pour *E. faecium*, *S. epidermidis* méticilline-

résistant et SAMR (92, 121, 128, 170). Des cas cliniques impliquant des souches de *S. aureus* de sensibilité diminuée à la vancomycine (VISA) suite à un traitement prolongé par daptomycine et *vice versa* et se soldant par des échecs thérapeutiques ont également été rapportés (55, 127). Des observations cliniques similaires ont été décrites pour des infections à entérocoques (121, 137). Les hypothèses tentant d'expliquer ces cas de résistance croisée à la vancomycine et à la daptomycine, se fondent sur la similarité des sites d'action de ces deux molécules: en effet, elles doivent toutes les deux pénétrer à travers la paroi de peptidoglycane des BGP avant d'atteindre la membrane cytoplasmique, où se trouve leur cible d'action. Pour rappel, la vancomycine est un antibiotique de la classe des glycopeptides, se fixant aux extrémités D-alanine-D-alanine terminales des précurseurs penta-peptidiques impliqués dans la synthèse du peptidoglycane des parois bactériennes. Il a été démontré que l'épaississement de la paroi bactérienne était une caractéristique commune des souches VISAs, bloquant ainsi la pénétration de la vancomycine jusqu'à proximité de la membrane cytoplasmique, où se trouve sa cible. La daptomycine est une molécule de haut poids moléculaire (1621 Da), comme la vancomycine (1486 Da), ce qui laisse supposer un passage difficile des parois de peptidoglycane aussi épaisses que celles des souches VISA, bloquant également l'atteinte de la membrane cytoplasmique. L'équipe de Cui *et al.* a établi une corrélation directe entre une sensibilité diminuée à la daptomycine et à la vancomycine et un épaississement de la paroi bactérienne chez 53 souches de *S. aureus* (55). La daptomycine ne serait donc pas l'antibiotique de choix dans le traitement des infections à *S. aureus* si une sensibilité diminuée à la vancomycine (ou à la teicoplanine) est suspectée ou documentée. Une autre étude a présenté quant à elle une souche de *S. aureus* résistante à la vancomycine (souche connue sous le nom « Michigan MRSA », CMI = 1,024 mg/L) mais hautement sensible à la daptomycine (CMI = 0,25 mg/L). La différence de sensibilité à la vancomycine et à la daptomycine chez cette souche pourrait s'expliquer par le fait que la résistance à la vancomycine n'est pas due à un épaississement de la paroi bactérienne, mais à la présence du gène *van A* du transposon Tn1546, responsable d'une modification de la cible même de la vancomycine, différente de

celle de la daptomycine. Aucune diminution de la sensibilité à la daptomycine suite à l'administration préalable d'antibiotiques autres que la vancomycine n'a été rapportée à ce jour. Dans les cas de sensibilité diminuée à la daptomycine, des associations avec d'autres antibiotiques, tels que la gentamicine ou la rifampicine, sont à envisager (54).

Les mécanismes de résistance exacts des bactéries contre la daptomycine n'ont pas encore été clairement identifiés. Cependant une étude récente a montré que certaines mutations du génome bactérien, liées à des modifications de la nature des phospholipides de la membrane cytoplasmique bactérienne, sont associées à une diminution de la sensibilité à la daptomycine (24). Ainsi l'équipe de Arias *et al.* a révélé sur une souche clinique d'*Enterococcus faecalis* résistante à la vancomycine, que les mutations d'un gène codant pour une enzyme du métabolisme phospholipidique (gène *GdpD*) et d'un gène codant pour une protéine de membrane (gène *LiaF*) étaient nécessaires et suffisantes pour entraîner une résistance à la daptomycine. Enfin une résistance tissu-spécifique, limitée aux poumons, a été mise en évidence: la daptomycine n'a pas présenté de critères de non-infériorité par rapport aux traitements standards dans les essais cliniques portant sur le traitement des pneumonies acquises communautaires (148). Des études *in vitro* ont montré que la daptomycine est séquestrée dans le surfactant pulmonaire bovin entraînant une inhibition de son activité antibactérienne (168).

V.4 Indications cliniques

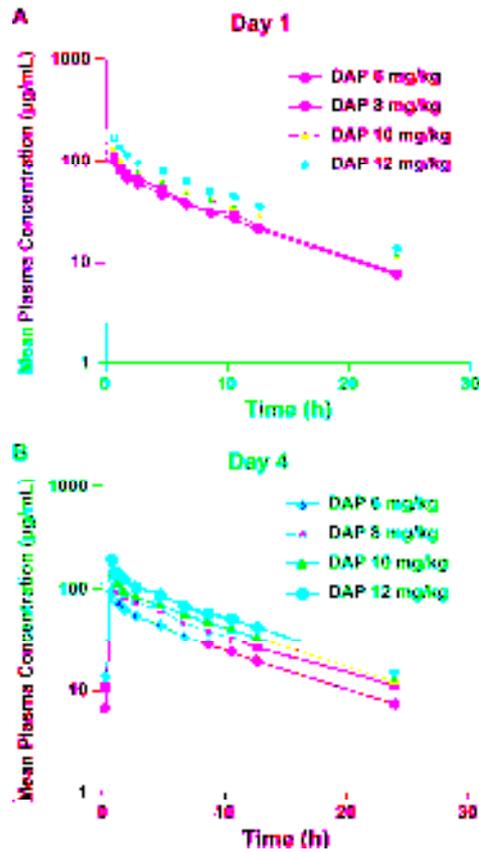
Depuis janvier 2006, la daptomycine possède une autorisation de mise sur le marché (AMM) dans plusieurs pays membres de l'Union Européenne. Elle y est distribuée par Novartis Pharmaceuticals, qui a obtenu les licences européennes, et elle est commercialisée sous le nom de spécialité Cubicin® pour le traitement des infections suivantes de l'adulte (15):

- Infections compliquées de la peau et des tissus mous (IcPTM). La dose recommandée est de 4 mg/kg administrée en une fois toutes les 24 heures, pendant 7 à 14 jours ou jusqu'à résolution de l'infection.
- Endocardite infectieuse (EI) du cœur droit due à *S. aureus*. La dose recommandée est de 6 mg/kg administrée en une fois toutes les 24 heures. La nécessité d'un traitement supérieure à 14 jours est fonction du risque de complications estimé pour chaque patient.
- Bactériémie à *S. aureus* lorsqu'elle est associée à une EI du cœur droit ou à une IcPTM. La dose recommandée est également de 6mg/kg/jour.

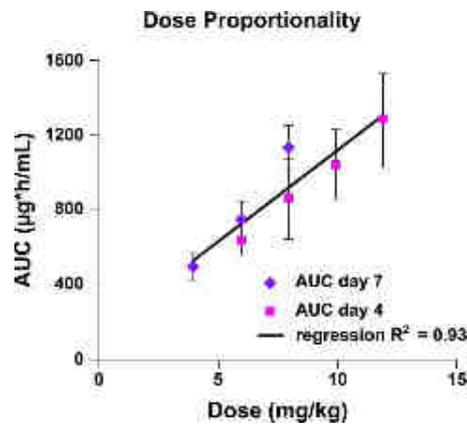
La daptomycine est efficace uniquement sur les BGP. En cas d'infections polymicrobiennes pouvant comporter des BGN et/ou certains types de bactéries anaérobies, Cubicin® doit être associé à un ou plusieurs antibactérien(s) adapté(s).

V.5 Tolérance

Il existe un risque de toxicité musculosquelettique sévère concernant l'administration de daptomycine. Lors des études de phase I et II, la daptomycine a été associée à des élévations importantes de créatine phosphokinase (CPK) lorsque la posologie étudiée était fractionnée en deux ou trois doses par jour. Cependant lorsque les doses sont administrées à 24 heures d'intervalle, cette augmentation des CPK est évitée.



[Figure 12](#). Courbes des concentrations plasmatiques de daptomycine en fonction du temps, après 1 jour (A) et 4 jours (B) d'administration intraveineuse quotidienne chez des volontaires sains. D'après (32).



[Figure 13](#). Corrélation entre l'AUC à l'équilibre et la dose administrée de daptomycine selon les données des études de Dvorchik *et al.* (4 à 8 mg/kg/j) (61) et de Benvenuto *et al.* (6 à 12 mg/kg/j) (32) chez des sujets sains.

Le muscle cardiaque semble épargné par cette toxicité dont les mécanismes ne sont pas encore élucidés. Une surveillance des CPK plasmatiques est donc recommandée à l'initiation du traitement et à intervalles réguliers. Le taux de CPK doit être dosé plus fréquemment chez les patients ayant un risque élevé de développer une myopathie.

V.6 PK/PD

- **Pharmacocinétique**

Chez des volontaires sains, la pharmacocinétique sérique de la daptomycine est linéaire et dose proportionnelle pour des doses de 4 à 12 mg/kg administrées par injection intraveineuse unique journalière pendant une durée allant jusqu'à 14 jours (32, 61). Selon l'étude réalisée par Benvenuto *et al.* (32), la demi-vie d'élimination plasmatique ($T_{1/2el}$) de la daptomycine est indépendante de la dose administrée et de la durée du traitement (voir Figure 12.). $T_{1/2el}$, environ 9h, est longue, avec une faible variation interindividuelle. De plus, l'aire sous la courbe concentration-*vs*-temps (ASC) à l'équilibre augmente proportionnellement à la dose administrée (Figure 13.). Toujours selon cette même étude, l'ASC à l'équilibre est de 747 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ après administration de 6 mg/kg/j et de 494 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ après administration de 4 mg/kg/j en perfusion IV de 30 minutes. Les concentrations plasmatiques maximales (C_{max}), atteintes à la fin des 30 minutes de perfusion, sont de 98.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et de 57.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivement. Un long effet post-antibiotique *in vivo* a été mis en évidence (5h pour *S. aureus* et 10h pour *S. pneumoniae*) (160). Ceci pourrait expliquer l'efficacité du schéma de la dose unique journalière. Des études sur des modèles expérimentaux animaux ont également montré que la daptomycine n'était pas absorbée dans des proportions significatives après administration orale. Une forme galénique pour administration orale n'est donc pas disponible. La daptomycine se lie fortement aux protéines plasmatiques humaines (90% de liaison en moyenne) de manière réversible et indépendante de sa concentration (116). Son faible volume de distribution (0.1 L/kg) est lié à ses caractéristiques physico-chimiques : avec une polarité élevée, une faible lipophilie, un haut poids moléculaire et un taux élevé de liaison aux

protéines plasmatiques, la distribution de la daptomycine se limite essentiellement au compartiment plasmatique et diffuse de manière limitée dans le compartiment extra-vasculaire (152, 191). Elle présente un métabolisme hépatique et systémique faible voir inexistant (pas de métabolisation par les cytochromes P 450, CYP450) et n'a pas de potentiel d'induction ou d'inhibition des principales isoformes de CYP450. Ainsi il semble peu probable que la daptomycine présente des interactions pharmacocinétiques avec des médicaments métabolisés par ces isoformes du CYP450 et administrés simultanément (142). La daptomycine est éliminée essentiellement par filtration glomérulaire. Environ 50% de la dose est retrouvé de manière inchangée dans les urines et environ 5% est excrété dans les fèces (179). Une étude a montré que la daptomycine était sujette à l'**efflux via les transporteurs P-gp** de macrophages humains, réduisant ainsi son accumulation intracellulaire et son activité contre les bactéries phagocytées. Ceci suggère qu'une administration concomitante d'inhibiteurs de P-gp pourrait moduler favorablement l'activité de la daptomycine dans les infections à staphylocoques difficiles à traiter et pour lesquelles la survie intracellulaire de ces bactéries peut jouer un rôle dans la chronicité de l'infection (120). Cependant il ne faut pas exclure que ces inhibiteurs de P-gp, également présents au niveau rénal, pourraient diminuer la clairance rénale de la daptomycine et amplifier les risques d'effets secondaires de type myopathie. L'interaction avec des médicaments inhibiteurs de P-gp (tels que le verapamil) est donc à surveiller et le développement de nouveaux dérivés de la famille des lipopeptides cycliques n'étant pas ou faiblement reconnus par les P-gp semble être une approche intéressante à étudier.

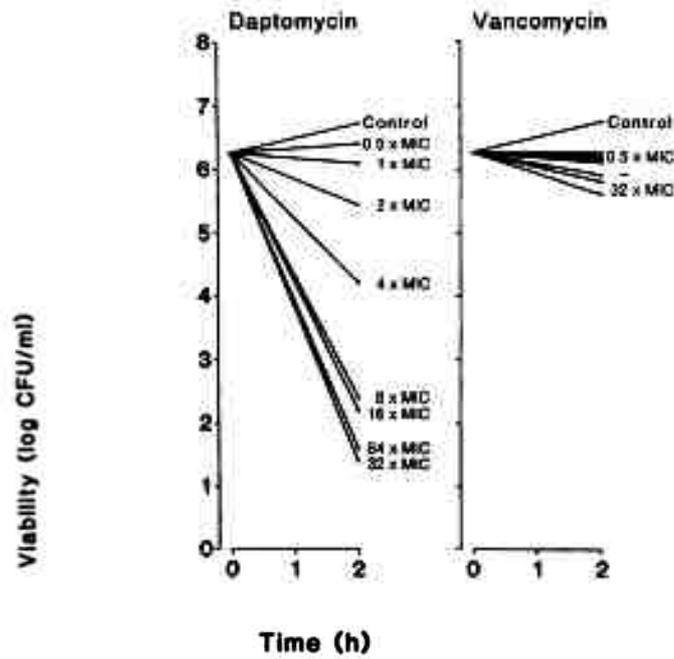


Figure 14. Etude de la bactéricidie *in vitro* de la daptomycine et de la vancomycine sur une souche de *S. aureus* ATCC 25923. D’après (86)

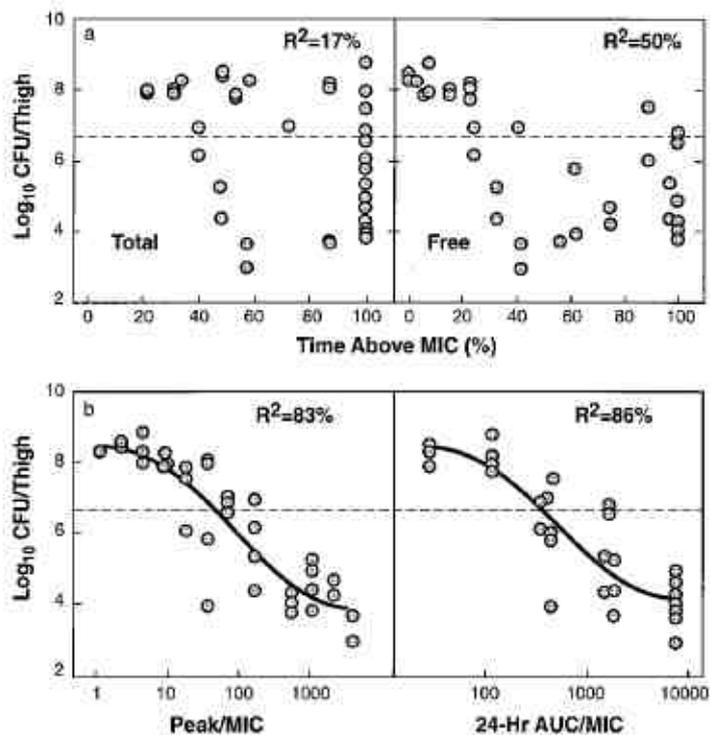


Figure 15. Relation entre les différents paramètres pharmacodynamiques de la daptomycine et le nombre de CFU de *S. aureus* ATCC 25923 dans un modèle d’infection musculaire de cuisses de souris neutropéniques. Après 24h de traitement par daptomycine. (a) Pas de corrélation entre le temps pendant lequel les concentrations en daptomycine (totales et libres) sont supérieures à la CMI ($T > CMI$) et le nombre de CFU. (b) Bonne corrélation entre les rapports C_{max}/CMI et ASC_{0-24h}/CMI , et le nombre de CFU. D’après (160).

A ce jour, des essais cliniques ainsi que des études rétrospectives, des cas cliniques et des modèles de simulation *in vitro* suggèrent une bonne tolérance de la daptomycine aux doses quotidiennes recommandées (4 et 6 mg/kg/j) ainsi qu'à de hautes doses (jusqu'à 12 mg/kg/j) pour des durées de traitement prolongées (192). Quelques patients ont cependant présenté une élévation significative des CPK sériques, accompagnée de myalgie lors de l'utilisation de doses supérieures à 6 mg/kg/j. L'arrêt du traitement par la daptomycine a mené à la résolution des symptômes (192).

- **Pharmacodynamie**

La daptomycine présente une activité bactéricide rapide (99,9% de mort cellulaire en 1 heure ; SAMS ou SAMR) et concentration-dépendante contre les BGP. Comme nous pouvons le voir sur la Figure 14, l'augmentation des concentrations de daptomycine sur la souche étudiée se traduit par une augmentation proportionnelle de la vitesse et de la profondeur de la bactéricidie. La vancomycine présente, quant à elle, une efficacité bactéricide dépendante du temps d'exposition à l'antibiotique (86).

Des études *in vivo* sur un modèle d'infection musculaire chez la souris neutropénique ont montré que les rapports C_{\max}/CMI (ou QI_{\max} , quotient inhibiteur maximum) et ASC_{0-24h}/CMI (ou ASIC) pour la daptomycine étaient les paramètres PK/PD les mieux corrélés à une efficacité contre des souches standards de *S. aureus* (122, 160) (Figure 15). Selon ces études, le rapport C_{\max}/CMI doit atteindre un seuil d'environ 100 et le rapport ASC_{0-24h}/CMI d'environ 500 pour obtenir une efficacité bactériostatique.

VI. ETUDES EXPERIMENTALES

VI.1 Introduction et objectifs

- **Introduction**

Ni le linézolide, ni la daptomycine ne possèdent à ce jour d'AMM pour une utilisation en ophtalmologie, cependant nombreuses de leurs caractéristiques les ont rendu éligibles pour notre travail expérimental : le linézolide et la daptomycine présentent un spectre d'activité antibactérienne important sur les bactéries à Gram positif (majoritairement impliquées dans les endophtalmies bactériennes aiguës), une efficacité sur les bactéries multi-résistantes (dont les souches résistantes à la vancomycine) et un mécanisme d'action particulier et unique diminuant le risque de résistance croisée avec les autres classes d'antibiotiques. De plus les résultats de la littérature tant *in vitro* qu'*in vivo*, chez l'animal et chez l'homme, montrent que ces molécules sont des options thérapeutiques intéressantes en termes d'efficacité et de tolérance en cas d'échec des traitements habituels, dans les infections profondes et sévères que sont les endophtalmies aiguës à *S. aureus*.

En ce qui concerne le linézolide, sa pénétration oculaire a été étudiée dans l'œil non inflammatoire chez l'homme après administration IV (94) et *per os* (68, 151). Les résultats ont souligné la capacité du linézolide à atteindre des concentrations inhibitrices ($\geq 4\text{mg/L}$), dans les fluides aqueux et/ou vitrés, pour la plupart des pathogènes Gram-positifs impliqués dans l'endophtalmie bactérienne aiguë. Cependant, dans ces études conduites chez l'homme, les concentrations vitréennes n'étaient pas mesurées chez les mêmes patients au cours du temps, pour des raisons éthiques évidentes. Il n'était donc pas possible d'obtenir des conclusions précises sur la pénétration oculaire du linézolide. Une étude de la toxicité du linézolide administré par voie IVT sur la fonction visuelle avait été réalisée sur des yeux de lapin. Les résultats ont montré que le linézolide était bien toléré mais l'étude concernait des doses très faibles d'antibiotique (jusqu'à $300\mu\text{g}/0.1\text{mL}$) (60). Aucune donnée n'étaient publiées sur des dysfonctionnements visuels liés à des doses plus élevées de linézolide, telles que les neuropathies optiques observées après administration par voie orale (74). **En ce qui**

concerne la daptomycine, le cas d'un seul patient présentant une endophtalmie endogène à SAMR a été publié (165). Les résultats ont montré que les concentrations vitréennes de daptomycine atteignaient 28% des concentrations sériques, après administration IV d'une dose de 10 mg/kg. Seule l'équipe de Comer *et al.* a publié une étude sur l'efficacité et la toxicité de la daptomycine dans un modèle expérimental d'endophtalmie. Les résultats ont montré qu'une injection IVT de 0.2 mg de daptomycine était efficace et non toxique dans un modèle d'endophtalmie à *S. epidermidis* chez une espèce de lapin pigmenté (51).

- **Objectifs de nos travaux**

Afin d'étudier la pénétration du linézolide dans les différents compartiments de l'œil, nous avons dans un premier temps travaillé sur des lapins sains :

Quelle est la pénétration intraoculaire du linézolide administré par voie topique ?

Quelle est la pénétration intraoculaire du linézolide administré par voie orale ?

Dans un deuxième temps, nous avons mis au point un modèle d'endophtalmie expérimentale à *S. aureus* chez le lapin et nous avons réalisé deux études parallèles :

Quelle est l'activité bactéricide du linézolide par rapport à la vancomycine (traitement de référence), administrés par voie IVT ? et quelle est l'activité bactéricide de la daptomycine par rapport à la vancomycine, administrés par voie IVT ?

Une analyse de la pharmacocinétique et la pharmacodynamie de ces deux antibiotiques dans les yeux de lapins infectés est présentée ainsi qu'une étude de leur toxicité intrinsèque sur les tissus intraoculaires et sur la fonction visuelle.

Nous avons utilisé le lapin, comme modèle animal expérimental, car il est adapté à l'évaluation de l'activité, de la toxicité et de la pharmacocinétique des antimicrobiens dans l'oeil (27, 30). En effet, les différentes structures de l'œil et la présence des barrières hémato-oculaires sont comparables à celles de l'œil humain. De plus, la taille du globe oculaire, le

volume d'humeur vitrée (entre 1 à 1,5 mL, vs 5mL chez l'homme) et la vitesse de renouvellement de l'humeur aqueuse permettent des ponctions précises dans les différents compartiments et des prélèvements répétés d' humeur aqueuse et d'humeur vitrée.

VI.2 Etude de la pénétration intraoculaire du linézolide chez le lapin sain

ARTICLE N°1 : LINEZOLIDE ADMINISTRE PAR VOIE TOPIQUE

Dans cette étude nous avons instillé à la surface d'un œil de chaque lapin (n=24), soit une goutte unique de linézolide (100µg de linézolide) soit une goutte répétée toutes les 15 minutes pendant une heure (dose totale de 400 µg de linézolide). Des échantillons d'humeur aqueuse, d'humeur vitrée, de conjonctive, de cornée et de sang ont été prélevés à différents temps chez les animaux. Les concentrations en linézolide dans ces échantillons ont été déterminées à l'aide d'une méthode par CLHP en phase inverse dédiée aux tissus oculaires, mise au point préalablement dans notre laboratoire (11).

Les résultats ont montré qu'après administration d'une goutte unique, la concentration maximale moyenne dans l'humeur aqueuse était de 0,87 mg/L alors qu'elle atteignait 2,18 mg/L après administration de gouttes répétées. Dans les yeux de lapins recevant des doses multiples, les concentrations de linézolide au niveau de la cornée et de la conjonctive étaient comprises entre 3 et 5 µg/g de tissu après 1 et 2 heures. Le linézolide pénètre donc dans tout le segment antérieur de l'œil après administration par voie topique. Par contre, la pénétration dans l'humeur vitrée était négligeable et indétectable dans le sérum des lapins.

D'après les données de cette première étude, l'utilisation du linézolide sous forme de collyre serait envisageable dans le traitement des infections oculaires superficielles (type kératite) à bactéries sensibles. Le linézolide n'atteignant pas le chambre postérieure de l'œil après administration par voie topique, nous n'avons pas poursuivi l'étude de cette forme galénique dans la prise en charge thérapeutique d'une endophtalmie aiguë à *S. aureus*.

ARTICLE N°2 : LINEZOLIDE ADMINISTRE PAR VOIE ORALE

Dans cette deuxième étude, nous avons tout d'abord recherché la dose de linézolide à administrer chez le lapin afin de mimer au mieux les concentrations sériques retrouvées chez l'homme après administration orale d'un comprimé de 600 mg. Cette adaptation posologique a été possible grâce aux données sur la linéarité de la pharmacocinétique sérique du linézolide (125). Les lapins ont ensuite été répartis en deux groupes distincts : l'un recevant la dose orale adaptée de manière unique (120mg), l'autre recevant des doses multiples (120 mg toutes les 12h pendant trois jours, afin d'atteindre l'état d'équilibre des concentrations plasmatiques). Des échantillons de sérum et d'humeur vitrée ont été collectés à 0, 30, 45 minutes et 1, 2, 4, 6, 8 et 12 heures suivant l'administration de linézolide chez les lapins.

Il apparaît dans cette étude que le linézolide pénètre dans l'œil sain après administration par voie orale. Les concentrations maximales de linézolide chez le lapin apparaissent, comme chez l'homme, à 0,5-1h dans le sérum ($C_{\max \text{ sérum}} = 13,9 \text{ mg/L}$ après une dose unique et $C_{\max \text{ sérum}} = 18,0 \text{ mg/L}$ après des doses multiples), et à 2h dans l'humeur vitrée ($C_{\max \text{ vitré}} = 3,0 \text{ mg/L}$ après une dose unique et $C_{\max \text{ vitré}} = 4,5 \text{ mg/L}$ après des doses multiples). La demi-vie d'élimination du linézolide est de 4h, dans le sérum et dans l'humeur vitrée et quel que soit le schéma thérapeutique. Les ratios de pénétration oculaire (ASC_{0-12h} dans l'humeur vitrée / ASC_{0-12h} dans le sérum x 100) atteignent 49,3 % après une dose orale unique et 53,6% après des doses orales multiples.

Afin d'évaluer l'activité antibactérienne potentielle de ces concentrations en linézolide dans le traitement d'une endophtalmie à bactéries à Gram positif, nous avons analysé les paramètres PK/PD suivants : $T > CMI$, QI_{\max} (C_{\max}/CMI) et ASC/CMI . Selon les résultats d'une étude rapportée par Mac Gowan (125), $T > CMI$ serait le meilleur paramètre prédictif de l'efficacité du linézolide dans un modèle d'infection de la cuisse à *S. aureus* chez la souris avec un seuil bactériostatique efficace de 40%. Dans notre étude, après l'administration d'une dose unique,

T>CMI dans le sérum atteint 50% pour des CMI allant jusqu'à 3 mg/L tandis qu'il atteint 100% pour des CMI de 4mg/L à l'état d'équilibre. Dans l'humeur vitrée, après une dose unique, T>CMI atteint 50% pour une CMI =1mg/L, tandis qu'il atteint 83% pour des CMI allant jusqu'à 3 mg/L après des doses multiples. Considérant, que la CMI₉₀ moyenne du linézolide pour les staphylocoques à coagulase négative est de 1 mg/L (programme de surveillance ZAAPS (35)), une dose unique de 120 mg par voie orale est juste suffisante pour permettre un effet bactériostatique des souches majoritairement responsables des cas d'endophtalmie bactériennes aiguë. Au contraire, un schéma thérapeutique de doses multiples permet d'atteindre des concentrations vitréennes entre deux administrations assez élevées pour envisager une guérison de ce type d'infections intra-oculaires. Selon Craig et al. (53), le **QI max** dans les cas d'otite est aussi prédictif de la guérison clinique que le T>CMI pour les bêta-lactamines même si cette classe d'antibiotique est temps-dépendante. La valeur cible pour une guérison clinique est un QI max de 5. Dans notre étude, le pic moyen de linézolide dans l'humeur vitrée à l'état d'équilibre fournit un QI de 4,5 pour une CMI de 1mg/L. Enfin, en ce qui concerne le paramètre **ASC/CMI**, que ce soit en considérant les valeurs d'ASC dans le sérum ou dans l'humeur vitrée, après une dose unique ou une dose multiple, la valeur cible comprise entre 80 et 120 déterminée chez l'homme, n'est jamais atteinte pour des souches avec une CMI <1 mg/L.

Malgré ces résultats encourageants, les concentrations oculaires obtenues après administration de la posologie de linézolide recommandée par voie orale ne répondent pas à tous les pré-requis PK/PD établis pour cet antibiotique à ce stade des connaissances de la littérature. L'administration d'une dose orale de linézolide significativement plus élevée n'est autorisée par aucune autorité de santé et les risques de toxicité associée (atteinte hématologique, acidose lactique ou neuropathies observées lors des traitements prolongés par linézolide) ne peuvent être ignorés. Au contraire les hautes concentrations mesurées dans l'œil après des injections IVT sont bien tolérées, comme montré par l'étude de l'activité électrophysiologique de la rétine après injection IVT de linézolide (13). Ainsi, un schéma incluant une injection

IVT suivie d'une thérapie orale adjuvante pour maintenir des taux efficaces à long terme dans l'œil est à considérer pour le traitement des infections oculaires sévères bactériennes à Gram positif. Une évaluation de l'efficacité clinique du linézolide sur un modèle expérimental d'endophtalmie à *S. aureus* est nécessaire pour confirmer l'utilité de ces données pharmacocinétiques. En effet, la pharmacocinétique oculaire du linézolide dans un œil infecté peut être sensiblement différente de celle d'un œil sain.

VI.3 Etude de l'efficacité et de la toxicité du LZD et de la DAP dans un modèle d'endophtalmie aiguë à *S. aureus* chez le lapin

MATERIEL ET METHODES (commun pour les articles n° 3 et n°4)

- **Mise au point du modèle expérimental d'endophtalmie chez le lapin**

Nous avons choisi de développer un modèle d'infection intraoculaire à *Staphylococcus aureus*. Cette espèce bactérienne est la deuxième espèce responsable des endophtalmies aiguës post-opératoires chez l'homme après les staphylocoques à coagulase négative. Notre choix s'est porté sur cette espèce car les infections à *S. aureus* sont plus sévères, en raison de leur virulence élevée, liée à la production de protéines de surface (jouant un rôle dans l'adhésion des bactéries aux épithéliums), de nombreuses toxines (entérotoxines, exfoliatines, leucotoxine de Panton et Valentine...) et d'enzymes favorisant la dissémination de la bactérie dans l'organisme en luttant contre les mécanismes de défense de l'hôte (anti-opsonisation, inhibition du chimiotactisme, lyse des leucocytes, dégradations cellulaires...). **La souche de *S. aureus*** utilisée dans cette étude a été isolée au laboratoire de bactériologie des HUS, à partir d'un échantillon d'ulcère de cornée (grattage cornéen) d'un patient hospitalisé. Cette souche est résistante à la méticilline et sensible à la vancomycine, au linézolide et à la daptomycine ([Tableau 4](#)) et l'étude du profil toxinique a révélé la présence d'entérotoxine de type A et l'absence de la leucocidine de Panton et Valentine ([Tableau 5](#)).

Tableau 4. CMI de l'oxacilline, vancomycine et daptomycine pour la souche de *S. aureus* étudiée

Souche	Phénotype ^a	CMI (mg/L)	Sensibilité ^b
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29737)	SAMR VAN-S, DAP-S	Oxacilline > 2	R
		Vancomycine = 0.5	S
		Linézolide = 2	S
		Daptomycine = 0.064	S

Abréviations: ^a VAN, vancomycine ; DAP, daptomycine ; SAMR, *S. aureus* méticilline-résistant. ^b R : résistant; S : sensible

Tableau 5. Profil toxinique de la souche de *S. aureus* étudiée

Souche	Toxine ^a	Technique	Presence (+)/ Absence (-)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29737)	LukFPV, LukSPV	Immunoprecipitation	-
	EtA	(méthode d'	-
	EtB	Ouchterlony)	-
	SEA	Agglutination	+
	SEB	passive reverse sur	-
	SEC	latex à l'aide d'un kit	-
SED	de détection de toxines (Oxoid [®] , Dardilly France)	-	

^a LukFPV and LukSPV = protéines F and P de la leucocidine de Panton-Valentine; EtA et

EtB = toxines exfoliatives A et B; SEA, SEB, SEC et SED, = entérotoxines A, B, C, D

Cette souche a étéensemencée sur des géloses Columbia à 5% de sang de mouton (géloses COS, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) et incubée pendant 18 à 24 h dans une atmosphère aérobie à 37°C. 500 Unités Formant Colonies (UFC) dans un volume de 0.1 mL ont été injectées directement dans le secteur postérieur de l'œil droit de tous les lapins. Ces suspensions bactériennes ont été préparées à partir de colonies de *S. aureus* prélevées sur un milieu de culture de 18 à 24 h et diluées dans une solution de NaCl 0.9% stérile. La pureté et le comptage bactérien de chacune de ces suspensions ont été contrôlés. Les yeux gauches des lapins ont servi de contrôles non-infectés.

L'investigation clinique des yeux a été conduite par un ophtalmologiste, selon les critères de Nussenblatt (141). Pour résumer, un premier score représentait les dommages du segment antérieur et des annexes avec cinq niveaux de sévérité, et un deuxième score représentait le segment postérieur également selon cinq niveaux et observés à l'aide d'un ophtalmoscope direct (Heine®). L'addition de ces deux scores constituait le score d'inflammation oculaire (sur une échelle de 0, indiquant un état oculaire normal, suivi de valeurs croissantes représentant une sévérité augmentant jusqu'à un score maximum de 8). L'endophtalmie était diagnostiquée pour un score de Nussenblatt supérieur ou égal à 2.

- **Protocole expérimental**

Une fois l'endophtalmie diagnostiquée (voir détail de l'examen clinique des yeux), tous les lapins ont reçu une injection IVT de 0.1 mL d'antibiotique ou de BSS dans l'œil droit infecté. Les animaux ont été répartis au hasard (randomisation) dans différents groupes : six groupes traités et un groupe non traité. Deux groupes de huit lapins ont reçu respectivement 0,2 mg ou 1.0 mg de daptomycine. Trois groupes de 8 lapins ont reçu respectivement 1, 10 et 30 mg de linézolide par IVT. Enfin un dernier groupe, composé également de 8 lapins et considéré comme le groupe de référence, a reçu 1,0 mg de vancomycine par IVT. Dans le groupe non traité, 0,1 mL de BSS a été injecté à quatre animaux (groupe BSS). Les yeux gauches contrôles n'ont pas reçu d'injection. Le jour 0 (J0) correspond au jour de cette injection IVT d'antibiotique ou de BSS. Tous les yeux ont été cliniquement examinés à J0, J2, J4 et J7. Des échantillons de 50 à 100 µL d'humeur vitrée ont été prélevés de manière répétée dans les yeux droits de tous les animaux, et à différents temps afin de réaliser un comptage bactérien et/ou un dosage des concentrations résiduelles d'antibiotiques. Une culture bactérienne réalisée sur les échantillons d'humeur vitrée des yeux gauches contrôles prélevés à J7 a été réalisée. Tous les animaux ont été finalement euthanasiés à J7.

- **Analyse histopathologique des yeux**

Juste après euthanasie, quatre animaux de chaque groupe ont été énucléés, pour une évaluation histopathologique des yeux. Une lecture des lames a été réalisée par un pathologiste hospitalier et un score a été appliqué selon les données présentées dans le [Tableau 6 \(144\)](#).

[Tableau 6](#). Graduation histopathologique de la sévérité de l'endophtalmie

Grade	Description			
	Cornée	Chambre antérieure	Humeur vitrée	Rétine
0	Pas d'infiltration par des cellules inflammatoires	Normale	Pas d'infiltration par des cellules inflammatoires	Normale
1	Infiltration partielle de l'épaisseur de la cornée par des cellules inflammatoires	Partiellement remplie par de la fibrine, pas de cellules inflammatoires	Présence de cellules inflammatoires non réparties en abcès focaux	Partiellement infiltrée et nécrotique, zones normales de la rétine visibles
2	Infiltration de toute l'épaisseur sur certains segments par des cellules inflammatoires	Partiellement remplie par de la fibrine, présence de cellules inflammatoires	Partiellement remplie par des infiltrats de cellules inflammatoires en abcès	Totalement infiltrée et partiellement nécrotique, pas de zone normale mais certaines couches intactes
3	Infiltration de toute l'épaisseur par des cellules inflammatoires	Totalement remplie par de la fibrine, cellules inflammatoires	Complètement remplie par des infiltrats inflammatoires	Totalement nécrotique, aucune couche intacte

- **Dosage des antibiotiques dans le sérum et l'humeur vitrée des lapins**

En ce qui concerne les dosages du **linézolide** dans l'humeur vitrée des lapins, nous avons utilisé la même méthode de dosage par CLHP citée précédemment (11).

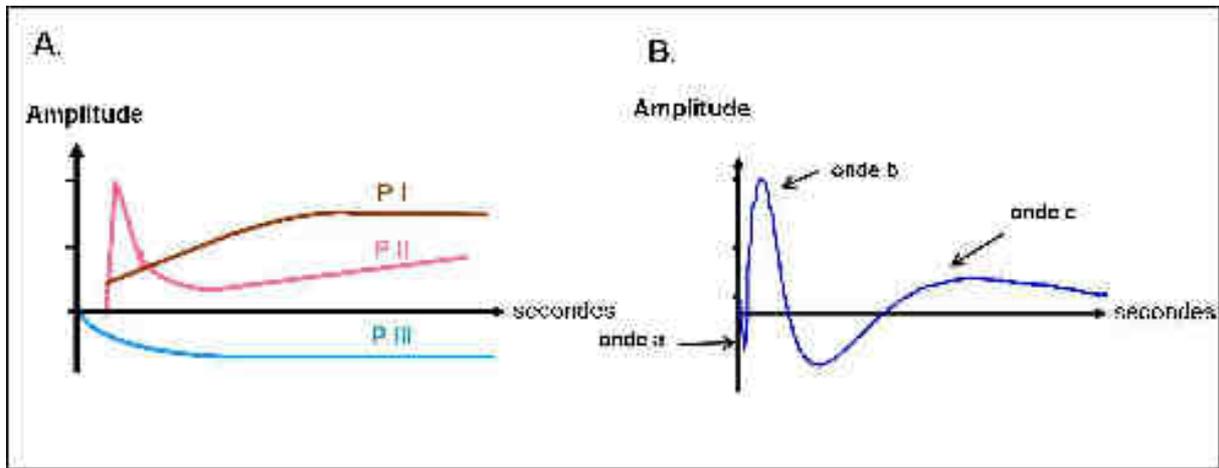
Pour le dosage de la **daptomycine**, plusieurs méthodes de dosage dans le sérum par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) ont été publiées dans la littérature scientifique (77, 178). Ces dernières nous ont servis de point de départ pour le développement et la validation d'une méthode de CLHP capable de quantifier la daptomycine dans des échantillons d'humeur vitrée, en prenant en compte les particularités du matériel spécifique de notre laboratoire. En raison de sa faible teneur en protéines, l'humeur vitrée pourrait être directement utilisable en vue du dosage d'antibiotiques par des techniques chromatographiques. Cependant, en raison de la contamination bactérienne et de l'état potentiellement inflammatoire des échantillons d'humeur vitrée à doser, nous avons réalisé une étape préalable de précipitation des protéines avant dosage. Les échantillons d'humeur vitrée de lapin ont été stockés à - 80°C jusqu'à analyse. Après décongélation à température ambiante, l'étape de précipitation des protéines est la suivante : 50 µL d'humeur vitrée ont été mélangés avec le même volume du mélange méthanol:acétonitrile 1:2 (v/v). Après 5 secondes de vortex, suivies d'une rotation lente pendant 10 min à 30 rpm, ce mélange a été centrifugé pendant 5 min à 10 000 g. Enfin, 20 µL du surnageant ont été injectés dans un système CLHP prominence® (Shimadzu USA Manufacturing Inc., Canby, OR, USA) comprenant une pompe LP-20AT et un détecteur UV-visible SPD-20A. Un injecteur manuel du modèle Rheodyne® (Rheodyne, Rohnert Park, CA, USA) a été utilisé avec une boucle d'injection de 20 µL. La séparation chromatographique a été réalisée grâce à une colonne en phase-inverse C18, 150×4.6 mm, 3 µm Uptisphere Interchim® (Interchim, Montluçon, France), avec une phase mobile composée d'un mélange isocratique de tampon phosphate 20mM, 40% d'acétonitrile, et un pH ajusté à 3.5 avec de l'acide phosphorique. Un débit de 1.0 mL/min a été utilisé et la détection a été réalisée à une longueur d'onde de 224 nm. Sous ces conditions, le temps de rétention de la daptomycine était de 7,5 min. Le logiciel Solution Shimadzu® (Shimadzu France, Champs sur Marne, France) a été utilisé pour

l'acquisition et le traitement des données. La limite de quantification de cette technique de dosage de la daptomycine dans l'humeur vitrée était de 0,5 µg/mL. La méthode était linéaire pour des concentrations allant de 0,5 à 500 µg/mL, avec un coefficient de corrélation de 0,999. Des contrôles standards de qualité ont été préparés aux concentrations finales de 1, 50 et 250 µg/mL. Les exactitudes intra- et inter-journalières de la méthode étaient comprises respectivement entre 92,0 et 102,9% et entre 93,8 et 101,5%. La précision de la méthode est caractérisée par de coefficients de variation compris entre 0,98 et 3,58% et entre 2,66 et 3,03 % respectivement pour les précision intra- et inter-journalières.

Enfin les concentrations de **vancomycine** dans l'humeur vitrée ont été déterminées, quant à elle, par dosage immunoenzymatique en phase homogène (Viva-E[®] Drug Testing System, Siemens, USA). Les échantillons hémorragiques d'humeur vitrée ont été exclus de l'étude.

- **Evaluation de l'intégrité fonctionnelle de la rétine (ERG)**

La réponse électrique de la rétine à la lumière, suite à l'administration IVT de linézolide et de daptomycine, a été évaluée par des enregistrements d'électrorétinographie. Cette réponse, appelée électrorétinogramme (ERG), est la traduction globale du potentiel d'action mesuré de part et d'autre de la rétine. En 1933, Granit a mis en évidence chez le chat anesthésié à l'éther trois composantes de l'ERG nommées PI, PII et PIII en fonction de leur ordre de disparition (80). La somme algébrique de ces trois composantes donne naissance à trois ondes appelées a, b et c. Quatre types cellulaires produisent les principales composantes de l'ERG, les photorécepteurs, les cellules bipolaires, les cellules de Müller et les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien.



[Figure 16](#). Réponse électrorétinographique des cellules de la rétine.

A. Les composantes de l'électrorétinogramme selon Granit 1933. **B.** électrorétinogramme, formé par la superposition de ces trois composantes.

Onde a

C'est une onde précoce et négative résultant de l'hyperpolarisation des segments externes des photorécepteurs. Son amplitude varie avec la vitesse d'apparition de l'onde b. L'onde a correspond au début de la composante PIII de Granit.

Onde b

L'onde b est fortement positive mais son origine cellulaire est encore discutée. En effet, l'origine de l'onde b a tout d'abord été attribuée aux cellules bipolaires (Hashimoto et al, 1961). Quelques années plus tard, la contribution des cellules de Müller a été établie (Newman & Odette, 1984). Actuellement de nombreuses études tendent à démontrer que les cellules bipolaires seraient les cellules majoritairement impliquées dans la formation de l'onde b (88, 107) alors que la contribution des cellules de Müller serait limitée (88, 193). D'autres cellules telles que les cellules amacrines ou les cellules ganglionnaires pourraient également être impliquées dans la formation de l'onde b (193).

Globalement, l'onde b serait le reflet d'une dépolarisation des cellules bipolaires. Elle représente au mieux l'intégrité fonctionnelle de la rétine, car elle n'est présente que si les photorécepteurs sont intacts et seulement si la transmission synaptique entre les

photorécepteurs et les cellules bipolaires est correcte. L'onde b correspond à la composante PII de Granit.

Onde c

C'est une onde tardive et globalement positive. Elle est la somme de deux composantes de latence et de durée similaires : une composante PIII lente et négative qui trouve son origine dans la rétine neurale et une composante positive générée par les cellules de l'épithélium pigmentaire (88). L'onde c correspond approximativement à l'onde PI de Granit.

L'électrorétinographie permet d'évaluer l'intégrité fonctionnelle de la rétine. Lors d'une dégénérescence des cellules rétiniennes, la transmission synaptique est réduite conduisant ainsi à une diminution de l'intégrité fonctionnelle de la rétine.

ARTICLE N°3 : LINEZOLIDE ADMINISTRE PAR VOIE INTRAVITREENNE

Parmi les trois groupes de lapins traités par linézolide (1, 10 et 30 mg de linézolide administrés par une injection IVT unique), seul le groupe ayant reçu 30 mg de linézolide (LZD 30) présentait une efficacité équivalente au groupe ayant reçu le traitement de référence d'1 mg de vancomycine (VAN 1). Précisons que la dose de 30 mg était la dose maximale administrable dans notre modèle en raison de la limite de solubilité de la poudre d'antibiotique utilisée. Ainsi dans le groupe ayant reçu 1 mg de linézolide (LZD 1), ni les scores cliniques et histopathologiques, ni le comptage bactérien, n'étaient différents du groupe contrôle positif, infecté mais non traité ($p > 0.05$). Dans le groupe ayant reçu 10mg de linézolide (LZD 10), la moitié des yeux (4/8) étaient stérilisés 4 jours après l'injection IVT d'antibiotique. Une re-croissance bactérienne a cependant été observée chez deux yeux à 7 jours post-injection avec des scores cliniques et un comptage bactérien semblables à ceux du groupe contrôle positif ($p > 0.05$). Seul le groupe LZD 30 a permis d'obtenir une stérilisation de tous les yeux (8/8) après 4 jours. Un échec a été observé sur un oeil dans le groupe de référence VAN 1 (7/8). Après 7 jours, une re-croissance bactérienne a été observée sur un oeil dans chacun de ces deux groupes. Une amélioration clinique nette a été observée dans ces deux groupes. Pour le groupe LZD 30, les résultats de l'étude histopathologique montrent que l'architecture des couches rétiniennes était conservée. Des cellules inflammatoires polynucléées et des lymphocytes ont été observés dans le vitré avec quelques amas de fibrine mais il n'existait pas de micro-abcès. La cornée était d'aspect normal et de rares cellules inflammatoires ont été retrouvées dans la chambre antérieure. Les résultats de l'ERG n'ont pas montré de modification de l'ERG 1 jour et 14 jours après administration IVT d'une dose de 30 mg de linézolide par rapport aux yeux contrôles sains de chaque lapin, nous permettant

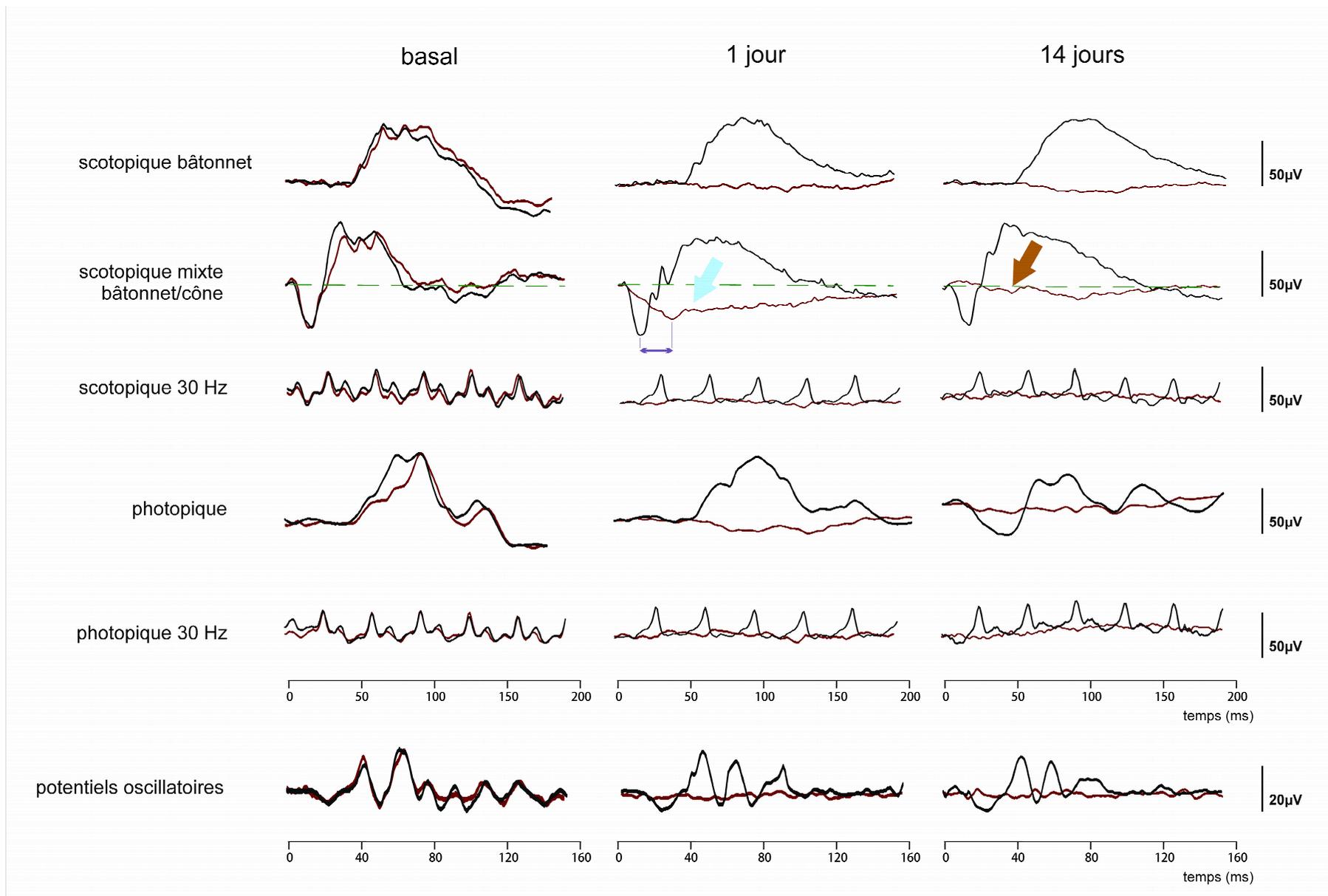
de conclure que le linézolide à une dose de 30 mg n'altère pas l'intégrité fonctionnelle de la rétine.

Face à l'absence d'efficacité bactériologique des doses de 1 mg et 10 mg de linézolide dans ce modèle, nous avons étudié la PK/PD oculaire de cet antibiotique: tout d'abord, la demi-vie d'élimination du linézolide dans l'humeur vitrée est courte et a été réduite de moitié, passant de 4 h dans l'œil sain (voir article n°2) à 2 h dans l'œil inflammatoire, contre 48 h pour la vancomycine (145). Ensuite, les concentrations vitréennes du linézolide étaient supérieures à la CMI de l'antibiotique pour la souche étudiée (2 mg/L) pendant plus de 60 % du temps entre deux administrations dans tous les groupes de traitement, mais nous n'avons pas noté de corrélation entre ce $T > CMI$ et une efficacité bactériologique pour LZD 1 et LZD 10. De même pour le rapport ASC/CMI , qui malgré un ratio très supérieur au seuil recommandé dans la littérature n'était pas corrélé à une efficacité thérapeutique. Il semble donc que les paramètres pharmacodynamiques prédictifs de l'activité antibactérienne du linézolide dans les autres modèles d'infection à *S. aureus* ne soient pas applicables à ce modèle expérimental d'endophtalmie.

ARTICLE N°4 : DAPTOMYCINE ADMINISTRÉE PAR VOIE INTRAVITREENNE

Dans cette étude, une injection IVT unique de 0,2 mg de daptomycine n'est pas suffisante pour stériliser tous les yeux de lapin tandis qu'une injection IVT d'1 mg de daptomycine ou de vancomycine a permis d'éradiquer l'infection intra-oculaire. La demi-vie d'élimination terminale ($T_{1/2el}$) de la daptomycine dans l'humeur vitrée s'est révélée constante et indépendante de la dose administrée (38,8 et 40,9 h respectivement après administration de 0,2 et 1 mg de daptomycine), ainsi que significativement plus longue que celle de la vancomycine (20,5 h). Concernant la pharmacodynamie de la daptomycine, il a été montré que l'efficacité bactéricide *in vivo* de la daptomycine vis-à-vis de *S. aureus* était bien corrélée avec les rapports C_{max}/CMI et ASC_{0-24h}/CMI . Ces données proviennent cependant d'études réalisées sur un modèle d'infection des tissus mous chez la souris après administration sous-cutanée de daptomycine (122, 160). Aucune étude n'a décrit à ce jour les paramètres pharmacodynamiques relatifs à l'efficacité de la daptomycine dans un cas d'infection oculaire et sur la base des concentrations intraoculaires locales. Dans notre modèle expérimental d'endophtalmie, des valeurs très élevées des rapports C_{max}/CMI et AUC_{0-24h}/CMI n'étaient pas corrélées à une activité bactéricide satisfaisante pour une dose de 0,2 mg de daptomycine. Enfin, en ce qui concerne l'étude de la toxicité oculaire de la daptomycine : les résultats du score de Nussenblatt et de l'analyse histopathologique ont montré que la dose d'1 mg de daptomycine directement injectée dans l'œil limitait l'inflammation clinique de l'œil et préservait l'architecture des structures oculaires d'une manière supérieure aux deux autres groupes de traitement. A la suite de cet article, nous avons réalisé des enregistrements d'électrorétinographie après une injection IVT d'1mg de daptomycine sur des yeux sains. 4 lapins ont été soumis aux mêmes procédures que celles utilisées pour le linézolide dans l'article n°3. Les résultats (voir Figure 17.) montrent qu'à J1, la fonction de la rétine interne

(onde b générée par la composante pII) est fortement altérée voire presque inexistante (flèche bleue) alors que celle des photorécepteurs est toujours présente (onde a « légèrement négative », générée par le début de la composante pIII) même si elle montre déjà des signes d'altération (amplitude réduite et son pic négatif décalé dans le temps, voir flèches violettes). Les deux réponses flicker (scotopique et photopique) sont inexistantes, indiquant une fonctionnalité fortement altérée de la rétine. Le tracé photopique, inexistant pour les yeux traités, ainsi que les potentiels oscillatoires confirment cette altération de la fonction de la rétine interne. En résumé à J1, la fonction de la rétine interne est presque inexistante alors que celle des photorécepteurs (rétine externe) est toujours présente même si elle montre des signes d'altération. A J14, la composante pIII a complètement disparu. Les tracés obtenus sont totalement plats (flèche orange) avec une absence d'onde a. Ces premiers résultats montrent que la dose d'1 mg de daptomycine administrée par IVT altère significativement l'intégrité fonctionnelle de la rétine.



[Figure 17](#). Electrorétinogramme après injection intravitréenne d'1 mg de daptomycine sur un modèle de lapin New-Zealand albinos

VI.4 Discussion et perspectives de la partie 1

Au cours de ces différentes études, nous avons réalisé un nombre répété de ponctions dans les yeux de chaque lapin. Une des limites de cette pratique, est que chacun de ces prélèvements modifie le volume total de liquide dans la chambre antérieure (humeur aqueuse) et/ou dans le segment postérieur (humeur vitrée) de l'œil, entraînant une sécrétion répétée d'humeur aqueuse, mécanisme naturel de renouvellement des liquides intraoculaires. Une dilution du contenu de ces compartiments pourrait ainsi être responsable d'une diminution de la concentration réelle en antibiotique. La ponction dans ces deux compartiments est un acte invasif pouvant être également responsable d'une rupture des barrières hémato-oculaires et de dommages sur les tissus oculaires, c'est pourquoi nous nous sommes attaché à exclure les échantillons hémorragiques de toute analyse en raison des potentielles conséquences de la rupture de ces barrières sur le phénomène d'élimination de l'antibiotique et sur les résultats des examens cliniques et histopathologiques. Le suivi des concentrations vitréennes en antibiotique au cours du temps, de manière individuelle, chez chacun des animaux, nous a permis d'éviter le biais des variations interindividuelles lors du calcul de paramètres pharmacocinétiques. Enfin dans les études n°3 et n°4, la même procédure ayant été réalisée pour le groupe avec le traitement de référence (vancomycine 1 mg en IVT), les perturbations devraient avoir lieu dans les même proportions dans tous les groupes.

- **L'article n°1** présente les premiers résultats publiés concernant la pénétration intraoculaire du linézolide après administration par voie topique. Les principes actifs administrés par cette voie doivent tout d'abord passer à travers la cornée ou la conjonctive avant d'atteindre l'humeur aqueuse de la chambre antérieure de l'œil. Le passage de ces barrières anatomiques nécessite des molécules à caractère amphiphile (groupements hydrophiles et lipophiles). Le linézolide présente cette propriété physico-chimique, tout comme les fluoroquinolones, largement utilisées dans le traitement et la prophylaxie des infections du segment antérieur de l'oeil. Par la suite la distribution du médicament depuis

l'humeur aqueuse dans les tissus environnants (iris, corps ciliaire et cristallin) et le corps vitré prend en compte trois potentiels obstacles : la fixation active du médicament à la mélanine de l'iris et du corps ciliaire (133, 147) (ce n'est pas le cas dans notre étude puisque nous travaillons sur des lapins albinos), la fixation à des protéines de l'humeur aqueuse, et l'élimination rapide due à la vitesse élevée du renouvellement de l'humeur aqueuse, dont le flux (du corps ciliaire vers la chambre antérieure de l'œil) s'oppose à celui du médicament. Le corps vitré ne reçoit ainsi que peu de substances actives en provenance de l'humeur aqueuse et sa consistance gélatineuse s'ajoute à une vitesse de diffusion peu élevée. Le linézolide, comme les autres antibiotiques disponibles à ce jour, ne permet donc pas, après administration par voie topique, d'obtenir des concentrations vitréennes suffisantes pour envisager le traitement des infections du segment postérieur de l'œil.

- **Dans l'article n°2**, bien que le linézolide montrait une importante pénétration dans le segment postérieur de l'œil sain après administration par voie orale, l'analyse PK/PD ne nous permettait pas de prédire l'efficacité de ce schéma thérapeutique dans le traitement des endophtalmies bactériennes. Par la suite il est apparu dans notre modèle expérimental d'endophtalmie à *S. aureus* chez le lapin (article n°3), que seules des concentrations de linézolide très élevées, atteignables uniquement par voie intravitréenne, étaient capables de stériliser des yeux présentant une endophtalmie à *S. aureus*.

- A la lecture des résultats de **l'article n°3**, nous pouvons conclure que le linézolide présenterait dans l'œil infecté, une activité d'ordre plutôt concentration-dépendante que temps-dépendante, puisque des doses élevées sont nécessaires pour obtenir une activité bactéricide satisfaisante. L'étude de l'élimination oculaire du linézolide a permis de mettre en évidence une diminution de sa demi-vie d'élimination terminale dans le modèle d'endophtalmie à *S. aureus* ($T_{1/2el} = 2h$) par rapport au modèle avec œil sain ($T_{1/2el} = 4h$). Il n'est pas possible d'apporter ici d'explications précises à cette différence car les mécanismes

impliqués dans l'élimination oculaire du linézolide ne sont pas connus à ce jour. De plus notons que le calcul de ce paramètre pharmacocinétique dans les deux études a été réalisé en considérant des concentrations vitréennes en linézolide très différentes et sur des périodes de temps très différentes. Au sujet de l'étude pharmacodynamique oculaire du linézolide, nous avons montré que les paramètres PK/PD ($T > CMI$ et ASC/CMI) du linézolide et leurs valeurs seuils bien corrélées à une efficacité bactério-clinique dans d'autres modèles infectieux (endocardite, pneumopathie...) n'étaient pas applicables dans notre modèle expérimental d'infection du segment postérieure de l'œil. Ces résultats pourraient s'expliquer par la présence d'un privilège immunitaire dans l'œil, dont le but est de limiter la mise en place des mécanismes d'inflammation capable de perturber la transparence du trajet optique. Ce contexte immunitaire particulier à l'œil pourrait être à l'origine de la re-croissance bactérienne rapide de cet antibiotique bactériostatique malgré des concentrations locales en linézolide très élevées. Des études complémentaires sont bien sur nécessaires pour apporter une réponse à ces questions. Enfin malgré une dose efficace élevée (30mg), les études de toxicité oculaire du linézolide ont montré l'absence d'atteintes histologiques des différents tissus oculaires et de perturbation de la fonction visuelle, faisant de cette molécule une alternative toujours prometteuse dans le traitement des endophtalmies bactériennes aiguës à Gram positif. Le développement d'une nouvelle formule galénique à usage ophtalmique reste à envisager.

- **Dans l'article n°4** l'augmentation des doses de daptomycine améliore l'efficacité bactéricide de l'antibiotique, ces résultats sont en faveur d'une activité concentration-dépendante de la daptomycine dans le compartiment oculaire. L'échec de la dose de 0,2 mg de daptomycine est surprenante car les concentrations vitréennes correspondantes étaient environ 2000 fois plus élevées que la CMI de la daptomycine 24h après l'injection et 47 fois plus élevées après 7 jours. Or plusieurs études présentant des modèles de pharmacodynamie *in vitro* et *in vivo*, montrent qu'une efficacité bactéricide maximale est obtenue pour des

antibiotiques concentration-dépendants (tels que les aminosides et les fluoroquinolones) lorsque les concentrations au pic (C_{max}) sont 10 fois supérieures à la CMI (38, 82, 112). De plus l'analyse des paramètres pharmacodynamiques et de leurs valeurs seuils à atteindre pour obtenir une efficacité bactérioclinique de la daptomycine dans d'autres types d'infections tissulaires n'était pas applicable à notre modèle d'endophtalmie. Afin d'expliquer la nécessité d'atteindre des concentrations en daptomycine très élevées dans l'humeur vitrée pour obtenir une bactéricidie locale, nous proposons les hypothèses suivantes : la première hypothèse s'appuie sur des données selon lesquelles la liaison de la daptomycine aux protéines environnantes aurait un effet sur son activité bactéricide. Garrison *et al.* (75) ont évalué l'effet de la liaison aux protéines plasmatiques sur l'activité bactéricide de la daptomycine vis-à-vis de *S. aureus* en utilisant un modèle de pharmacodynamie *in vitro*. Une simulation des courbes concentration en fonction du temps obtenues chez des patients recevant 6 mg/kg de daptomycine en IV, a été réalisée *in vitro* en présence et en absence de 4% d'albumine. Les temps moyens nécessaires pour tuer 99% des colonies de *S. aureus* étaient respectivement de 0,3 h et 0,9 h sans et avec l'albumine. Ainsi, la composition de l'humeur vitrée, très riche en protéines, dans les yeux infectés et inflammatoires pourrait influencer l'activité bactéricide de la daptomycine, puisque seule la forme libre de la daptomycine est active. Une deuxième hypothèse est liée à l'activité calcium-dépendante de la daptomycine : il a été démontré que le cation divalent Ca^{2+} permettait à l'antibiotique d'interagir et de perturber les membranes bactériennes à l'origine de son activité bactéricide (93, 138). Il serait donc intéressant d'investiguer la concentration vitrénne en Ca^{2+} dans l'humeur vitrée des lapins infectés et d'analyser son impact sur l'activation de la molécule. Enfin nous avons montré que la dose efficace d'1mg de daptomycine présentait une toxicité oculaire intrinsèque. En effet, bien que les résultats de l'analyse histopathologique montrent une préservation de l'architecture rétinienne des yeux de lapin, l'analyse ERG révèle une altération significative de leur fonction visuelle.

Ces résultats divergent sur certains points avec l'étude de Comer *et al.* (51). Ces derniers ont montré à l'aide d'un modèle d'endophtalmie à *S. epidermidis* avec des lapins pigmentés, qu'une dose de 0,2 mg de daptomycine administrée par voie IVT était efficace et non toxique. Aucune croissance bactérienne n'a été détectée dans les yeux infectés (7 yeux) 48 h après l'injection de cette dose d'antibiotique. Aucune modification de l'électrorétinogramme n'a été observée à J14 et l'analyse d'histopathologie montrait une couche de photorécepteurs préservée. Cependant après administration de doses supérieures de daptomycine (0,375 et 0,750 mg) une toxicité rétinienne intrinsèque de la daptomycine sur œil sain a été mise en évidence. Dans le cas de l'étude d'efficacité de la daptomycine dans le modèle d'endophtalmie, une différence majeure entre nos deux études tient au choix de l'inoculum bactérien (espèce bactérienne et taille de l'inoculum injecté) utilisé pour réaliser le modèle d'endophtalmie sur les yeux des lapins : 2.10^5 UFC/0.1mL de *S. epidermidis* pour l'équipe de Comer *et al.*, versus 500 UFC/0.1mL de *S. aureus* pour notre étude. Cette différence pourrait expliquer la différence d'efficacité retrouvée pour une dose de daptomycine administrée équivalente de 0,2 mg entre ces deux études. De plus, la différence d'espèce (Dutch belted vs New-Zealand) et de poids (respectivement 2,2 à 2,5 kg versus 3 à 4 kg) entre les lapins utilisés pourrait être responsable d'une variation significative du volume vitréen total des différents animaux testés. Dans le cadre de l'étude de toxicité intrinsèque de la daptomycine, les modifications de l'électrorétinogramme observées à J14 dans l'étude de Comer *et al.* après administration de 0,375 et 0,750 mg de daptomycine étaient similaires à celles que nous avons observé dans notre étude à J1 après l'administration d'une dose de 1 mg : l'ERG n'était pas plat et une onde a « négative » était toujours présente. Par contre en ce qui concerne l'analyse histopathologique des yeux, les résultats de nos deux études divergent. En effet Comer *et al.* ont mis en évidence une diminution modérée voir une absence totale de la couche des photorécepteurs tandis que nous n'avons pas noté de modifications de l'architecture rétinienne après administration d'une dose supérieure. Ces résultats mettent en avant la nécessité d'associer des études d'électrorétinographie aux études d'histopathologie

par coloration à l'hématoxyline-éosine pour étudier l'atteinte des structures rétinienne. Pour conclure, l'absence de données sur les concentrations vitréennes de daptomycine dans l'étude de Comer *et al.* manque fortement pour établir une réelle comparaison de nos deux études.

En perspective de cette étude, des études complémentaires sont nécessaires pour établir une dose IVT de daptomycine efficace mais non toxique. De plus la pénétration oculaire de la daptomycine après administration systémique par voie intraveineuse reste à étudier afin d'obtenir des données sur le passage des barrières hémato-oculaires par cette molécule amphiphile et plus lipophile que les glycopeptides. La présence de P-gp au niveau de la BHR pouvant être un frein à la pénétration intraoculaire de la daptomycine. A ce jour un seul cas a été publié et a montré une pénétration de 28% de la daptomycine dans l'humeur vitrée après administration IV chez un patient présentant une endophtalmie endogène à SAMR (165). Ces données doivent cependant être confirmées. Une étude de la pénétration de la daptomycine administrée par voie IV dans un œil sain *versus* un œil inflammatoire permettrait également d'évaluer les modifications pharmacocinétiques dérivant directement de la réaction inflammatoire locale, comme il a pu être observé de manière caractéristique dans le cas d'autres antibiotiques.

- **Ces différentes études mettent en avant les particularités de la PK/PD oculaire de ces antibiotiques :** Les paramètres PK/PD établis à ce jour, aussi bien pour le linézolide que pour la daptomycine, ont été évalués pour prédire l'efficacité thérapeutique de ces antibiotiques dans certains types d'infections tissulaires, à partir des concentrations sériques et après administration par voie systémique. Nous avons mis en évidence grâce à notre modèle d'endophtalmie à *S. aureus* chez le lapin, que ces paramètres PK/PD ainsi que leurs seuils à atteindre n'étaient pas directement applicables dans le cadre des infections intra-oculaires. L'œil, ce compartiment profond de l'organisme humain, présente une anatomie complexe et des caractéristiques physiologiques influençant directement la PK/PD des antibiotiques. Le

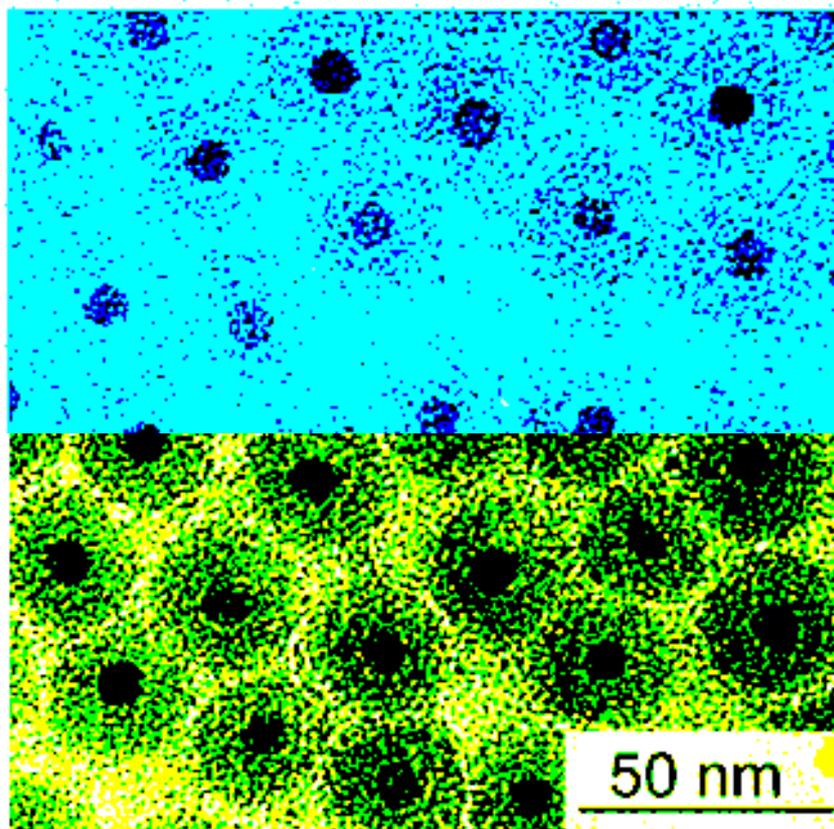
profil pharmacodynamique de ces molécules dans le compartiment vitréen doit être étudié précisément dans des études complémentaires chez l'animal.

En ce qui concerne les concentrations très élevées de linézolide et de daptomycine observées pour obtenir une bactéricidie efficace dans notre modèle d'endophtalmie à *S. aureus* (articles n°3 et n°4), nous proposons ici une dernière hypothèse : l'existence d'un **effet matrice** dans l'humeur vitrée des yeux de lapin infectés, responsable de modifications conformationnelles affectant le pourcentage de la forme stable et active du linézolide et de la daptomycine. La structure 3D de ces deux molécules dans ce contexte particulier pourrait être étudiée par spectroscopie RMN ou par cristallographie.

- Afin de diminuer la dose IVT de linézolide et de daptomycine à administrer chez l'homme, il serait également intéressant d'investiguer une synergie de bactéricidie de ces deux molécules associées à d'autres molécules antibactériennes.

PARTIE 2 :

IRM, USPIO et arthrite bactérienne aiguë



Représentation schématique de nanoparticules superparamagnétiques avec leur corps d'oxyde de fer et leur enrobage de surface. Il s'agit d'une image obtenue par microscopie électronique à transmission de Carmen Vogt, Royal Institute of Technology, Stockholm [153].

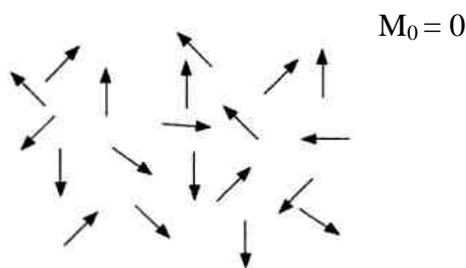
I. IRM ET RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est une technique d'imagerie médicale d'apparition relativement récente (début des années 1980) reposant sur la résonance magnétique nucléaire. L'examen IRM n'irradie pas le sujet, est non invasif et correspond à la méthode de diagnostic la plus puissante et la plus sensible disponible actuellement. Cet outil permet d'obtenir des images de tissus à l'intérieur du corps humain en 2D et en 3D, plus précises que celles obtenues par un scanner. Le développement des nanomatériaux (super)-paramagnétiques a ouvert la voie à de nouvelles applications dans le domaine de l'IRM. Dans le cadre de ce travail, ce sont les nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer qui nous ont intéressés.

I.1. Le principe

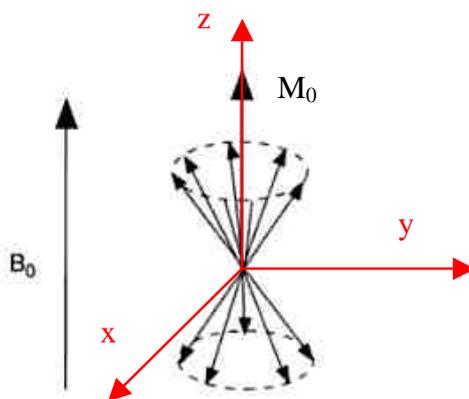
La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) exploite le fait que le noyau de certains atomes possèdent un moment magnétique μ . Seuls les atomes avec un nombre impair de nucléons (protons et neutrons) possèdent un magnétisme nucléaire (^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P). L'hydrogène est un élément abondant dans les tissus biologiques, tant au niveau de l'eau des liquides organiques que des graisses.

En l'absence d'un champ magnétique statique puissant, les noyaux d'hydrogènes possèdent tous des moments magnétiques μ individuels orientés au hasard qui s'ajoutent en une aimantation totale M_0 nulle.



[Figure 18](#). Moments magnétiques μ des différents noyaux d'hydrogène d'un volume de tissu biologique à l'état naturel. Ces moments magnétiques sont orientés au hasard et leur somme correspond à une aimantation M_0 nulle. D'après (7).

Cependant, en présence d'un champ magnétique uniforme B_0 dirigé arbitrairement selon un axe Oz , les moments magnétiques des protons vont adopter une des orientations, soit alignés dans le sens de B_0 (spin parallèle ou fondamental, de basse énergie), soit dans le sens opposé (spin antiparallèle ou excité, de haute énergie). En s'orientant, les moments magnétiques décrivent également un mouvement de précession (mouvement de rotation décrivant un cône) autour de l'axe de B_0 (Figure 19.).



[Figure 19.](#) Moments magnétiques μ des noyaux d'hydrogène d'un volume de tissu biologique placé dans un champ magnétique B_0 . A l'équilibre, l'aimantation totale M_0 est parallèle à B_0 .

D'après (7).

Du fait de leur meilleure stabilité au niveau fondamental, les spins parallèles se retrouvent en léger excès, créant une aimantation nucléaire totale M_0 détectable en RMN. M_0 est définie par deux composantes : l'aimantation longitudinale M_L et l'aimantation transversale M_T . A l'équilibre, M_L est maximale et M_T est nulle. Pour pouvoir détecter les signaux de ces deux composantes, il est nécessaire de rompre cet équilibre. Pour cela, on applique un champ magnétique radiofréquence B_1 , très bref et perpendiculaire à B_0 (dans le plan xy). L'aimantation M_0 va être déséquilibrée et se retrouver dans le plan xy où elle va être mesurée : le nouveau champ est appelé M . Il faut pour cela que la fréquence de l'onde radio soit telle que l'énergie apportée soit équivalente à la différence entre les deux états d'énergie des noyaux d'hydrogène, on parle alors de fréquence de résonance.

Après l'arrêt du champ B_1 , l'aimantation M va revenir à son état fondamental et rejoindre son état d'équilibre suivant l'axe Oz en décrivant une hélice de rayon décroissant (Figure 20.).

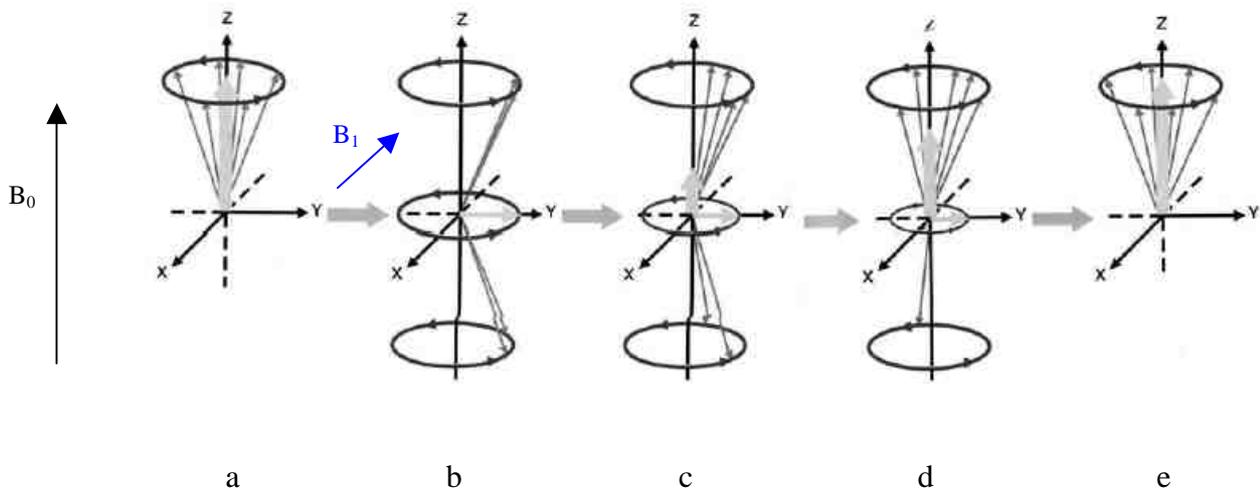


Figure 20. a) Représente le champ M_0 avant l'émission du champ magnétique radiofréquence B_1 . b) Déplacement du champ M_0 en M perpendiculairement à B_0 à la fin de l'impulsion radiofréquence. A l'arrêt de B_1 , le champ M va rejoindre sa position d'équilibre en retrouvant sa composante longitudinale M_L maximale et sa composante transversale M_T nulle. D'après (10).

Bien que simultanées, on peut considérer la composante transversale et la composante longitudinale de relaxation de manière séparées. On parle de phase de relaxation : l'énergie restituée par le retour du système à l'équilibre est un signal de radiofréquence recueilli par une antenne dans le plan xy .

I.2. Les temps de relaxation

- La relaxation longitudinale (T_1)

La repousse longitudinale correspond au retour à l'état d'équilibre (niveau de basse énergie avec des spins parallèle) des spins excités. Cette repousse se fait selon une loi exponentielle caractérisée par le temps T_1 qui est le temps au bout duquel un tissu a regagné 63% de son aimantation maximale après une impulsion à 90° . T_1 est dû à un transfert d'énergie entre le proton et le milieu dans lequel il se trouve. Il est donc caractéristique du tissu où sont

engagées les molécules d'hydrogène dont les protons ont été excités. Le temps T1 est plus court pour les tissus contenant de grosses molécules comme la **graisse** et on obtiendra alors un **hypersignal**. En effet, le mouvement brownien de ces molécules est limité. Le transfert d'énergie entre le spin et le réseau (milieu environnant) est donc rapide. Comme la relaxation est rapide, le **T1** sera **court**, et le signal sera intense.

- La relaxation transversale (T2 et T2*)

La relaxation transversale correspond à une chute de l'aimantation transversale suivant une courbe décroissante caractérisée par le temps T2. T2 est le temps au bout duquel un tissu a perdu 63% de son aimantation transversale maximale. Il est également dépendant du tissu dans lequel le proton se trouve. Pour les tissus sous forme liquide (**eau**) on obtiendra un **hypersignal**. En effet, ces molécules ont un mouvement brownien important. La relaxation **T2** sera donc **lente**, ce qui entraîne donc un signal intense.

Une composante de la relaxation T2 est la relaxation T2*. Cette dernière correspond à la relaxation liée aux hétérogénéités du champ magnétique et est particulièrement sensible à la présence de fer.

La relaxation T1 / T2 contrôle le signal en IRM qui est la clé du diagnostic.

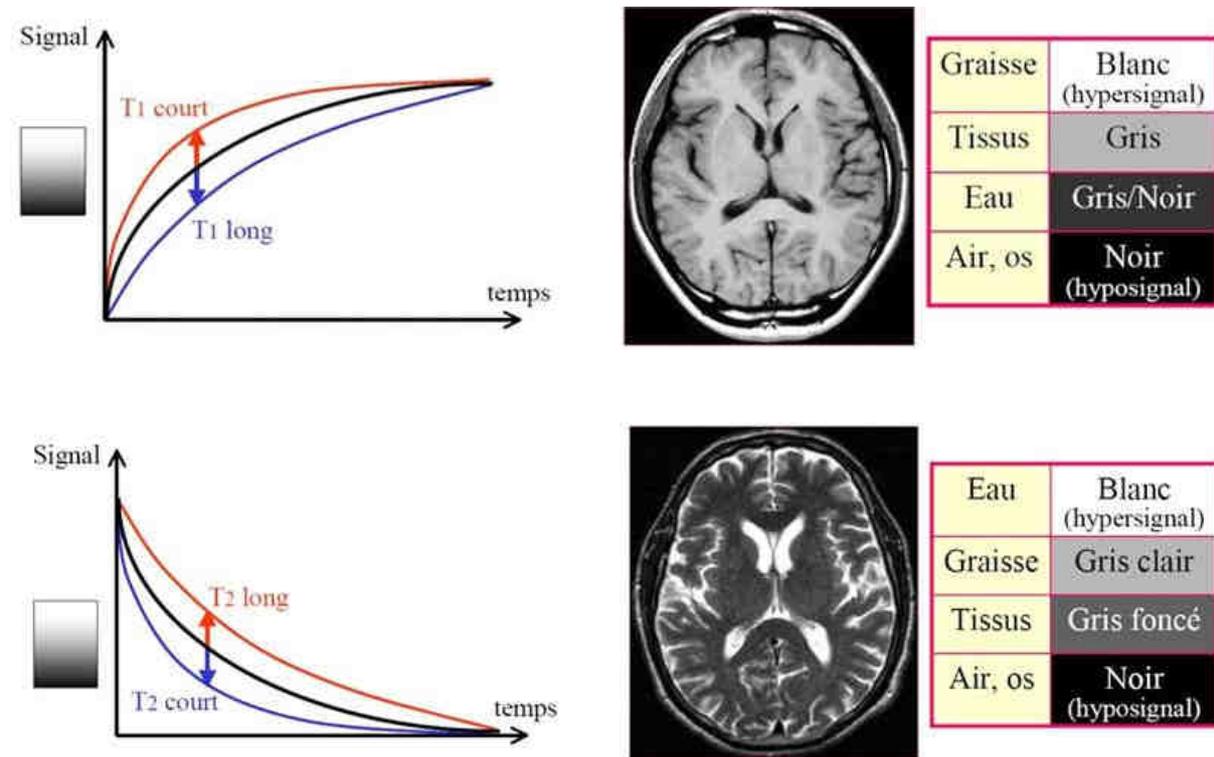
I.3 Le contraste intrinsèque en IRM

Le contraste en IRM est la traduction du signal RMN en pixels de niveaux de gris différents.

Le blanc correspond à un signal élevé donc à un hypersignal. Le noir correspond à un faible signal donc à un hyposignal.

Les paramètres pouvant influencer le signal en IRM sont :

- Les temps de relaxation T1, T2 et T2*
- La densité de noyaux d'hydrogène*
- La vitesse de flux des liquides
- Les paramètres diffusionnels comme la température ou la viscosité du milieu



[Figure 21](#). Intensité du signal en IRM et temps de relaxation T1 et T2

I.4 La machinerie d'IRM

L'IRM consiste à appliquer sur une partie du corps :

- Un fort **champ magnétique (B_0)**, généré par un **aimant principal** statique et fixe. Les aimants les plus couramment employés sont les électro-aimants supraconducteurs. Ils sont constitués d'une bobine rendue supraconductrice grâce à un refroidissement par hélium liquide, entouré d'azote liquide. Ils permettent d'obtenir des champs magnétiques intenses et homogènes mais sont chers et doivent être entretenus régulièrement (recharge de la cuve d'hélium notamment). L'intensité de ce champ principal, constant et permanent, est exprimée en **Tesla (T)** et elle détermine la précision, la finesse des images obtenues (rapport signal sur bruit) et le temps d'acquisition de ces images : plus élevé est le champ magnétique, meilleure est la résolution de l'image et plus rapide est l'acquisition. A l'heure actuelle, les machines IRM commerciales les plus sophistiquées utilisent des champs magnétiques de 3T.
- Le champ B_0 est graduellement varié dans le temps et l'espace pour former un gradient de champ magnétique, via les **bobines de gradient de champ magnétique**. Il s'agit de trois bobines métalliques (bobines x, y et z) enfermées dans un cylindre en fibres de verre et placées autour du tunnel de l'aimant, qui sont à l'origine de la formation de gradients de champs magnétique dans les trois directions de l'espace.

La réalisation d'un gradient de champ magnétique permet de caractériser dans l'espace chaque élément de volume étudié : la linéarité du gradient impacte donc la qualité des images. But = placer l'échantillon non pas dans un champ homogène, sinon tous les spins nucléaires résonneraient à la même fréquence, mais dans un gradient de champs (3 directions orthogonales, pour que chaque noyau, puisse résonner à une fréquence dépendant de sa position dans l'échantillon).

- Une antenne (bobinages de cuivre) émet simultanément une onde électromagnétique à haute fréquence (appelée ondes radio ou onde radiofréquence, RF), exprimée en MHz, qui excite les protons du tissu biologique. A l'arrêt de l'émission, les

protons reviennent à leur position initiale. Le signal ré émis est capté par une antenne réceptrice et permet de localiser les noyaux résonants dans l'échantillon. La chaîne radiofréquence comprend également le spectromètre pour le recueil et l'analyse du signal.

- La coordination des différentes étapes de l'examen et des séquences, le spectromètre, la reconstruction des images et leur post-traitement sont contrôlés par un système informatique interne et par les consoles d'acquisition et de post-traitement. On obtient au final une image 3D présentée en coupes successives.

II. AGENTS DE CONTRASTE

Le choix judicieux des paramètres instrumentaux permet d'optimiser le contraste mais pour élaborer un diagnostic médical rapide et précis, des agents de contraste sont indispensables. Ils augmentent le contraste, diminuent les temps d'acquisition (26, 90) et facilitent la distinction entre les tissus sains et pathologiques. Pour cela les agents de contraste en IRM vont interagir sur les protons de leur environnement. Ce n'est donc pas l'agent lui-même qui est détecté mais l'effet qu'il confère à son entourage. L'accélération de T1 augmente l'intensité du signal (agent positif et effet T1) et l'accélération de T2 diminue l'intensité du signal (agent négatif et effet T2). Certains produits de contrastes, sont des molécules de taille nanométrique. On parle de composés nanoparticulaires. Il s'agit d'un des rares domaines médicaux où les « nanotechnologies » ont abouti à des produits commercialisés avec des applications concrètes. Ces substances doivent être non toxiques, biocompatibles et efficaces à faible dose.

II.1 Les composés paramagnétiques (effet T1)

Leur principe repose sur l'utilisation de l'ion gadolinium (Gd^{3+}), un lanthanide présentant un moment magnétique électronique très élevé, car il porte de nombreux électrons non appariés. Sous l'application d'un champ magnétique externe, les moments magnétiques électroniques de ces produits paramagnétiques vont influencer les moments nucléaires de chaque proton de leur voisinage et changer par voie de conséquence leur temps de relaxation : les temps de relaxation T1 des protons de l'eau vont être diminués de manière prédominante. Cet effet paramagnétique est utilisé pour augmenter le contraste en IRM (on parle d'agents de contraste positifs) et ainsi améliorer la détection de certaines zones tout en diminuant le temps d'analyse.

L'ion gadolinium présente une certaine toxicité à l'état libre. En effet, il entre en compétition avec le calcium dans les processus calcium-dépendants du corps humain et doit toujours être utilisé sous forme de chélate. Exemple du complexe Gd-DOTA, DOTAREM® (Figure 22.)



[Figure 22.](#) Acide gadotérique, Gd-DOTA, DOTAREM[®]. Ion Gd³⁺ chélaté par une molécule organique macrocyclique : DOTA (acide 1, 4, 7, 10 tétra-azacycloDODécane N, N', N'', N''' Tétra-Acétique). D'après la brochure 2010 des laboratoires Guerbet.

Il existe sept agents de contraste à base de gadolinium commercialisés actuellement en Europe (voir [Tableau 7.](#)).

[Tableau 7.](#) Agents de contraste commercialisés en Europe à base de gadolinium (181)

Nom de spécialité	DCI (Dénomination Commune Internationale)	Abréviations chimiques	AMM (UE et autres pays)
DOTAREM[®] / ARTIREM[®]	Gadotérate mégлумine	Gd-DOTA	UE
MULTIHANCE[®]	Gadobénate dimégлумine	Gd-BOPTA	UE , Etats-Unis
GADOVIST[®]	Gadobutrol	Gd-DO3A-BUTROL	UE, Etats-Unis, Canada
MAGNEVIST[®]	Gadopentate dimégлумine	Gd-DTPA	UE, Etats-Unis, Japon
PROHANCE[®]	Gadoteridol	Gd-HP-DO3A	UE, Etats-Unis, Japon
OMNISCAN[®]	Gadodiamide	Gd-DTPA-BMA	UE, Etats-Unis, Japon

Ces composés se distribuent dans l'espace extracellulaire sans présenter de spécificité tissulaire. On obtient des images anatomiques avec une différenciation des tissus mous inégalée par les autres techniques d'imagerie.

II.2 Les composés superparamagnétiques (effet T2)

Les composés superparamagnétiques sont des nanoparticules d'oxyde de fer. A la différence des composés paramagnétiques, ils affectent de manière prépondérante la relaxation transverse des protons de l'eau en diminuant le temps de relaxation T2 et en diminuant l'intensité du signal des tissus. Ils agissent donc en tant qu'agents de contraste négatifs en augmentant le signal négatif sur les séquences T2 et T2* (73).

II.2.1. Superparamagnétisme

Ces oxydes de fer sont à l'origine des substances ferromagnétiques qui ont perdu leur résonance magnétique à cause de leur petite taille (nanométrique) : lorsqu'ils se trouvent dans un champ magnétique externe statique, les cristaux superparamagnétiques présentent un moment magnétique très élevé, mais cette aimantation va retourner à son état initial dès l'arrêt du champ magnétique externe sans conserver de magnétisme résiduel. Les particules superparamagnétiques ont une susceptibilité magnétique (faculté magnétique qu'a un matériau à s'aimanter sous un champ magnétique) supérieure à celle des composés paramagnétiques permettant une sensibilité de détection plus importante. Cet effet est la conséquence directe de la structure cristalline qui permet un couplage magnétique important avec un alignement parfait des spins magnétiques individuels. Les cristaux s'alignent et créent un champ magnétique local très intense qui déphase les protons environnants avec un raccourcissement important des temps de relaxations T1 et T2.

II.2.2. Structure

Ces nanoparticules sont toutes constituées d'un corps inorganique composé de cristaux d'oxyde de fer, comme la magnétite (Fe_3O_4) ou la maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) comprenant des ions paramagnétiques (Fe^{2+} , Fe^{3+}). Pour stabiliser ces nanoparticules dans les milieux biologiques, elles doivent être modifiées en surface à l'aide d'un enrobage. Ce dernier, hydrophile, peut être composé de silice ou de molécules organiques de structure polymérique, telles que le dextran (un polysaccharide naturel), polyéthylène glycol (PEG) ou des alginates... (113).

Cette couche permet de moduler le devenir des nanoparticules dans l'organisme en masquant et en contrôlant leurs propriétés de surface ferromagnétiques. Elle empêche la formation d'agrégats entre les nanoparticules magnétiques, permettant ainsi de stabiliser les suspensions *in vitro* (76). Enfin cette couche externe réduit les réactions d'oxydation ou de formation de complexes ioniques qui pourraient avoir lieu à la surface du corps ferrique (150).

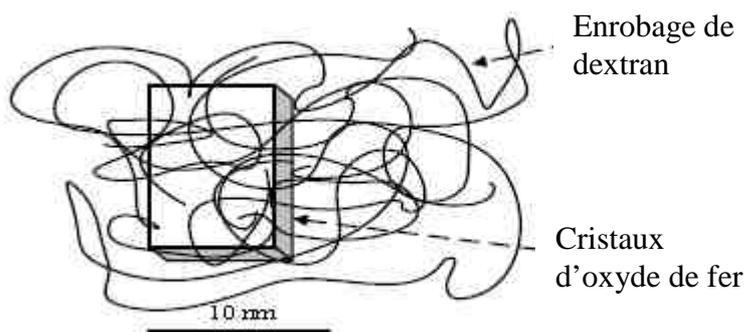


Figure 23. Représentation schématique d'une particule d'oxyde de fer enrobée par du dextran

II.2.3. Propriétés biologiques

Phagocytose cellulaire

Les agents superparamagnétiques ne sont plus des marqueurs des espaces extracellulaires mais des marqueurs de l'espace de diffusion des cellules phagocytaires, principalement les macrophages. Les organes présentant la plus haute densité de macrophages résidents sont les organes lymphoïdes (foie, rate, ganglions lymphatiques et moelle osseuse), les poumons et les espaces péritonéaux et pleuraux. Ces organes sont par conséquent un siège privilégié de la phagocytose dans l'organisme. En ce qui concerne les nanoparticules de fer, divers mécanismes de phagocytose ont été décrits: *Raynal et al.* ont rapporté que la prise en charge d'une nanoparticule enrobée de dextran par des macrophages péritonéaux de souris était médiée par une endocytose dépendante de récepteurs scavengers (RS) (154). Dans une autre étude (69), de plus petites particules (20 nm) également enrobées par du dextran ont été prises en charges par pinocytose dans des macrophages cultivés *in vitro*. La taille des nanoparticules

et leur charge extérieure ont un rôle majeur sur leur phagocytose et leur temps de circulation dans la circulation systémique (132) (Figure 24.)

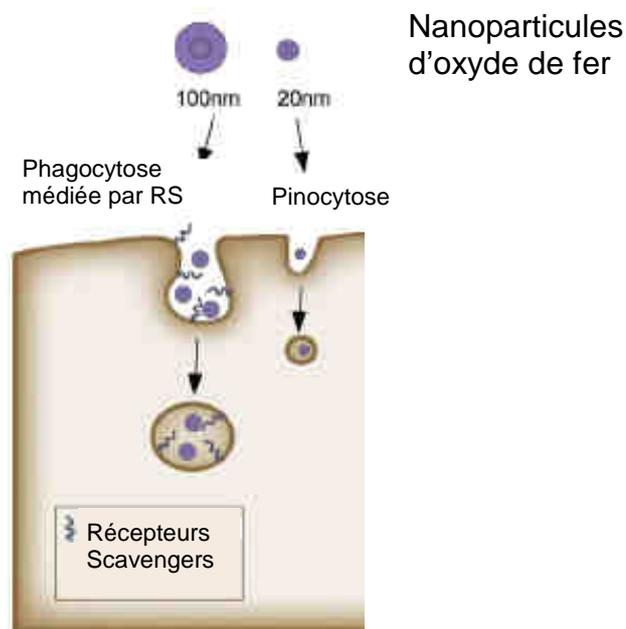


Figure 24. Voies d'internalisation cellulaire des nanoparticules d'oxyde de fer

Cependant les détails de la prise en charge des nanoparticules restent à élucider, et plusieurs hypothèses sont discutées : endocytose par les monocytes sanguins activés qui migrent vers les sites pathologiques ; transcytose à travers l'endothélium et migration dans les tissus suivie d'une endocytose progressive par des macrophages résidents ... De plus les USPIOs peuvent également être phagocytés, dans une moindre mesure, par d'autres cellules (183-185).

Biodégradation

Les nanoparticules d'oxyde de fer subissent les mêmes processus métaboliques que le fer physiologique. Il a été démontré qu'après captation macrophagique, l'enrobage était progressivement dégradé puis éliminé, et que le corps d'oxyde de fer était progressivement solubilisé dans les lysosomes macrophagiques (154). Le fer ainsi libéré est ensuite intégré au pool de fer de l'organisme (retrouvé au niveau de l'hémoglobine).

Biocompatibilité/Toxicologie

En général, les nanoparticules d'oxyde de fer sont classées comme biocompatibles. Les études

de toxicologie à ce jour n'ont pas mis en évidence d'effets toxiques sévères *in vitro* et *in vivo* (111). Chez l'animal, pas de modification du poids ou de la consommation alimentaire, pas d'effet sur la morbidité et la mortalité. Pas d'apparition de valeurs biologiques anormales. Pas de dommages tissulaires. Aucun effet mutagène n'a été mis en évidence mais un effet tératogène à forte dose a été signalé chez le rat et le lapin (187) (41). Aucune données de cancérogénèse n'a été publiée à ce jour. Chez l'homme, le niveau de tolérance locale est acceptable : les effets indésirables sont essentiellement de type anaphylactoïde (prurit, urticaire) problème par ailleurs difficilement évaluable en pré clinique en raison d'une mauvaise prédictivité des modèles (34).

II.2.4. SPIO / UPSIO

On distingue deux groupes de composés superparamagnétiques selon leur taille :

Les SPIO (Small superParamagnetic Iron Oxide) dont le diamètre global moyen est de 50 nm. Ces particules ont en commun leur prise en charge spécifique par le système phagocytaire mononucléé (SPM) essentiellement au niveau de la moelle osseuse, du foie et de la rate, sans prise en charge par le système lymphatique. Dans les années 1980s, les premiers essais cliniques ont mis en évidence leur capacité à induire une diminution du signal dans ces organes, après administration par voie intraveineuse (173, 186). Seulement un très faible pourcentage de SPIOs injecté est pris en charge par les macrophages et autres cellules phagocytaires en dehors du système phagocytaire mononucléé (187).

Les USPIOs (UltraSmall superParamagnetic Iron Oxyde) dont le diamètre est inférieur à 50 nm, seront quand à eux le **sujet des travaux présentés dans la suite de ce manuscrit**. Ces nanoparticules sont capables d'éviter la prise en charge précoce et massive par les macrophages du foie et de la rate grâce à leur très petite taille et à leur enrobage. Les USPIOs sont caractérisés par une **demi-vie d'élimination plasmatique** considérablement plus longue que celle des SPIOs. Un temps de rémanence dans la circulation sanguine systémique élevé ainsi qu'une capacité à l'extravasation par un passage à travers les pores serrés de l'endothélial capillaire (157), augmente la distribution tissulaire de ces particules et leur

permet de **cibler les macrophages des compartiments profonds** (154). Les particules d'USPIO injectées par voie intraveineuse sont prises en charge principalement par les macrophages et autres cellules phagocytaires mobilisées dans les différentes parties du corps, au cours des maladies inflammatoires. Les USPIOs ont ainsi un champ d'investigation clinique plus large que celui des SPIOs. Ils peuvent être utiles dans la détection de troubles inflammatoires ou dégénératifs associés au recrutement des macrophages, tels que les métastases des ganglions lymphatiques (117), les plaques d'athérosclérose (159), la sclérose en plaque (52), la polyarthrite rhumatoïde... De plus ces USPIOs pourraient être une alternative aux agents de contraste à base de chélate de gadolinium dans l'exploration par IRM des patients atteints de pathologies rénales et présentant un risque de fibrose systémique néphrogénique (140).

II.2.5. Applications générales de l'imagerie associée aux SPIOs/USPIOs

L'utilisation de l'imagerie macrophagique est intéressante pour le diagnostic des pathologies inflammatoires et dégénératives, au cours desquelles les macrophages jouent un rôle central dans la pathogenèse et sont présents de manière abondante au niveau des structures des zones affectées. De plus cette technologie est utile pour la surveillance de l'efficacité de nouvelles thérapies dont la réponse affecte l'activité macrophagique : il peut s'agir d'antibactériens, d'anti-inflammatoires, des thérapies des maladies auto-immunes (anti-IL1, anti- TNF). Au cours des études expérimentales que nous présenterons plus loin dans ce manuscrit, nous étudierons la place de l'IRM associée aux USPIOs dans un modèle expérimental d'arthrite bactérienne du genou.

III. ARTHRITE BACTERIENNE AIGUE

Un patient se présentant avec une ou plusieurs articulations chaudes, enflées et douloureuses correspond à une urgence médicale courante. Cependant de tels symptômes correspondent à un large éventail de diagnostics différentiels, et bien qu'il ne s'agisse pas du plus fréquent, l'arthrite septique bactérienne en est la cause la plus sérieuse. En effet cette pathologie articulaire évolue très rapidement vers une destruction irréversible de l'articulation si la prise en charge thérapeutique est retardée ou inadéquate, associée à une morbidité et une mortalité élevées.

III. 1 Epidémiologie

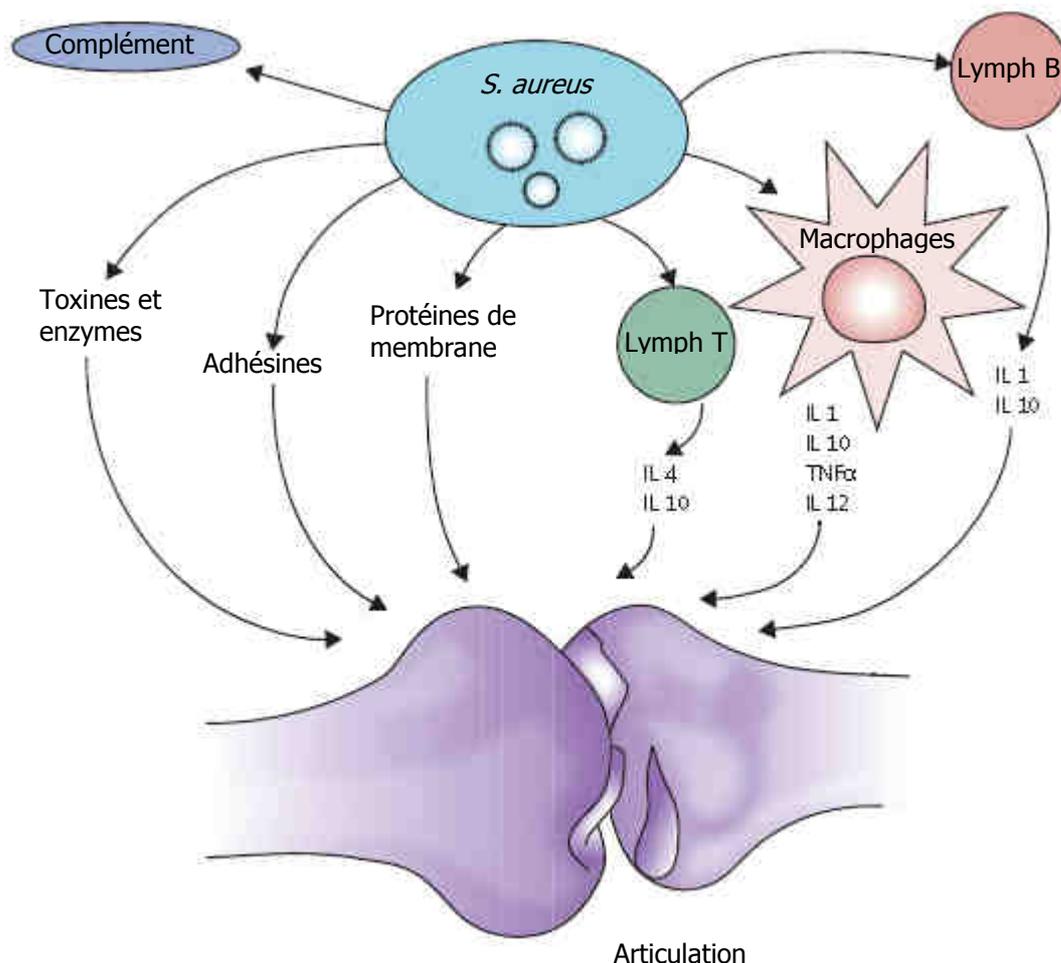
L'incidence générale de l'arthrite septique est estimée à environ 6 cas pour 100 000 habitants par an dans les pays industrialisés (177). Ce taux est en constante augmentation, en raison de l'augmentation des procédures invasives, des infections orthopédiques, d'un vieillissement de la population et de l'administration croissante de traitements immunosuppresseurs. Parmi tous les groupes d'âge et de risque, l'organisme le plus fréquemment isolé reste *Staphylococcus aureus*, suivi par d'autres bactéries à coloration de Gram positive incluant les streptocoques. La mortalité de l'arthrite septique varie selon les études mais semble se situer autour de 11% dans les cas d'infection monoarticulaire (130).

III.2 Physiopathologie

La porte d'entrée de l'infection est le plus souvent hématogène mais elle peut également être liée à une inoculation directe du germe dans l'articulation suite à un traumatisme. L'origine bactériémique est plus souvent observée chez des patients immunodéprimés et chez des patients hospitalisés. *S. aureus* produit de nombreux facteurs de virulence, incluant diverses toxines extracellulaires et des enzymes. De plus des composants de la paroi cellulaire

bactérienne, tels que la protéine A et des adhésines spécifiques ont été bien caractérisées en tant qu'acteur de la virulence des souches de cette espèce (130).

Les cellules de l'immunité innée (cellules du SPM et polynucléaires neutrophiles) sont la première ligne de défense de l'organisme, immédiate et non spécifique, contre les invasions par des microorganismes. Macrophages et neutrophiles sont capables de phagocyter et de détruire les microorganismes. Ces derniers traversent une barrière épithéliale et sont immédiatement reconnus par les macrophages tissulaires. Les neutrophiles représentent seulement la deuxième population de phagocytes. Ils ne sont pas présents au niveau des tissus sains mais sont rapidement recrutés en grand nombre dans les tissus infectés. Au niveau du site d'infection les macrophages sont recrutés plus lentement mais ils persistent plus longtemps. En effet, le polynucléaire neutrophile présente une durée de vie très courte (1 à 4 jours). Il meurt par apoptose juste après avoir phagocyté les bactéries puis il est lui-même phagocyté par les macrophages. Le macrophage présente quant à lui une durée de vie dans les tissus allant jusqu'à plusieurs mois (8) (100). Au niveau des articulations infectées, les macrophages sont progressivement mais intensivement recrutés dès la phase précoce de l'infection bactérienne. Dans la phase aiguë de l'infection, les cytokines sécrétées par les lymphocytes T les attirent et les activent. Ils peuvent alors migrer au niveau du site de l'infection où ils sont hautement impliqués dans la mise en place d'une réaction inflammatoire destinée à éradiquer les microorganismes (sécrétion de nombreuses enzymes hydrolytiques, d'immunomodulateurs tels qu'interferon alpha et beta, IL-1...) (130) (Figure 25).



[Figure 25](#). Physiopathologie de l'arthrite septique staphylococcique. D'après (130)

Ceci se caractérise par une augmentation de la perméabilité vasculaire avec une accumulation des fluides et du plasma dans les tissus et une infiltration par des cellules inflammatoires.

III.3 Diagnostic

Les individus avec une arthrite bactérienne aiguë se présentent avec un tableau clinique souvent bruyant : une histoire d'articulation isolée rouge, douloureuse, avec un épanchement purulent et de la fièvre. Le diagnostic repose sur **l'isolement de bactéries dans le liquide synovial** après ponction de l'articulation. Ce prélèvement articulaire à visée bactériologique est réalisé avant l'introduction de l'antibiothérapie. En cas de suspicion d'arthrite septique et quelle que soit la gravité de l'infection, une hémoculture doit également toujours être réalisée avant la première administration d'antibiotique, même en l'absence de syndrome fébrile, afin

d'augmenter les chances d'isoler le microorganisme responsable. Un agent infectieux est habituellement retrouvé à la culture du liquide synovial dans 60 à 90% des cas et dans environ 50% des cas à l'examen direct (78). Dans une étude, les hémocultures étaient positives dans 24 % des cas où une culture du liquide articulaire était positive. Dans 9% des cas, seule l'hémoculture était la source d'un diagnostic microbiologique positif (189). En pratique, la présence de symptômes évocateurs d'une infection systémique, n'est pas un pré-requis au diagnostic d'arthrite septique, puisque seuls 60% des cas présentent une fièvre >37.5 °C. Au niveau de l'investigation biologique, le suivi des taux sériques de la CRP et de la procalcitonine est réalisé, en tant qu'éléments indicateurs d'une infection, mais aucun paramètre biologique sérologique ou synovial n'est à lui seul spécifique de l'arthrite septique. La ponction de l'articulation est indispensable et reste l'examen clé face à un tableau d'une articulation enflée et chaude. Mais cet acte invasif n'est pas dénué de risques traumatiques et infectieux supplémentaires. Ainsi dans certaines situations, les médecins ont recours, comme aide au diagnostic, à une technologie non invasive : l'imagerie par résonance magnétique.

III.4 Prise en charge thérapeutique

Le traitement d'une arthrite bactérienne aiguë comprend, selon les recommandations de pratique clinique de la SPILF, un traitement antibactérien court (3 à 6 semaines) comprenant des antibiotiques bactéricides, tels que bêta-lactamine et aminoside ou glycopeptides. Un drainage articulaire est réalisé pour obtenir un prélèvement à visée bactériologique, mais il sert aussi à soulager le patient en diminuant la pression intra-articulaire génératrice de douleurs et à évacuer le liquide inflammatoire qui participe à la destruction de l'articulation. Une synovectomie est parfois réalisée sur les grosses articulations. Enfin une immobilisation de l'articulation peut permettre une meilleure récupération.

III.5 Suivi de la guérison

L'efficacité du traitement est tout d'abord jugée sur la clinique : la diminution des douleurs, la diminution de l'épanchement articulaire et des signes inflammatoires locaux, une normalisation de la température centrale en quelques jours. Bien que la diminution de la CRP soit un élément de surveillance, il n'existe pas de marqueur biologique spécifique de la guérison. Une ponction articulaire n'est pas réalisée pour confirmer la stérilité de la cavité synoviale et comme nous allons le voir dans le paragraphe suivant, les techniques d'imagerie conventionnelle ne permettent pas de visualiser la guérison d'une articulation.

III.6 Place de l'IRM conventionnelle

L'IRM présente une haute résolution spatiale et un excellent contraste des tissus mous permettant une mise en évidence précise des épanchements articulaires et des anomalies de la synoviale (épaississement du tissu synovial) caractéristiques des infections articulaires bactériennes. La présence d'une inflammation de la synovie est associée à une augmentation de l'intensité du signal T1 au cours d'une IRM au gadolinium, permettant ainsi de distinguer précisément une hyperplasie de la synoviale, d'un épanchement et de l'environnement tissulaire directe (tendons et cartilage). Ces caractéristiques radiologiques, liées à l'accumulation du gadolinium dans l'espace extra vasculaire, mettent en évidence une perméabilité capillaire augmentée des tissus inflammés. Les modifications de la synoviale de type extracellulaire (œdème, angiogénèse) ne correspondent pas à un marquage tissulaire ou cellulaire et ne sont pas spécifiques d'une pathologie articulaire particulière. La technique d'IRM associée au gadolinium ne permet donc pas de distinguer précisément une arthrite septique d'un autre type d'arthrite inflammatoire aiguë (arthrite rhumatoïde, trauma, ostéo-arthrite post-chirurgie articulaire ou ostéo-arthropathie diabétique... (153)). De plus, les modifications observées peuvent persister pendant plusieurs semaines après résolution de l'infection en raison du développement du tissu granuleux et fibreux de cicatrisation (36, 115) (Figure 26.).

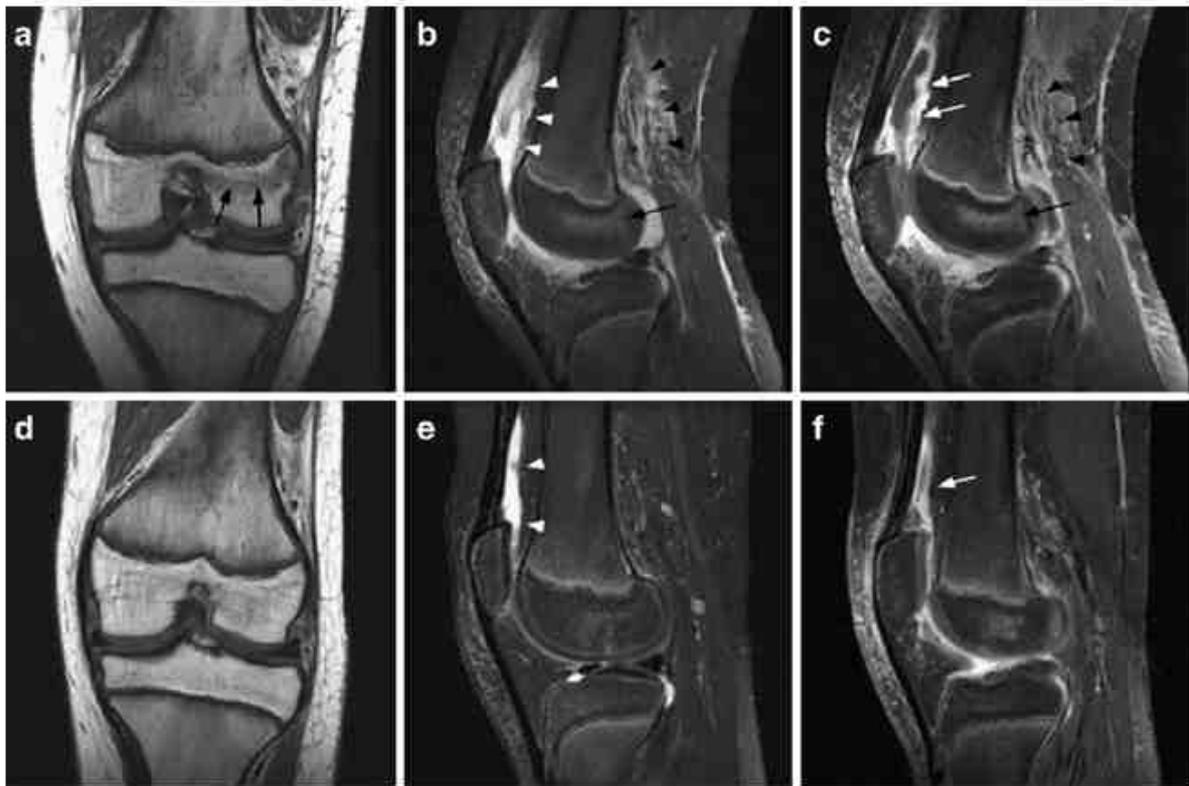


Figure 26. Arthrite septique d'un genou gauche chez une jeune fille de 14 ans. **a)** Séquence T1 coronale **b)** séquence T2 sagittale **c)** séquence T1 sagittale contrastée au gadolinium. Les images **a)**, **b)** et **c)** correspondent à une baseline avant prise en charge thérapeutique. On observe un œdème au niveau du condyle fémorale latéral (flèches noires), un épanchement de l'articulation (têtes de flèches blanches), une myosite/cellulite (têtes de flèches noires) et un épaississement de la synoviale (flèche blanches).

Les images **d)** Séquence T1 coronale **e)** séquence T2 sagittale, **f)** séquence T1 sagittale contrastée au gadolinium, montrent une résolution de l'œdème mais une persistance des anomalies de signal sur les séquences T2 et T1 contrastée avec persistance de la synovite (flèches blanches) bien que l'infection ait été traitée avec succès à ce moment de l'étude. D'après (36)

Pour conclure, l'IRM conventionnelle n'est utilisée en pratique ni pour le diagnostic spécifique d'une arthrite septique aiguë, ni pour la mise en évidence de la guérison après prise en charge médicale. Cette technique reste cependant la technique de choix pour **évaluer la présence et l'étendue de l'inflammation, de la destruction et de la réponse tissulaire.**

IV. IMAGERIE DES MACROPHAGES ET ARTHRITE BACTERIENNE

Une nouvelle approche du diagnostic d'arthrite infectieuse pourrait être la mise en évidence d'une infiltration cellulaire pathologique du tissu synovial par les macrophages. En effet, comme nous l'avons vu précédemment dans le paragraphe présentant la physiopathologie de l'arthrite bactérienne, les macrophages font parti des cellules clés impliquées dans l'initiation et le développement de la réaction inflammatoire au cours d'une infection bactérienne. Une fois exposés aux antigènes bactériens et aux cytokines relarguées par les lymphocytes T, les macrophages vont s'activer et accroître leur capacité phagocytaire ainsi que leur activité cytolytique. Ces macrophages activés vont massivement migrer au niveau du site de l'infection bactérienne et aider au processus d'élimination des débris cellulaires (100).

Mais quel est le potentiel de l'IRM associée aux USPIOs dans la mise en évidence de l'activité macrophagique au cours d'une arthrite bactérienne du genou ?

V. ETUDES EXPERIMENTALES

V.1 Introduction et objectifs

- **Introduction**

Préalablement à nos travaux, l'intérêt de l'imagerie du macrophage utilisant l'IRM associée aux USPIOs a été évaluée dans des modèles d'arthrite inflammatoire du genou induite par des antigènes (57, 123, 124). Nous citerons l'équipe de Lutz et al. (124) qui a évalué les USPIOs en tant que marqueurs de l'activité macrophagique dans un modèle d'arthrite non infectieuse expérimentale chez le lapin (arthrite rhumatoïde induite par injection intra-articulaire de BSA méthylé): dans ce modèle, la session d'IRM associée aux USPIOs est réalisée en moyenne 18 jours après l'induction antigénique. A ce stade, l'arthrite était développée chez tous les animaux (n=10) avec une accumulation importante de macrophages dans le tissu synovial et dans une moindre mesure au niveau du liquide synovial. Les résultats de cette étude montrent qu'après administration intraveineuse d'USPIO (ferumoxytol, AMI 7228, dose de 150µmol Fe/kg), des changements significatifs des caractéristiques du signal IRM ont été mis en évidence : les effets T1 (augmentation de l'intensité du signal) mais de manière prédominante les effets T2 et T2* (diminution de l'intensité du signal) étaient significatifs au niveau de la synovie des 10 genoux atteints, 24h après injection des USPIOs. Dans une moindre mesure, un effet T2* était également présent au niveau de l'épanchement articulaire. Les résultats de l'examen histopathologique ont révélé que les macrophages chargés en fer (colorations Hématoxyline-Eosine et Bleu de Prusse) étaient situés dans les zones de la synovie où la diminution du signal était détectée à l'IRM. Ceci reflète la prise en charge des USPIOs par les macrophages dans le tissu synovial. Des macrophages chargés en fer ont également été mis en évidence au niveau de la moelle des structures osseuses des genoux et dans les ganglions lymphatiques poplités. Aucune détection de fer n'a été observée dans les espaces extracellulaires de tous les genoux examinés. De plus aucune vésicule de fer n'a été observée dans les granulocytes ou lymphocytes dans cette étude.

A notre connaissance, préalablement à nos travaux, aucune étude d'imagerie du macrophage par IRM associée aux USPIOs n'avait été réalisée sur un modèle d'arthrite bactérienne du genou.

- **Objectifs de nos travaux**

Nous avons choisi d'étudier l'imagerie du macrophage dans un modèle d'arthrite bactérienne aiguë à *Staphylococcus aureus*, en tant qu'agent majoritairement responsable de cette pathologie chez l'homme.

Après avoir mis au point le modèle expérimental d'infection chez le lapin, nous avons répondu aux questions suivantes :

- 1) L'IRM associée aux USPIOs permet-elle de mettre en évidence qualitativement et quantitativement une infection bactérienne aiguë du genou ?
- 2) L'IRM associée aux USPIOs permet-elle de mettre en évidence la guérison d'une arthrite bactérienne aiguë du genou traitée par antibiothérapie ?

V.2 Matériel et méthodes

- **Modèle infectieux d'arthrite du genou**

Pour réaliser les études expérimentales que nous allons présenter dans la suite de ce manuscrit, nous avons mis au point un modèle d'arthrite bactérienne du genou chez le lapin : une souche de collection de *Staphylococcus aureus* méticilline sensible (Newman strain, NTCC 8178) diluée dans du sérum physiologique (10^4 à 10^6 UFC/mL) a été injectée directement par voie intra-articulaire dans le genou droit de chaque lapin. Le genou gauche n'a reçu aucune injection et a servi de contrôle négatif interne.

- **Analyse bactériologique**

La concentration de l'inoculum bactérien injecté chez chaque lapin a été contrôlée par ensemencement de dilutions successives sur géloses au sang. Les prélèvements de liquide synovial réalisés au cours de nos expériences ont été ensemencés sur gélose au sang ainsi que sur gélose Drigalski et gélose PVX pour suivre l'évolution de la concentration bactérienne et vérifier l'efficacité bactéricide de l'antibiothérapie.

- **Analyse histopathologique**

La coloration hématoxyline-éosine met en évidence les noyaux (colorés en bleu-noir) et le cytoplasme (coloré en rouge-orangé) des cellules. Cette technique est utilisée pour observer la présence de cellules inflammatoires au niveau des échantillons de synovie et donc mettre en évidence une synovite. Le réactif de Perls (ou bleu de Prusse) est utilisé pour détecter la présence de particules de fer dans ces échantillons et donc visualiser la localisation des nanoparticules de fer (USPIOs). Enfin des anticorps monoclonaux de lapin anti RAM-11 ont été utilisés en tant que marqueurs spécifiques des macrophages, pour étudier la proportion et la distribution des macrophages dans la synovie (132). Les résultats de l'examen histologique

ont été étudiés en parallèle des images de RM pour comparer les changements d'intensité de signal d'IRM avec la distribution en fer et en macrophages.

- **Analyse des examens IRM**

Les examens de RM des genoux des lapins ont été réalisés avec un champ magnétique de 3 Teslas. Tous les agents de contraste utilisés nous ont été fournis par le laboratoire Guerbet. Tout d'abord, nous avons utilisé un chélate de gadolinium (Gadotérate méglumine, DOTAREM[®], 0,1 mmol/kg injecté par voie intraveineuse une minute avant le début de la séquence) comme agent de contraste de référence pour confirmer la présence d'une inflammation de la synovie à la phase aiguë de l'infection. Les modifications de signaux observées sur les images T1 mettent en évidence les modifications extracellulaires suivantes : épaissement de la synovie et épanchement intra-articulaires. Les images contrastées par cet agent servent également de référence pour localiser ces modifications au niveau de l'articulation avant l'administration d'USPIO.

De plus, deux différents USPIOs ont été utilisés au cours de nos travaux. Dans la première étude, nous avons utilisé le ferumoxtran-10 (SINEREM[®]). Dans la deuxième étude nous avons étudié le P904. Si ces deux USPIOs présentent une taille similaire moyenne de 30 nm avec un corps de maghémite, leur enrobage diffère : polymère de dextran pour le ferumoxtran-10 et dérivé amino-alcool de glucose pour le P904. Le P904, présente une demi-vie plasmatique plus faible : 3.5 h chez des lapins *versus* plusieurs jours pour une dose équivalente de ferumoxtran-10 (167). Ces deux USPIOs ont été administrés par injection intraveineuse unique à une dose équivalente de 150 $\mu\text{mol Fe / kg}$. Cette dose ayant été montrée efficace pour induire des changements de signaux de résonance magnétique dans un modèle d'arthrite inflammatoire du genou chez le lapin (124). Les séquences d'IRM contrastées par les USPIOs ont été réalisées systématiquement 24h après administration. Cet intervalle de temps permettant l'élimination des particules de fer de l'espace vasculaire et une

phagocytose des USPIOs par les macrophages n'appartenant pas au système réticulo-endothélial (31, 89, 185).

V.3 Etude de l'IRM associée aux USPIOs dans un modèle expérimental d'arthrite aiguë du genou à *S. aureus* chez le lapin

ARTICLE N°5 : MISE EN EVIDENCE DE L'INFECTION BACTERIENNE

L'IRM associée aux USPIOs permet-elle de mettre en évidence qualitativement et quantitativement une infection bactérienne aiguë du genou ?

Dans cette étude (37) nous avons réalisé une infection unilatérale du genou chez 8 lapins. En phase aiguë de l'infection, une première session d'IRM a été réalisée en utilisant le produit de contraste à base de chélate de gadolinium (DOTAREM®). Immédiatement après cette session d'IRM, une dose de ferumoxtran-10 (SINEREM®) a été administrée à chaque lapin. 24 h après, une deuxième session d'IRM a été réalisée. Des séquences pondérées en T1, T2 et T2* ont été réalisées au cours de ces deux sessions d'IRM, puis une analyse qualitative et quantitative des images a été réalisée.

Au niveau qualitatif, les images ont mis en évidence un épanchement articulaire et un épaissement de la synovie avant administration d'USPIO (augmentation du signal sur les images des séquences pondérées en T1 contrastées au gadolinium), ainsi que des changements de signaux après administration d'USPIO (perte distincte de signal au niveau de la synoviale des huit genoux infectés sur les images des séquences pondérées en T1, T2 et T2*). La distribution de ces modifications de signal correspondait exactement aux zones présentant une augmentation de signal sur les images pondérées en T1 contrastées par gadolinium.

L'analyse quantitative confirmait l'analyse visuelle en montrant une perte statistiquement significative de signal (nombre de pixels noirs) au niveau de la synovie 24h après administration d'USPIO sur les séquences pondérées en T1 ($p=0.01$), T2 ($p=0.01$) et T2* ($p=0.01$) des genoux infectés. L'analyse histopathologique a confirmé le développement d'une synovite importante au niveau de ces genoux avec une infiltration intense par des macrophages contenant du fer. Au contraire, aucune modification n'a été observée pour les

genoux contrôles. Les images de RM de ces derniers ne montraient aucune modification des signaux et l'examen histologique confirmait la présence d'une synovie normale sans infiltration par des cellules inflammatoires et des macrophages contenant du fer. La modification des signaux observée après administration d'USPIO dans les genoux infectés révèle donc bien la présence d'une infection. Enfin, l'utilisation du gadolinium a permis de mettre en évidence une excellente correspondance entre la localisation des changements de signaux dus aux modifications extracellulaires vs cellulaires : la synovie est donc bien le lieu des changements de signaux induits par les USPIOs.

Les résultats de notre étude ne sont pas en totale concordance avec ceux du modèle d'arthrite induite par antigène de l'équipe de Lutz et al. (124). En effet ces derniers montrent une perte significative du signal pondéré en T2 et en T2* au niveau de la synovie après administration d'USPIO, mais ils observent, contrairement à nous, une augmentation significative du signal sur les images pondérées en T1. Administrés à la même faible dose (ferumoxytol, 150 $\mu\text{mol Fe/kg}$), une des hypothèses proposée pour expliquer cet effet paradoxal des USPIOs pourrait être la différence de puissance du champ magnétique utilisé dans nos deux études (1.5 T *versus* 3T dans notre étude). Ceci pourrait expliquer les différences de relaxivité des USPIOs. La perte de signal observée sur les images pondérées en T1 dans notre étude pourrait également être due à une proportion plus importante de fer présent dans le tissu synovial infecté. Cette hypothèse suggérerait la présence d'une infiltration plus intense de la synovie par des macrophages activés dans notre modèle d'arthrite bactérienne aiguë, par rapport au modèle d'arthrite aseptique induite par antigène. Il serait par conséquent intéressant d'étudier plus largement l'attitude de ce signal T1 après administration d'USPIO dans ces deux pathologies distinctes, afin de mettre en évidence une utilité dans le diagnostic différentiel d'une monoarthrite chez des patients atteints d'arthrite rhumatoïde (Même machinerie d'IRM, mêmes animaux, même USPIO administré à la même dose et par la même voie d'administration, même protocole d'IRM).

Cette étude présente plusieurs limites :

tout d'abord, le faible effectif d'animaux inclus (n=8) dans cette étude nous oblige à la considérer comme une étude expérimentale préliminaire. Ensuite cette étude a été réalisée sur un modèle animal et il n'est pas certain que les résultats puissent être extrapolés à un modèle d'arthrite septique humaine. Cependant, dans une étude réalisée sur 10 volontaires sains humains, *Reiner et al* (156) ont montré qu'aucun changement qualitatif ou quantitatif du signal d'IRM (séquences pondérées en T1, T2 et T2* avec un champ de 1.5 T) n'était détecté au niveau de la synovie des genoux de ces patients après administration de ferumoxtran-10 (2.6 mg Fe/kg). Ainsi aucun changement de signal non spécifique ne semblerait entraver l'IRM associée aux USPIOs dans l'imagerie de genoux sains humains, ce qui laisserait envisager que la prise en charge des USPIO dans la synovie de genoux humains pourrait être observée chez des patients présentant une pathologie articulaire du genou liée à un augmentation de l'activité macrophagique

Pour conclure, cet article révèle que l'imagerie utilisant l'IRM associée aux USPIOs est capable de mettre en évidence la présence de macrophages dans l'arthrite bactérienne, en montrant leur infiltration dans la synoviale infectée. Cette technique pourrait permettre une identification plus exacte de la présence ou de la persistance d'une infection dans le cadre des maladies ostéo-articulaires.

L'IRM associée aux USPIOs permet-elle de mettre en évidence la guérison d'une arthrite bactérienne aiguë du genou ?

Le suivi de l'évolution d'une arthrite bactérienne au cours d'un traitement antibiotique reste un challenge à ce jour. Comme nous l'avons cité précédemment, l'IRM associée au gadolinium n'est pas capable, dans la plupart des cas, de mettre en évidence la guérison de l'infection car l'hypersignal observé peut persister pendant des semaines après la résolution de l'infection. Pour réaliser notre étude (118) nous nous sommes basés sur le postulat suivant : au moment de la phase aiguë d'une infection bactérienne les macrophages activés sont intensivement recrutés, et leur nombre diminuera parallèlement à la résolution de cette infection (8). De plus il a été démontré que le nombre de pixels noirs observés sur les images de RM après injection d'USPIOs était corrélé à la quantité de fer phagocytée et au nombre de macrophages activés au niveau tissulaire (97, 167). Après l'injection d'USPIO, la perte d'intensité de signal observée reflèterait donc l'importance de l'infiltration macrophagique. Ainsi suivre l'évolution de la quantité de macrophages présents au niveau du site infecté pourrait être un marqueur de la guérison dans le cadre d'une arthrite bactérienne aiguë.

Dans cette étude, 12 lapins présentant une infection unilatérale du genou ont subi une session d'IRM à la phase aiguë de l'infection avant la mise en place de l'antibiothérapie. Le protocole d'imagerie était le suivant : séquences pondérées en T1 avant et après administration de chélate de gadolinium, suivies de séquences pondérées en T2* réalisées avant et 24h après administration d'USPIO. Suite à cette première session d'IRM, 6 lapins ont été euthanasiés pour analyse histopathologique de la synoviale à la phase aiguë de l'infection.

Les 6 autres lapins ont reçu une antibiothérapie adaptée et ont subi une deuxième session d'IRM après guérison de l'infection (stérilisation de la cavité articulaire).

Au stade aiguë de l'infection, une augmentation marquée du signal a été observée qualitativement sur les images T1 contrastées au gadolinium pour toutes les synovies infectées (n=12). 24 h après administration de P904, tous les animaux montraient des zones diffuses de pixels noirs localisées dans la synovie sur les images T2*. A ce stade, l'analyse histopathologique a révélé une inflammation de la synovie, caractérisée par une hyperplasie synoviale et par la présence d'un important infiltrat de cellules inflammatoires, comprenant des polynucléaires, des lymphocytes, ainsi qu'une infiltration intense de macrophages contenant du fer. Après administration du traitement antibiotique adapté (n=6), des zones avec une perte d'intensité de signal étaient toujours observées sur les images T2* avant ré-administration de P904. Cependant le nombre de pixels noirs était significativement plus faible que sur les images T2* contrastées par P904 au moment de la phase aiguë de l'infection (1077 ± 189 vs 314 ± 89 , $p=0.03$). Après ré-administration de P904, aucun changement significatif du nombre de pixels noirs n'a été observé sur les images T2* (314 ± 89 vs 306 ± 92 , $p=0.14$). Par contre l'hypersignal observé sur les images T1 contrastées au gadolinium sont conservées chez tous les animaux. La prise en charge du gadolinium est toujours visible dans les synovies même après l'efficacité bactéricide du traitement antibiotique. Les résultats de l'analyse histopathologique ont montré la résolution de l'aspect inflammatoire de la synovie et le développement de tissu fibreux cicatriciel. L'infiltration macrophagique significativement plus faible que celle observée à la phase aiguë ($p=0.04$). Les cellules contenant du fer étaient toujours présentes. L'analyse bactériologique des échantillons de liquide synovial a confirmé la présence d'une infection bactérienne dans le genoux infecté des 12 lapins de l'étude au moment de la phase aiguë de l'infection. Cette analyse, renouvelée au moment de l'étude de la phase de guérison, a confirmé la stérilisation du tissu synovial et du liquide articulaire.

Dans le groupe de lapins guéris, le nombre de pixels noirs était significativement plus faible après l'administration de l'antibiothérapie qu'au moment de la phase aiguë de l'infection, indiquant une réduction du contenu en nanoparticules de fer sur les images de la zone étudiée. Cette réduction peut être due à une réduction du nombre de macrophages présents sur le site, ou à une diminution du contenu en fer des macrophages présents (perte de la capacité des macrophages à phagocyter les USPIOs), ou à une combinaison des deux mécanismes. L'analyse histologique a démontré, grâce au marquage spécifique par l'Ac anti-RAM 11, que le nombre de macrophages effectivement présents dans la synovie était significativement plus faible dans le groupe guéri que dans le groupe infecté : 24 h après la deuxième injection d'USPIO, aucun changement significatif du nombre de pixels noirs n'a été observé dans le groupe guéri, suggérant qu'aucune nouvelle nanoparticule de fer n'a pas été phagocytée à cette étape. Ainsi soit les macrophages présents étaient saturés en USPIOs, soit ils n'étaient pas activés et incapables de phagocyter les USPIOs en raison de la résolution de l'inflammation aiguë. La réduction du nombre de pixels noirs dans le groupe guéri, entre les images T2* contrastées par les USPIOs en phase aiguë et les images T2* non contrastées après guérison, peut donc être considérée comme étant due à une réduction du nombre de macrophages activés au niveau de la synovie.

Il a été démontré que les USPIOs phagocytés par les macrophages étaient capables de rester à l'intérieur de ces cellules pendant plusieurs jours (167). Dans notre étude, la présence de pixels noirs persistait 7 jours après la première injection d'USPIO, permettant d'envisager une évaluation des changements de signaux entre la phase aiguë de l'infection et la phase de guérison sans une deuxième administration d'USPIO. Étant donné qu'aucun changement qualitatif ou quantitatif du signal d'IRM n'a été détecté au niveau de la synovie des genoux de volontaires sains humains (156), l'imagerie RM associée aux USPIOs pourrait présenter une haute sensibilité et spécificité dans l'évaluation des pathologies synoviales humaines, puisque de faibles changements d'intensité de signal refléteraient des changements pathologiques.

Cependant l'attitude précise des particules d'USPIOs à l'intérieur des macrophages sur plusieurs jours après injection n'a pas été évaluée et reste à étudier.

En ce qui concerne les images de RM au gadolinium, nos résultats confirment que, contrairement à l'imagerie cellulaire, les séquences contrastées au gadolinium sont incapables d'aider précisément au suivi de la guérison d'une arthrite bactérienne aiguë.

V.4 Discussion et perspectives de la partie 2

Le modèle animal développé pour réaliser ces deux études peut être considéré comme reflétant de façon satisfaisante la pathologie infectieuse humaine. Le lapin est en effet couramment utilisé en tant que modèle expérimental d'arthrite bactérienne : le genou de cet animal présente une anatomie similaire à celle de l'homme et suite à une infection bactérienne intra-articulaire, on observe une réponse immunitaire et des modifications tissulaires identiques au niveau de la synovie, du cartilage et de l'os menant à une destruction de l'articulation (79). De plus, techniquement, le genou des lapins présente une capsule synoviale avec un volume assez important pour réaliser des prélèvements répétés de liquide articulaire. L'exploitation en imagerie de ce modèle permet d'obtenir des images interprétables et relativement comparables à celles de l'homme.

L'imagerie cellulaire et plus particulièrement l'imagerie des macrophages et des cellules phagocytaires offre une nouvelle dimension à l'imagerie ostéo-articulaire. Une mise en évidence plus spécifique des phénomènes pathologiques peut ainsi être obtenue *in vivo*. Nous avons montré que l'imagerie macrophagique permet d'une part la mise en évidence des arthrites aiguës bactériennes du genou et, d'autre part, permet de visualiser la guérison de l'articulation. En effet nous avons mis en évidence des modifications qualitatives et quantitatives du signal IRM due à la disparition macrophagique après administration d'une antibiothérapie adaptée et efficace. Des modifications qui n'étaient pas visualisables sur les images d'IRM au gadolinium. Ces résultats sont à présents à évaluer et à valider chez l'homme. Enfin le rôle de cette technique d'imagerie cellulaire en tant qu'outil d'aide au diagnostic différentiel entre arthrite inflammatoire non infectieuse et infectieuse reste à évaluer.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Cubist Pharmaceuticals.** 2006. Cubicin (daptomycin for injection) prescribing information. cubist Pharmaceuticals, Lexington, MA.
2. **Argemi, X., Y. Hansmann, D. Christmann, B. Jaulhac, F. Jehl.** In vitro activity of daptomycin against clinical strain of *Enterococcus faecalis* isolated from endocarditis as determined by time-kill studies under various conditions of growth phase, inoculum and pH. In Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2011.
3. **Baltz, R.H.** 1997. Lipopeptide antibiotics produced by *Streptomyces roseosporus* and *Streptomyces fradiae*. In: Strohl WR, ed. Biotechnology of antibiotics. 2nd ed. New York: Informa Healthcare. p415-435.
4. **Renier, G.** 2008. Immunologie de l'oeil. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique.* 48: 303-313.
5. **Baltz, R.H.** 2007. Antimicrobial from actinomycetes : back to the future. *Microbe* 2:125-131.
6. **Zurenko, G.E., W.M. Todd, B.A. Hafkin, B. Myers, C. Kaufman, J. Bock.** Development of linezolid resistant *Enterococcus faecium* in two compassionate use program patients treated with linezolid. In 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco, 1999.
7. **Doyon, D., E.A. Cabanis, M.T. Iba-Zizen, B. Roger, J. Frija, D. Pariente, I. Idy-Peretti.** 2004. IRM, Imagerie à résonance magnétique. Ed Masson.
8. **Heale, J.P., D.P. Speert.** 2002. Macrophages in bacterial infection. In : Burke B, Lewis CE, eds. *The macrophage.* 2nd ed. Oxford, England: Oxford University Press. p210-252.
9. **Peyman, G.A., P.J. Lee and D.V. Seal.** 2004. Endophthalmitis: diagnosis and management. Ed Taylor and Francis.
10. L'IRM apprivoisée. Laboratoire Schering.
11. **Saleh.M., T. Bourcier, G. Prévost, C. Speeg-Schatz, F. Jehl.** 2008. High-performance liquid chromatographic assay to measure linezolid antibiotic in eye tissues. *Trends in Chromatography,* 4: 107-112
12. Toxicity of Dup 105. 1987. *Scrip World Pharmaceutic News,* 25:1-5.

13. **Albin, S., T. Lin, L. Ulanski, D. Edward, D. Lee, S. Langridge.** Ocular toxicity of intravitreal injections of linezolid and daptomycin in a rabbit model. Poster 844/A423, Association for Research in Vision and Ophthalmology meeting, Apr 27, 2008.
14. **Observatoire nationale des endophtalmie, ONDE :**
http://www.snof.org/chirurgie/endophtalmie_2.html
15. **European Medicines Agency.** Résumé des Caractéristiques du produit: daptomycin CUBICIN. Voir le site officiel de l'EMEA : <http://www.ema.europa.eu>
16. 1995. 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 **113**:1479-96.
17. **Aaberg, T. M., Jr., H. W. Flynn, Jr., and T. G. Murray.** 1994. Intraocular ceftazidime as an alternative to the aminoglycosides in the treatment of endophthalmitis. Arch Ophthalmol **112**:18-9.
18. **Adenis, J. P., F. Denis, and M. Mounier.** 1984. [Intraocular penetration of ceftriaxone in man. Comparison with other beta-lactams]. J Fr Ophtalmol **7**:137-41.
19. **Aguilar, H. E., T. A. Meredith, A. Shaarawy, M. Kincaid, and J. Dick.** 1995. Vitreous cavity penetration of ceftazidime after intravenous administration. Retina **15**:154-9.
20. **Almeida, L. N., M. G. Canedo, R. N. Almeida, E. F. Almeida Sobrinho, and M. B. Nehemy.** 2005. [Macular infarction after intravitreal injection of amikacin: case report]. Arq Bras Oftalmol **68**:837-40.
21. **Ament, P. W., N. Jamshed, and J. P. Horne.** 2002. Linezolid: its role in the treatment of gram-positive, drug-resistant bacterial infections. Am Fam Physician **65**:663-70.
22. **Antonetti, D. A., A. J. Barber, L. A. Hollinger, E. B. Wolpert, and T. W. Gardner.** 1999. Vascular endothelial growth factor induces rapid phosphorylation of tight junction proteins occludin and zonula occluden 1. A potential mechanism for vascular permeability in diabetic retinopathy and tumors. J Biol Chem **274**:23463-7.
23. **Antonetti, D. A., E. B. Wolpert, L. DeMaio, N. S. Harhaj, and R. C. Scaduto, Jr.** 2002. Hydrocortisone decreases retinal endothelial cell water and solute flux coincident with increased content and decreased phosphorylation of occludin. J Neurochem **80**:667-77.

24. **Arias, C. A., D. Panesso, D. M. McGrath, X. Qin, M. F. Mojica, C. Miller, L. Diaz, T. T. Tran, S. Rincon, E. M. Barbu, J. Reyes, J. H. Roh, E. Lobos, E. Sodergren, R. Pasqualini, W. Arap, J. P. Quinn, Y. Shamoo, B. E. Murray, and G. M. Weinstock.** Genetic basis for in vivo daptomycin resistance in enterococci. *N Engl J Med* **365**:892-900.
25. **Asbell, P. A., D. F. Sahm, M. Shaw, D. C. Draghi, and N. P. Brown.** 2008. Increasing prevalence of methicillin resistance in serious ocular infections caused by *Staphylococcus aureus* in the United States: 2000 to 2005. *J Cataract Refract Surg* **34**:814-8.
26. **Bartolozzi, C., R. Lencioni, F. Donati, and D. Cioni.** 1999. Abdominal MR: liver and pancreas. *Eur Radiol* **9**:1496-512.
27. **Barza, M.** 1989. Antibacterial agents in the treatment of ocular infections. *Infect Dis Clin North Am* **3**:533-51.
28. **Barza, M., B. Doft, and E. Lynch.** 1993. Ocular penetration of ceftriaxone, ceftazidime, and vancomycin after subconjunctival injection in humans. *Arch Ophthalmol* **111**:492-4.
29. **Barza, M., A. Kane, and J. Baum.** 1983. Pharmacokinetics of intravitreal carbenicillin, cefazolin, and gentamicin in rhesus monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **24**:1602-6.
30. **Belmatoug, N., and B. Fantin.** 1997. Contribution of animal models of infection for the evaluation of the activity of antimicrobial agents. *Int J Antimicrob Agents* **9**:73-82.
31. **Bengele, H. H., S. Palmacci, J. Rogers, C. W. Jung, J. Crenshaw, and L. Josephson.** 1994. Biodistribution of an ultrasmall superparamagnetic iron oxide colloid, BMS 180549, by different routes of administration. *Magn Reson Imaging* **12**:433-42.
32. **Benvenuto, M., D. P. Benziger, S. Yankelev, and G. Vigliani.** 2006. Pharmacokinetics and tolerability of daptomycin at doses up to 12 milligrams per kilogram of body weight once daily in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:3245-9.
33. **Bernardo, K., N. Pakulat, S. Fleer, A. Schnaith, O. Utermohlen, O. Krut, S. Muller, and M. Kronke.** 2004. Subinhibitory concentrations of linezolid reduce *Staphylococcus aureus* virulence factor expression. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:546-55.
34. **Bernd, H., E. De Kerviler, S. Gaillard, and B. Bonnemain.** 2009. Safety and tolerability of ultrasmall superparamagnetic iron oxide contrast agent: comprehensive analysis of a clinical development program. *Invest Radiol* **44**:336-42.

35. **Biedenbach, D. J., D. J. Farrell, R. E. Mendes, J. E. Ross, and R. N. Jones.** Stability of linezolid activity in an era of mobile oxazolidinone resistance determinants: results from the 2009 Zyvox(R) Annual Appraisal of Potency and Spectrum program. *Diagn Microbiol Infect Dis* **68**:459-67.
36. **Bierry, G., A. J. Huang, C. Y. Chang, M. Torriani, and M. A. Bredella.** MRI findings of treated bacterial septic arthritis. *Skeletal Radiol*.
37. **Bierry, G., F. Jehl, A. Neuville, S. Lefevre, P. Robert, S. Kremer, and J. L. Dietemann.** MRI of macrophages in infectious knee synovitis. *AJR Am J Roentgenol* **194**:W521-6.
38. **Blaser, J., B. B. Stone, M. C. Groner, and S. H. Zinner.** 1987. Comparative study with enoxacin and netilmicin in a pharmacodynamic model to determine importance of ratio of antibiotic peak concentration to MIC for bactericidal activity and emergence of resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **31**:1054-60.
39. **Booth, M. C., R. V. Atkuri, S. K. Nanda, J. J. Iandolo, and M. S. Gilmore.** 1995. Accessory gene regulator controls *Staphylococcus aureus* virulence in endophthalmitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **36**:1828-36.
40. **Booth, M. C., A. L. Cheung, K. L. Hatter, B. D. Jett, M. C. Callegan, and M. S. Gilmore.** 1997. Staphylococcal accessory regulator (sar) in conjunction with agr contributes to *Staphylococcus aureus* virulence in endophthalmitis. *Infect Immun* **65**:1550-6.
41. **Bourrinet, P., H. H. Bengele, B. Bonnemain, A. Dencausse, J. M. Idee, P. M. Jacobs, and J. M. Lewis.** 2006. Preclinical safety and pharmacokinetic profile of ferumoxtran-10, an ultrasmall superparamagnetic iron oxide magnetic resonance contrast agent. *Invest Radiol* **41**:313-24.
42. **Brickner, S. J., D. K. Hutchinson, M. R. Barbachyn, P. R. Manninen, D. A. Ulanowicz, S. A. Garmon, K. C. Grega, S. K. Hendges, D. S. Toops, C. W. Ford, and G. E. Zurenko.** 1996. Synthesis and antibacterial activity of U-100592 and U-100766, two oxazolidinone antibacterial agents for the potential treatment of multidrug-resistant gram-positive bacterial infections. *J Med Chem* **39**:673-9.
43. **Briggs, M. C., P. McDonald, R. Bourke, G. Smith, J. N. McGalliard, and D. Wong.** 1998. Intravitreal penetration of teicoplanin. *Eye (Lond)* **12 (Pt 2)**:252-5.
44. **Bron, A., D. Talon, B. Delbosc, J. M. Estavoyer, F. Prost, and M. Montard.** 1986. [Intracamerale penetration of pefloxacin in man]. *J Fr Ophtalmol* **9**:317-21.
45. **Buchanan, L. V., C. F. Dailey, R. J. LeMay, R. J. Zielinski, M. S. Kuo, and J. K. Gibson.** 2002. Time-dependent antibacterial effects of linezolid in experimental rabbit endocarditis. *J Antimicrob Chemother* **50**:440-2.

46. **Callegan, M. C., M. C. Booth, B. D. Jett, and M. S. Gilmore.** 1999. Pathogenesis of gram-positive bacterial endophthalmitis. *Infect Immun* **67**:3348-56.
47. **Callegan, M. C., M. Engelbert, D. W. Parke, 2nd, B. D. Jett, and M. S. Gilmore.** 2002. Bacterial endophthalmitis: epidemiology, therapeutics, and bacterium-host interactions. *Clin Microbiol Rev* **15**:111-24.
48. **Campocharo, P. A., and J. I. Lim.** 1994. Aminoglycoside toxicity in the treatment of endophthalmitis. The Aminoglycoside Toxicity Study Group. *Arch Ophthalmol* **112**:48-53.
49. **Chang, S., D. M. Sievert, J. C. Hageman, M. L. Boulton, F. C. Tenover, F. P. Downes, S. Shah, J. T. Rudrik, G. R. Pupp, W. J. Brown, D. Cardo, and S. K. Fridkin.** 2003. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. *N Engl J Med* **348**:1342-7.
50. **Cochereau-Massin, I., J. Bauchet, F. Faurisson, J. M. Vallois, P. Lacombe, and J. J. Pocidallo.** 1991. Ocular kinetics of pefloxacin after intramuscular administration in albino and pigmented rabbits. *Antimicrob Agents Chemother* **35**:1112-5.
51. **Comer, G. M., J. B. Miller, E. W. Schneider, N. W. Khan, D. M. Reed, V. M. Elner, and D. N. Zacks.** INTRAVITREAL DAPTOMYCIN: A Safety and Efficacy Study. *Retina*.
52. **Corot, C., K. G. Petry, R. Trivedi, A. Saleh, C. Jonkmanns, J. F. Le Bas, E. Blezer, M. Rausch, B. Brochet, P. Foster-Gareau, D. Baleriaux, S. Gaillard, and V. Doussel.** 2004. Macrophage imaging in central nervous system and in carotid atherosclerotic plaque using ultrasmall superparamagnetic iron oxide in magnetic resonance imaging. *Invest Radiol* **39**:619-25.
53. **Craig, W. A., and D. Andes.** 1996. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibiotics in otitis media. *Pediatr Infect Dis J* **15**:255-9.
54. **Credito, K., G. Lin, and P. C. Appelbaum.** 2007. Activity of daptomycin alone and in combination with rifampin and gentamicin against *Staphylococcus aureus* assessed by time-kill methodology. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:1504-7.
55. **Cui, L., E. Tominaga, H. M. Neoh, and K. Hiramatsu.** 2006. Correlation between Reduced Daptomycin Susceptibility and Vancomycin Resistance in Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:1079-82.
56. **D'Amico, D. J., L. Caspers-Velu, J. Libert, E. Shanks, M. Schrooyen, L. A. Hanninen, and K. R. Kenyon.** 1985. Comparative toxicity of intravitreal aminoglycoside antibiotics. *Am J Ophthalmol* **100**:264-75.

57. **Dardzinski, B. J., V. J. Schmithorst, S. K. Holland, G. P. Boivin, T. Imagawa, S. Watanabe, J. M. Lewis, and R. Hirsch.** 2001. MR imaging of murine arthritis using ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles. *Magn Reson Imaging* **19**:1209-16.
58. **Dernouchamps, J. P., and J. F. Heremans.** 1975. Molecular sieve effect of the blood-aqueous barrier. *Exp Eye Res* **21**:289-97.
59. **Dryden, M. S.** Linezolid pharmacokinetics and pharmacodynamics in clinical treatment. *J Antimicrob Chemother* **66 Suppl 4**:iv7-iv15.
60. **Duke, S. L., L. I. Kump, Y. Yuan, W. W. West, A. J. Sachs, N. B. Haider, and E. Margalit.** The safety of intraocular linezolid in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**:3115-9.
61. **Dvorchik, B. H., D. Brazier, M. F. DeBruin, and R. D. Arbeit.** 2003. Daptomycin pharmacokinetics and safety following administration of escalating doses once daily to healthy subjects. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:1318-23.
62. **el-Massry, A., T. A. Meredith, H. E. Aguilar, A. Shaarawy, M. Kincaid, J. Dick, and M. I. Mahmoud.** 1996. Aminoglycoside levels in the rabbit vitreous cavity after intravenous administration. *Am J Ophthalmol* **122**:684-9.
63. **Eliopoulos, G. M., S. Willey, E. Reiszner, P. G. Spitzer, G. Caputo, and R. C. Moellering, Jr.** 1986. In vitro and in vivo activity of LY 146032, a new cyclic lipopeptide antibiotic. *Antimicrob Agents Chemother* **30**:532-5.
64. **Engelbert, M., H. Mino de Kaspar, M. Mette, M. Thiel, C. N. Ta, T. Grasbon, M. Schulze-Schwering, V. Klauss, and A. Kampik.** 2003. Intravenous treatment of experimental *Staphylococcus aureus* endophthalmitis: imipenem versus the combination of ceftazidime and amikacin. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **241**:1029-36.
65. **Engelbert, M., H. Mino de Kaspar, M. Thiel, T. Grasbon, C. N. Ta, M. Schulze-Schwering, V. Klauss, and A. Kampik.** 2004. Intravitreal vancomycin and amikacin versus intravenous imipenem in the treatment of experimental *Staphylococcus aureus* endophthalmitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **242**:313-20.
66. **Ficker, L., T. A. Meredith, S. Gardner, and L. A. Wilson.** 1990. Cefazolin levels after intravitreal injection. Effects of inflammation and surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **31**:502-5.
67. **Finks, J., E. Wells, T. L. Dyke, N. Husain, L. Plizga, R. Heddurshetti, M. Wilkins, J. Rudrik, J. Hageman, J. Patel, and C. Miller.** 2009. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, Michigan, USA, 2007. *Emerg Infect Dis* **15**:943-5.

68. **Fiscella, R. G., W. W. Lai, B. Buerk, M. Khan, K. A. Rodvold, J. S. Pulido, S. Labib, M. J. Shapiro, and N. P. Blair.** 2004. Aqueous and vitreous penetration of linezolid (Zyvox) after oral administration. *Ophthalmology* **111**:1191-5.
69. **Fleige, G., F. Seeberger, D. Laux, M. Kresse, M. Taupitz, H. Pilgrimm, and C. Zimmer.** 2002. In vitro characterization of two different ultrasmall iron oxide particles for magnetic resonance cell tracking. *Invest Radiol* **37**:482-8.
70. **Fowler, V. G., Jr., H. W. Boucher, G. R. Corey, E. Abrutyn, A. W. Karchmer, M. E. Rupp, D. P. Levine, H. F. Chambers, F. P. Tally, G. A. Vigliani, C. H. Cabell, A. S. Link, I. DeMeyer, S. G. Filler, M. Zervos, P. Cook, J. Parsonnet, J. M. Bernstein, C. S. Price, G. N. Forrest, G. Fatkenheuer, M. Gareca, S. J. Rehm, H. R. Brodt, A. Tice, and S. E. Cosgrove.** 2006. Daptomycin versus standard therapy for bacteremia and endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med* **355**:653-65.
71. **Freidlin, J., N. Acharya, T. M. Lietman, V. Cevallos, J. P. Whitcher, and T. P. Margolis.** 2007. Spectrum of eye disease caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Am J Ophthalmol* **144**:313-5.
72. **French, G.** 2003. Safety and tolerability of linezolid. *J Antimicrob Chemother* **51 Suppl 2**:ii45-53.
73. **Fretz, C. J., G. Elizondo, R. Weissleder, P. F. Hahn, D. D. Stark, and J. T. Ferrucci, Jr.** 1989. Superparamagnetic iron oxide-enhanced MR imaging: pulse sequence optimization for detection of liver cancer. *Radiology* **172**:393-7.
74. **Frippiat, F., C. Bergiers, C. Michel, J. P. Dujardin, and G. Derue.** 2004. Severe bilateral optic neuritis associated with prolonged linezolid therapy. *J Antimicrob Chemother* **53**:1114-5.
75. **Garrison, M. W., K. Vance-Bryan, T. A. Larson, J. P. Toscano, and J. C. Rotschafer.** 1990. Assessment of effects of protein binding on daptomycin and vancomycin killing of *Staphylococcus aureus* by using an in vitro pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother* **34**:1925-31.
76. **Gaur, U., S. K. Sahoo, T. K. De, P. C. Ghosh, A. Maitra, and P. K. Ghosh.** 2000. Biodistribution of fluoresceinated dextran using novel nanoparticles evading reticuloendothelial system. *Int J Pharm* **202**:1-10.
77. **Gikas, E., F. N. Bazoti, P. Fanourgiakis, E. Perivolioti, A. Roussidis, A. Skoutelis, and A. Tsarbopoulos.** Simultaneous quantification of daptomycin and rifampicin in plasma by ultra performance liquid chromatography: Application to a pharmacokinetic study. *J Pharm Biomed Anal* **51**:901-6.
78. **Goldenberg, D. L.** 1998. Septic arthritis. *Lancet* **351**:197-202.

79. **Goldenberg, D. L., P. L. Chisholm, and P. A. Rice.** 1983. Experimental models of bacterial arthritis: a microbiologic and histopathologic characterization of the arthritis after the intraarticular injections of *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus aureus*, group A streptococci, and *Escherichia coli*. *J Rheumatol* **10**:5-11.
80. **Granit, R.** 1933. The components of the retinal action potential in mammals and their relation to the discharge in the optic nerve. *J Physiol* **77**:207-39.
81. **Gregory, W. A., D. R. Brittelli, C. L. Wang, M. A. Wuonola, R. J. McRipley, D. C. Eustice, V. S. Eberly, P. T. Bartholomew, A. M. Slee, and M. Forbes.** 1989. Antibacterials. Synthesis and structure-activity studies of 3-aryl-2-oxooxazolidines. 1. The "B" group. *J Med Chem* **32**:1673-81.
82. **Gunderson, S. M., R. A. Hayes, J. P. Quinn, and L. H. Danziger.** 2004. In vitro pharmacodynamic activities of ABT-492, a novel quinolone, compared to those of levofloxacin against *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:203-8.
83. **Gupta, M. S., H. D. McKee, M. Saldana, and O. G. Stewart.** 2005. Macular thickness after cataract surgery with intracameral cefuroxime. *J Cataract Refract Surg* **31**:1163-6.
84. **Haider, S. A., P. Hassett, and A. J. Bron.** 2001. Intraocular vancomycin levels after intravitreal injection in post cataract extraction endophthalmitis. *Retina* **21**:210-3.
85. **Han, D. P., S. R. Wisniewski, L. A. Wilson, M. Barza, A. K. Vine, B. H. Doft, and S. F. Kelsey.** 1996. Spectrum and susceptibilities of microbiologic isolates in the Endophthalmitis Vitrectomy Study. *Am J Ophthalmol* **122**:1-17.
86. **Hanberger, H., L. E. Nilsson, R. Maller, and B. Isaksson.** 1991. Pharmacodynamics of daptomycin and vancomycin on *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* demonstrated by studies of initial killing and postantibiotic effect and influence of Ca²⁺ and albumin on these drugs. *Antimicrob Agents Chemother* **35**:1710-6.
87. **Hancock, H. A., C. Guidry, R. W. Read, E. L. Ready, and T. W. Kraft.** 2005. Acute aminoglycoside retinal toxicity in vivo and in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**:4804-8.
88. **Hanitzsch, R., T. Lichtenberger, and W. U. Mattig.** 1996. The influence of MgCl₂ and APB on the light-induced potassium changes and the ERG b-wave of the isolated superfused rat retina. *Vision Res* **36**:499-507.

89. **Hauger, O., C. Delalande, H. Trillaud, C. Deminiere, B. Quesson, H. Kahn, J. Cambar, C. Combe, and N. Grenier.** 1999. MR imaging of intrarenal macrophage infiltration in an experimental model of nephrotic syndrome. *Magn Reson Med* **41**:156-62.
90. **Heywang-Kobrunner, S. H., P. Viehweg, A. Heinig, and C. Kuchler.** 1997. Contrast-enhanced MRI of the breast: accuracy, value, controversies, solutions. *Eur J Radiol* **24**:94-108.
91. **Hiramatsu, K., H. Hanaki, T. Ino, K. Yabuta, T. Oguri, and F. C. Tenover.** 1997. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* **40**:135-6.
92. **Hirschwerk, D., C. C. Ginocchio, M. Bythrow, and S. Condon.** 2006. Diminished susceptibility to daptomycin accompanied by clinical failure in a patient with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol* **27**:315-7.
93. **Ho, S. W., D. Jung, J. R. Calhoun, J. D. Lear, M. Okon, W. R. Scott, R. E. Hancock, and S. K. Straus.** 2008. Effect of divalent cations on the structure of the antibiotic daptomycin. *Eur Biophys J* **37**:421-33.
94. **Horcajada, J. P., R. Atienza, M. Sarasa, D. Soy, A. Adan, and J. Mensa.** 2009. Pharmacokinetics of linezolid in human non-inflamed vitreous after systemic administration. *J Antimicrob Chemother* **63**:550-2.
95. **Hosoya, K., A. Makihara, Y. Tsujikawa, D. Yoneyama, S. Mori, T. Terasaki, S. Akanuma, M. Tomi, and M. Tachikawa.** 2009. Roles of inner blood-retinal barrier organic anion transporter 3 in the vitreous/retina-to-blood efflux transport of p-aminohippuric acid, benzylpenicillin, and 6-mercaptopurine. *J Pharmacol Exp Ther* **329**:87-93.
96. **Hwang, D. G.** 2004. Fluoroquinolone resistance in ophthalmology and the potential role for newer ophthalmic fluoroquinolones. *Surv Ophthalmol* **49 Suppl 2**:S79-83.
97. **Hyafil, F., J. P. Laissy, M. Mazighi, D. Tchetché, L. Louedec, H. Adle-Biassette, S. Chillon, D. Henin, M. P. Jacob, D. Letourneur, and L. J. Feldman.** 2006. Ferumoxtran-10-enhanced MRI of the hypercholesterolemic rabbit aorta: relationship between signal loss and macrophage infiltration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**:176-81.
98. **Jackson, T. L., S. J. Eykyn, E. M. Graham, and M. R. Stanford.** 2003. Endogenous bacterial endophthalmitis: a 17-year prospective series and review of 267 reported cases. *Surv Ophthalmol* **48**:403-23.

99. **Jacqueline, C., E. Batard, L. Perez, D. Boutoille, A. Hamel, J. Caillon, M. F. Kergueris, G. Potel, and D. Bugnon.** 2002. In vivo efficacy of continuous infusion versus intermittent dosing of linezolid compared to vancomycin in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* rabbit endocarditis model. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:3706-11.
100. **Johnston, R. B., Jr.** 1988. Current concepts: immunology. Monocytes and macrophages. *N Engl J Med* **318**:747-52.
101. **Jones, R. N., T. R. Fritsche, H. S. Sader, and J. E. Ross.** 2007. 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* **59**:199-209.
102. **Jones, R. N., S. Kohno, Y. Ono, J. E. Ross, and K. Yanagihara.** 2009. ZAAPS International Surveillance Program (2007) for linezolid resistance: results from 5591 Gram-positive clinical isolates in 23 countries. *Diagn Microbiol Infect Dis* **64**:191-201.
103. **Jones, R. N., J. E. Ross, J. M. Bell, U. Utsuki, I. Fumiaki, I. Kobayashi, and J. D. Turnidge.** 2009. Zyvox Annual Appraisal of Potency and Spectrum program: linezolid surveillance program results for 2008. *Diagn Microbiol Infect Dis* **65**:404-13.
104. **Jung, D., J. P. Powers, S. K. Straus, and R. E. Hancock.** 2008. Lipid-specific binding of the calcium-dependent antibiotic daptomycin leads to changes in lipid polymorphism of model membranes. *Chem Phys Lipids* **154**:120-8.
105. **Jung, D., A. Rozek, M. Okon, and R. E. Hancock.** 2004. Structural transitions as determinants of the action of the calcium-dependent antibiotic daptomycin. *Chem Biol* **11**:949-57.
106. **Kane, A., M. Barza, and J. Baum.** 1981. Intravitreal injection of gentamicin in rabbits. Effect of inflammation and pigmentation on half-life and ocular distribution. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **20**:593-7.
107. **Kofuji, P., P. Ceelen, K. R. Zahs, L. W. Surbeck, H. A. Lester, and E. A. Newman.** 2000. Genetic inactivation of an inwardly rectifying potassium channel (Kir4.1 subunit) in mice: phenotypic impact in retina. *J Neurosci* **20**:5733-40.
108. **Koul, S., A. Philipson, B. T. Philipson, and S. Arvidson.** 1993. Intraocular levels of cefuroxime in inflamed rabbit eyes. *Eur J Ophthalmol* **3**:61-5.
109. **Kumar, H., S. Ahuja, and A. Kumar.** 1993. Macular infarction after intravitreal amikacin. *Ann Ophthalmol* **25**:262-3.

110. **Kunimoto, D. Y., and R. S. Kaiser.** 2007. Incidence of endophthalmitis after 20- and 25-gauge vitrectomy. *Ophthalmology* **114**:2133-7.
111. **Kunzmann, A., B. Andersson, T. Thurnherr, H. Krug, A. Scheynius, and B. Fadeel.** Toxicology of engineered nanomaterials: focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. *Biochim Biophys Acta* **1810**:361-73.
112. **Lacy, M. K., D. P. Nicolau, C. H. Nightingale, and R. Quintiliani.** 1998. The pharmacodynamics of aminoglycosides. *Clin Infect Dis* **27**:23-7.
113. **Laurent, S., D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst, and R. N. Muller.** 2008. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem Rev* **108**:2064-110.
114. **Leach, K. L., S. M. Swaney, J. R. Colca, W. G. McDonald, J. R. Blinn, L. M. Thomasco, R. C. Gadwood, D. Shinabarger, L. Xiong, and A. S. Mankin.** 2007. The site of action of oxazolidinone antibiotics in living bacteria and in human mitochondria. *Mol Cell* **26**:393-402.
115. **Ledermann, H. P., A. Kaim, G. Bongartz, and W. Steinbrich.** 2000. Pitfalls and limitations of magnetic resonance imaging in chronic posttraumatic osteomyelitis. *Eur Radiol* **10**:1815-23.
116. **Lee, B. L., M. Sachdeva, and H. F. Chambers.** 1991. Effect of protein binding of daptomycin on MIC and antibacterial activity. *Antimicrob Agents Chemother* **35**:2505-8.
117. **Leenders, W.** 2003. Ferumoxtran-10 Advanced Magnetics. *IDrugs* **6**:987-93.
118. **Lefevre, S., D. Ruimy, F. Jehl, A. Neuville, P. Robert, C. Sordet, M. Ehlinger, J. L. Dietemann, and G. Bierry.** Septic arthritis: monitoring with USPIO-enhanced macrophage MR imaging. *Radiology* **258**:722-8.
119. **Leite, B., F. Gomes, P. Teixeira, C. Souza, E. Pizzolitto, and R. Oliveira.** In vitro activity of daptomycin, linezolid and rifampicin on *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Curr Microbiol* **63**:313-7.
120. **Lemaire, S., F. Van Bambeke, M. P. Mingeot-Leclercq, and P. M. Tulkens.** 2007. Modulation of the cellular accumulation and intracellular activity of daptomycin towards phagocytized *Staphylococcus aureus* by the P-glycoprotein (MDR1) efflux transporter in human THP-1 macrophages and madin-darby canine kidney cells. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:2748-57.
121. **Lewis, J. S., 2nd, A. Owens, J. Cadena, K. Sabol, J. E. Patterson, and J. H. Jorgensen.** 2005. Emergence of daptomycin resistance in *Enterococcus faecium* during daptomycin therapy. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:1664-5.

122. **Louie, A., P. Kaw, W. Liu, N. Jumbe, M. H. Miller, and G. L. Drusano.** 2001. Pharmacodynamics of daptomycin in a murine thigh model of *Staphylococcus aureus* infection. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:845-51.
123. **Lutz, A. M., K. Gopfert, W. Jochum, D. Nanz, J. M. Frohlich, and D. Weishaupt.** 2006. USPIO-enhanced MR imaging for visualization of synovial hyperperfusion and detection of synovial macrophages: preliminary results in an experimental model of antigen-induced arthritis. *J Magn Reson Imaging* **24**:657-66.
124. **Lutz, A. M., C. Seemayer, C. Corot, R. E. Gay, K. Goepfert, B. A. Michel, B. Marincek, S. Gay, and D. Weishaupt.** 2004. Detection of synovial macrophages in an experimental rabbit model of antigen-induced arthritis: ultrasmall superparamagnetic iron oxide-enhanced MR imaging. *Radiology* **233**:149-57.
125. **MacGowan, A. P.** 2003. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of linezolid in healthy volunteers and patients with Gram-positive infections. *J Antimicrob Chemother* **51 Suppl 2**:ii17-25.
126. **Mannermaa, E., K. S. Vellonen, and A. Urtti.** 2006. Drug transport in corneal epithelium and blood-retina barrier: emerging role of transporters in ocular pharmacokinetics. *Adv Drug Deliv Rev* **58**:1136-63.
127. **Mariani, P. G., H. S. Sader, and R. N. Jones.** 2006. Development of decreased susceptibility to daptomycin and vancomycin in a *Staphylococcus aureus* strain during prolonged therapy. *J Antimicrob Chemother* **58**:481-3.
128. **Marty, F. M., W. W. Yeh, C. B. Wennersten, L. Venkataraman, E. Albano, E. P. Alyea, H. S. Gold, L. R. Baden, and S. K. Pillai.** 2006. Emergence of a clinical daptomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate during treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia and osteomyelitis. *J Clin Microbiol* **44**:595-7.
129. **Mascio, C. T., J. D. Alder, and J. A. Silverman.** 2007. Bactericidal action of daptomycin against stationary-phase and nondividing *Staphylococcus aureus* cells. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:4255-60.
130. **Mathews, C. J., V. C. Weston, A. Jones, M. Field, and G. Coakley.** Bacterial septic arthritis in adults. *Lancet* **375**:846-55.
131. **McDonald, M., and J. M. Blondeau.** Emerging antibiotic resistance in ocular infections and the role of fluoroquinolones. *J Cataract Refract Surg* **36**:1588-98.
132. **Metz, S., G. Bonaterra, M. Rudelius, M. Settles, E. J. Rummeny, and H. E. Daldrup-Link.** 2004. Capacity of human monocytes to phagocytose approved iron oxide MR contrast agents in vitro. *Eur Radiol* **14**:1851-8.

133. **Mochizuki, K., S. Ohkubo, M. Torisaki, Y. Yamashita, T. Tanahashi, Y. Jin, Y. Okamura, and M. Tanaka.** 1994. [Intraocular penetration of oral levofloxacin in rabbits]. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi* **98**:1085-90.
134. **Moellering, R. C.** 2003. Linezolid: the first oxazolidinone antimicrobial. *Ann Intern Med* **138**:135-42.
135. **Montan, P. G., G. Wejde, H. Setterquist, M. Rylander, and C. Zetterstrom.** 2002. Prophylactic intracameral cefuroxime. Evaluation of safety and kinetics in cataract surgery. *J Cataract Refract Surg* **28**:982-7.
136. **Morel, C., G. Gendron, D. Tosetti, F. Poisson, C. Chaumeil, F. Auclin, O. Laplace, E. Tuil, and J. M. Warnet.** 2005. [Postoperative endophthalmitis: 2000-2002 results in the XV-XX National Ophthalmologic Hospital]. *J Fr Ophtalmol* **28**:151-6.
137. **Munoz-Price, L. S., K. Lolans, and J. P. Quinn.** 2005. Emergence of resistance to daptomycin during treatment of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* infection. *Clin Infect Dis* **41**:565-6.
138. **Muraih, J. K., A. Pearson, J. Silverman, and M. Palmer.** Oligomerization of daptomycin on membranes. *Biochim Biophys Acta* **1808**:1154-60.
139. **Narsani, A. K., S. M. Jatoi, S. Gul, and S. A. Dabir.** 2008. Efficacy of intravitreal ceftazidime in acute postoperative endophthalmitis. *J Coll Physicians Surg Pak* **18**:98-101.
140. **Neuwelt, E. A., B. E. Hamilton, C. G. Varallyay, W. R. Rooney, R. D. Edelman, P. M. Jacobs, and S. G. Watnick.** 2009. Ultrasmall superparamagnetic iron oxides (USPIOs): a future alternative magnetic resonance (MR) contrast agent for patients at risk for nephrogenic systemic fibrosis (NSF)? *Kidney Int* **75**:465-74.
141. **Nussenblatt, R. B., A. G. Palestine, C. C. Chan, and F. Roberge.** 1985. Standardization of vitreal inflammatory activity in intermediate and posterior uveitis. *Ophthalmology* **92**:467-71.
142. **Oleson, F. B., C. L. Berman, and A. P. Li.** 2004. An evaluation of the P450 inhibition and induction potential of daptomycin in primary human hepatocytes. *Chem Biol Interact* **150**:137-47.
143. **Oleson, F. B., Jr., C. L. Berman, J. B. Kirkpatrick, K. S. Regan, J. J. Lai, and F. P. Tally.** 2000. Once-daily dosing in dogs optimizes daptomycin safety. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:2948-53.
144. **Park, S. S., N. Samiy, K. Ruoff, D. J. D'Amico, and A. S. Baker.** 1995. Effect of intravitreal dexamethasone in treatment of pneumococcal endophthalmitis in rabbits. *Arch Ophthalmol* **113**:1324-9.

145. **Park, S. S., R. V. Vallar, C. H. Hong, S. von Gunten, K. Ruoff, and D. J. D'Amico.** 1999. Intravitreal dexamethasone effect on intravitreal vancomycin elimination in endophthalmitis. *Arch Ophthalmol* **117**:1058-62.
146. **Peacock, S. J., I. de Silva, and F. D. Lowy.** 2001. What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*? *Trends Microbiol* **9**:605-10.
147. **Perez, S., C. Solans, M. A. Bregante, I. Pinilla, M. A. Garcia, and F. Honrubia.** 2002. Pharmacokinetics and ocular penetration of grepafloxacin in albino and pigmented rabbits. *J Antimicrob Chemother* **50**:541-5.
148. **Pertel, P. E., P. Bernardo, C. Fogarty, P. Matthews, R. Northland, M. Benvenuto, G. M. Thorne, S. A. Luperchio, R. D. Arbeit, and J. Alder.** 2008. Effects of prior effective therapy on the efficacy of daptomycin and ceftriaxone for the treatment of community-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis* **46**:1142-51.
149. **Peyman, G. A.** 2004. Exogenous endophthalmitis, p. 122. *Endophthalmitis: Diagnosis and management.* Taylor francis group, London.
150. **Plaza, R. C., J. L. Arias, M. Espin, M. L. Jimenez, and A. V. Delgado.** 2002. Aging effects in the electrokinetics of colloidal iron oxides. *J Colloid Interface Sci* **245**:86-90.
151. **Prydal, J. I., D. R. Jenkins, A. Lovering, and A. Watts.** 2005. The pharmacokinetics of linezolid in the non-inflamed human eye. *Br J Ophthalmol* **89**:1418-9.
152. **Pryka, R. D., R. M. Novak, D. K. Wagner, and K. A. Rodvold.** 1990. Clinical pharmacokinetics of daptomycin. *DICP* **24**:255-6.
153. **Rand, T., J. Healy, A. Brossmann, K. Muhle, P. Clopton, and D. Resnick.** 2001. Atlantoaxial joints: patterns of gadolinium enhancement with MR imaging in normal subjects. *Eur J Radiol* **37**:26-30.
154. **Raynal, I., P. Prigent, S. Peyramaure, A. Najid, C. Rebuzzi, and C. Corot.** 2004. Macrophage endocytosis of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: mechanisms and comparison of ferumoxides and ferumoxtran-10. *Invest Radiol* **39**:56-63.
155. **Rayner, C. R., A. Forrest, A. K. Meagher, M. C. Birmingham, and J. J. Schentag.** 2003. Clinical pharmacodynamics of linezolid in seriously ill patients treated in a compassionate use programme. *Clin Pharmacokinet* **42**:1411-23.
156. **Reiner, C. S., A. M. Lutz, F. Tschirch, J. M. Froehlich, S. Gaillard, B. Marincek, and D. Weishaupt.** 2009. USPIO-enhanced magnetic resonance imaging of the knee in asymptomatic volunteers. *Eur Radiol* **19**:1715-22.
157. **Renkin, E. M.** 1977. Multiple pathways of capillary permeability. *Circ Res* **41**:735-43.

158. **Ross, J. E., D. J. Farrell, R. E. Mendes, H. S. Sader, and R. N. Jones.** 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.
159. **Ruehm, S. G., C. Corot, P. Vogt, S. Kolb, and J. F. Debatin.** 2001. Magnetic resonance imaging of atherosclerotic plaque with ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide in hyperlipidemic rabbits. *Circulation* **103**:415-22.
160. **Safdar, N., D. Andes, and W. A. Craig.** 2004. In vivo pharmacodynamic activity of daptomycin. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:63-8.
161. **Saleh, M., F. Jehl, G. Prevost, C. Speeg-Schatz, and T. Bourcier.** 2008. [Advantages of corticosteroids in managing acute bacterial postoperative endophthalmitis]. *J Fr Ophtalmol* **31**:825-33.
162. **Sauermann, R., M. Rothenburger, W. Graninger, and C. Joukhadar.** 2008. Daptomycin: a review 4 years after first approval. *Pharmacology* **81**:79-91.
163. **Seawright, A. A., R. D. Bourke, and R. J. Cooling.** 1996. Macula toxicity after intravitreal amikacin. *Aust N Z J Ophthalmol* **24**:143-6.
164. **Sharifi, E., T. C. Porco, and A. Naseri.** 2009. Cost-effectiveness analysis of intracameral cefuroxime use for prophylaxis of endophthalmitis after cataract surgery. *Ophthalmology* **116**:1887-96 e1.
165. **Sheridan, K. R., B. A. Potoski, R. K. Shields, and G. J. Nau.** Presence of adequate intravitreal concentrations of daptomycin after systemic intravenous administration in a patient with endogenous endophthalmitis. *Pharmacotherapy* **30**:1247-51.
166. **Shorr, A. F.** 2007. Epidemiology of staphylococcal resistance. *Clin Infect Dis* **45 Suppl 3**:S171-6.
167. **Sigovan, M., L. Bousel, A. Sulaiman, D. Sappey-Marinier, H. Alsaïd, C. Desbleds-Mansard, D. Ibarrola, D. Gamondes, C. Corot, E. Lancelot, J. S. Raynaud, V. Vives, C. Laclede, X. Violas, P. C. Douek, and E. Canet-Soulas.** 2009. Rapid-clearance iron nanoparticles for inflammation imaging of atherosclerotic plaque: initial experience in animal model. *Radiology* **252**:401-9.
168. **Silverman, J. A., L. I. Mortin, A. D. Vanpraagh, T. Li, and J. Alder.** 2005. Inhibition of daptomycin by pulmonary surfactant: in vitro modeling and clinical impact. *J Infect Dis* **191**:2149-52.
169. **Silverman, J. A., N. Oliver, T. Andrew, and T. Li.** 2001. Resistance studies with daptomycin. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:1799-802.
170. **Skiest, D. J.** 2006. Treatment failure resulting from resistance of *Staphylococcus aureus* to daptomycin. *J Clin Microbiol* **44**:655-6.

171. **Slee, A. M., M. A. Wuonola, R. J. McRipley, I. Zajac, M. J. Zawada, P. T. Bartholomew, W. A. Gregory, and M. Forbes.** 1987. Oxazolidinones, a new class of synthetic antibacterial agents: in vitro and in vivo activities of DuP 105 and DuP 721. *Antimicrob Agents Chemother* **31**:1791-7.
172. **Smith, A., P. M. Pennefather, S. B. Kaye, and C. A. Hart.** 2001. Fluoroquinolones: place in ocular therapy. *Drugs* **61**:747-61.
173. **Stark, D. D., R. Weissleder, G. Elizondo, P. F. Hahn, S. Saini, L. E. Todd, J. Wittenberg, and J. T. Ferrucci.** 1988. Superparamagnetic iron oxide: clinical application as a contrast agent for MR imaging of the liver. *Radiology* **168**:297-301.
174. **Straus, S. K., and R. E. Hancock.** 2006. Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. *Biochim Biophys Acta* **1758**:1215-23.
175. **Strieker, M., and M. A. Marahiel.** 2009. The structural diversity of acidic lipopeptide antibiotics. *Chembiochem* **10**:607-16.
176. **Tally, F. P., M. Zeckel, M. M. Wasilewski, C. Carini, C. L. Berman, G. L. Drusano, and F. B. Oleson, Jr.** 1999. Daptomycin: a novel agent for Gram-positive infections. *Expert Opin Investig Drugs* **8**:1223-38.
177. **Tarkowski, A.** 2006. Infection and musculoskeletal conditions: Infectious arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **20**:1029-44.
178. **Tobin, C. M., J. Sunderland, L. O. White, and A. P. MacGowan.** 2001. A simple, isocratic high-performance liquid chromatography assay for linezolid in human serum. *J Antimicrob Chemother* **48**:605-8.
179. **Trotman, R. L., J. C. Williamson, D. M. Shoemaker, and W. L. Salzer.** 2005. Antibiotic dosing in critically ill adult patients receiving continuous renal replacement therapy. *Clin Infect Dis* **41**:1159-66.
180. **Velpandian, T., S. K. Gupta, Y. K. Gupta, H. C. Agarwal, and N. R. Biswas.** 1999. Comparative studies on topical lomefloxacin and ciprofloxacin on ocular kinetic and experimental corneal ulcer. *J Ocul Pharmacol Ther* **15**:505-11.
181. **Villaraza, A. J., A. Bumb, and M. W. Brechbiel.** Macromolecules, dendrimers, and nanomaterials in magnetic resonance imaging: the interplay between size, function, and pharmacokinetics. *Chem Rev* **110**:2921-59.
182. **Walstad, R. A., and S. Blika.** 1985. Penetration of ceftazidime into the normal rabbit and human eye. *Scand J Infect Dis Suppl* **44**:63-7.

183. **Weissleder, R., H. C. Cheng, A. Bogdanova, and A. Bogdanov, Jr.** 1997. Magnetically labeled cells can be detected by MR imaging. *J Magn Reson Imaging* **7**:258-63.
184. **Weissleder, R., G. Elizondo, J. Wittenberg, A. S. Lee, L. Josephson, and T. J. Brady.** 1990. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: an intravenous contrast agent for assessing lymph nodes with MR imaging. *Radiology* **175**:494-8.
185. **Weissleder, R., G. Elizondo, J. Wittenberg, C. A. Rabito, H. H. Bengel, and L. Josephson.** 1990. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: characterization of a new class of contrast agents for MR imaging. *Radiology* **175**:489-93.
186. **Weissleder, R., P. F. Hahn, D. D. Stark, G. Elizondo, S. Saini, L. E. Todd, J. Wittenberg, and J. T. Ferrucci.** 1988. Superparamagnetic iron oxide: enhanced detection of focal splenic tumors with MR imaging. *Radiology* **169**:399-403.
187. **Weissleder, R., D. D. Stark, B. L. Engelstad, B. R. Bacon, C. C. Compton, D. L. White, P. Jacobs, and J. Lewis.** 1989. Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *AJR Am J Roentgenol* **152**:167-73.
188. **West, E. S., A. Behrens, P. J. McDonnell, J. M. Tielsch, and O. D. Schein.** 2005. The incidence of endophthalmitis after cataract surgery among the U.S. Medicare population increased between 1994 and 2001. *Ophthalmology* **112**:1388-94.
189. **Weston, V. C., A. C. Jones, N. Bradbury, F. Fawthrop, and M. Doherty.** 1999. Clinical features and outcome of septic arthritis in a single UK Health District 1982-1991. *Ann Rheum Dis* **58**:214-9.
190. **Wiechens, B., D. Neumann, J. B. Grammer, U. Pleyer, J. Hedderich, and G. I. Duncker.** 1998. Retinal toxicity of liposome-incorporated and free ofloxacin after intravitreal injection in rabbit eyes. *Int Ophthalmol* **22**:133-43.
191. **Wise, R., T. Gee, J. M. Andrews, B. Dvorchik, and G. Marshall.** 2002. Pharmacokinetics and inflammatory fluid penetration of intravenous daptomycin in volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:31-3.
192. **Wu, G., T. Abraham, J. Rapp, F. Vastey, N. Saad, and E. Balmir.** Daptomycin: evaluation of a high-dose treatment strategy. *Int J Antimicrob Agents* **38**:192-6.
193. **Wurziger, K., T. Lichtenberger, and R. Hanitzsch.** 2001. On-bipolar cells and depolarising third-order neurons as the origin of the ERG-b-wave in the RCS rat. *Vision Res* **41**:1091-101.
194. **Yoeruek, E., M. S. Spitzer, O. Saygili, O. Tatar, T. Biedermann, K. U. Bartz-Schmidt, and P. Szurman.** 2008. Comparison of in vitro safety profiles of vancomycin and cefuroxime on human corneal endothelial cells for intracameral use. *J Cataract Refract Surg* **34**:2139-45.

195. **Yoshizumi, M. O., A. R. Bhavsar, A. Dessouki, and A. Kashani.** 1999. Safety of repeated intravitreal injections of antibiotics and dexamethasone. *Retina* **19**:437-41.
196. **Zhanel, G. G., C. Shroeder, L. Vercaigne, S. G. A, J. Embil, and J. H. D.** 2001. A critical review of oxazolidinones: An alternative or replacement for glycopeptides and streptogramins? *Can J Infect Dis* **12**:379-90.

Sophie LEFEVRE



Etude PK/PD du linézolide et de la daptomycine et intérêt de l'IRM associée aux USPIOs dans deux modèles d'infections expérimentales à *S. aureus* chez le lapin : endophtalmie et arthrite aiguës

RESUME

Staphylococcus aureus est une des espèces bactériennes les plus fréquemment responsable des cas d'endophtalmie et d'arthrite aiguës chez l'homme. Nous avons étudié la pharmacodynamie oculaire du linézolide et de la daptomycine, ainsi que leur toxicité, dans un modèle d'endophtalmie expérimentale chez le lapin. Il est apparu que seule une dose très élevée de linézolide administrée par voie intravitréenne (30mg/0,1mL) présentait une efficacité bactérioclinique. Aucune altération de la fonction visuelle n'a été mise en évidence. La dose intravitréenne efficace de daptomycine (1mg/0,1mL) était quant à elle responsable d'une altération significative de l'intégrité fonctionnelle de la rétine. Enfin, la pharmacodynamie de ces deux antibiotiques dans le compartiment oculaire présentait des différences significatives avec les autres sites tissulaires d'infection étudiés à ce jour. Dans la deuxième partie de nos travaux nous nous sommes intéressés à une nouvelle technique d'IRM, associée à des particules d'USPIOs (Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxide). Nous avons montré que cette technique d'imagerie permettait d'une part la mise en évidence de l'infiltration des macrophages dans la synoviale infectée, et, d'autre part, la visualisation de la guérison de l'articulation, contrairement à l'imagerie conventionnelle à base de chélates de gadolinium. Cette technique innovante offre donc une nouvelle dimension à l'imagerie ostéo-articulaire grâce à une mise en évidence *in vivo* plus spécifique des phénomènes pathologiques.

Mots-clés : linézolide, daptomycine, endophtalmie, arthrite, IRM, nanoparticule de fer.

SUMMARY

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) is a frequent cause of acute endophthalmitis and arthritis in humans. In the first part, we investigated the ocular pharmacodynamics and safety of two recently approved antistaphylococcal antibiotics, linezolid and daptomycin. Only a very high intravitreal dose of linezolid (30 mg / 0.1 mL) showed a bactericidal and clinical efficacy. Such intraocular concentrations appeared to be safe for the retinal function, and linezolid could be considered as a promising therapeutic alternative. The effective intravitreal dose of daptomycin (1 mg / 0.1 mL) was responsible for a significant impairment of the functional integrity of the retina. Finally, the ocular pharmacodynamics of these two antibiotics showed special features in comparison with the one of other types of tissue infection. In a second part, we evaluated a new imaging method in experimental infectious arthritis, by using MRI enhanced by ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO). We first showed this method can depict the macrophage infiltration in infected synovium, and secondly it can demonstrate resolution of joint infection, in contrast to conventional MRI performed by gadolinium chelates. This *in vivo* non invasive imaging method therefore presents a new dimension in musculoskeletal imaging by accurately helping monitor bacterial joint infection.

Key words : linezolid, daptomycin, endophthalmitis, arthritis, MRI, USPIO.