



**HAL**  
open science

# Development of analytical methods for the quantification of amoxicillin in human plasma and for the determination of Minimal Biofilm Eradication Concentration and Biofilm Prevention Concentration

Céline Reynaud

► **To cite this version:**

Céline Reynaud. Development of analytical methods for the quantification of amoxicillin in human plasma and for the determination of Minimal Biofilm Eradication Concentration and Biofilm Prevention Concentration. Pharmaceutical sciences. 2019. dumas-02193016

**HAL Id: dumas-02193016**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02193016>**

Submitted on 24 Jul 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :  
[bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr](mailto:bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Année : 2019

**MISE AU POINT DE METHODES ANALYTIQUES POUR QUANTIFIER  
L'AMOXICILLINE DANS LE PLASMA HUMAIN, ET DETERMINER LES  
CONCENTRATIONS MINIMALES D'ERADICATION DU BIOFILM ET LES  
CONCENTRATIONS DE PREVENTION DE FORMATION DU BIOFILM**

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE  
BIOLOGIE MÉDICALE

Conformément aux dispositions du décret N° 90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de

THÈSE  
PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE  
DIPLÔME D'ÉTAT

Céline Reynaud

[Données à caractère personnel]

MÉMOIRE SOUTENU PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE  
GRENOBLE

Le : 05/07/2019

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Présidente du jury :

Madame La Professeure CORNET Muriel

Membres :

Madame Le Docteur BOISSET Sandrine (directrice de thèse)

Madame La Professeure STANKE Françoise (co-directrice de thèse)

Monsieur Le Professeur MAURIN Max

Monsieur Le Professeur EPAULARD Olivier

*L'UFR de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les mémoires ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.*

Doyen de la Faculté : **M. le Pr. Michel SEVE**

Vice-doyen et Directrice des Etudes :  
**Mme Christine DEMEILLIERS**

**Année 2018 – 2019**

**ENSEIGNANTS – ENSEIGNANTS/CHERCHEURS  
HDR et ou Pharmaciens**

<b>Statut</b>	<b>Nom</b>	<b>Prénom</b>	<b>Laboratoire</b>	<b>Pharmacien</b>	<b>HDR</b>
MCF	ALDEBERT	DELPHINE	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525, TheREx	oui	oui
PU-PH	ALLENET	BENOIT	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525, TheMAS	oui	oui
PU	BAKRI	ABDELAZIZ	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525	oui	oui
MAST	BARDET	JEAN-DIDIER	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525, TheMAS	oui	non
MCF	BATANDIER	CECILE	LBFA – INSERM U1055	oui	non
PU-PH	BEDOUCHE	PIERRICK	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525, TheMAS	oui	oui
MCF	BELAIDI-CORSAT	ELISE	HP2, Inserm U1042	non	oui
MAST	BELLET	BEATRICE	-	oui	non
MCF	BOUCHERLE	BENJAMIN	DPM - UMR CNRS 5063	oui	non
PU	BOUMENDJEL	AHCENE	DPM – UMR CNRS 5063	non	oui
MCF	BOURGOIN	SANDRINE	IAB – CRI INSERM U823	non	non
MCF	BRETON	JEAN	LCIB – UMR CEA E3	oui	oui
MCF	BRIANCON-MARJOLLET	ANNE	HP2 – INSERM U1042	non	non
PU	BURMEISTER	WILHEM	UVHCI- UMI 3265 EMBL CNRS	non	oui
MCU-PH	BUSSER	BENOIT	Institute for Advanced Biosciences, UGA / Inserm U 1209 / CNRS 5309	oui	oui
Professeur Emerite	CALOP	JEAN	-	oui	oui
MCF	CAVAILLES	PIERRE	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525	non	non
MCU-PH	CHANOINE	SEBASTIEN	CR UGA - INSERM U1209 - CNRS 5309	oui	non
MCF	CHOISNARD	LUC	DPM – UMR CNRS 5063	non	non
AHU	CHOVELON	BENOIT	DPM – UMR CNRS 5063	oui	non
PU-PH	CORNET	MURIEL	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525 TheREx	non	oui
Professeur Emérite	DANEL	VINCENT		non	oui
PU	DECOUT	JEAN-LUC	DPM – UMR CNRS 5063	non	oui
MCF Emérite	DELETRAZ-DELPORTE	MARTINE	LPSS – EAM 4129 LYON	oui	oui
MCF	DEMEILLIERS	CHRISTINE	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525	non	oui
PU-PH	DROUET	CHRISTIAN	GREPI EA7408	oui	oui
PU	DROUET	EMMANUEL	IBS – UMR 5075 CEA CNRS HIV & virus persistants Institut de Biologie Structurale	oui	oui
MCF	DURMORT	CLAIRE	IBS – UMR CEA CNRS 5075	non	oui
PU-PH	FAURE	PATRICE	HP2 – INSERM U1042	non	oui

MCF	FAURE-JOYEUX	MARIE	HP2 – INSERM U1042	oui	oui
PRCE	FITE	ANDREE	-	non	non
MCU-PH	GARNAUD	CECILE	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525 TheReX	oui	non
PRAG	GAUCHARD	PIERRE- ALEXIS	-	non	non
MCU-PH	GERMI	RAPHAELE	IBS – UMR CEA CNRS 5075 HIV & virus persistants Institut de Biologie Structurale	oui	oui
MCF	GEZE	ANNABELLE	DPM – UMR CNRS 5063	non	oui
MCF	GILLY	CATHERINE	DPM – UMR CNRS 5063	oui	oui
PU	GODIN-RIBUOT	DIANE	HP2 – INSERM U1042	non	oui
MCF	GONINDARD	CHRISTELLE	LECA – UMR CNRS 5553	non	non
Professeure Emérite	GRILLOT	RENEE	-	oui	oui
MCF Emérite	GROSSET	CATHERINE	DPM – UMR CNRS 5063	oui	oui
MCF	GUIEU	VALERIE	DPM – UMR CNRS 5063	non	non
AHU	HENNEBIQUE	AURELIE	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525 TheReX	oui	non
MCF	HININGER- FAVIER	ISABELLE	LBFA – INSERM U1055	oui	oui
MCF	KHALEF	NAWEL	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525	non	non
MCF	KOTZKI	SYLVAIN	HP2 – UMR S1042	oui	non
MCF	KRIVOBOK	SERGE	DPM – UMR CNRS 5063	oui	oui
PU	LENORMAND	JEAN-LUC	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525 TheReX	non	oui
PU	MARTIN	DONALD	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525	non	oui
PRCE	MATTHYS	LAURENCE	-	non	non
AHU	MAZET	ROSELINE	DPM – UMR CNRS 5063	oui	non
AHU	MINOVES	MELANIE	HP2 – INSERM U1042	oui	non
PU	MOINARD	CHRISTOPHE	LBFA - INSERM U1055	non	oui
PU-PH	MOSSUZ	PASCAL	IAB – INSERM U1209	non	oui
MCF	MOUHAMADOU	BELLO	LECA – UMR CNRS 5553	non	oui
MCF	NICOLLE	EDWIGE	DPM – UMR CNRS 5063	oui	oui
MCF	OUKACINE	FARID	DPM – UMR CNRS 5063	non	non
MCF	PERES	BASILE	DPM – UMR CNRS 5063	non	oui
MCF	PEUCHMAUR	MARINE	DPM – UMR CNRS 5063	non	oui
PU	PEYRIN	ERIC	DPM – UMR CNRS 5063	oui	oui
AHU	PLUCHART	HELENE	TIMC-IMAG – UMR CNRS 5525 THEMAS	oui	non
MCF	RACHIDI	WALID	LCIB – UMR E3 CEA	non	oui
MCF	RAVELET	CORINNE	DPM – UMR CNRS 5063	non	oui
PU	RIBUOT	CHRISTOPHE	HP2 – INSERM U1042	oui	oui
PU-PH	SEVE	MICHEL	LBFA – INSERM U1055	oui	oui
MCF	SOUARD	FLORENCE	DPM – UMR CNRS 5063	oui	non
MCF	SPANNO	MONIQUE	IBS – UMR CEA CNRS 5075	non	oui
MCF	TARBOURIECH	NICOLAS	IBS – UMR CEA CNRS 5075	non	oui
MCF	VANHAVERBEKE	CECILE	DPM – UMR CNRS 5063	non	non
PU	WOUESSIDJEW	DENIS	DPM – UMR CNRS 5063	oui	oui

**AHU** : Assistant Hospitalo-Universitaire

**ATER** : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches

**BCI** : Biologie du Cancer et de l'Infection

**CHU** : Centre Hospitalier Universitaire

**CIB** : Centre d'Innovation en Biologie

**CRI** : Centre de Recherche INSERM  
**CNRS** : Centre National de Recherche Scientifique  
**DCE** : Doctorants Contractuels Enseignement  
**DPM** : Département de Pharmacochimie Moléculaire  
**HP2** : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire  
**IAB** : Institute for Advanced Biosciences  
**IBS** : Institut de Biologie Structurale  
**LAPM** : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes  
**LBFA** : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée  
**LCBM** : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux  
**LCIB** : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie  
**LECA** : Laboratoire d'Ecologie Alpine  
**LPSS** : Laboratoire Parcours Santé Systémique  
**LR** : Laboratoire des Radio pharmaceutiques  
**MAST** : Maître de Conférences Associé à Temps Partiel  
**MCF** : Maître de Conférences des Universités  
**MCU-PH** : Maître de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers  
**PAST** : Professeur Associé à Temps Partiel  
**PRAG** : Professeur Agrégé  
**PRCE** : Professeur certifié affecté dans l'enseignement  
**PU** : Professeur des Universités  
**PU-PH** : Professeur des Universités et Praticiens Hospitaliers  
**SyMMES** : Systèmes Moléculaires et nanoMatériaux pour l'Energie et la Santé  
**TIMC-IMAG** : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation  
**UMR**: Unité Mixte de Recherche  
**UVHCI**: Unit of Virus Host Cell Interactions

*A mes parents,*

*A Mike,*

## Remerciements

### Aux membres du jury

A Madame la Professeure Muriel Cornet, pour me faire l'honneur de présider mon jury de thèse. Merci de votre investissement dans notre formation et de toutes les connaissances que vous m'avez apportées au cours de mon cursus de pharmacie.

A Madame le Docteur Sandrine Boisset, pour avoir accepté le co-encadrement de mon master 2 puis de ma thèse. Merci pour tous vos précieux conseils et votre porte toujours ouverte pour mes questions. Je vous remercie de m'avoir initiée au monde de la recherche. De manière plus globale, je vous remercie pour votre investissement dans la formation des internes.

A Madame la Professeure Françoise Stanke, pour avoir accepté de co-encadrer mon master 2 puis ma thèse. Je vous remercie pour votre accueil dans le service de pharmacologie, pour votre disponibilité ainsi que tous vos conseils avisés qui m'ont permis de progresser tant dans mon travail de routine que dans la recherche.

A Monsieur le Professeur Max Maurin, pour avoir accepté de juger ce travail. Je vous remercie pour votre accueil dans le service de bactériologie ainsi que vos conseils dans mon travail de recherche.

A Monsieur le Professeur Olivier Epaulard, pour avoir accepté de juger ce travail et permis le recrutement de patients pour l'étude. Je vous remercie pour votre soutien dans ce projet ainsi que pour les connaissances que vous m'avez apportées en staff et DU.



### **Merci à tous ceux qui ont contribué à ma formation et ce travail**

A l'ensemble des techniciens que j'ai croisé pendant mon internat et qui m'ont appris la partie technique de ce métier.

Merci aux techniciens de bactériologie et de pharmacologie pour votre aide sur mon master 2, ma thèse et bien entendu, pour tout ce que vous faites pour la routine.

A Jean-François Jourdil, pour m'avoir encadrée et appris les bases de la spectrométrie de masse.

A Julien Peyroux, merci pour ton aide et tous tes petits « trucs et astuces » de recherche. Merci aussi pour les moments plus tranquilles en mode karaoké. Je te souhaite le meilleur pour la suite.

A Emmanuelle Caspar, pour ton sérieux et ta méthodologie. Je te remercie pour ton implication dans ce travail.

Merci aux biologistes et aux techniciens d'Annecy pour votre accueil lors de mes 2 stages et pour tout ce que vous m'avez appris.

Merci à l'ensemble des biologistes, en particulier aux biologistes de bactériologie, que j'ai pu côtoyer au long de ces 5 années. Merci de m'avoir donné envie de suivre vos parcours

A Chrystel et Laurence, merci pour votre soutien, vos conseils et les moments plus légers du vendredi.

.

## A mes proches :

A mes amies d'enfance, Sophie et Claire. C'est toujours avec joie que je vous retrouve pour un repas, une après-midi copines ou une coinche.

A mes amies de lycée, Angélique et Sandra. La vie fait que nous nous voyons moins souvent mais le principal est que lorsque l'on se retrouve, ce soit toujours avec autant de joie et de rire.

A mes amis rencontrés à la fac, Pauline, Michou, Joss, Doudou, Kéké, Laure, Xav', Sylvain, Bastoun, Thom, Anais. Grâce à vous, ces années sont passées à la vitesse de l'éclair et je n'en garde que des souvenirs mémorables.

A ma Lauratatouille et ma Anne-Soso, pour nos soirées de fac puis nos soirées plus tranquilles mais toujours aussi cultes que ce soit sur le plan culinaire (« Des sushis »), musical (« ...ta belette ») ou de papottage. Merci d'être là, d'être vous, je vous adore les louloutes.

A la « love promo », VTH (dit Ronchonchon), Simon (dit Sinus), Benjamin (dit Jean-Jacques), Judith (dit JD Lady), Reza (dit Professeur Arbab/Rezadoudou) et Claire (dit Clairoudou). Merci d'avoir empli ces années d'internat de souvenirs impérissables. J'ai dû mal à imaginer la suite loin de vous mais au final nous nous retrouverons.

A tous les internes que j'ai rencontrés au cours de ces 5 années. Merci d'être comme vous êtes, ne changez pas.

A Aurélie, qui a été ma co-interne puis mon assistante. Merci pour ton aide et ton soutien dans mes moments de doute et merci de m'avoir fait partager ton amour de la bactériologie.

A ma belle-famille, Thierry, Sylvie, Sarah, Alexis, Monique et Roby. Merci pour tous ces bons moments passés ensemble et surtout ceux à venir.

Aux Martin, ma famille de cœur. Merci d'avoir fait de moi la plus fière des marraines. J'ai tant de merveilleux souvenirs avec vous et je sais qu'il y en aura encore beaucoup d'autres.

A mon Pépé Louis et ma Mémé Elise qui ne sont plus parmi nous depuis quelques années mais qui sont pourtant tous les jours avec moi. Pas un jour ne se passe sans qu'une expression, un rire ne vous rappellent à mon souvenir. J'espère que vous êtes fiers de moi comme je suis fière de vous.

A mon Pépé Edmond, parti trop tôt. J'ai grandi dans ton souvenir et tes valeurs et j'en suis fière.

A ma mamie Germaine dit « Ginette », merci pour tous ces beaux souvenirs d'enfance autour d'une tarte, d'un jeu de dames ou encore de cartes. Tu représentes bien le titre de « Mamie ».

A mes cousins, nombreux et dispersés. De l'extérieur, personne ne comprend vraiment qui est qui mais c'est ce que je préfère. Merci de m'avoir fait tourner en bourrique et de m'avoir tant fait rire. Vous êtes mes héros, mes modèles.

Au reste de ma famille, je chérie tous les moments de bonheurs que nous partageons.

A mes parents, Monique et Yves, pour votre indéfectible soutien et votre incommensurable amour. Merci d'avoir été mes piliers dans tous les moments de ma vie. Je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous faites/avez fait pour moi. Je vous aime fort.

A Michael, mon Mike, la Douceur, mon tout. Tu es à mes côtés depuis 7 ans et même les kilomètres n'ont pas eu d'emprise sur nous. Tu es ma boussole (en même temps tu es bien plus du Nord que moi comme on nous l'a fait remarquer^^). Le bonheur d'être de nouveau à tes côtés tous les soirs est indescriptible. J'ai hâte de réaliser nos nouveaux projets. Je t'aime.

## Table des matières

<b>Remerciements .....</b>	<b>6</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>16</b>
<b>2. Utilisation de l'amoxicilline à hautes doses en clinique .....</b>	<b>18</b>
<b>a. Pour quelles pathologies ?.....</b>	<b>18</b>
i. Les endocardites infectieuses (EI) .....	18
ii. Les infections ostéo-articulaires (IOA).....	24
<b>b. Dans quel but ?.....</b>	<b>26</b>
<b>3. Critères intermédiaires biologiques d'efficacité.....</b>	<b>27</b>
<b>a. Le suivi thérapeutique pharmacologique (STP).....</b>	<b>27</b>
<b>b. Action sur le biofilm.....</b>	<b>28</b>
i. Rappel sur le biofilm.....	28
ii. Les outils disponibles pour l'étudier.....	31
• Les modèles <i>in vivo</i> .....	32
• Les modèles <i>ex vivo</i> .....	32
• Les modèles <i>in vitro</i> .....	32
<b>4. Objectifs de l'article .....</b>	<b>34</b>
<b>5. Article.....</b>	<b>36</b>
<b><i>Development of analytical methods for the quantification of amoxicillin in human plasma and for the determination of Minimal Biofilm Eradication Concentration and Biofilm Prevention</i></b>	
<b><i>Concentration .....</i></b>	<b>36</b>
<b><i>Introduction .....</i></b>	<b>36</b>
<b><i>Materials and methods.....</i></b>	<b>37</b>

<b>1. Patients.....</b>	<b>37</b>
<b>2. Sample schedule and conservation.....</b>	<b>38</b>
<b>3. Amoxicillin plasma concentration measure .....</b>	<b>38</b>
1. <i>Preparation of working solutions, calibration standard, and quality control samples .....</i>	38
2. <i>Sample preparation.....</i>	39
3. <i>Method validation .....</i>	41
4. <i>Statistical analysis .....</i>	42
<b>4. Amoxicillin preparation .....</b>	<b>42</b>
<b>5. Strains.....</b>	<b>42</b>
<b>6. E-Test.....</b>	<b>42</b>
<b>7. MBEC and BPC determinations.....</b>	<b>43</b>
1. Biofilm formation on the Calgary Biofilm Device .....	43
2. MBEC determination: susceptibility testing of biofilm cells.....	44
<b>8. Pharmacokinetics determination.....</b>	<b>46</b>
<b>Results.....</b>	<b>47</b>
<b>1. Patients.....</b>	<b>47</b>
<b>2. Amoxicillin dosage.....</b>	<b>49</b>
1. Method validation according to the ISO 15189 standard.....	49
2. Amoxicillin plasma concentration .....	52
<b>3. MIC, MBEC and BPC .....</b>	<b>54</b>
<b>4. Pharmacokinetics parameters .....</b>	<b>56</b>
<b>Discussion.....</b>	<b>58</b>
<b>Objectives.....</b>	<b>58</b>

<b>Amoxicillin dosage.....</b>	<b>58</b>
<b>MIC, MBEC and BPC.....</b>	<b>59</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>64</b>

## Liste des figures

Figure 1 : Infections présentant du biofilm .....	29
Figure 2 : Etapes de formation et de dispersion du biofilm d'après Tremblay <i>et al.</i> (44) .....	30
Figure 3 : Le biofilm comme mode de protection des bactéries d'après Costerton <i>et al.</i> (46).....	31
Figure 1: Flowchart of the methodological procedure for the susceptibility testing of clinical strains in planktonic (MIC) and biofilm mode (MBEC).....	43
Figure 2: Flowchart of the methodological procedure for the BPC determination of clinical strains.....	45
Figure 3: Chromatogram of blank plasmas, amoxicillin calibration C2 level and its IS.....	49
Figure 4: Determination of the specificity of the method .....	51
Figure 5: Passing and Bablock regression and Bland and Altman Diagram .....	51

## Liste des Tableaux

Tableau 1 : Répartitions des micro-organismes responsables d'EI dans une cohorte Française de 497 patients (33).....	19
Tableau 2 : Définitions des critères de Duke modifiés.....	20
Tableau 3 : Critères de Duke modifiés.....	21
Tableau 4 : Traitement proposé des EI d'après Habib <i>et al.</i> (2).....	22
Tableau 5 : Traitement proposé selon la documentation bactériologique.....	22
Tableau 6 : Recommandations de l'HAS (27) dans la prise en charge d'infections sur prothèse de hanche et du genou causées par des Streptocoques.....	26
Table 1: Preparation of the calibration curve (C1 to C6).....	38
Table 2: Preparation of the QC.....	39
Table 3: Cohort description (antibiotic treatment according to the bacterium).....	48
Table 4: Within- and between-day precisions (expressed as coefficient of variation (CV)) and accuracies (expressed as bias) of the LC-MS/MS method.....	50
Table 6: Trough concentration corresponding to the bacterium, the doses and the administration route.....	53
Table 7: MICs, MBEC and BPC determined for the 22 bacteria and CFU per peg.....	54
Table 8: Pharmacokinetics parameters with MIC and MBEC.....	57



## Liste des abréviations

IOA : Infections Ostéo Articulaires

EI : Endocardites Infectieuses

IV : voie Intraveineuse (IV)

STP : Suivi Thérapeutique Pharmacologique

PK/PD : pharmacocinétiques/pharmacodynamiques

HAS : Haute Autorité de Santé

CMEB : Concentration Minimale d'Éradication du Biofilm

CPB : Concentration de Prévention de formation du Biofilm

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

IE: Infective Endocarditis

BJI: bone and joint infections

MIC: Minimal Inhibiting Concentration

MBEC: Minimal Biofilm Eradication Concentration

BPC: Biofilm Preventive Concentration

IQC : Internal Quality Control

MRM : Multiple Reaction Monitoring

IS: Internal Standard

ULOQ : Upper Limit Of Quantification

LLOQ: Lower Limit Of Quantification

AT : Antibiotic

O.D. : Optical Density

## 1. Introduction

L'avènement des antibiotiques a permis un recul de la mortalité imputable aux maladies infectieuses causées par des bactéries. Malgré cette diminution, les maladies infectieuses devraient causer 13 millions de décès en 2050 (1). Outre les problèmes de résistance bactérienne aux antibiotiques, une autre problématique majeure des pays industrialisés concerne des pathologies à morbi-mortalité élevée, nécessitant de fortes doses d'antibiotiques sur de longues durées comme les Infections Ostéo Articulaires (IOA) sur matériel ou chroniques ou les Endocardites Infectieuses (EI). L'amoxicilline est une des  $\beta$ -lactamines les plus employées dans ces infections lorsque les micro-organismes incriminés sont sensibles à celle-ci. Dans un contexte d'EI ou d'IOA, les doses prescrites représentent au moins 4 g par jour et sont administrées sur de longues durées (au minimum 2 semaines) (2–4). Ces antibiothérapies sont généralement débutées par voie Intraveineuse (IV) avant de passer à la voie orale pour des raisons de confort du patient. Les contraintes liées à ces deux types d'infection expliquent l'utilisation massive de l'amoxicilline. En effet, cette molécule possède un spectre large ainsi qu'une relative innocuité. Avec l'émergence de résistances, il est de plus en plus rare de pouvoir traiter un bacille à Gram négatif par de l'amoxicilline en monothérapie. Néanmoins, cette molécule reste active sur de nombreuses bactéries responsables d'EI ou d'IOA (streptocoques, entérocoques, *Cutibacterium acnes*). L'amoxicilline est par ailleurs une molécule qui possède une très bonne biodisponibilité ce qui permet l'administration du traitement *per os* (5). Son innocuité en fait un excellent choix pour des antibiothérapies longues à posologies élevées chez des patients pouvant présenter des comorbidités. En effet, des cas de toxicité sont rapportés dans la littérature (6–8) mais sont caractérisés par des concentrations plasmatiques largement au-dessus des concentrations habituellement considérées comme thérapeutiques.

L'optimisation de l'utilisation d'antibiotiques a pu être grandement facilitée grâce au développement du Suivi Thérapeutique Pharmacologique (STP) (9). Ainsi, les cliniciens peuvent monitorer leurs patients en suivant les paramètres pharmacocinétiques/pharmacodynamiques (PK/PD) de leurs patients. Dans le cadre des EI, les cliniciens ont l'habitude de recourir au STP afin de prévenir une toxicité lors de l'administration de glycopeptides ou d'aminosides (2) et de s'assurer d'une exposition suffisante en antibiotique pour prévenir l'apparition de résistances bactériennes (glycopeptiques). A l'inverse, les recommandations de dosage des concentrations dans le but de déterminer l'efficacité du traitement sont rares. Des recommandations par les Sociétés Françaises de Pharmacologie et de Réanimation sur l'optimisation des  $\beta$ -lactamines en soins critiques ont été publiées en octobre 2018 (10). L'efficacité du traitement est par ailleurs évaluée sur des aspects cliniques et d'imagerie. Peu d'études ont en revanche regardé le lien qu'il pourrait exister entre paramètres PK/PD et échec thérapeutique (11–15). Il semblerait intéressant de regarder le lien entre ces paramètres PK/PD et l'issue clinique d'un traitement par amoxicilline (guérison vs échec) dans le cadre d'EI ou d'IOA.

Pour étudier ce lien, il faut également prendre en considération un point commun physiopathologique que présentent ces 2 types d'infections : le biofilm. Les biofilms bactériens sont des amas structurés composés de bactéries enrobées d'une matrice polymérique et attachés à une surface. Ils protègent les bactéries et leur permettent de survivre dans des conditions environnementales hostiles (16). La présence de biofilm a donc un impact sur la prise en charge de ces pathologies puisque l'antibiotique va rencontrer des difficultés pour pénétrer la structure du biofilm afin d'agir sur les bactéries et il aura des difficultés d'action sur ces-dernières, les bactéries étant à l'état quiescent à l'intérieur d'un biofilm. Ainsi, si la cible des concentrations plasmatiques pour les  $\beta$ -lactamines correspond à 4 à 8 fois la CMI (17–19), les concentrations cibles en présence de biofilm seraient beaucoup plus importantes d'après les expériences *in vitro* (16,20,21) et par conséquent, potentiellement impossible à atteindre *in vivo*. Par exemple, dans le cas d'un verrou antibiotique sur un dispositif implantable, il faudrait des concentrations de 100 à 1000 fois la CMI afin d'éradiquer le biofilm (16,22). Dans une autre étude *in vitro* sur des *Streptococcus agalactiae* (21), la concentration en pénicilline permettant d'éradiquer le biofilm représente 2000 à 4000 fois la CMI. Le rôle de l'amoxicilline sur le biofilm a été étudié dans des modèles *in vitro* de biofilm gingival (23), chez des patients atteints de sinusites chroniques (24) ainsi que sur certaines souches de staphylocoques (25). Par ailleurs, l'action de l'ampicilline (molécule proche de l'amoxicilline) a également été étudiée sur le biofilm d'*E. coli* (26). Il ressort de ces études que l'amoxicilline peut avoir une action préventive et/ou d'éradication du biofilm qui sera différente selon la souche bactérienne concernée.

Dans ce contexte, il paraît intéressant d'étudier à l'aide d'un modèle *in vitro*, l'impact de l'amoxicilline sur le biofilm.

## 2. Utilisation de l'amoxicilline à hautes doses en clinique

L'amoxicilline est un  $\beta$ -lactamine très utilisée en infectiologie. Cette utilisation s'explique par son large spectre d'action, son innocuité ainsi que son coût.

### a. Pour quelles pathologies ?

L'utilisation de hautes doses d'amoxicilline est particulièrement fréquente dans deux pathologies : les EI (2) et les IOA (27). Bien que ces pathologies soient rares, elles sont associées à une mortalité élevée.

#### i. Les endocardites infectieuses (EI)

Les endocardites infectieuses (EI) sont définies comme étant l'infection d'une ou plusieurs valves cardiaques, native ou prothétique (28,29).

Dans ce chapitre, les aspects épidémiologiques, microbiologiques et diagnostiques sont succinctement résumés. La prise en charge sera quant à elle focalisée sur les bactéries sensibles à l'amoxicilline.

- **Epidémiologie**

Leur incidence est estimée à 3-10 cas pour 100000 habitants dans les pays industrialisés (28,30). Les hommes sont plus touchés par cette pathologie (29) et la mortalité est élevée. En effet, dans la cohorte mondiale de Murdoch *et al.* (31) la mortalité de l'EI pendant l'hospitalisation était de 20 % et pouvait atteindre 25 à 30 % dans les 6 mois après le diagnostic voire 40 % à 1 an (dépendant du microorganisme incriminé). Dans la revue de littérature de Thuny *et al.* (30), la mortalité peut atteindre 1/3 des patients dans l'année suivant leur diagnostic. D'après une étude française portant sur EI et valvulopathie pulmonaire percutanée (32), la mortalité était de 14 %. Il est à noter que malgré les progrès en matière de diagnostic et thérapie, la mortalité n'a pas diminué depuis 25 ans (30,31). Cela peut en partie s'expliquer par l'augmentation de l'âge des patients et les EI associées aux soins. Les agents pathogènes incriminés sont généralement plus résistants (cet aspect ne sera pas abordé dans la suite de ce chapitre).

- **Microbiologie**

Les fréquences de micro-organismes en cause sont résumées dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Répartition des micro-organismes responsables d'EI dans une cohorte Française de 497 patients (33)

Micro-organismes		Fréquences	
Streptocoques	Streptocoques oraux	19 %	48 %
	Streptocoques du Groupe D (72 % de <i>S. gallolyticus</i> )	12.5 %	
	Streptocoques pyogènes	5 %	
Entérocoques (90 % de <i>E. faecalis</i> )		10.5%	
Staphylocoques	<i>S. aureus</i>	26 %	36 %
	Staphylocoques à coagulase négative	10 %	
HACCEK ( <b><i>Haemophilus</i></b> , <b><i>Aggregatibacter</i></b> , <b><i>Cardiobacterium</i></b> , Capnocytophaga, <i>Eikenella corrodens</i> , <b><i>Kingella</i></b> )		1-2 %	
Espèces <i>Candida</i>		1-2 %	
Autres*		6 %	
≥ 2 micro-organismes		1.8 %	
Pas de micro-organisme identifié		5.2 %	

(\*) Entérobactéries, *Cutibacterium acnes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactobacillus* spp., *Corynebacterium* spp, *Coxiella burnetti*, *Bartonella quintana*, *Tropheryma whipplei*, *Gordonia bronchialis*, *Bacillus* spp, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Neisseria elongata*, *Moraxella catarrhalis*, *Veillonella* spp, *Listeria monocytogenes*, *Acinetobacter ursingii*, *Campylobacter fetus*, *Francisella tularensis* et *Catabacter hongkongensis*.

- **Diagnostic**

Le diagnostic de l'EI nécessite l'intégration d'arguments cliniques, microbiologiques et d'imagerie (2,28,34). Depuis 2000, il est recommandé d'utiliser les critères de Duke modifiés dans le cadre du diagnostic d'EI qui sont définis dans le Tableau 2. Ces critères sont résumés dans le Tableau 3.

Tableau 2 : Définition des critères de Duke modifiés

<b>Critères majeurs</b>	<b>Hémocultures positives</b>	2 hémocultures (+) à Streptocoques non groupables, <i>S. gallolyticus</i> , HACCEK*, <i>S. aureus</i> ou Entérocoques communitaires.
		Hémocultures persistantes au même micro-organisme : 2 hémocultures (+) à 12h d'intervalle, ou toutes les hémocultures (si 3) ou une majorité (si plus de 4).
	<b>Sérologie <i>C. burnetti</i></b>	Avec des IgG en phase I $\geq 800$ en Immunofluorescence
	<b>Atteinte de l'endocarde, signes échographiques et cliniques</b>	<b>Echographie positive</b> : végétation, abcès, nouvelle déchisence d'une valve prothétique.
<b>Clinique positive</b> : nouveau souffle cardiaque		
<b>Critères mineurs</b>	<b>Clinique</b>	<b>Microbiologie</b>
	Cardiopathie pré-existante, toxicomanie, fièvre $> 38^{\circ}\text{C}$ , phénomènes vasculaires, immunologiques.	Hémoculture positive (n'entrant pas dans les critères majeurs), sérologie positive pour une bactérie connue responsable d'EI

Tableau 3 : Critères de Duke modifiés

Critères		
	Critère pathologique	Critère clinique
<b>Endocardite certaine</b>	Culture ou examen histologique	2 critères majeurs ou 1 critère majeur et 3 critères mineurs ou 5 critères mineurs
<b>Endocardite possible</b>		1 critère majeur et 1 ou 2 critères mineurs ou 3 ou 4 critères mineurs
<b>Endocardite exclue</b>	Autre diagnostic certain, résolution en moins de 4 jours sous antibiotiques, absence d'évidence à la chirurgie ou à l'autopsie après 4 jours d'antibiotiques, aucun critère d'endocardite	

- **Prise en charge**

La prise en charge consiste en l'instauration d'une antibiothérapie associée dans certains cas à la chirurgie. Le but du traitement est d'éradiquer la présence bactérienne. Des recommandations européennes ont été publiées en 2015 (2). Le traitement empirique (résumé dans le Tableau 4) doit être débuté après le prélèvement des hémocultures. Un aminoside et une  $\beta$ -lactamine sont habituellement prescrits afin de diminuer la durée de la thérapie tout en obtenant une éradication du micro-organisme en cause. Le Tableau 5 résume les options thérapeutiques pour les bactéries sensibles à l'amoxicilline. Le traitement est prescrit pour une durée de 2 à 6 semaines (2). En cas d'allergie aux  $\beta$ -lactamines, celles-ci sont remplacées par la vancomycine.

Le critère de réussite biologique du traitement d'une EI repose sur la stérilisation des hémocultures.

Tableau 4 : Traitement empirique des EI d'après Habib *et al.* (2)

Type d'infection	Antibiotique	Posologie
<b>EI communautaire sur valve native ou valve prothétique &gt; 12 mois post-chirurgie</b>	Ampicilline + Oxacilline + Gentamicine	12 g/jr IV en 4–6 injections + 12 g/jr IV en 4–6 injections + 3 mg/kg/jr IV ou IM en 1 injection
<b>EI sur valve prothétique récente (&lt; 12 mois post-chirurgie) et EI associée aux soins (nosocomiale ou non)</b>	Vancomycine + Gentamicine + Rifampicine	30 mg/kg/jr IV en 2 injections + 3 mg/kg/jr IV ou IM en 1 Injection + 900–1200 mg IV ou per os en 2 ou 3 prises



Tableau 5 : Traitement proposé selon la documentation bactériologique

Bactérie	Antibiothérapie		Posologie	Durée (semaines)	
				Valve native	Valve prothétique
<b>Streptocoques oraux et <i>Streptococcus bovis</i></b>	Souches sensibles à la pénicilline G	Pénicilline G	12–18 millions U/jr IV en continu ou 4-6 injections	2 (si association aminoside) 4	6
		Ou Amoxicilline	100–200 mg/kg/jr IV en 4–6 injections		
		Ou Ceftriaxone	2 g/jr IV ou IM en 1 injection		
		+/- Gentamicine ou Nétilmicine	3 mg/kg/day i.v. ou i.m. en 1 injection ou 4–5 mg/kg/day i.v. en 1 injection		
	Souches intermédiaires à la pénicilline G	Pénicilline G	24 millions U/jr IV en continu ou en 4-6 injections	β-lactamine 4 Aminoside 2	6
		Ou Amoxicilline	200 mg/kg/jr IV en 4–6 injections		
		Ou Ceftriaxone	2 g/jr IV ou IM en 1 injection		
		+ Gentamicine	3 mg/kg/jr IV ou IM en 1 injection		
<b>Enterocoques</b>	Amoxicilline + Gentamicine		200 mg/kg/jr IV en 4–6 injections + 3 mg/kg/jr IV ou IM en 1 injection	4-6 (si les symptômes persistent) + 2-6	6 + 2-6
	Ou Ampicilline + Ceftriaxone		200 mg/kg/jr IV en 4–6 injections 4 g/jr IV ou IM en 2 injections	6	
	Ou Vancomycine + Gentamicine		30 mg/kg/jr IV en 2 injections 3 mg/kg/jr IV ou IM en 1 injection	6	

## ii. Les infections ostéo-articulaires (IOA)

Les infections ostéo-articulaires (IOA) représentent un ensemble d'entités cliniques diverses. Elles peuvent être classées sur différents critères : localisation, délai d'évolution, voie de contamination, présence de matériel (35).

Comme précédemment, les aspects épidémiologiques, physiopathologiques et diagnostiques seront succinctement résumés. La prise en charge sera quant à elle focalisée sur les bactéries sensibles à l'amoxicilline.

- **Epidémiologie :**

L'incidence des IOA toute cause confondue est de 2-6 cas pour 100000 habitants dans les pays industrialisés (36). Si l'on considère les IOA précoces en France, l'incidence était située entre 0,34 % et 1,53 % selon la localisation en 2010 (27). Selon le Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire du 13 février 2013, la mortalité hospitalière associée aux IOA était de 2,5 pour 100000 (37).

- **Physiopathologie**

Il s'agit de distinguer les infections aiguës des infections chroniques ainsi que le mécanisme d'infection (38).

Les infections à point de départ hématogène sont les plus communes chez les jeunes et les personnes âgées (38).

Lorsque l'on parle d'IOA sur prothèses, deux types de situations sont à distinguer : les infections précoces (< 1 mois) ou les infections tardives (> 1 mois).

- **Diagnostic d'une IOA bactérienne**

Le diagnostic est facile si l'infection est aiguë mais plus complexe en cas d'infection chronique ou d'infection sur matériel.

Il repose sur un faisceau d'arguments cliniques, radiologiques et bactériologiques. Une confrontation multidisciplinaire est nécessaire pour décider de la conduite à tenir.

L'interprétation des résultats microbiologiques doit impérativement prendre en compte le contexte clinique, l'(les)espèce(s) identifiée(s), la nature et le nombre de prélèvements positifs et de colonies observées.

Les critères suivants sont retenus pour affirmer une IOA (36) :

- $\geq 3$  prélèvements per opératoires ou 2 prélèvements espacés dans le temps positifs à la même bactérie (espèce et antibiogramme identiques) appartenant à la flore cutanée (staphylocoque à coagulase négative, *Cutibacterium acnes*, corynebactéries...)
- $\geq 2$  prélèvements positifs à une bactérie n'appartenant pas à la flore cutanée et pour laquelle la question d'une contamination ne se pose pas (*Staphylococcus aureus*, entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella*, *Listeria*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Campylobacter*, *Pasteurella*...).

Dans les infections chroniques, la culture met généralement plus de temps à se positiver et les colonies peuvent présenter un caractère atypique. Les infections poly microbiennes sont fréquentes (10-15%) (39).

- **Prise en charge :**

Leur prise en charge associe traitement chirurgical en particulier en présence d'une prothèse et antibiothérapie (40). Il n'existe pas de consensus européen mais les sociétés savantes ont établi des lignes directrices selon le cas rencontré notamment dans le cadre d'infections sur prothèse (41). La HAS a notamment édité des recommandations sur la prise en charge des infections sur prothèse de hanche et du genou (27). Dans le cadre des infections par Streptocoques par exemple, l'HAS recommande l'utilisation de fortes doses d'amoxicilline (Tableau 6).

Le succès thérapeutique est évalué par des critères cliniques, d'imagerie, et biologique.

Tableau 6 : Recommandations de l'HAS (27) dans la prise en charge d'infections sur prothèse de hanche et du genou causées par des Streptocoques

	Traitement initial	Relai oral exclusif
<b>Streptocoques</b>		
<b>Poids ≤ 70 kg</b>	Amoxicilline 1,5 g/4 h IV OU ceftriaxone 2 g/24 h IV	Clindamycine 600 mg x3/j OU amoxicilline 2 g 3x/j
<b>Poids &gt; 70 kg</b>	Amoxicilline 2 g/4 h IV OU ceftriaxone 1,5 à 2 g/12 h IV	Clindamycine 600 mgx4/j OU amoxicilline 3 g 3x/j

### **b. Dans quel but ?**

Le but premier d'un traitement antibiotique dans le cadre d'EI ou d'IOA est l'éradication du micro-organisme responsable de l'infection (2). Les micro-organismes à l'état quiescent (notamment ceux présents dans le biofilm) responsables de réinfection, doivent être éliminés (2). La chirurgie contribue à ce processus par l'élimination des dispositifs infectés et donc du biofilm qui s'est formé sur ces-derniers. L'utilisation de hautes doses d'antibiotiques a pour objectif secondaire d'empêcher la reformation du biofilm ou en l'absence de lavage chirurgical, d'éradiquer celui qui a pu être formé.

Ces pratiques cliniques ne reposent pas sur des études clinico-biologiques mais sur des critères empiriques.

### 3. Critères intermédiaires biologiques d'efficacité

#### a. Le suivi thérapeutique pharmacologique (STP)

D'après la société française de pharmacologie, le STP est défini par 3 étapes successives :

- la mesure précise et fiable de la concentration sanguine d'un médicament ;
- l'interprétation de cette valeur de concentration en fonction des connaissances disponibles sur les relations concentrations-effets de ce médicament ;
- le calcul et la proposition d'une posologie permettant *a priori* de maximiser les chances de succès du traitement (10) en intégrant les paramètres pharmacocinétiques du patient, le contexte physiopathologique, et les traitements associés.

Des recommandations sont bien établies notamment dans le suivi des traitements par aminosides par exemple (42) afin de prévenir les événements toxiques, néphrotoxicité et ototoxicité essentiellement. Plus récemment, des recommandations ont été écrites conjointement par la Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique et la Société Française de Réanimation quant au STP des  $\beta$ -lactamines chez les patients de réanimation (10) dans le but de déterminer des concentrations efficaces chez des patients critiques.

L'amoxicilline possédant une relative innocuité, le STP peut aussi être envisagé pour la surveillance de son efficacité dans le cadre de traitements d'EI ou d'IOA nécessitant l'utilisation de fortes doses d'amoxicilline, afin d'observer si les concentrations plasmatiques atteintes permettent d'être efficaces sur les bactéries à l'état planctonique et dans un second temps si elles permettent une éradication du biofilm.

En effet, peu d'études ont étudié le lien entre paramètres pharmacocinétiques/pharmacodynamiques (PK/PD) et efficacité clinique de l'amoxicilline chez des patients atteints d'EI et d'IOA (11). Chez des patients avec EI, une étude observationnelle a rapporté un taux de guérison de 80% de guérison après un traitement par voie orale (12) et un essai clinique a montré que l'utilisation de hautes doses d'amoxicilline après une antibiothérapie IV initiale aboutissait au traitement de tous les patients dans le bras traité (13). Dans ces études le succès thérapeutique n'est évalué que sur des critères cliniques et aucun paramètre pharmacologique n'est étudié. La littérature n'est pas plus riche concernant l'efficacité de l'amoxicilline et les IOA. Une revue (14) a étudié le devenir des patients atteints d'IOA causées par des bactéries anaérobies dans laquelle 30% des patients étaient traités par l'amoxicilline. Un traitement chirurgical était associé à une antibiothérapie dans 93,5% des cas. Cette étude n'étant pas centrée sur l'amoxicilline, aucun taux de guérison associé au traitement par celle-ci n'est présenté. Une autre étude rétrospective s'est intéressée aux IOA (15). Cinquante-neuf pourcent des patients de cette étude étaient traités par de l'amoxicilline mais de nouveau les auteurs ne concluent pas sur l'efficacité de l'amoxicilline. Il est cependant intéressant de noter qu'ils

soulignent un nombre important d'évènements clinique défavorables ainsi que d'amputations en dépit d'un taux de résistance bas. Une étude observationnelle paraît donc pertinente afin d'étudier ces paramètres.

Un autre aspect intéressant du STP de l'amoxicilline dans le cadre d'EI et d'IOA serait donc de voir si les concentrations plasmatiques obtenues empêchent la reformation du biofilm lorsqu'un traitement chirurgical a été réalisé afin d'éliminer le biofilm présent.

## **b. Action sur le biofilm**

Parmi les critères d'efficacité à prendre à compte dans ce type d'infection, il y a le fait de prévenir la formation du biofilm ou de l'éradiquer. Dans le but d'atteindre cet objectif, les patients sont actuellement traités, de façon empirique, par de fortes posologies d'amoxicilline afin d'être efficace sur les bactéries planctoniques et quiescentes.

### **i. Rappel sur le biofilm**

Lebeaux *et al.* rappellent dans une revue de la littérature (43) que 65 à 80 % des infections humaines seraient associées à la présence de biofilm (Figure 1). Ainsi, le biofilm est largement étudié grâce à différents modèles afin de mieux comprendre ses propriétés spécifiques et de le combattre.

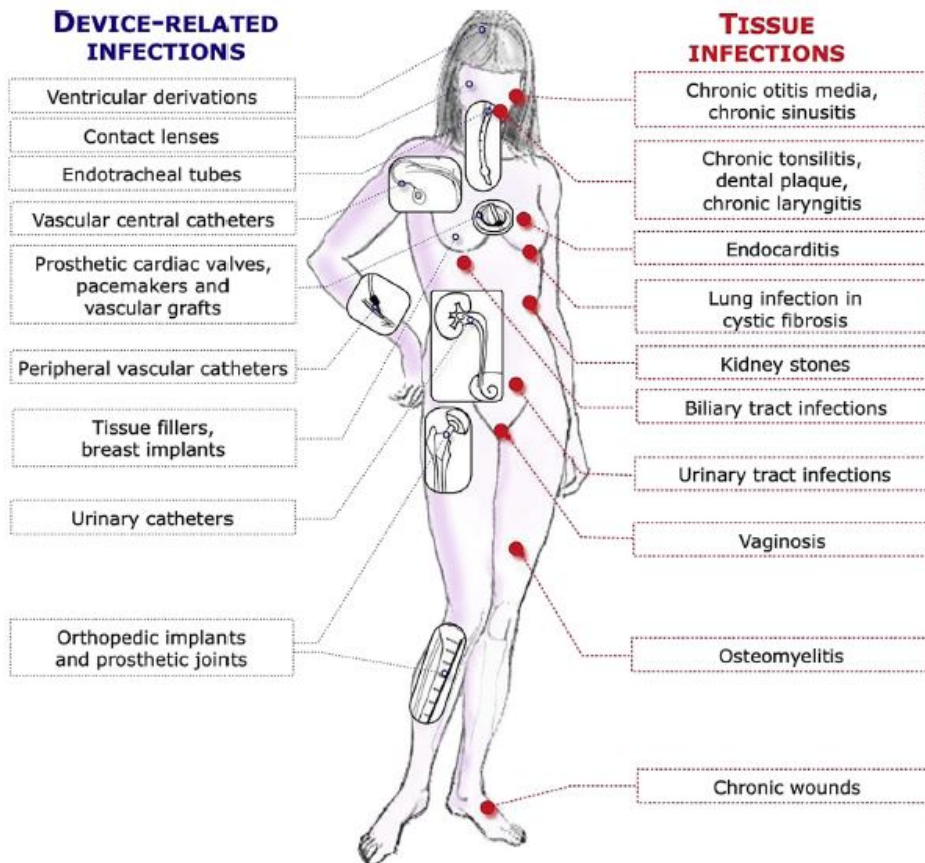


Figure 1 : Infections présentant du biofilm d'après Lebeaux *et al.* (43)

Celui-ci est défini comme un consortium de cellules microbiennes, composé d'une ou plusieurs espèces, entouré d'une matrice polymérique produite par celles-ci (16). La matrice du biofilm est hautement hydratée (jusqu'à 97 % d'eau) et peut être constituée de polysaccharides, de protéines, d'acides nucléiques, d'agents tensioactifs, de lipides, de glycolipides et de cations. La composition de la matrice varie selon l'espèce bactérienne et les conditions de croissance (44). Celui-ci constitue donc une barrière mécanique dans laquelle les bactéries vont être sous forme quiescente. Ponctuellement, des bactéries à l'état planctonique vont être libérées de cette matrice pouvant causer une réinfection. Le biofilm est donc également un réservoir pour de futures infections.

La formation d'un biofilm comprend plusieurs étapes (Figure 2) qui peuvent se succéder dans un temps très court. On considère que l'adhésion bactérienne irréversible se produit dans les 4-8h (45) et que le biofilm s'installe en 8 jours.

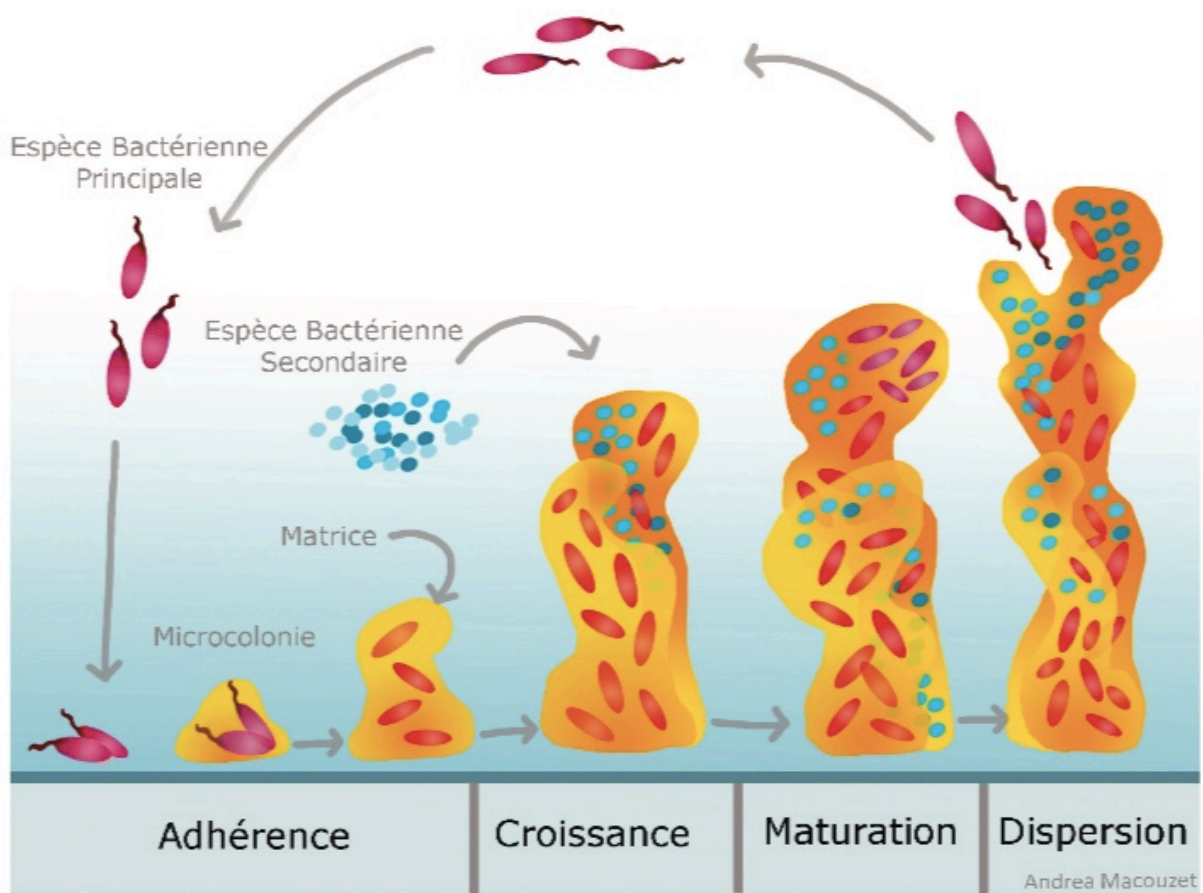


Figure 2 : Etapes de formation et de dispersion du biofilm d'après Tremblay *et al.* (44)

Le biofilm est un mode de survie des bactéries : il va protéger ces-dernières contre la phagocytose, les anticorps ainsi que l'action des antibiotiques (Figure 3) (46).



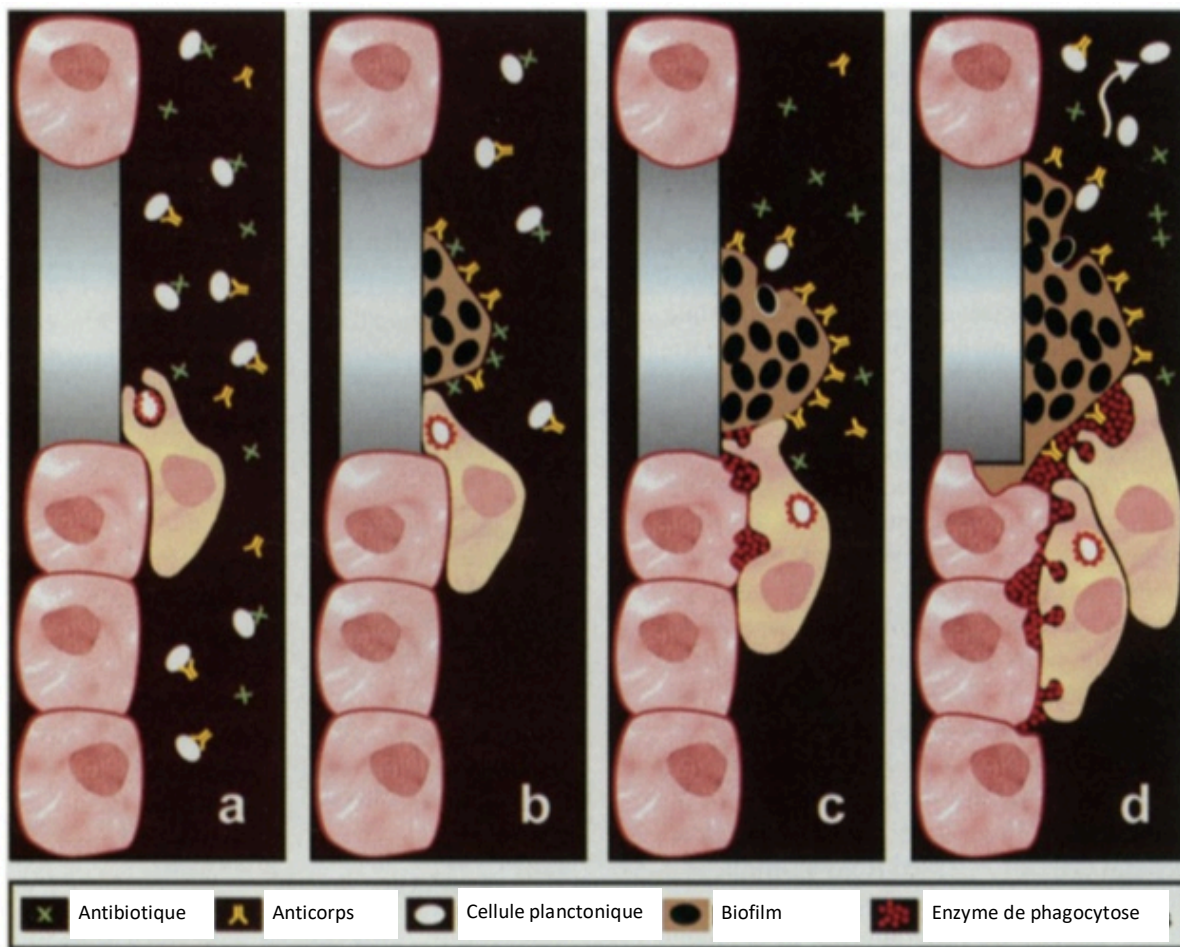


Figure 3 : Le biofilm comme mode de protection des bactéries d'après Costerton *et al.* (46)

(A) Les bactéries planctoniques peuvent être éliminées par les anticorps et les phagocytes et sont accessibles aux antibiotiques (B) Formation de biofilm sur des surfaces inertes : les bactéries à l'intérieur de cette structure ne peuvent plus être atteintes par les anticorps, les phagocytes et les antibiotiques (C) Les phagocytes sont attirés par les biofilms. La phagocytose est perturbée mais les enzymes sont tout de même libérées. (D) Les enzymes phagocytaires endommagent les tissus autour du biofilm et des bactéries planctoniques sont relarguées de ce-dernier conduisant à une dissémination et une infection aigue des tissus environnants.

Les antibiotiques et plus spécifiquement l'amoxicilline, vont avoir des difficultés à cibler les bactéries pour deux raisons : la matrice polymérique doit être traversée afin d'atteindre les bactéries puis l'antibiotique doit agir sur celles-ci. Or les  $\beta$ -lactamines agissent sur des cellules en division et le biofilm est composé de cellules dites quiescentes.

## ii. Les outils disponibles pour l'étudier

Il existe différents types de modèles afin de pouvoir étudier le biofilm.

- **Les modèles *in vivo***

Les modèles *in vivo* permettent d'émettre une hypothèse qui pourra être validée par des études cliniques par exemple. De nombreux modèles non-mammifères (plantes, invertébrés) ont été développés cette dernière décennie afin d'étudier la colonisation des tissus, la formation du biofilm et le début de la pathologie (43).

- **Les modèles *ex vivo***

A la frontière des modèles *in vitro* et *in vivo*, existent les modèles *ex vivo* qui consistent à placer des tissus ou organes extraits d'un organisme dans un environnement artificiel afin de réaliser l'analyse (43). Ces modèles permettent un meilleur contrôle des conditions expérimentales et représentent une alternative aux modèles *in vivo*.

- **Les modèles *in vitro***

Deux types de dispositifs sont actuellement disponibles pour étudier le biofilm : les modèles ouverts et les modèles clos. Les modèles ouverts ou dynamiques ont l'avantage de se rapprocher des conditions *in vivo* en contrôlant l'apport en nutriments, le flux et la température. Ils permettent d'étudier la dynamique du biofilm en l'absence de bactéries planctoniques et peuvent servir de modèle PK/PD mais ils sont difficiles à mettre en place dans un laboratoire. A l'inverse les modèles clos (ou statiques) n'offrent qu'une approche *in vitro* mais sont plus aisés à implémenter et peuvent permettre d'avoir un plus haut débit d'analyses (47).

Parmi les modèles clos *in vitro*, un des plus utilisé dans la littérature est le Calgary Device ou MBEC device (47–54). Ce dispositif est composé d'une plaque 96 puits et d'un couvercle modifié qui comporte des peignes. Le biofilm se forme sur ces derniers. Un des avantages de ce dispositif est qu'il permet de déterminer différents paramètres dont la Concentration Minimale d'Eradication du Biofilm (CMEB) ainsi que la Concentration de Prévention de formation du Biofilm (CPB).

Aucune étude n'a, à notre connaissance, observé le rapport entre CMEB ou CPB et outcome clinique (guérison après arrêt de l'antibiotique vs échec : changement d'antibiotique ou antibiothérapie suspensive) dans le cadre de traitement d'EI ou d'IOA par amoxicilline afin de regarder si un échec thérapeutique pourrait correspondre à une concentration plasmatique inefficace sur le biofilm.

La détermination de la Concentration de Prévention de formation du Biofilm ou CPB (47,51) peut être un outil intéressant afin de déterminer si les concentrations plasmatiques atteintes permettent d'empêcher la reformation d'un biofilm notamment lorsque le patient a reçu une prise en charge chirurgicale comprenant un lavage de la prothèse. La détermination de ce paramètre permet notamment de voir des phénomènes d'induction de biofilm.

En effet, certaines études évoquent le fait que des antibiotiques utilisés dans des concentrations inférieures à la CMI (sub-CMI) peuvent avoir un effet inducteur (55–58) ou inhibiteur du biofilm (55). Kaplan rappelle dans sa revue (55) que l'azithromycine utilisée à des concentrations inférieures à une fois la CMI permet d'inhiber

le quorum-sensing ainsi que la production d'alginate nécessaires à la formation du biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*. A l'inverse, de nombreuses études ont montré qu'en présence d'antibiotiques à des sub-CMI, la formation du biofilm est induite. Or une sub-CMI peut résulter d'un traitement sous-dosé mais peut également s'observer à l'intérieur du biofilm du fait des difficultés de pénétration de l'antibiotique. Dès 1988, il a été montré que la formation de biofilm augmentait de 65%, chez 1 souche sur 3 de *Staphylococcus epidermidis* en présence d'une concentration de rifampicine équivalente à  $\frac{1}{4}$  de la CMI. Dans cette revue, aucune étude ne s'est intéressée à l'effet de l'amoxicilline mais une étude a constaté que l'ampicilline (molécule de structure proche de l'amoxicilline) est inductrice de biofilm chez *Streptococcus intermedius* (59). Il est intéressant de noter dans cette revue que l'azithromycine induit la formation de biofilm chez *S. epidermidis*. Les phénomènes d'induction et d'inhibition du biofilm semblent être antibiotique et bactérie dépendante. Waack *et al.* (57) ont par ailleurs montré que l'exposition d'une souche de *Streptococcus suis* à des concentrations sub-CMI d'amoxicilline pouvait augmenter la formation de biofilm. Cet effet n'était pas observé pour toutes les souches de *S. suis* étudiées, mais pour une majorité, signifie qu'il ne s'agissait pas d'un phénomène ponctuel. Dans cette même étude (57), les auteurs rappellent que l'érythromycine ou l'azithromycine ont un effet inhibiteur de biofilm à des concentrations sub-CMI. De plus, Waack *et al.* (57) décrivent une relation biphasique entre la concentration en Lincomycine et la formation de biofilm: la formation de biofilm augmente pour des concentrations égales à  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{8}$  et  $\frac{1}{32}$  de la CMI mais pas entre  $\frac{1}{8}$  et  $\frac{1}{32}$ . Il sera intéressant de voir si le même phénomène peut être observé pour l'amoxicilline et d'autres bactéries.

## 4. Objectifs de l'article

**Contexte :** Actuellement, les infections impliquant la formation de biofilm, telles que les EI et les IOA sont traitées de manière empirique par de fortes concentrations d'antibiotiques (au moins 4g par jour) sur de longues périodes (au minimum 2 semaines) dans le but d'éradiquer les bactéries planctoniques mais également quiescentes. Il n'y a actuellement, à notre connaissance, aucune étude permettant d'établir un lien entre concentration en amoxicilline plasmatique et succès thérapeutique.

Une étude observationnelle a été menée au Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes incluant 20 patients traités par de hautes doses d'amoxicilline (>4 g/jour) pour des EI (7/20) ou des IOA (13/20) causées par des bactéries sensibles à l'amoxicilline. Ces patients ont tous eu un dosage d'amoxicilline plasmatique prescrit entre 07/2017 et 02/2019. Deux patients présentaient des co-infections à bactéries sensibles à l'amoxicilline. Au total, 22 souches bactériennes ont été étudiées.

**Objectifs :** Les objectifs de cette étude ont été de mesurer les concentrations plasmatiques en amoxicilline afin de déterminer si les concentrations plasmatiques obtenues étaient efficaces dans un premier temps sur les bactéries planctoniques puis dans un second temps, si ces concentrations permettaient l'éradication du biofilm *in vitro*. Cet objectif a nécessité le développement et la validation selon la norme ISO 15189 d'une méthode de dosage plasmatique de l'amoxicilline par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse ainsi que l'optimisation du protocole d'utilisation des plaques MBEC™, système permettant la détermination de la Concentration Minimale d'Éradication du Biofilm (CMEB). Enfin, une dernière étape a été de déterminer si la concentration plasmatique permettrait de prévenir la formation de biofilm.

**Résultats :** Nous avons développé une méthode de dosage plasmatique de l'amoxicilline par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse qui satisfait aux exigences de la norme ISO 15189. Les courbes de calibration de la méthode sont linéaires entre 2 et 200 mg/L. Les Coefficients de Variation ainsi que les biais déterminés après des études de répétabilité et reproductibilité de la méthode sont inférieurs à 15 % comme l'exige la norme. Les patients traités par voie IV avaient des concentrations plasmatiques plus élevées que ceux traités *per os* (médiane IV de 42 mg/L vs médiane *per os* de 5,5 mg/L). Par ailleurs, les concentrations présentaient une grande variabilité inter-individuelle (CV = 136,94 %) Les concentrations mesurées étaient toutes efficaces pour 19/20 patients de l'étude. Seul le patient co-infecté par *Escherichia coli* et *E. faecalis* présentait un ratio Concentration résiduelle/CMI inférieur à 4 (1,25). Concernant l'activité *in vitro* sur le biofilm, les CMEB d'*E. faecalis* étaient toutes comprises entre 64 et 128 mg/L ce qui correspond à plus de 100 fois leur CMI (de l'ordre de 0,38 à 1 mg/L). A l'opposé, les *Cutibacterium acnes* présentaient des CMEB assez basses (0,016 à 0,125 mg/L) permettant une éradication du biofilm *in vitro*. En effet, celles-ci étaient du même

ordre de grandeur que leur CMI (0,016 à 0,094 mg/L). Concernant les Streptocoques, 2 souches n'ont pas formé de biofilm dans nos conditions expérimentales. Une souche de *S. galloyticus* présentait une CMEB à 16 mg/L, par conséquent l'éradication du biofilm de cette souche demande également une concentration élevée en antibiotique (>100 mg/L) et donc potentiellement toxique. En revanche, pour 2 *S. dysgalactiae*, les CMEB (0,031 à 0,062 mg/L) sont tout à fait comparables aux CMI (0,023 à 0,032 mg/L). Les Concentrations Préventives de formation du Biofilm (CPB) ont également été déterminées pour les *E. faecalis* et les *C. acnes*. Les CPB des *E. faecalis* se situe entre 0,5 et 1 mg/L tandis que celles des *C. acnes* se situent entre 2 et 256 mg/L. Il semble que l'amoxicilline ait une action préventive dans la formation de biofilm par *E. faecalis* mais pas par *C. acnes*. Par ailleurs, en présence de fortes concentrations en amoxicilline (de 4 à 512 mg/L), la formation de biofilm est induite pour *E. faecalis*.

### **Conclusion :**

Il semble intéressant de prescrire un dosage d'amoxicilline chez les patients ayant une infection causée par une bactérie avec une CMI élevée ainsi que pour les patients traités *per os*.

L'amoxicilline est efficace *in vitro* sur l'éradication du biofilm formé par *C. acnes* mais ne prévient pas sa formation. A contrario, l'amoxicilline ne permet pas d'éradiquer *in vitro* le biofilm formé par *E. faecalis* du fait de sa CMEB très élevée, mais permet la prévention de sa formation. Par ailleurs, à des concentrations élevées, l'amoxicilline induit la formation de biofilm par *E. faecalis*. Concernant les Streptocoques, l'éradication du biofilm par de l'amoxicilline semble espèce dépendante.

En conclusion, les CMEB étaient prédictives d'un succès thérapeutique pour les infections à *C. acnes*, mais pas pour les autres espèces bactériennes étudiées.

Six patients ont subi une chirurgie avant la mise en place de l'antibiothérapie. Pour ces derniers, la détermination de la CPB semble plus pertinente que la CMEB puisque la chirurgie a pour objectif d'enlever le biofilm. Certaines valeurs sont encore en cours de détermination. L'objectif sera de déterminer si la CPB peut être prédictive de l'absence de reformation de biofilm post-chirurgie.

Il serait intéressant de déterminer les CMEB et CPB des molécules fréquemment associées à l'amoxicilline dans le traitement des IOA et des EI afin de déterminer si une synergie s'opère sur les bactéries quiescentes.

## 5. Article

### Development of analytical methods for the quantification of amoxicillin in human plasma and for the determination of Minimal Biofilm Eradication Concentration and Biofilm Prevention Concentration

#### Introduction

Amoxicillin is a beta-lactam widely used because of its broad-spectrum, and its safety use. Amoxicillin is currently used in high doses (> 4g/day) in deep infections such as Infective Endocarditis (IE) (2) and other endovascular infections, and Bone and Joint Infections (BJI) (4) with or without device. These infections involve prolonged antibiotic courses (2–4), and intravenous (IV) therapy is considered the cornerstone of the treatment strategy. The recommended durations of antibiotic are never lower than 2 weeks and can be extended beyond 4 weeks. The maintenance of prolonged IV is not always feasible (patient's inability to maintain intravascular access) and oral antibiotic therapy is a convenient alternative. There is no published data pharmacokinetic/pharmacodynamics (PK/PD) relationship of amoxicillin when orally administrated at high doses. In the review of Al-Omari *et al.* (11), focusing on the efficacy of oral antibiotic therapy in IE, only 2 old studies with amoxicillin were identified; one observational study reporting 80% cure rate with oral amoxicillin (12) and one clinical trial in which the use of high dose oral amoxicillin (13) following an initial IV therapy resulted in the cure of all patients in the treatment arm. In these studies, therapeutic success is evaluated on clinical criteria. No pharmacological data was studied. The literature is also poor regarding amoxicillin efficacy and BJI. One review (14) studied the outcomes in BJI due to anaerobic bacteria. In that review, 30% (18/61 patients) of the patients were treated by amoxicillin. Surgery was associated to the antibiotic treatment in 93.5 % of the cases. However, this review did not focus on amoxicillin treatment and no amoxicillin treated BJI cure rates are presented. One retrospective study (15) addressed BJI outcome with streptococcal involvement. Fifty-nine percent of patients of this study were treated by amoxicillin. Once again, the authors did not conclude on amoxicillin efficacy but they interestingly highlighted the considerable number of unfavorable clinical outcomes and amputations despite the low antimicrobial resistance rate.

The beta-lactam amoxicillin, is a time dependent antibiotic. It is usually described that to be efficient, the time above the MIC must at least cover 30 to 50 % of the time between two administrations (60,61). Regarding critically ill patients or when we consider high bacterial load and/or limited penetration of  $\beta$ -lactams into the site of infection, the time spent above the MIC must be increased up to 100% of the interdose so as to

be as efficient (11,62,63). Currently, there are no guidelines for amoxicillin therapeutic monitoring in IE and BJI.

In order to be effective, beta-lactam concentration must reach 4 to 8-fold MIC (17–19,64). *In vitro* studies indicated that the concentration required to kill sessile bacteria may be 1000 fold greater than MIC required to kill planktonic bacteria (16,20,49,64,65). Regarding *Streptococcus agalactiae*, Ruppen *et al.* (21) even talk about penicillin concentration that would reach 2000 to 4000 fold MIC.

IE and BJI also share the characteristic to be typical biofilm-associated infectious diseases. Biofilm is defined as a “structured consortium of microbial cells surrounded by a self-produced polymer matrix” (16). This phenomenon complicates the treatment by forming a mechanical barrier that unable the antibiotics to reach their targets. Furthermore, as bacteria in the biofilm are in a dormant state, the antibiotics as amoxicillin are not effective, as their action is only possible on dividing cells (66).

We performed an observational study on 20 patients who presented IE or BJI due to amoxicillin susceptible bacteria and were treated by amoxicillin. We developed the dosage method of plasmatic amoxicillin so as to measure the amoxicillin plasma concentration, In parallel, the Minimal Inhibitory Concentration (MIC), the Minimal Biofilm Eradication Concentration (MBEC) and the Biofilm Preventive Concentration (BPC) were determined for each strain with the Calgary device (47–49,51,53,54,67–70). The objectives of this work were first, to determine whether the plasma concentrations obtained were effective on planktonic bacteria and secondly, if these concentrations allowed the eradication or the prevention of the biofilm *in vitro*. Finally, these results have been compared with the therapeutic outcome of patients.

## Materials and methods

### 1. Patients

From June 2017 to February 2019 in the University Hospital of Grenoble, we performed an observational study. Inclusion criteria were: presence of IE or BJI due to one or at most two amoxicillin susceptible bacteria, treatment with amoxicillin dose above or equal to 4 g/day. For these patients, we collected from medical records clinical: biological and therapeutic data through a standardized case report form. Clinical data included demographics characteristics, weight, diagnostic categories (IE or BJI), and outcome. Biological data included creatinine level and bacterial culture results. Therapeutic data included amoxicillin doses and the route of administration.

Outcome was considered as a treatment failure if antibiotic was switched or if suppressive antibiotic therapy was prescribed.

## 2. Sample schedule and conservation

Blood samples were drawn on heparinate lithium tube before the new amoxicillin administration to determine the trough concentration in routine care. The sample was transported at room temperature to the laboratory immediately after sampling where it was centrifuged and the plasma was immediately frozen and stored at -80°C.

## 3. Amoxicillin plasma concentration measure

### 1. Preparation of working solutions, calibration standard, and quality control samples

Considering the solubility of the powders, stock solutions were prepared in water: amoxicillin at 1 mg/mL; amoxicillin -D<sub>4</sub> at 1 mg/mL.

All stock solutions were ultrasonicated for 5 minutes to facilitate dissolution and stored at -80°C. Two batches of stock solutions were made: one each for the calibration curve and internal quality control (IQC).

Appropriate volumes of each stock solution were added to 800 µL of drug -free- plasma to obtain concentration of the calibration curve (see Table 1 for details). Beginning with this spiked plasma, a series of dilutions was made to obtain the 6 levels of calibration (see Table 1) for details of the dilution and concentrations for each compound). This process was repeated for the 3 levels of IQC (see Table 2).

**Table 1: Preparation of the calibration curve (C1 to C6)**

Volumes (µL)/ calibration curve points	C6	C5	C4	C3	C2	C1	C0
[Amoxicillin] (mg/L)	200	100	50	20	10	2	0
SS (µL)	200						
C6 (µL)		500					
C5 (µL)			500				
C4 (µL)				200			
C3 (µL)					500		
C2 (µL)						200	
Plasma (µL)	800	500	500	600	500	800	1000

SS: Stock Solution, C6 correspond to the Upper Limit Of Quantification (ULOQ) and C1 corresponds to the Lower Limit Of Quantification (LLOQ)



Table 2: Preparation of the QC

Volumes ( $\mu\text{L}$ )	HQC	MQC	LQC
[Amoxicillin] (mg/L)	60	30	3
SS ( $\mu\text{L}$ )	200		
HQC ( $\mu\text{L}$ )		500	
MQC ( $\mu\text{L}$ )			100
Plasma ( $\mu\text{L}$ )	800	500	900

SS= Stock Solution, HQC= High Quality Control, MQC= Medium Quality Control, LQC= Low Quality Control

## 2. Sample preparation

In polypropylene tubes, 75  $\mu\text{L}$  of plasma was treated with 150  $\mu\text{L}$  of precipitation reagent (acetonitrile/amoxicillin-D<sub>4</sub>/formic acid (98/2/0.1)). Amoxicillin-D<sub>4</sub> was our Internal Standard (IS).

Samples were vortexed immediately and thoroughly mixed at 10800 rpm for 10 minutes. After centrifugation, 20  $\mu\text{L}$  of supernatant were put in vials that were ready for the analysis by LC-MS/MS.

### Instrumentation

- *Chromatographic conditions: 2-dimensional chromatography configuration*

The LC system comprised an (LC-20AD Shimadzu®) quaternary pump, equipped with an autosampler (SIL-20AC Shimadzu®) and a column compartment (CTO-20A Shimadzu®). Online sample clean-up was performed on a 25  $\mu\text{m}$  column (Water®, Oasis® HLB 25 $\mu\text{M}$ , 2.1 x 20 mm). Chromatographic separation was performed on 5  $\mu\text{m}$  reversed-phase Phenyl-Hexyl column (Phenomenex®, Luna, 5 $\mu\text{m}$ , 100 Å, 50 x 2 mm) analytical column.

The LC-integrated online sample clean-up consisted of 2 steps: first, 20  $\mu\text{L}$  of deproteinized sample (thermostated at 4 °C in the autosampler) was injected into the system and transferred onto the POROS column, onto which the analytes adsorbed, whereas potentially interfering matrix compounds (mainly salts, protein residues) were washed directly into the waste by mobile phase A (water + 20 mM ammonium formiate, pH 2.8 with formic acid) delivered at a flow rate of 1.5 mL/min over 0.5 min. Next, the 6-port valve was switched at 1 min.

The elution was performed at 0.5 mL/min under the following conditions using water + 20 mM ammonium formiate, pH 2.8 with formic acid (mobile phase C) and ACN + 0.1% formic acid (mobile phase D): 0-1.10 min: 2% D; 1.10-4 min: 2-95% D; 4.-4.20 min: 95% D; 4.20-5 min: 2% D; and 5-5.30 min: 2% D. During this step, the valve was switched back at 2.9 min to its configuration close to the original, allowing a mobile phase B that

consisted of MeOH + water + 0.2% formic acid to wash the POROS purification column for 0.40 min before being replaced by the original mobile phase A/C for loading (equilibration of the column for the next run).

Measurements were performed on an API 3200Qtrap Tandem Mass Spectrometer (AB Sciex, Toronto, Canada), equipped with a turbo ionspray source. Quantification was achieved in the multiple reaction monitoring (MRM) mode, monitoring 2 ion transitions for the amoxicillin  $m/z366 \Rightarrow m/z114$  and  $m/z366 \Rightarrow m/z134$  (one each for quantitation and confirmation) and 1 ion transition for amoxicillin-D<sub>4</sub> (IS)  $m/z370 \Rightarrow m/z114$ . For each analyte, the monocharged molecular ion  $[M+H]^+$  was selected as the parent ion.

The source was operated in positive ion mode with an ESI potential of +5500 V and the following parameters: turbo heater gas at 50 psi, ion source temperature at 750°C, nebulizer gas setting at 60 psi, and curtain gas setting at 30 psi.

### 3. Method validation

Validation of the method was based on guidelines of the Food and Drug Administration Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation (71).

The selectivity was tested by the analysis of 6 sources of blank plasmas, prepared with a precipitation reagent without IS (blank-blank), and 6 blank plasmas with the precipitation reagent, containing the IS (blank) to measure interference by impurities of isotopically. The multiple reaction monitoring (MRM) signal was monitored to confirm the absence of interfering matrix compounds.

The calibration model (linearity) was examined by choosing a suitable regression model and the appropriate weighting factor to compensate for heteroscedasticity.

Within- and between-day accuracy (bias) and precision were examined by replicate analysis (n=6) of the 3 levels of the IQC. Per FDA guidelines, the first level of the IQC was less than 3 times higher than the first level of the calibration curve. Inter-day accuracy and precision were assessed with the same IQCs by analysis (n=6) within various days and by several analysts and were calculated as the percentage deviation of the average calculated concentration from the nominal concentration. Precision was expressed as the percentage of coefficient of variation (CV%). The acceptance limits were CV<15% for precision and within 15% of the nominal value for accuracy, except at the lower limit of quantitation (LLOQ), for which a CV<20% for precision and within 20% of the nominal value for accuracy were required.

To determine the influence of dilutions that might be required for patient samples in which the plasma drug concentration exceeded the upper limit of quantitation (ULOQ), a dilution factor was tested by spiking blank plasma (n=6) at 250 mg/L. The samples were then diluted 2-fold to reduce their concentrations to those provided by the calibration curve.

Inter-sample carryover was studied to measure the persistence of analytes from 1 injection to another: after rinsing the chromatographic system, the sample that corresponded to the ULOQ was analyzed 3 times consecutively (H1, H2, H3, medium H). The sample that corresponded to the LLOQ was then analyzed 3 times (L1, L2, L3). The percentages of contamination were calculated as follows:

$$\text{Contamination (\%)} = \frac{(L1-L3)}{\bar{H}} * 100$$

The maximum level of contamination was determined per the requirements of the analysis.

Qualitative matrix effects were studied by analyzing ion suppression and enhancement phenomenon. Extracted blank plasma samples were injected into the LC system while a methanolic solution that contained all compounds and IS (each at 200 ng/mL) was infused continuously postcolumn in parallel in the ionization

source through a tee (72). This approach was used to check the matching route between the MRM signals of analytes and their respective IS.

#### 4. Statistical analysis

External exchange for amoxicillin measures was performed with another laboratory. The concentrations of amoxicillin measured by LC-MS/MS were compared with those determined using another LC-MS-MS method using non-parametric Passing and Bablok analysis and Bland and Altman plotting to assess method agreement between the two methods (73). Statistical tests were performed using MedCalc® software (version 12.5).

#### 4. Amoxicillin preparation

We reconstituted a 500mL Clamoxyl® vial with 10 mL of purified water. We obtained a 50 g/L stock solution. We prepared 2.048 g/L working solutions in phosphate buffer for the preparation of the amoxicillin challenge plate.

#### 5. Strains

Bacterial isolates were obtained from clinical samples collected for bacteriological diagnosis for each patient. These isolates included: 5 *Enterococcus faecalis*, 11 *Streptococcus* sp. (4 *S. dysgalactiae*, 2 *S. agalactiae*, 2 *S. group mitis/oralis*, 2 *S. gallolyticus*, 1 *S. gordonii*), 5 *Cutibacterium* (former *Propionibacterium*) *acnes* and 1 *Escherichia coli*. Isolates are referred to as numbers ranging from 1 to 22. Two patients (J and P) had a co-infection: one with *E. coli* and *E. faecalis*, one with *S. agalactiae* and *C. acnes*. All strains were previously identified by MALDI-TOF MS, using a Microflex LT instrument, Flexcontrol 3.0 software and the Biotyper 2.0 database (Bruker Daltonics, USA). Bacteria were stored using a cryovial bead preservation system at -80°C.

In addition, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Streptococcus mitis/oralis* (CIP 103335), *Streptococcus agalactiae* (ATCC 12400) and *Cutibacterium acnes* (CIP 110337) were used as quality control of susceptibility testing and so as to validate our protocols.

#### 6. E-Test

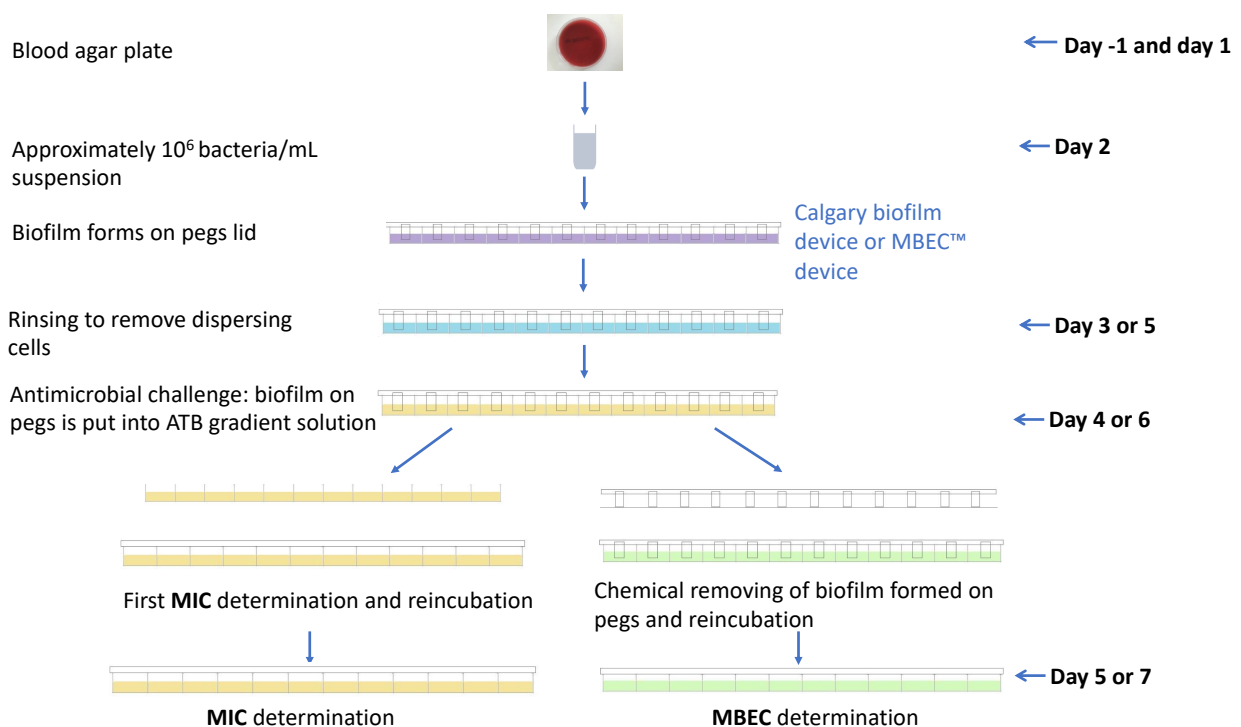
MH (Mueller Hinton) or MH-F (Mueller Hinton agar + 5% horse blood + 20 mg/l β-NAD) plates from Biomerieux® were inoculated regarding the 2018 EUCAST guidelines with an inoculum of 0,5 McF. Brucella agar + 5% horse blood from Biomerieux® were inoculated regarding the 2018 EUCAST guidelines with an inoculum of 1 McF for *Cutibacterium acnes*. Amoxicillin E-Test strips from Biomerieux® were used. The plates were incubated at 35°C and MICs were read after 24h except for *Cutibacterium acnes* which were read after 48h of anaerobic culture.

## 7. MBEC and BPC determinations

### 1. Biofilm formation on the Calgary Biofilm Device

#### i. Calgary Biofilm Device (CBD).

All strains were subcultured on blood agar plate. Various broth have been used to prepare inoculum suspension according the bacteria species as described in Figure 1 (MH for *E. faecalis*, MH-F for *Streptococcus* and Schaedler broth for *C. acnes*). Each well of a 96-well Calgary Biofilm Device (CBD) (MBEC P&G Assay, InnovotechVR , Calgary, Canada) was inoculated with a suspension of about  $10^6$  CFU  $\times$  mL<sup>-1</sup> (1/100 dilution of 0.5 McF inoculum) (48,49,67,68,74,75). The inoculum concentration (CFU/mL) has been checked by counting the number of colonies cultured on blood agar plate from serial dilutions of the suspension. The CBD device plates were placed at 35°C for 24 h (48 h for *C. acnes* under anaerobic conditions [Anaerogen™ Compact, Thermo Scientific, Oxoid], 48h for *S. agalactiae*, *S. mitis/oralis*, *S. gordonii*) to allow the formation of biofilm around the pegs while planktonic bacteria remain in the broth.



**Figure 1: Flowchart of the methodological procedure for the susceptibility testing of clinical strains in planktonic (MIC) and biofilm mode (MBEC).**

Purple: wells are filled with the  $10^6$  bacteria/mL inoculum, Blue corresponds to the saline water for rinsing. Yellow corresponds to the plate containing amoxicillin gradient. Green corresponds to the biofilm dispersion solution.

ii. Colony forming units per peg (CFU x peg<sup>-1</sup>).

For each bacterium, 2 control wells were dedicated to determine the biofilm bacteria concentration. Biofilm formed around the pegs after 24 h incubation (48 h for *C. acnes*, *S. agalactiae*, *S. mitis/oralis*, *S. gordonii*) at 35°C +/- 5% CO<sub>2</sub> or under anaerobic conditions (depending on the bacteria) was detached by chemical dispersion for 30 min and serial dilutions were plated on blood agar plates so as to quantify viable CFU (CFU x peg<sup>-1</sup> = CFU x mL<sup>-1</sup>). The dispersion solution was prepared following the manufacturer's instructions by adding 1 % Tween 80 (Sigma-Aldrich) and 2 % saponin (Sigma-Aldrich) in the medium supplemented with a mixture of amino acids (1 g/L of L-histidine (Sigma-Aldrich), 1 g/L L-cysteine (Sigma-Aldrich) and 2 g/L reduced glutathione (Sigma-Aldrich)) (500 µl for 20 mL final medium). Finally, pH was adjusted to 7 +/- 0,1 with sodium hydroxide 1M.

2. MBEC determination: susceptibility testing of biofilm cells.

MBEC was determined according to the manufacturer's protocol (48,49,67,68,74,75). In brief, biofilm grown on pegs lid from the CBD were rinsed and placed on the antimicrobial plates (96 Well Falcon®) containing amoxicillin gradient concentrations (in yellow in Figure 1) ranging from 1,024 mg/L to 0.008 mg/L and incubated for 24 h (48 h for *C. acnes*) at 35°C +/- CO<sub>2</sub> or under anaerobic conditions (depending on the bacteria). Thereafter, each peg lid was rinsed for 10 seconds and placed in a plate (in green in Figure 1) containing the biofilm dispersion medium (prepared following the MBEC™ Assay Procedural Manual (75)) for 30 minutes to release the remaining biofilm into the recovery plate. The pegs lid was replaced by a regular sterile lid and incubated at 35°C +/- 5% CO<sub>2</sub> (depending on the bacteria) for additional 24 h (48 h under anaerobic conditions for *C. acnes*). Growth of bacteria in some wells indicates regrowth of planktonic bacteria from surviving biofilm. MBEC value represents the lowest dilution at which bacteria fail to regrow. MBEC (for amoxicillin) was determined by O.D. measurements at a wavelength of 650 nm using a plate reader (Tecan®). The cutoff O.D. was defined as three standard deviations above the mean O.D. of the negative controls (53,76–78). After antimicrobial testing, the biofilm-free pegs or negative controls should not produce growth in the MBEC assay and the positive control wells with biofilms on pegs should show turbidity. Tests were run in duplicate and results were validated when the duplicate was plus or minus a single two-fold dilution.

3. MIC determination with CBD device

MIC can be determined using the CBD device from the bacteria that were shed from the pegs when it was placed in the antimicrobial plate. The MIC values obtained using the CBD are similar to those obtained using the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) procedure (48). The cutoff O.D. was defined as three standard deviations above the mean O.D. of the negative controls. Tests were run in duplicate and results were validated when the duplicate was plus or minus a single two-fold dilution.

#### 4. BPC determination with CBD device

BPC determination consists in incubating pegs lid with the planktonic inoculum at the time of exposure to antibiotic gradient concentrations (47,49,51,75) (Figure 2). The CBD plate was filled with 75  $\mu$ L of the amoxicillin gradient working solution (ranging from 2,048 to 0.016 mg/L) and 75  $\mu$ L of the inoculum ( $10^6$  bacteria/mL or  $10^8$  bacteria/mL for *C. acnes*). After 24 h of incubation (48 h under anaerobic conditions for *C. acnes*, 48h for *S. agalactiae*, *S. mitis/oralis*, *S. gordonii*) at 35°C +/- 5% CO<sub>2</sub> (depending on the bacteria), the lid with pegs was rinsed for 10 seconds and biofilm was chemically dispersed for 30 minutes. The plate containing the dispersed biofilm was then incubated for 24 h (48 h under anaerobic conditions for *C. acnes*) at 35°C +/- 5% CO<sub>2</sub> (depending on the bacteria) and BPC was determined by OD measurements at a wavelength of 650 nm in a plate reader (Tecan®). The cutoff O.D. was defined as three standard deviations above the mean O.D. of the negative controls. Tests were run in duplicate and results were validated when the duplicate was plus or minus a single two-fold dilution.

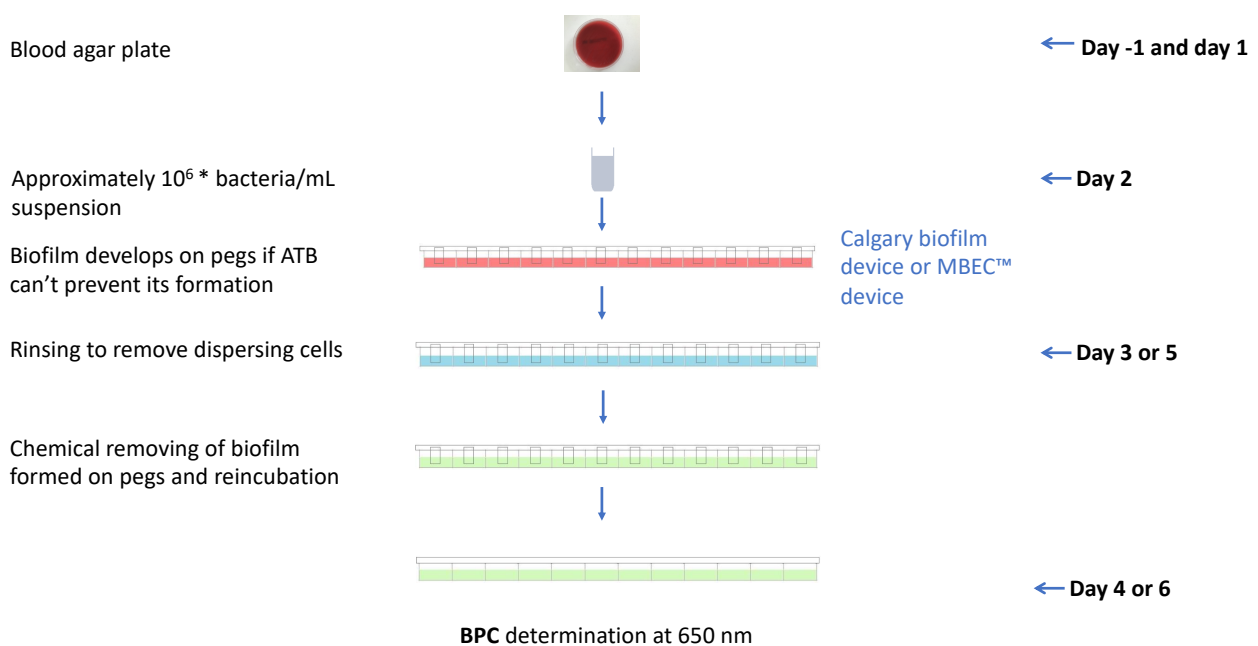


Figure 2: Flowchart of the methodological procedure for the BPC determination of clinical strains.

Red corresponds to the plate containing amoxicillin gradient completed with the inoculum at  $10^6$  bacteria/mL. Blue corresponds to the saline water for rinsing. Green corresponds to the biofilm dispersion solution. \*For *C. acnes*, the inoculum used was around  $10^8$  bacteria/mL.

## **8. Pharmacokinetics determination**

In order to be efficient, beta-lactam concentration must reach 4 to 8 -fold MIC (17–19,64) so we first determined the ratio trough concentration/MIC to check the efficiency of the treatment on planktonic bacteria. We did the same with the ratio trough concentration/MBEC to determine if our concentration was active on the biofilm.



## Results

### 1. Patients

The characteristics of the cohort such as indications of treatment, isolated bacteria, route of administration, amoxicillin doses and treatment duration are presented in Table 3. A total of 20 patients, 8 women (40%) and 12 men (60%) were included in the analysis. They were aged from 20 to 93 years old with a median age of 68 years old. They received 4 to 12 g of amoxicillin per day with a median of 6 g per day. Ten patients were treated by IV route while 10 had an oral treatment when the amoxicillin dosage was performed.

The clinical presentations were 7 IE and 13 BJI including 2 arthritis. Note that patients I and K presented an IE (both wearing a pace-maker) associated with a spondylitis and patient R presented a knee prosthesis infection with an EI. The treatment lasted from 3 to 12 weeks with a median of 6 weeks.

Regarding the outcomes, 10/20 patients were considered cured after treatment. Two of them were coinfecting with *Streptococcus* and *C. acnes*, 2 patients had an infection caused by *Streptococcus*, 3 infections were caused by *C. acnes* while the 3 others were *E. faecalis* infections. Eight patients had a BJI, four of them had devices. Four patients (D, M, N and P) were treated with the association amoxicillin + clindamycin. The other two therapeutic successes were *E. faecalis* IE (I, Q).

Treatment failure was observed in 10 cases (4 IE and 6 BJI): antibiotic treatment was modified for 6 patients (5 IE + 1 BJI). For 4 elderly patients, surgical management being impossible, prolonged suppressive antibiotic therapy have been introduced: they all had knee prosthesis.

Note that for patients, for which antibiotic therapy was modified, three were then cured (3 IE), 2 were then treated with suppressive antibiotic therapy (1 IE with TAVI and 1 BJI), 1 was lost to follow-up.

Table 3: Cohort description (antibiotic treatment according to the bacterium)

Patient	Sex	Age	Pathology	Bacteria ID	Bacteria species	Posology g/day	Treatment duration (weeks)	Treatment associated	Administration route	Outcome
A	F	67	IE	1	<i>S. gallolyticus</i>	12	4	Gentamicin	IV	AT (antibiotic) modification (allergy)
B	M	84	IE (TAVI)	2	<i>S. dysgalactiae</i>	8	6		per os	AT modification
C	M	46	BJI, (knee)	3	<i>S. dysgalactiae</i>	8 then 10 after dosage	6 prolonged to 12	Surgery	per os	Cured
D	M	60	BJI (shoulder)	4	<i>C. acnes</i>	8	12	Clindamicin	per os	Cured
E	F	89	BJI, (knee)	5	<i>S. mitis/oralis</i> group	4.5	6	Surgery	IV	Suppressive antibiotic therapy
F	M	43	BJI, (sterno-clavicular monoarthritis)	6	<i>S. mitis/oralis</i> group	6	3		per os	Cured
G	F	69	BJI, (knee)	7	<i>S. agalactiae</i>	6	12	Clindamicin	IV	Suppressive antibiotic therapy
H	F	36	BJI, Mediastinitis	8	<i>E. faecalis</i>	6	8		IV	Cured
I	M	73	IE with spondylitis	9	<i>E. faecalis</i>	6	6		IV	Cured
J	M	84	BJI, (knee)	10	<i>E. coli</i>	6	6	Trimethoprim-Sulfamethoxazole	per os	New antibiotherapy
				11	<i>E. faecalis</i>					
K	M	87	IE (Pacemaker) with spondylitis	12	<i>S. gallolyticus</i>	6	6		IV	AT modification
L	F	74	BJI, (knee)	13	<i>S. dysgalactiae</i>	6	8		per os	AT modification
M	M	86	BJI, (wrist with prosthesis)	14	<i>C. acnes</i>	6	6	Clindamicin, Surgery	per os	Cured
N	M	44	BJI (arthrodesis device)	15	<i>C. acnes</i>	6	6 to 12	Clindamicin, Surgery	per os	Cured
O	F	20	BJI (osteosynthesis device)	16	<i>C. acnes</i>	6 then 4	6		per os	Cured
P	M	30	BJI, osteosynthesis	17	<i>S. dysgalactiae</i>	6	6	Clindamicin Surgery	per os	Cured
				18	<i>C. acnes</i>					
Q	M	64	IE (bioprosthesis)	19	<i>E. faecalis</i>	6	6	Gentamicin	IV	Cured
R	F	93	BJI, (knee) with IE	20	<i>E. faecalis</i>	12	6		IV	Suppressive antibiotic therapy
S	M	70	IE	21	<i>S. agalactiae</i>	12	6	Surgery	IV	AT modification
T	F	66	IE (benthall)	22	<i>S. gordonii</i>	12	6		IV	AT modification (renal failure)

## 2. Amoxicillin dosage

### 1. Method validation according to the ISO 15189 standard

#### Chromatogram

A representative chromatographic profile of calibration point is shown in Figure 3. A run was completed in 5.3 min.

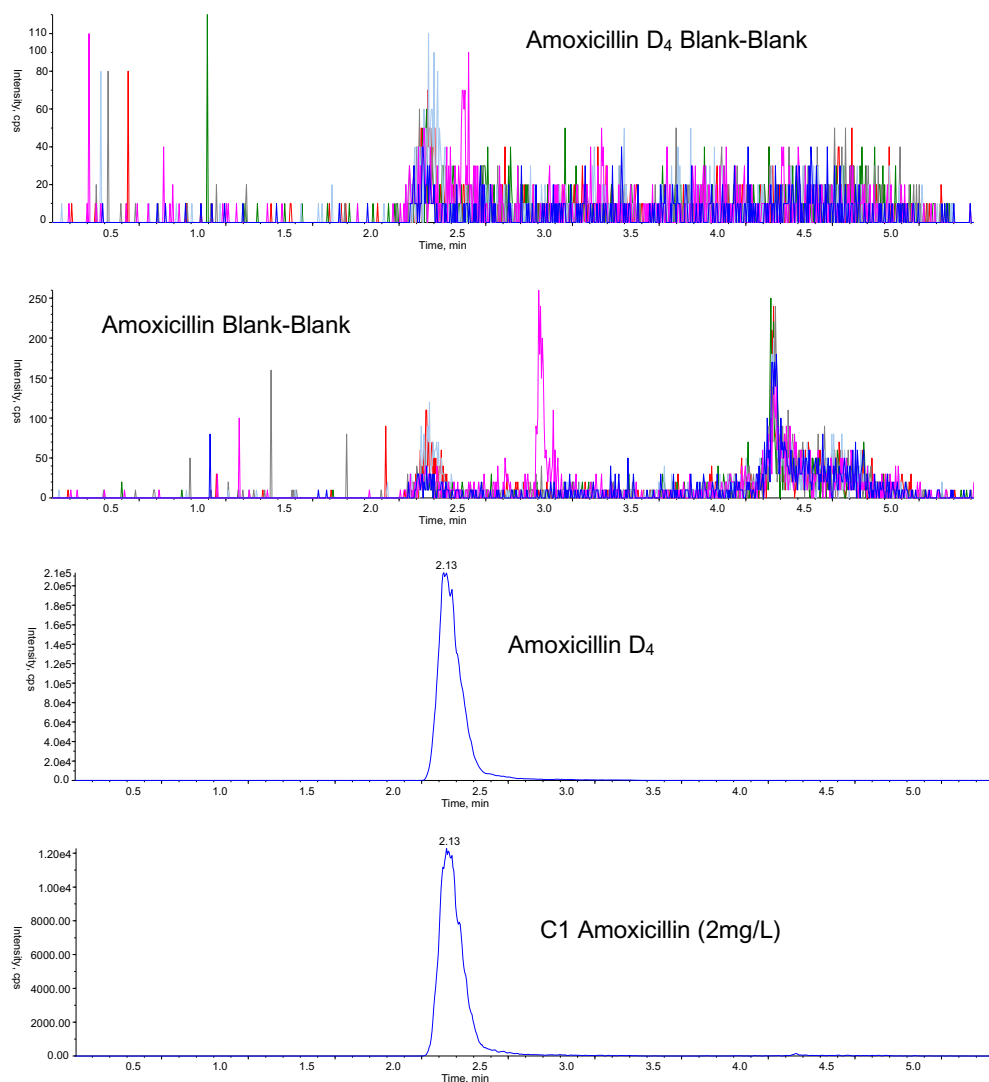


Figure 3: Chromatogram of blank plasmas, amoxicillin calibration C2 level and its IS

#### *i. Selectivity*

The analysis of 6 blank plasmas in the absence of IS showed there was no interference between the amoxicillin and endogenous compounds in the matrix.

*ii. Within- and between-day accuracy and precision, LLOQ*

Within-day and between-day precision and accuracy for the 3 levels of IQC samples are shown in Table 4.

All calculated values were within the ranges of the FDA guidelines:  $\pm 20\%$  for the low-quality control and  $\pm 15\%$  for the higher quality control levels.

The LLOQ was fixed to the lowest concentration of the calibration curve (Table 1). All concentrations met the FDA recommendations—ie,  $\pm 20\%$  for precision and accuracy (data not shown).

Our results regarding the within-day and between-days of the dosage were acceptable as we had a coefficient of variation (CV) under 15% for the three levels we chose (Table 4).

**Table 4: Within- and between-day precisions (expressed as coefficient of variation (CV)) and accuracies (expressed as bias) of the LC-MS/MS method**

Analyte	Nominal concentration (mg/L)	Within-day precision and accuracy (n=6)			Between-day precision and accuracy		
		Mean concentration (mg/L)	CV (%)	Bias (%)	Mean concentration (mg/L)	CV (%)	Bias (%)
Amoxicillin	3	3.16	2.44	5.44	2.90	10.84	-3.28
	30	28.82	2.21	-3.94	28.22	7.09	-5.94
	60	57.98	2.46	-3.36	56.87	3.54	-5.22

*iii. Linearity*

Ratios of analyte peak area and IS peak area (y-axis) were plotted against ratios of analyte and IS concentrations (x-axis), and calibration curves were calculated by least square regression with 1/x weighting with linear regression. The correlation coefficient was 0.9999.

*iv. Sample test dilution*

During the validation, we diluted the 6 plasma samples, spiked with a concentration above the ULOQ (250 mg/L), and the resulting concentration values were always  $\pm 15\%$  of the target value (data not shown).

*v. Contamination*

Results of contamination can be seen in Table 5.

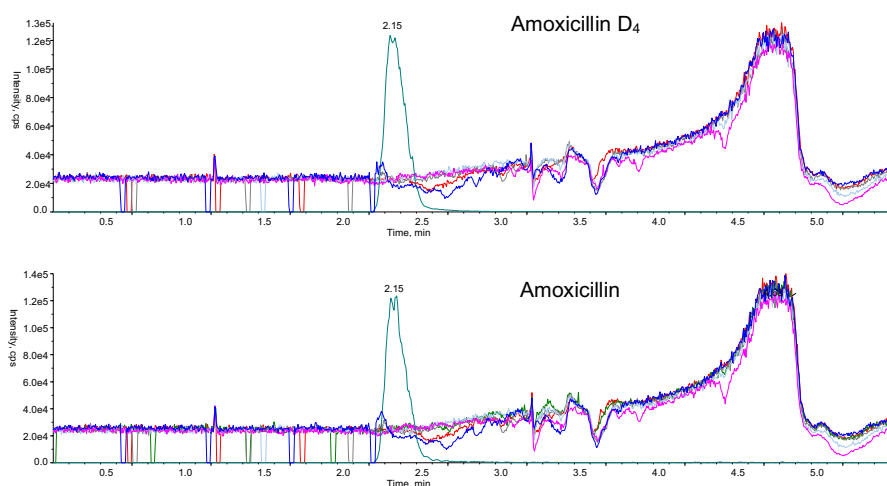
**Table 5: Percentage of contamination on 2 plasmas**

Days (D)	D1	D + 4
Contamination (%)	0.079	0.191

There is no influence of a highly concentrated sample on a low concentrated one.

*vi. Ion suppression phenomenon*

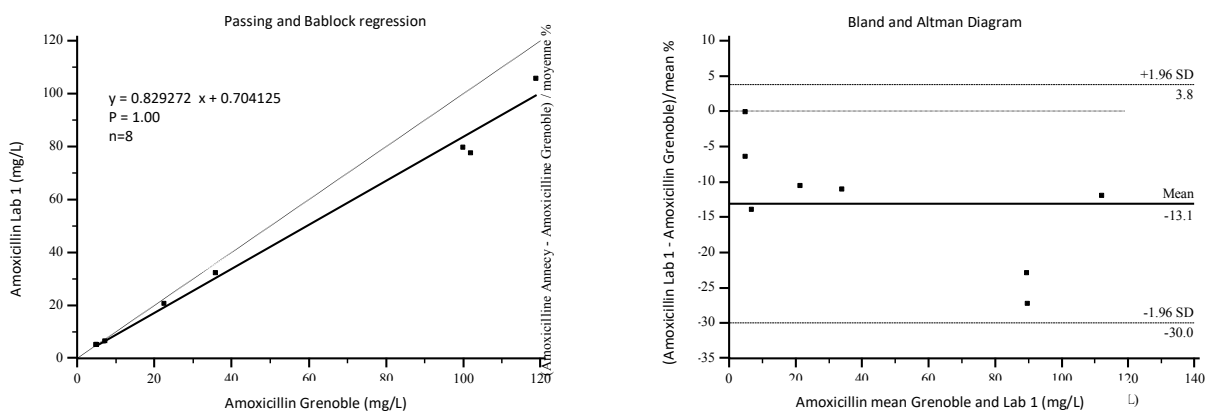
There was an overlay of 10 signals of each postcolumn-infused compound (Figure 4) and a signal that corresponded to the selected IS (in green). Thus, at the retention times of the compounds, the variations in signals were equivalent to those of the selected IS (similar patterns).



**Figure 4: Determination of the specificity of the method**

The signal of the plasma alone is a thousand times below the amoxicillin signal so there is no interference in the dosage (Figure 4).

Our method showed a good agreement with those of one laboratory. The Passing and Bablok regression revealed no significant deviation from linearity (Cusum test, P=1) and the slope from the equation for the linear regression (0.83) indicated that our LC-MS/MS results underestimated concentrations by 16% compared the LC-MS/MS from the laboratory using UPLC-MS/MS (Figure 5). The Bland and Altman plot showed that the mean bias of the two methods was -13.1%.



**Figure 5: Passing and Bablock regression and Bland and Altman Diagram**

The results are correlated despite an overestimation of our method (LC-MS/MS) with the UPLC-MS/MS used by the laboratory for the upper concentration.

## 2. Amoxicillin plasma concentration

There were tremendous interindividual variations in amoxicillin plasma concentrations (coefficient of variation was 136.94%) as we can see in Table 6. Dosages were externalized and the LLOQ was < 5 mg/L. One sample (\*) was never received by the laboratory.

Ten patients took their amoxicillin orally. Concentrations ranged from < 5 mg/L to 9.3 mg/L, the median concentration (considering < 5 mg/L as 5 mg/L) was 5.5 mg/L. Five patients were below 5 mg/L, two were between 5 and 6 mg/L and three were between 6 and 10 mg/L. One patient below 5 mg/L had his posology changed after the first dosage and had an amoxicillin concentration of 8 mg/L the second time. Ten patients had IV doses. Concentrations ranged from < 5 mg/L to 126.4 mg/L. Two patients had an amoxicillin concentration below 5 mg/L and the median concentration (considering < 5 mg/L as 5 mg/L) was 42 mg/L. One patient had received IV doses but had an allergy and an acute renal failure (creatinine normalized when amoxicillin dosed) and had a concentration of 126.4 mg/L.

Patients' weight ranged from 39 to 160 kg with a median of 75 kg. Patients' creatinine ranged from 25 to 387  $\mu\text{mol/L}$  with a median of 72  $\mu\text{mol/L}$ . Hypercreatininaemia for the laboratory corresponds to a value of creatinine above 104  $\mu\text{mol/L}$ . Five patients had a hypercreatininaemia (187, 208, 387, 347 and 179  $\mu\text{mol/L}$ ), two had similar amoxicillin plasma concentration (31 mg/L and 53 mg/L) for respective doses of 6 g per day, one had a low amoxicillin plasma concentration (<5 mg/L) for 12 g per day and two were high 113.2mg/L and 99.3 mg/L for 6 g per day and 12 g per day. All these patients received their treatment by IV. The patient with the lowest weight (39 kg) had a trough concentration of < 5 mg/L and the patient with the highest weight (160 kg) had a trough concentration of 53 mg/L.

Table 6: Trough concentration corresponding to the bacterium, the doses and the administration route

Patients	Weight (kg)	Creatinine (µmol/L)	Bacteria species	Trough concentration mg/L	Dose (g per day)	Administration route
A	76	86	<i>S. gallolyticus</i>	126.4	12	IV
B	90.2	66	<i>S. dysgalactiae</i>	<5	8	per os
C	98	70	<i>S. dysgalactiae</i>	5.6	8	per os
D	No data	62	<i>C. acnes</i>	*	8	per os
E	73.5	72	<i>S. mitis/oralis</i> group	10.6	4.5	IV
F	60.1	57	<i>S. mitis/oralis</i> group	9	6	per os
G	55	47	<i>S. agalactiae</i>	<5	6	IV
H	74	187	<i>E. faecalis</i>	31	6	IV
I	100	80	<i>E. faecalis</i>	5.7	6	IV
J	100.8	81	<i>E. coli</i> <i>E. faecalis</i>	<5	6	per os
K	160	208	<i>S. gallolyticus</i>	53	6	IV
L	120	64	<i>S. dysgalactiae</i>	5.5	6	per os
M	85	82	<i>C. acnes</i>	<5	6	per os
		72	<i>S. agalactiae</i>	8		
N	70.5	59	<i>C. acnes</i>	<5	6	per os
O	61	43	<i>C. acnes</i>	<5	6 then 4	per os
P	No data	69	<i>S. dysgalactiae</i>	9.3	6	per os
			<i>C. acnes</i>			
Q	59	387	<i>E. faecalis</i>	113.2	6	IV
R	39	347	<i>E. faecalis</i>	<5	12	IV
S	84	179	<i>S. agalactiae</i>	99.3	12	IV
T	60	25	<i>S. gordonii</i>	54	12	IV

### 3. MIC, MBEC and BPC

The distribution of amoxicillin MICs by Etest and broth microdilution method for the 22 isolates is presented in Table 7. The 2 testing methods demonstrated exact agreement in 14/17 (82.35 %) cases with plus or minus a single two-fold dilution. However, discrepancies observed assign the same susceptibility category to an isolate and cannot be considered as a major error.

The CBD device was designed to determine both liquid MIC and MBEC. The MBEC (concentration required to kill biofilm bacteria) and the counts of CFU per peg from the device are gathered in Table 7.

Table 7: MICs, MBEC and BPC determined for the 22 bacteria and CFU per peg.

Bacteria ID	Bacteria species	MIC E test mg/L	Liquid MIC (mg/L)	MBEC (mg/L)	CFU/pegs	BPC (mg/L)	Biofilm induction <sup>1</sup>
4	<i>C. acnes</i>	0.016	0.031	0.062	5.60E+04	0.5	no
14		0.094	0.062	0.062	1.06E+05	64	no
15		0.094	0.125	0.125	1.41E+05	256*	no
16		0.064	0.062	0.062	9.20E+04	4*	no
18		0.047	0.016	0.016	7.60E+03	2	no
8	<i>E. faecalis</i>	0.38	0.25	128	1.30E+05	0.5	yes
9		0.38	0.5	128	7.23E+04	1	yes
11		1	0.25	64	5.50E+03	1	yes
19		0.75	0.25	128	1.70E+05	1	yes
20		0.5	0.25	128	1.07E+05	1	yes
2	<i>S. dysgalactiae</i>	0.023	0.031	/	<5000		
3		0.023	0.031	0.031	5.20E+04		
13		0.023	0.031	0.062	1.50E+04		
17		0.032	0.062	/	<5000		
7	<i>S. agalactiae</i>	0.064	0.062				
21		0.032					
1	<i>S. gallolyticus</i>	0.19	0.25	16	4.40E+06		
12		0.19					
5	<i>S. mitis/oralis</i>	0.032					
6		0.064					
10	<i>E. coli</i>	4	8	4	7.25E+03		
22	<i>S. gordonii</i>	0.047					

Concordant values for MIC (E test and Liquid) are highlighted in green and MIC with an error of more than two 2-fold dilution are

in red. \* one single assay <sup>1</sup>Biofilm induction observed with high amoxicillin concentrations



MICs of the reference strains were in agreement with the expectations (data not shown). Amoxicillin was effective in inhibiting planktonic bacterial growth at low concentrations and all the bacteria would be considered susceptible based upon EUCAST breakpoints.

Bacterial biofilms were readily formed by *E. faecalis*, most of *Streptococcus*, *C. acnes* and *E. coli* on the CBD ( $10^4$  to  $10^6$  CFU/pegs). Regarding *Streptococcus* gender, 2/4 *S. dysgalactiae* strains were not able to form biofilm under our experimental conditions (< 5000 CFU/pegs).

Amoxicillin was effective in killing biofilm bacteria at relatively low concentrations for 3 *Streptococcus* and *Cutibacterium acnes*. Two *S. dysgalactiae* MBEC ranged from 0.031 to 0.062 mg/L, which is comparable to their MIC (0.023 to 0.032 mg/L). Duplicates are being run to determine the missing *Streptococcus* MBEC. MBEC measured for *C. acnes* ranged from 0.016 to 0.125 mg/L. These values are comparable to MIC (0.016 to 0.094 mg/L). In contrast, *E. faecalis* MBEC ranged from 64 to 128 mg/L, which is 100 times higher than the MICs (ranging from 0.38 to 1 mg/L). For the *E. coli*, MBEC was equal to the MIC whereas in literature *E. coli* ATCC 25922 MBEC is described to be a hundred times higher than the MIC (48). Our results for ATCC *E. coli* strain were concordant with the literature (MBEC = 1.024 g/L)

Regarding BPC, concentrations ranged from 0.5 to 1 mg/L for *E. faecalis*. These values are comparable to MIC (0.38 to 1 mg/L). For *C. acnes*, BPC are very high ranging from 2 to 256 mg/L. Moreover, a biofilm induction for high amoxicillin concentrations has been observed for all *E. faecalis*.

#### 4. Pharmacokinetics parameters

The calculated ratios are summarized in the Table 8.

Regarding the concentrations below 5 mg/L, an arbitrary 5 mg/L concentration was chosen to determine the ratio. The ratio obtained will be the best-case scenario. Except for patient J infected by both *E. coli* and *E. faecalis*, all the patients have a C trough/MIC above the recommendations, which represents 94.7 % (18/19 patients with a dosage) of our cohort. Amoxicillin is efficient on planktonic bacteria for 18/19 patients.

Regarding the C trough/MBEC ratios, all the *C. acnes* have a ratio above 4 (ranging from 40 to 581). All the *E. faecalis* had a C trough/MBEC ratio under 4 (ranging from 0.04 to 1.25) even when the trough concentration was high (bacteria 19, trough concentration equal to 113.2 mg/L). Amoxicillin concentrations enable biofilm eradication with *C. acnes* but not with *E. faecalis*.

Regarding the *Streptococcus*, two strains didn't produce biofilm in our *in vitro* conditions. One *S. gallolyticus*, 2 *S. dysgalactiae* had C trough/MBEC ratios above 4 (ranging from 7.9 to 180), which enables the biofilm eradication.

Table 8: Pharmacokinetics parameters with MIC and MBEC.

Administration route	Bacteria species	Trough Concentration	MIC Etest	MBEC	C. Trough/MIC	C. Trough/MBEC	Outcome
IV	<i>E. faecalis</i>	31	0.38	128	81,58	0.24	Cured
		5,7	0.38	128	15.00	0.04	Cured
		113,2	0.75	128	150,93	0.88	Cured
		<5	0.5	128	10.00	0.04	Suppressive antibiotic therapy
	<i>S. gallolyticus</i>	126,4	0.19	16	665.26	7.90	AT modification
		53	0.19		278.95		AT modification
	<i>S. agalactiae</i>	<5	0.064	0.031	78.13		Suppressive antibiotic therapy
		99,3	0.032		3103.13		AT modification
	<i>S. mitis/oralis</i>	10,6	0.032		331.25		Suppressive antibiotic therapy
<i>S. gordonii</i>	54	0.047		1148.94		AT modification (renal failure)	
Per os	<i>C. acnes</i>	*	0.016	0.062	*	*	Cured
		<5 and 8	0.094	0.062	85.11	129.03	Cured
		<5	0.094	0.125	53.19	40.00	Cured
		<5	0.064	0.062	78.13	80.65	Cured
	<i>S. dysgalactiae</i>	9,3	0.047	0.016	197.87	581.25	Cured
		<5	0.023	/	217.39	/	AT modification
		5,6	0.023	0.031	243.48	180.65	Cured
		5,5	0.023	0.062	239.13	88.71	AT modification
		9,3	0.032	/	290.63	/	Cured
	<i>S. mitis/oralis</i>	9	0.064		140.63		Cured
	<i>E. faecalis</i>	<5	1	64	5.00	1.00	Suppressive antibiotic therapy
	<i>E. coli</i>	<5	4	4	1.25	1.25	

C. trough means trough concentration. The values highlighted in green are those for which the ratio is greater than or equal to 4. The values highlighted in red are those for which the ratio is under 4. / means the strain did not produce biofilm under our experimental conditions. \* corresponds to the absence of dosage

## Discussion

### Objectives

Regarding the objective to develop an analytical method for the quantification of amoxicillin by LC-MS/MS, we can consider that we succeeded it.

The determination of MBEC with the commercialized CBD system was performed in duplicate for each strain.

We modified the experimental protocol for *C. acnes* (incubation under anaerobic condition for 48h) and

*Streptococcus* (use of lysed horse blood-supplemented Mueller-Hinton broth).

These optimized conditions were applied for the determination of BPC. Despite this, some *Streptococcus* strains do not produce biofilm under our *in vitro* conditions.

### Amoxicillin dosage

The performances of our LC-MS/MS method were in agreement with the required guidelines. Indeed, our results regarding within-day and between-day precisions and accuracies correspond to the requirements of the ISO 15189 standard (CV<15%), including for LLOQ and ULOQ. As all French laboratories must be accredited depending on this standard by 2020, this point was essential. The dynamic calibration range of our calibration curve was consistent with those previously studied and with amoxicillin concentrations that were described (62,79). This allows us to conclude that our method is suitable for amoxicillin drug monitoring.

In patients treated with amoxicillin, the measured plasma concentrations displayed a large variability (present study). This variability could partly be explained by the variability of amoxicillin dose (4 g to 12 g per day) and pre-analytical consideration, i.e. the time when the plasma sample has been handled after amoxicillin administration. Few data have described amoxicillin concentrations in plasma from patients. Old PK/PD studies showed that for a 250 mg oral dose of amoxicillin, concentrations are 2.5 mg/L at 2 hours, 0.5mg/L at 4 hours and below 0.5 mg/L at six hours (80). One review of IE treatments by oral amoxicillin shows that trough concentrations 6 hours after administration are of 1.1 mg/L (11). This is consistent with the concentrations we measured.

The route of administration seems to account for those differences. Although our cohort size is too small to make statistics, the concentration obtained after IV administration seems higher than those administered orally (5,5 for IV and 42 mg/L *per os* considering that <5mg/L concentrations were equal to 5 mg/L). Only 2 plasma concentrations were below 5 mg/L among the 10 patients that received their treatment by IV whereas five patients with oral treatment were above 5 mg/L and none had a concentration above 10 mg/L. Currently, the continuous infusion administration versus intermittent bolus administration is mostly studied (81–83).

Higher clinical cure rates and better PK/PD target attainment are reached when amoxicillin is administered by continuous infusion compared to intermittent bolus. However, simulation data suggests that there will be little difference in the achievement of PK/PD targets for intermittent bolus and continuous infusion if the pathogens involved are in the susceptible range (82). In our case, continuous infusion might have been interesting for our patient with an *E. coli* infection.

Weight and renal function could also account for the variations of amoxicillin concentrations. Again, our results were not conclusive as the sample size of our cohort was very small. For instance, patients with hypercreatininaemia had a large range of amoxicillin plasma concentrations, which could be compared to those with a normal creatininaemia. We can make the same remark regarding the weight: patients with the highest weight have plasma concentrations in the same range as patients with a lower weight. This can be explained by the early adaptation of the dose depending on the weight.

### **MIC, MBEC and BPC**

#### MIC

Although broth micro-dilution is the gold standard for determination of MIC, E-test is one of the alternatives widely used in bacteriology laboratory. E-test is routinely performed to determine amoxicillin MIC. The Etest has several advantages; the gradient is stable for up to 20 h, it is suitable for a variety of pathogens. However, some authors pointed differences in results with a systematic bias for smaller and larger MIC values for specific bacteria–drug combinations compared to broth dilution (84). Old studies had clearly demonstrated that the E-test underestimates the MICs of  $\beta$ -lactam agents (85). Our results don't confirm these data. The E-test MIC were 1 to 2-fold higher than broth micro-dilution MIC. For 1 strain, the MIC obtained by the E-Test was 2 dilutions greater than the corresponding liquid MICs. However, the E-Test provides results on a linear scale, so these results are not directly comparable to the two-fold dilution results provided by the broth micro-dilution method. Also we found an agreement of 81,25%, both techniques gave similar results for the categorization of the strains as being susceptible to amoxicillin. The results of the E-tests may be considered for the calculation of pharmacological parameters.

According to Ceri *et al.* the MIC values obtained using the CBD are similar to those obtained using the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) procedure (48). We were able to determine the MIC for all our bacteria with the CBD.

In spite of the heterogeneity of the plasma concentrations, we can conclude that amoxicillin was active on all the bacteria based on the calculation of the  $\frac{C_{trough}}{MIC}$  ratio with the only exception of patient J co-infected by *E. coli* and *E. faecalis*. The Etest MIC was much higher than others (4 mg/L *versus*  $\leq 0.5$  mg/L). For such bacteria

with higher MICs, dosage should be considered as soon as the treatment starts. Dosage should be considered in order to be effective from the treatment start for strains with MIC >1.

### MBEC

Assays can be performed when pegs contained approximately  $10^4$  to  $10^6$  bacteria growing as a biofilm (67). These concentrations were obtained for all *E. faecalis*, *C. acnes*, *E. coli*, *S. gallolyticus* and *S. dysgalactiae*. The biofilm development is depending on the specific bacterial growth rate. Special conditions are required for some bacteria to grow as biofilms. For example, *Corynebacterium renale* and *Pasteurella multocida*, required the addition of fetal bovine serum and incubation under 10% CO<sub>2</sub>. The duration of heavy biofilm formation on the pegs [ $> 10^4$  CFU/peg] varied from 4 h for *P. aeruginosa* to 24 h for *C. renale* (67). The experimental protocol was modified to obtain a concentration of  $10^4$  bacteria / peg in the biofilm of *Streptococci* and *Cutibacterium*. Despite those changes, some *Streptococci* did not grow a biofilm. They are considered as non-biofilm producer under our experimental conditions.

When calculating the  $\frac{C_{trough}}{MBEC}$  ratio for *E. faecalis* and *E. coli*, we notice that amoxicillin is not active on biofilm cells in our study.

The highest MBEC measured in our study were *E. faecalis* MBEC. They were all in the same range (128 mg/L). Recommendations say that we should be 4 to 8 times above the MIC (17–19,86) so as to be efficient. If follow them, we should have plasma concentrations between 200 and 400 mg/L. Yet, plasma concentrations that were measured do not correspond to even one time the MBEC. Plus, those concentrations are in the range of potential toxic concentrations (6–8) Effective concentrations are not likely to be reached. Amoxicillin would therefore be ineffective on the biofilm formed by *E. faecalis*. The results is not so surprising because  $\beta$ -lactams are not active in anaerobic conditions; consequently, they affect only the outer part of the biofilm, where oxygen is present (87).

In our study we found that MBEC was equal the MIC for *E. coli* strain, which isn't consistent with literature. Higher MBEC ( $>1.024$  g/L) have been reported for ampicillin (48). There was only one strain of *E. coli* in our cohort. This is probably due to the increase of amoxicillin resistance in *E. coli*. Few enterobacteria are treated with amoxicillin in BJI or EI contexts. It would be interesting to observe if this phenomenon was a one-time event.

The species *Streptococcus gallolyticus* has been characterized as a biofilm producer in our experimental conditions. The MBEC was intermediate between the *E. faecalis* and the *C. acnes* MBEC (16 mg/L). The  $\frac{C_{trough}}{MBEC}$  ratio was in the theoretical range of efficacy (7,9), but the amoxicillin plasma concentration was extremely

high for this patient underwent kidney failure. For patients with normal renal function, this amoxicillin concentration is not likely to be reached especially when the treatment is taken *per os*. Amoxicillin has an intermediate activity on formed biofilm by *S. gallolyticus*.

Regarding *C. acnes*, MBEC were the same as MIC (plus or minus a single two-fold dilution) so the  $\frac{C_{trough}}{MBEC}$  ratio was above 4 for all the strains. Amoxicillin is active on formed biofilm by *C. acnes*.

### BPC

BPC were determined only when the bacteria was able to produce biofilm according to the manufacturer protocol. More experiments are scheduled for the missing data (*Streptococci* and missing duplicate of the other bacteria).

Interestingly, *E. faecalis*, which had the highest MBEC, have a low BPC ranging from 0,5 to 1 (close to their MIC). In contrast, *C. acnes* had higher BPC ranging from 2 to 256 mg/L. We can conclude that amoxicillin can prevent the biofilm formation for *E. faecalis* but not on *C. acnes*. So, amoxicillin is active on formed biofilm with *C. acnes* whereas it is active during early biofilm formation regarding *E. faecalis*.

It had been previously described that on *Pseudomonas aeruginosa*, various antibiotics can either prevent the biofilm formation and not be active on formed biofilm or on the contrary be active on mature biofilm and not prevent its formation (51).

Regarding the induction of biofilm formation, the studies indicate that it is a bacteria and antibiotic dependent phenomenon. It has been showed that low antibiotic concentrations like ampicillin may induce *S. intermedius* biofilm formation (88). On the contrary, azithromycin could inhibit the biofilm formation of *P. aeruginosa* (88). MBEC evaluate the ability of amoxicillin to eradicate the biofilm already established while BPC studies the prevention of its formation. Indeed, in some cases, amoxicillin is prescribed when the biofilm is already formed, so it has to be able to eradicate it. On the contrary, when amoxicillin is prescribed after a new prosthesis implantation, the aim is to prevent the biofilm formation. Our BPC results suggest that the biofilm prevention may be possible for *E. faecalis*.

Moreover, biofilm induction for high amoxicillin concentration was only observed for *E. faecalis*. Yu *et al.* (89) described an *E. faecalis* biofilm induction for sub-inhibitory concentrations of ampicillin. A review gathered sub-inhibitory antibiotic concentrations responsible for biofilm induction (55). To our knowledge, biofilm induction was not described for high amoxicillin concentrations regarding *E. faecalis* infections. So not only high amoxicillin plasma concentration could be harmful by its intrinsic properties (6–8) but by the induction of biofilm formation as well.

## Comparison of the *in vitro* results to the outcome

Regarding the ten favorable outcomes, 2/7 patients with an IE and 8/13 patients with a BJI were cured. Three patients were prescribed IV amoxicillin and 7 were prescribed an oral treatment. Regarding IE, both IE cured were caused by *E. faecalis* and were treated by IV. Interestingly,  $\frac{C_{trough}}{MBEC}$  ratio was between 0,04 and 0,88. The third IV cured patient (patient H) presented a BJI caused by *E. faecalis*. His  $\frac{C_{trough}}{MBEC}$  ratio was below 4 (0.24) as well. *E. faecalis* MBEC were not in favor of a therapeutic success. However, amoxicillin cured these patients. Regarding BJI and favorable outcomes, all the other patients had oral therapy. All the patients infected by *C. acnes* (treatment *per os* n = 5) were cured, it seems that amoxicillin was able to eradicate the biofilm caused by *C. acnes* as  $\frac{C_{trough}}{MBEC}$  ratio suggests (80 to 580). However, surgery was associated to amoxicillin treatment for 3 patients so BPC would be more interesting in these cases. Preliminary results suggest that *C. acnes* BPCs are higher than their MBEC (2 to 64 mg/L). The 3 other BJI infections cured were caused by *E. faecalis* (IV route), *S. dysgalactiae* and *S. mitis/oralis* group. *E. faecalis* and *S. dysgalactiae*  $\frac{C_{trough}}{MBEC}$  ratios were not in favor of a favorable outcome so it was not predictable.

Regarding IE and non-favorable outcomes, 4/5 were treated by IV route. One patient had a suppressive antibiotic therapy (Patient B), antibiotic has been modified for 3 patients (Patients A, K and S) and one patient was lost to follow up (Patient T). The suppressive antibiotic therapy for Patient B (patient with TAVI) is consistent with literature as IE after TAVI are of poor prognosis (90). We cannot conclude on the impact of amoxicillin in the treatment of patient A's IE. Indeed, the change of antibiotic was due to kidney failure associated with encephalopathy and immune allergy to amoxicillin. The last 2 IE were cured after modification of antibiotic according the European treatment recommendations (2).

Regarding BJI and non-favorable outcomes, the 5 patients had a knee prosthesis. The bacteria isolated in these 5 cases were: 1 co-infection by *E. coli* and *E. faecalis* (patient J), 1 *E. faecalis* (patients R), 1 *S. mitis/oralis* group (patient E), 1 *S. agalactiae* (patient G) and 1 *S. dysgalactiae* (patient L). The *E. faecalis* and *E. coli* (*per os* route) had both ratios  $\frac{C_{trough}}{MIC}$  and  $\frac{C_{trough}}{MBEC}$  below 4. The last *E. faecalis* infection (IV route, patient J) had also its ratio below 4. Only *S. dysgalactiae* (*per os* route) ratio was available and it was above 4. MBEC do not seem a good method for the prediction of therapeutic success in case of knee prosthesis infection. Suppressive antibiotic therapies were prescribed for patients with BJI associated with knee prosthesis even if they had surgery to mechanically treat them. This observation is consistent with the current medical practices consisting in replacing the prosthesis when possible though reinfection often occurs (91).

So MBEC were only a suitable marker for the prediction of therapeutic success regarding *C. acnes* infections. In the review of Macia *et al* (92), the interaction of biofilm mechanisms with antibiotic activity is very complex



and deeper *in vitro* and *in vivo* studies are needed before basing antibiotic strategies on biofilm antimicrobial susceptibility testing rather than conventional ones.

Some patients had another antibiotic prescribed with the amoxicillin (clindamycin or trimethoprim-sulfamethoxazole), it would be interesting to determine the MBEC and BPC of those two molecules. Indeed, Ferran *et al.*, studied *in vitro* activity of amoxicillin and clindamycin on *S. aureus* and *S. pseudointermedius* biofilm and they observed that the combination of both molecules was less efficacious on reducing biofilm than clindamycin alone (25).

THÈSE SOUTENUE PAR : REYNAUD Céline

TITRE :

MISE AU POINT DE METHODES ANALYTIQUES POUR QUANTIFIER L'AMOXICILLINE DANS LE PLASMA HUMAIN, ET DETERMINER LES CONCENTRATIONS MINIMALES D'ERADICATION DU BIOFILM ET LES CONCENTRATIONS DE PREVENTION DE FORMATION DU BIOFILM

CONCLUSION :

Actuellement, les Infections Osteo-Articulaires (IOA) et les Endocardites Infectieuses (EI) causées par des germes sensibles à l'amoxicilline sont traitées par de fortes doses de cette molécule dans le but d'être actif sur les bactéries planctoniques comme sur les bactéries en biofilm.

Une étude observationnelle a été menée au Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes incluant 20 patients traités par de hautes doses d'amoxicilline (>4 g/jour) pour des EI (7/20) ou des IOA (13/20). Ces patients ont tous eu un dosage d'amoxicilline plasmatique prescrit entre 07/2017 et 02/2019. Deux patients présentaient des co-infections à bactéries sensibles à l'amoxicilline. Au total, 22 souches bactériennes ont été étudiées : *Enterococcus faecalis* (n=5), *Streptococcus* (n = 11), *Cutibacterium acnes* (n = 5) et *Escherichia coli* (n=1).

Les objectifs de cette étude ont été de mesurer les concentrations plasmatiques en amoxicilline afin de déterminer si les concentrations plasmatiques obtenues étaient efficaces dans un premier temps sur les bactéries planctoniques puis dans un second temps, si ces concentrations permettaient l'éradication ou la prévention du biofilm *in vitro*.

La méthode de dosage de l'amoxicilline a été développée selon la norme ISO 15189. En parallèle, les plasmas de patients traités ont été dosés par un laboratoire extérieur le temps du développement. Les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI), les Concentrations Minimales d'Éradication du Biofilm (CMEB) et les Concentrations de Prévention de formation du Biofilm (CPB) ont été déterminées *in vitro* grâce au système « Calgary Biofilm Device » commercialisé par la société Innovotech.

Les concentrations plasmatiques d'amoxicilline mesurées présentent une grande variabilité interindividuelle (Coefficient de Variation [en considérant que les valeurs <5 mg/L sont égales à 5 mg/L] = 136,94 %). Il a également été constaté que les patients traités *per os* présentaient des concentrations plasmatiques d'amoxicilline inférieures à ceux traités par IV (médiane de 5,5 vs 42

mg/L en considérant que les concentrations <5 mg/L étaient à 5 mg/L). En pratique, on considère un ratio Concentration résiduelle/CMI entre 4 et 8, efficace sur les bactéries planctoniques. Dans notre étude, ce ratio était compris entre 5 et 3103 pour 20 souches et égal à 1,25 pour la souche de *E. coli* (CMI = 4 mg/L). Ainsi il paraît intéressant de réaliser un dosage d'antibiotique de façon précoce afin d'adapter au plus vite l'antibiothérapie pour des patients traités *per os* ainsi que pour les infections causées par des bactéries avec des CMI élevées.

La méthode utilisée dans cette étude permettant de déterminer les CMEB et CPB est longue et fastidieuse à mettre en place dans un laboratoire et ne permet pas l'obtention de résultats aussi rapidement que pour des CMI. Cependant, les résultats obtenus ont permis de nous apporter un début d'explication quant à la réponse au traitement d'IOA et/ou d'EI par l'amoxicilline.

Les CMEB obtenues montrent qu'en monothérapie, les concentrations en amoxicilline ne sont pas suffisantes pour éradiquer un biofilm déjà formé par *E. faecalis* mais peuvent éradiquer le biofilm formé par *C. acnes*. En effet, les CMEB d'*E. faecalis* sont toutes comprises entre 64 et 128 mg/L ce qui correspond à plus de 100 fois leur CMI (de l'ordre de 0,38 à 1 mg/L). A l'opposé, les CMEB mesurées pour *C. acnes* sont comprises entre 0,016 et 0,125 mg/L. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que les CMI de ces bactéries (0,016 et 0,094 mg/L). Concernant les CPB, le phénomène opposé est observé : l'amoxicilline permettrait la prévention de la formation du biofilm *in vitro* par les souches de *E. faecalis* (CPB comprises entre 0,5 et 1 mg/L, soit du même ordre que les CMI); alors que pour *C. acnes*, ces concentrations sont très élevées entre 2 à 256 mg/L. De plus, pour *E. faecalis*, une induction de la formation du biofilm en présence de concentrations élevées en amoxicilline (de 4 à 512 mg/L) a été observée. Ce phénomène, qui est bactérie- et antibiotique-dépendant, avait été décrit dans la littérature pour d'autres molécules avec *Pseudomonas aeruginosa* ainsi que pour l'amoxicilline sur différentes bactéries. Concernant les Streptocoques, certaines CMEB sont en cours de détermination. Certaines souches de Streptocoques (n = 2) n'ont pas développé de biofilm dans nos conditions expérimentales. Une souche de *S. gallolyticus* présente une CMEB à 16 mg/L, par conséquent l'éradication du biofilm de cette souche demande également une concentration élevée en antibiotique (>100 mg/L) et donc potentiellement toxique. En revanche, pour 2 *S. dysgalactiae*, les CMEB sont tout à fait comparables aux CMI. En conséquence, l'éradication du biofilm par de l'amoxicilline semble espèce dépendant pour les Streptocoques.

En comparant les résultats de CMEB obtenus et le devenir clinique des patients, les CMEB semblent prédictives de la guérison pour 5 patients. Ces derniers ont présenté une arthrite du genou (*S. dysgalactiae*) et des infections causées par *C. acnes* (n = 4). Pour ces patients le ratio Concentration résiduelle/CMI était de l'ordre de 40 à 180. En revanche, pour 3 patients qui ont guéri (2 EI et une

médiastinite), la CMEB était en faveur d'un échec thérapeutique (ratio Concentration résiduelle/CMI de l'ordre de 0,04 à 0,88). Les CMEB semblent prédictives d'un échec chez 2 patients (co-infection à *E. coli* et *E. faecalis* et infection à *E. faecalis*) avec des ratio Concentration résiduelle/CMEB de l'ordre de 1. Une patiente avait un ratio à 7,9 (prédictif d'une guérison), mais son traitement par amoxicilline a été modifié à cause d'effets indésirables. Une souche ne produisant pas de biofilm *in vitro* a été isolée chez un patient en échec thérapeutique. Nous n'avons pas pu conclure pour 8 patients pour lesquels il manque des données (CMEB en cours, absence de dosage, devenir inconnu).

En conclusion, les CMEB étaient prédictives d'un succès thérapeutique pour les infections à *C. acnes*, mais pas pour les autres espèces bactériennes étudiées.

Six patients ont subi une chirurgie avant la mise en place de l'antibiothérapie. Pour ces derniers, la détermination de la CPB semble plus pertinente que la CMEB puisque la chirurgie a pour objectif d'enlever le biofilm. Certaines valeurs sont encore en cours de détermination. L'objectif sera de déterminer si la CPB peut être prédictive de l'absence de reformation de biofilm post-chirurgie.

Dans la poursuite de ce travail, il serait intéressant de déterminer les CMEB et CPB des molécules fréquemment associées à l'amoxicilline dans le traitement des IOA et des EI afin de déterminer si une synergie s'opère sur les bactéries quiescentes.

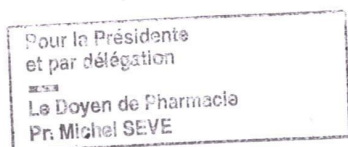
## VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le : 17/06/2019

LE DOYEN



Michel SEVE



LE DIRECTEUR DE THESE :



LE TUTEUR UNIVERSITAIRE :



# Bibliographie

---

1. Dye C. After 2015: infectious diseases in a new era of health and development. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* [Internet]. 19 juin 2014 [cité 7 août 2018];369(1645). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4024220/>
2. Habib G, Lancellotti P, Antunes MJ, Bongiorni MG, Casalta J-P, Del Zotti F, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of infective endocarditis The Task Force for the Management of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC) Endorsed by: European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), the European Association of Nuclear Medicine (EANM). *Eur Heart J*. 21 nov 2015;36(44):3075-128.
3. Clinical Guidelines for the Antimicrobial Treatment of Bone and Joint Infections in Korea. *Infect Chemother*. juin 2014;46(2):125-38.
4. Saavedra-Lozano J, Falup-Pecurariu O, Faust SN, Girschick H, Hartwig N, Kaplan S, et al. Bone and Joint Infections. *Pediatr Infect Dis J*. août 2017;36(8):788-99.
5. Spyker DA, Rugloski RJ, Vann RL, O'Brien WM. Pharmacokinetics of Amoxicillin: Dose Dependence After Intravenous, Oral, and Intramuscular Administration. *Antimicrob Agents Chemother*. janv 1977;11(1):132-41.
6. Raposo J, Teotónio R, Bento C, Sales F. Amoxicillin, a potential epileptogenic drug. *Epileptic Disord*. 1 déc 2016;18(4):454-7.
7. Cundiff J, Joe S. Amoxicillin-clavulanic acid–induced hepatitis. *Am J Otolaryngol*. 1 janv 2007;28(1):28-30.
8. Mrvos R, Pummer TL, Krenzelok EP. Amoxicillin Renal Toxicity: How Often Does It Occur? *Pediatr Emerg Care*. mai 2013;29(5):641.
9. Netgen. Suivi thérapeutique des médicaments (II) la pratique clinique1. *Rev Médicale Suisse*

[Internet]. [cité 28 août 2018]; Disponible sur: <https://www.revmed.ch/RMS/2008/RMS-165/Suivi-therapeutique-des-medicaments-II-la-pratique-clinique>

10. STP & personnalisation des traitements [Internet]. [cité 19 oct 2018]. Disponible sur: <https://pharmacol-fr.org/groupe-de-travail/suivi-therapeutique-pharmacologique>
11. Al-Omari A, Cameron DW, Lee C, Corrales-Medina VF. Oral antibiotic therapy for the treatment of infective endocarditis: a systematic review. *BMC Infect Dis*. 13 mars 2014;14:140.
12. Chetty S, Mitha AS. High-dose oral amoxicillin in the treatment of infective endocarditis. *South Afr Med J Suid-Afr Tydskr Vir Geneeskd*. 18 juin 1988;73(12):709-10.
13. Stamboulian D, Bonvehi P, Arevalo C, Bologna R, Casseti I, Scilingo V, et al. Antibiotic management of outpatients with endocarditis due to penicillin-susceptible streptococci. *Rev Infect Dis*. févr 1991;13 Suppl 2:S160-163.
14. Walter G, Vernier M, Pinelli PO, Million M, Coulange M, Seng P, et al. Bone and joint infections due to anaerobic bacteria: an analysis of 61 cases and review of the literature. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. août 2014;33(8):1355-64.
15. Seng P, Vernier M, Gay A, Pinelli P-O, Legré R, Stein A. Clinical features and outcome of bone and joint infections with streptococcal involvement: 5-year experience of interregional reference centres in the south of France. *New Microbes New Infect*. 13 avr 2016;12:8-17.
16. Høiby N, Bjarnsholt T, Moser C, Bassi GL, Coenye T, Donelli G, et al. ESCMID\* guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clin Microbiol Infect*. 1 mai 2015;21:S1-25.
17. Abdul-Aziz MH, Lipman J, Mouton JW, Hope WW, Roberts JA. Applying pharmacokinetic/pharmacodynamic principles in critically ill patients: optimizing efficacy and reducing resistance development. *Semin Respir Crit Care Med*. févr 2015;36(1):136-53.
18. F. Jehl, D. Levêque. Perfusion continue des bêta-lactamines : intérêts, inconvénients, modalités

pratiques. 15 avr 2009;

19. Dailly E, Verdier M-C, Deslandes G, Bouquié R, Tribut O, Bentué-Ferrer D. [Level of evidence for therapeutic drug monitoring of ceftriaxone]. *Thérapie*. avr 2012;67(2):145-9.
20. Chai WL, Hamimah H, Cheng SC, Sallam AA, Abdullah M. Susceptibility of *Enterococcus faecalis* biofilm to antibiotics and calcium hydroxide. *J Oral Sci*. juin 2007;49(2):161-6.
21. Ruppen C, Hemphill A, Sendi P. In vitro activity of gentamicin as an adjunct to penicillin against biofilm group B *Streptococcus*. *J Antimicrob Chemother*. 1 févr 2017;72(2):444-7.
22. Jacqueline C, Caillon J. Impact of bacterial biofilm on the treatment of prosthetic joint infections. *J Antimicrob Chemother*. 1 sept 2014;69(suppl\_1):i37-40.
23. Sedlacek MJ, Walker C. Antibiotic resistance in an in vitro subgingival biofilm model. *Oral Microbiol Immunol*. oct 2007;22(5):333-9.
24. Božić DD, Pavlović B, Milovanović J, Jotić A, Čolović J, Ćirković I. Antibiofilm effects of amoxicillin-clavulanic acid and levofloxacin in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol Off J Eur Fed Oto-Rhino-Laryngol Soc EUFOS Affil Ger Soc Oto-Rhino-Laryngol - Head Neck Surg*. août 2018;275(8):2051-9.
25. Ferran AA, Liu J, Toutain P-L, Bousquet-Mélou A. Comparison of the In vitro Activity of Five Antimicrobial Drugs against *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Front Microbiol* [Internet]. 2 août 2016 [cité 3 sept 2018];7. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4969302/>
26. González MJ, Robino L, Iribarnegaray V, Zunino P, Scavone P. Effect of different antibiotics on biofilm produced by uropathogenic *Escherichia coli* isolated from children with urinary tract infection. *Pathog Dis*. 01 2017;75(4).
27. HAS. Recommandations de bonnes pratiques Prothèse de hanche ou de genou : diagnostic et prise en charge de l'infection dans le mois suivant l'implantation [Internet]. 2014 [cité 11 sept 2018].

Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2014-03/rbp\\_recommandations\\_protheses\\_infectees\\_vd.pdf](https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2014-03/rbp_recommandations_protheses_infectees_vd.pdf)

28. Cahill TJ, Prendergast BD. Infective endocarditis. *Lancet Lond Engl*. 27 févr 2016;387(10021):882-93.
29. Collège des universitaires des Maladies Infectieuses et Tropicales. ECN.PILLY 2018 UE6 Endocardite infectieuse [Internet]. 5ème édition. [cité 24 août 2018]. 8 p. Disponible sur: <http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/formation/ecn-pilly-2018/ecn-2018-ue6-149-nb.pdf>
30. Thuny F, Grisoli D, Collart F, Habib G, Raoult D. Management of infective endocarditis: challenges and perspectives. *The Lancet*. mars 2012;379(9819):965-75.
31. Murdoch DR, Corey GR, Hoen B, Miró JM, Fowler VG, Bayer AS, et al. Clinical Presentation, Etiology and Outcome of Infective Endocarditis in the 21st Century: The International Collaboration on Endocarditis-Prospective Cohort Study. *Arch Intern Med*. 9 mars 2009;169(5):463-73.
32. Malekzadeh-Milani S, Houeijeh A, Jalal Z, Hascoet S, Bakloul M, Aldebert P, et al. French national survey on infective endocarditis and the Melody™ valve in percutaneous pulmonary valve implantation. *Arch Cardiovasc Dis*. 1 août 2018;111(8):497-506.
33. Selton-Suty C, Célard M, Le Moing V, Doco-Lecompte T, Chirouze C, Iung B, et al. Preeminence of *Staphylococcus aureus* in infective endocarditis: a 1-year population-based survey. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. mai 2012;54(9):1230-9.
34. Société Française de Microbiologie. Endocardite. In: REMIC : Société Française de Microbiologie. 2015. p. 139-44.
35. Collège des universitaires des Maladies Infectieuses et Tropicales. ECN.PILLY.2018 UE 6 Infections ostéo-articulaires (IOA) de l'adulte et de l'enfant [Internet]. 5ème édition. [cité 24 août 2018]. 12 p. Disponible sur: <http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/formation/ecn-pilly->



2018/ecn-2018-ue6-153-nb.pdf

36. García-Arias M, Balsa A, Mola EM. Septic arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* juin 2011;25(3):407-21.
37. BEH\_4\_5\_2013.pdf. 2013.
38. Colston J, Atkins B. Bone and joint infection. *Clin Med.* 4 janv 2018;18(2):150-4.
39. Société Française de Microbiologie. Infections osseuses et articulaires. In: REMIC : Société Française de Microbiologie. 2015. p. 285-94.
40. Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, Lew D, Zimmerli W, Steckelberg JM, et al. Diagnosis and Management of Prosthetic Joint Infection: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 1 janv 2013;56(1):e1-25.
41. IDIBELL B, Navarra P. Management of prosthetic joint infections. Clinical practice guidelines by the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC).
42. Afssaps. MISE AU POINT SUR LE BON USAGE DES AMINOSIDES ADMINISTRÉS PAR VOIE INJECTABLE : GENTAMICINE, TOBRAMYCINE, NÉTILMICINE, AMIKACINE [Internet]. [cité 25 oct 2018]. Disponible sur: [https://ansm.sante.fr/var/ansm\\_site/storage/original/application/3e0d2264e2921c8465d9ad6464e12660.pdf](https://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/3e0d2264e2921c8465d9ad6464e12660.pdf)
43. Lebeaux D, Chauhan A, Rendueles O, Beloin C. From in vitro to in vivo Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. *Pathogens.* 13 mai 2013;2(2):288-356.
44. Tremblay YDN, Hathroubi S, Jacques M. Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Can J Vet Res.* avr 2014;78(2):110-6.
45. Olson ME, Ruseska I, Costerton JW. Colonization ofn-butyl-2-cyanoacrylate tissue adhesive byStaphylococcus epidermidis. *J Biomed Mater Res.* juin 1988;22(6):485-95.

46. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Sci New Ser.* 1999;284(5418):1318-22.
47. Macia MD, Rojo-Molinero E, Oliver A. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clin Microbiol Infect.* 1 oct 2014;20(10):981-90.
48. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. *J Clin Microbiol.* 6 janv 1999;37(6):1771-6.
49. Ceri H, Olson M, Morck D, Storey D, Read R, Buret A, et al. [25] The MBEC assay system: Multiple equivalent biofilms for antibiotic and biocide susceptibility testing. In: Doyle RJ, éditeur. *Methods in Enzymology* [Internet]. Academic Press; 2001 [cité 26 avr 2018]. p. 377-85. (Microbial Growth in Biofilms - Part B: Special Environments and Physicochemical Aspects; vol. 337). Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S007668790137026X>
50. Rodrigues D, Cerca N, Teixeira P, Oliveira R, Ceri H, Azeredo J. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* Enteritidis Biofilms Susceptibility to Different Disinfectants and Stress-Response and Virulence Gene Expression of Surviving Cells. *Microb Drug Resist.* juin 2011;17(2):181-9.
51. Fernández-Olmos A, García-Castillo M, Maiz L, Lamas A, Baquero F, Cantón R. In vitro prevention of *Pseudomonas aeruginosa* early biofilm formation with antibiotics used in cystic fibrosis patients. *Int J Antimicrob Agents.* août 2012;40(2):173-6.
52. Soares GMS, Teles F, Starr JR, Feres M, Patel M, Martin L, et al. Effects of azithromycin, metronidazole, amoxicillin, and metronidazole plus amoxicillin on an in vitro polymicrobial subgingival biofilm model. *Antimicrob Agents Chemother.* mai 2015;59(5):2791-8.
53. Zaborowska M, Tillander J, Brånemark R, Hagberg L, Thomsen P, Trobos M. Biofilm formation and antimicrobial susceptibility of staphylococci and enterococci from osteomyelitis associated with percutaneous orthopaedic implants: BIOFILM FORMATION AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* nov

2017;105(8):2630-40.

54. Sandoe JAT, Wysome J, West AP, Heritage J, Wilcox MH. Measurement of ampicillin, vancomycin, linezolid and gentamicin activity against enterococcal biofilms. *J Antimicrob Chemother.* avr 2006;57(4):767-70.

55. Kaplan JB. Antibiotic-induced biofilm formation. *Int J Artif Organs.* sept 2011;34(9):737-51.

56. Kaplan JB, Izano EA, Gopal P, Karwacki MT, Kim S, Bose JL, et al. Low Levels of  $\beta$ -Lactam Antibiotics Induce Extracellular DNA Release and Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus*. *mBio* [Internet]. 31 juill 2012 [cité 6 mars 2019];3(4). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3419523/>

57. Waack U, Nicholson TL. Subinhibitory Concentrations of Amoxicillin, Lincomycin, and Oxytetracycline Commonly Used to Treat Swine Increase *Streptococcus suis* Biofilm Formation. *Front Microbiol* [Internet]. 6 nov 2018 [cité 6 mars 2019];9. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6232385/>

58. Mlynek KD, Callahan MT, Shimkevitch AV, Farmer JT, Endres JL, Marchand M, et al. Effects of Low-Dose Amoxicillin on *Staphylococcus aureus* USA300 Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 22 avr 2016;60(5):2639-51.

59. Ahmed NA, Petersen FC, Scheie AA. AI-2/LuxS Is Involved in Increased Biofilm Formation by *Streptococcus intermedius* in the Presence of Antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* oct 2009;53(10):4258-63.

60. de Velde F, de Winter BCM, Koch BCP, van Gelder T, Mouton JW, COMBACTE-NET consortium. Non-linear absorption pharmacokinetics of amoxicillin: consequences for dosing regimens and clinical breakpoints. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(10):2909-17.

61. Economou CJP, Wong G, McWhinney B, Ungerer JPJ, Lipman J, Roberts JA. Impact of  $\beta$ -lactam antibiotic therapeutic drug monitoring on dose adjustments in critically ill patients undergoing

- continuous renal replacement therapy. *Int J Antimicrob Agents*. 1 mai 2017;49(5):589-94.
62. Carlier M, Stove V, Wallis SC, De Waele JJ, Verstraete AG, Lipman J, et al. Assays for therapeutic drug monitoring of  $\beta$ -lactam antibiotics: A structured review. *Int J Antimicrob Agents*. oct 2015;46(4):367-75.
63. Osthoff M, Siegemund M, Balestra G, Abdul-Aziz MH, Roberts JA. Prolonged administration of  $\beta$ -lactam antibiotics - a comprehensive review and critical appraisal. *Swiss Med Wkly*. 2016;146:w14368.
64. Larsen T, Fiehn N-E. Resistance of *Streptococcus sanguis* biofilms to antimicrobial agents. *APMIS*. 1 janv 1996;104(1-6):280-4.
65. Lepape A. Y a-t-il des spécificités dans la prise en charge des infections liées aux cathéters suivant la microbiologie ? *Ann Fr Anesth Réanimation*. 1 mars 2005;24(3):298-301.
66. Flemming H-C, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol*. sept 2016;14(9):563-75.
67. Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res*. avr 2002;66(2):86-92.
68. Parker AE, Walker DK, Goeres DM, Allan N, Olson ME, Omar A. Ruggedness and reproducibility of the MBEC biofilm disinfectant efficacy test. *J Microbiol Methods*. juill 2014;102:55-64.
69. Tomlin KL, Malott RJ, Ramage G, Storey DG, Sokol PA, Ceri H. Quorum-Sensing Mutations Affect Attachment and Stability of *Burkholderia cenocepacia* Biofilms. *Appl Environ Microbiol*. sept 2005;71(9):5208-18.
70. Soares GMS, Teles F, Starr JR, Feres M, Patel M, Martin L, et al. Effects of Azithromycin, Metronidazole, Amoxicillin, and Metronidazole plus Amoxicillin on an *In Vitro* Polymicrobial Subgingival Biofilm Model. *Antimicrob Agents Chemother*. mai 2015;59(5):2791-8.

71. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. *Vet Med.* 2001;(May).
72. Annesley TM. Ion suppression in mass spectrometry. *Clin Chem.* juill 2003;49(7):1041-4.
73. J Martin Bland DGA. Comparing methods of measurement: why plotting difference against standard method is misleading. *Lancet.* 1995;346:1085-7.
74. Harrison JJ, Turner RJ, Ceri H. High-throughput metal susceptibility testing of microbial biofilms. *BMC Microbiol.* 3 oct 2005;5:53.
75. Products: MBEC Assays - Microbial & Bacterial Biofilm Solutions [Internet]. [cité 11 avr 2018]. Disponible sur: [http://www.innovotech.ca/products\\_mbec.php](http://www.innovotech.ca/products_mbec.php)
76. Stepanović S, Ćirković I, Ranin L, S√vabić-Vlahović M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Lett Appl Microbiol.* 1 mai 2004;38(5):428-32.
77. Revdiwala S, Rajdev BM, Mulla S. Characterization of Bacterial Etiologic Agents of Biofilm Formation in Medical Devices in Critical Care Setup. *Crit Care Res Pract* [Internet]. 2012 [cité 23 août 2018];2012. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3270516/>
78. Brady AJ, Lavery G, Gilpin DF, Kearney P, Tunney M. Antibiotic susceptibility of planktonic- and biofilm-grown staphylococci isolated from implant-associated infections: should MBEC and nature of biofilm formation replace MIC? *J Med Microbiol.* 2017;66(4):461-9.
79. Pullen J, Stolk LML, Nieman FHM, Degraeuwe PLJ, van Tiel FH, Zimmermann LJI. Population pharmacokinetics and dosing of amoxicillin in (pre)term neonates. *Ther Drug Monit.* avr 2006;28(2):226-31.
80. Adam D, de Visser I, Koeppe P. Pharmacokinetics of amoxicillin and clavulanic acid administered alone and in combination. *Antimicrob Agents Chemother.* sept 1982;22(3):353-7.

81. Abdul-Aziz MH, Sulaiman H, Mat-Nor M-B, Rai V, Wong KK, Hasan MS, et al. Beta-Lactam Infusion in Severe Sepsis (BLISS): a prospective, two-centre, open-labelled randomised controlled trial of continuous versus intermittent beta-lactam infusion in critically ill patients with severe sepsis. *Intensive Care Med.* oct 2016;42(10):1535-45.
82. Abdul-Aziz MH, Dulhunty JM, Bellomo R, Lipman J, Roberts JA. Continuous beta-lactam infusion in critically ill patients: the clinical evidence. *Ann Intensive Care.* 16 août 2012;2(1):37.
83. Roberts JA, Abdul-Aziz M-H, Davis JS, Dulhunty JM, Cotta MO, Myburgh J, et al. Continuous versus Intermittent  $\beta$ -Lactam Infusion in Severe Sepsis. A Meta-analysis of Individual Patient Data from Randomized Trials. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 2016;194(6):681-91.
84. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1 déc 2009;49(11):1749-55.
85. Tandé D, Picard B. Evaluation of the E-test for routine testing of the susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to benzylpenicillin, amoxicillin and cefotaxime. *Clin Microbiol Infect.* 1 août 1997;3(4):474-9.
86. Potel G, Caillon J, Jacqueline C, Navas D, Kergueris M-F, Batard E. Dosage des antibiotiques en réanimation : quand et comment demander et interpréter les tests ? *Réanimation.* 1 juin 2006;15(3):187-92.
87. Borriello G, Werner E, Roe F, Kim AM, Ehrlich GD, Stewart PS. Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* juill 2004;48(7):2659-64.
88. Kaplan JB. Antibiotic-induced biofilm formation. *Int J Artif Organs.* sept 2011;34(9):737-51.
89. Yu W, Hallinen KM, Wood KB. Interplay between Antibiotic Efficacy and Drug-Induced Lysis Underlies Enhanced Biofilm Formation at Subinhibitory Drug Concentrations. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 21 déc 2017 [cité 17 juin 2019];62(1). Disponible sur:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5740344/>

90. Amat-Santos IJ, Messika-Zeitoun D, Eltchaninoff H, Kapadia S, Lerakis S, Cheema AN, et al. Infective Endocarditis After Transcatheter Aortic Valve Implantation: Results From a Large Multicenter Registry. *Circulation*. 5 mai 2015;131(18):1566-74.
91. Tande AJ, Patel R. Prosthetic Joint Infection. *Clin Microbiol Rev*. avr 2014;27(2):302-45.
92. Macià MD, Rojo-Molinero E, Oliver A. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. oct 2014;20(10):981-90.



# **Serment de Galien**



**« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :**

**D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.**

**D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.**

**De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.**

**Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».**