



DIU Infections ostéo-articulaires – Lyon, décembre 2022

Antibiothérapie intracellulaire et anti-biofilm

Florent Valour

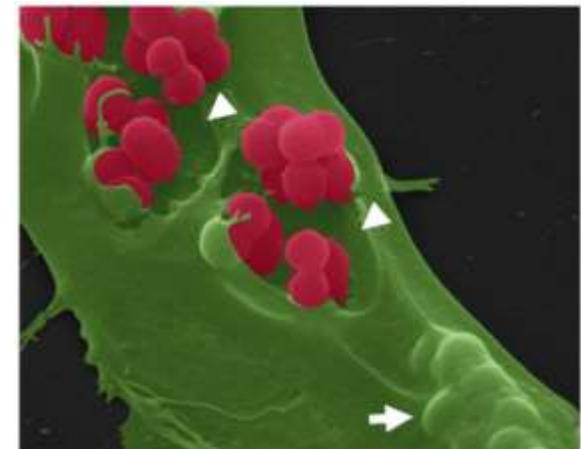
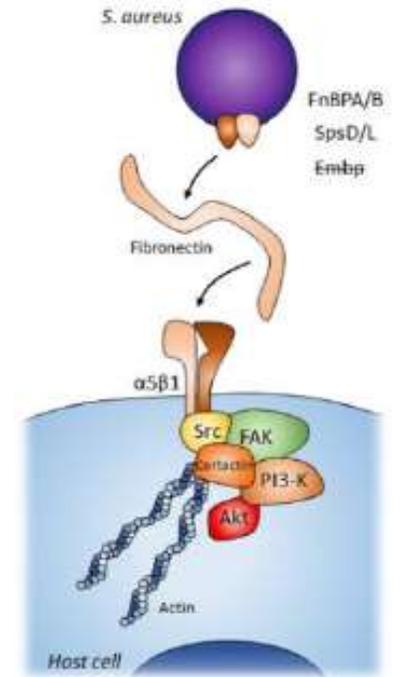
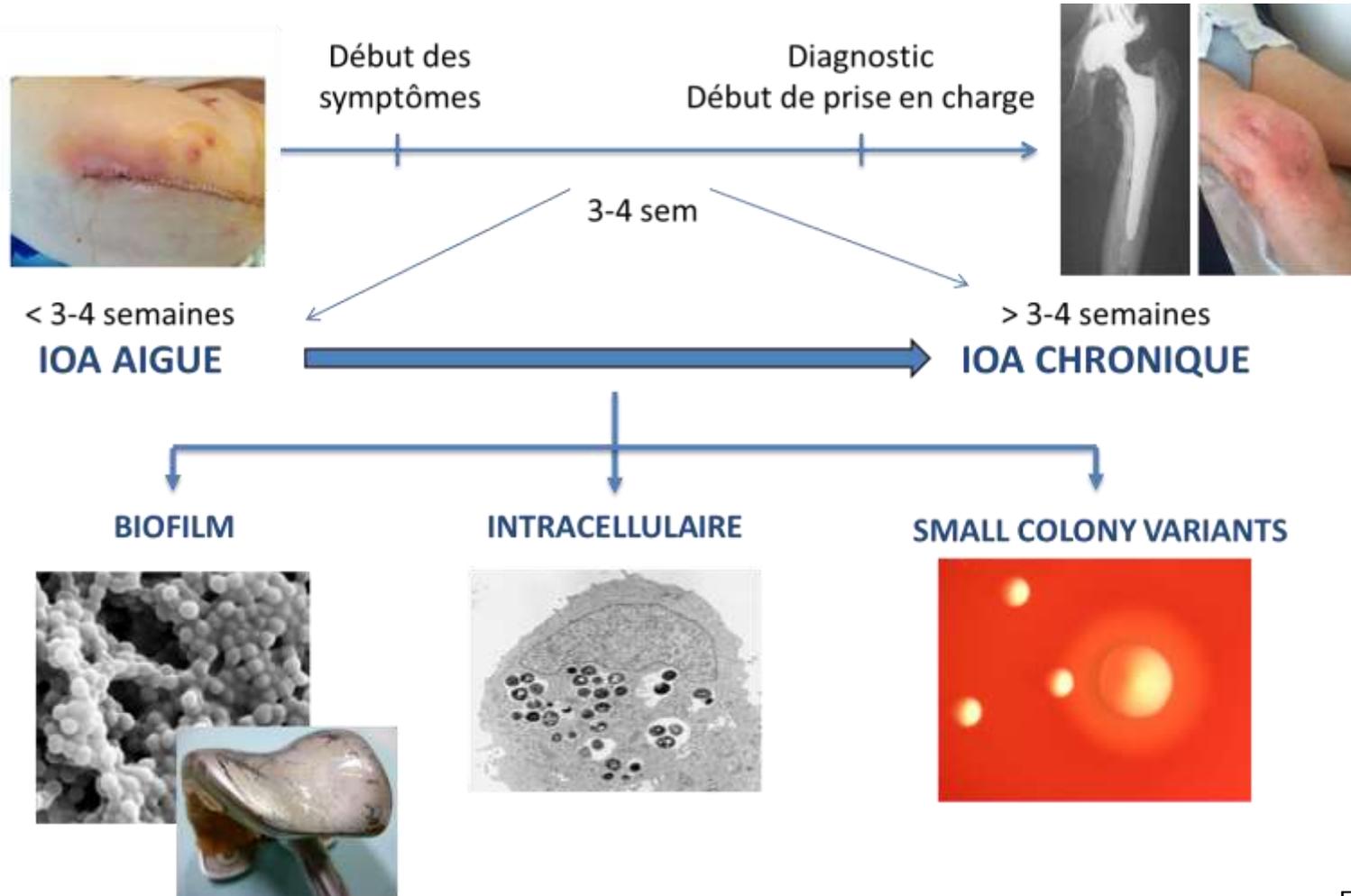
Jérôme Josse

Service des maladies infectieuses et tropicales
CRIOAc Lyon
Hospices Civils de Lyon

INSERM U1111 – Equipe « Pathogénèse des infections à staphylocoques »
Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI)
Université Claude Bernard Lyon 1

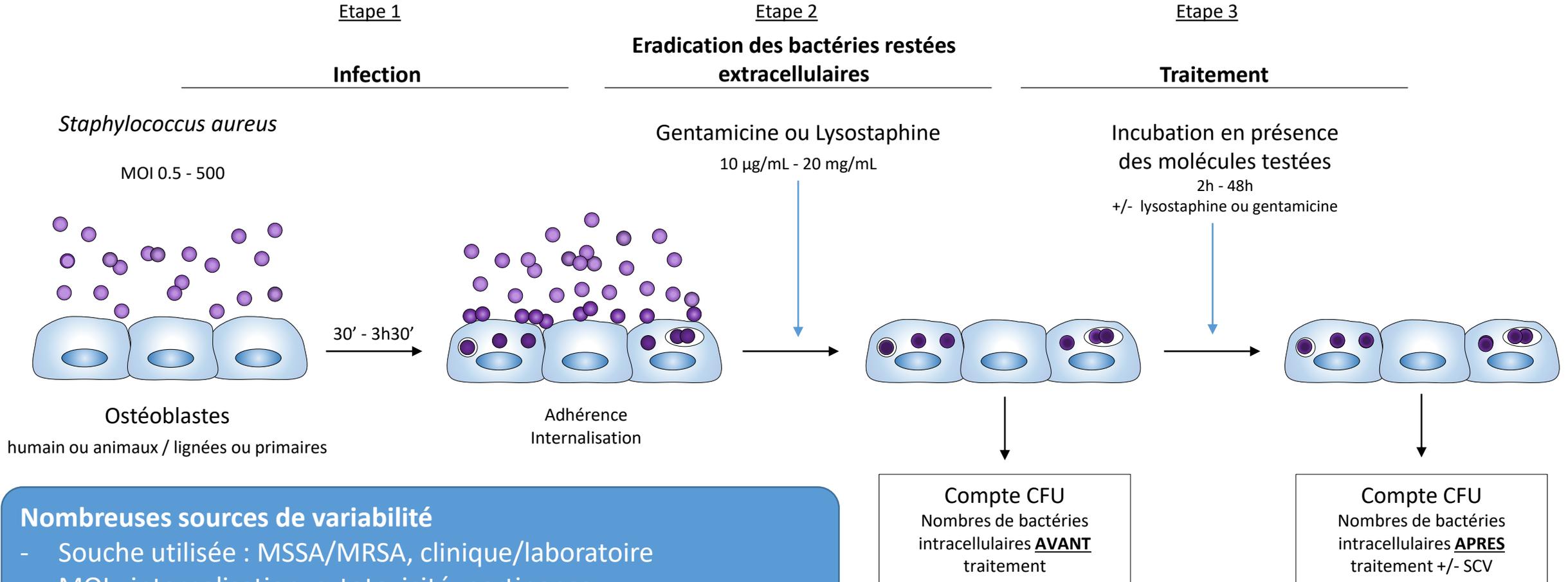
Introduction

Prise en charge des **IOA chroniques / sur matériel** : 20% d'échec (au mieux ...)



Antibiothérapie intracellulaire

Modèle d'étude

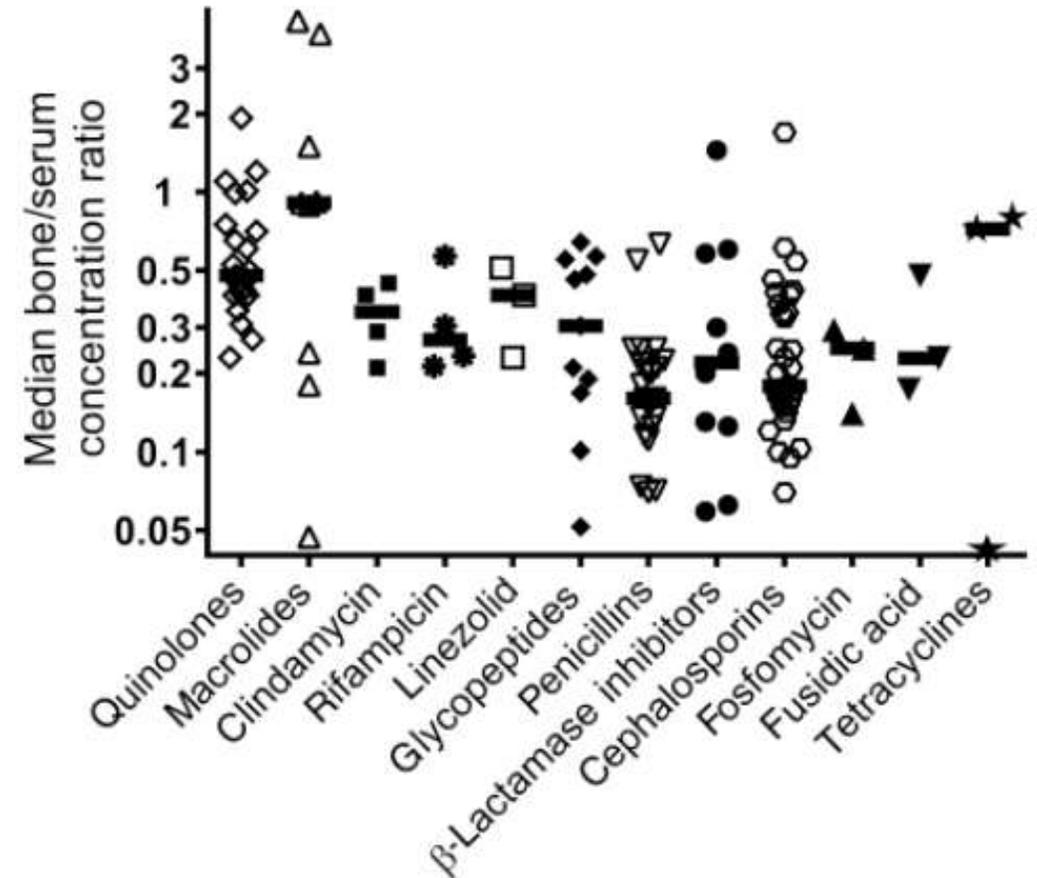
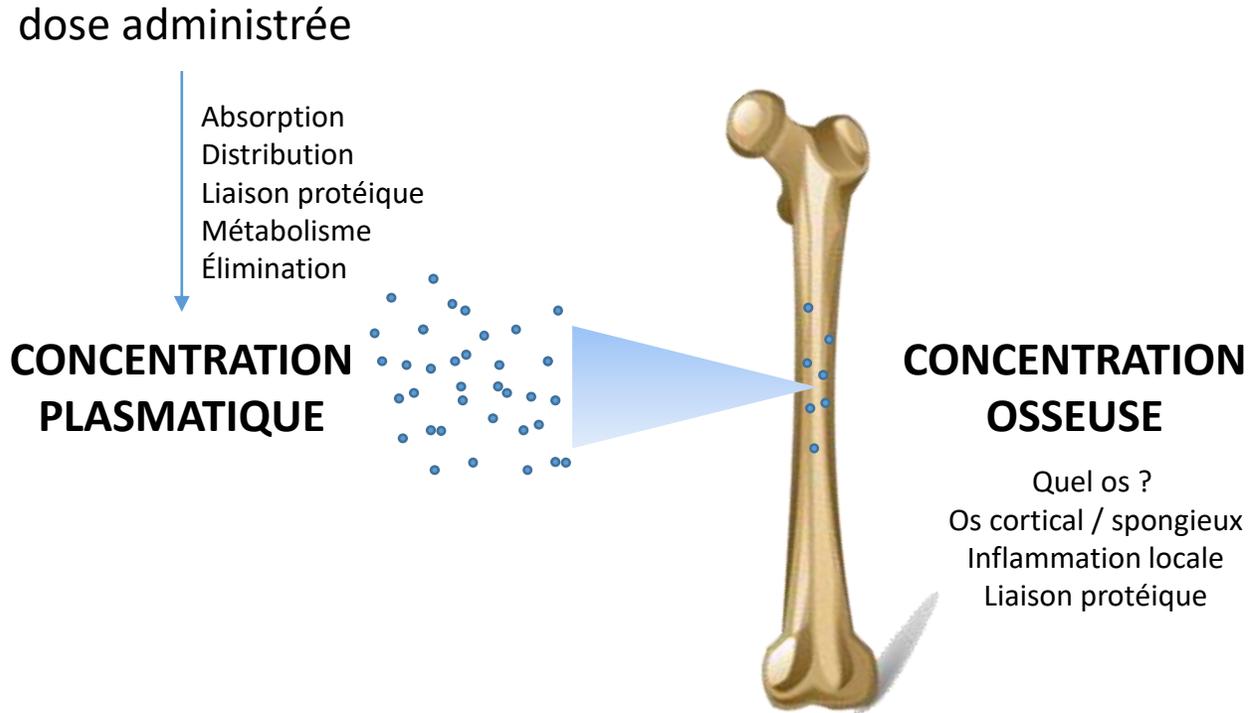


Nombreuses sources de variabilité

- Souche utilisée : MSSA/MRSA, clinique/laboratoire
- MOI : internalisation, cytotoxicité, pertinence
- Phase de culture
- Agent extracellulaire et concentration (pinocytose)
- Timing du traitement : modèle aigu ou chronique
- Dose d'antibiotique : multiple CMI, concentration osseuse
- Maintien genta/lyso : évite la réinfection

Paramètres PK influençant l'efficacité du traitement

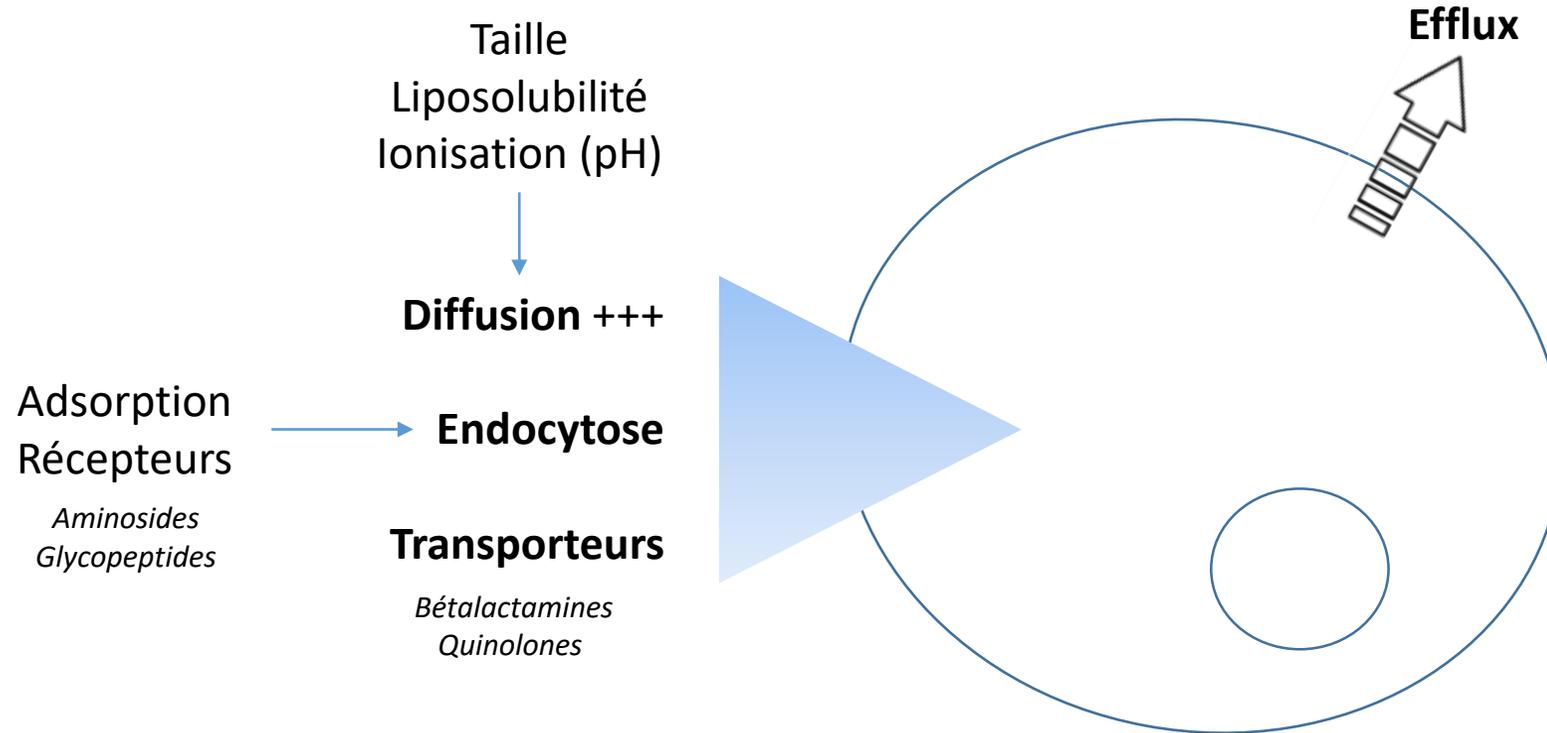
1. Concentration locale : diffusion osseuse des antibiotiques



Paramètres PK influençant l'efficacité du traitement

1. Concentration locale : diffusion osseuse des antibiotiques

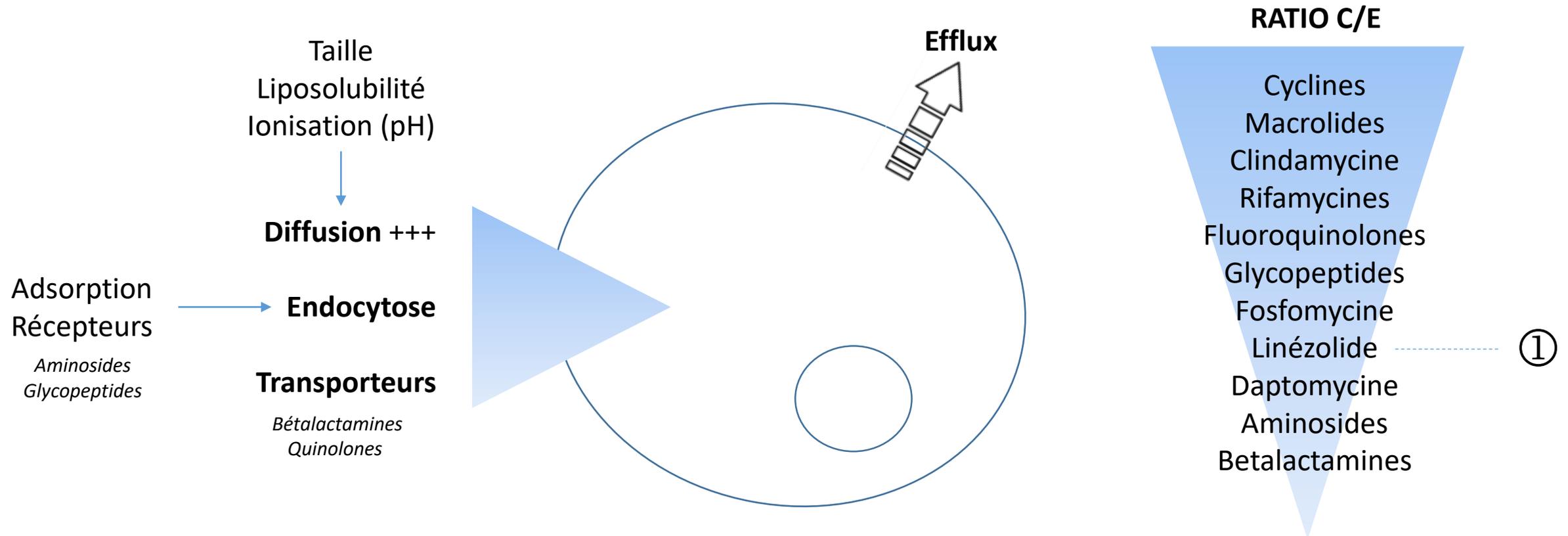
2. Concentration intracellulaire



Paramètres PK influençant l'efficacité du traitement

1. Concentration locale : diffusion osseuse des antibiotiques

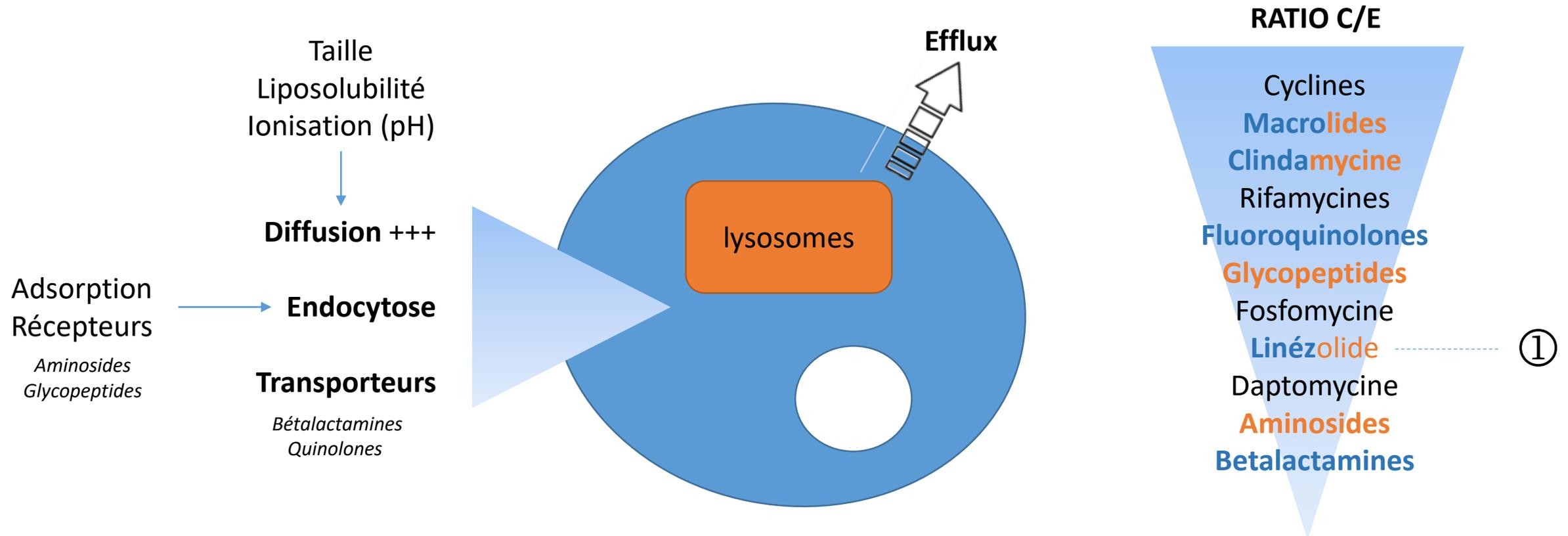
2. Concentration intracellulaire



Paramètres PK influençant l'efficacité du traitement

1. Concentration locale : diffusion osseuse des antibiotiques

2. Concentration intracellulaire et sub-cellulaire



Paramètres PK influençant l'efficacité du traitement

1. Concentration locale : diffusion osseuse des antibiotiques

2. Concentration intracellulaire et sub-cellulaire

3. Conditions physicochimiques locales (pH)

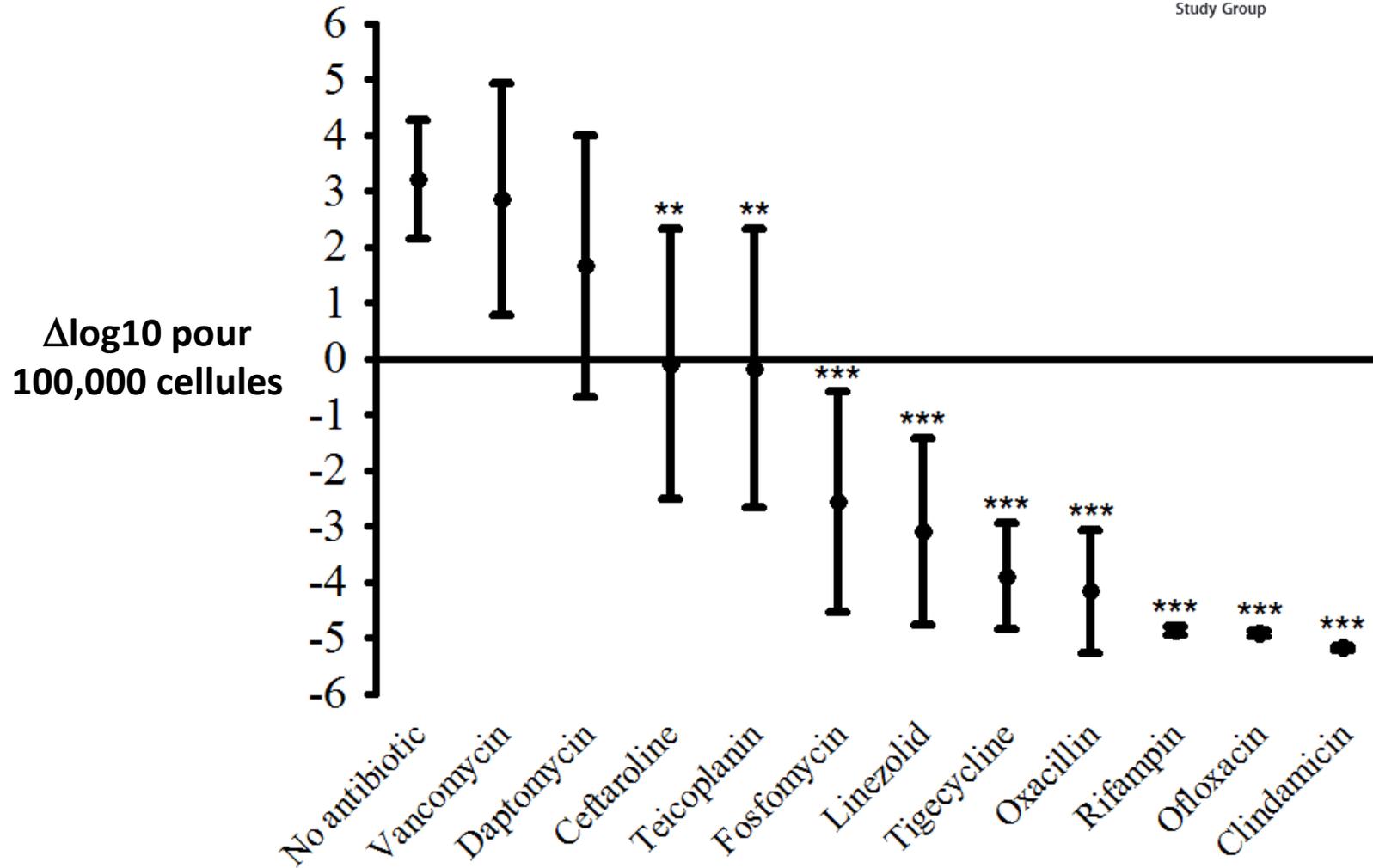
-  Perte d'efficacité à pH acide
-  Gain d'efficacité à pH acide
-  Aucun changement

CMI	pH7,5	pH5
Rifampicine	0,0075	0,0009
Rifapentine	0,007	<0,0035
Téicoplanine	0,5	0,0625
Rifabutine	<0,0035	0,125
Fosfomycine	0,25	2
Daptomycine	1	4
Lévofloxacine	0,25	2
Ofloxacine	0,5	2
Tigécycline	0,25	1
Cotrimoxazole	0,5	2
Clindamycine	8	>32
Oxacilline	0,0625	0,0625
Céfazoline	0,125	0,0125
Vancomycine	2	1
Linezolide	4	4
Doxycycline	0,125	0,0625

Screening

Antimicrobial Activity against Intraosteoblastic *Staphylococcus aureus*

Florent Valour,^{a,b} Sophie Trouillet-Assant,^d Natacha Riffard,^d Jason Tasse,^d Sacha Flammier,^d Jean-Philippe Rasigade,^{b,c} Christian Chidlac,^{a,d} 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

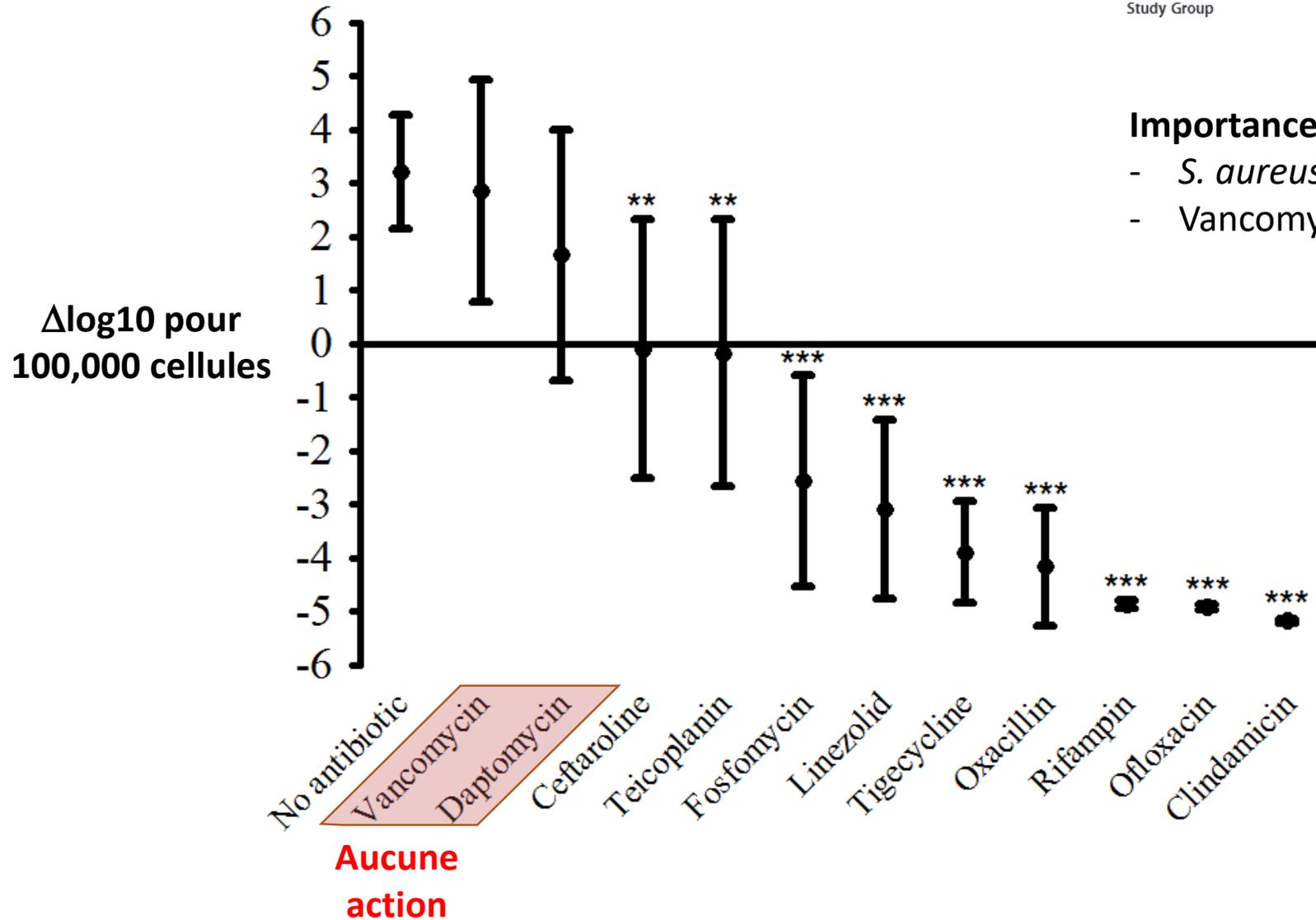


HG001
Concentration osseuses

Screening

Antimicrobial Activity against Intraosteoblastic *Staphylococcus aureus*

Florent Valour,^{a,b} Sophie Trouillet-Assant,^d Natacha Riffard,^d Jason Tasse,^d Sacha Flammier,^d Jean-Philippe Rasigade,^{b,c} Christian Chidlac,^{a,d} 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



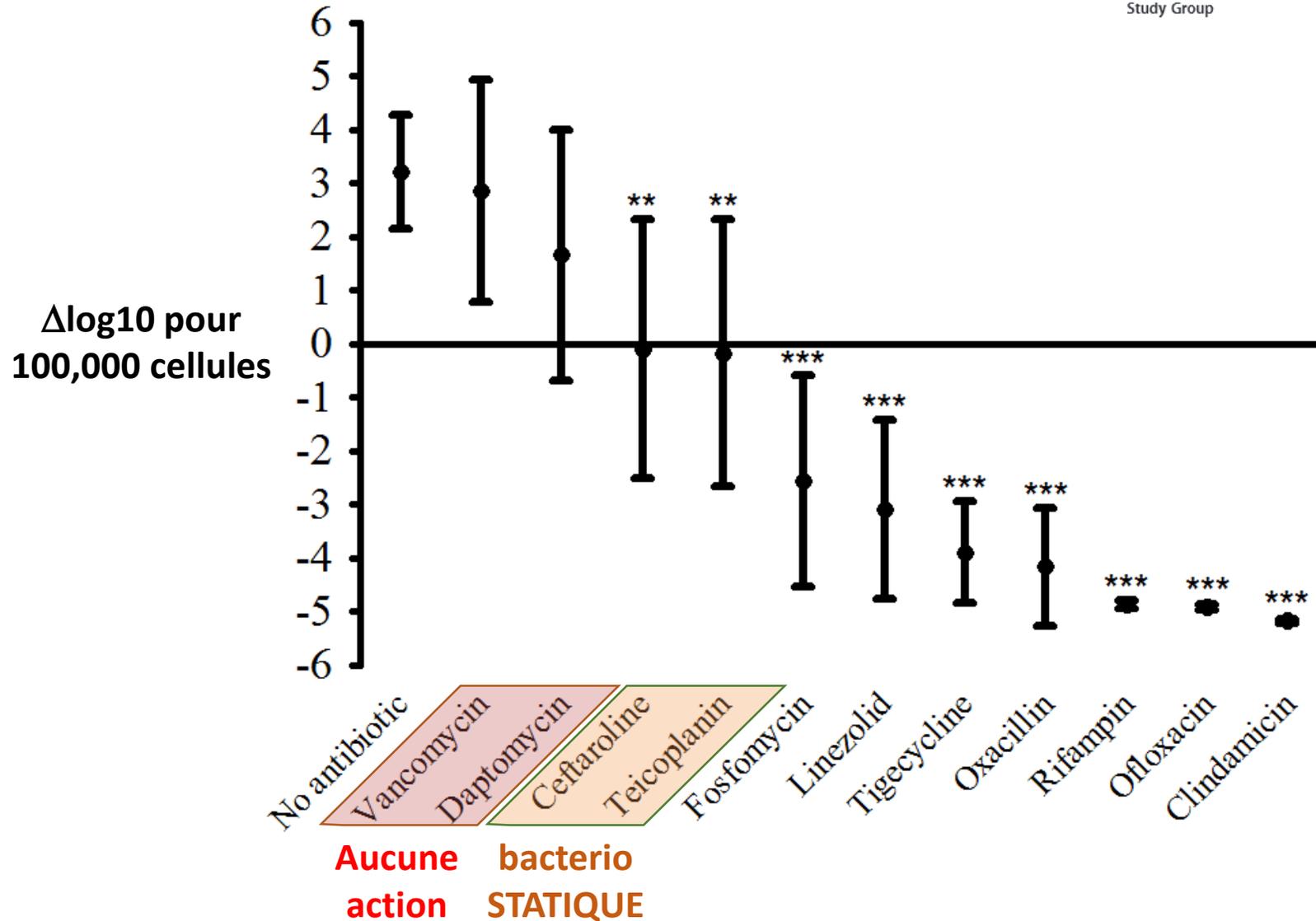
Importance de la localisation intra-cellulaire

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

Screening

Antimicrobial Activity against Intraosteoblastic *Staphylococcus aureus*

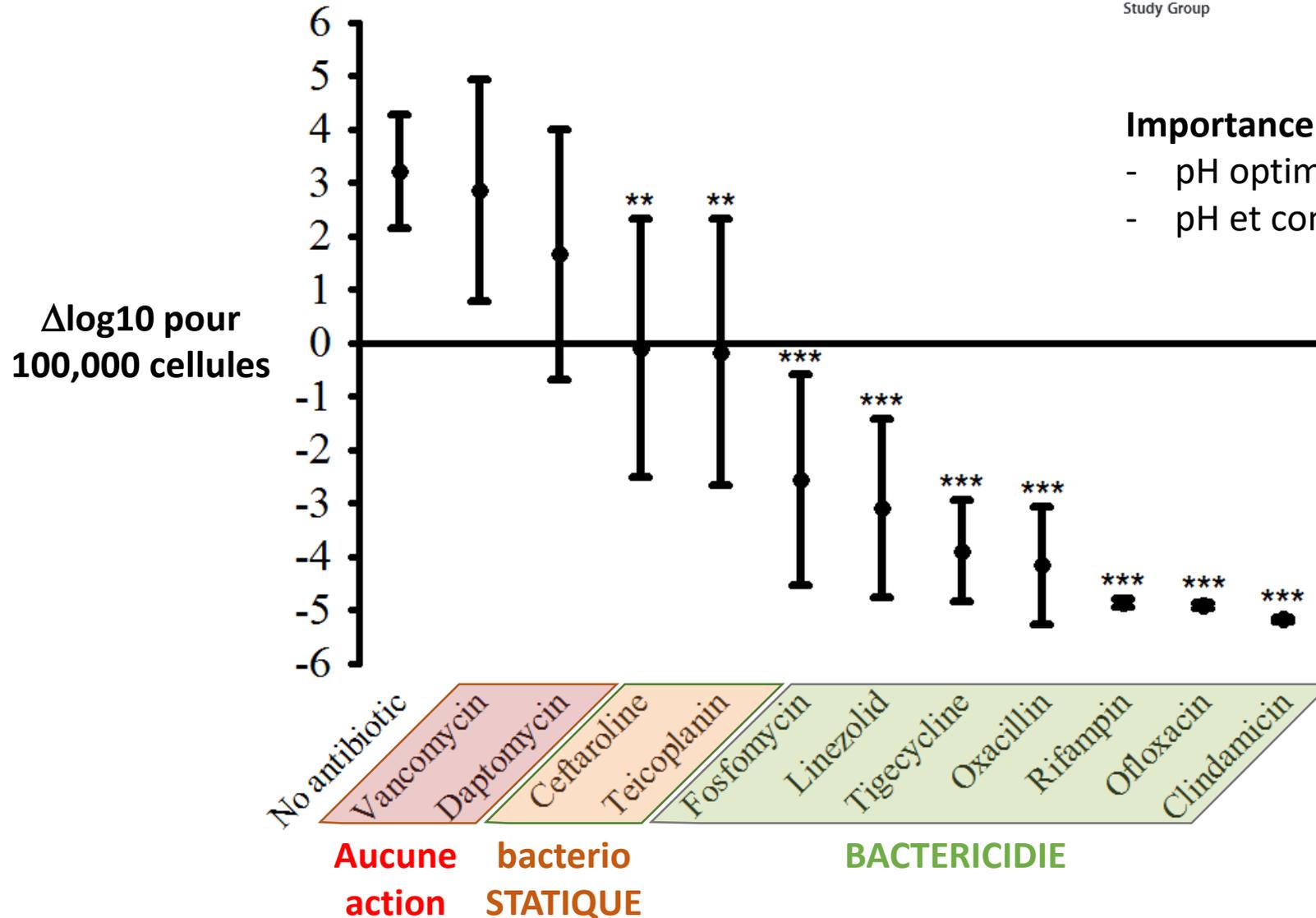
Florent Valour,^{a,b} Sophie Trouillet-Assant,^d Natacha Riffard,^d Jason Tasse,^d Sacha Flammier,^d Jean-Philippe Rasigade,^{b,c} Christian Chidlac,^{a,d} François Vandenesch,^{b,c,d} Tristan Ferry,^{a,b} Frédéric Laurent,^{b,c,d} on behalf of the Lyon Bone and Joint Infection Study Group



Screening

Antimicrobial Activity against Intraosteoblastic *Staphylococcus aureus*

Florent Valour,^{a,b} Sophie Trouillet-Assant,^d Natacha Riffard,^d Jason Tasse,^d Sacha Flammier,^d Jean-Philippe Rasigade,^{b,c} Christian Chidlac,^{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

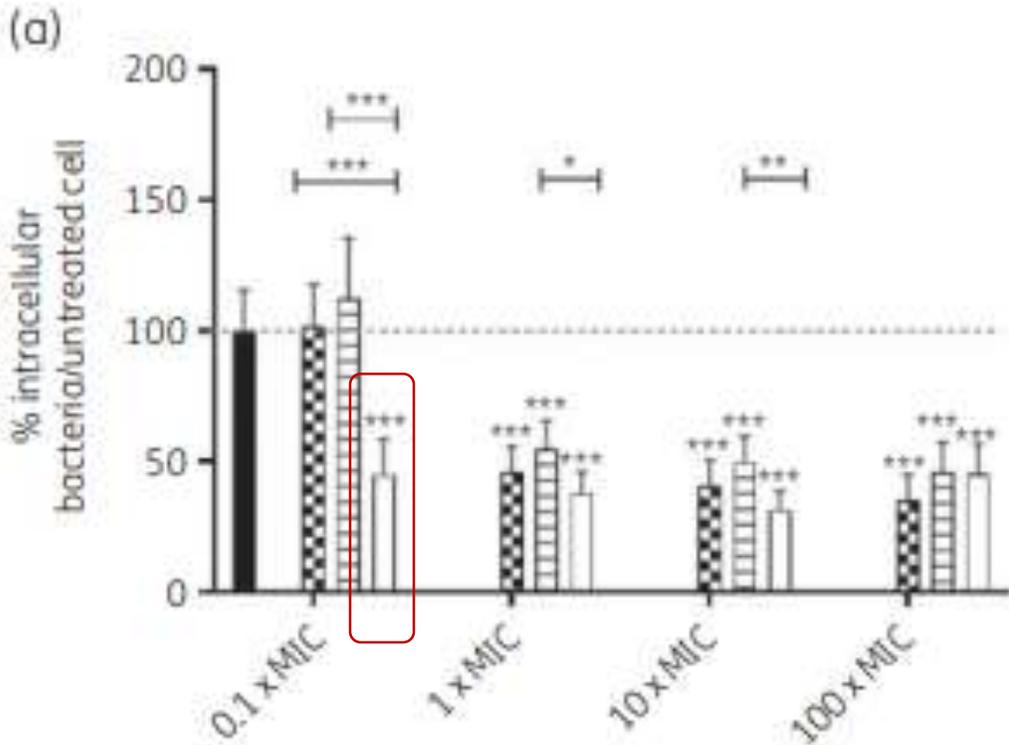


Importance des conditions physico-chimiques

- pH optimal : rifampicine
- pH et conformation PLP : oxacilline

Rifamycines

- Untreated cells
- ▣ Rifampicin
- ▤ Rifapentine
- Rifabutin



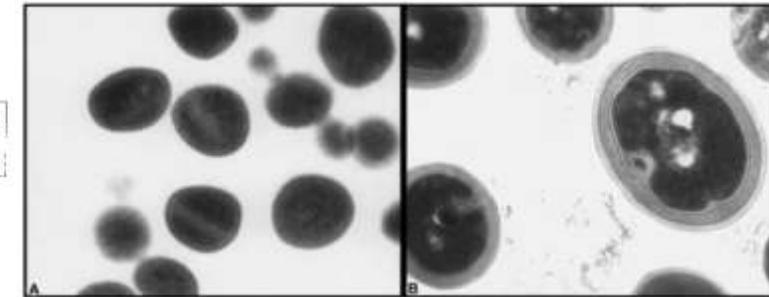
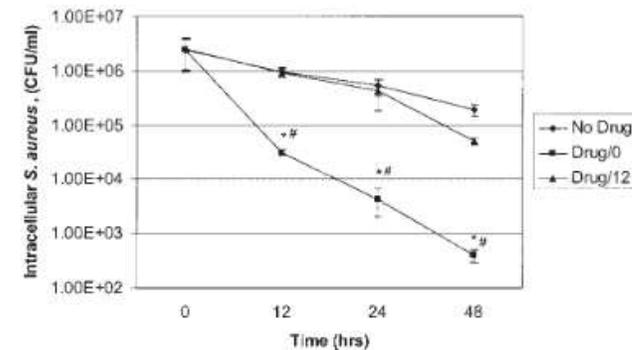
Antibiofilm and intraosteoblastic activities of rifamycins against *Staphylococcus aureus*: promising *in vitro* profile of rifabutin

Lélia Abad¹⁻³, Jérôme Josse¹, Jason Tasse¹, Sébastien Lustig^{2,4,5}, Tristan Ferry^{1,2,4,6}, Alan Diot¹, Frédéric Laurent^{1-4**†} and Florent Valour^{1,2,4,6†}

- Efficacité temps-dépendante de la rifampicine dans la majorité des modèles, plus controversée dans le modèle « chronique »

Intracellular *Staphylococcus Aureus* and Antibiotic Resistance: Implications for Treatment of Staphylococcal Osteomyelitis

J. Kent Ellington,¹ Mitchel Harris,² Michael C. Hudson,³ Sonia Vishin,³ Lawrence X. Webb,⁴ Robert Sherertz⁵

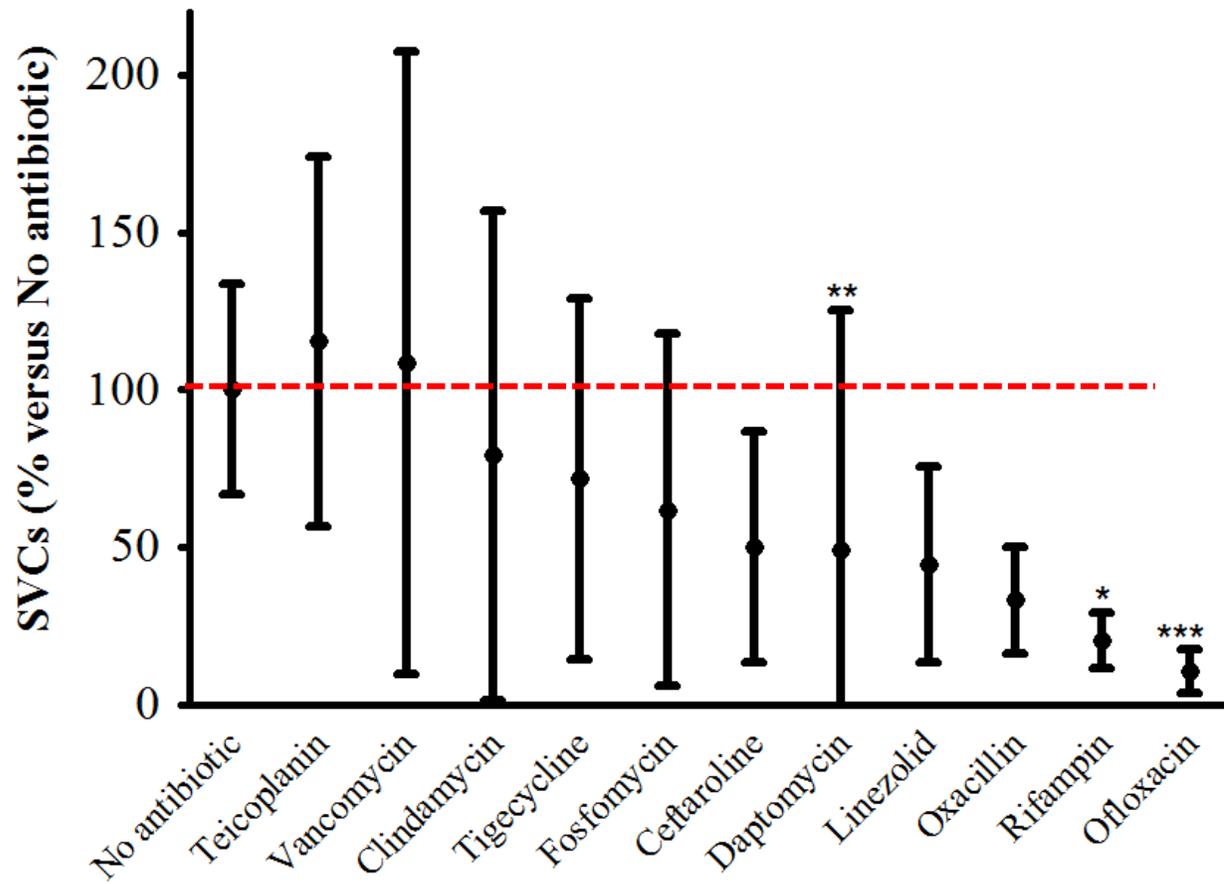


- Place des associations incertaines (efficacité déjà maximale de la rifampicine)
- Potentiel de la rifabutine, efficace dès de très faibles concentration (0,1 MIC)

Tolérance et émergence de SCVs

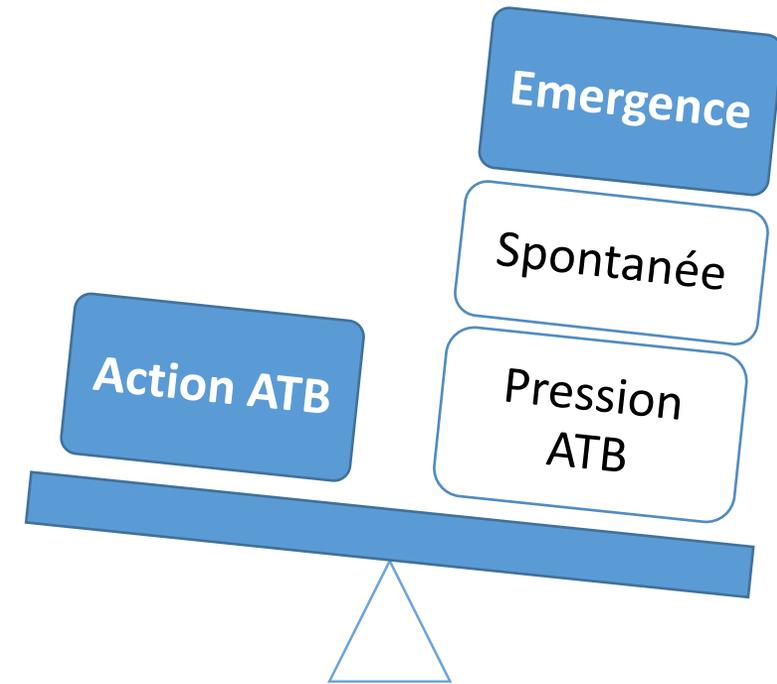
Antimicrobial Activity against Intraosteoblastic *Staphylococcus aureus*

Florent Valour,^{a,b} Sophie Trouillet-Assant,^d Natacha Riffard,^d Jason Tasse,^d Sacha Flammier,^d Jean-Philippe Rasigade,^{b,c} Christian Chidlac,^{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



HG001

Concentration osseuses



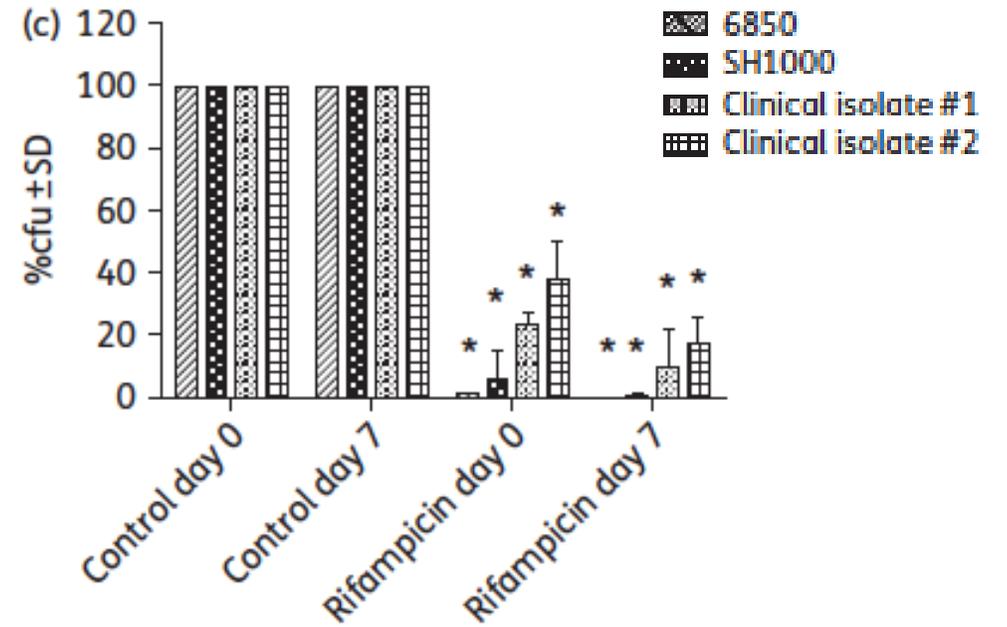
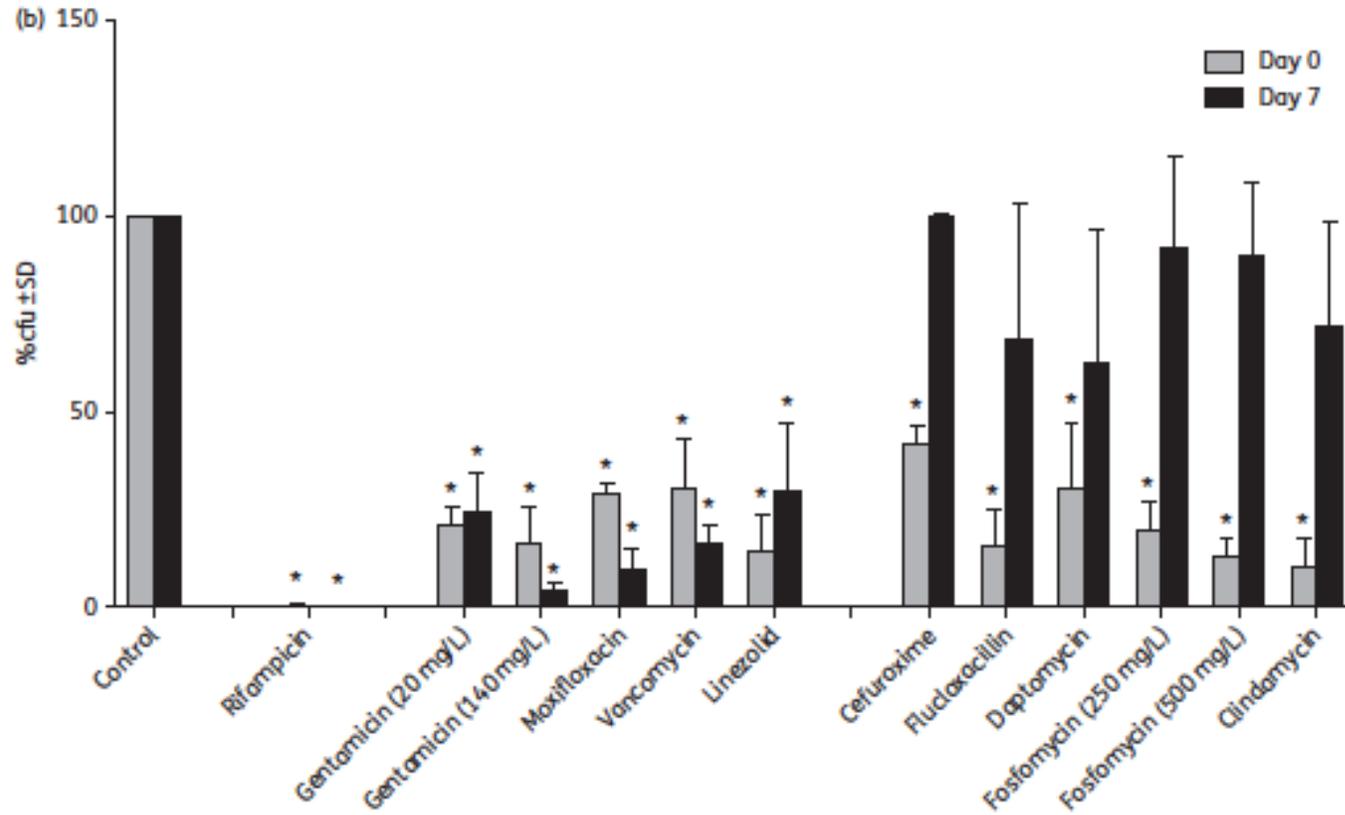
Tolérance et émergence de SCVs

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. Kreis^{2†}, 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}

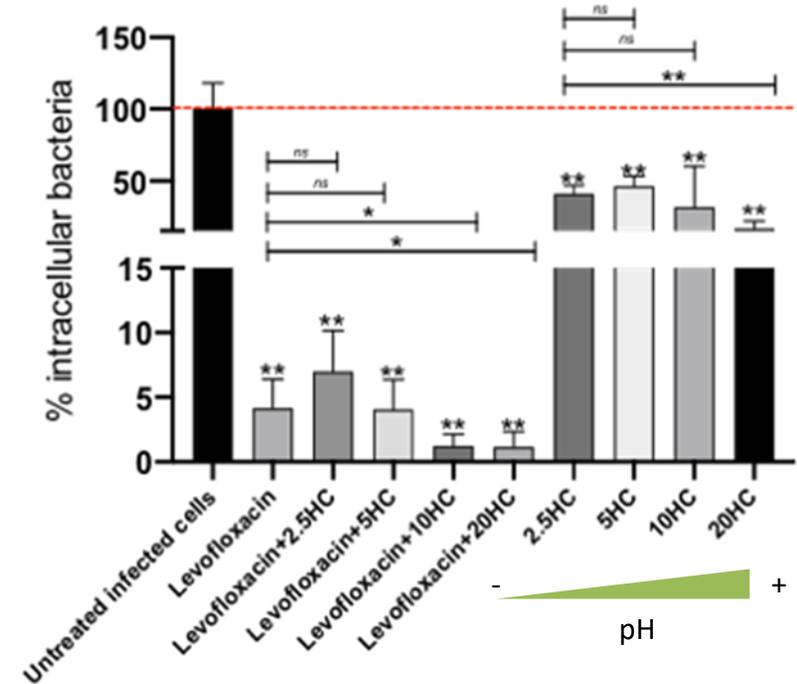
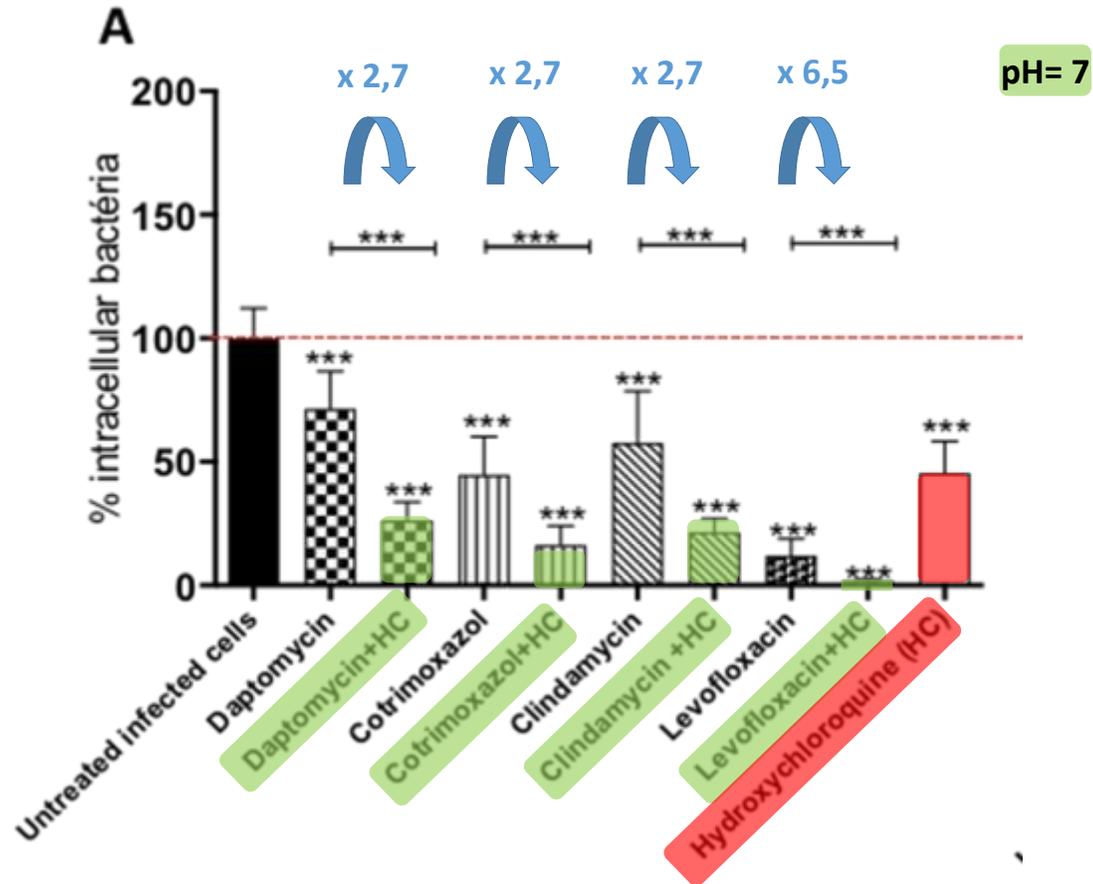


Alcalinisation lysosomale

Lysosomal alkalization to potentiate eradication of intra-osteoblastic *Staphylococcus aureus* in the bone and joint infection setting

Lélia Abad^{1,2,3}, Pierre Chauvelot^{4,5}, Estelle Audoux⁶, Camille Andre^{2,3}, Jérôme Josse^{1,2}, Céline Dupieux^{1,2,3,4}, Sébastien Lustig^{2,4,7}, Tristan Ferry^{1,2,4,5}, Paul O. Verhoeven^{6,8}, Alan Diot¹, Frédéric Laurent^{1,2,3,4,†}, Florent Valour^{1,2,4,5,*,†}

Trois souches poolées

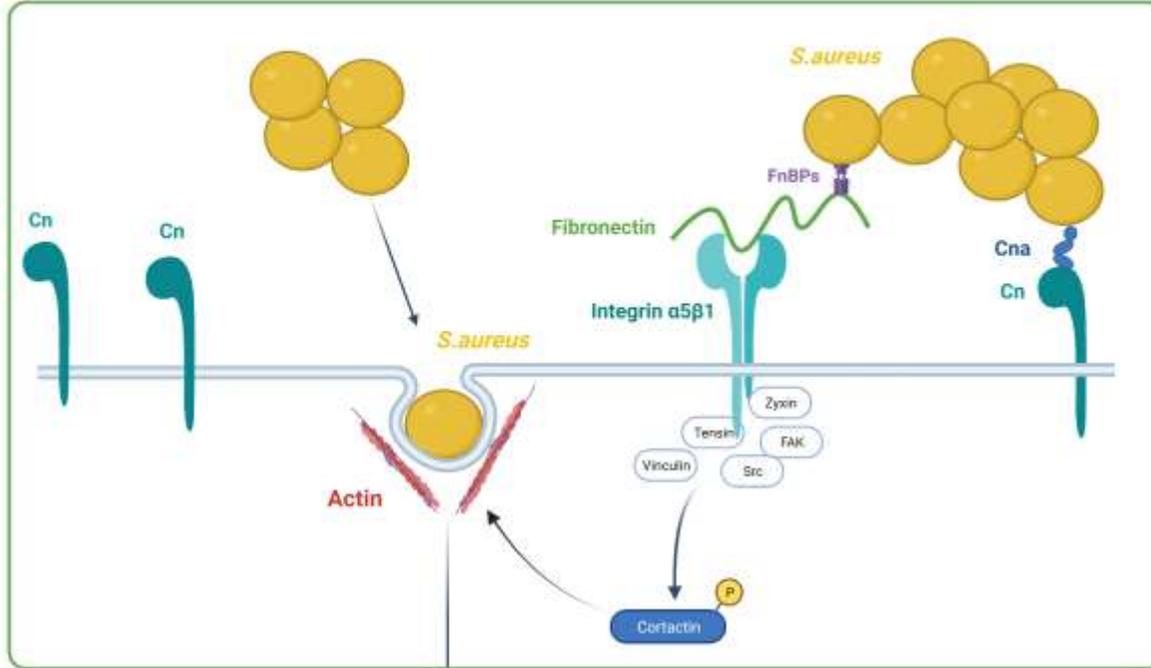


- A partir de 2,5 mg/L, HC augmente le flux autophagique
- A partir de 10 mg/L, HC alcalinise les lysosomes et donc restaure l'activité de certains ATB

Autres approches innovantes

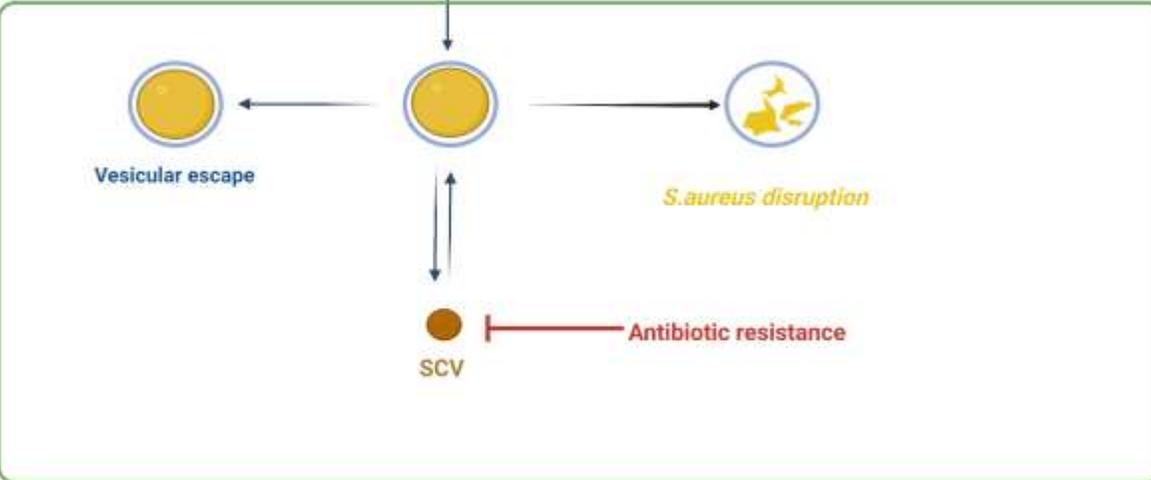
Strategies for prevention and treatment of internalized staphylococcus aureus

Jiangbi Li¹, Qiangqiang Wen², Feng Gu³, Lijuan An⁴, Yu Tiecheng⁵



Phase I-II

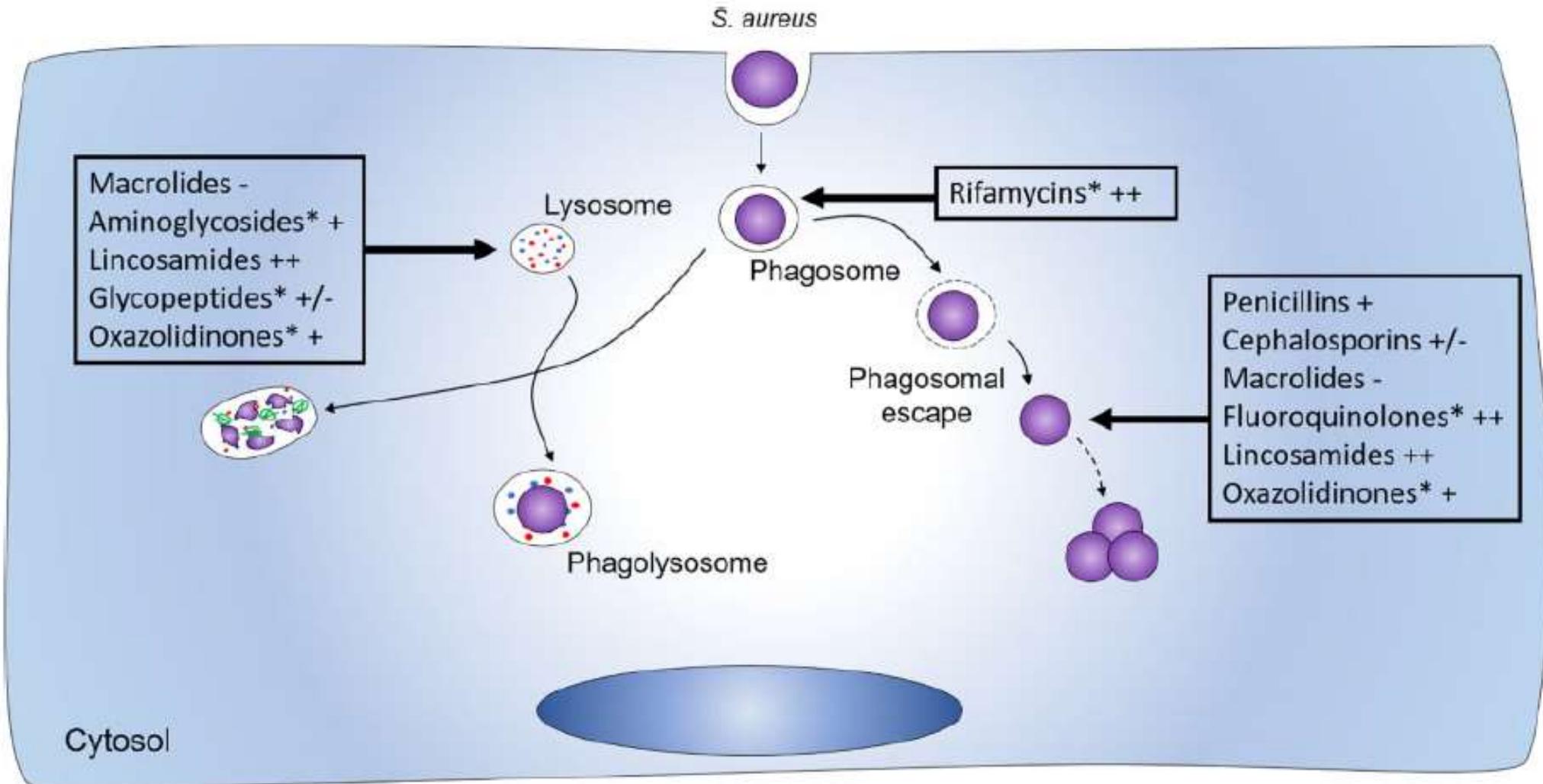
1. Recombinant CWA proteins
2. Microbiological agents



Phase III

1. Drugs inhibiting NF- κ B pathway
2. Nanoparticles
3. Photochemical internalization
4. Cell penetrating peptides
5. Antimicrobial peptides
6. Bacteriophage therapy

Conclusions



- ++ Good activity
- + Moderate activity
- No to low activity
- * Class keeping their activity in the chronic model

***In vitro* antibiotic activity against intraosteoblastic *Staphylococcus aureus*: a narrative review of the literature**

Florian C. Marro^{1,2,3,*†}, Lélia Abad^{1,3,4,†}, Ariel J. Blocker², Frédéric Laurent^{1,3,4,5}, Jérôme Josse^{1,3,5,†} and Florent Valour^{1,3,5,6,†}

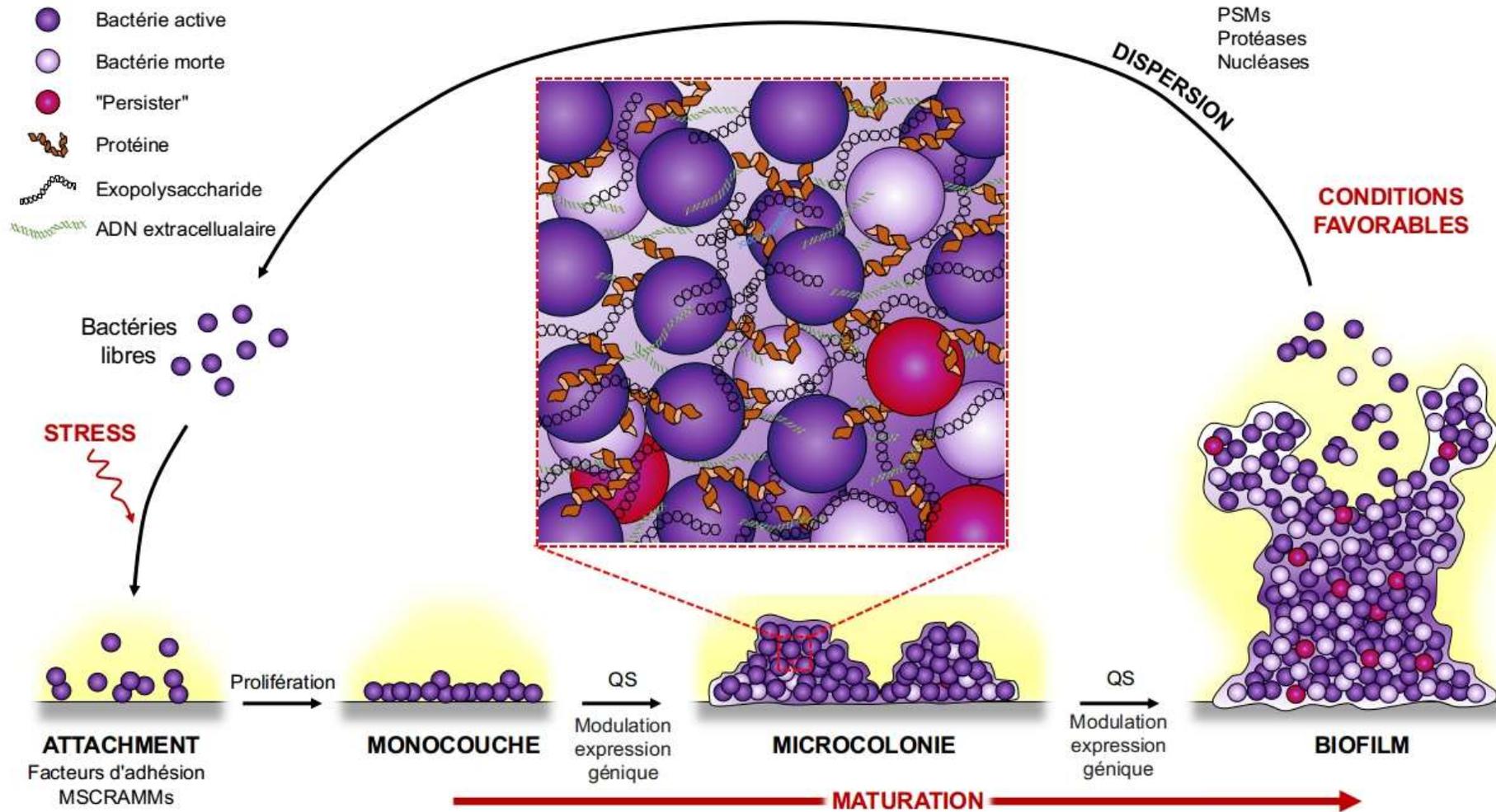
REVIEW ARTICLE **OPEN**

Can intracellular *Staphylococcus aureus* in osteomyelitis be treated using current antibiotics? A systematic review and narrative synthesis

Anja R. Zelmer¹, Renjy Nelson^{2,3}, Katharina Richter⁴ and Gerald J. Atkins¹ 

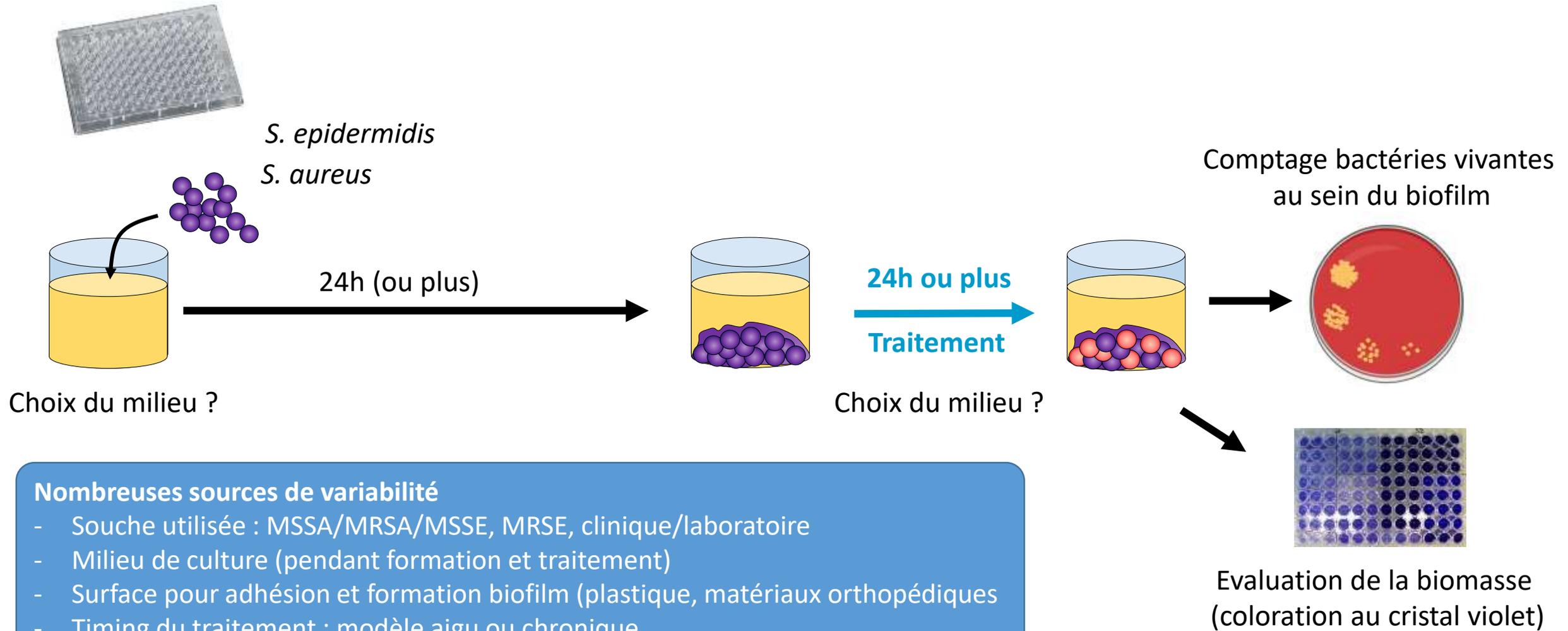
Antibiothérapie anti-biofilm

Rappel Biofilm



Biofilm = population bactérienne hétérogène + matrice extracellulaire (slime)

Modèle d'étude



Nombreuses sources de variabilité

- Souche utilisée : MSSA/MRSA/MSSE, MRSE, clinique/laboratoire
- Milieu de culture (pendant formation et traitement)
- Surface pour adhésion et formation biofilm (plastique, matériaux orthopédiques)
- Timing du traitement : modèle aigu ou chronique
- Dose d'antibiotique : multiple CMI, concentration osseuse
- Modèle statique ou dynamique (flow cell)

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

Rifamycines

Antibiofilm and intraosteoblastic activities of rifamycins against *Staphylococcus aureus*: promising *in vitro* profile of rifabutin

Lélia Abad¹⁻³, Jérôme Josse¹, Jason Tasse¹, Sébastien Lustig^{2,4,5}, Tristan Ferry^{1,2,4,6}, Alan Diot¹, Frédéric Laurent^{1-4*}† and Florent Valour^{1,2,4,6†}

Méthode Biofilm Ring Test
(prévention formation du biofilm)

Table 1. Rifamycin MIC, bMIC and MBEC₉₀ for the three *S. aureus* isolates tested

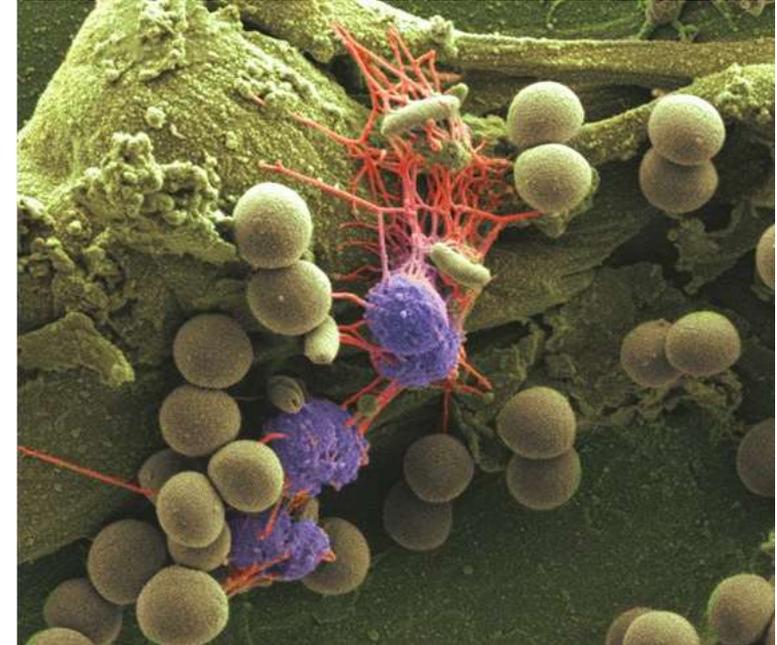
Isolate	MIC (mg/L)			bMIC (mg/L)			MBEC ₉₀ (mg/L)		
	rifampicin	rifapentine	rifabutin	rifampicin	rifapentine	rifabutin	rifampicin	rifapentine	rifabutin
6850	0.016	0.062	0.031	0.05	0.1	0.05	50	0.39	0.19
Clinical isolate 1	0.008	0.031	0.031	0.0125	0.0125	0.025	3.125	0.78	0.19
Clinical isolate 2	0.031	0.062	0.062	0.025	0.05	0.05	>100	0.19	0.78

MIC indicates the lowest concentration that prevented growth of planktonic bacteria, determined by the microdilution method; bMIC indicates the lowest concentration of antibiotics required to prevent biofilm formation, determined using AntibiofilmogramTM;³¹ MBEC₉₀ indicates the concentration of antibiotic (mg/L) that resulted in the reduction of viable bacteria by $\geq 90\%$ compared with the control untreated group 24 h post-treatment.

**Rifapentine et rifabutine plus efficace que rifampicine
contre biofilm à *S. aureus in vitro***

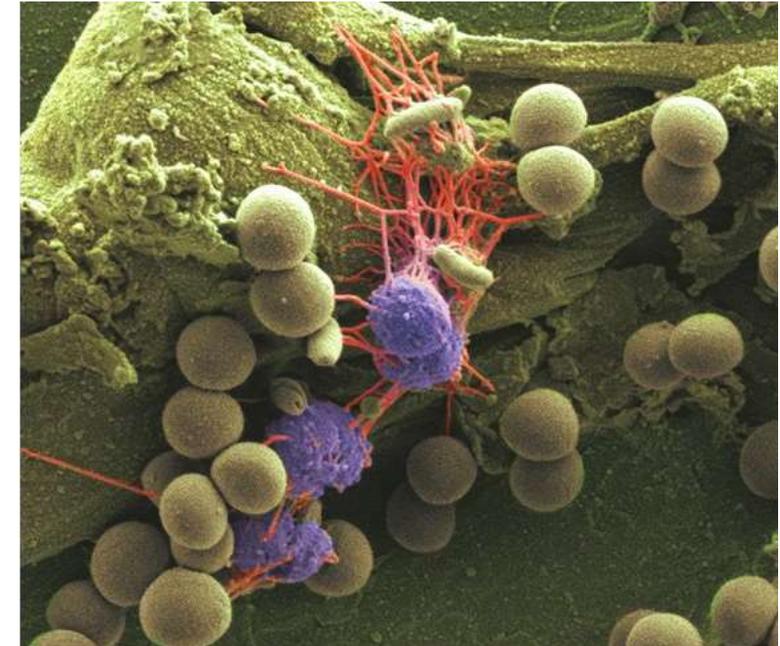
Mécanisme de tolérance aux antibiotiques

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



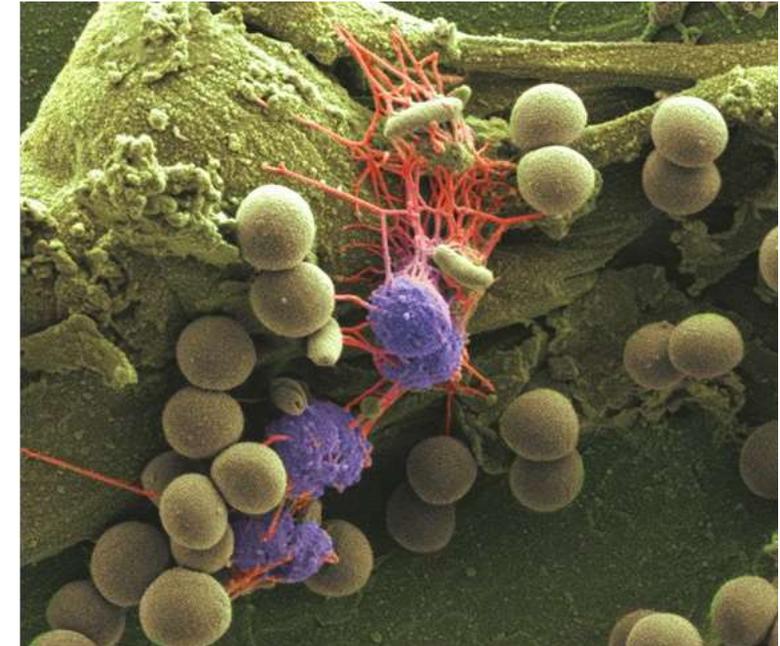
Mécanisme de tolérance aux antibiotiques

- 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



Mécanisme de tolérance aux antibiotiques

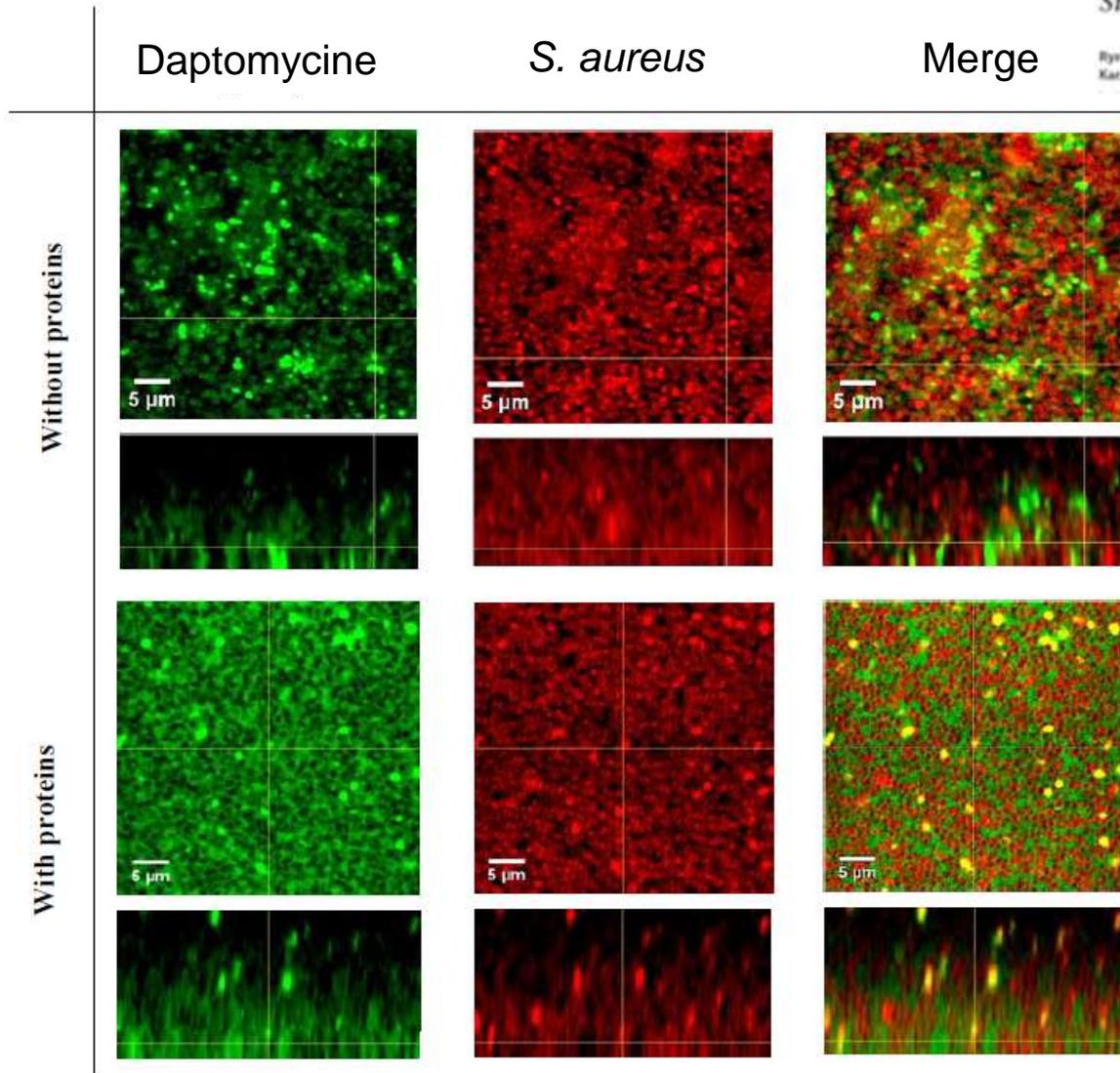
- **Pénétration des antibiotiques**
- Rôle des composants de la matrice extracellulaire
 - Polysaccharides
 - **eDNA**
- Enzymes présentes dans la matrice (β -lactamases)
- **Hétérogénéité, hypoxie et croissance ralentie**
- **Réponse oxydative**
- **Limitation nutritionnelle et réponse stringente**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



Biofilm et pénétration de la daptomycine

New Insight into Daptomycin Bioavailability and Localization in *Staphylococcus aureus* Biofilms by Dynamic Fluorescence Imaging

Rym Boudjema,^a Romain Briandet,^b Matthieu Revest,^{c,d} Cedric Jacqueline,^d Jocelyne Caillon,^e Marie-Pierre Fontaine-Aupart,^a Karine Steenkiste^a



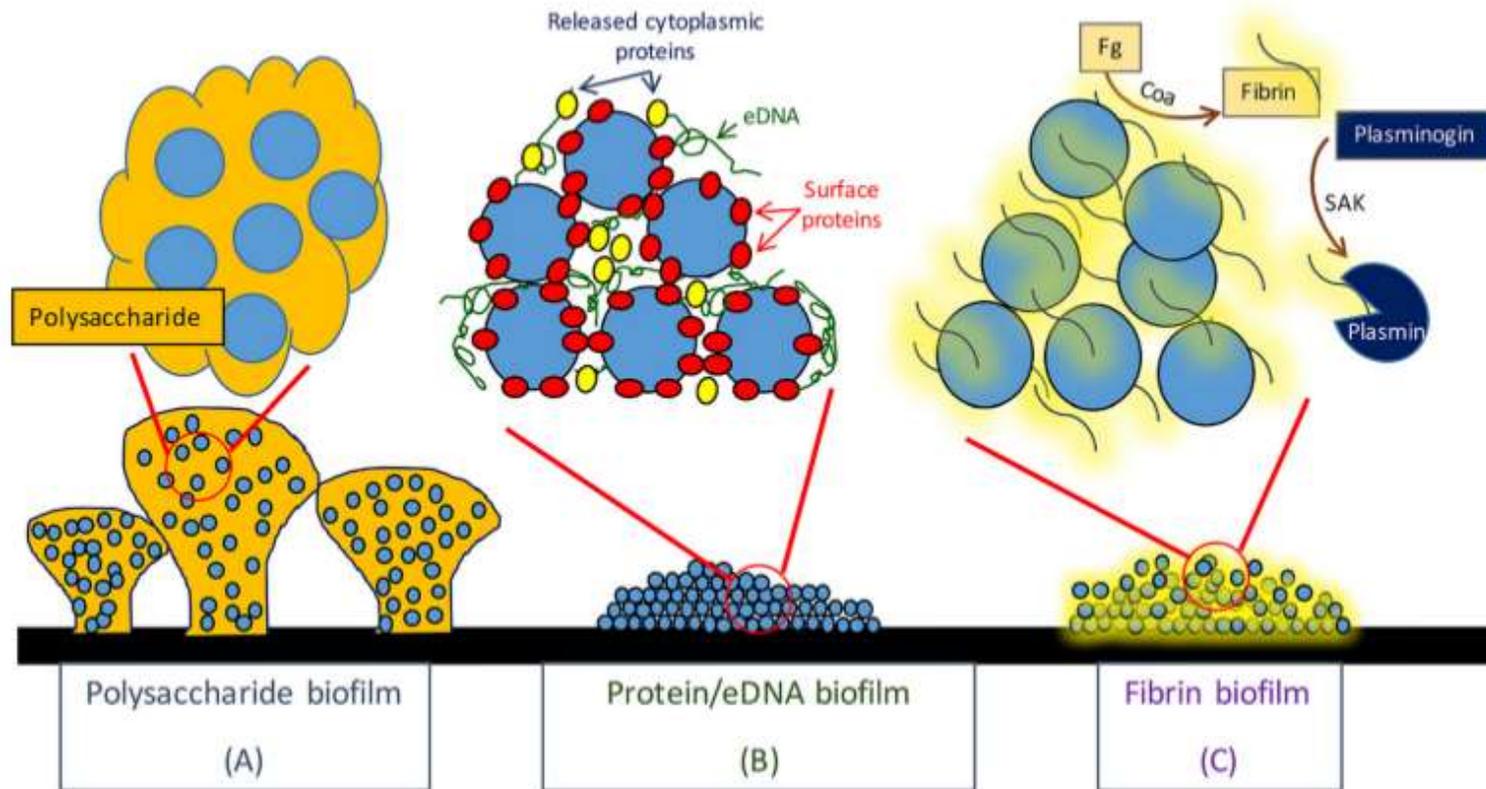
La daptomycine peut pénétrer dans le biofilm mais ne l'éradique pas !

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

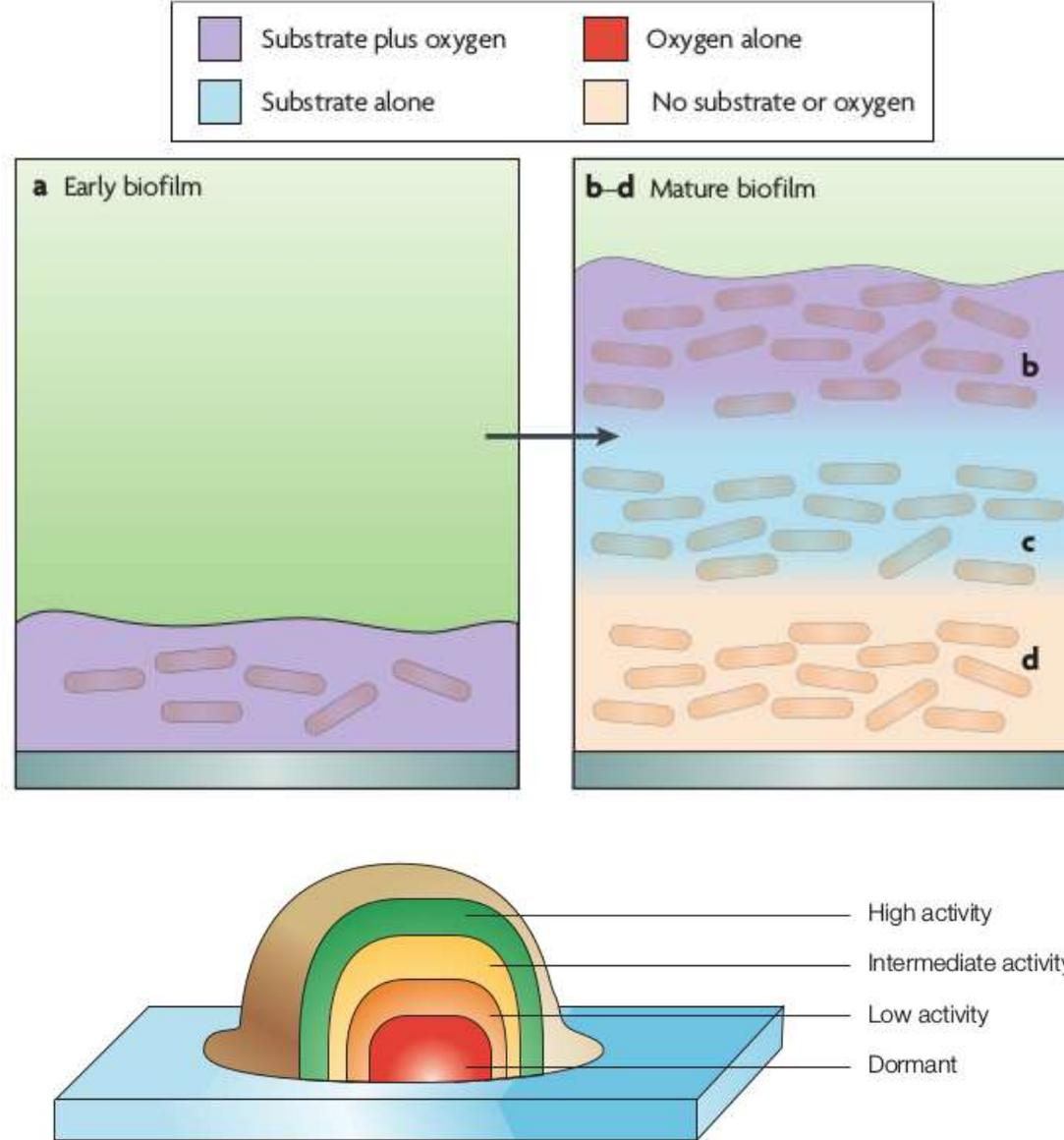
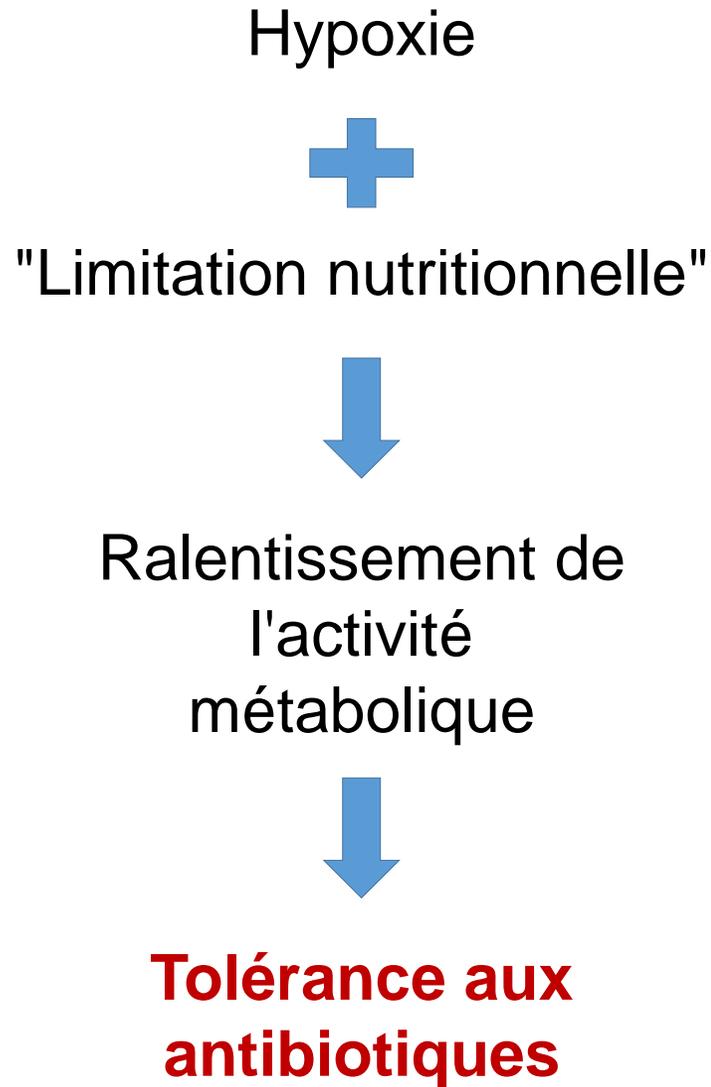


Acidification de microenvironnement par l'eDNA



Inactivation des antibiotiques

Biofilm et activité métabolique bactérienne



Antibiogramme anti-biofilm en pratique clinique

Clinical Microbiology and Infection 24 (2018) 570–572



Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Microbiology and Infection

Journal homepage: www.clinicalmicrobiologyandinfection.com



Commentary

Should standardized susceptibility testing for microbial biofilms be introduced in clinical practice?

T. Coenye^{1,2,*}, D. Goeres³, F. Van Bambeke^{4,5}, T. Bjarnsholt^{2,6}



Standardized biofilm models **more predictive** than planktonic cultures viz.

- Antibiotic activity against sessile bacteria
- Resistance and tolerance mechanisms in biofilms

Possible applications

- Drug/device registration
- Drug/device comparisons
- Support to move forward with a clinical trial
- Basic biology of biofilms



Data interpretation with **caution** due to *in vitro/in vivo* differences in biofilm biology

Modulation of drug activity by PK/PD parameters, host (e.g. immune response, host tissue) and environmental factors (e.g. oxygen, nutrients)



Not predictive of clinical success due to differences in

- Underlying biofilm biology
- Environment (flow, shear stress)
- Matrix composition
- Interplay with host

PK/PD issues limiting applicability

- Access of drugs to biofilms in deep tissues
- Effective antibiotic concentration not achievable
- Drug tolerant phenotypes

Take-home messages



Synthèse

Persistance intracellulaire

- prédiction d'efficacité complexe : diffusion (sub)cellulaire, conditions physicochimiques locales ...
- Rifamycines (dont rifabutine) +++, fluoroquinolones (et clindamycine)
- Impact clinique incertain

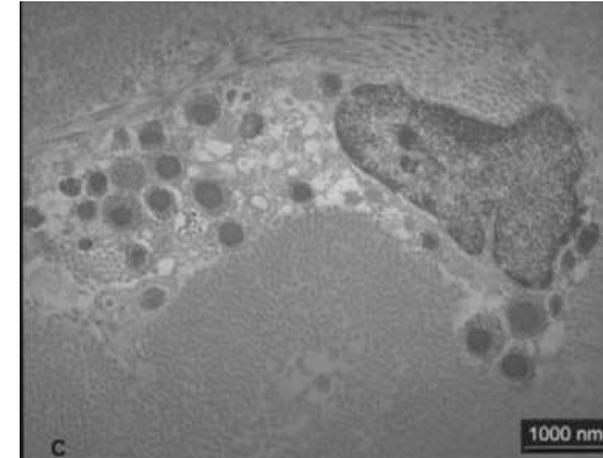
Biofilm

- 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

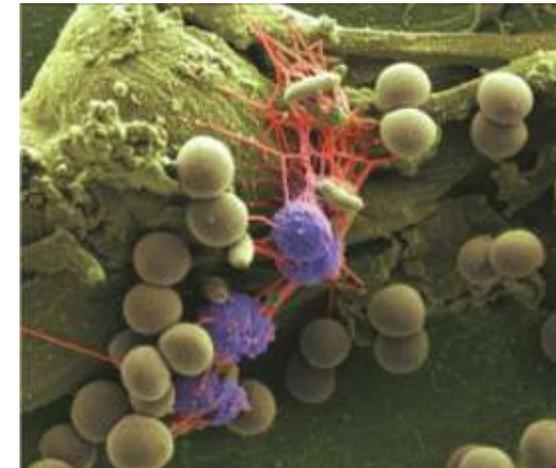
Similarité entre persistance intracellulaire et biofilm

Sanctuarisation de la bactérie et switch vers la chronicité

ex : SCV/persister



Sendi et al., 2006



J. Tasse, HCL, 2017