

Fenêtre de mutation apport du modèle animal

le couple pneumocoque - fluoroquinolones

P Chavanet

Département d'Infectiologie

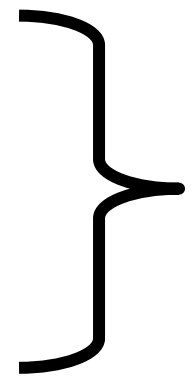
EA 562, LMI-LQRF

Dijon

Infections respiratoires « basses » le sketch

fréquence

Br.aigue	73%
EA.BPCO	16%
Pneumonie	11%



Antibiothérapie = 96%

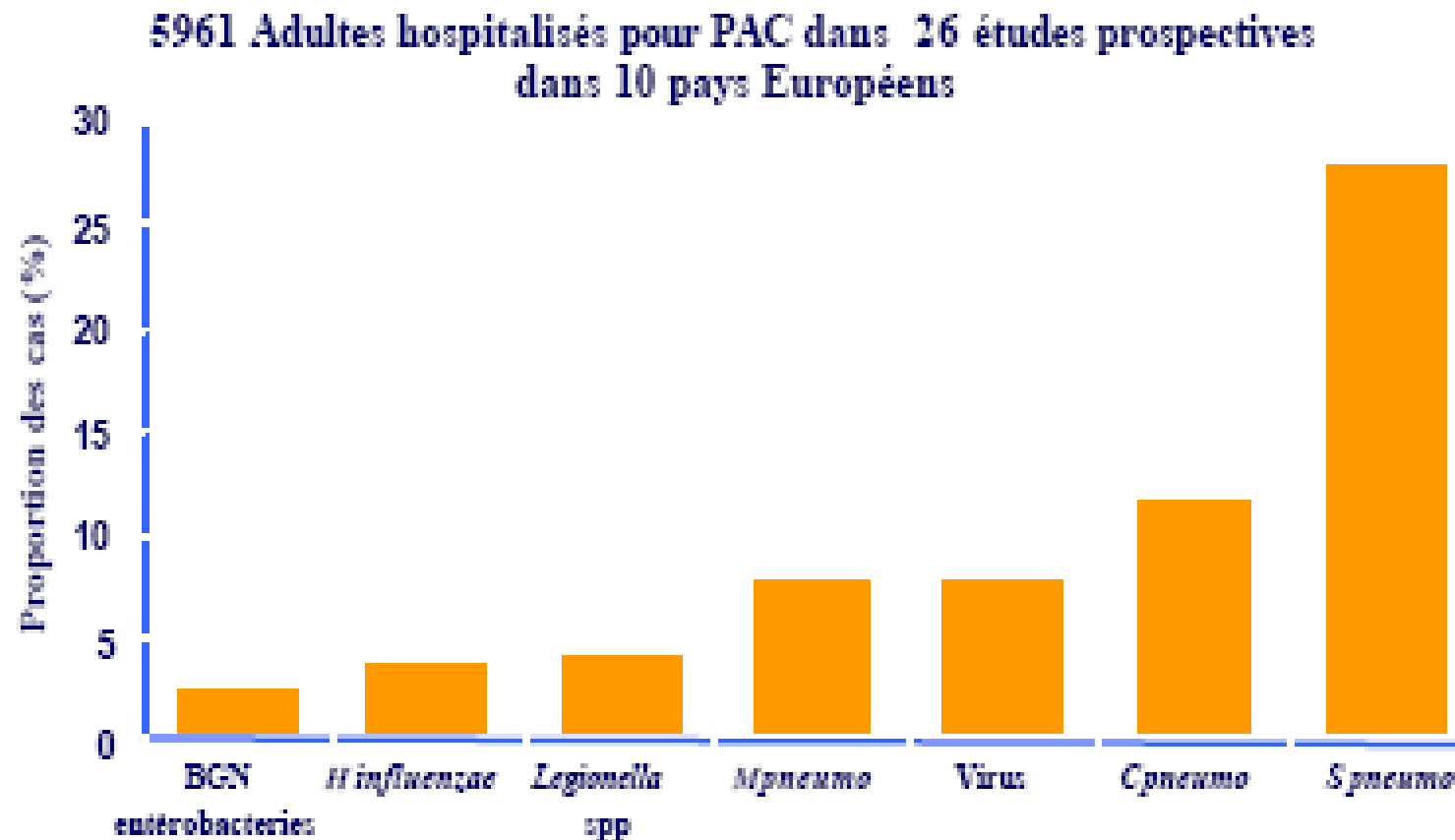
Infections respiratoires « basses » le sketch

	fréquence	hospitalisation
Br.aigue	73%	0.3%
EA. BPCO	16%	2.2%
Pneumonie	10%	12%

Infections respiratoires « basses » le sketch

	fréquence	hospitalisation	mortalité
Br.aigue	73%	0.3%	0
EA. BPCO	16%	2.2%	0.4%
Pneumonie	10%	12%	10-15%

Principaux pathogènes isolés au cours des PAC : Europe



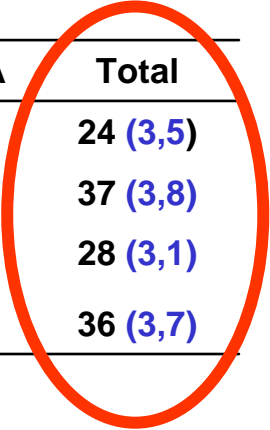
Woodhead MA. *Chest*. 1998;113:183S-187S.

S. pneumoniae : mécanismes de R aux FQ

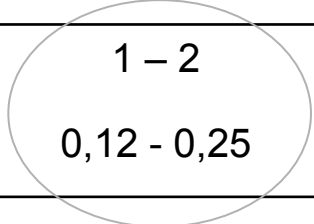
- Modification de cible:
 - mutations ponctuelles successives QRDR+++
 - » (rarement mosaïque)
 - Topoisomérase IV (C₂E₂)
 - Sous-unité C (*parC*)
 - Sous-unité E (*parE*)
 - Gyrase (A₂B₂)
 - Sous-unité A (*gyrA*)
 - Sous-unité B (*gyrB*)
- Efflux actif augmenté
 - *pmrA*
 - FQ “hydrophiles” (Cipro, Norflo)
 - Inhibé par la réserpine
 - Autres pompes ?

S. pneumoniae : résistance aux FQ (IRBA) en France

Année	N souches	Mécanisme de résistance (%)					Total
		ParC	Efflux	ParC+Efflux	GyrA	ParC+GyrA	
2000 - 2001	675	9 (1,3)	6 (0,9)	2 (0,3)	0	7 (1,0)	24 (3,5)
2002	965	14 (1,5)	8 (0,8)	1 (0,1)	0	14 (1,5)	37 (3,8)
2003	968	9 (1,0)	8 (0,9)	2 (0,2)	0	9 (1,0)	28 (3,1)
2004	980	10 (1,0)	17 (1,7)	1 (0,1)	0	8 (0,8)	36 (3,7)



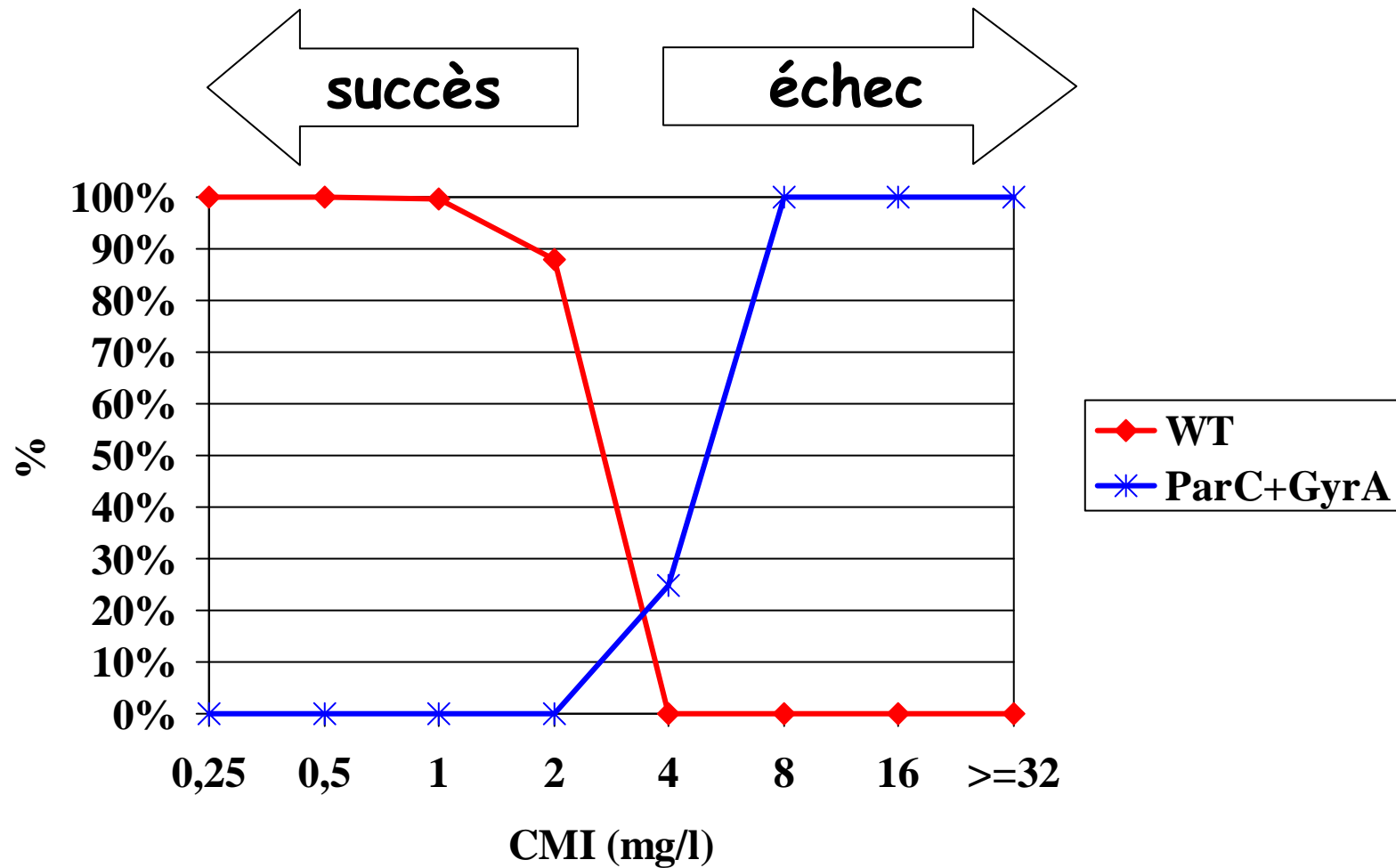
CMI extrêmes, mg/L	ParC	ParC+Efflux	GyrA	ParC+GyrA
Lévofoxacine	1 – 2	2 – 16	-	4 – 32
Moxifloxacine	0,12 - 0,25	0,5	-	2 - ≥8



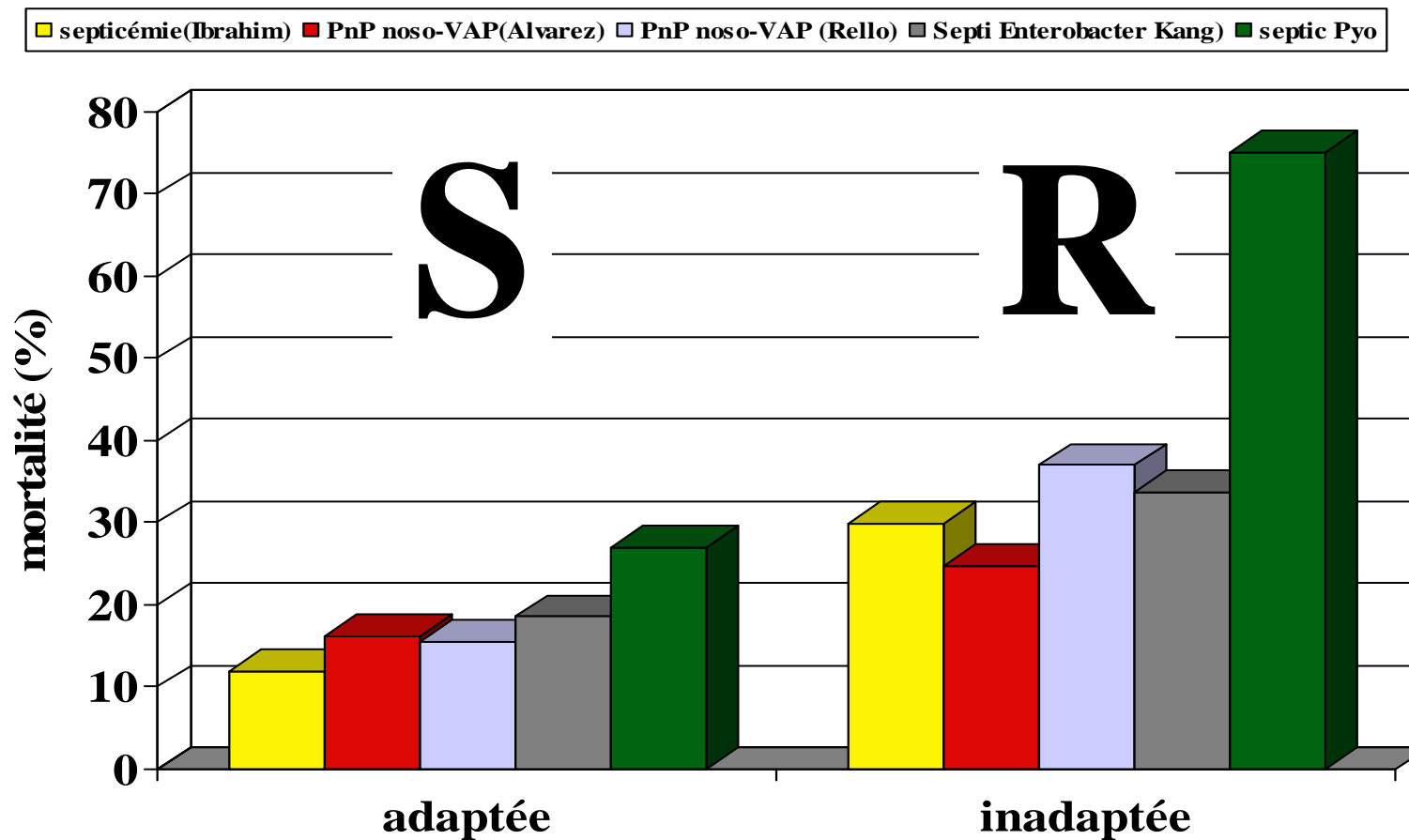
↓
A détecter sur l'antibiogramme
à l'aide de la norfloxacine (Ca-SFM)

Pneumocoque vs fluoroquinolones

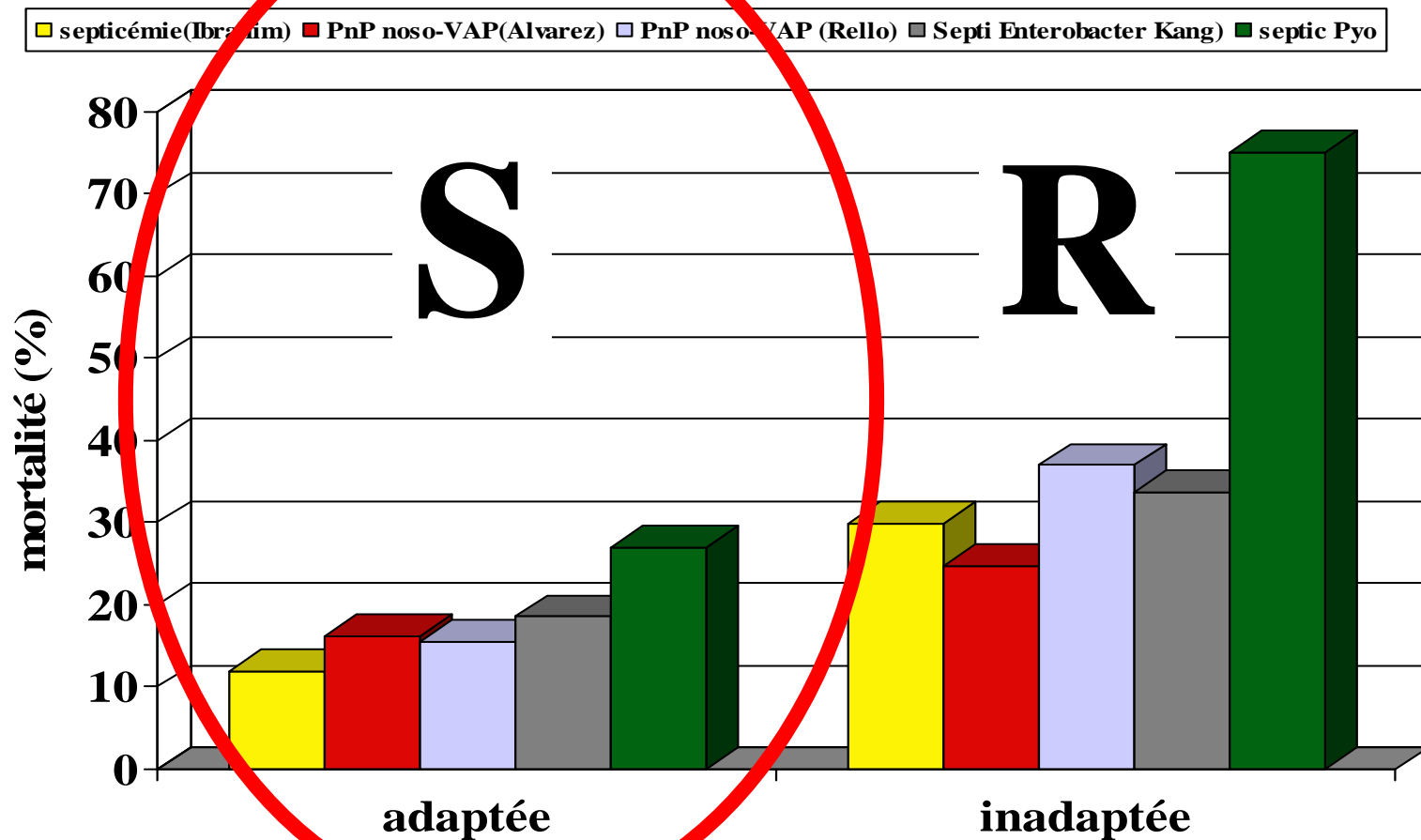
données françaises (CNR)



Une antibiothérapie « inadéquate » => mortalité accrue

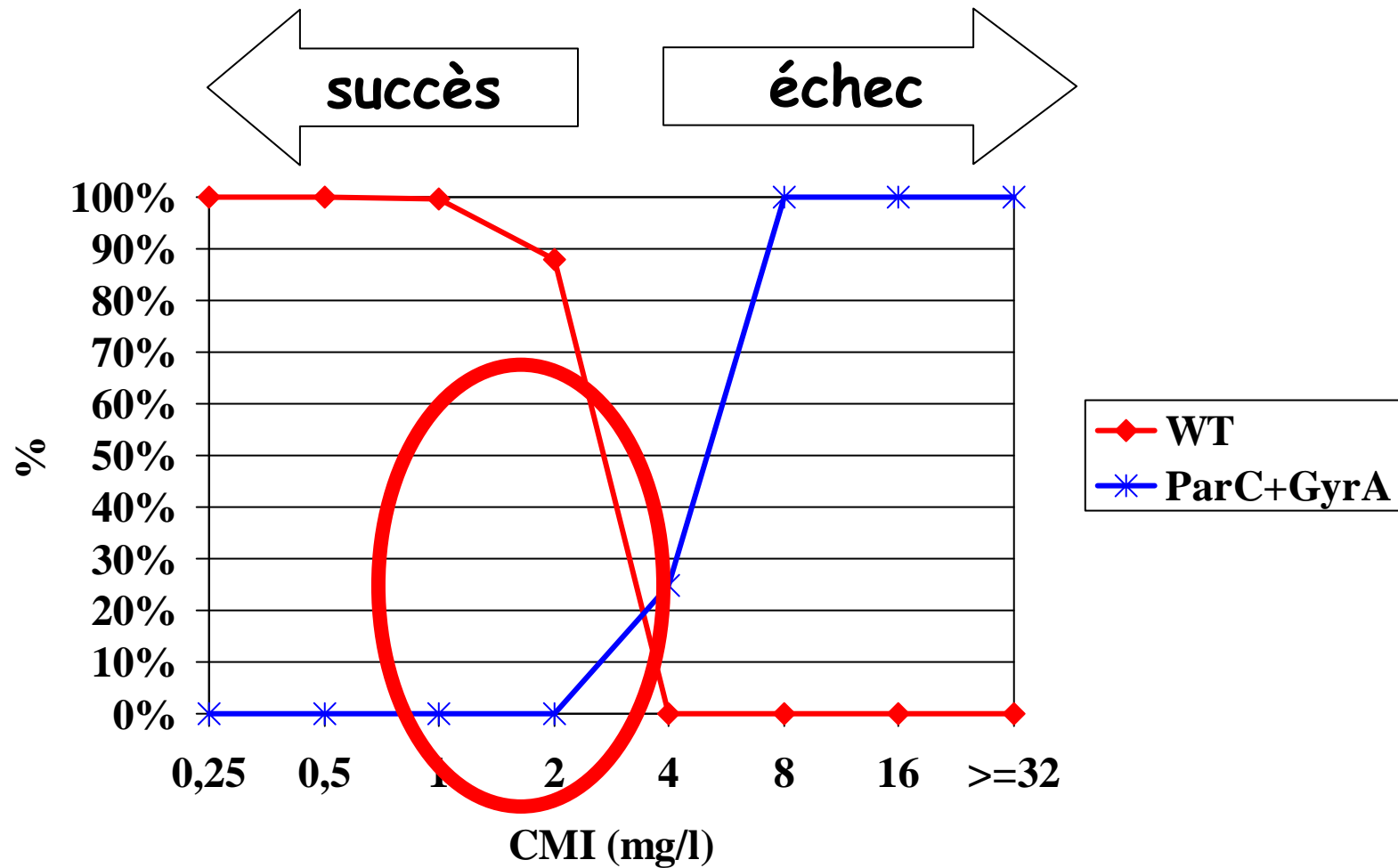


Une antibiothérapie « inadéquate » => mortalité accrue



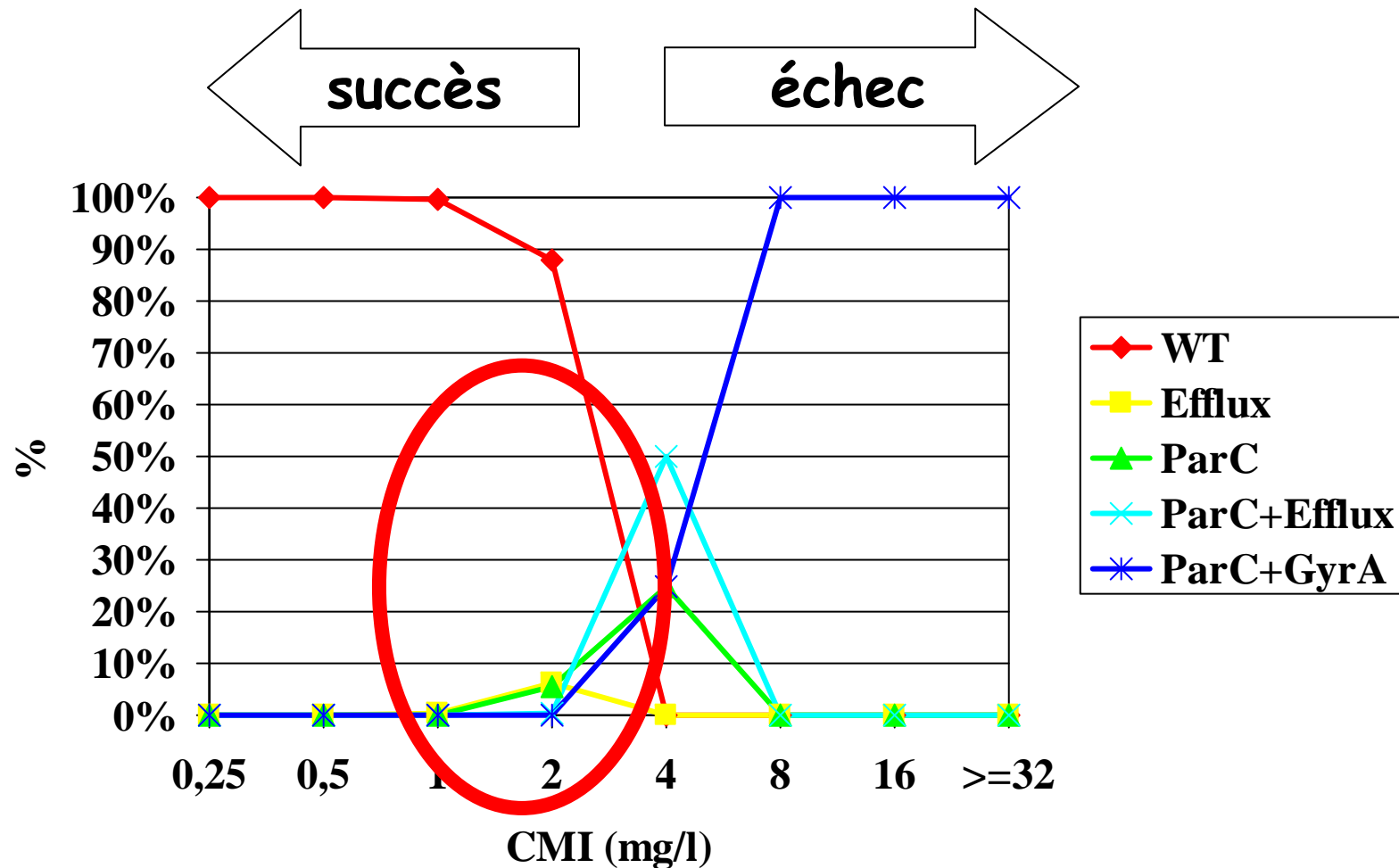
Pneumocoque vs fluoroquinolones

données françaises (CNR)



Pneumocoque vs fluoroquinolones

données françaises (CNR)



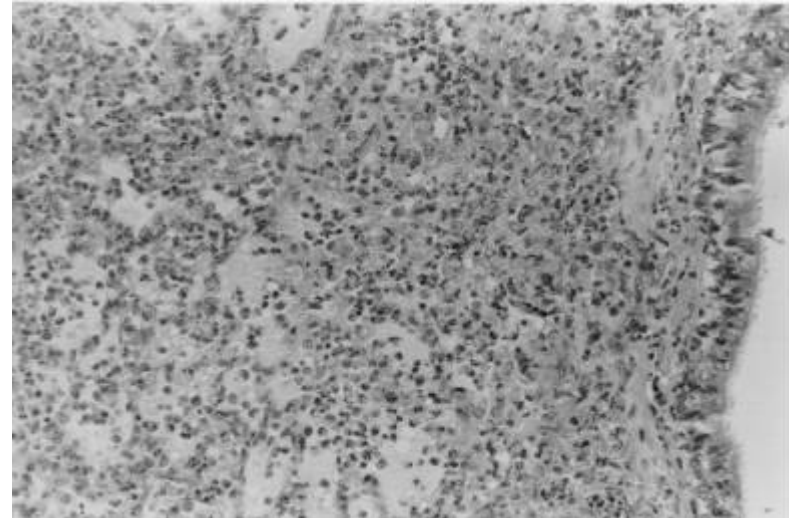
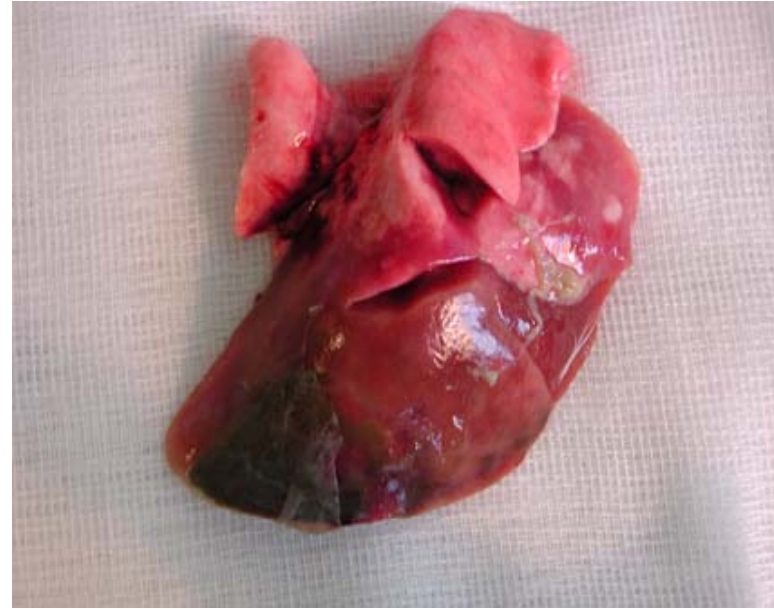
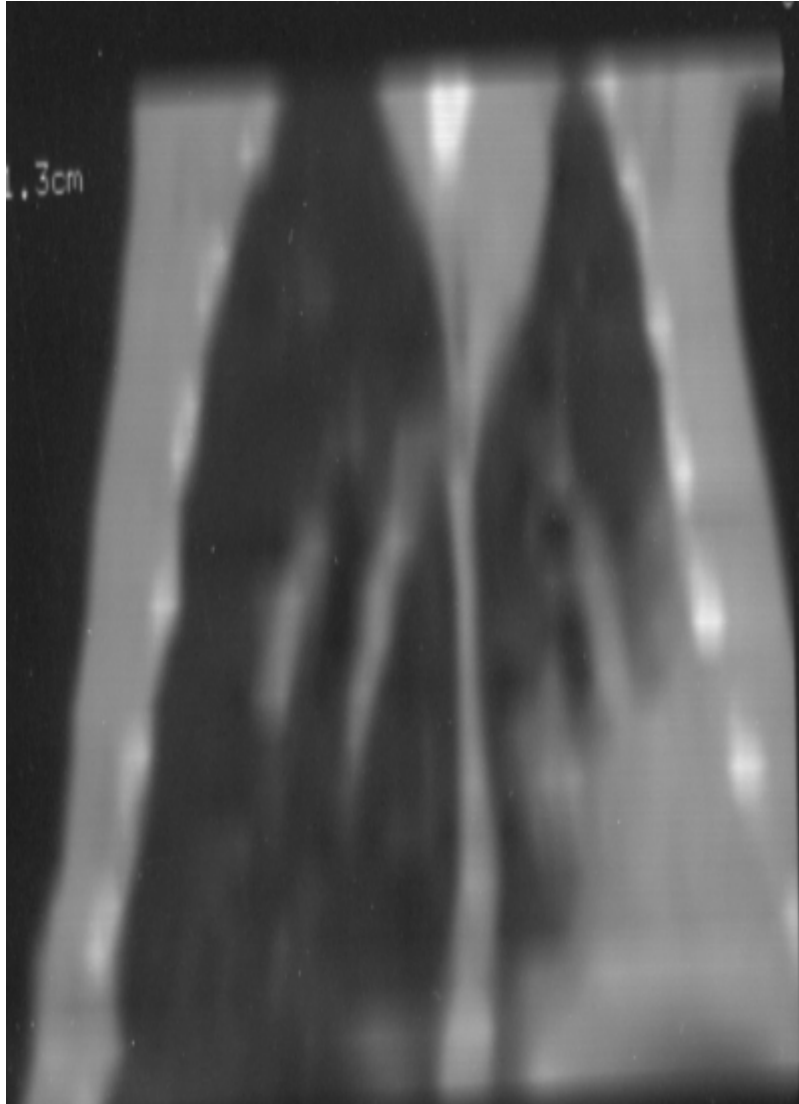
Les concentrations critiques

	CMI (mg/l)		
Cipro	1	2	4
levo	≤ 0.25	1	≥ 2
moxiflo	≤ 0.12	0.25	≥ 0.5
gatiflo	≤ 0.25	0.5	≥ 1

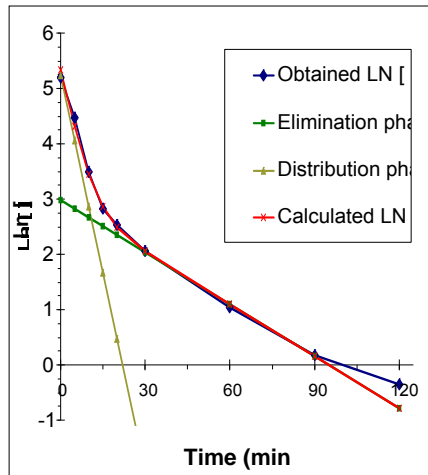
Fréquence des mutations « bas niveaux »

	CMI (mg/l)		
<u>% avec ≥ 1 mutation</u>			
Cipro	1	2	4
	21	16	52
levo	≤ 0.25	1	≥ 2
	0-14	6-27	5-100
moxiflo	≤ 0.12	0.25	≥ 0.5
	9	53	75
gatiflo	≤ 0.25	0.5	≥ 1
	10	52	80

Pneumonie expérimentale à (Dijon)



Traitement humanisé

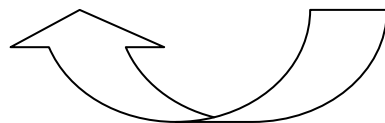


ordinateur

Pompe pilotée



PK individuelle

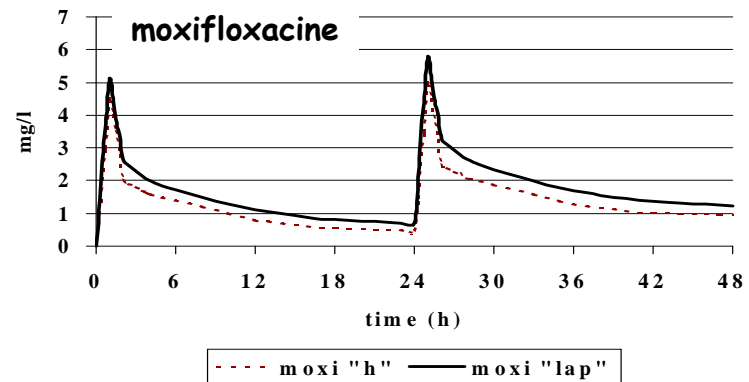
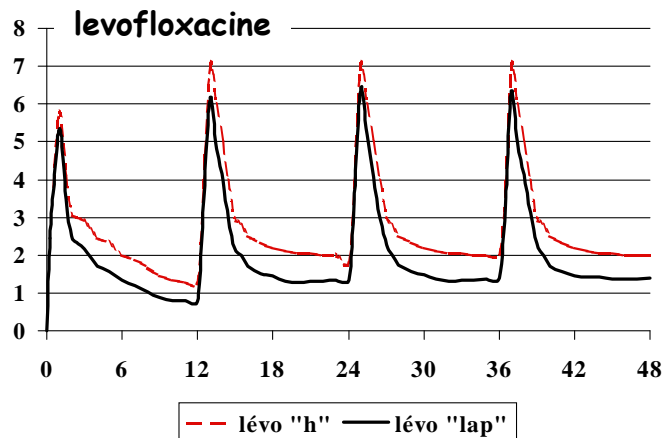
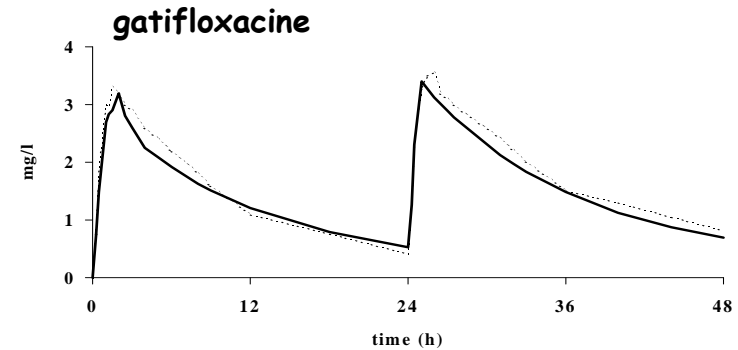
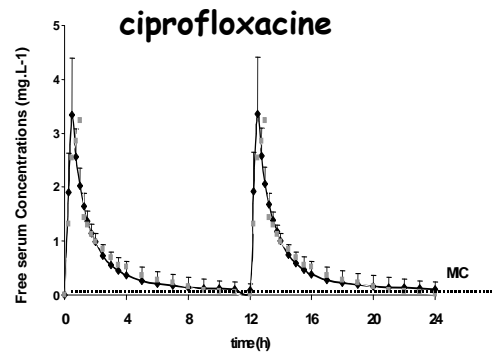


Pneumonie expérimentale

choix des traitements

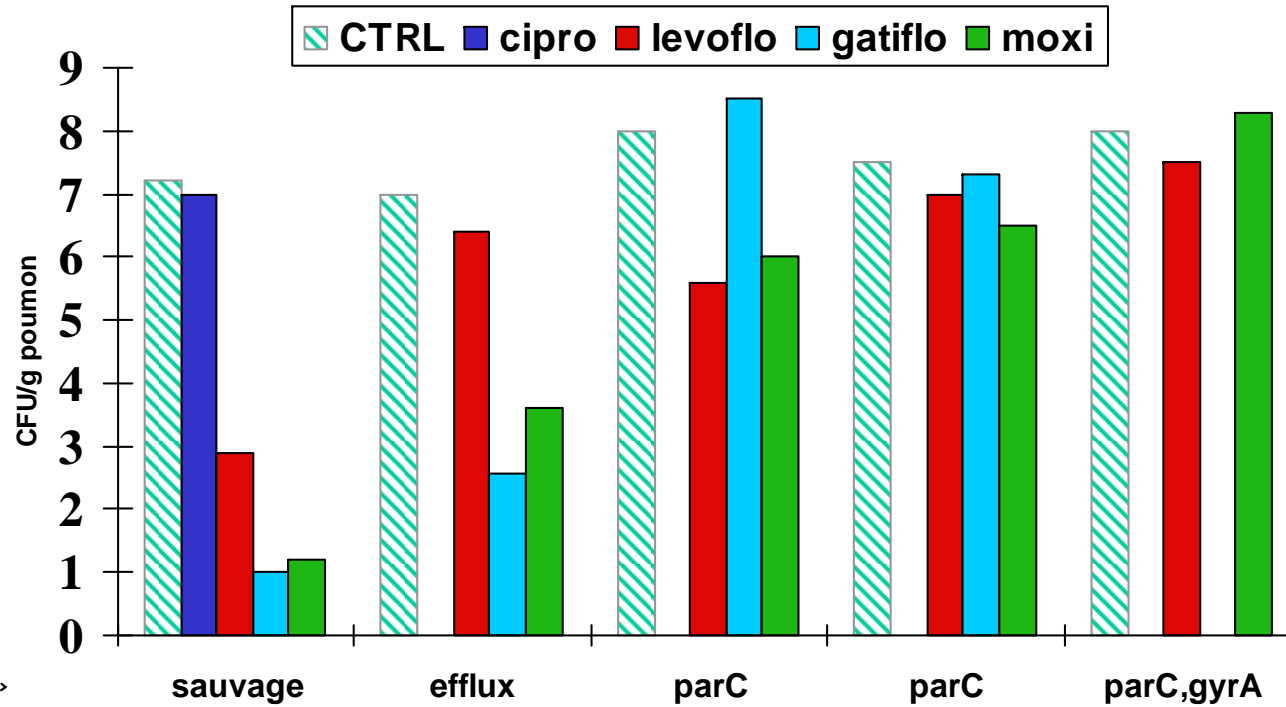
Traitement humanisé:

Ciprofloxacin IV: 400mg × 2
 levofloxacin po: 500mg × 2
 gatifloxacin po: 400mg × 1
 moxifloxacin po: 400mg × 1



Pneumocoque vs efficacité FQ *in vivo*

concentration bactérienne pulmonaire résiduelle à l'issue du traitement

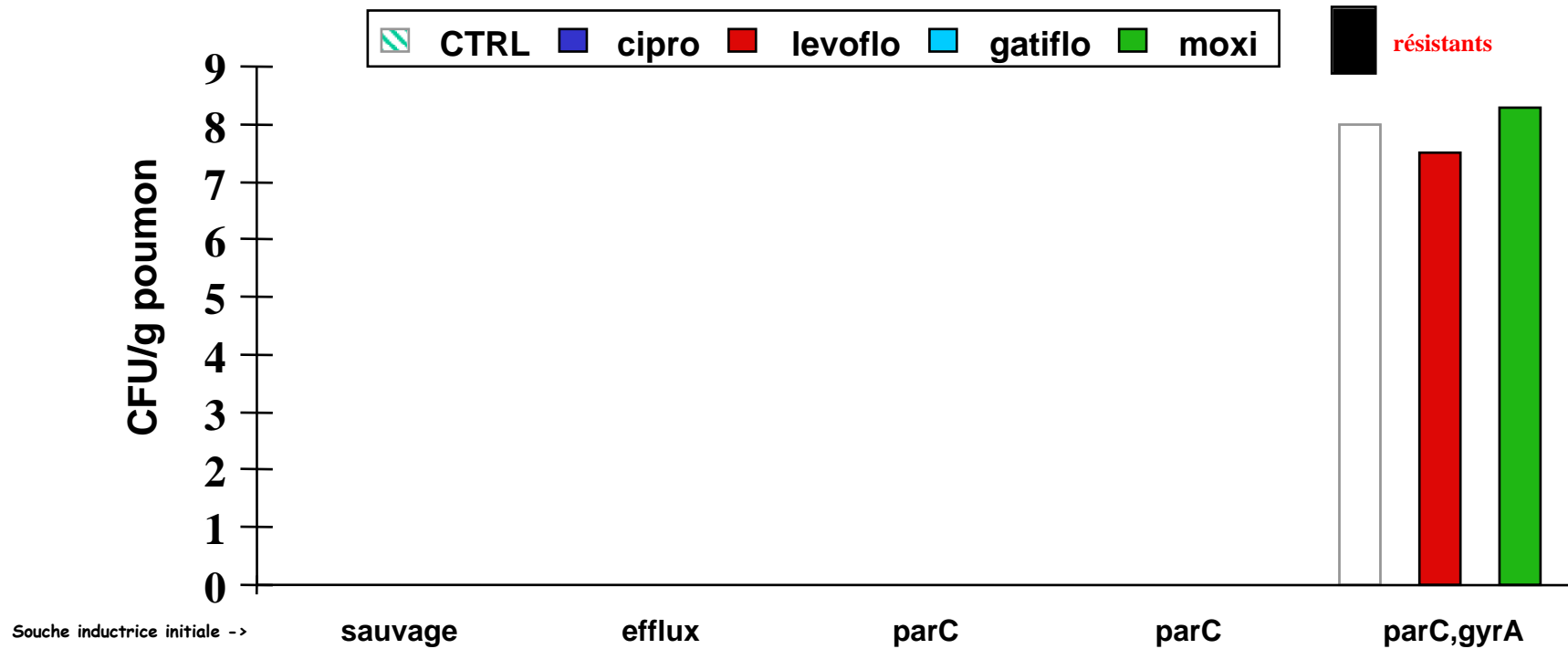


Souche inductrice initiale ->

CMIS/R
Cipro	0.5				
Levo	0.5	1	2	2	
Gati	0.125	0.25	1	1	4
Moxi	0.125	0.125	1	1	4

Pneumocoque vs efficacité FQ *in vivo*

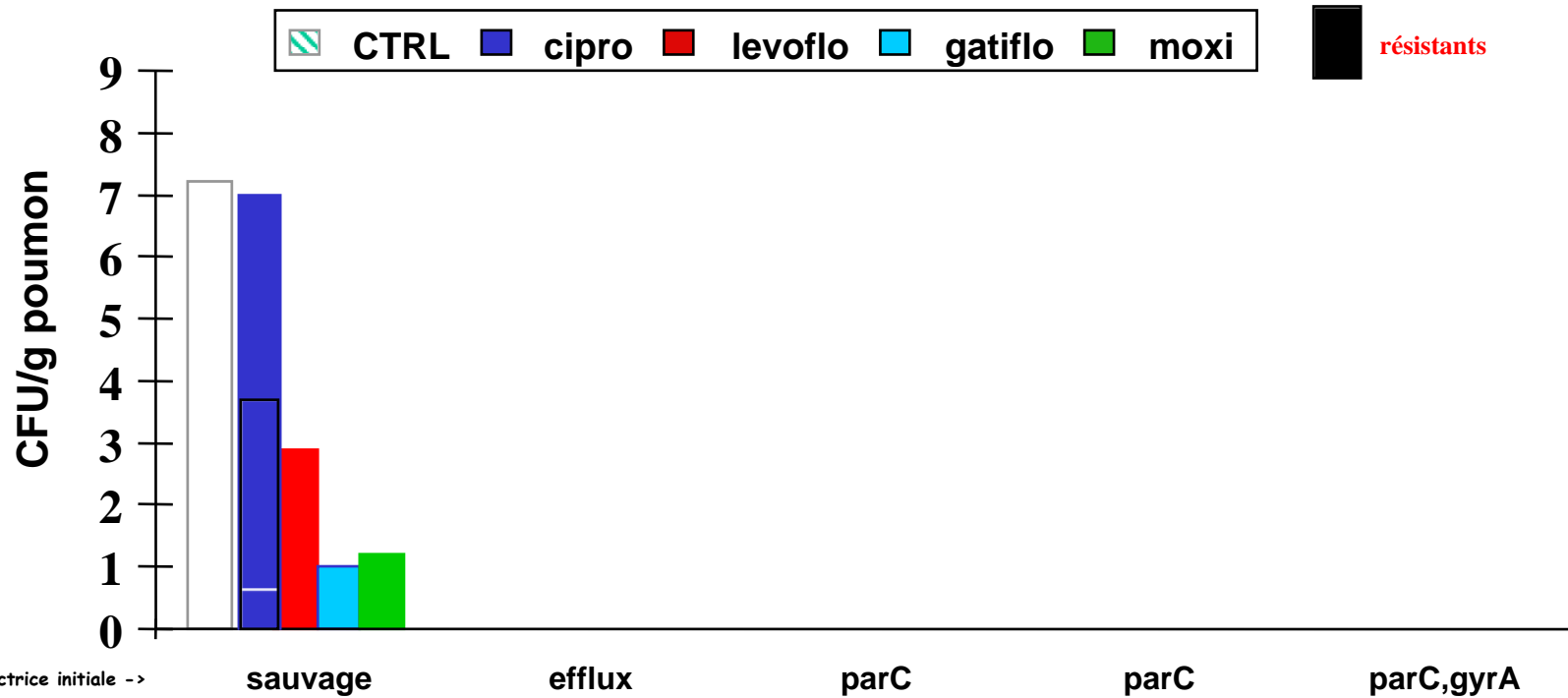
Survivants résistants à l'issue du traitement



CMIS/R
Cipro	0.5					
Levo	0.5	1	2		2	
Gati	0.125	0.25	1		1	4
Moxi	0.125	0.125	1		1	4

Pneumocoque vs efficacité FQ *in vivo*

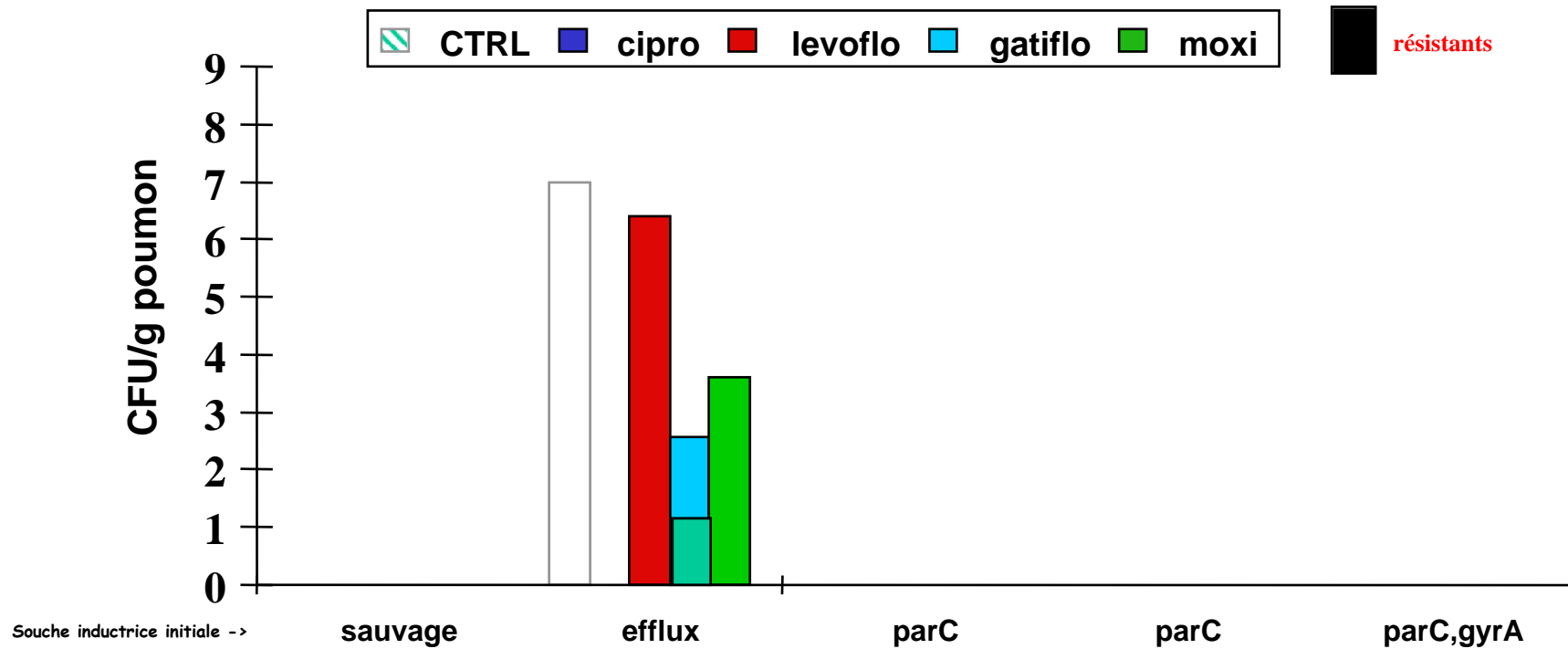
Survivants résistants à l'issue du traitement



CMIS/R
Cipro	0.5					
Levo	0.5	1	2	2		
Gati	0.125	0.25	1	1		4
Moxi	0.125	0.125	1	1		4

Pneumocoque vs efficacité FQ *in vivo*

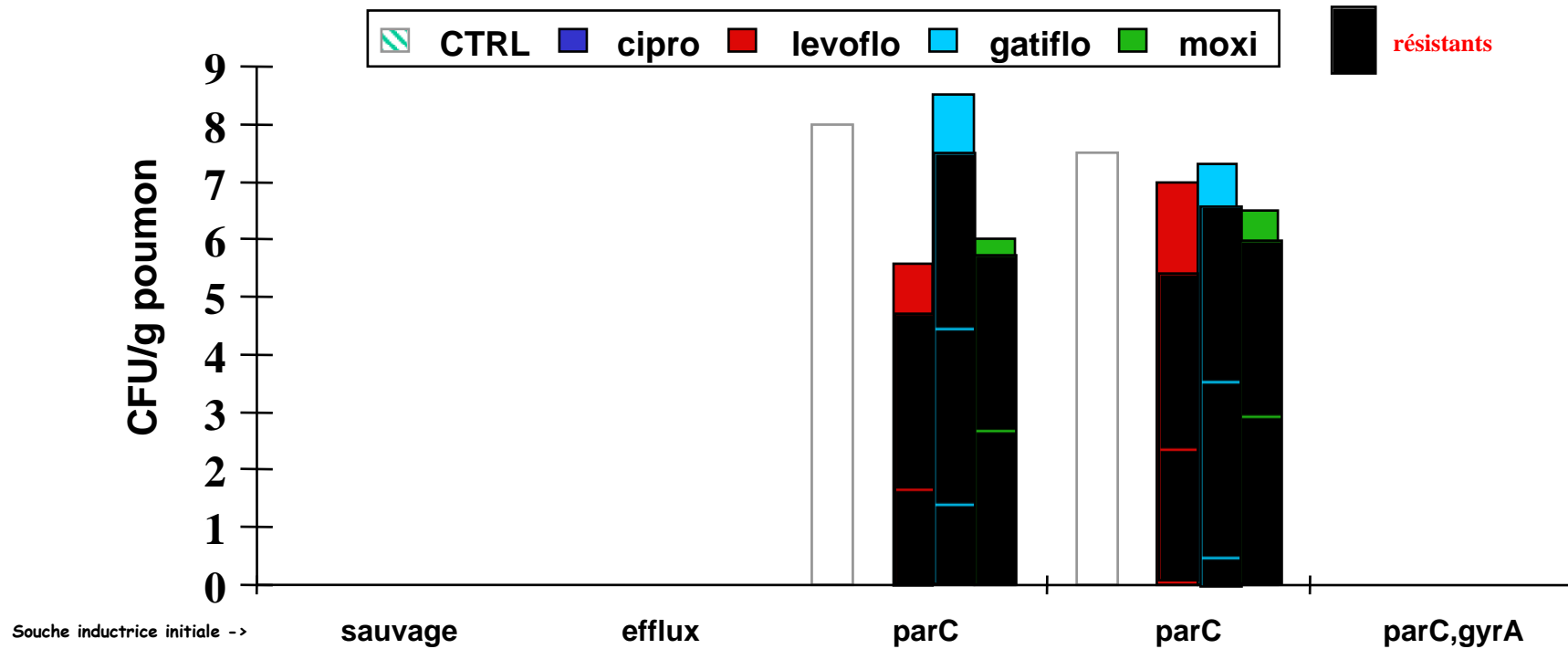
Survivants résistants à l'issue du traitement



CMIS/R
Cipro	0.5					
Levo	0.5	1	2	2		
Gati	0.125	0.25	1	1		4
Moxi	0.125	0.125	1	1		4

Pneumocoque vs efficacité FQ *in vivo*

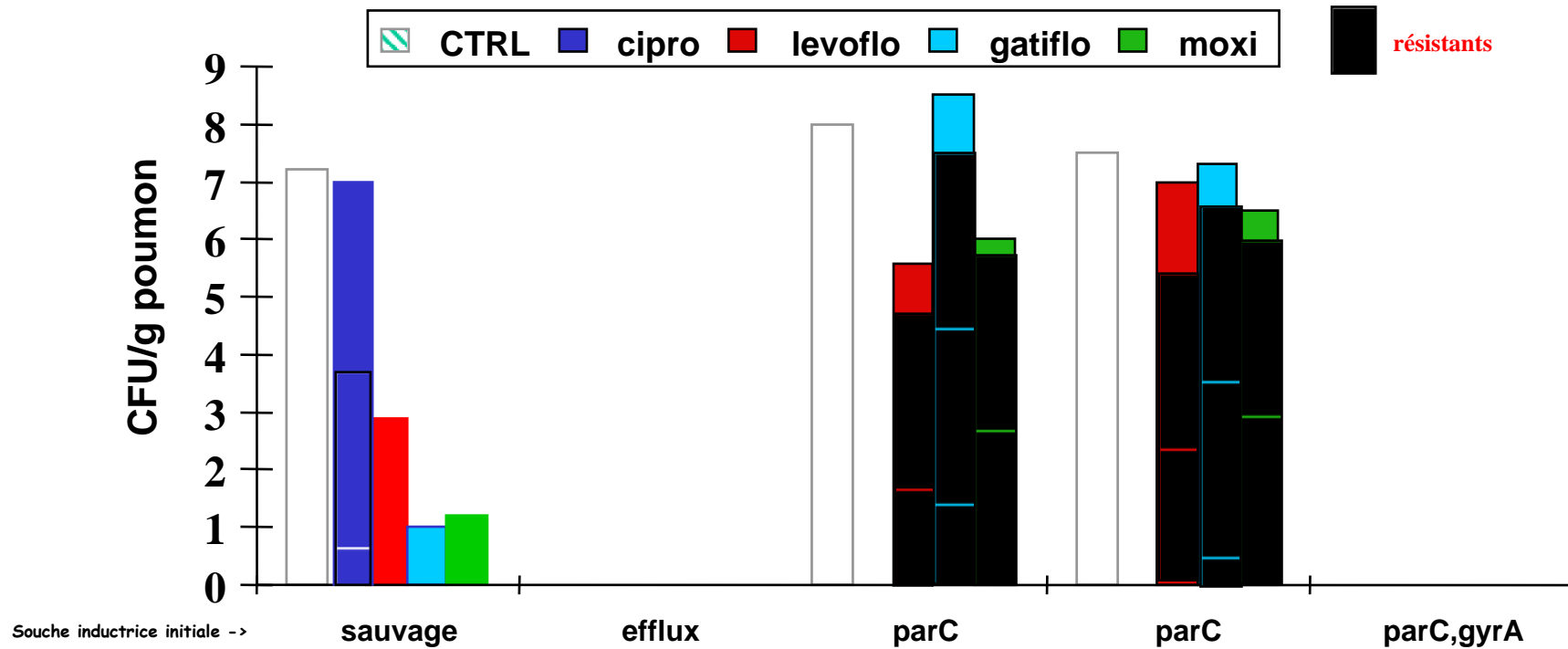
Survivants résistants à l'issue du traitement



CMIS/R
Cipro	0.5				
Levo	0.5	1	2	2	
Gati	0.125	0.25	1	1	4
Moxi	0.125	0.125	1	1	4

Pneumocoque vs efficacité FQ *in vivo*

Survivants résistants à l'issue du traitement



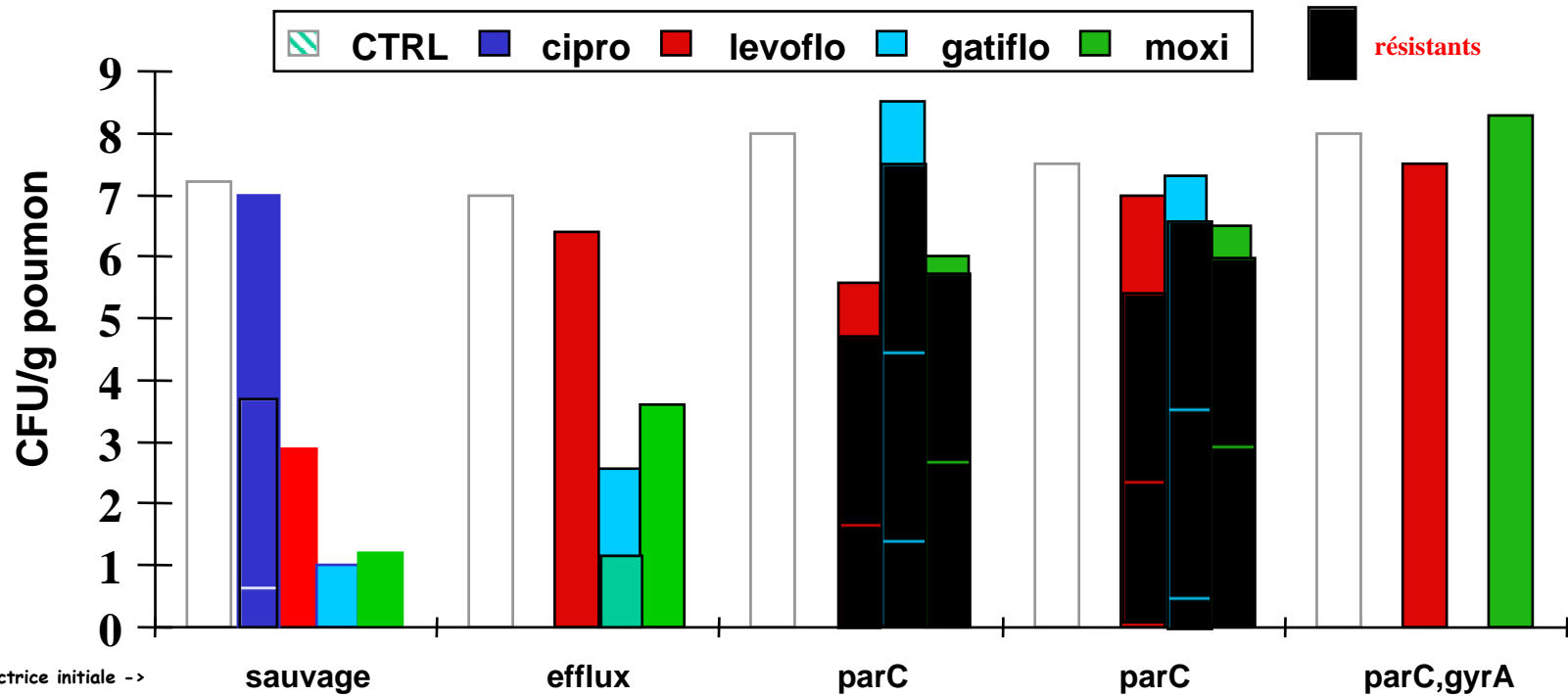
CMIS/R
Cipro	0.5					
Levo	0.5	1	2	2		
Gati	0.125	0.25	1	1		4
Moxi	0.125	0.125	1	1		4

PnP pneumocoque vs Fluoroquinolones
apport du modèle expérimental

Conclusion 1a

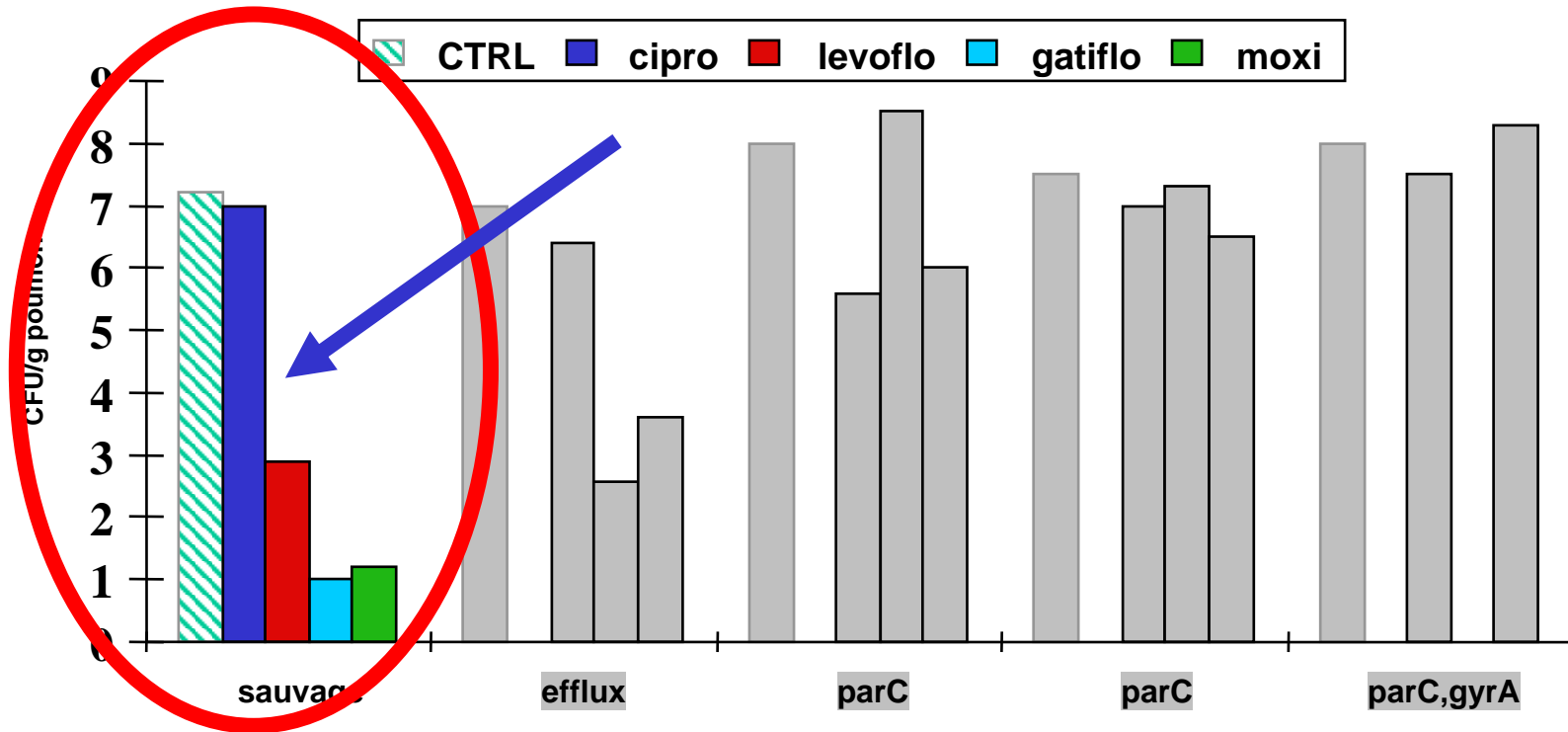
- **Un traitement par fluoroquinolone**
- **d ' une pneumonie à pneumocoque**
 - **sauvage exposée à cipro**
 - **ou**
 - **avec résistance à bas niveau exposée à levo ou moxiflo**
- **s 'accompagne:**
 - **d 'une faible réduction bactérienne**
 - **de la sélection de mutants résistants**
- **Danger d'une préexposition par une fluoroquinolone peu active**

concentration critique in vitro vs concentration critique clinique ?
ou
dépistage de la résistance à bas niveau ?



CMIS/R
Cipro	0.5				
Levo	0.5	1	2	2	
Gati	0.125	0.25	1	1	4
Moxi	0.125	0.125	1	1	4

Pneumocoque vs efficacité FQ *in vivo* (réduction bactérienne)



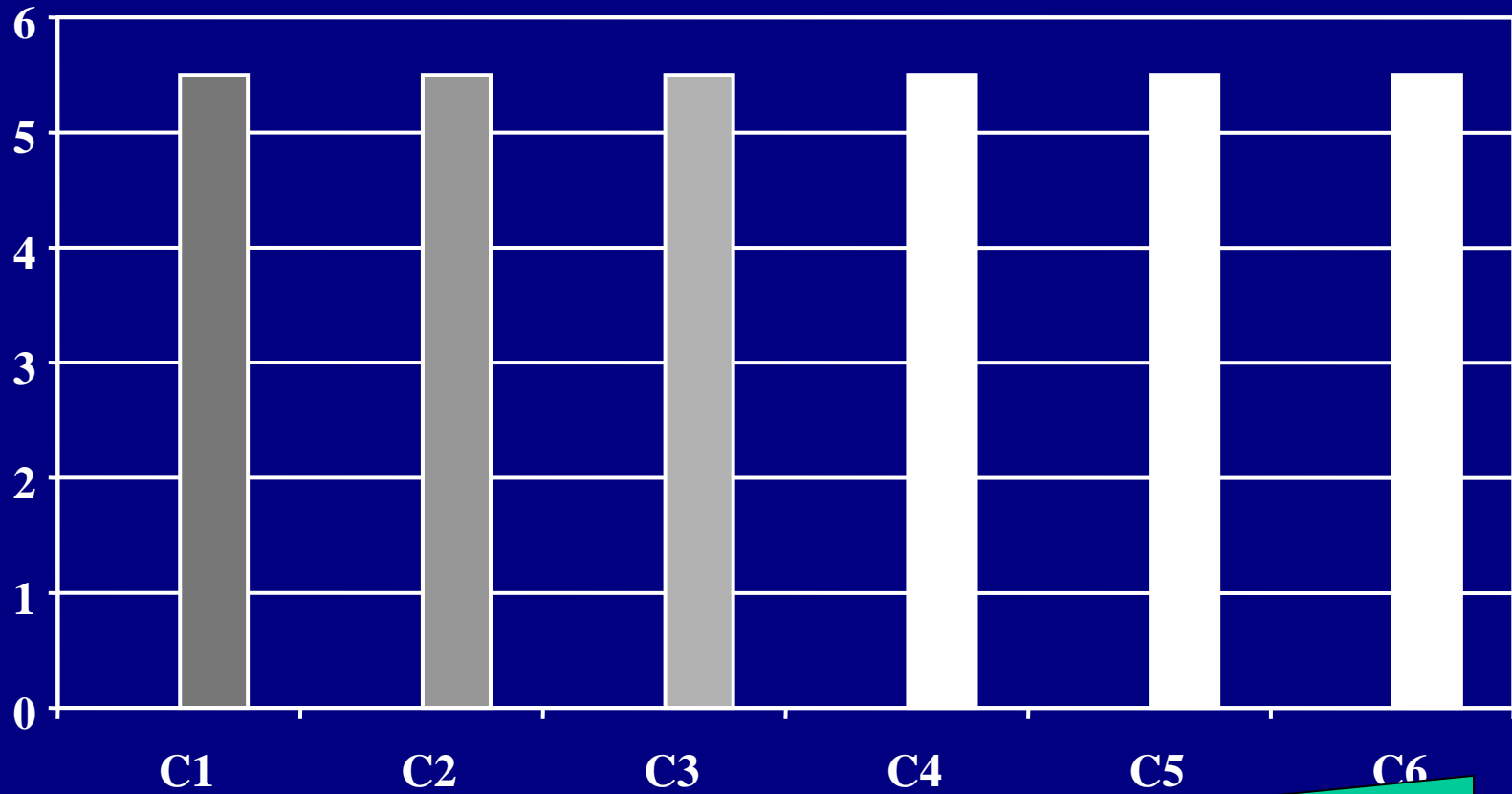
CMI	
Cipro	0.5
Levo	0.5
Gati	0.125
Moxi	0.125

Concentration minimale inhibitrice (CMI) *in vitro*

Concentration de prévention de la mutation (CPM) *in vitro*

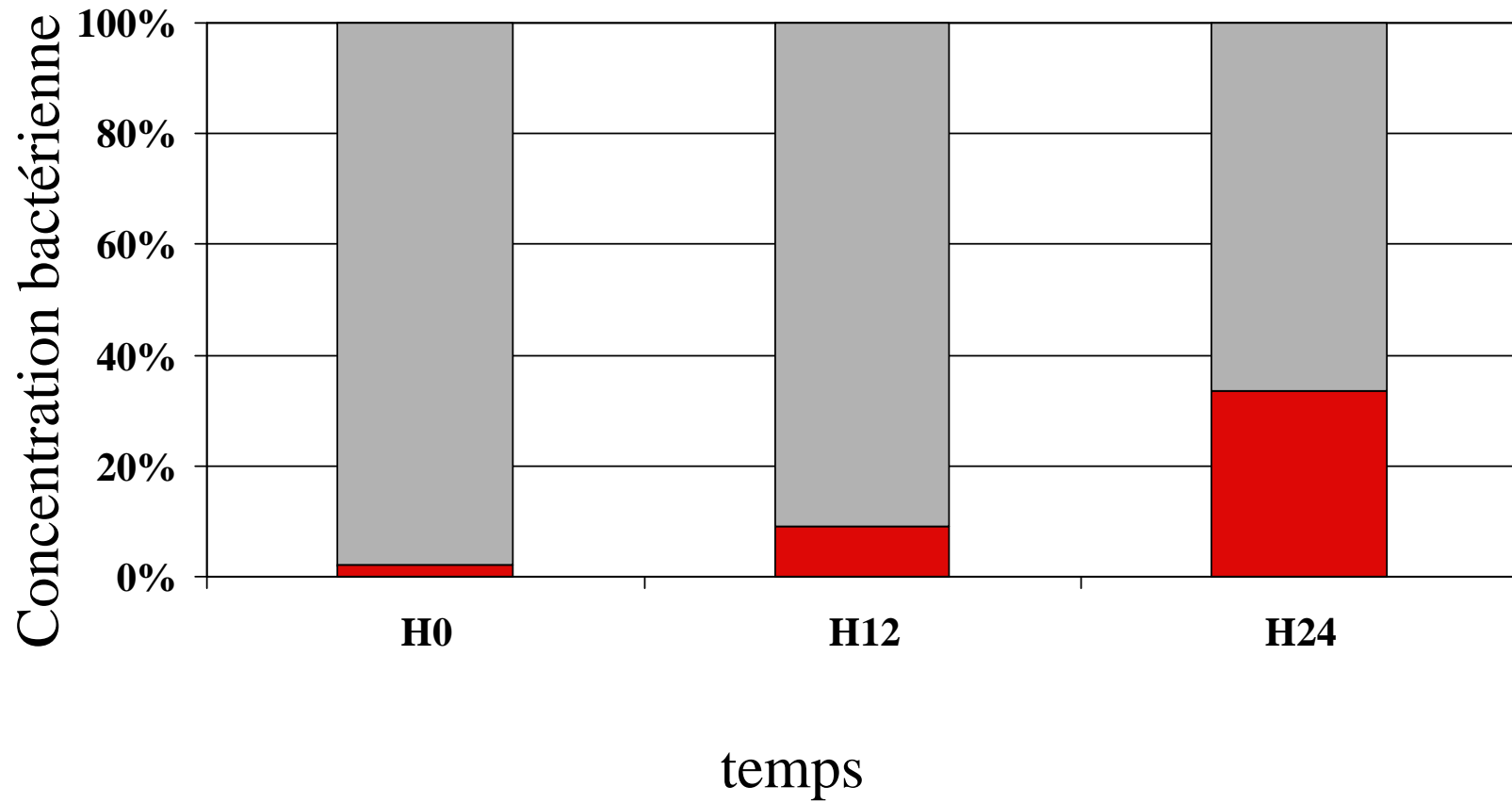
	CMI	CPM
inoculum (log CFU/ml)	5-6	>10
	10^{5-6}	$10^{>10}$
incubation (h)	24	48(72)
au delà	mutants	pas de mutant

CMI

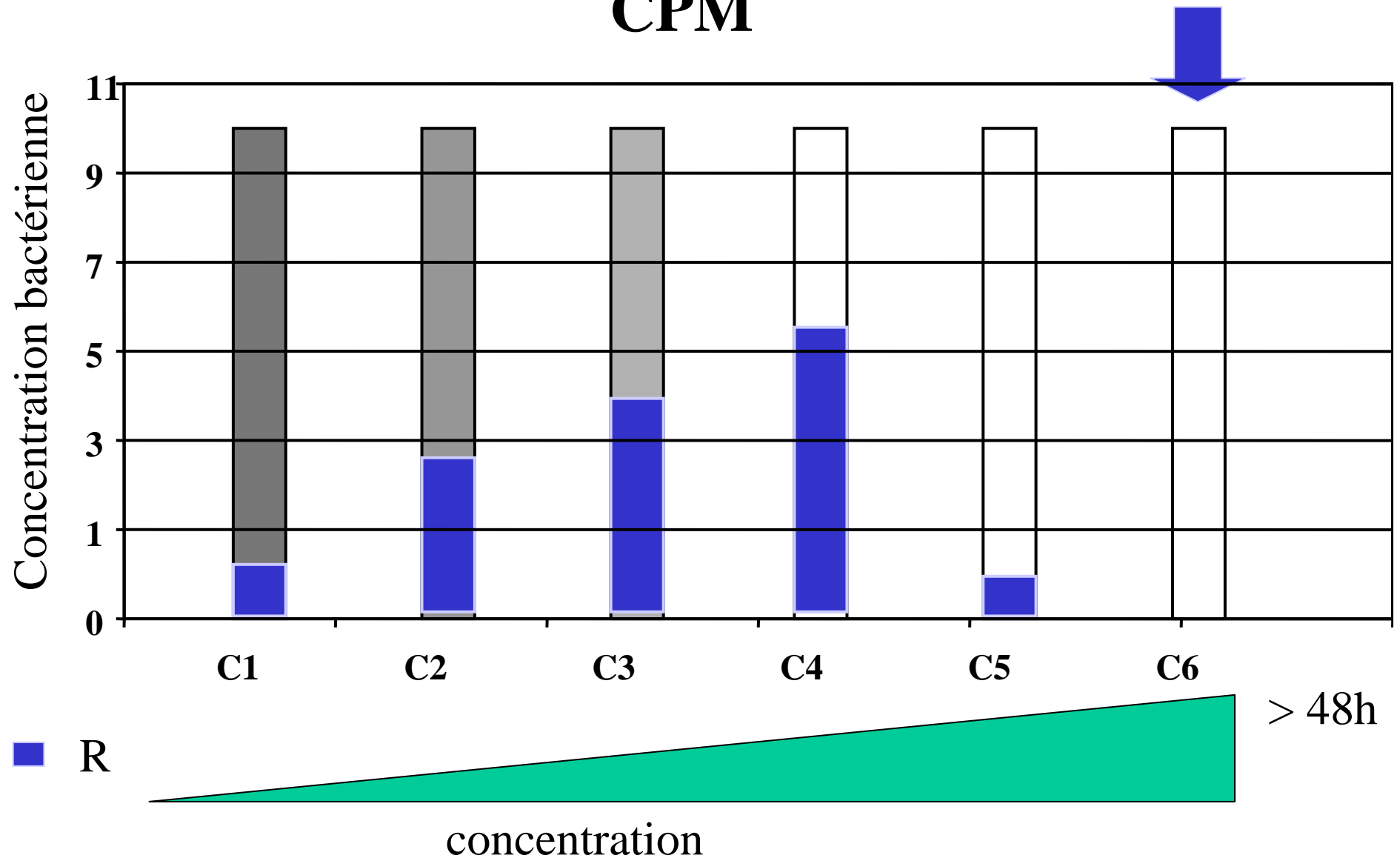


concentration

CMI

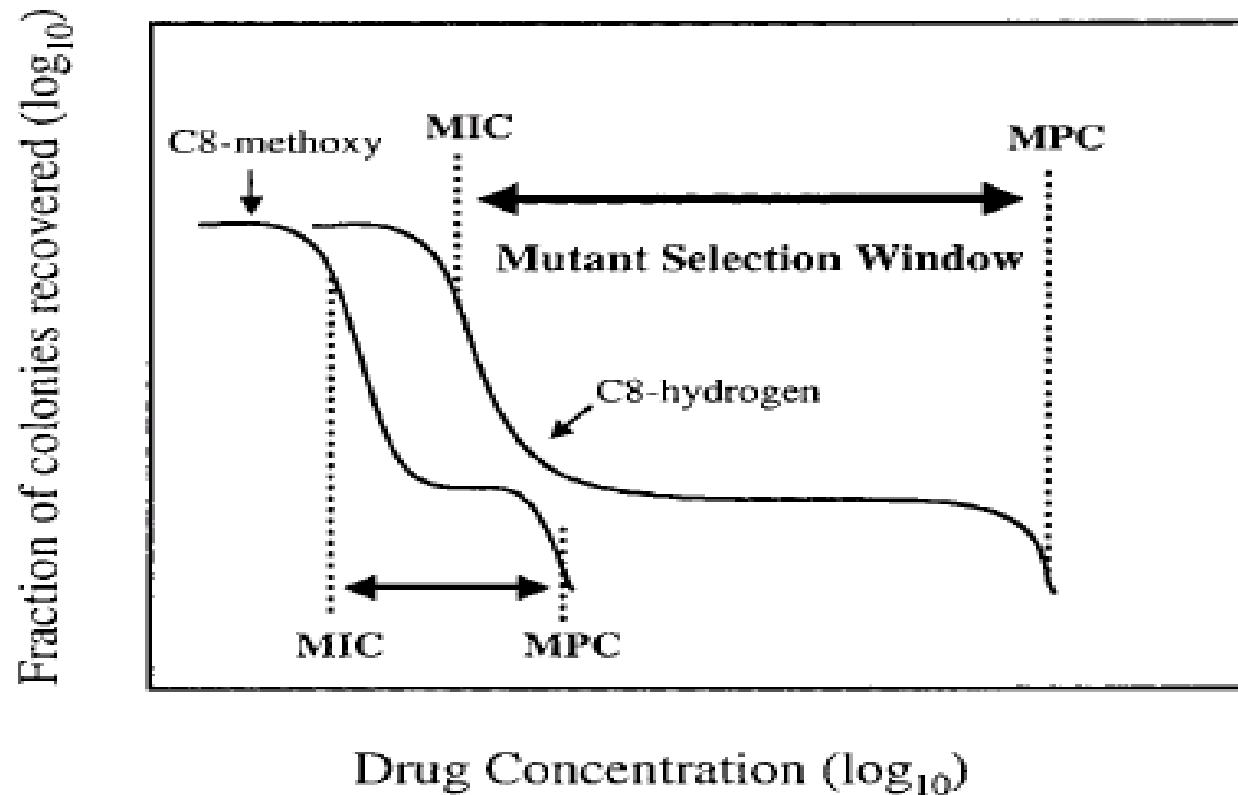


Concentration de Prévention de Mutation- CPM

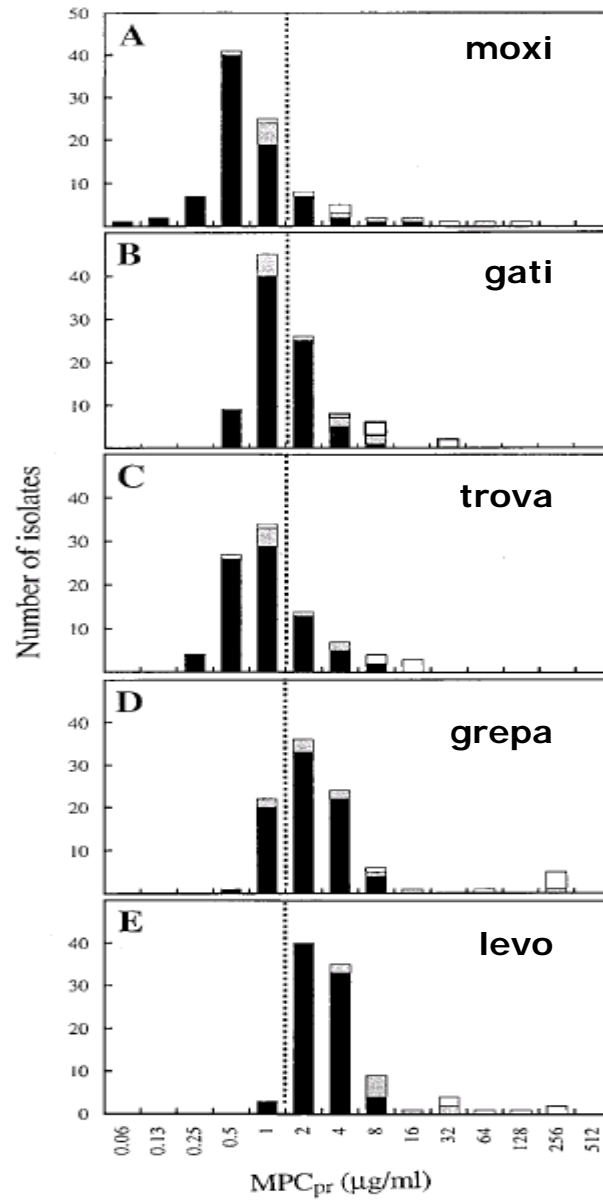


Activité intrinsèque: MIC vs MPC

« côté molécule »



Pneumo

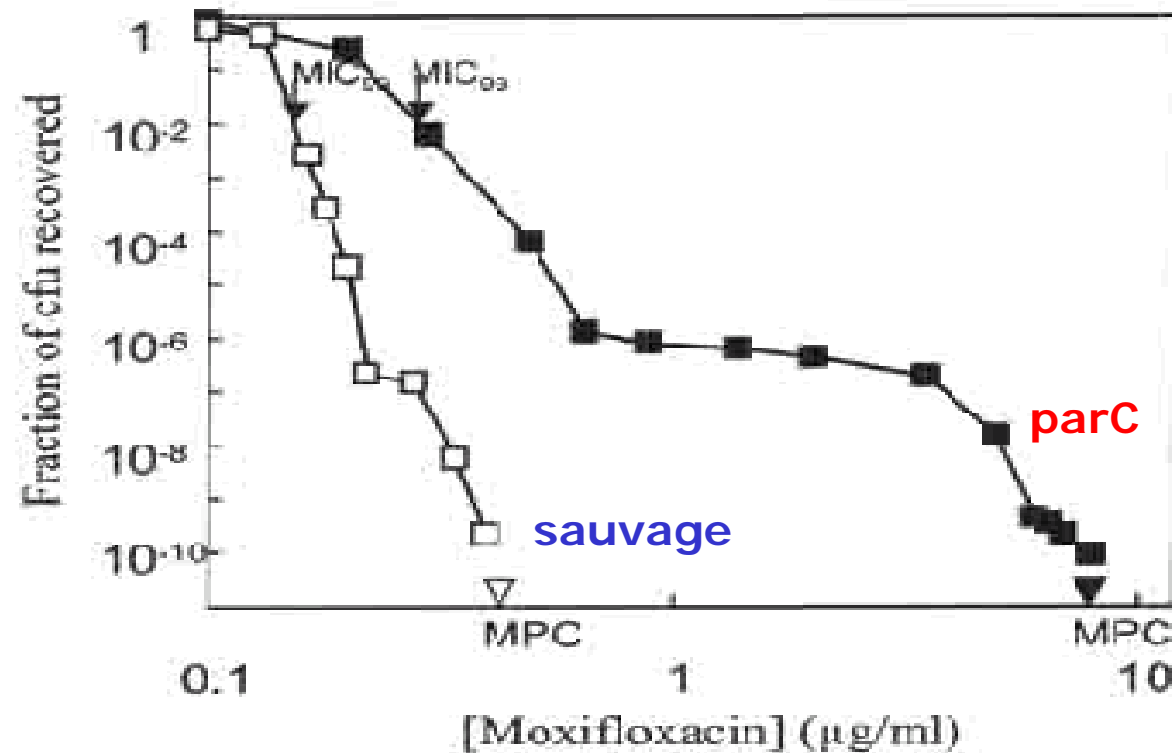


	MIC ₉₀	MPC ₉₀
Moxi	0.25	2
Gati	0.5	4
Trova	0.25	4
Grepa	0.5	8
Levo	1	8

MIC vs MPC

Impact de la 1ere marche de résistance

« côté bactérie »



Wild type vs parC

Pneumo: au départ c'est lequel ?

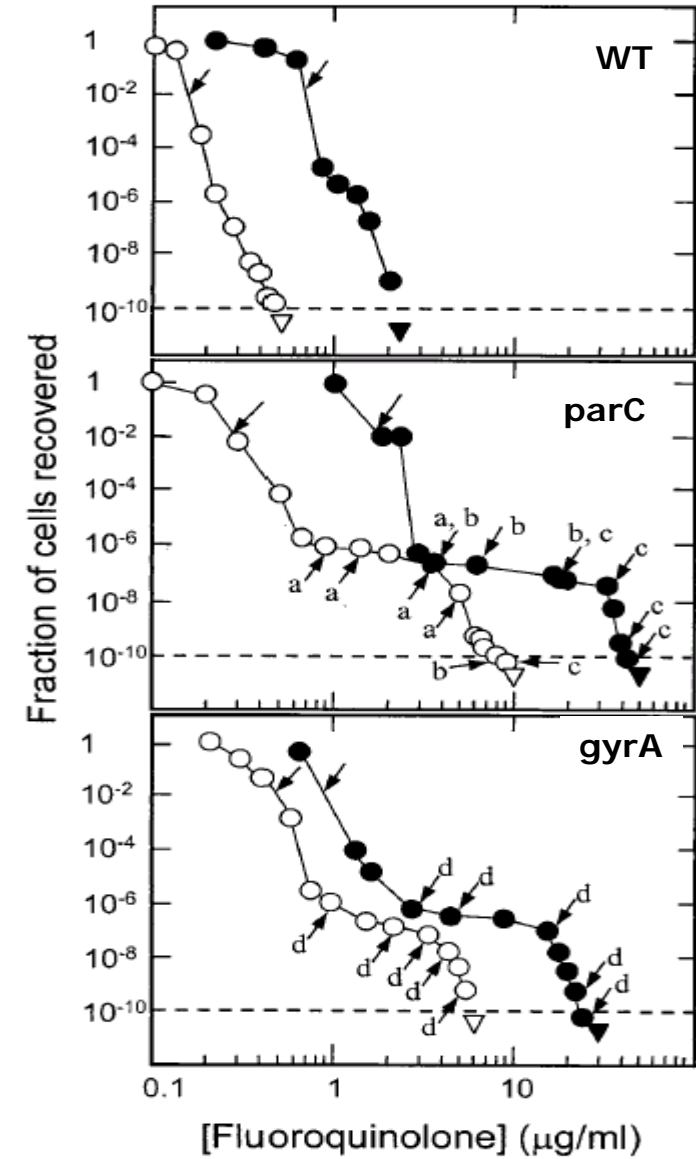
10 logCFU

Rond vide : Moxi

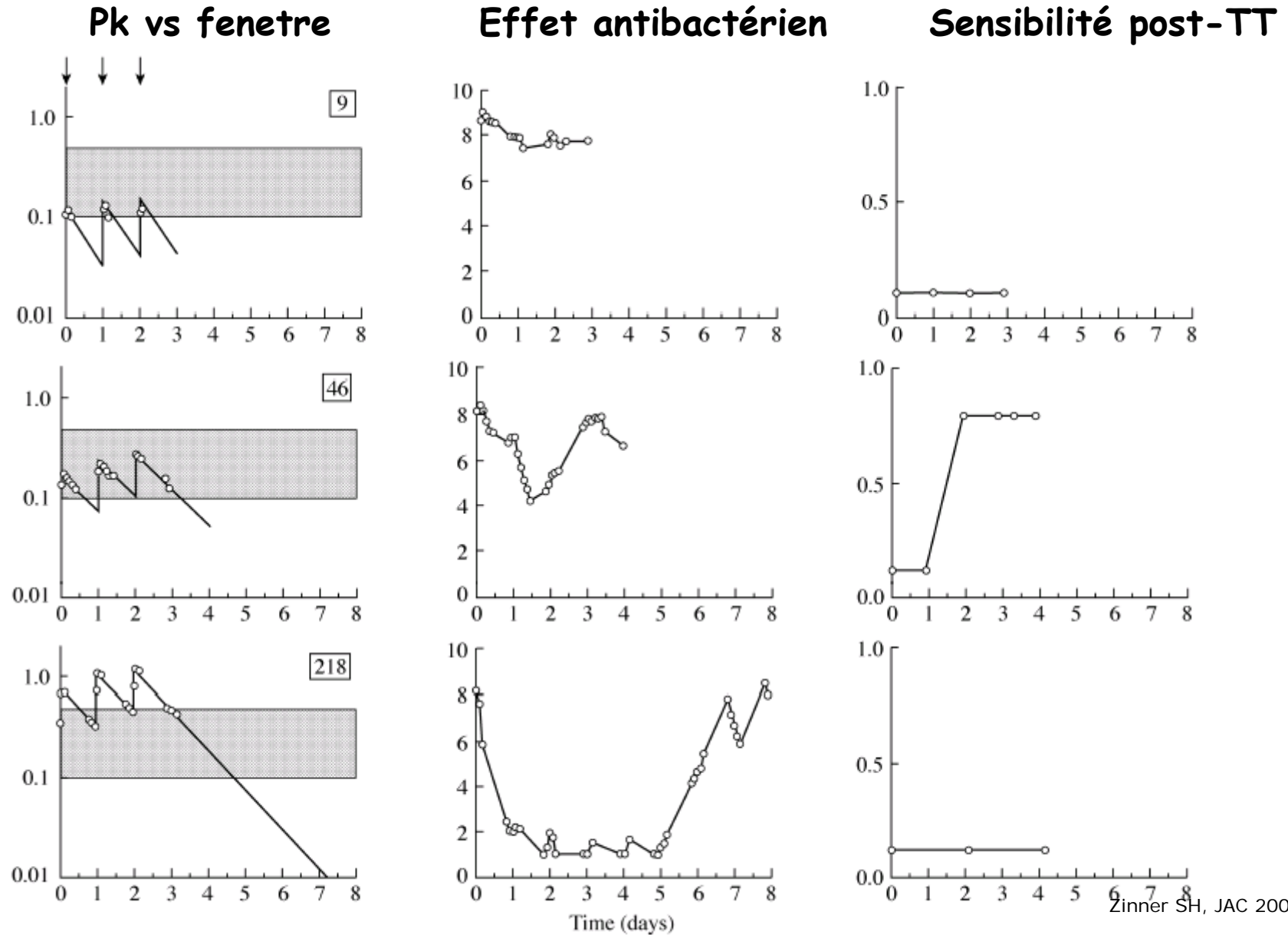
Rond plein : Levo

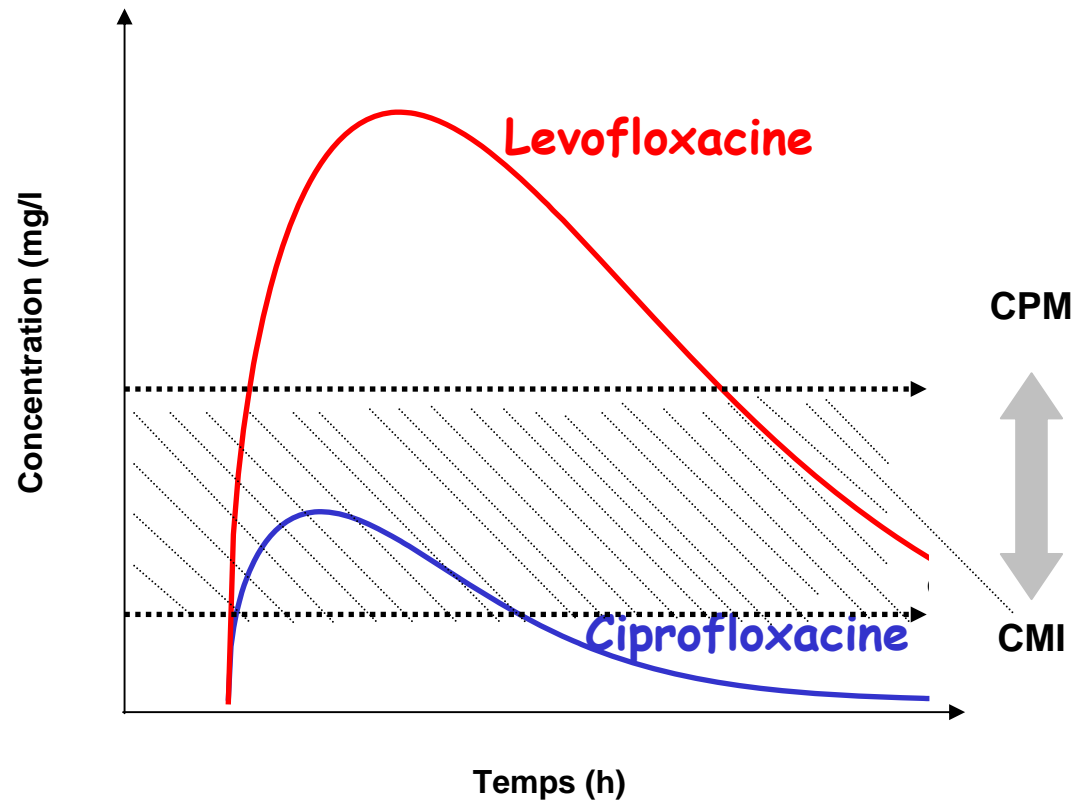
Triangle vide: MIC

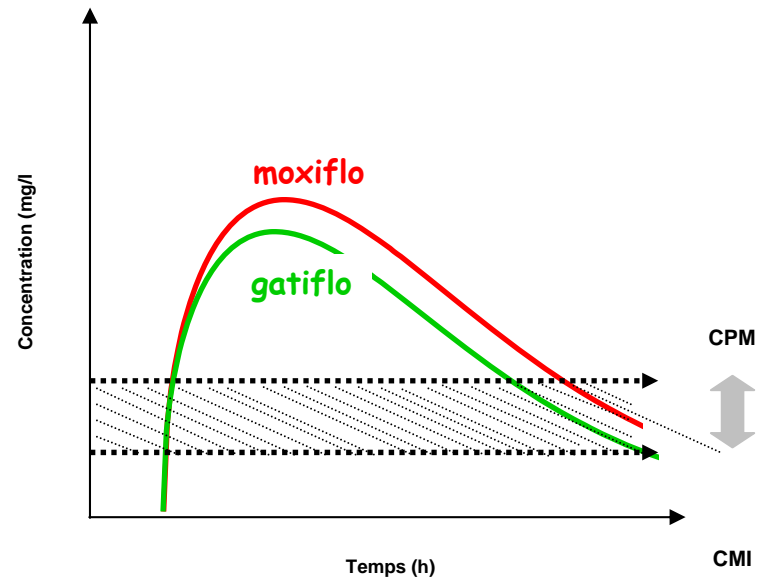
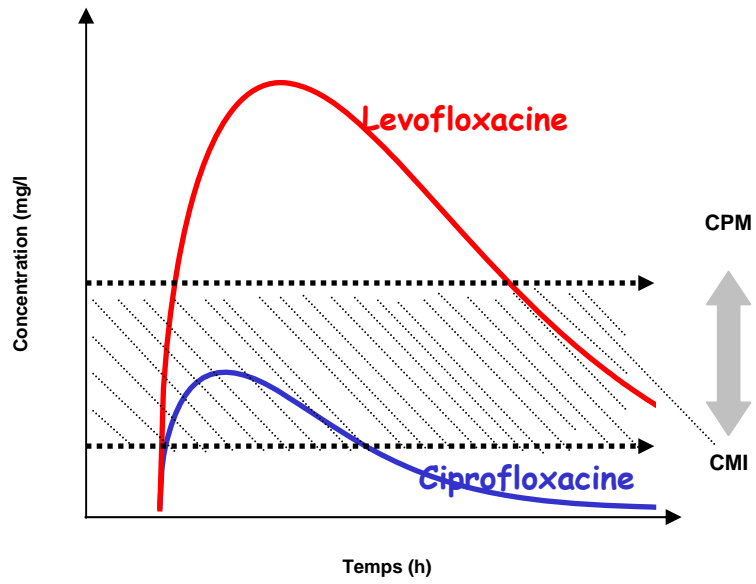
Triangle plein: MPC



Pneumo vs moxiflo *in vitro*

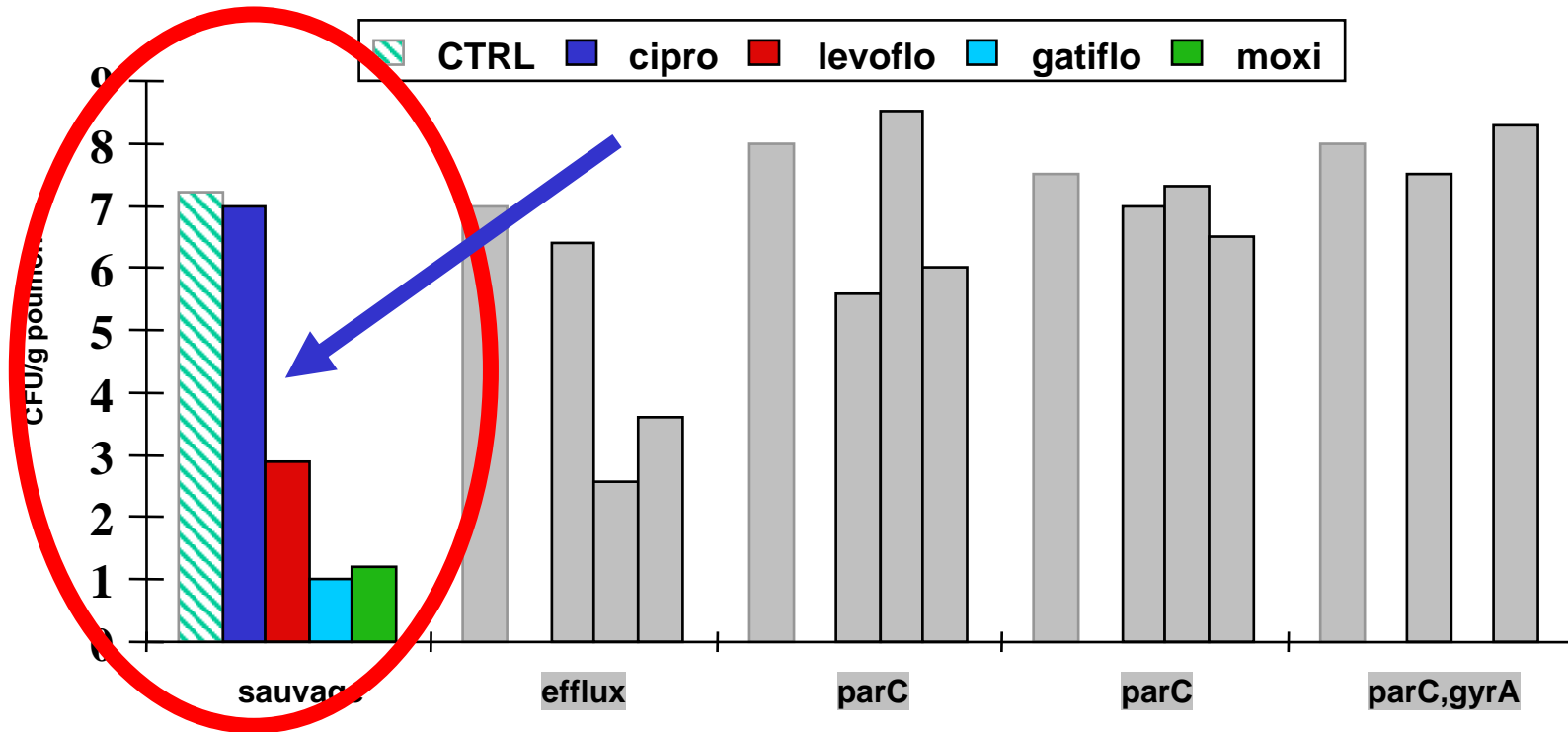






Pneumocoque vs efficacité FQ *in vivo*

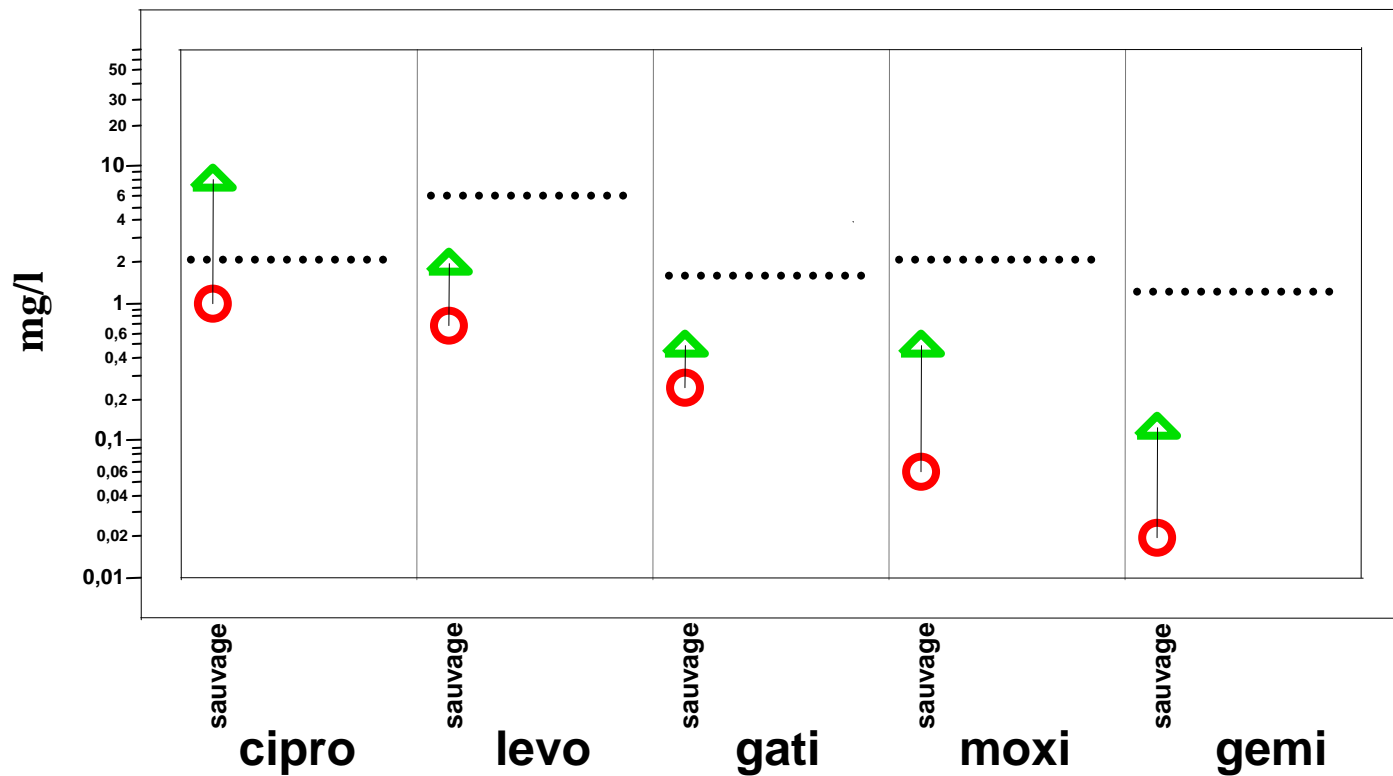
(réduction bactérienne)



CMI	
Cipro	0.5
Levo	0.5
Gati	0.125
Moxi	0.125

CMI, CPM

pneumocoque « sauvage »



CMI ○

CPM ▲

Cmax: ---

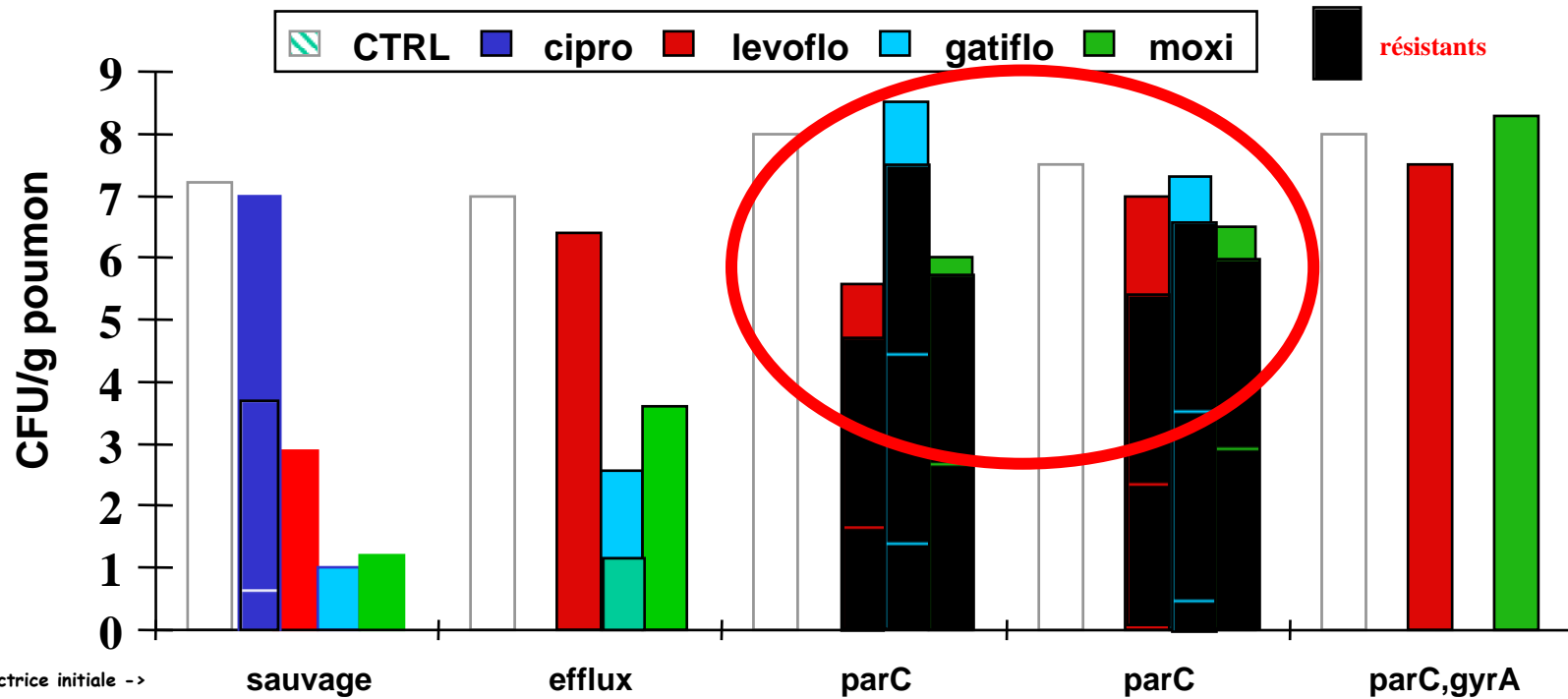
Cmax: ---

PnP pneumocoque vs Fluoroquinolones
apport du modèle expérimental

Conclusion 2a

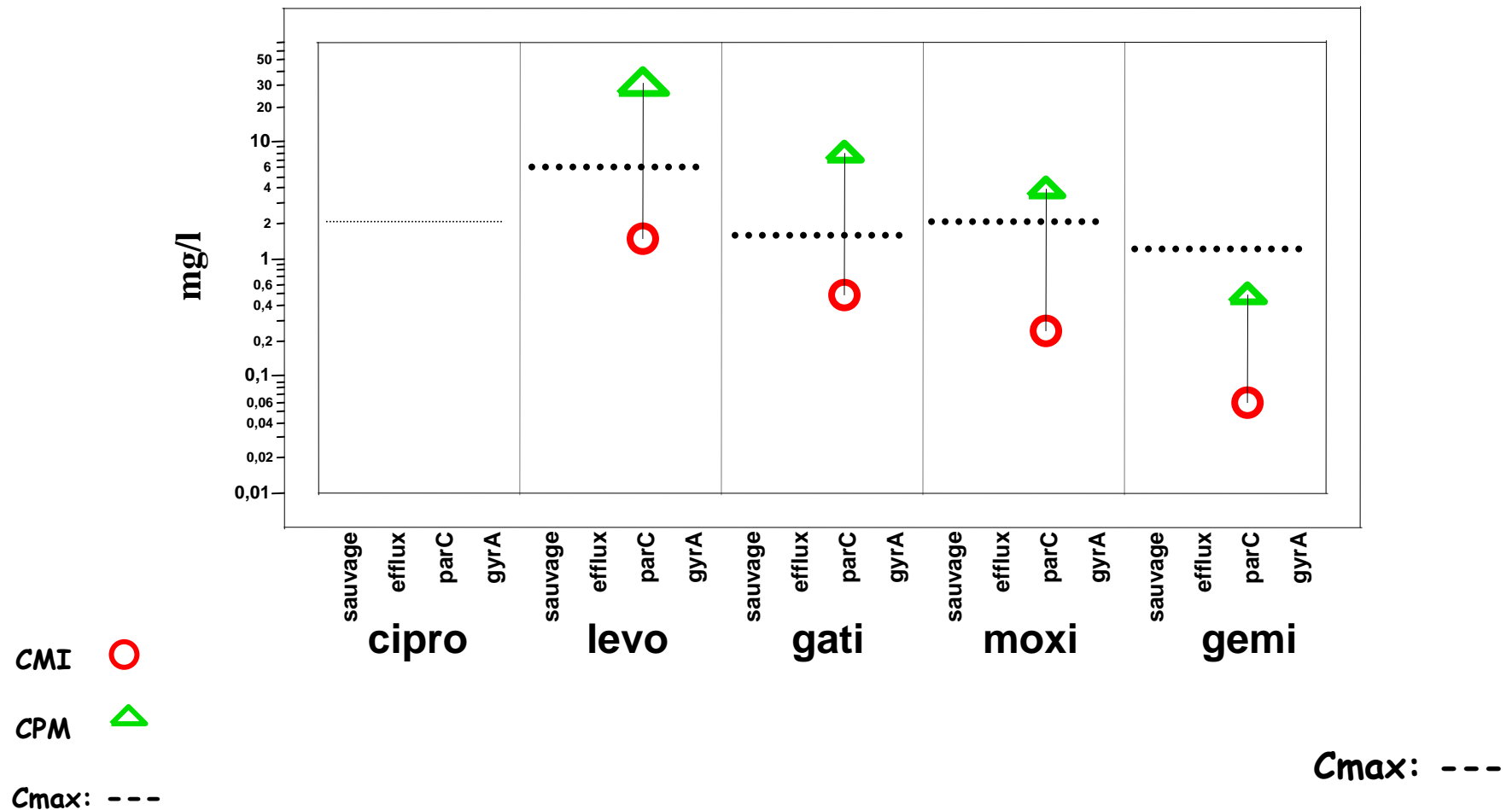
- **Un traitement par fluoroquinolone**
- **d ' une pneumonie à pneumocoque**
 - sensible et
 - **sans** résistance à bas niveau (sauvage)
- **s 'accompagne:**
 - d 'une faible réduction bactérienne
 - de **mutants résistants**
- **si les concentrations sont « dans la fenêtre de mutation»**
 - sous la CPM
 - ex: ciprofloxacin

Pneumocoque vs efficacité FQ *in vivo* (réduction bactérienne)



CMIS/R
Cipro	0.5				
Levo	0.5	1	2	2	
Gati	0.125	0.25	1	1	4
Moxi	0.125	0.125	1	1	4

Concentration minimale inhibitrice (CMI) Concentration de prévention de la mutation (CPM) pneumocoque « parC »

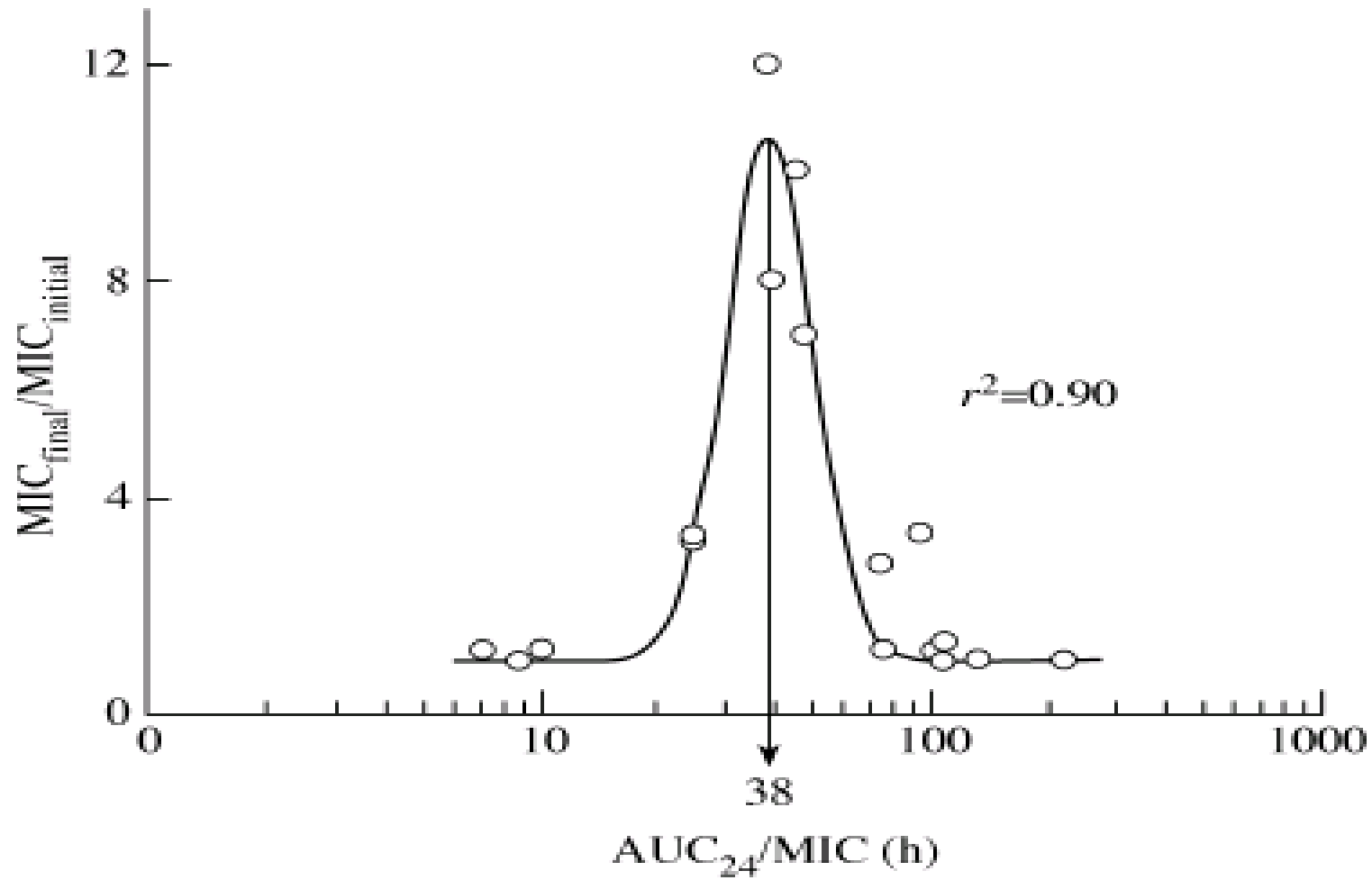


PnP pneumocoque vs Fluoroquinolones
apport du modèle expérimental

Conclusion 2b

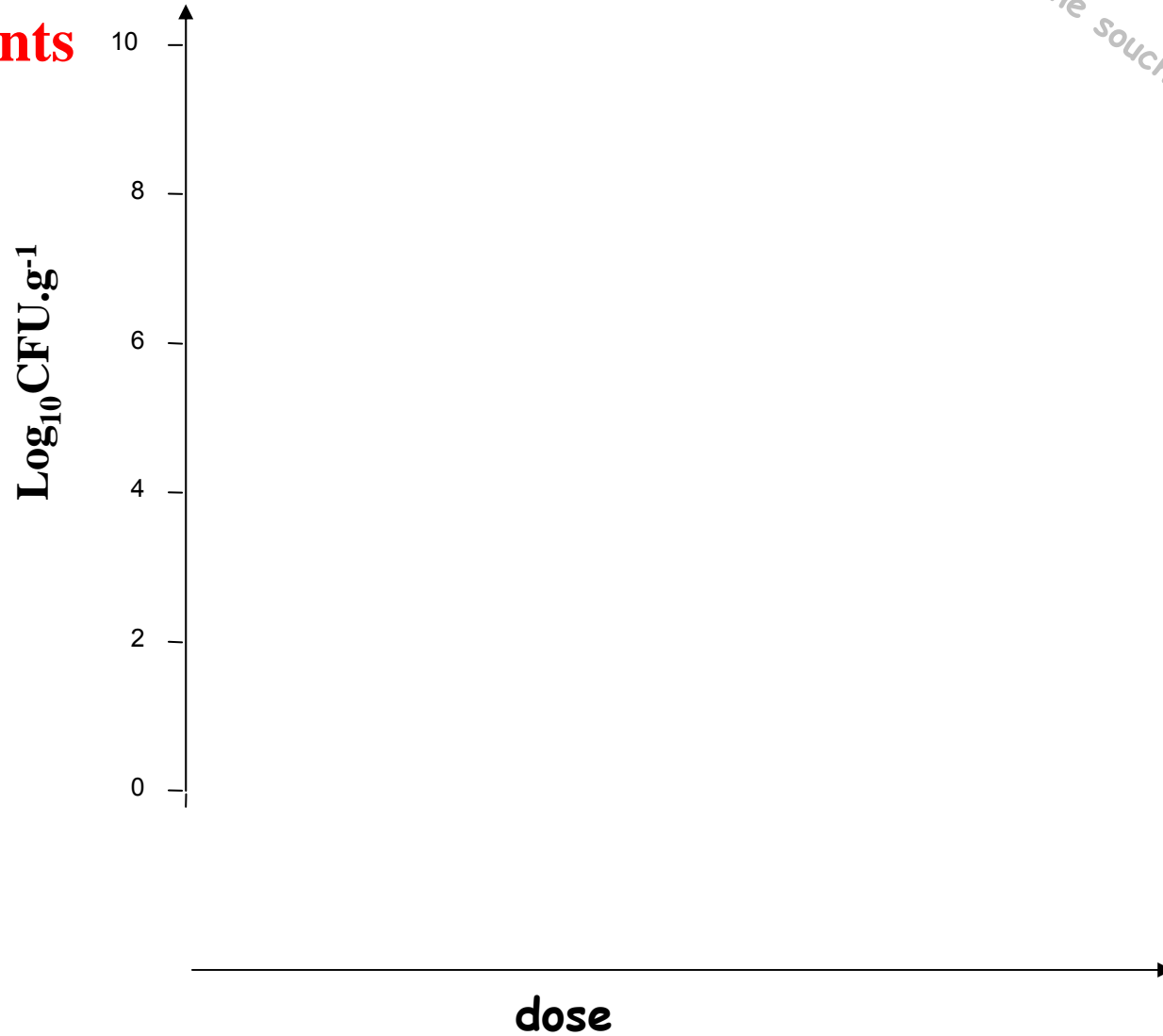
- **Un traitement par fluoroquinolone**
- **d ' une pneumonie à pneumocoque**
 - sensible et
 - **avec** ou **sans** résistance à bas niveau
- **s 'accompagne:**
 - d 'une faible réduction bactérienne
 - de **mutants résistants**
 - très fréquents en cas de parC initiale
- **si les concentrations sont « dans la fenêtre de mutation »**
 - sous la CPM

Pneumo vs moxiflo *in vitro*



Temps dans la fenêtre de mutation (Tmsw) : réduction bactérienne *in vivo*

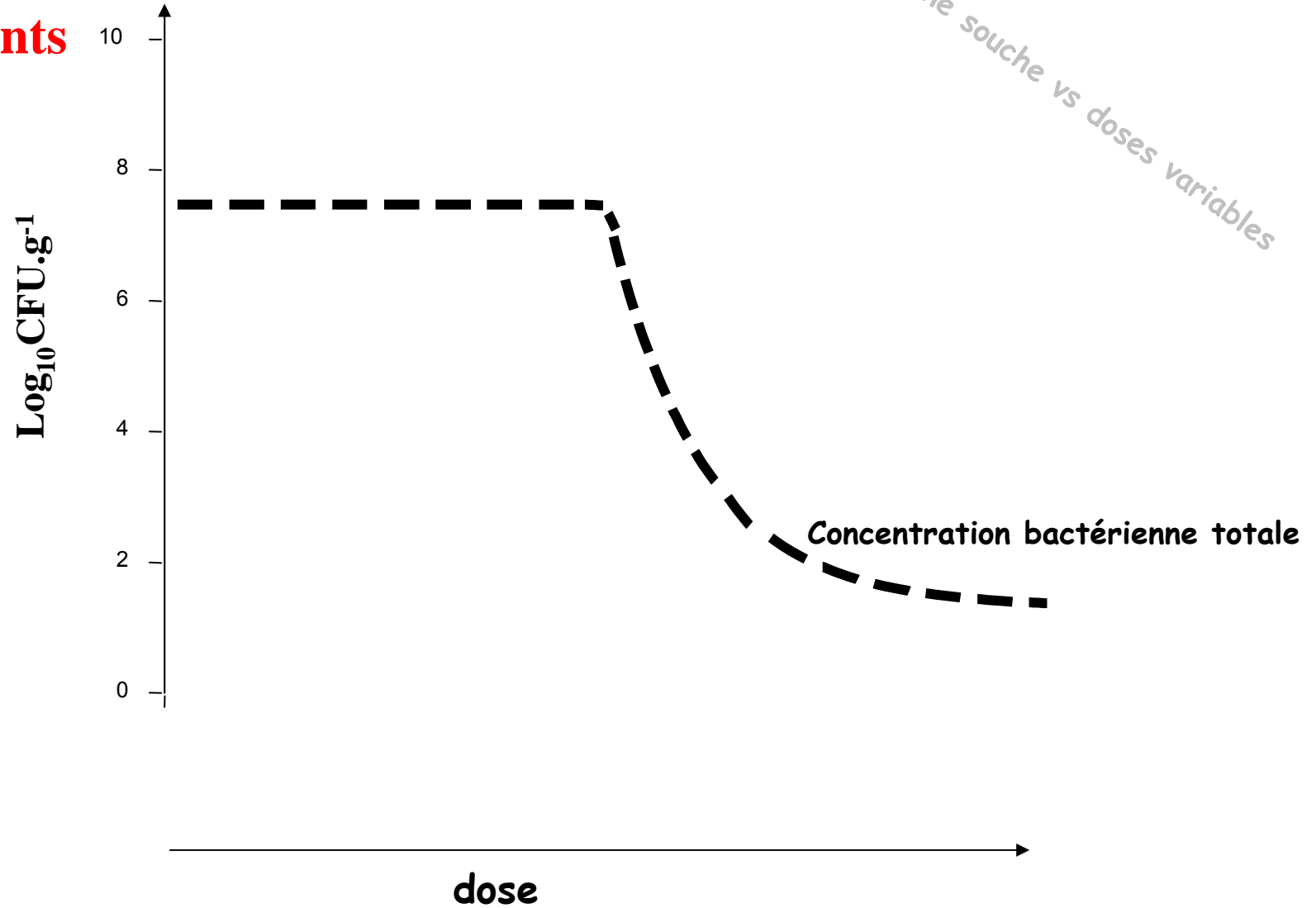
mutants

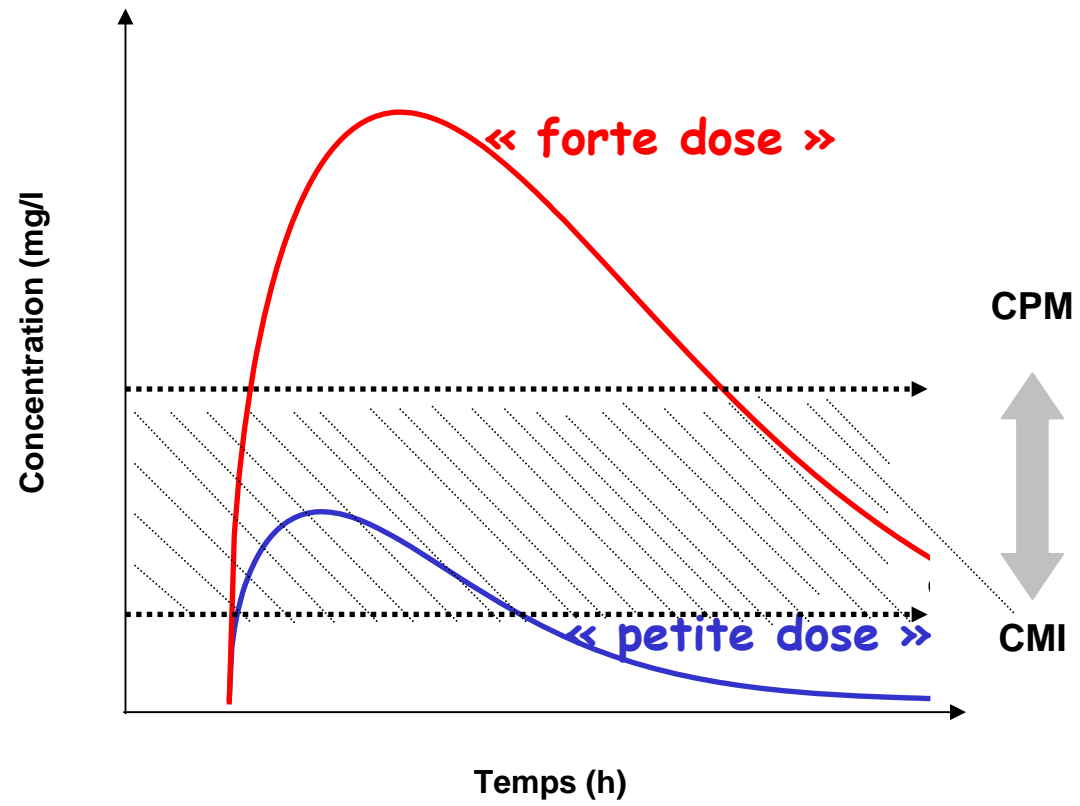


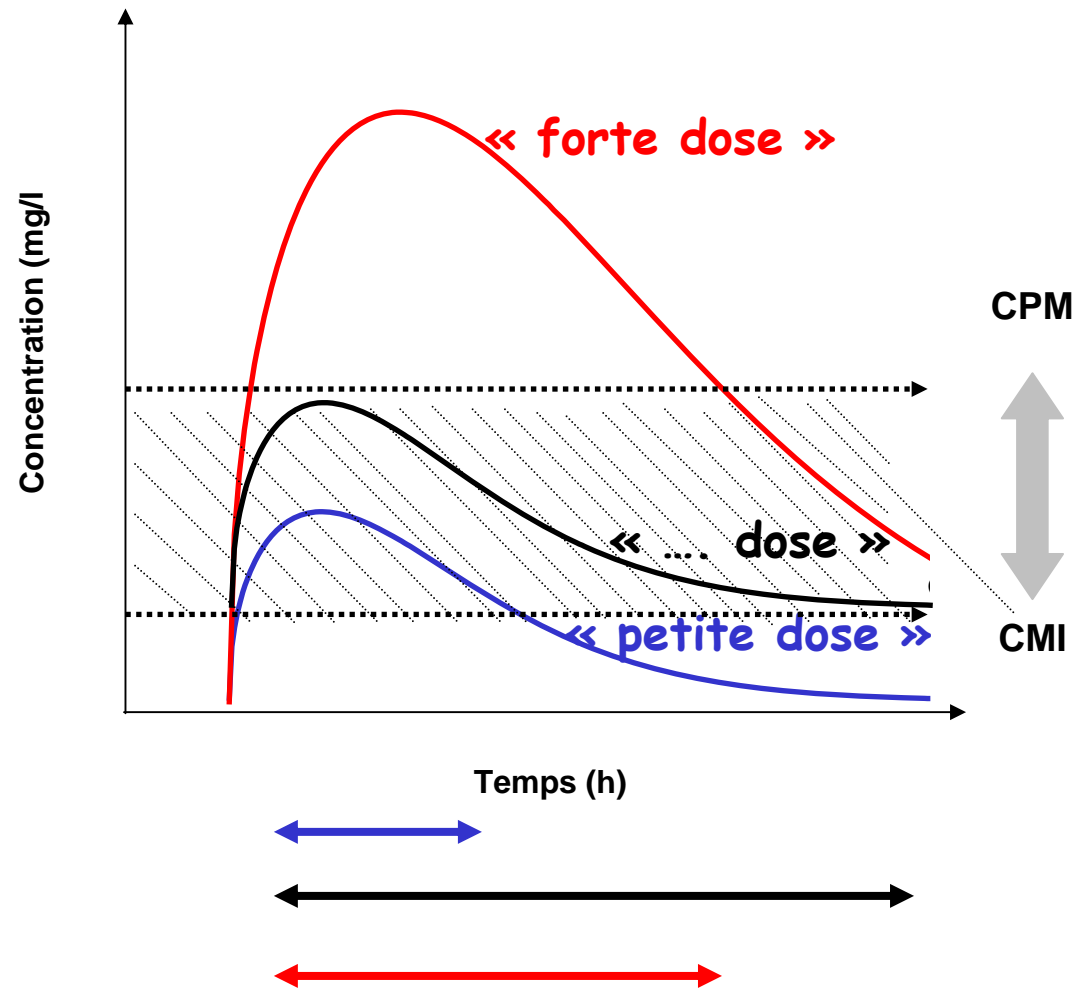
Une souche vs doses variables

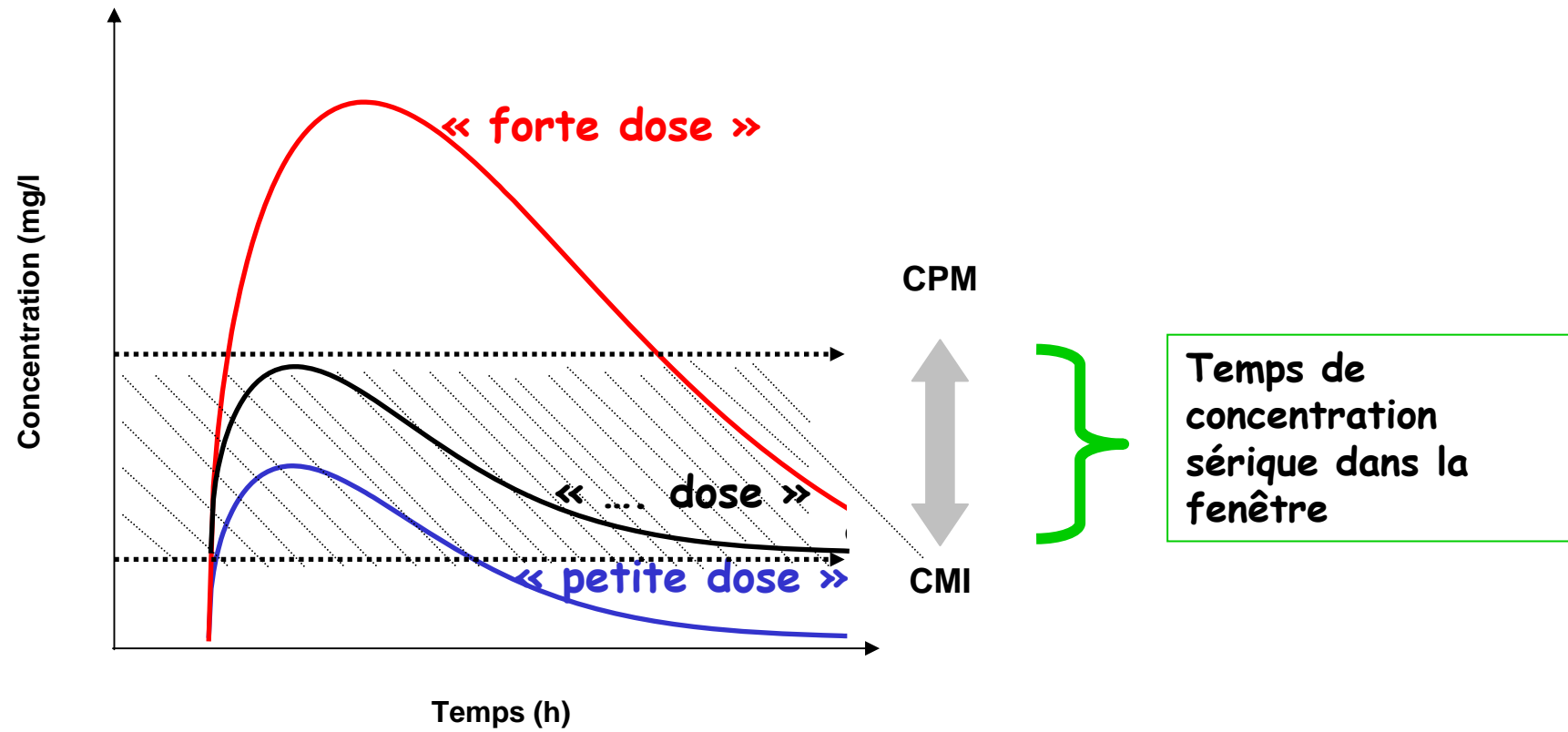
Temps dans la fenêtre de mutation (Tmsw) : réduction bactérienne

mutants



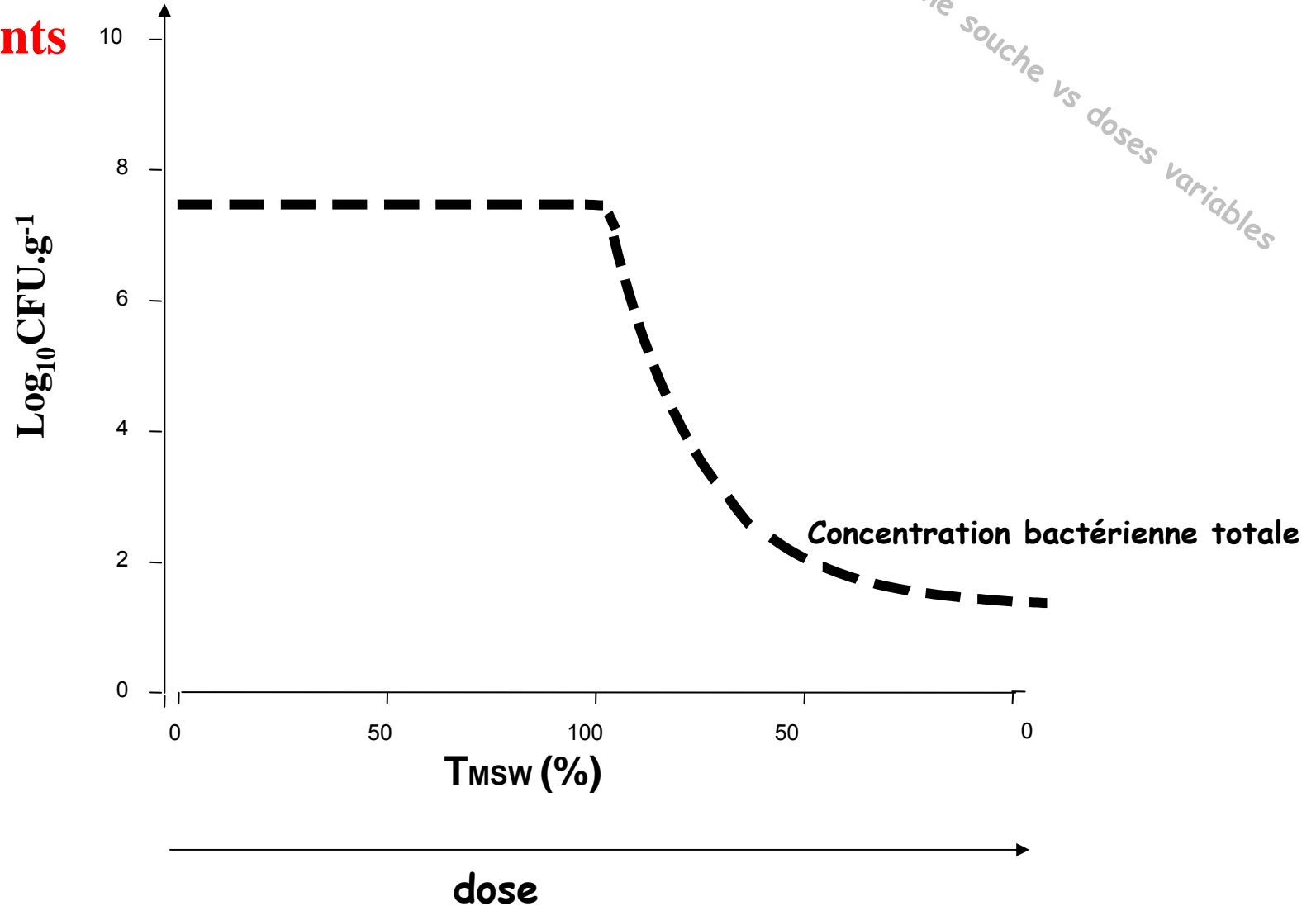






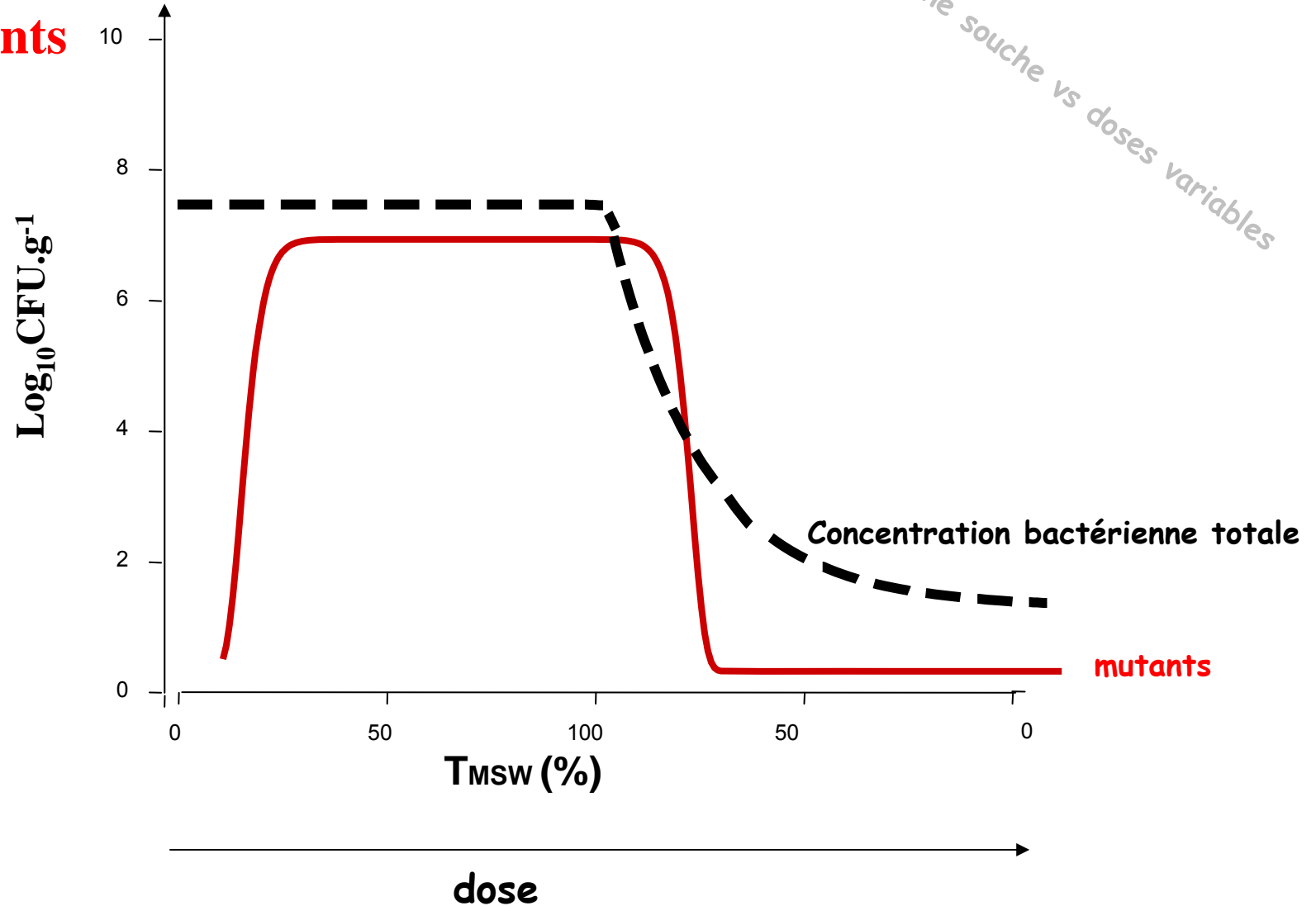
Temps dans la fenêtre de mutation (Tmsw) : réduction bactérienne

mutants



Temps dans la fenêtre de mutation (Tmsw) : réduction bactérienne

mutants



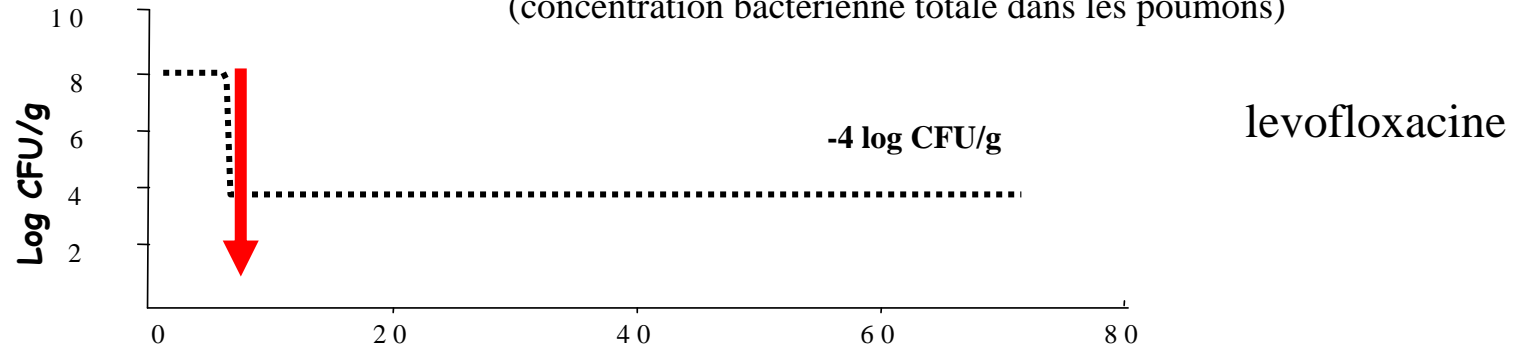
PnP pneumocoque vs Fluoroquinolones
apport du modèle expérimental

Conclusion 3

- **Une régime thérapeutique prévenant les mutants existe in vivo**
 - par exemple animaux
 - infectés par pneumocoque parC
 - traités par moxifloxacine (doses humanisées croissantes)
 - \Leftrightarrow Tmsw < 60% \Leftrightarrow \geq 2 x dose normale
- **Une fenêtre de mutation existe in vivo**
- **le concept de CPM « in vitro » prend toute sa valeur**

In vivo**TT humanisé vs pneumocoque de sensibilités variées aux fluoroquinolones**
efficacité « globale »

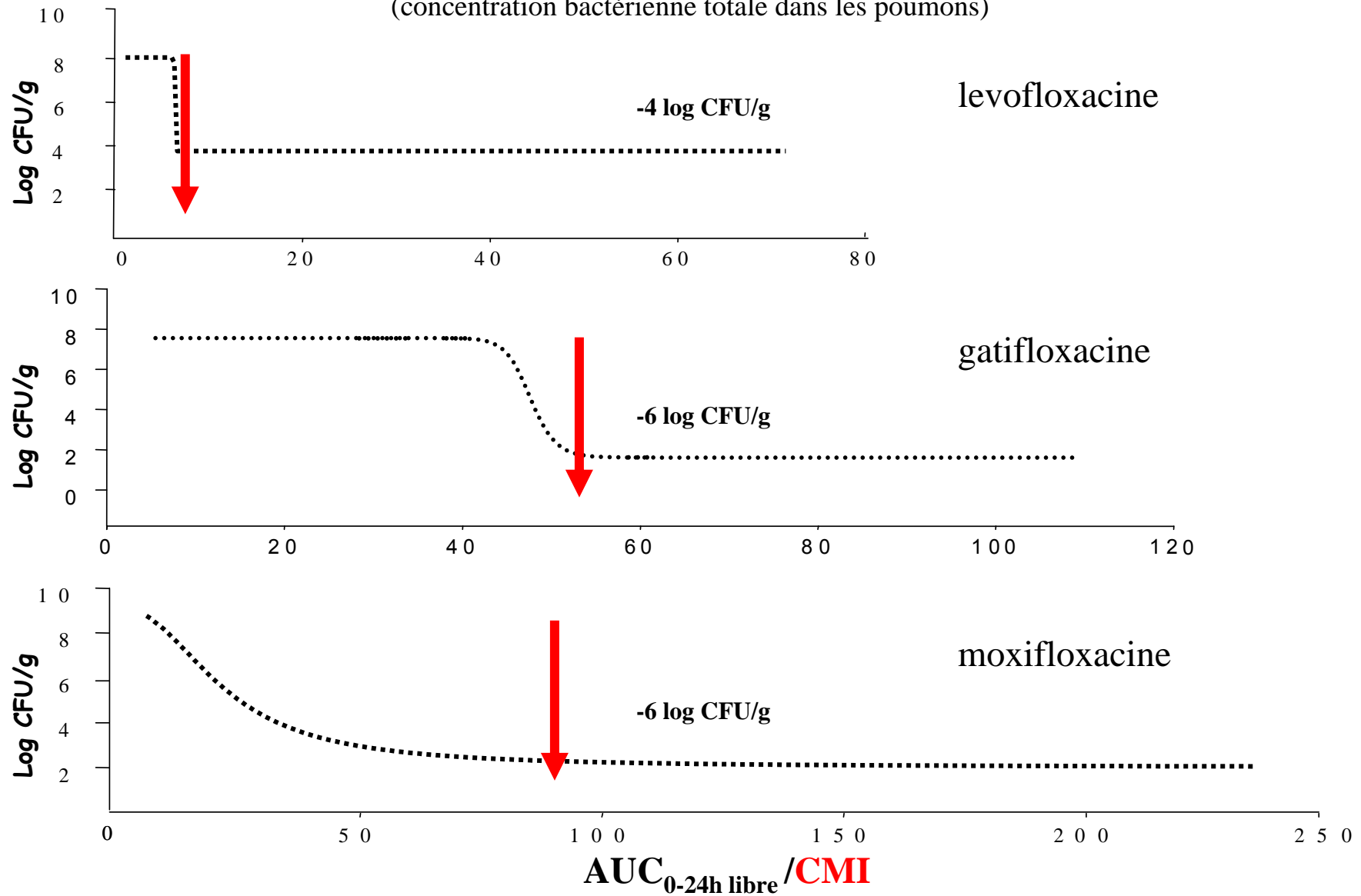
(concentration bactérienne totale dans les poumons)

 $AUC_{0-24h \text{ libre}} / CMI$

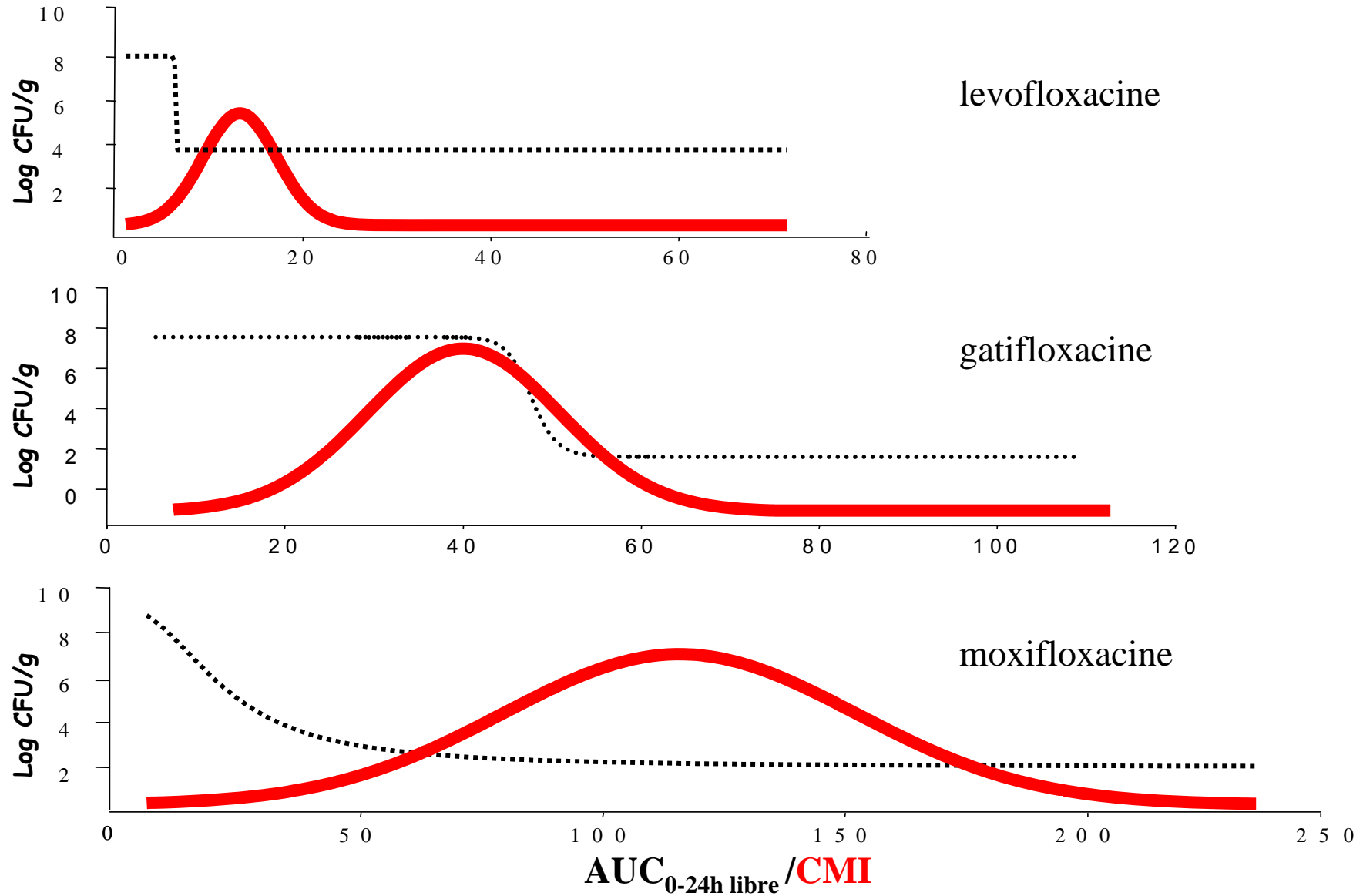
In vivo

TT humanisé vs pneumocoque de sensibilités variées aux fluoroquinolones efficacité « globale »

(concentration bactérienne totale dans les poumons)

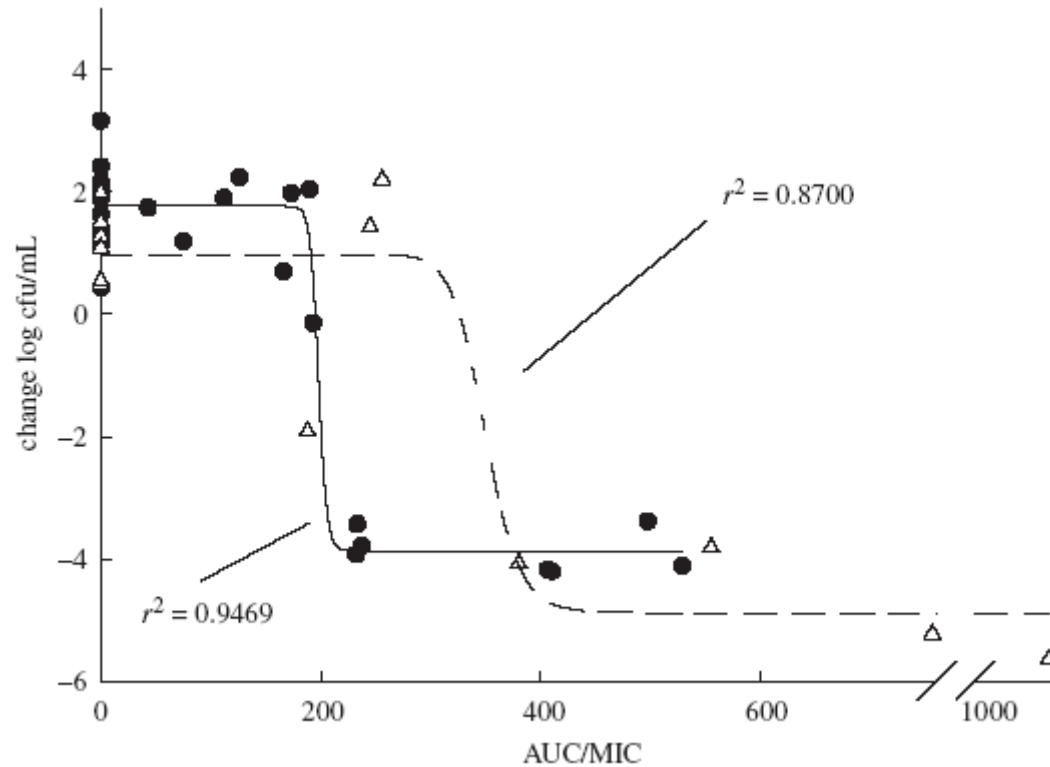


In vivo
TT humanisé vs pneumocoque de sensibilités variés aux fluoroquinolones
efficacité « globale » (...)
mutants résistants



Modèle in vitro « pk bronches »: lévo vs moxiflo - Pneumo parC

C. Andrew DeRyke, JAC (2006) 58, 601–609



Bactericidal activity at 48 h as a function of exposure. Closed circles, levofloxacin; open triangles, moxifloxacin; solid line, levofloxacin; dotted line, moxifloxacin.

La fenêtre de mutation existe pour tous les couples « bug-drug »

1- Mutations pré-existantes

- M. tuberculosis 10^{-6-8}
- => association
- Règle de l'indépendance des mutations

2- Mutations pré-existantes

- MPC
- TT « hautes doses » > MPC

BK vs antituberculeux (côté molécule)

Antibiotic	MIC ₉₉	MPC	Dose	C _{max}	MPC/C _{max}
Rifampicin	0.02	>80	600	9.5	>8
Streptomycin	0.2	>320	1000	34	>9
Isoniazid	0.06	20	250	7.6	2.6
Capreomycin	2.0	160	1000	33	4.8
Kanamycin	1.5	>800	500	21	>38
Cycloserine	14	70	750	35	2
Ciprofloxacin	0.15	8.0	750	4.4	1.8
Levofloxacin	0.2	7.5	500	5.7	1.3
Moxifloxacin	0.037	2.5	400	4.5	0.55
PD135432 ^b	0.03	1.5	300	3.7	0.41
Sparfloxacin	0.075	2.5	200	1.4	1.8

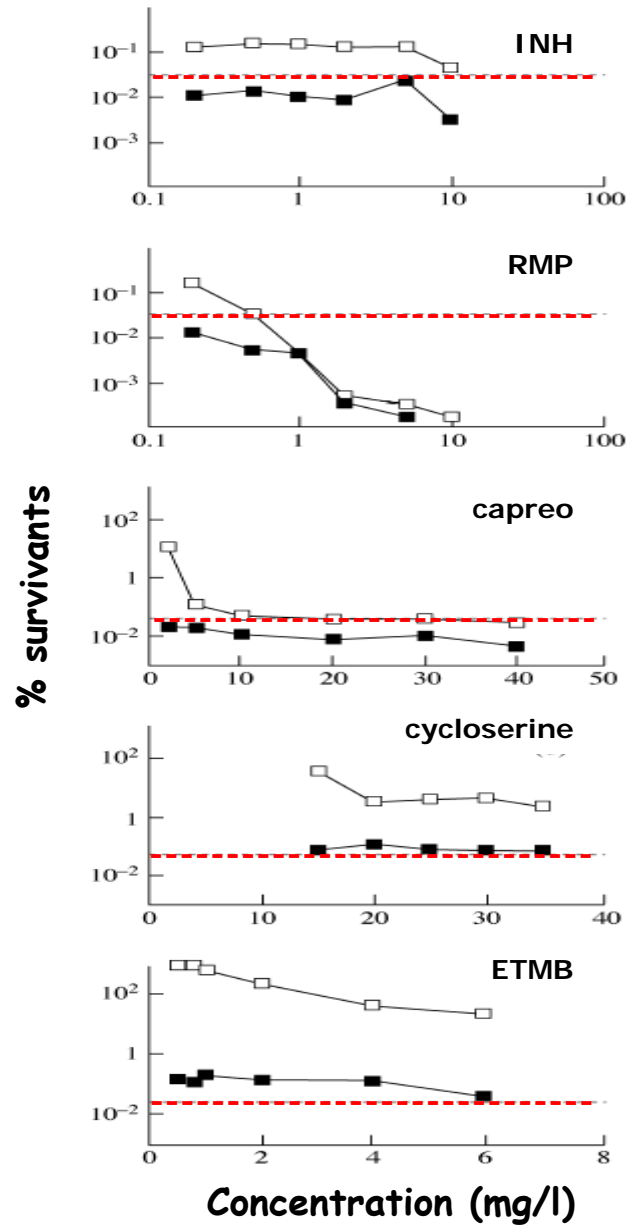
Mycobactéries MPC₅₀₋₉₀ (« côté molécule »)

Species (<i>M.</i>)	Linezolid	Rifabutin	Rifampicin	Ciprofloxacin	Levofloxacin	Gatifloxacin	Moxifloxacin	Azithromycin	Clarithromycin
<i>gordoniae</i> (n = 28)									
MPC ₅₀ /MPC ₉₀	2/12	1/3	4/12	1.5/6	1.5/6	1.5/4	2.5/4	18/50	1.5/2.5
<i>kansasii</i> (n = 8)									
MPC ₅₀ /MPC ₉₀	2.5/16	1.5/3	18/35	12/12	30/55	20/>64	40/50	>64/>64	2/2
<i>nonchromogenicum</i> (n = 6)									
MPC ₅₀ /MPC ₉₀	55/>64	1/3	35/40	16/>64	55/>64	64/>64	>64/>64	>64/>64	12/14
<i>malmoense</i> (n = 2)									
MPC ₅₀ /MPC ₉₀	16/16	1/1	18/18	40/40	30/30	12/12	30/30	64/64	2/2
<i>aurum</i> (n = 2)									
MPC ₅₀ /MPC ₉₀	2/2	1/1	3/3	>64/>64	0.25/0.25	0.25/0.25	0.5/0.5	>64/>64	>64/>64
<i>fortuitum</i> (n = 14)									
MPC ₅₀ /MPC ₉₀	>64/>64	25/>64	>64/>64	60/>64	10/>64	50/>64	4/>64	>64/>64	45/>64
<i>chelonae</i> (n = 3)									
MPC ₅₀ /MPC ₉₀	45/64	8/8	>64/>64	4/40	4/4	8/8	3.5/4	3.5/8	2.5/3
<i>xenopi</i>									
MPC	10	3	>64	35	16	10	16	>64	1.5

Association: *Mycobacterium tuberculosis*

moxi + ..

(« côté molécule »)



----- :Moxi seule 2.5mg/l après 6 jours
 Carré vide :Drogue seule
 Carré plein :Association avec moxi

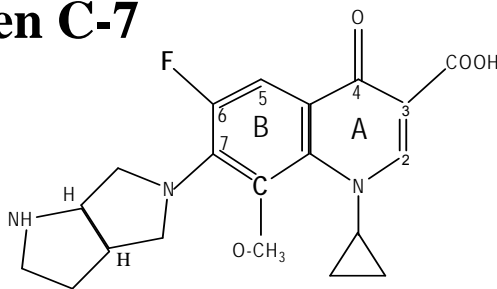
Antagonisme => sélection « accrue » de mutants

Effacité: données in vitro

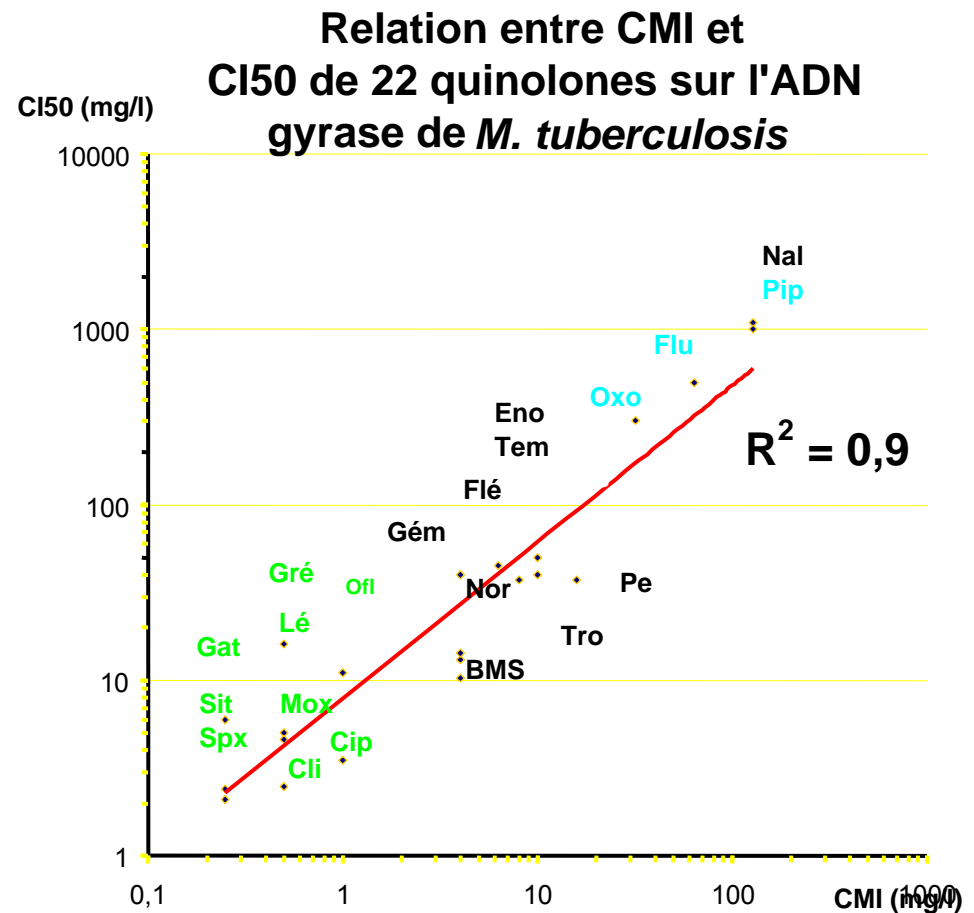
Etude de l'ADN gyrase de *M. tuberculosis*

Interaction avec les quinolones

- Production hétérologue des sous-unités A et B (His-tag) de *M. tuberculosis* chez *E. coli*
- ADN gyrase recombinante fonctionnelle
- Relation structure-activité des quinolones : C-8, N-1, F en C-6 et cycle en C-7

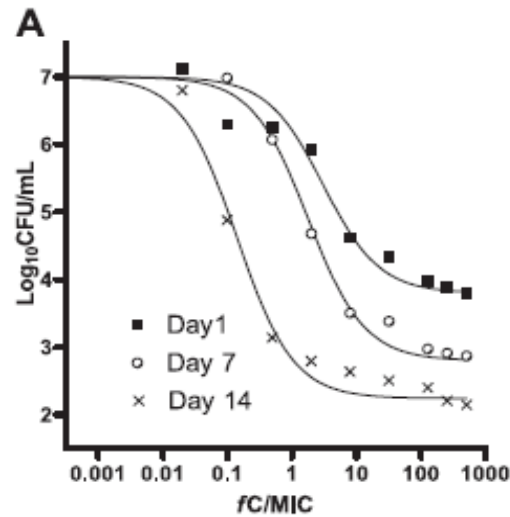


moxifloxacin

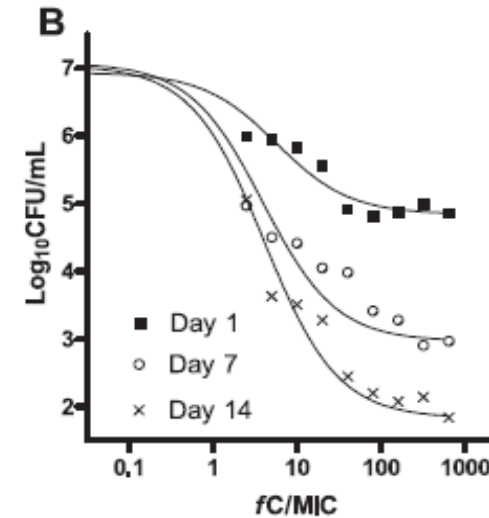


Efficacité: données in vitro

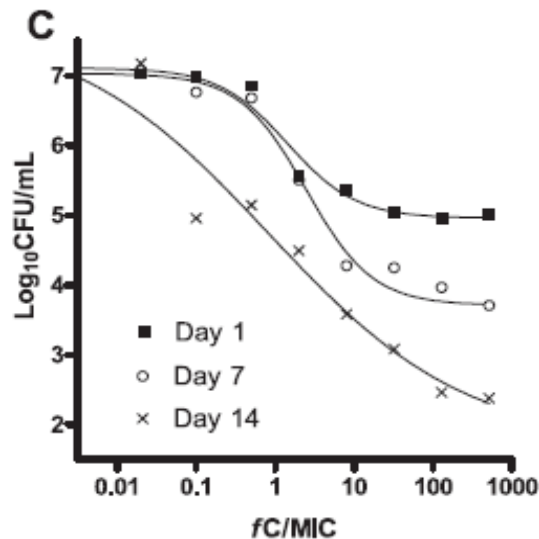
Moxifloxacin



Ofloxacin



Sparfloxacin



Ciprofloxacin

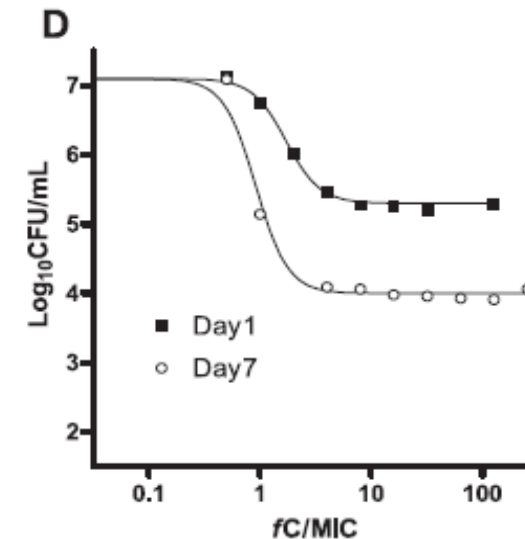


FIG. 2. Effects of increasing fC/MIC ratios on the bactericidal activities of MXF (panel A), OFX (B), SPX (C), and CIP (D) on days 1, 7, and 14 after the addition of drug. Each point represents the mean of triplicate values. The bactericidal effect is calculated on the basis of the initial inoculum prior to the addition of the drug.

Données expérimentales « dans les macrophages »

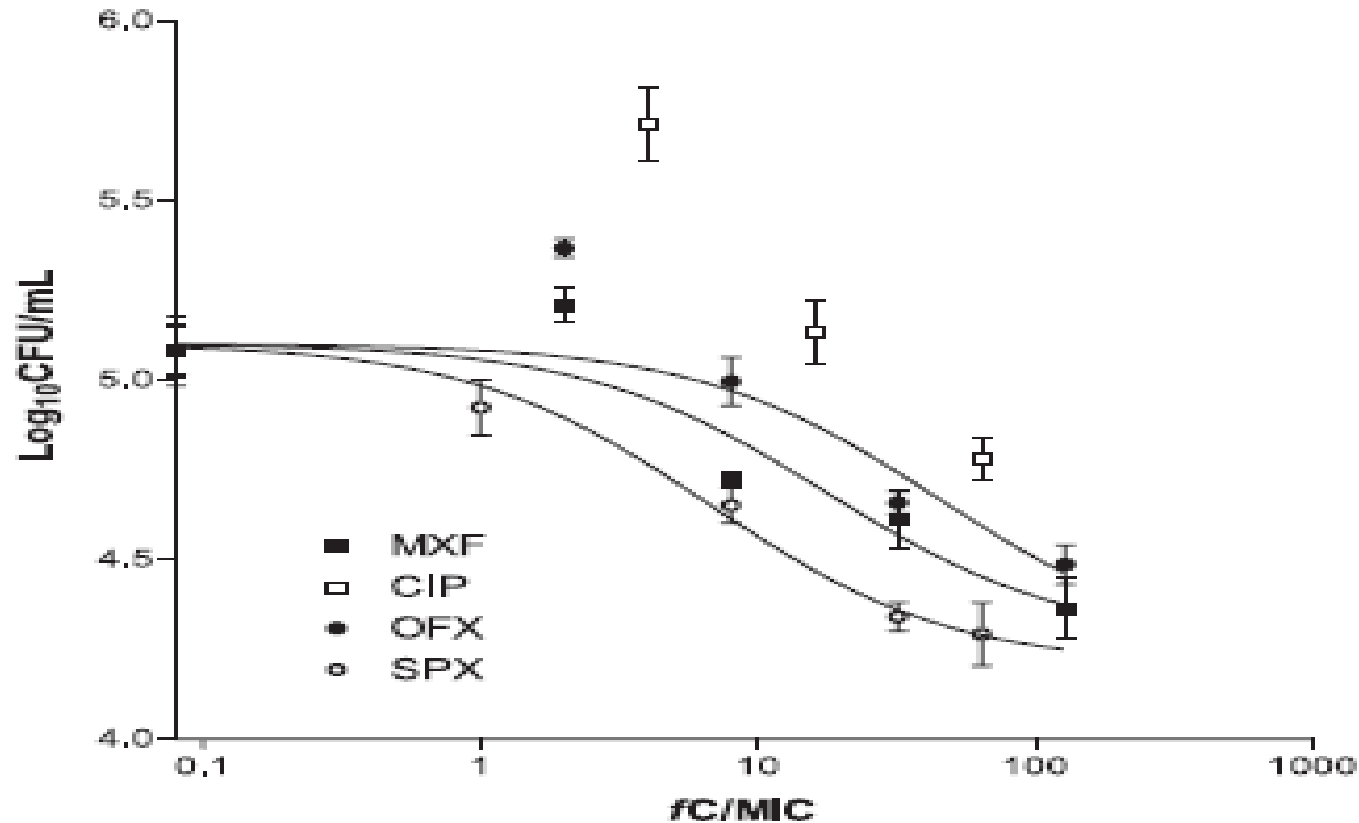


FIG. 3. Effects of increasing fC/MIC ratios on the intracellular bactericidal activities of the four fluoroquinolones, MXF, OFX, SPX, and CIP, against *M. tuberculosis* in the J774A.1 murine macrophage cell line after 3 days of exposure to the drug. Each point represents the mean \pm standard deviation of triplicate values. The bactericidal effect is calculated on the basis of the initial inoculum prior to addition of the drug.

Données expérimentales in vivo modèle murin

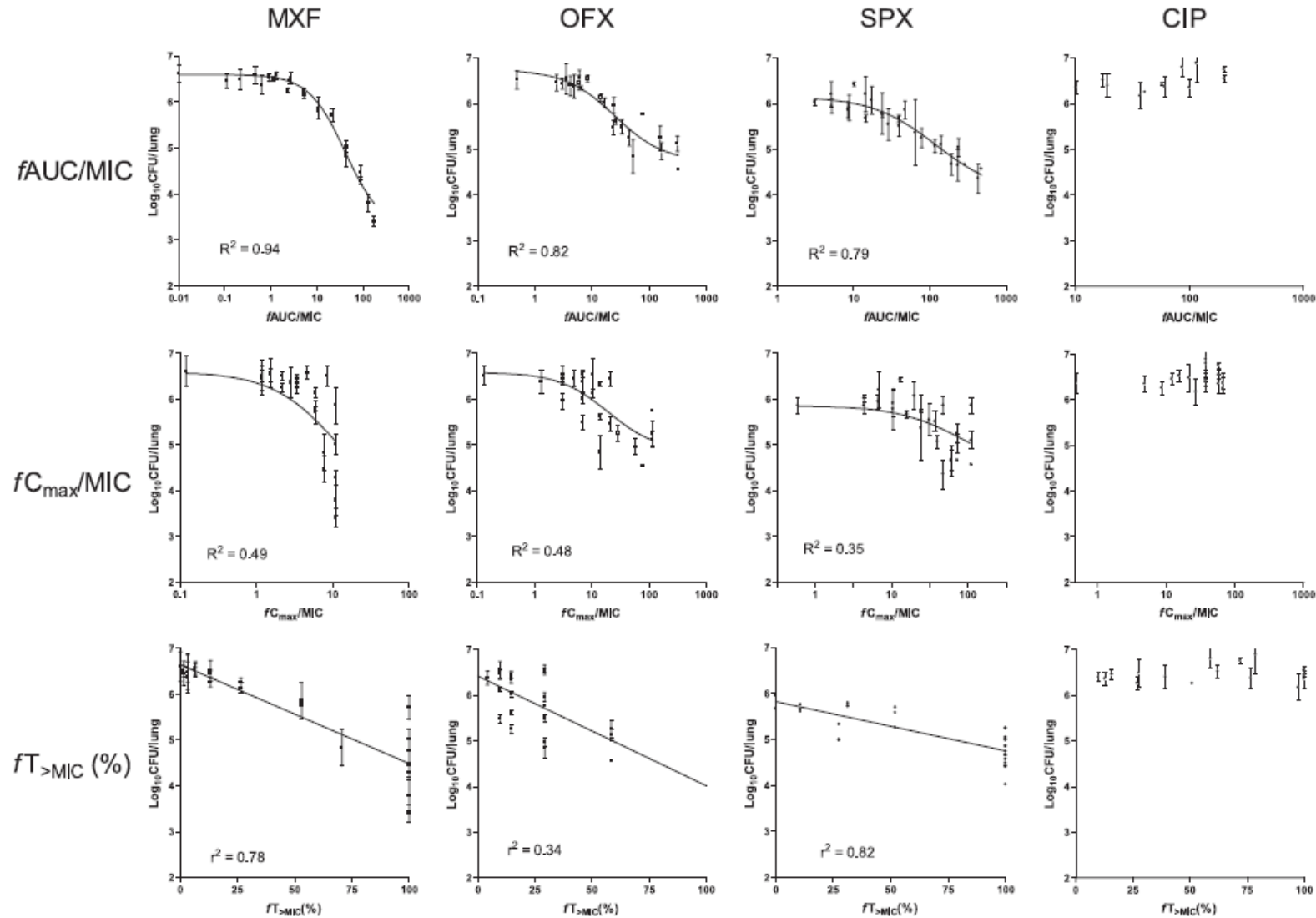


FIG. 5. Relationship between $fAUC/MIC$, fC_{max}/MIC , and $fT_{>MIC}$ (percent) of the four fluoroquinolones and \log_{10} CFU/lung of *M. tuberculosis* when the total dose is fractionated as per the design shown in Table 3. Each point represents the mean \pm standard deviation of triplicate values.

(Balb-C, aerosol, T0= 4 semaines, TT= 4 semaines (3 pour Sparflo))

Shandil, AAC, 2007

Moxiflo vs TB in vivo

Almeida D...Grosset, AAC 2007;51:4261

Souris
Inhalation BK
BK: CMI 0.5 - MPC 8

Moxiflo: 2 doses

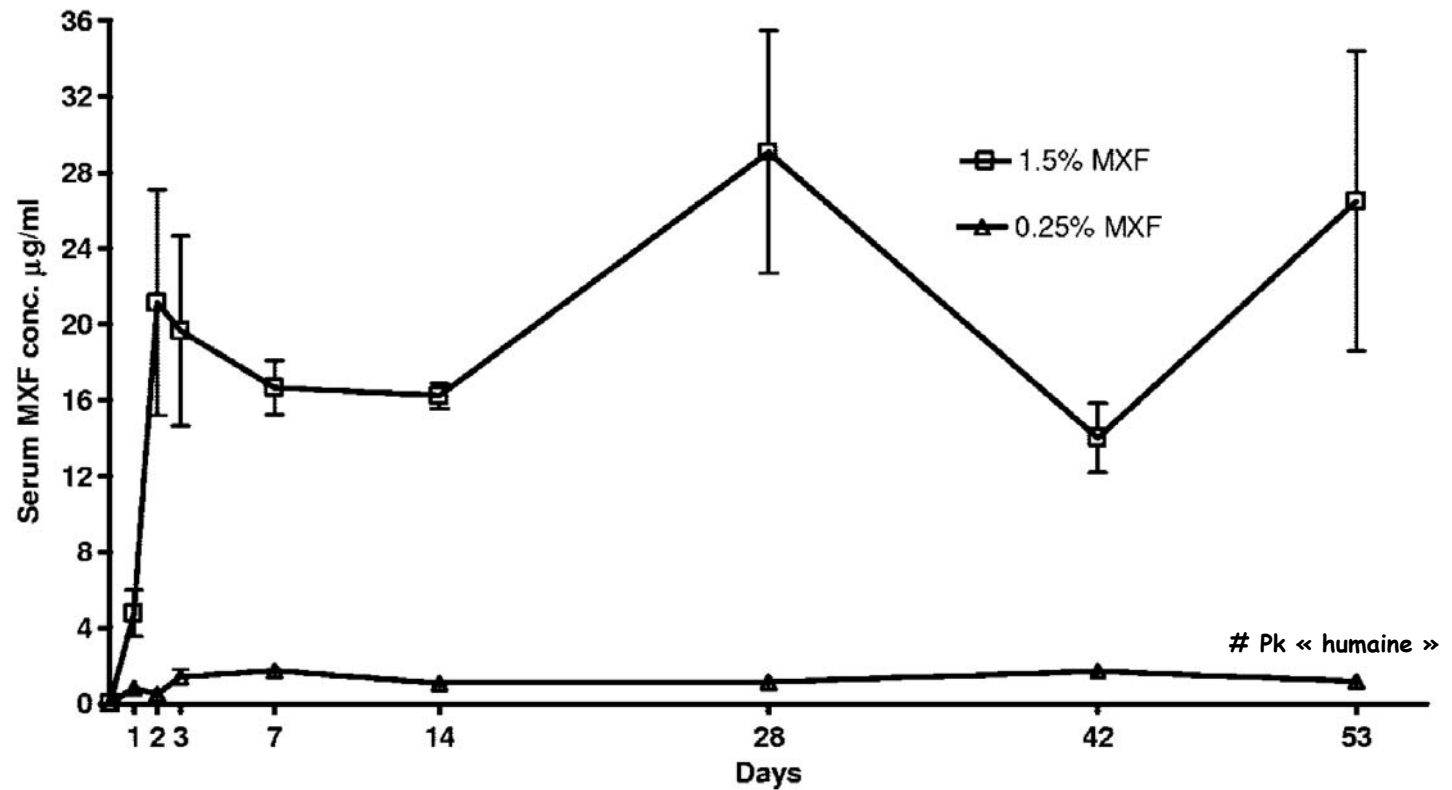
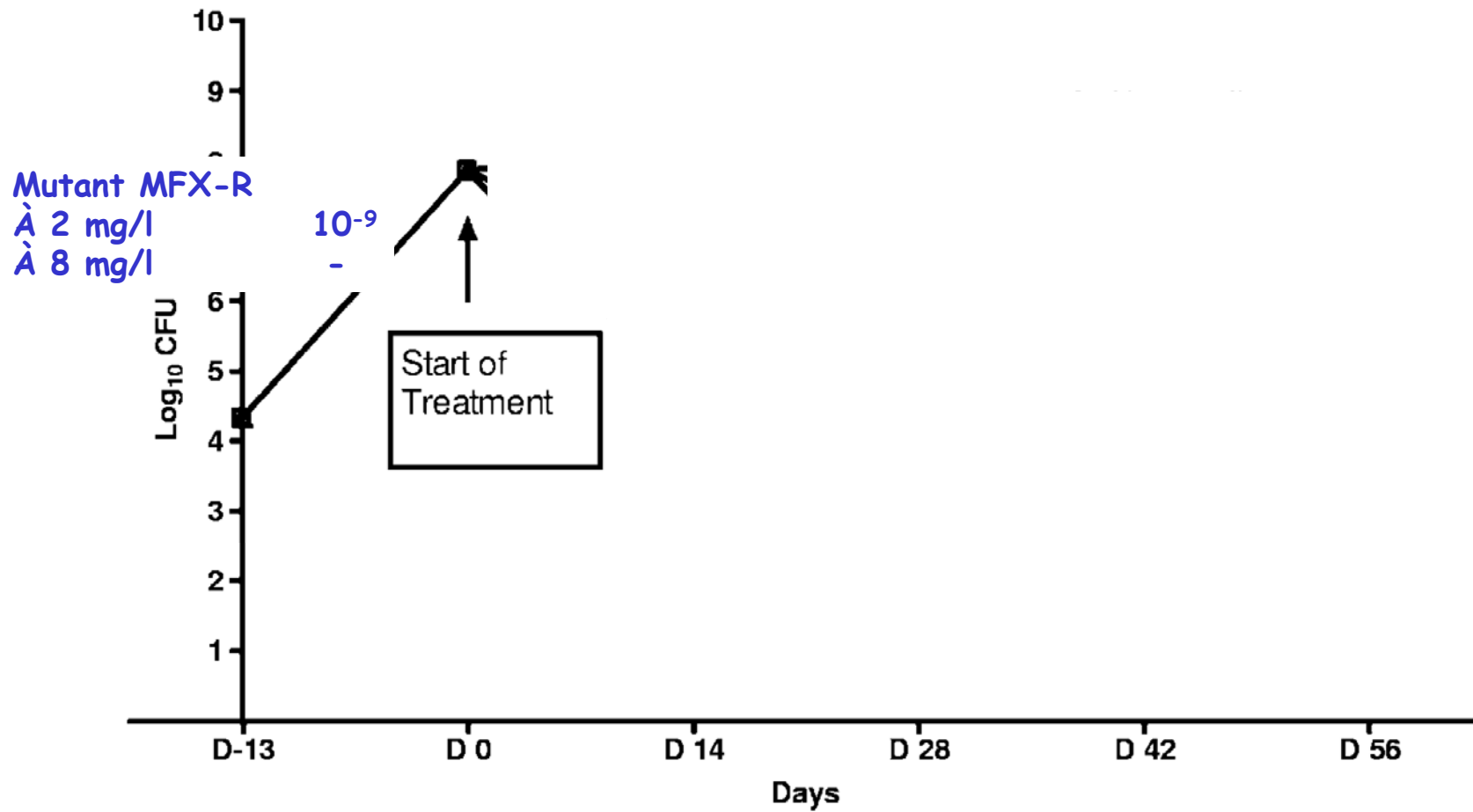


FIG. 1. Observed MXF serum concentrations during treatment.

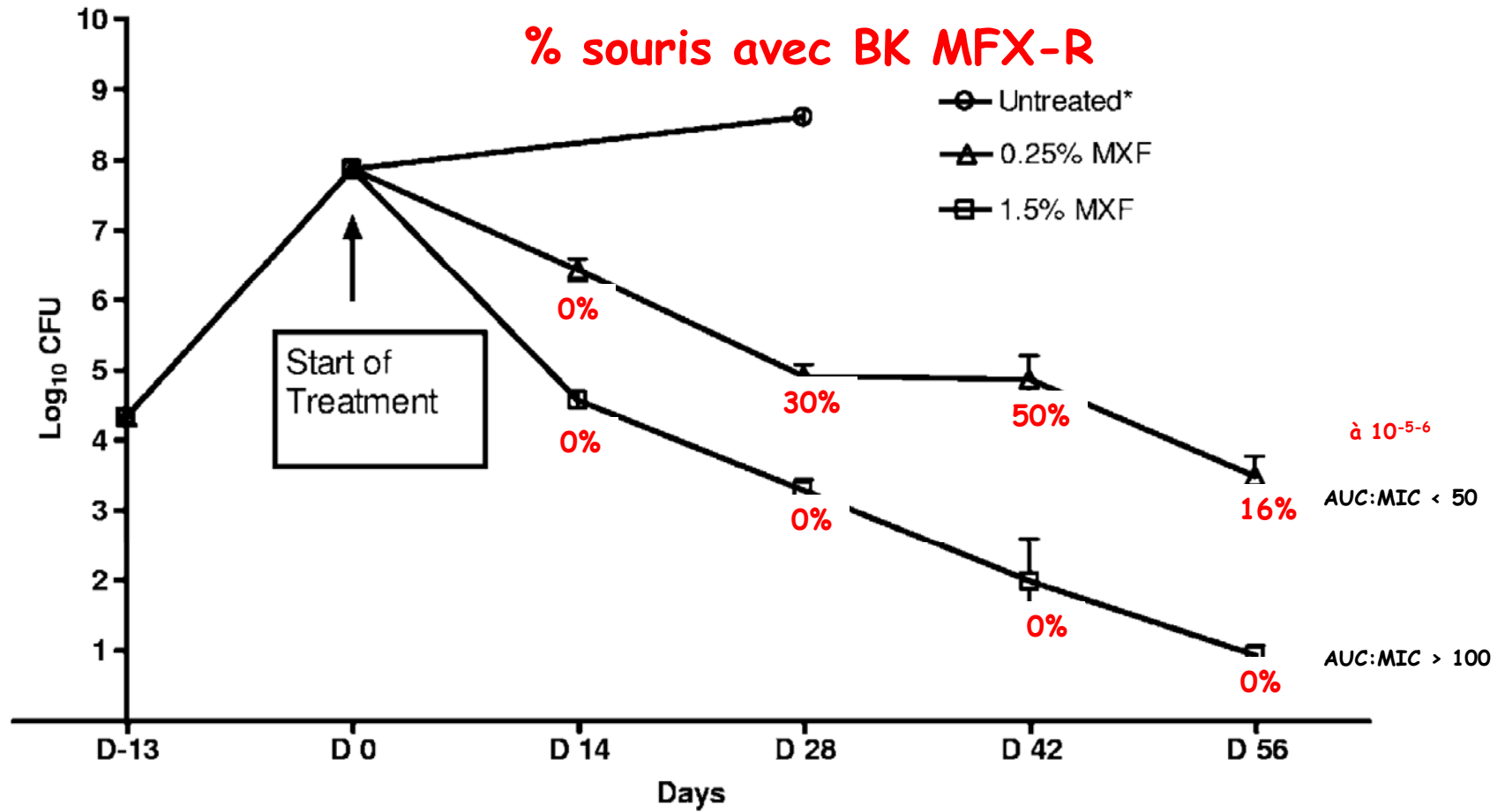
Moxiflo vs TB in vivo

Almeida D...Grosset, AAC 2007;51:4261



Moxiflo vs TB in vivo

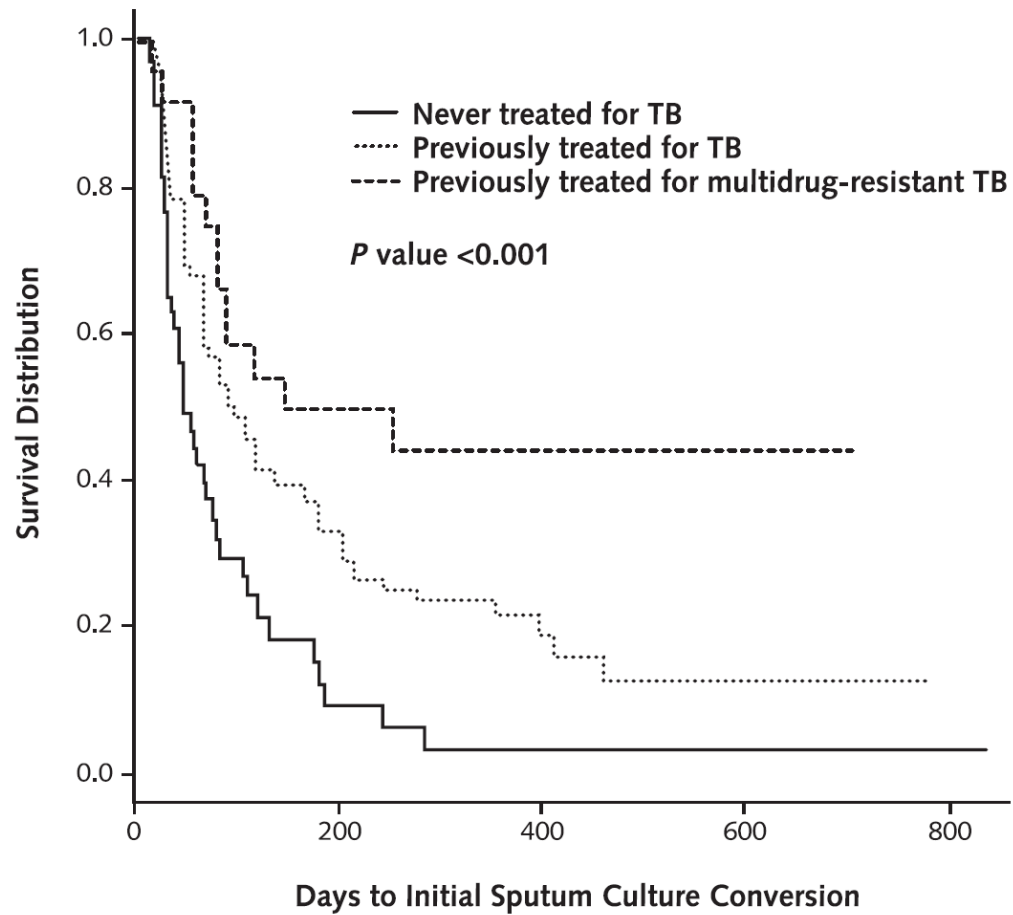
Almeida D...Grosset, AAC 2007;51:4261



Tuberculose
résistante: délai de
négativation des
expectorations

Holtz TH Ann Intern Med 2006

Figure 3. Kaplan–Meier survival curve of time to initial sputum culture conversion versus category of previous treatment in 167 patients.



The *P* value reflects the results of the log-rank test of the equality of the 3 survival curves. TB = tuberculosis.

Tuberculose résistante: délai de négativation des expectorations

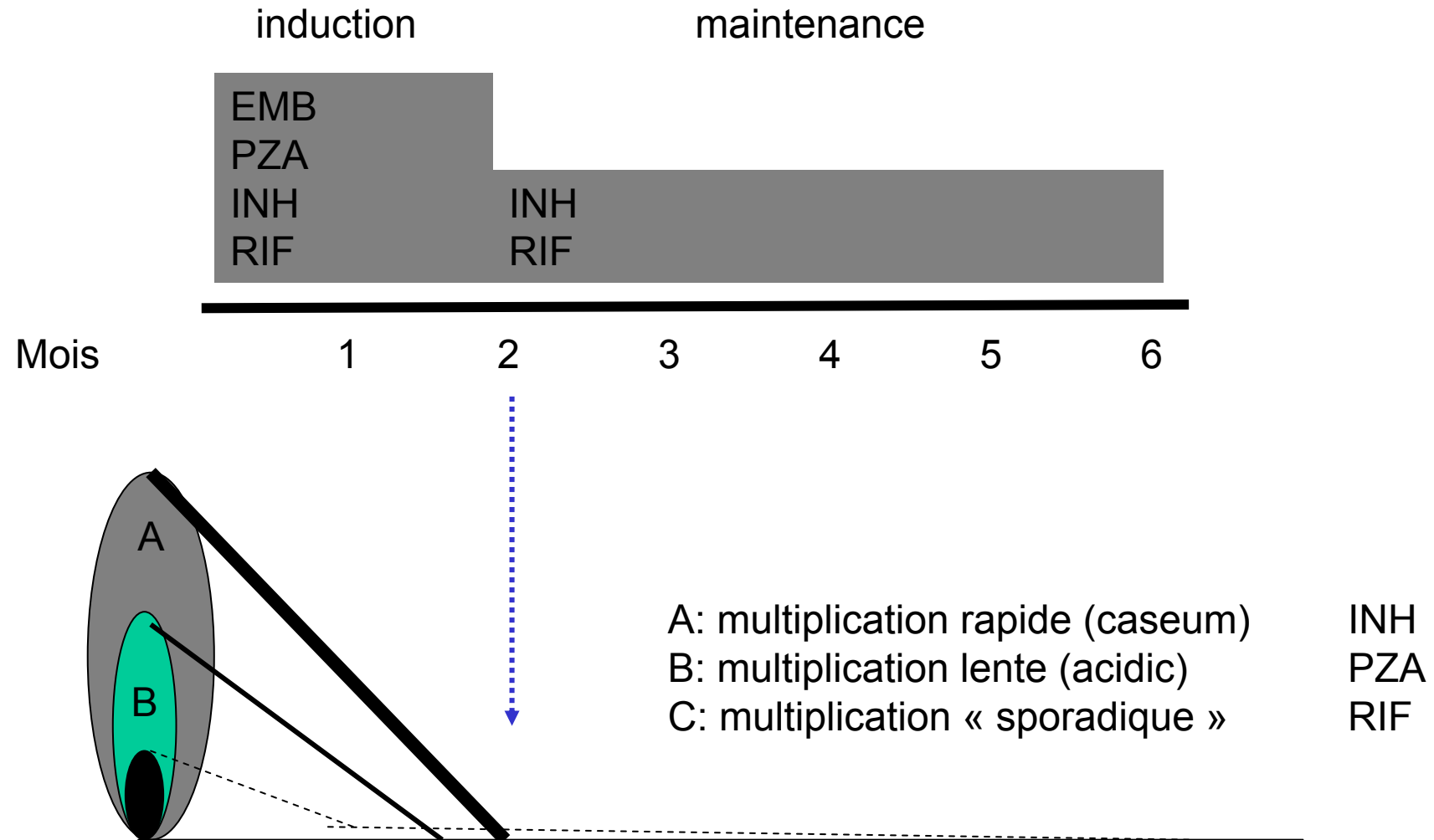
Holtz TH Ann Intern Med 2006

*Table 2. Multivariate Accelerated Failure Time Model Estimates of Percentage Difference in Time to Initial Sputum Culture Conversion in 166 Patients with Multidrug-Resistant Tuberculosis**

Characteristic	Initial Conversion Time	
	Difference in Initial Conversion Time (95% CI), dt	P Value
Impact de la résistance initiale		
Previously treated for multidrug-resistant TB	169 (49 to 384)	0.001
Previously treated for TB	31 (-18 to 105)	0.23
Never treated for TB	Referent	
Colony count of initial culture		
3+ or 4+	49 (5 to 111)	0.027
1+ or 2+	Referent	
Chest radiography at treatment initiation		
Bilateral cavitations	47 (2 to 113)	0.042
No bilateral cavitations	Referent	
Number of drugs resistant to at treatment initiation	16 (3 to 30)	0.014
	Impact de l'inoculum initial	

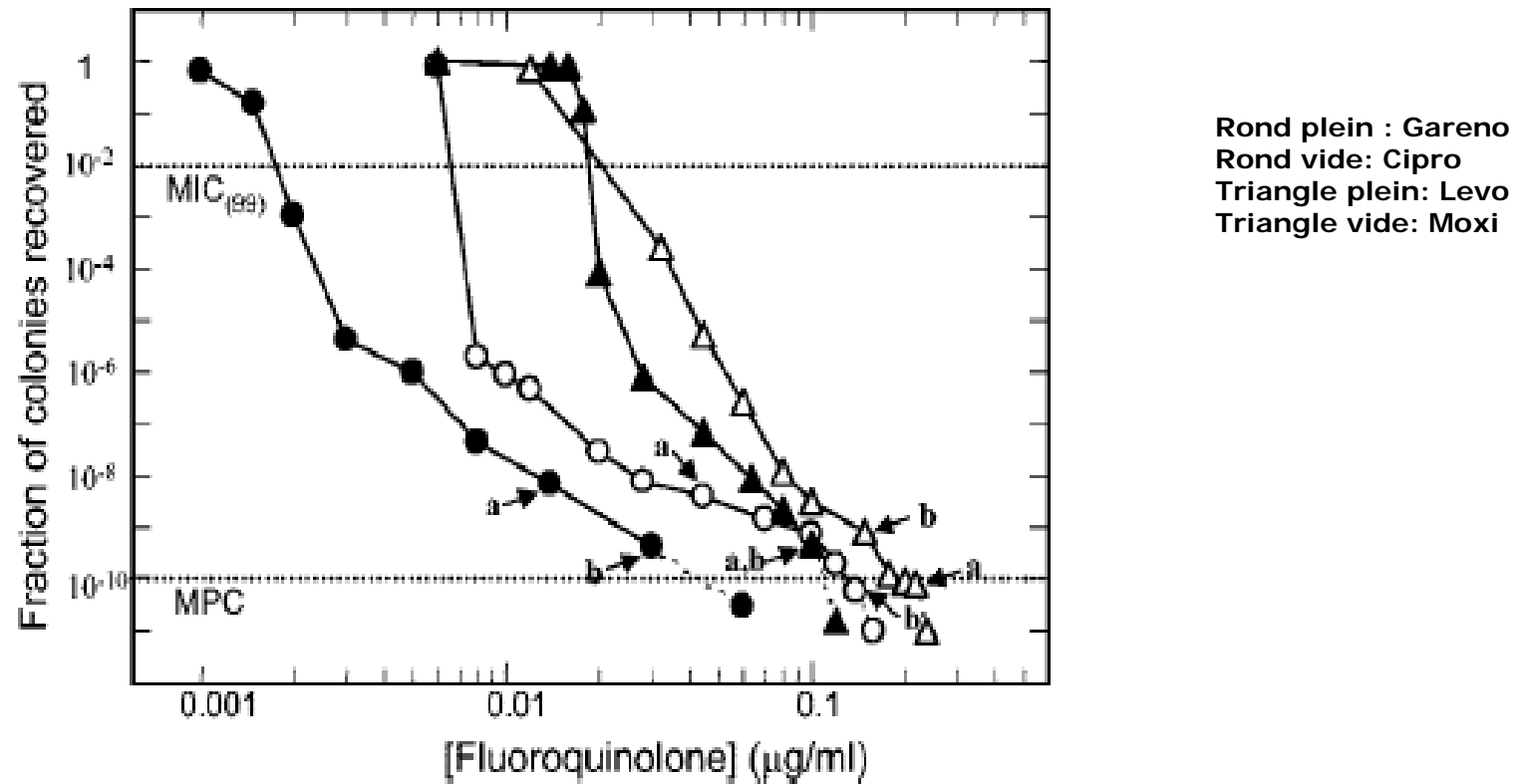
Phases du traitement de la tuberculose

Populations « BK »



Haemophilus:

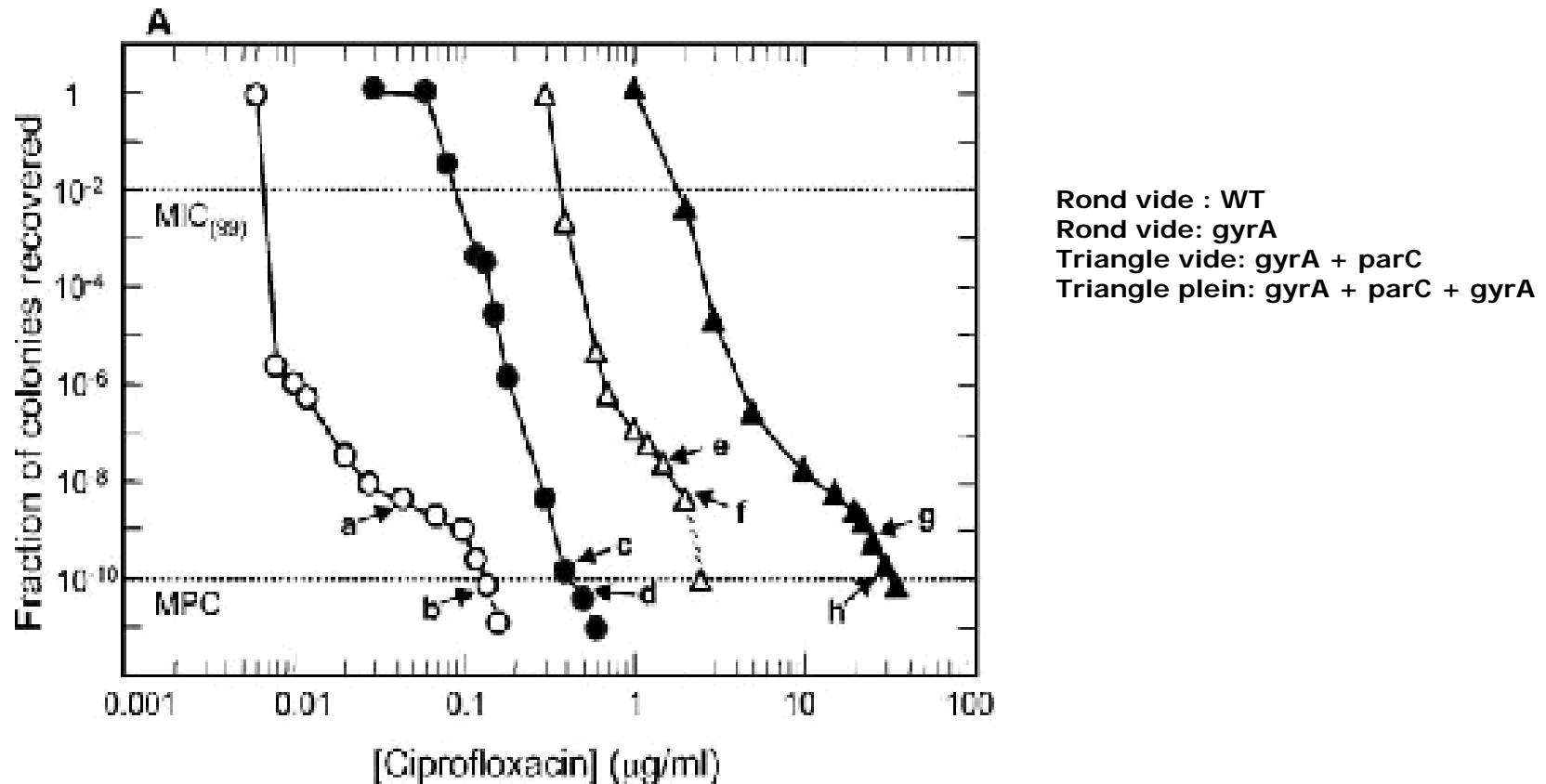
« côté molécule »: différences sans importance !!!



MPC << Cmax donc a priori pas de problème

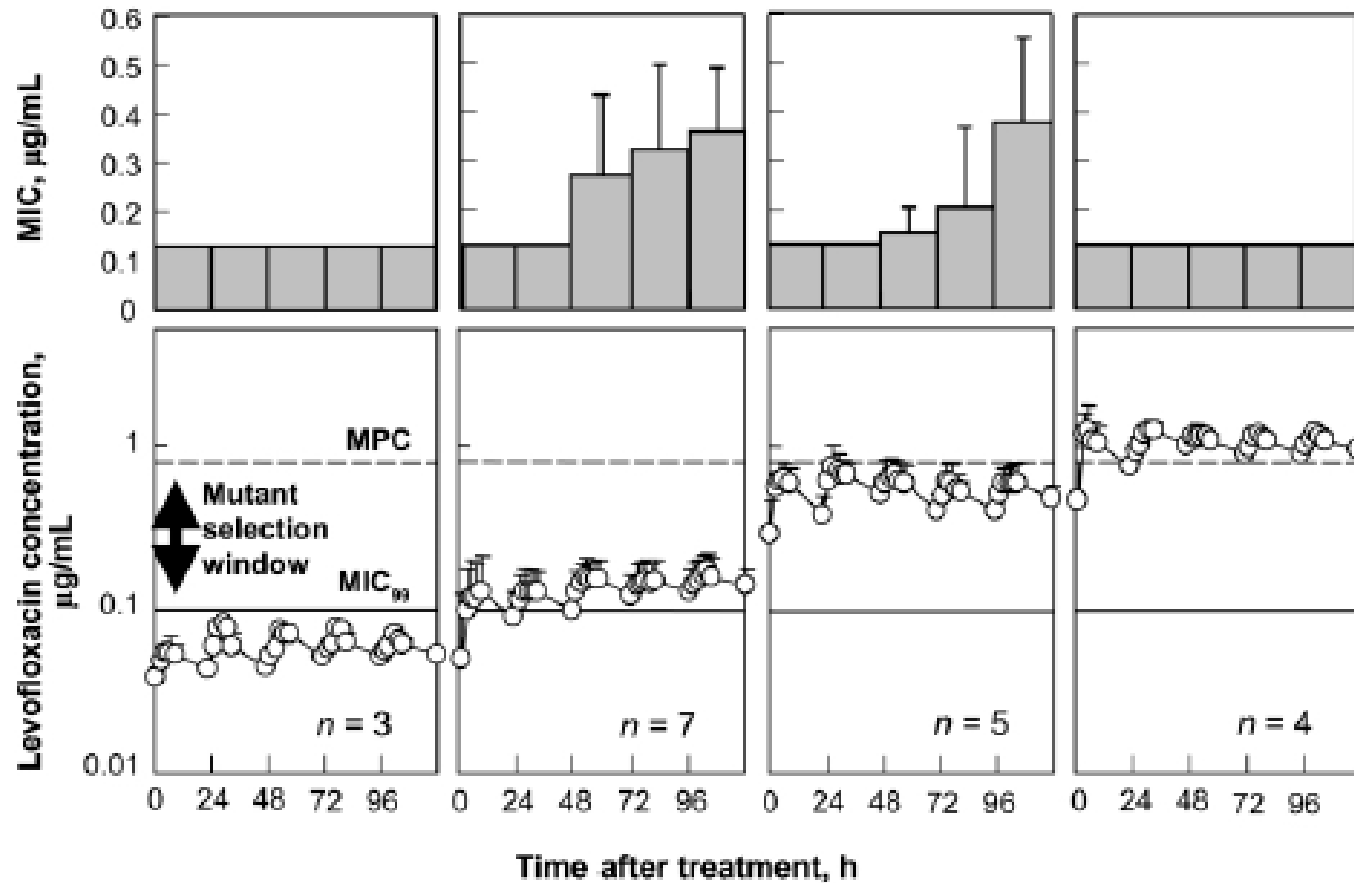
Haemophilus:

côté bactérie: au départ, c'est lequel !!
Différences avec grande importance



Si double mutation: MPC >> Cmax !!! =>.....! Mutants enrichis !

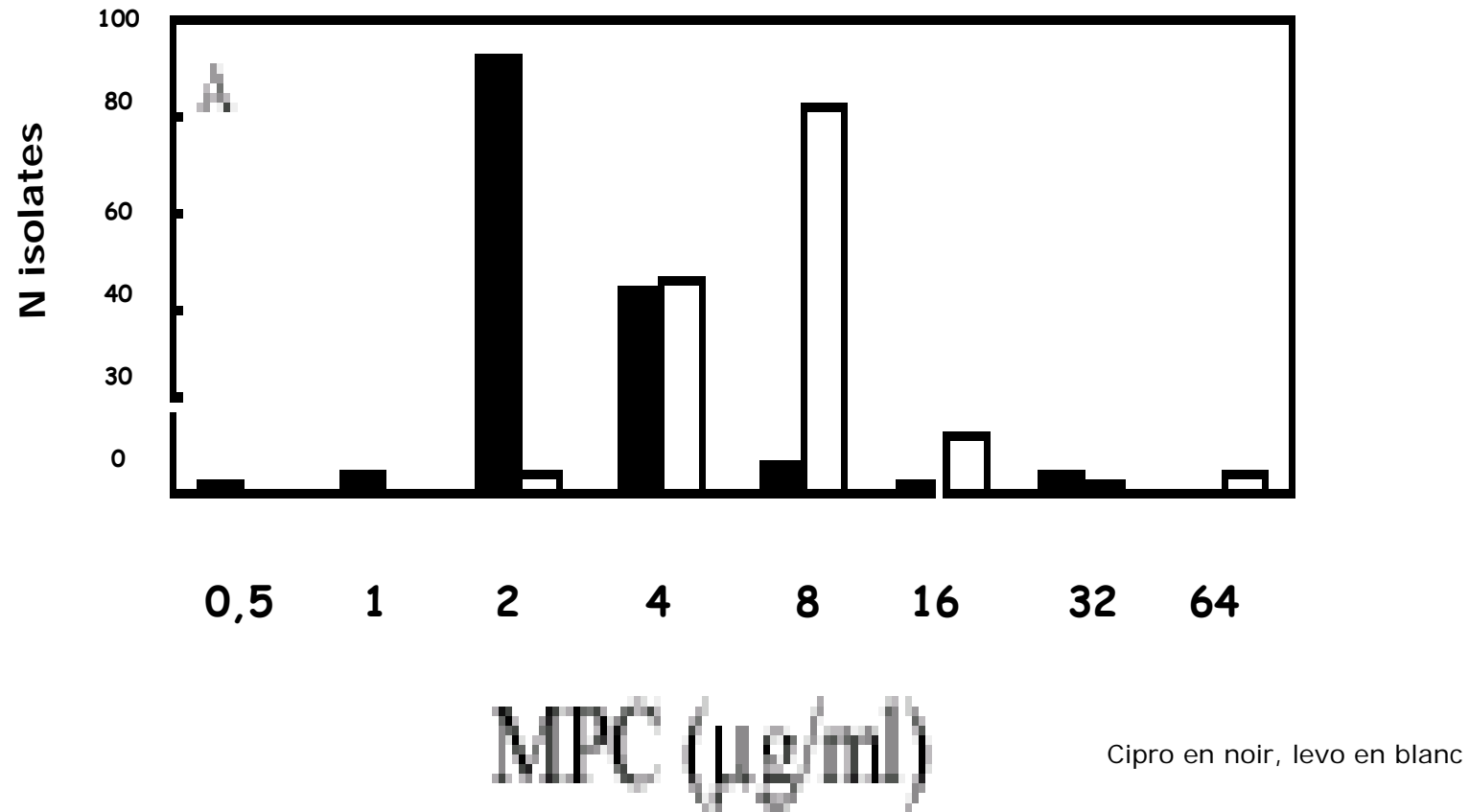
Staphylocoque vs levo



Divers bactéries: MPC « côté molécule »

Organism	Compound	MIC ₍₉₉₎ (mg/L)	MPC (mg/L)	MPC/ MIC ₍₉₉₎	C _{max} (mg/L)	MPC/C _{max}
<i>E. coli</i>	Norfloxacin	0.045	1.6	36	1.3	1.2
	Rifampicin	7	>4000	>570	9.5	>42
	Tobramycin	1.2	25	20	52	0.5
	Chloramphenicol	1.9	12	6.3	26	0.5
	Penicillin G ^a	2.4	300	120	510	0.6
<i>S. aureus</i> Strain RN450	Garenoxacin	0.02	0.3	15	6.4	0.047
	Moxifloxacin	0.12	0.38	3.2	4.5	0.08
	Gatifloxacin	0.08	0.5	6.2	3.7	0.14
	Levofloxacin	0.18	2	11	5.2	0.38
	Ciprofloxacin	0.31	4	13	6	0.67
	Erythromycin	0.5	32	64	2.7	12
	Penicillin G ^a	0.014	0.22	16	510	0.0004
	Chloramphenicol	3	17	5.7	26	0.65
	Tetracycline	0.24	1.2	5	4.8	0.25
	Clinical isolates	Ciprofloxacin	0.6	8	13	6
	Garenoxacin	0.03	0.4	13	6.4	0.06
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	Moxifloxacin	0.15	0.5	3.3	4.5	0.2
	Levofloxacin	0.7	2.3	3.3	5.2	0.4
Clinical isolates ^b	Moxifloxacin	0.25	1	4.0	4.5	0.22
	Gemifloxacin	0.03–0.06	0.5	8–17	1.6	0.31
	Gatifloxacin	0.5	4	8.0	3.7	1.1
	Trovafloxacin	0.25	4	16	3.1	1.3
	Levofloxacin	1	8	8.0	5.2	1.5

Pyo cipro vs levo



Conclusion

fluoroquinolones vs pneumonie à pneumocoque

- **La CMI seule ne prédit l'activité in vivo**
- **Impact thérapeutique majeur d'un bas niveau résistance**
 - **Détection phénotypique, génotypique,... ?**
 - **Adaptation des concentrations critiques ?**
- **Valeur prédictive de la CPM**
 - **Fenêtre de mutation vs apparition de résistances in vivo**

Traitements antibactériens

- Résistance inéluctable
- TT => sélection.....tôt ou tard
- => quels sont les objectifs thérapeutiques
 -
 - TT courts chez l'immunocompétent ?



Remerciements

EA 562 - LQRF:
Delphine Croisier
Manuel Etienne
Catherine Lequeu

Karl Drilcka
Public Health Research Institute, NJ, USA

L'équipe de Maladies Infectieuses

Faculté de Médecine
Région Bourgogne
CMIT
Laboratoires