



**DIU Infections ostéo-articulaires
Lyon, 28 novembre 2018**

Antibiothérapie intracellulaire et anti-biofilm

Dr. Florent Valour

Dr. Jérôme Josse

florent.valour@chu-lyon.fr

jerome.josse@chu-lyon.fr

Maladies infectieuses et tropicales

Centre de Référence inter-régional pour la prise en charge des IOA complexes

Hospices Civils de Lyon

CIRI - Centre International de Recherche en Infectiologie - INSERM U1111 - CNRS UMR5308 -
ENS Lyon - Université Claude Bernard Lyon 1

Chronicité : importance du concept

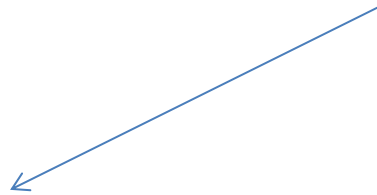


Début des
symptômes

Diagnostic
Début de prise en charge



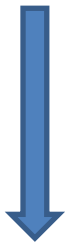
3-4 sem



< 3-4 semaines

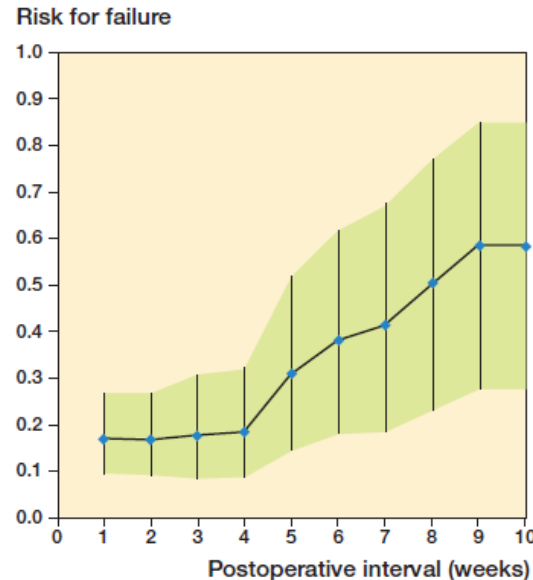
IOA AIGUE

- Réplication bactérienne +++
- Infection suppurative
- Congestion vasculaire



**TRAITEMENT
CONSERVATEUR**

Risque de récidence



Chronicité : importance du concept



Début des
symptômes

Diagnostic
Début de prise en charge

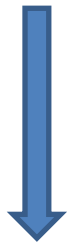
3-4 sem



< 3-4 semaines

IOA AIGUE

- Réplication bactérienne +++
- Infection suppurative
- Congestion vasculaire



**TRAITEMENT
CONSERVATEUR**

Risque de récurrence

> 3-4 semaines

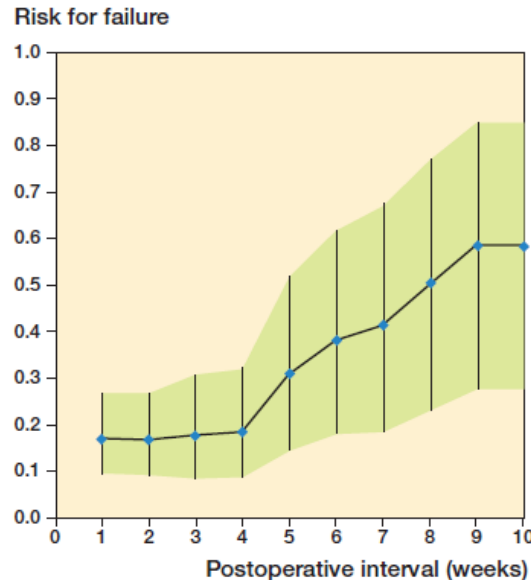
IOA CHRONIQUE

- Tissu osseux ischémique
- Séquestre osseux
- Descellement
- Ralentissement de la croissance bactérienne

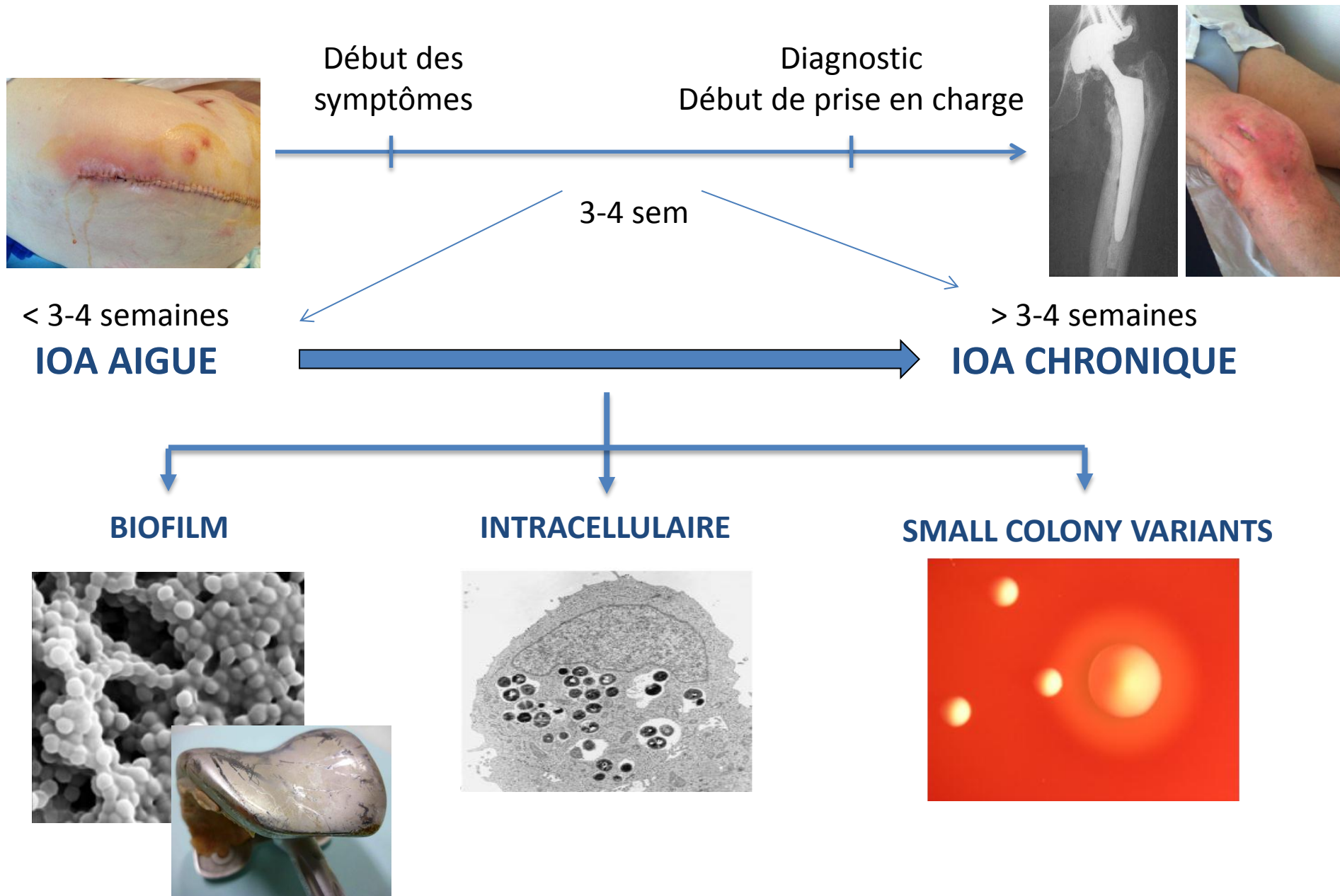


**ABLATION DES
IMPLANTS**

**Taux élevé d'échec
thérapeutique**



Chronicité : importance du concept



Antibiothérapie intracellulaire

Rationnel

Van de Velde H.

Etude sur le mécanisme de la virulence du staphylocoque pyogène.

La Cellule 1894;10:403-60.



THE SURVIVAL OF STAPHYLOCOCCI WITHIN HUMAN LEUKOCYTES*

By DAVID E. ROGERS,† M.D., AND RALPH TOMPSETT, M.D.

(From the Department of Medicine, New York Hospital-Cornell Medical Center, New York)

PLATES 8 TO 10

(Received for publication, October 10, 1951)

Rationnel

Staphylococcus aureus persistence in non-professional phagocytes

Bettina Löffler*, Lorena Tuchscher, Silke Niemann, Georg Peters

International Journal of Medical Microbiology 304 (2014) 170-176

Décrit avec de nombreux types cellulaires

- Cellules endothéliales
- Cellules épithéliales
- Kératinocytes
- Fibroblastes
- Leucocytes

Rationnel

Staphylococcus aureus persistence in non-professional phagocytes

Bettina Löffler*, Lorena Tuchscher, Silke Niemann, Georg Peters

International Journal of Medical Microbiology 304 (2014) 170–176

Décrit avec de nombreux types cellulaires

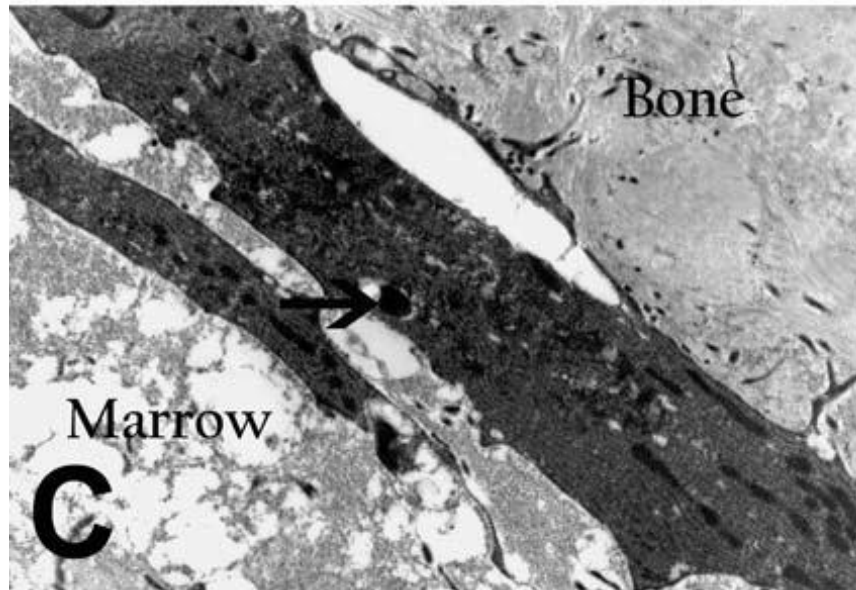
- Cellules endothéliales
- Cellules épithéliales
- Kératinocytes
- Fibroblastes
- Leucocytes
- **et les cellules osseuses !**

Mini Review

Interaction of staphylococci with bone

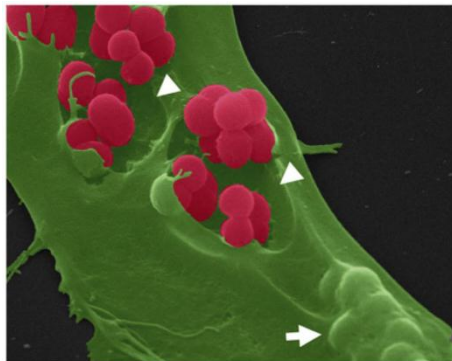
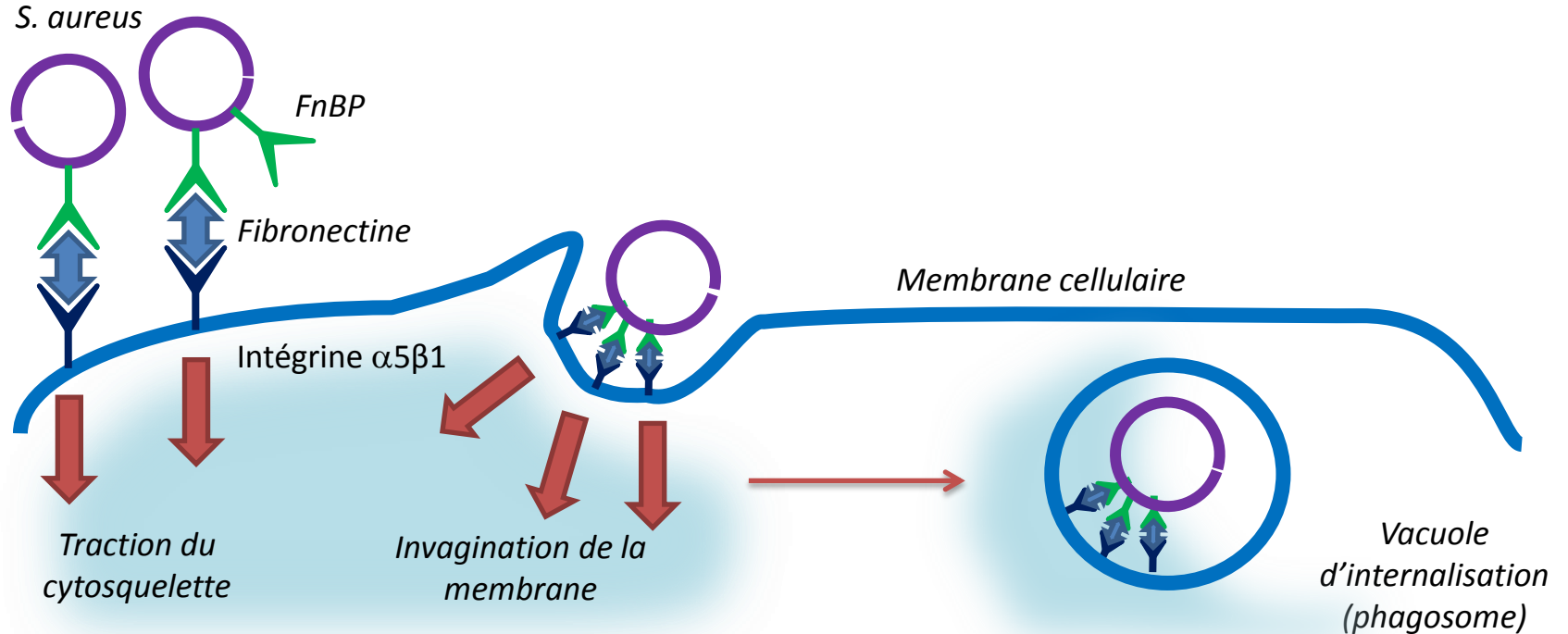
John A. Wright, Sean P. Nair*

International Journal of Medical Microbiology 300 (2010) 193–204



Bosse, 2005
Ostéite chronique
ME

Interactions avec les ostéoblastes



Microscopie électronique
Hoffmann *et al.*
Eur J Cell Biol 2011

frontiers
in Cellular and Infection Microbiology

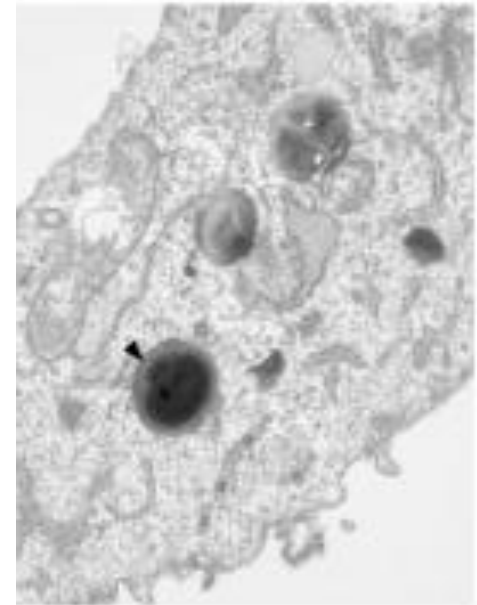
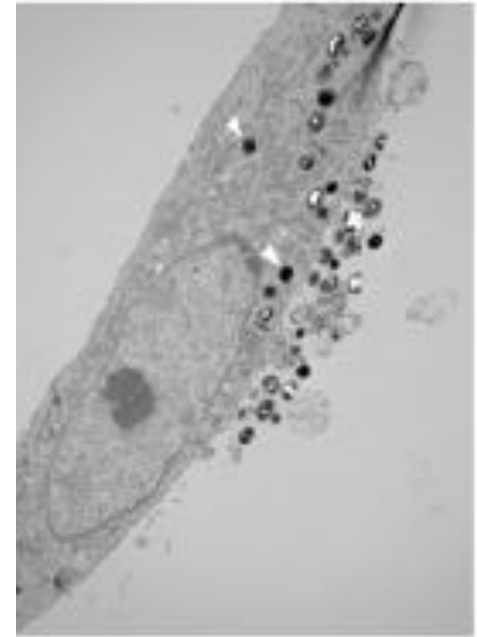
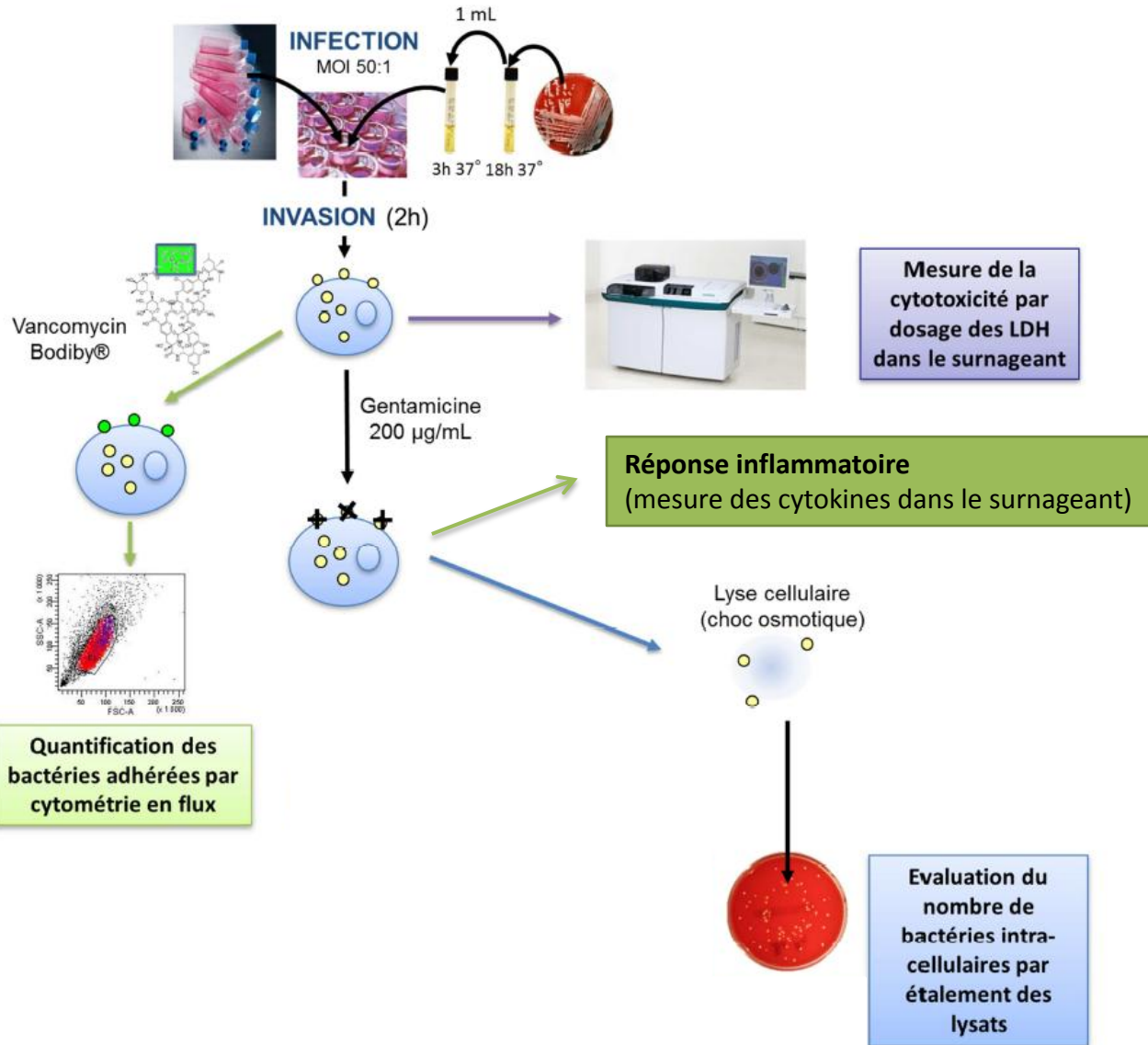
REVIEW
published: 26 November 2015
doi: 10.3389/fcimb.2015.00085

***Staphylococcus aureus* vs. Osteoblast: Relationship and Consequences in Osteomyelitis**

Jérôme Josse, Frédéric Velard and Sophie C. Gangloff*

EA 4691 Biomatériaux et inflammation en site osseux, Pôle Santé, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France

Interactions avec les ostéoblastes



Interactions avec les ostéoblastes : MRSA

May 2013 | Volume 8 | Issue 5 | e63176

PLOS ONE

PSMs of Hypervirulent *Staphylococcus aureus* Act as Intracellular Toxins That Kill Infected Osteoblasts

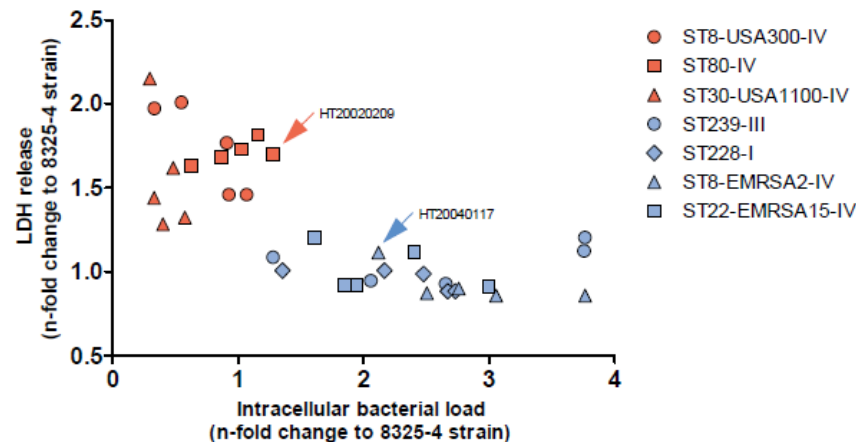
Jean-Philippe Rasigade^{1,2,3*}, Sophie Trouillet-Assant¹, Tristan Ferry¹, Binh An Diep⁴, Anaïs Sapin³, Yannick Lhoste³, Jérémy Ranfaing¹, Cédric Badiou¹, Yvonne Benito², Michèle Bes², Florence Couzon¹, Sylvestre Tigaud³, Gérard Lina^{1,2}, Jérôme Etienne^{1,2}, François Vandenesch^{1,2}, Frédéric Laurent^{1,2,3}

HA-MRSA (n=15)

- Infections post-opératoires
- Sur matériel
- Indolentes : chronicisation, récidence
- **Faible cytotoxicité**
- **Survie intracellulaire +++**

CA-MRSA (n=20)

- Ostéomyélites (enfants) +++
- Progression rapide, inflammation majeure, destruction osseuse, dommages tissulaires
- **Cytotoxicité +++**
- **Faible survie intracellulaire**
- **Dommages tissulaires (rôle de la PVL)**



Interactions avec les ostéoblastes : MSSA

Delta-toxin production deficiency in *Staphylococcus aureus*: a diagnostic marker of bone and joint infection chronicity linked with osteoblast invasion and biofilm formation

Clin Microbiol Infect 2015; 21: 568.e1–568.e11

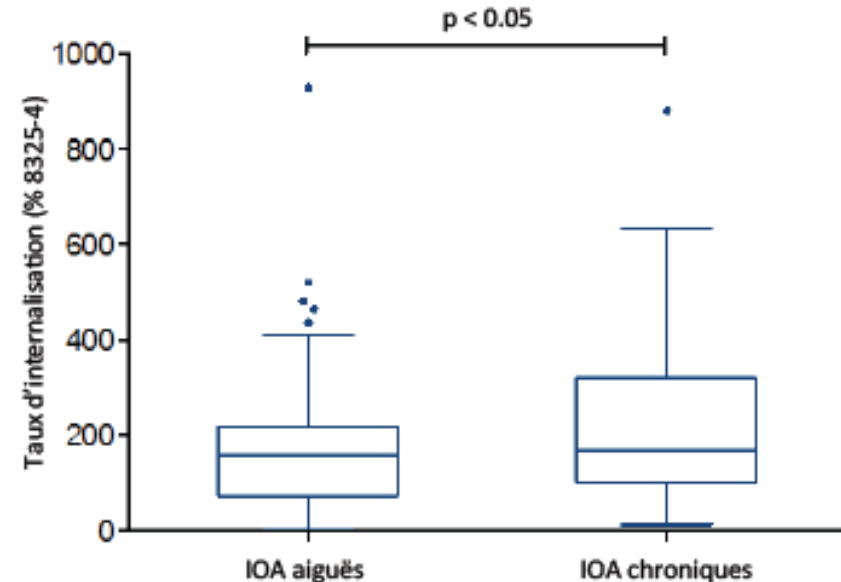
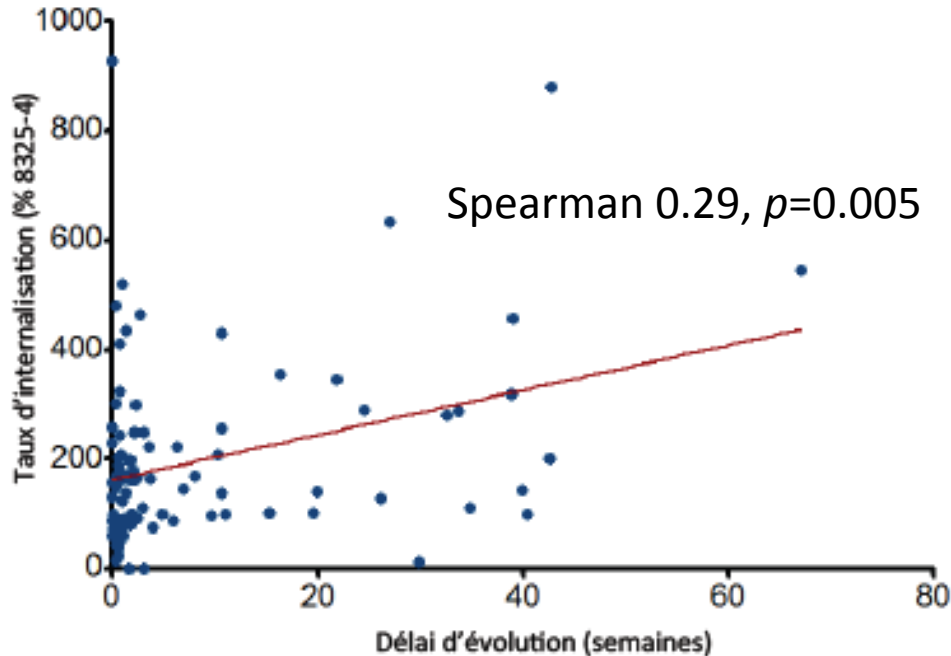
F. Valour^{1,2,3,4}, J.-P. Rasigade^{2,3,4}, S. Trouillet-Assant³, J. Gagnaire², A. Bouaziz¹, J. Karsenty¹, C. Lacour², M. Bes^{2,3}, S. Lustig^{3,4,5}, T. Béné⁶, C. Chidiac^{1,3,4}, J. Etienne^{2,3,4}, F. Vandenesch^{2,3,4}, T. Ferry^{1,3,4} and F. Laurent^{2,3,4}, on behalf of the Lyon BJI Study Group

95 couples patient-souche inclus

IOA aiguës
n=64

IOA chroniques
n=31

Délai d'évolution > 4 semaines



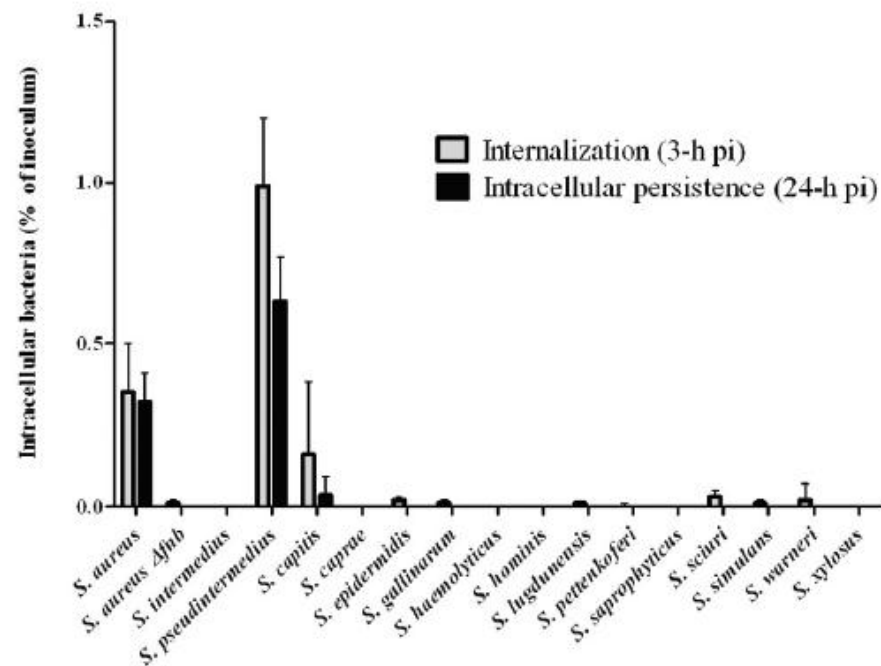
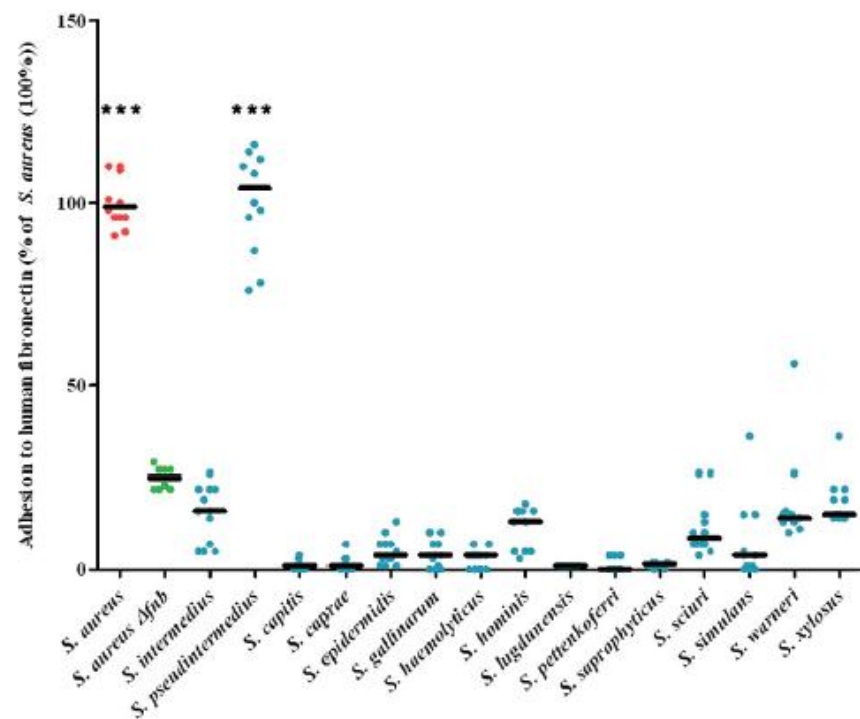
Interactions avec les ostéoblastes : SCN

Pathophysiological Mechanisms of *Staphylococcus Non-aureus* Bone and Joint Infection: Interspecies Homogeneity and Specific Behavior of *S. pseudintermedius*

Yousef Maall^{1,2}, Patricia Martins-Silv^{1,2}, Florent Valour^{1,3}, Daniel Bouvard^{4,5}, Jean-Philippe Rasigade^{1,6}, Michele Bes⁶, Marisa Haenni⁷, Tristan Ferry^{1,3}, Frédéric Laurent^{1,2,6,7*} and Sophie Trouillet-Assant^{1,2†}

Evaluation de l'adhésion et internalisation dans les ostéoblastes de 16 espèces de SCN (souches cliniques responsables d'IOA)

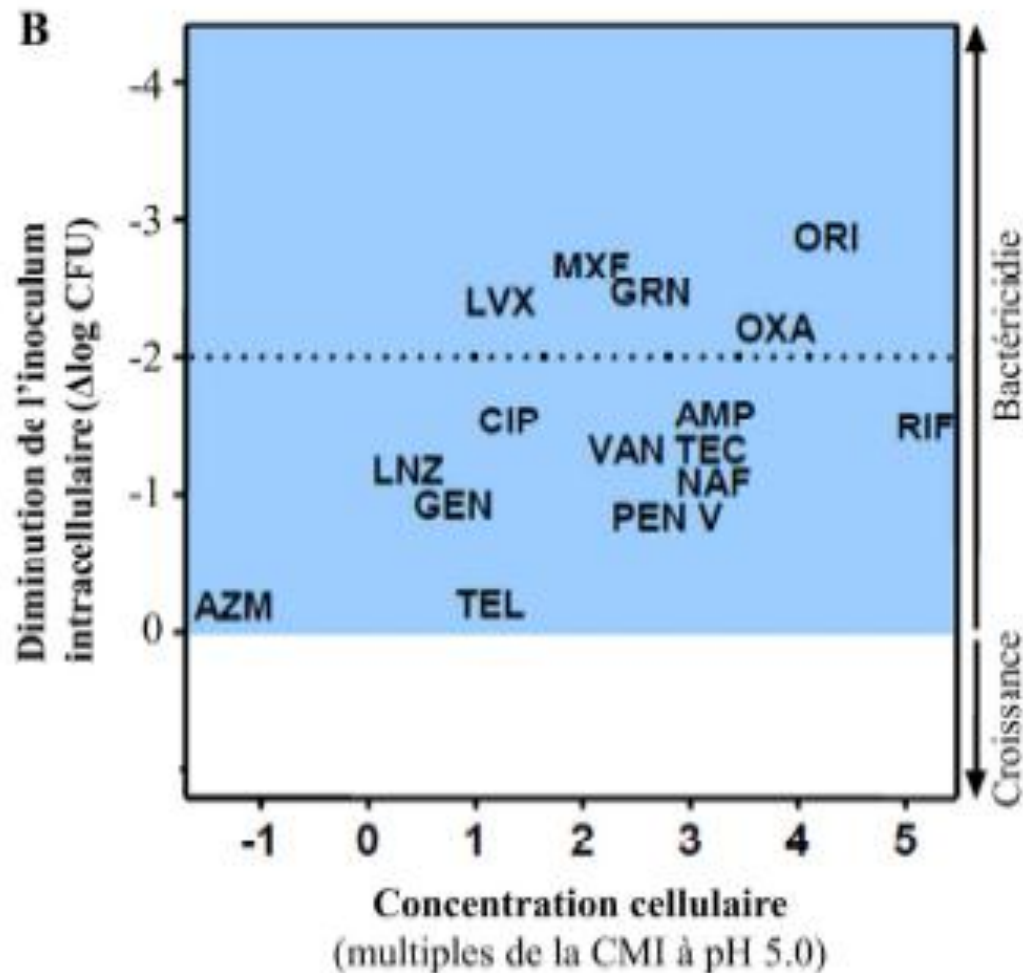
Faible capacité d'internalisation et de persistance des SCN à l'exception de *S. pseudintermedius*



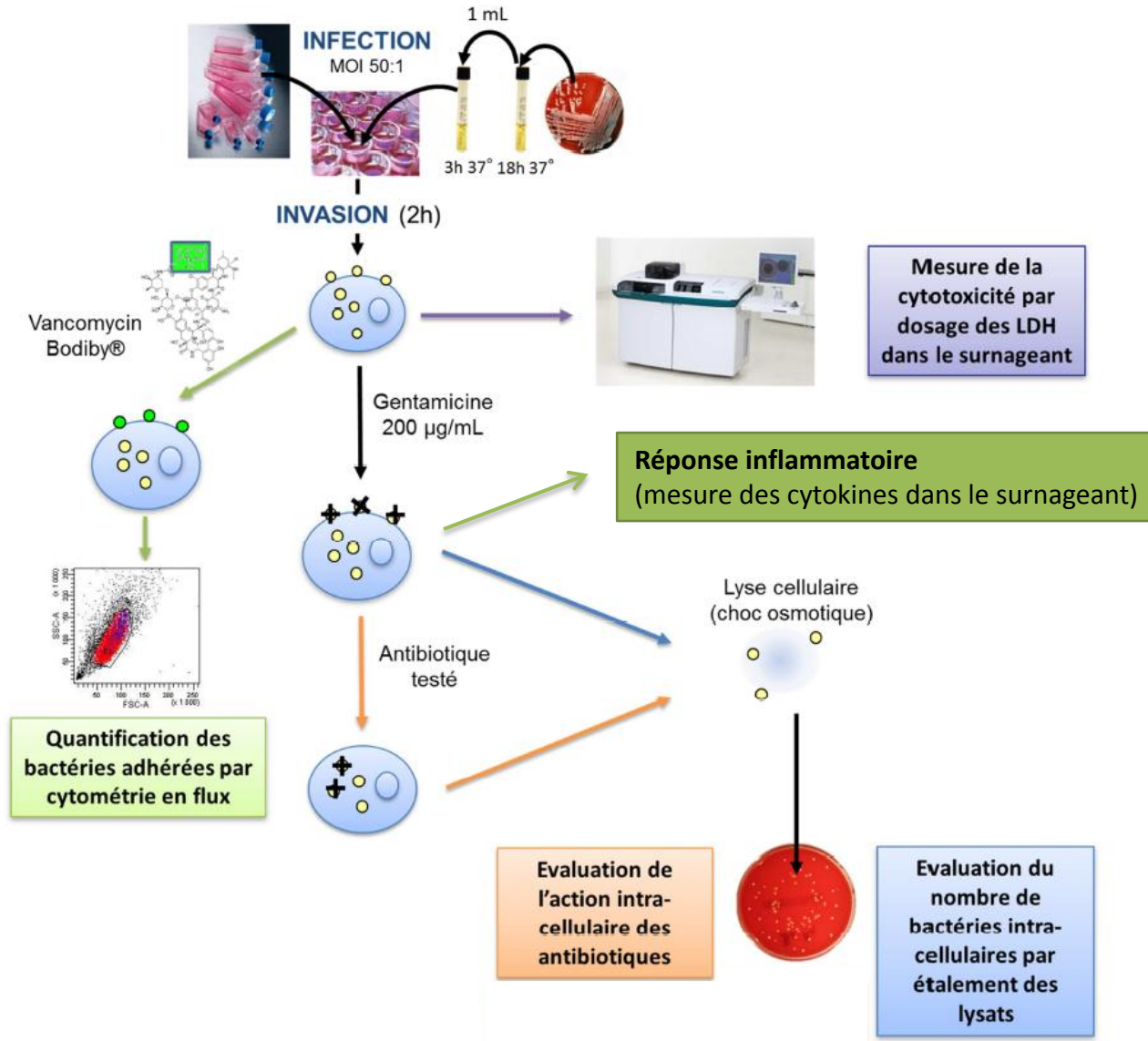
Réservoir intracellulaire et thérapeutique

Modèle d'infection de monocytes – macrophages humains

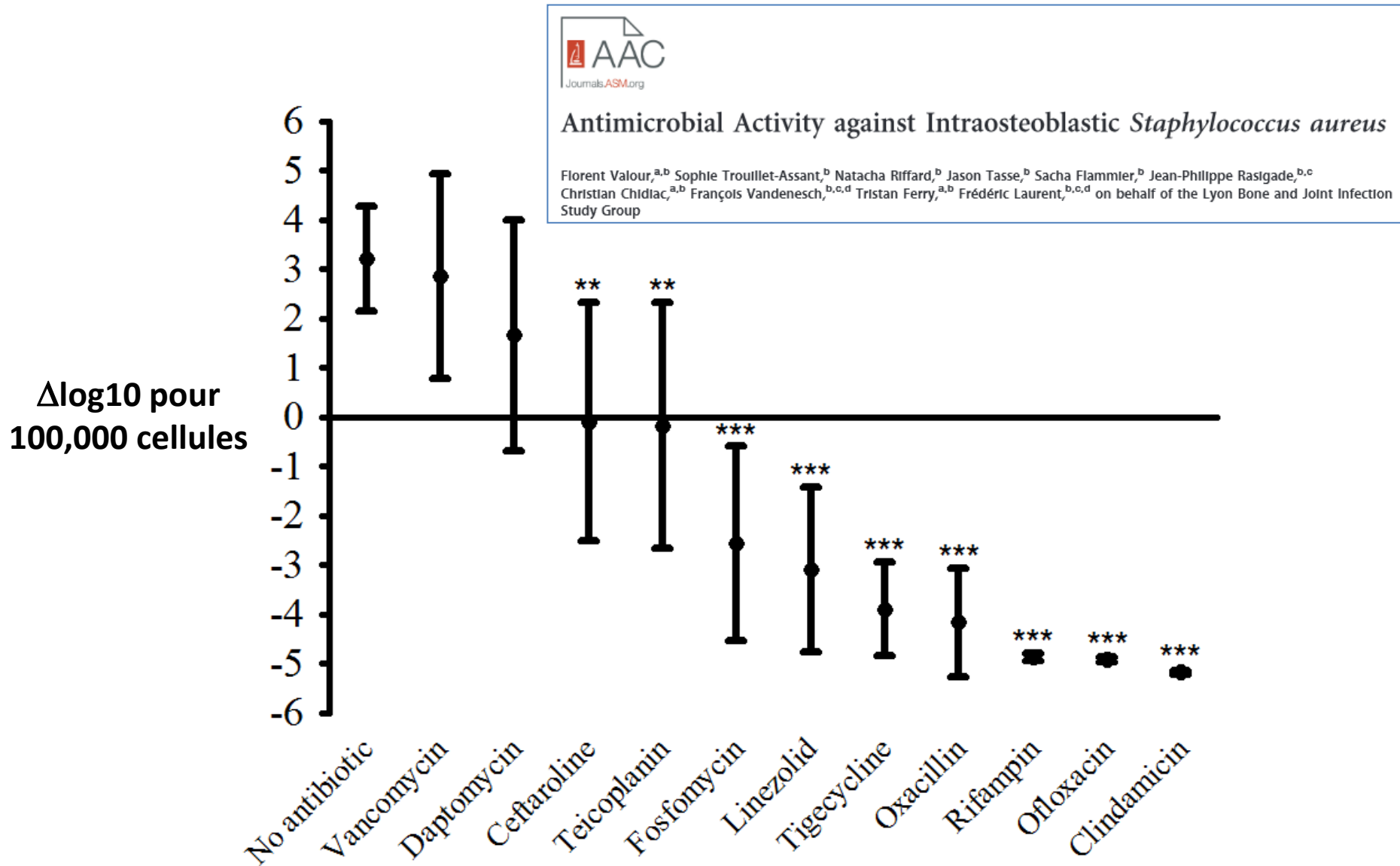
S. Lemaire, PM Tulkens - Université Catholique de Louvain



Réservoir intracellulaire et thérapeutique



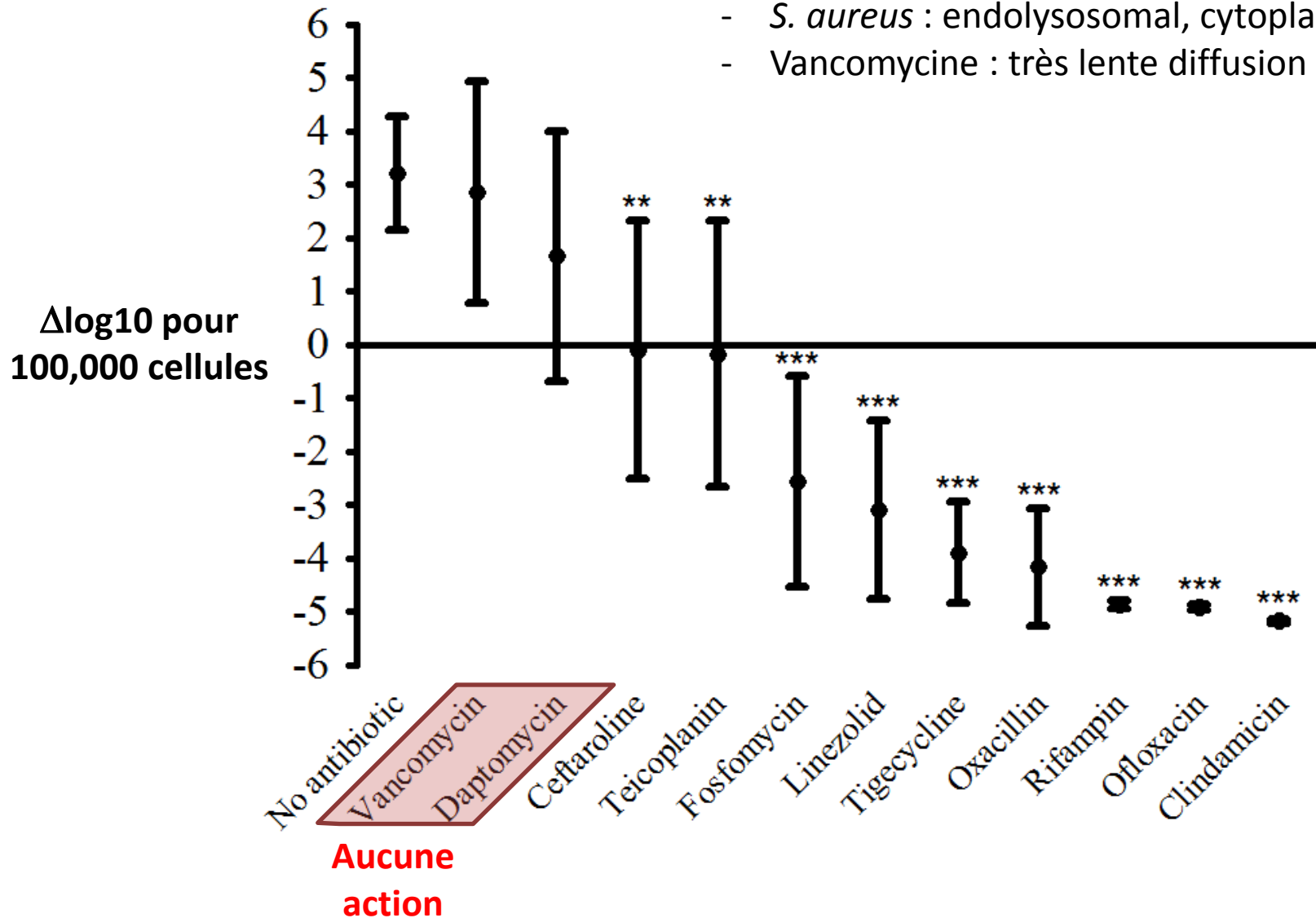
Réservoir intracellulaire et thérapeutique



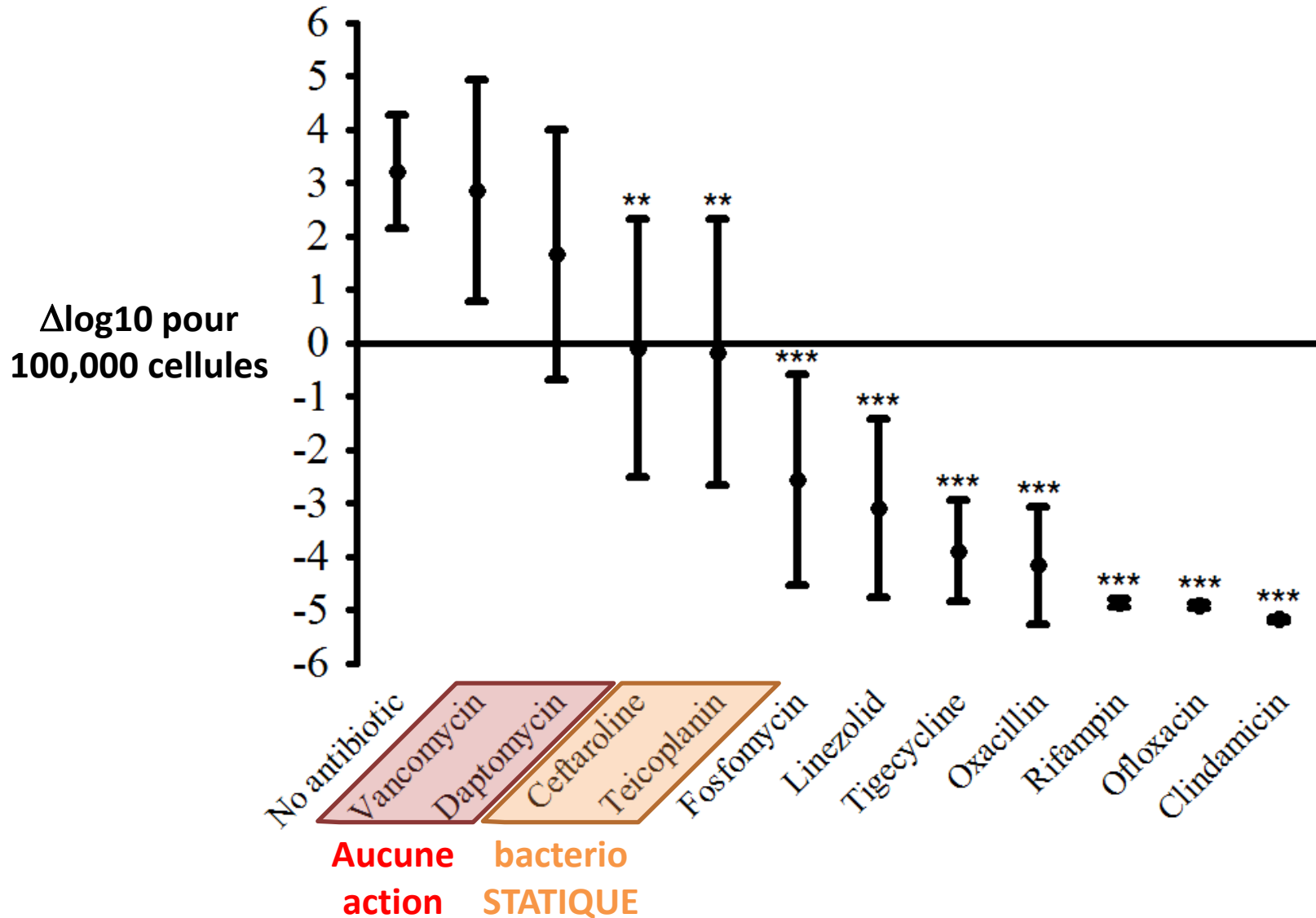
Réservoir intracellulaire et thérapeutique

Importance de la localisation intra-cellulaire

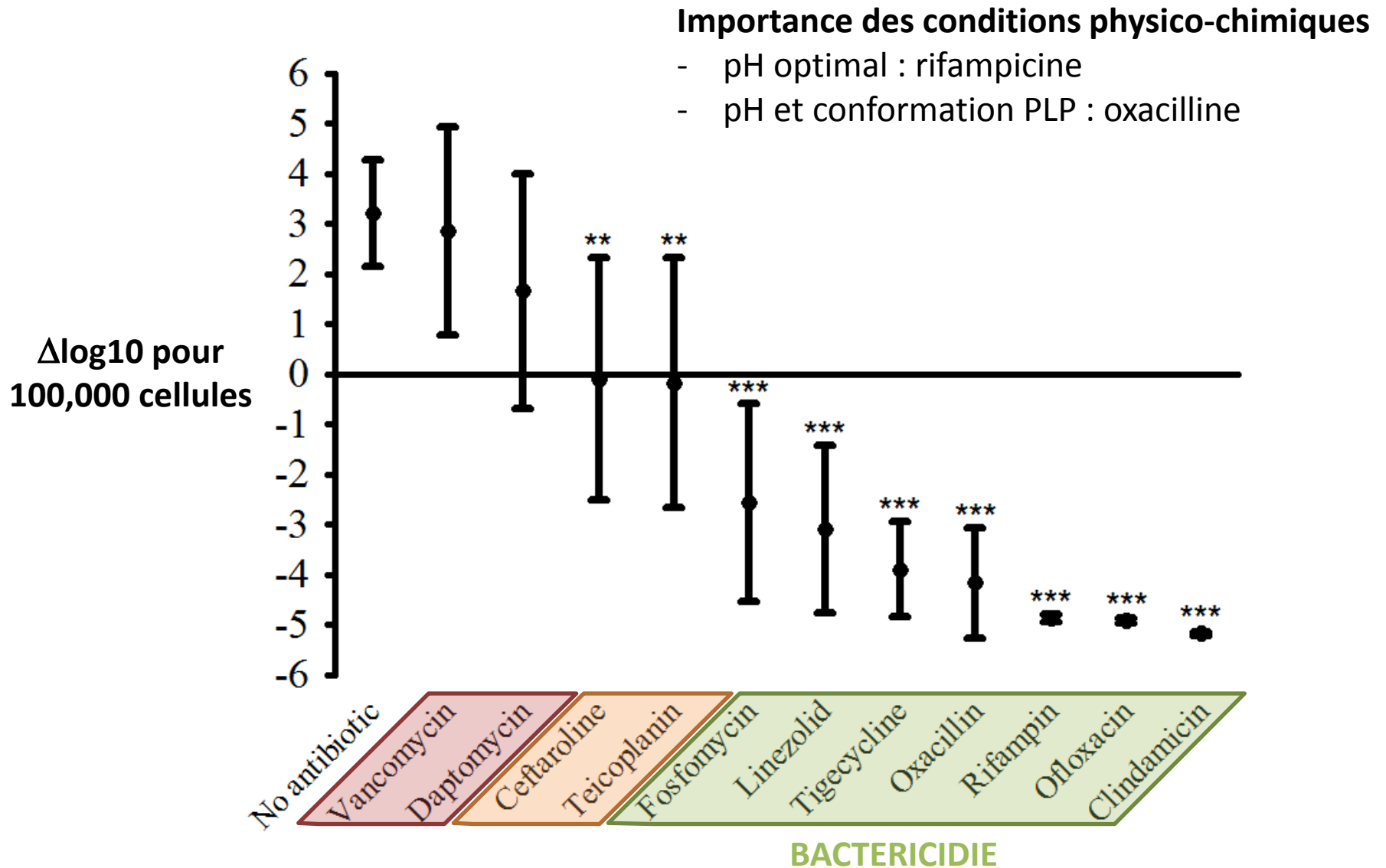
- *S. aureus* : endolysosomal, cytoplasme (30%)
- Vancomycine : très lente diffusion lysosomale



Réservoir intracellulaire et thérapeutique



Réservoir intracellulaire et thérapeutique



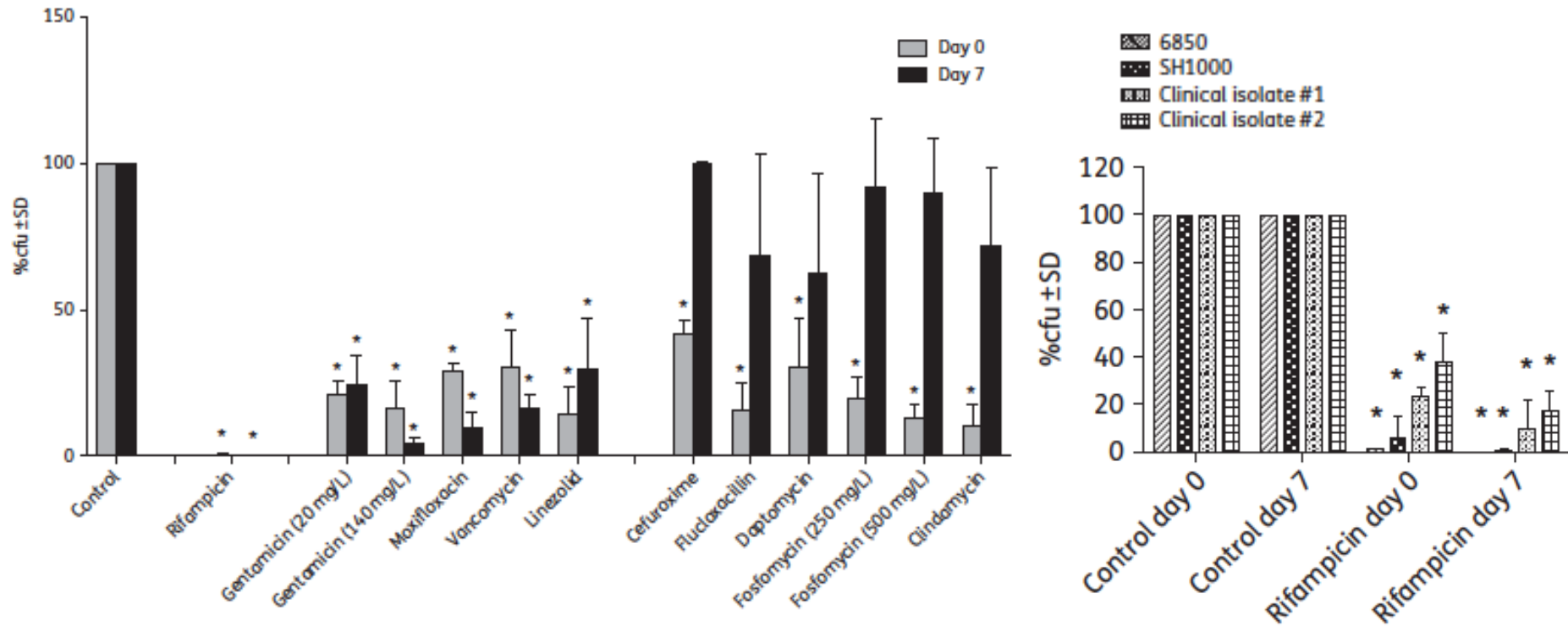
Réservoir intracellulaire et thérapeutique

J Antimicrob Chemother 2016; **71**: 438–448
doi:10.1093/jac/dkv371 Advance Access publication 20 November 2015

Journal of
Antimicrobial
Chemotherapy

Staphylococcus aureus develops increased resistance to antibiotics by forming dynamic small colony variants during chronic osteomyelitis

L. Tuscherr^{1*}†, C. A. Kreis²†, V. Hoerr^{1,3}†, L. Flint⁴, M. Hachmeister⁴, J. Geraci¹, S. Bremer-Streck⁵, M. Kiehntopf⁵, E. Medina⁶, M. Kribus⁷, M. Raschke², M. Pletz⁸, G. Peters⁴ and B. Löffler^{1,9}

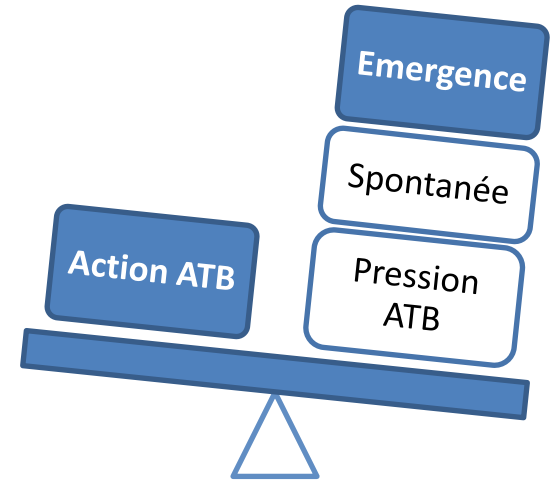
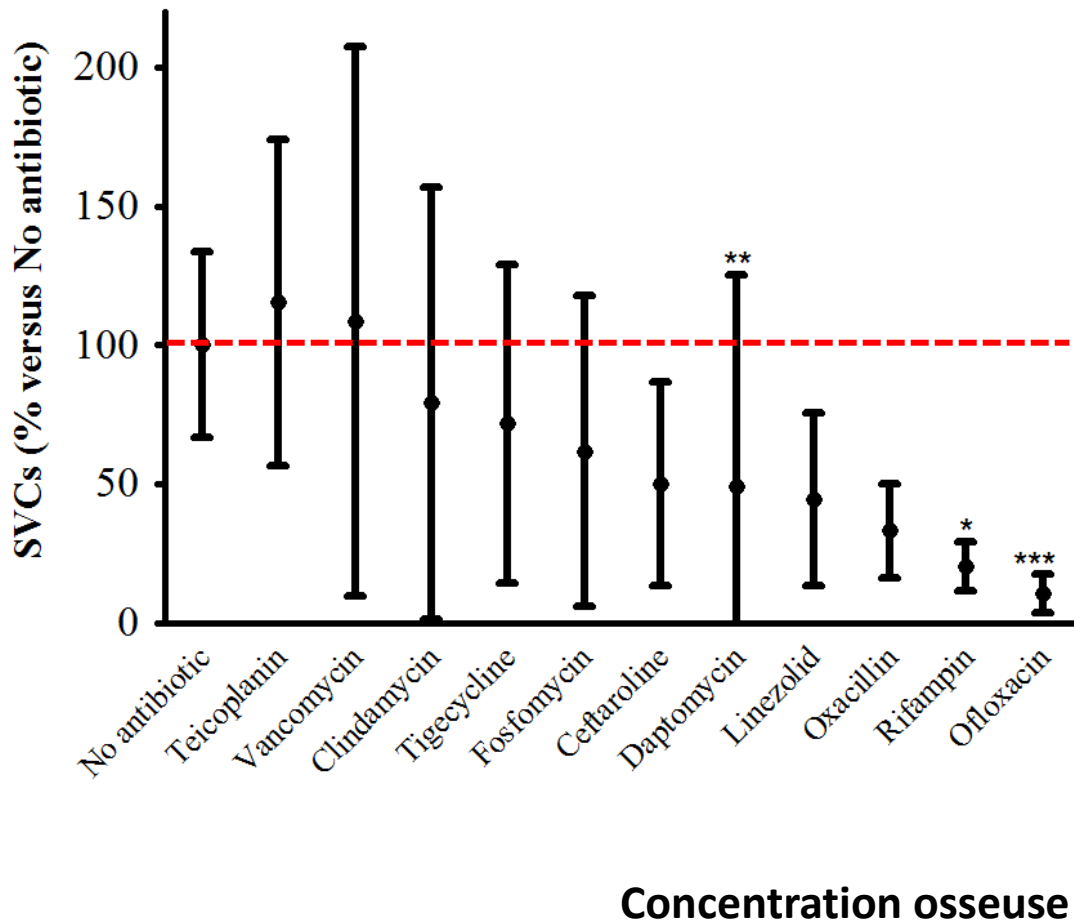


A propos des SCVs



Antimicrobial Activity against Intraosteoblastic *Staphylococcus aureus*

Florent Valour,^{a,b} Sophie Trouillet-Assant,^b Natacha Riffard,^b Jason Tasse,^b Sacha Flammier,^b Jean-Philippe Rasigade,^{b,c} Christian Chidiac,^{a,b} François Vandenesch,^{b,c,d} Tristan Ferry,^{a,b} Frédéric Laurent,^{b,c,d} on behalf of the Lyon Bone and Joint Infection Study Group



Réservoir intracellulaire et thérapeutique

Outcome and Predictors of Treatment Failure in Total Hip/Knee Prosthetic Joint Infections Due to *Staphylococcus aureus*

Eric Senneville, Donatienne Joulie, Laurence Legout, Michel Valette, Hervé Dezèque, Eric Bertrand, Bernadette Roseló, Thibaud d'Escrivan, Caroline Loiez, Michèle Caillaux, Yazdan Yazdanpanah, Carlos Maynou, and Henri Migaud

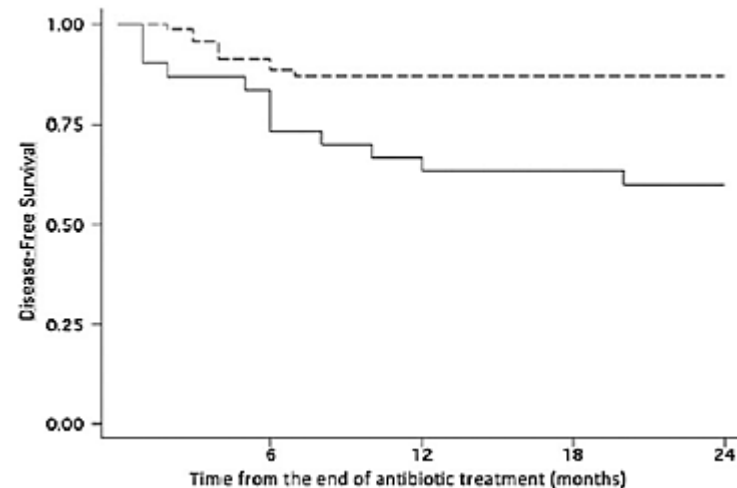
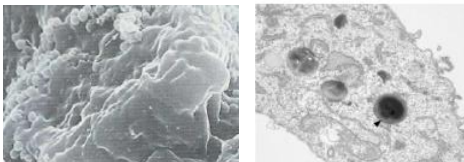
Centre National de Référence des Infections Ostéo-Articulaires Nord-Ouest, Roger Salengro Faculty Hospital of Lille, Lille, France

Facteurs protecteurs (univarié)

- ASA score ≤ 2
- ATB empirique post-opératoire adéquate
- **Combinaison à base de rifampicine**

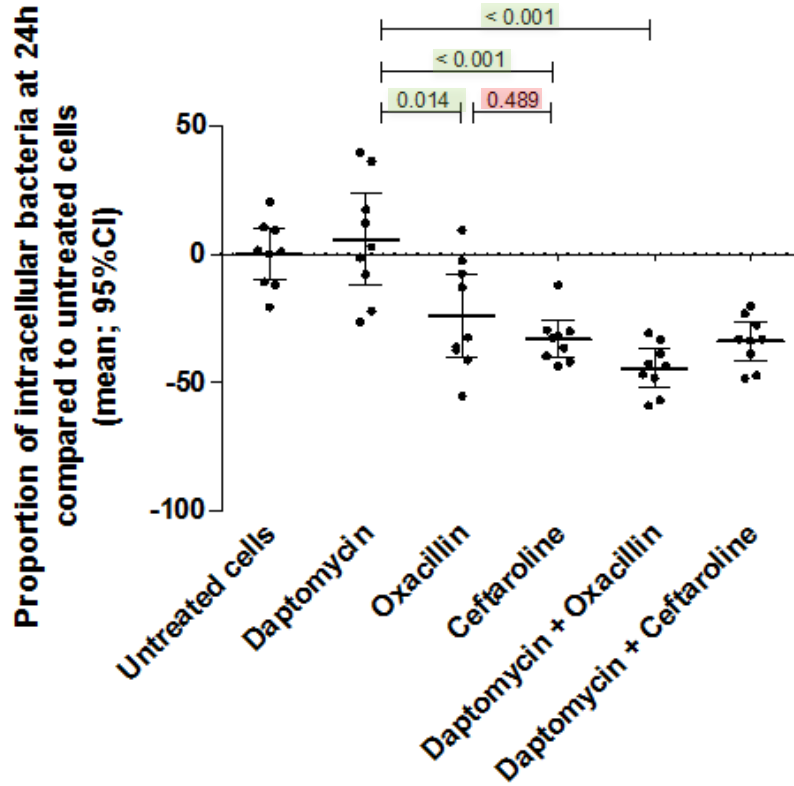
Facteurs protecteurs (multi-varié)

- ASA score ≤ 2
- **Rifampicine – fluoroquinolone**

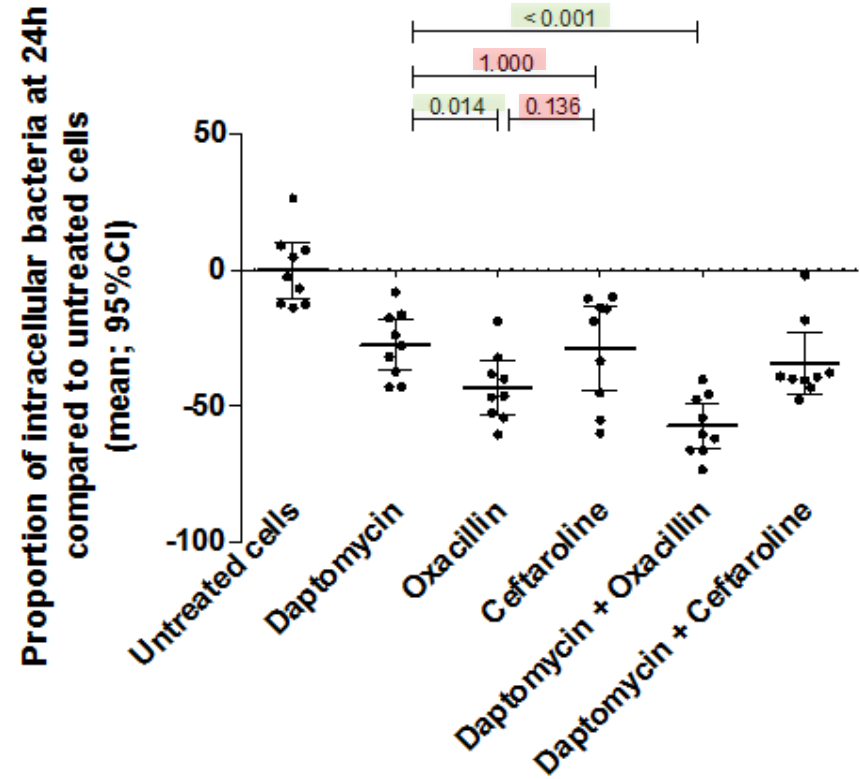


FOCUS : daptomycine et bêta-lactamines

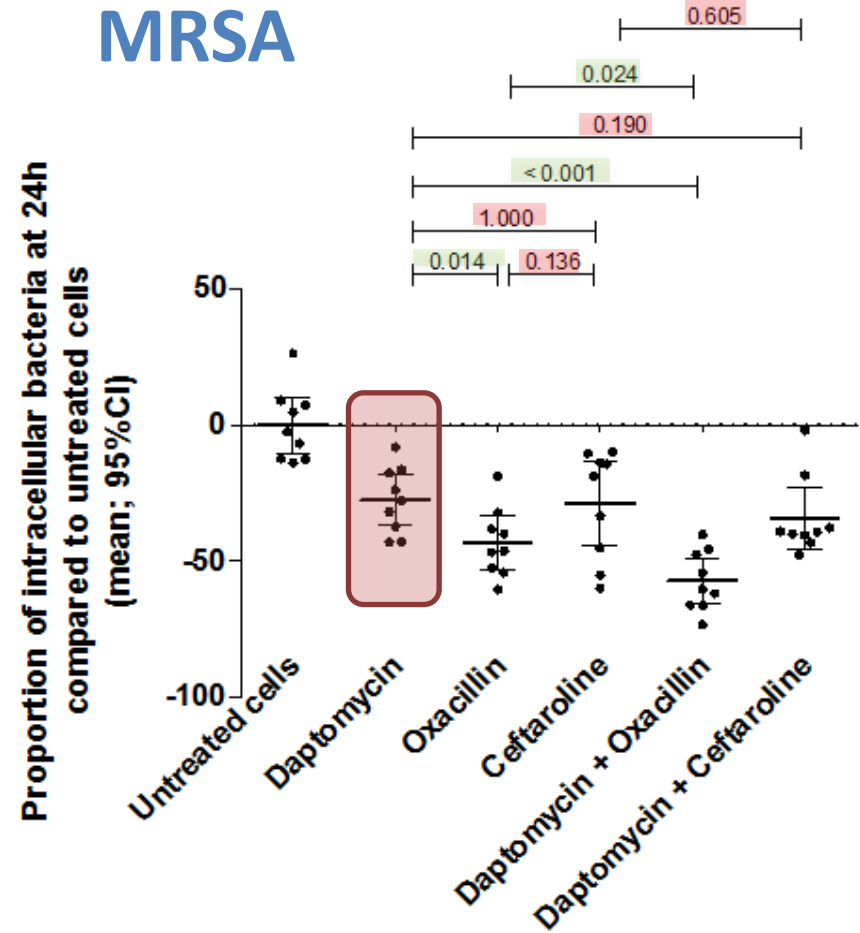
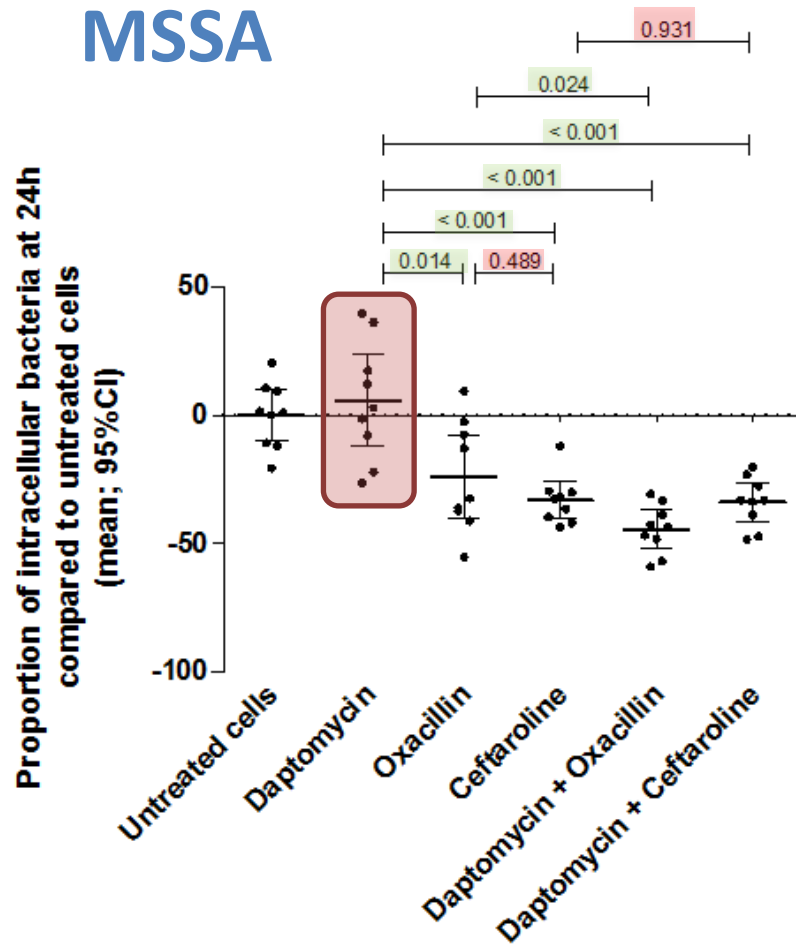
MSSA



MRSA

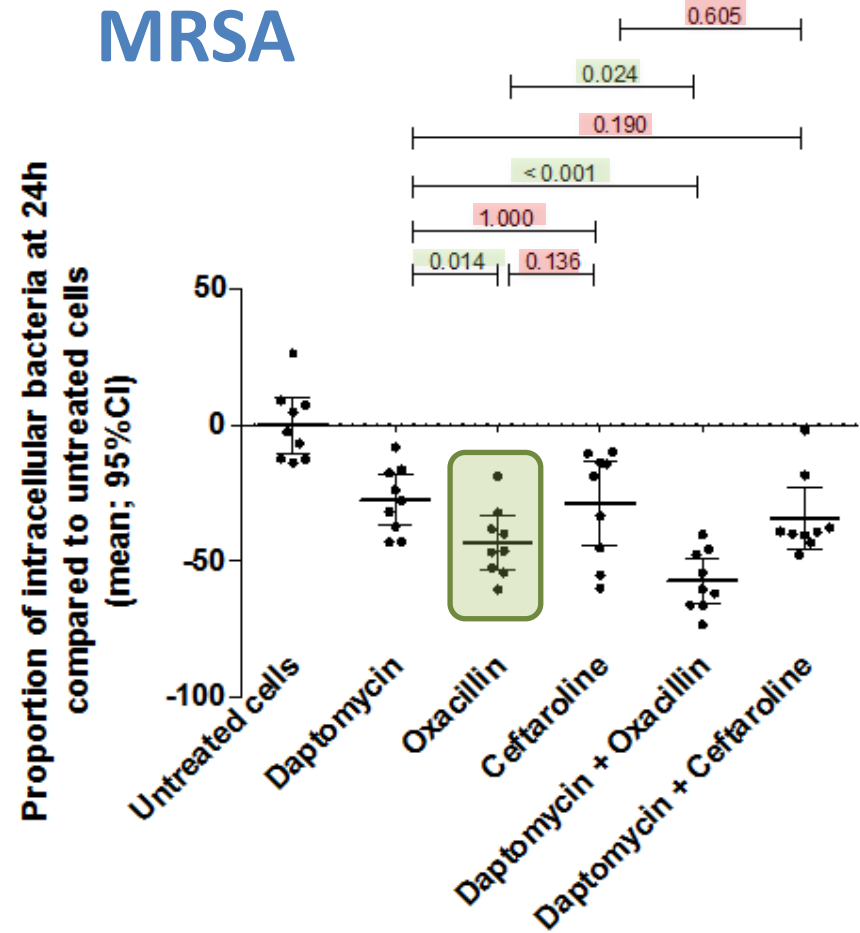
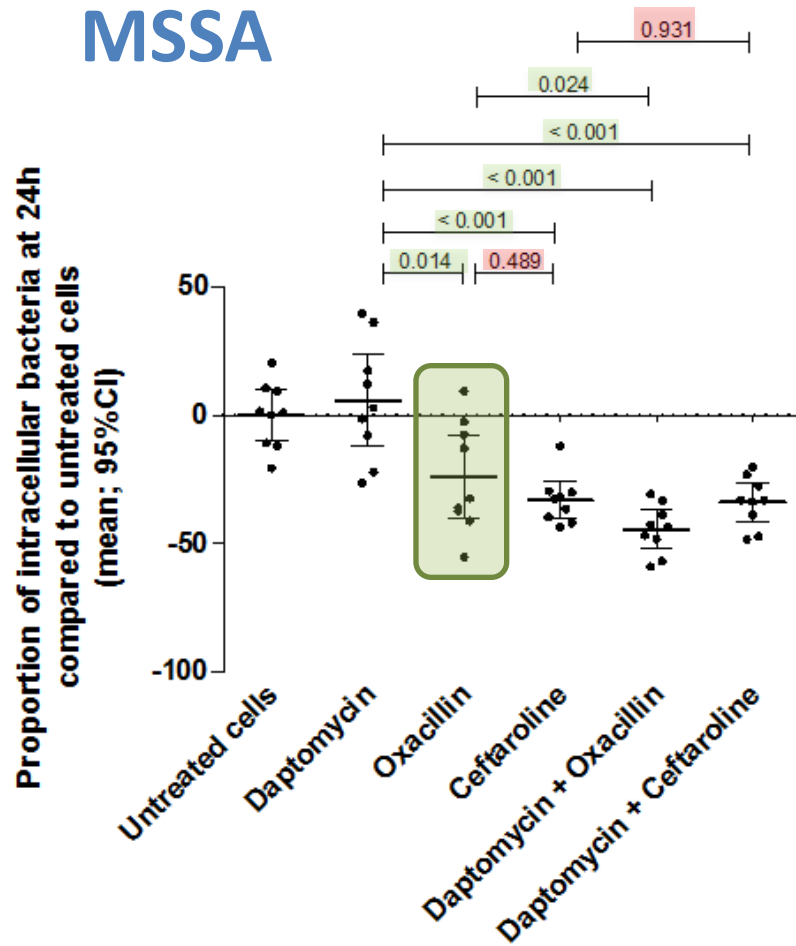


FOCUS : daptomycine et bêta-lactamines



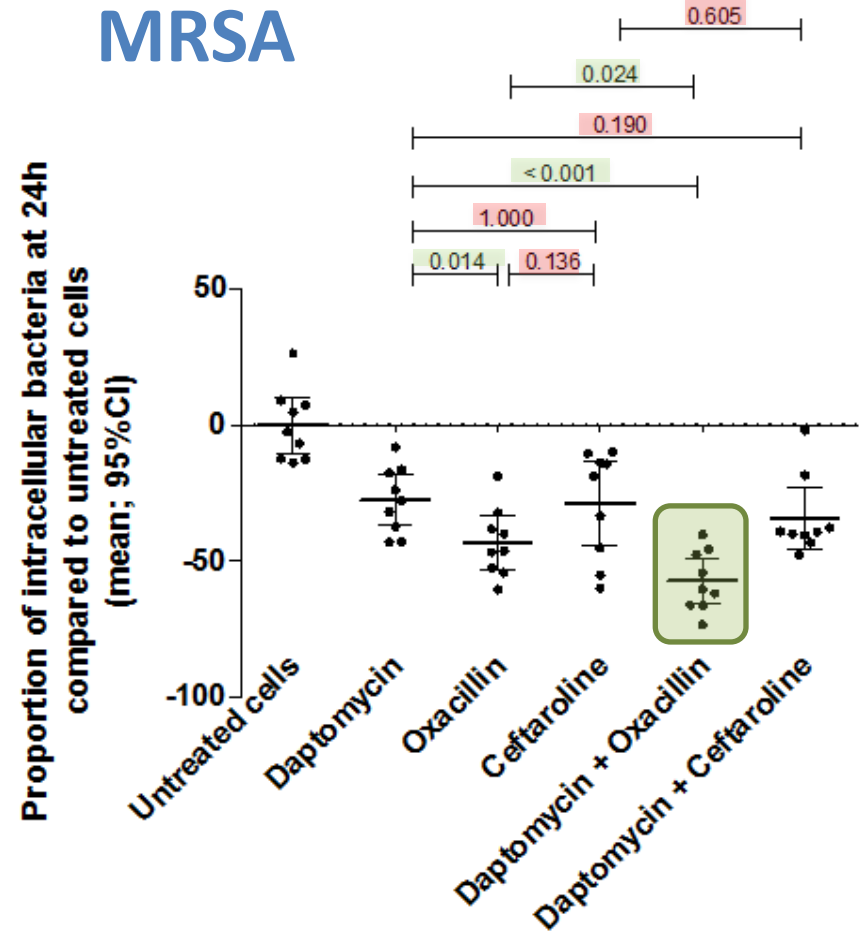
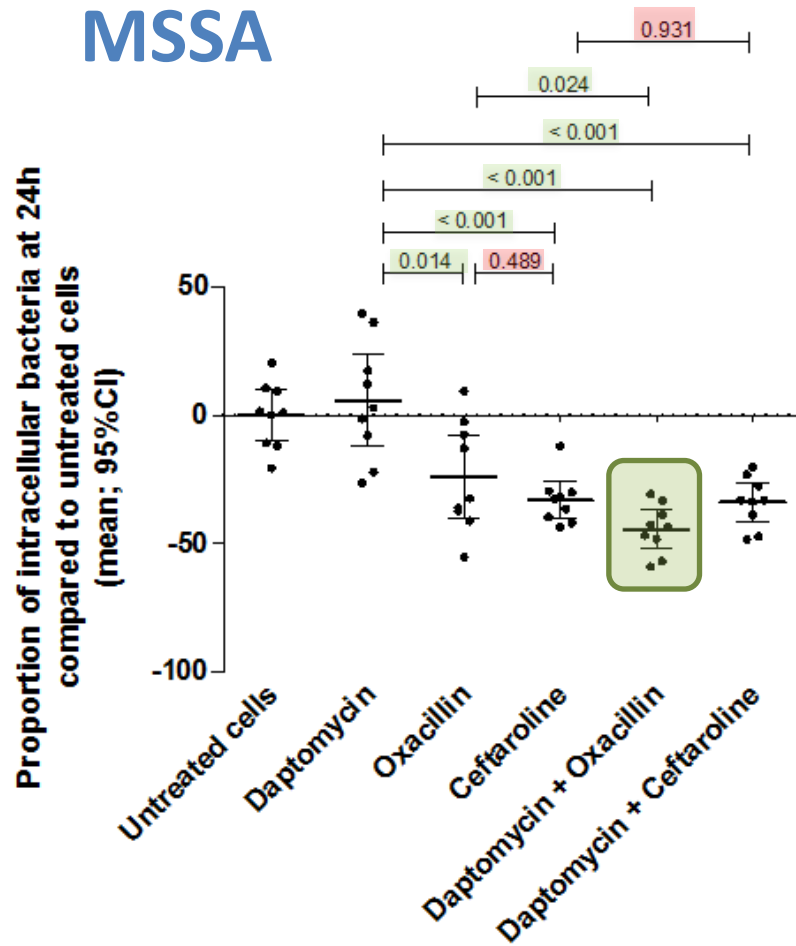
→ Confirmation of the weak intraosteoblastic activity of daptomycin against MSSA/MRSA

FOCUS : daptomycine et bêta-lactamines



→ Acceptable efficacy of oxacillin against intracellular *S. aureus* INCLUDING MRSA

FOCUS : daptomycine et bêta-lactamines



→ Superiority of the daptomycin-oxacillin combination compared to each molecule alone not observed for the daptomycin-ceftarolin combination

FOCUS : daptomycine et bêta-lactamines

Impact du pH intralysosomal

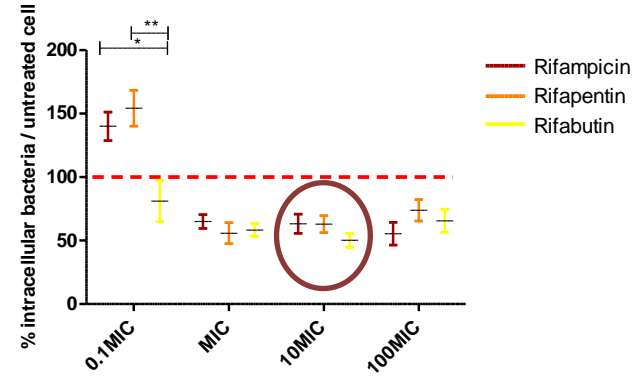
	SASM			SARM		
	pH 7	pH 5	<i>p</i> -value	pH 7	pH 5	<i>p</i> -value
Daptomycin	0,25	1,83	0,002	0,29	2,00	0,002
Oxacillin	0,50	0,06	0,047	106,70	0,35	0,001
Ceftaroline	4,00	0,08	0,059	8,00	0,062	0,047

- Intracellular restauration of oxacillin activity against MRSA is (at least partly) due to a major decrease in MICs at the intralysosomal acidic pH
- Intracellular weak activity of daptomycin might be partly due to its decrease in activity at acidic pH

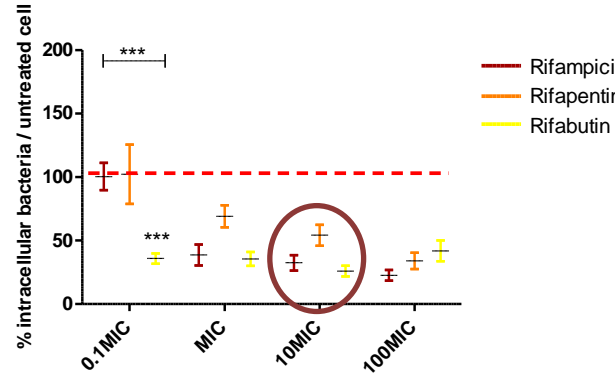


FOCUS : rifamycines

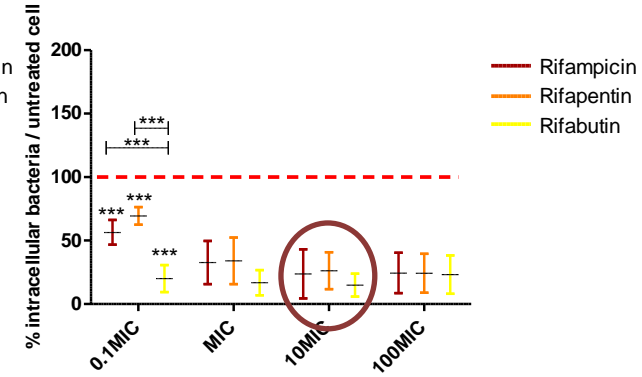
6850 strain



Clinical strain n°1



Clinical strain n°2

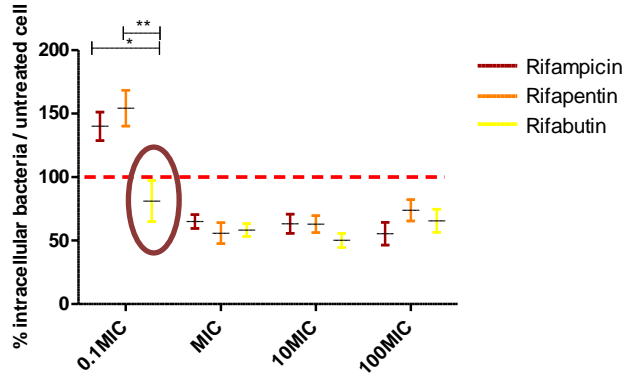


→ Bonne activité intracellulaire des 3 rifamycines à concentration osseuse

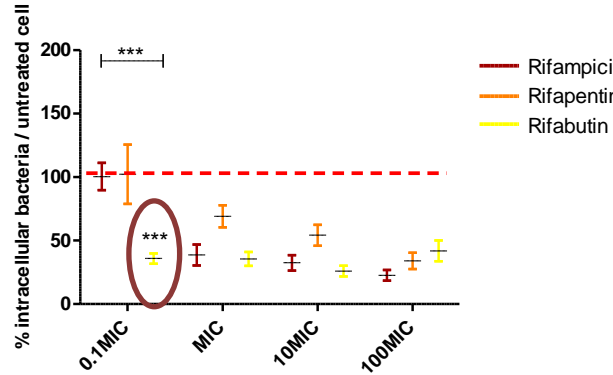


FOCUS : rifamycines

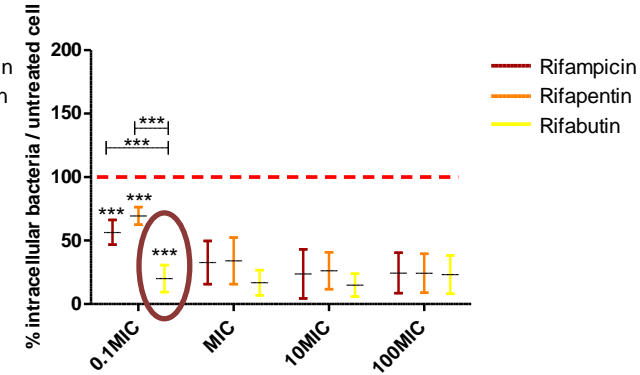
6850 strain



Clinical strain n°1



Clinical strain n°2



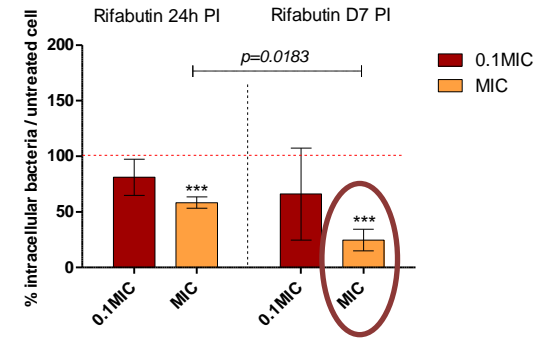
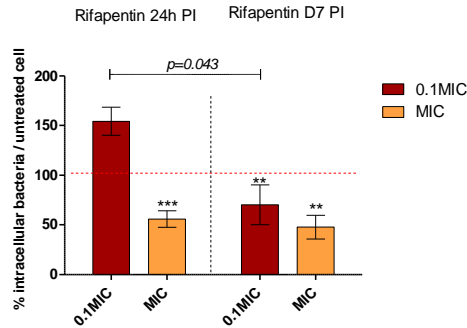
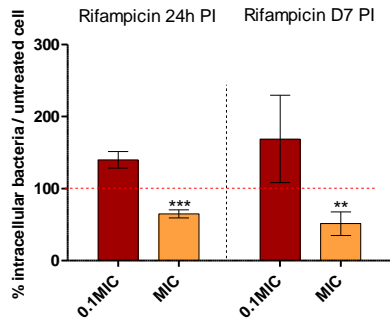
→ Bonne activité intracellulaire des 3 rifamycines à concentration osseuse

→ Meilleure activité de la rifabutine à faible concentration (dès 0,1 CMI)

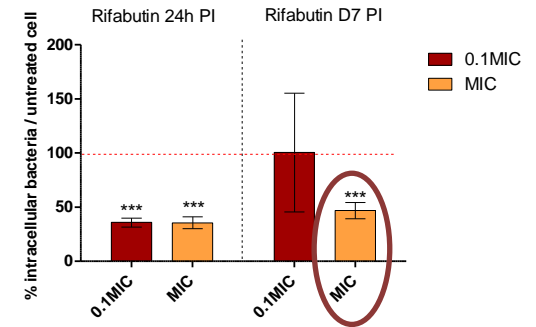
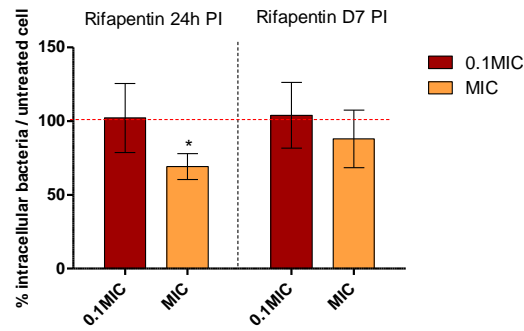
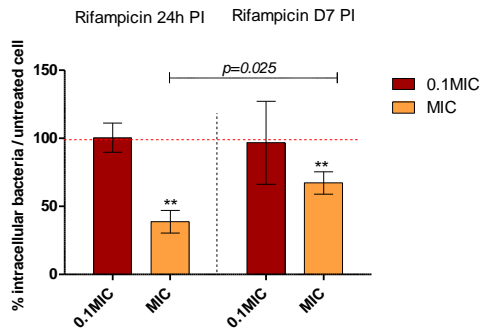


FOCUS : rifamycines

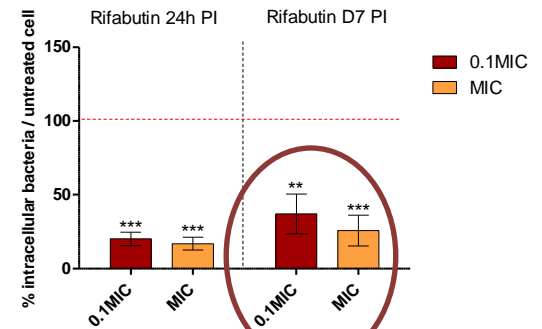
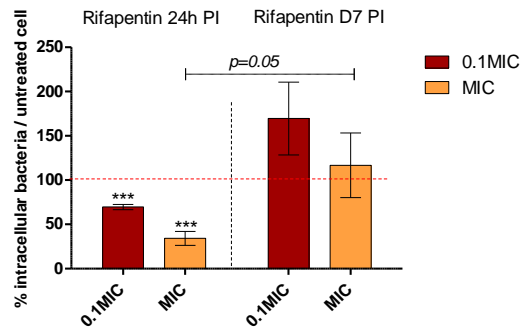
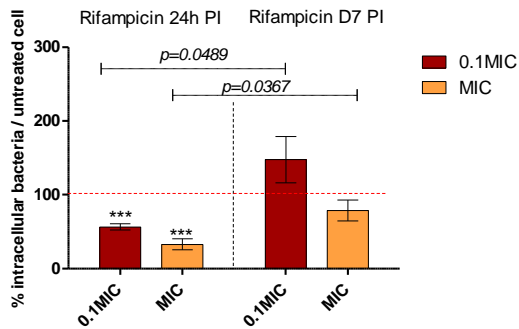
6850 strain



Clinical strain n°1

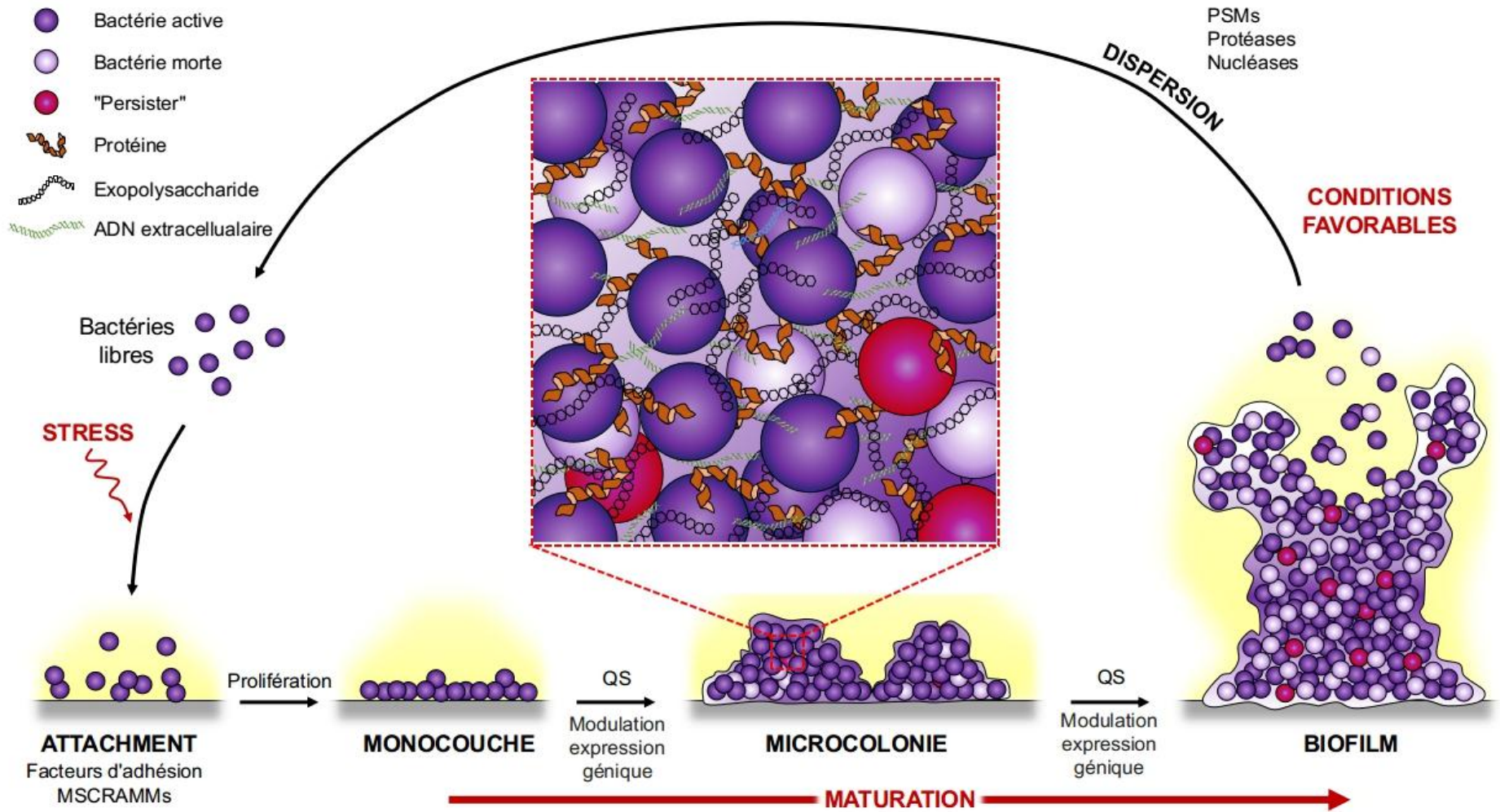


Clinical strain n°2



Antibiothérapie « anti-biofilm »

Formation du biofilm



Biofilm = population bactérienne hétérogène + matrice extracellulaire (slime)

Biofilm et IOA/IPA

Formation de biofilm sur :

- **la prothèse**
 - parties métalliques
 - céramique
 - PE

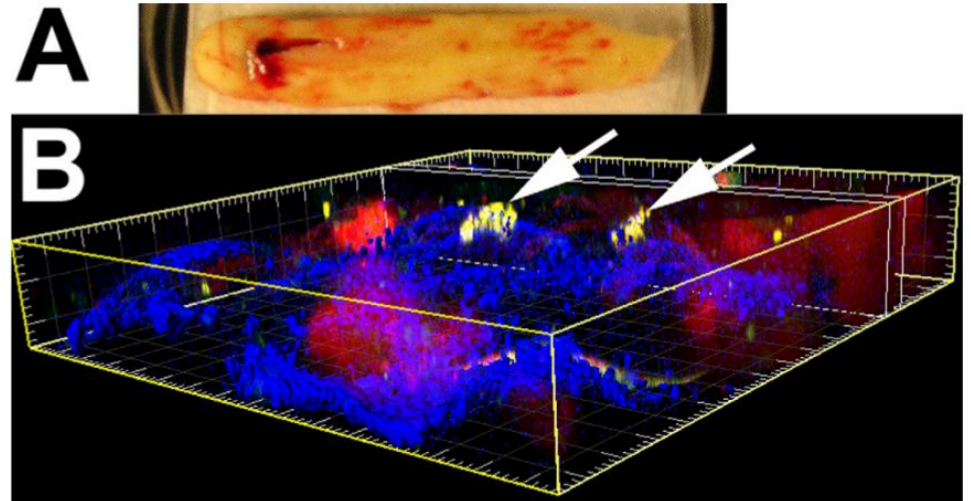


F. Laurent, HCL, 2017

Biofilm et IOA/IPA

Formation de biofilm sur :

- **la prothèse**
 - parties métalliques
 - céramique
 - PE
- **le ciment orthopédique**

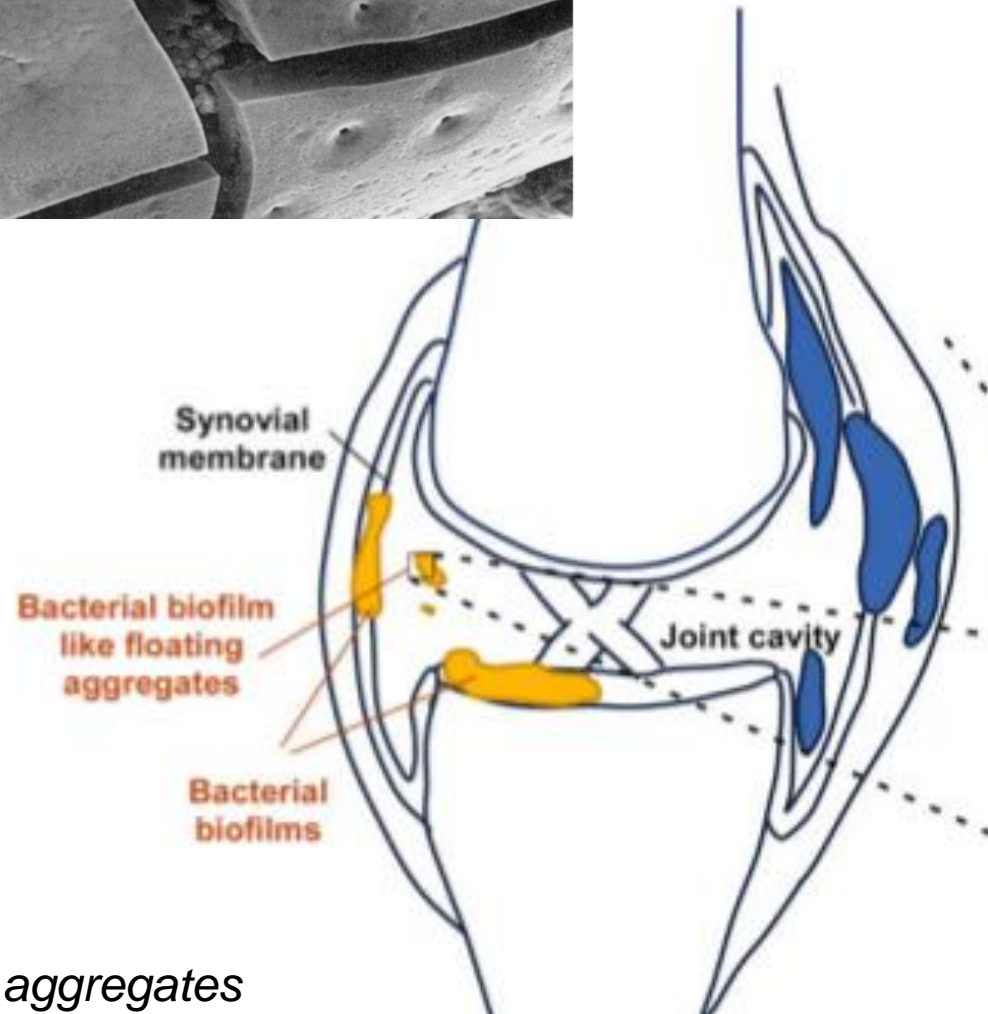
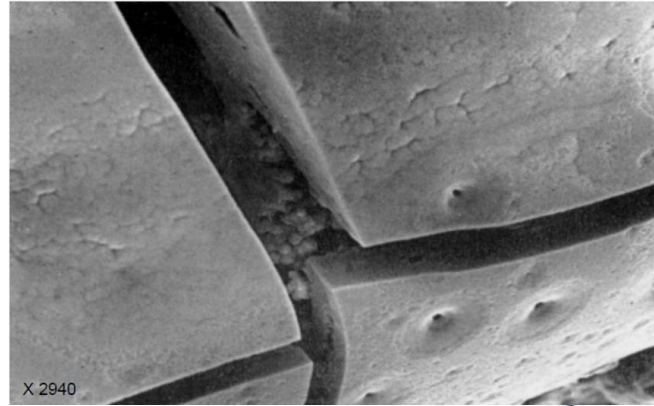


Stoodley et al., 2008

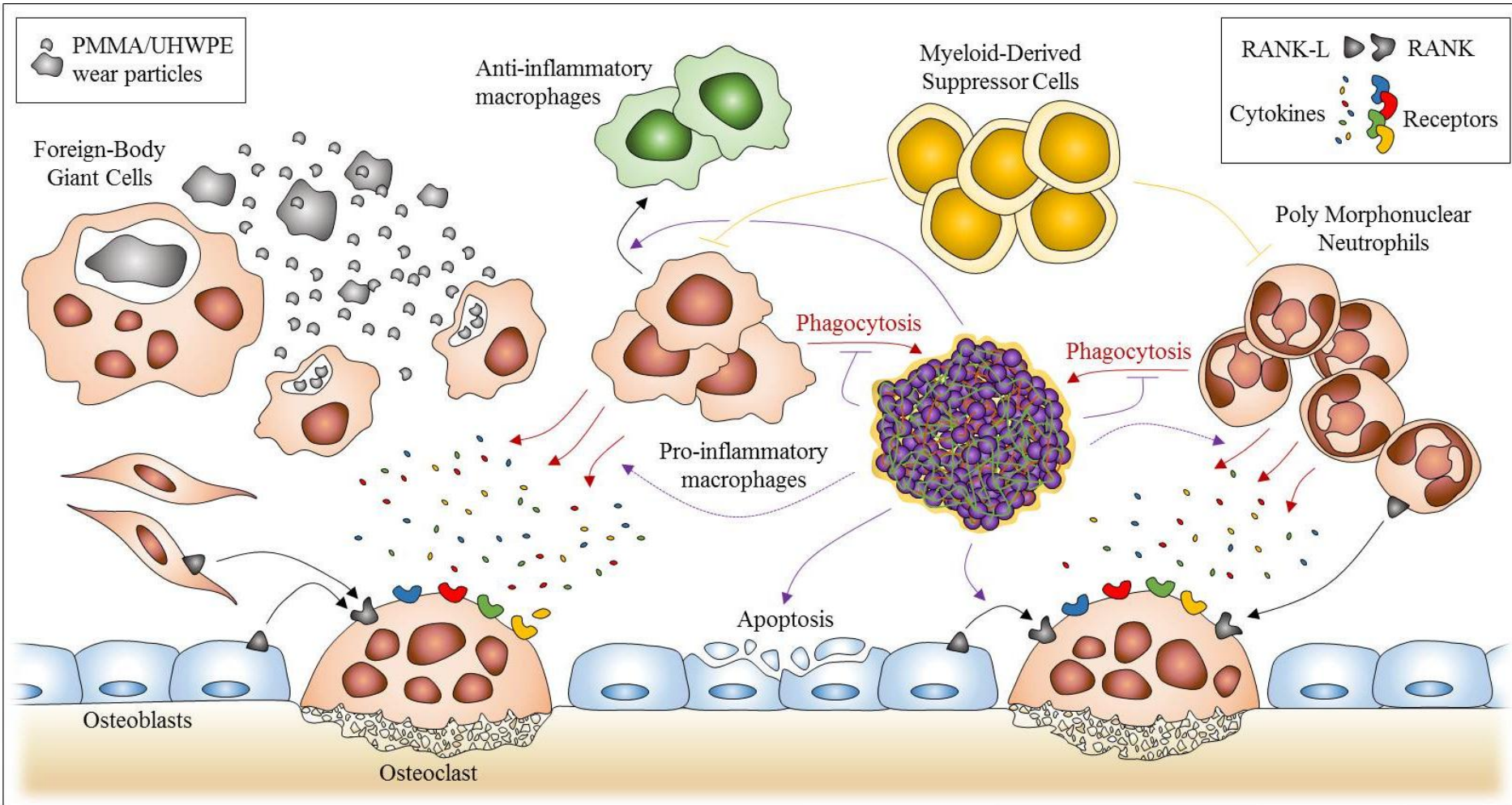
Biofilm et IOA/IPA

Formation de biofilm sur :

- **la prothèse**
 - parties métalliques
 - céramique
 - PE
- **le ciment orthopédique**
- **les tissus périprothétiques**
 - OS
 - membrane(s) synoviale(s)
 - liquide synovial = *biofilm-like aggregates*



Biofilm et environnement périprothétique



Réduction de la phagocytose des bactéries sous forme "biofilm"
Réponse "anti-inflammatoire" favorisée (MDSCs)



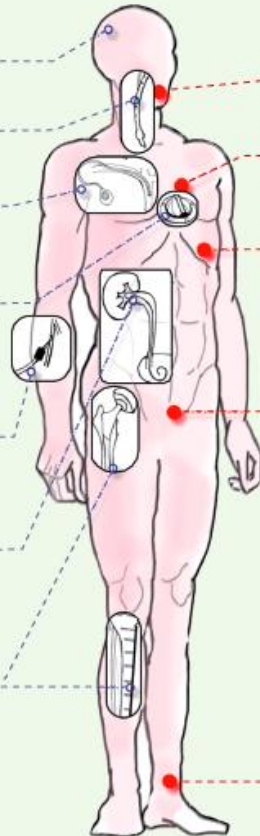
FOCUS : Biofilm et thérapeutique

ESCMID GUIDELINES

ESCMID* guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014

Infections liées au matériel

- Dérivations ventriculaires
- Sondes oro-trachéales
- Cathéters vasculaires centraux (artériels et veineux)
- Valves cardiaques et stimulateurs cardiaques
- Cathéters vasculaires périphériques
- Sondes sur voies urinaires (urétrales et urétérales)
- Prothèses articulaires et matériels d'ostéosynthèse



Infections chroniques

- Pathologies buccodentaires et ORL (caries, stomatites, otites chroniques)
- Endocardites infectieuses
- Pneumopathies chez les patients atteints de mucoviscidose
- Infections urinaires récurrentes
- Infections associées aux plaies chroniques

- Aucun test de sensibilité aux antibiotiques des bactéries en biofilm n'est prédictif du succès thérapeutique actuellement
- En cas d'infection sur matériel, éradication par ATB seuls possible uniquement si évolution ≤ 3 (hématogène) à 4 (inoculation) semaines
- Importance des ATB « anti-biofilm », notamment en cas de traitement conservateur

Biofilm et tolérance aux antibiotiques

- MBEC = Minimum Biofilm Eradication Concentration
↳ équivalent de la MIC pour les biofilms
- MBEC = 10 à 1000 x MIC !!!
- Baisse de sensibilité aux antibiotiques = **tolérance** et pas résistance
pas d'augmentation de la MIC pour les bactéries issues du biofilm
- Explications ?
 - Problème de pénétration des antibiotiques dans le biofilm ?
 - Bactéries différentes dans le biofilm ?

Antibiotic	MIC ($\mu\text{g/ml}$) NCCLS assay†	MIC ($\mu\text{g/ml}$) Assay with CBD†	MBEC ($\mu\text{g/ml}$) A_{650} †	MBEC ($\mu\text{g/ml}$) 0 CFU/peg‡
Cefazolin	0.5	0.5	>1,024	>1,024
Ciprofloxacin	0.25	0.5	512	512
Clindamycin	0.12	0.25	128	256
Gentamicin	0.5	0.5	2	2
Oxacillin	0.12	0.25	>1,024	>1,024
Penicillin	1	4	128	128
Vancomycin	1	1	>1,024	>1,024

Mécanismes de "tolérance" aux antibiotiques

- Pénétration des antibiotiques
- Rôle des composants de la matrice extracellulaire
 - Polysaccharides
 - eDNA
- Enzymes présentes dans la matrice (β -lactamases)

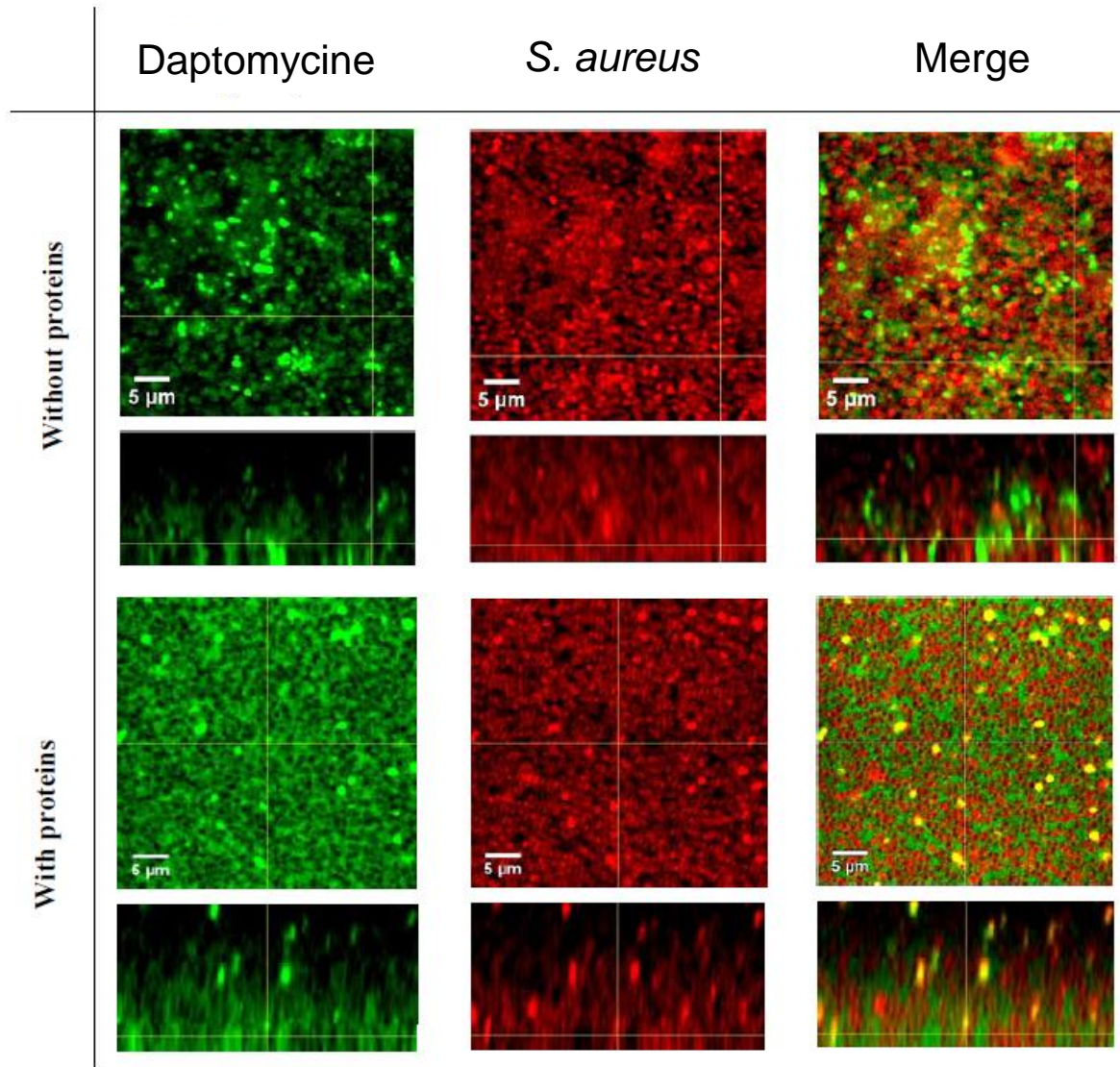
Mécanismes de "tolérance" aux antibiotiques

- Pénétration des antibiotiques
- Rôle des composants de la matrice extracellulaire
 - Polysaccharides
 - eDNA
- Enzymes présentes dans la matrice (β -lactamases)
- Hétérogénéité, hypoxie et croissance ralentie
- Réponse oxydative
- Limitation nutritionnelle et réponse stringente
- Pompes à efflux
- Diversité génétique
 - Transfert horizontal de gènes
 - Fréquence des mutations
- SCV
- Persister

Mécanismes de "tolérance" aux antibiotiques

- **Pénétration des antibiotiques**
- Rôle des composants de la matrice extracellulaire
 - Polysaccharides
 - **eDNA**
- Enzymes présentes dans la matrice (β -lactamases)
- **Hétérogénéité, hypoxie et croissance ralentie**
- **Réponse oxydative**
- **Limitation nutritionnelle et réponse stringente**
- Pompes à efflux
- Diversité génétique
 - Transfert horizontal de gènes
 - Fréquence des mutations
- SCV
- Persister

Biofilm et pénétration de la daptomycine



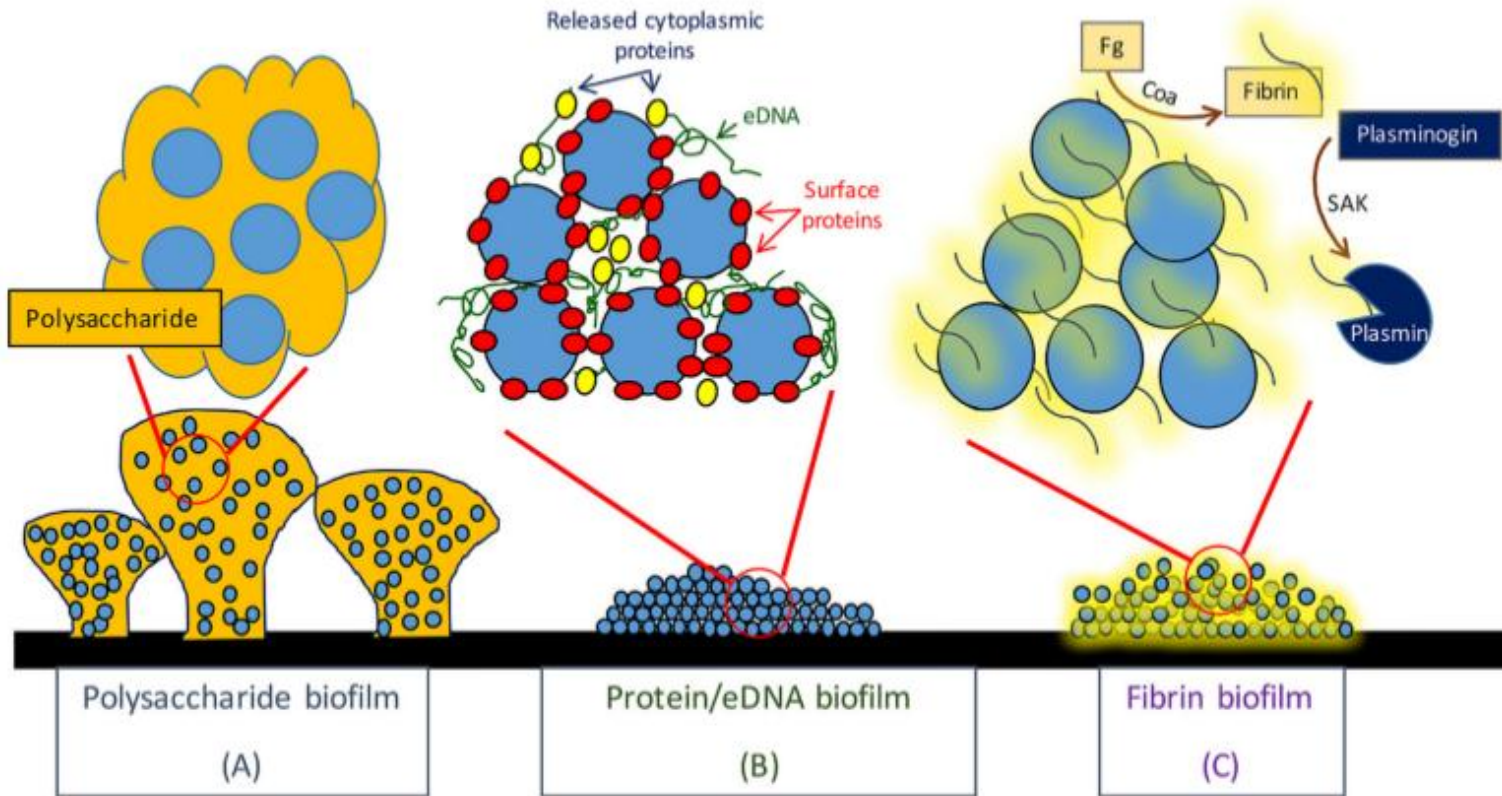
La daptomycine peut pénétrer dans le biofilm mais ne l'éradique pas !

Biofilm et pénétration des antibiotiques

Antibiotics	Inhibition of biofilm formation (adhesion)	Biofilm penetration	Bactericidal activity in biofilm
Vancomycin	+	++ ^{16,17}	+ ^{16,17}
Linezolid	+	++ ^{24,29}	+ ²⁴
Daptomycin	+	+++ ¹⁵	++ ^{21,24}
Rifampicin	+	+++ ^{8,16,18}	++ ^{16,30}
Moxifloxacin	+	++ ³¹	++ ^{21,31}
Rifampicin + daptomycin	+	+++ ^{2,30}	+++ ^{28,30}
Rifampicin + vancomycin	+	++ ^{16,18}	++ ^{16,27,32}
Rifampicin + linezolid	+	+++ ^{16,29}	+++ ^{27,32}

La pénétration des antibiotiques dans le biofilm n'est pas proportionnelle à l'activité bactéricide !

Matrice extracellulaire du biofilm



Acidification de microenvironnement par l'eDNA



Inactivation des antibiotiques

Biofilm et activité métabolique bactérienne

Hypoxie



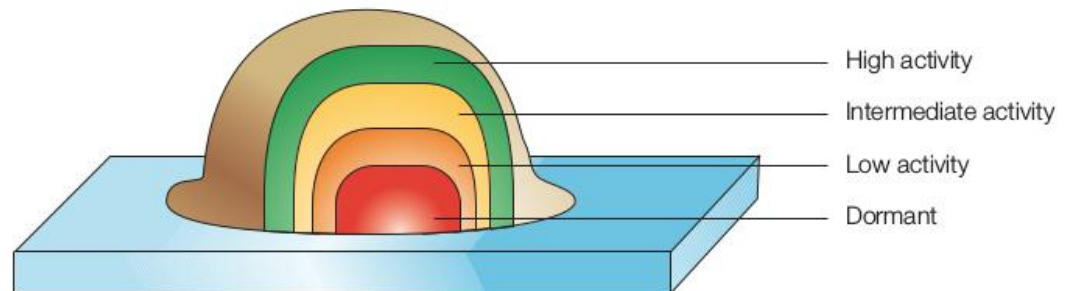
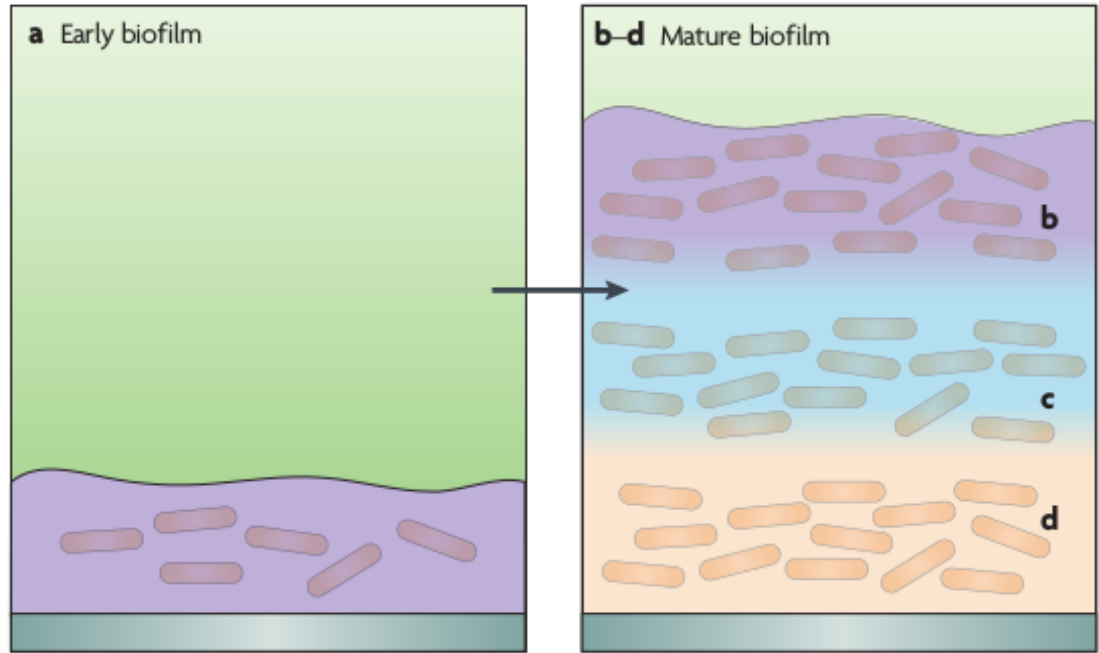
"Limitation nutritionnelle"



Ralentissement de
l'activité
métabolique



**Tolérance aux
antibiotiques**





Take-home messages

Synthèse

Persistence intracellulaire

-
-
-
-

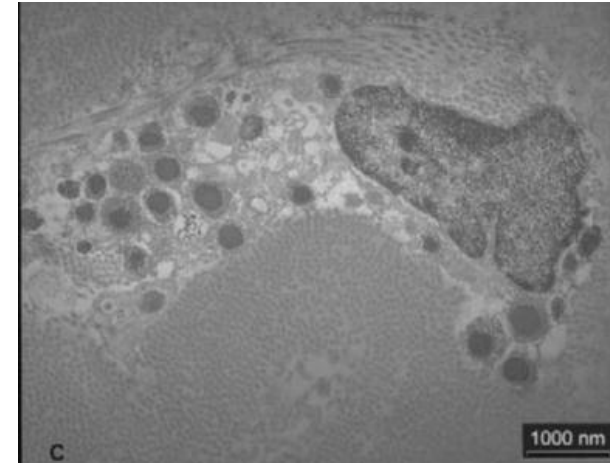
Biofilm

- MBEC = 10 à 1000 x MIC !!!
- Mécanismes de la tolérance aux antibiotiques
 - Pas forcément la pénétration
 - eDNA et acidification du microenvironnement
 - Métabolisme bactérien ralenti/altéré

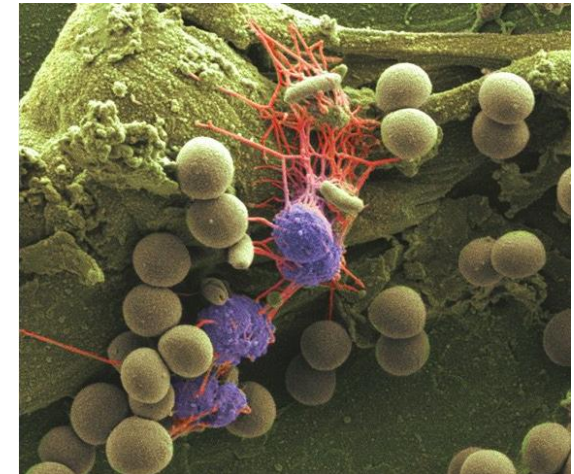
Similarité entre persistance intracellulaire et biofilm

Sanctuarisation de la bactérie et switch vers la chronicité

ex : SCV/persister



Sendi et al., 2006



J. Tasse, HCL, 2017

Remerciements : Lyon BJI study group

Infectiologie – Coordonateur : *Tristan Ferry* – *Tristan Ferry, Florent Valour, Thomas Perpoint, André Boibieux, François Biron, Patrick Miaillhes, Florence Ader, Julien Saison, Sandrine Roux, Claire Philit, Fatiha Daoud, Johanna Lippman, Evelyne Braun, Christian Chidiac, Yves Gillet, Laure Hees*

Chirurgie orthopédique et du rachis – *Sébastien Lustig, Philippe Neyret, Michel-Henry Fessy, Anthony Viste, Philippe Chaudier, Romain Desmarchelier, Sébastien Martres, Franck Trouillet, Antoine Schneider, Romain Gaillard, Cédric Barrey, Francesco Signorelli, Emmanuel Jouanneau, Timothée Jacquesson, Ali Mojallal, Fabien Boucher, Hristo Shipkov, Mehdi Ismail, Joseph Chateau*

Microbiologistes – *Frederic Laurent, François Vandenesch, Jean-Philippe Rasigade, Céline Dupieux*

Médecine nucléaire – *Isabelle Morelec, Marc Janier, Francesco Giammarile*

Pharmacologie – *Michel Tod, Marie-Claude Gagnieu, Sylvain Goutelle*

Attaché de recherche clinique – *Eugénie Mabrut*

