

UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER  
FACULTE DE SANTE  
DEPARTEMENT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNEE : 2024

THESE 2024 TOU3 2067

## THESE D'EXERCICE

POUR L'OBTENTION DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE  
Spécialité BIOLOGIE MEDICALE

Présentée et soutenue publiquement par

**POLLANI Candice**

ETUDE DE L'EFFET INOCULUM POUR L'OXACILLINE DE SOUCHES DE  
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SENSIBLES A LA METICILLINE  
RESPONSABLES D'ENDOCARDITES INFECTIEUSES

Le 11 Octobre 2024

Directeur de thèse : Madame le Docteur Clémence MASSIP

### JURY

Président : Madame le Professeur Peggy GANDIA

1er assesseur : Monsieur le Professeur Pierre DELOBEL

2ème assesseur : Madame le Docteur Aude FERRAN

**PERSONNEL ENSEIGNANT**  
**du Département des Sciences Pharmaceutiques de la Faculté de santé**  
**au 24/08/2024**

**Professeurs Emérites**

Mme BARRE A.	Biologie Cellulaire	M. PARINI A. Physiologie
M. BENOIST H.	Immunologie	
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie	
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire	
M. SALLES B.	Toxicologie	

**Professeurs des Universités**

**Hospitalo-Universitaires**

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CESTAC P.	Pharmacie Clinique
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
Mme DE MAS MANSAT V.	Hématologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PASQUIER C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B. (Directrice-adjointe)	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

**Universitaires**

Mme BERNARDES-GENISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme BOUTET E.	Toxicologie - Sémiologie
Mme COSTE A.	Parasitologie
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Doyen-directeur)	Physiologie
Mme DERA EVE C.	Chimie Thérapeutique
Mme ECHINARD-DOUIN V.	Physiologie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
M. GUIARD B.	Pharmacologie
M. LETISSE F.	Chimie pharmaceutique
Mme MULLER-STAUMONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme REYBIER-VUATTOUX K.	Chimie analytique
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
Mme SIXOU S.	Biochimie
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
Mme WHITE-KONING M.	Mathématiques

## Maîtres de Conférences des Universités

### Hospitalo-Universitaires

M. DELCOURT N.	Biochimie
Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique
Mme KELLER L.	Biochimie
M. PUISSET F.(*)	Pharmacie Clinique
Mme ROUCH L(*)	Pharmacie Clinique
Mme ROUZAUD-LABORDE C	Pharmacie Clinique
Mme SALABERT A.S.	Biophysique
Mme SERONIE-VIVIEN S (*)	Biochimie
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie

### Universitaires

Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme BON C. (*)	Biophysique
M. BOUAJILA J. (*)	Chimie Analytique
M. BROUILLET F(*)	Pharmacie Galénique
Mme CABOU C.	Physiologie
Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
Mme CHAPUY-REGAUD S. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme COLACIOS C.(*)	Immunologie
Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
Mme FALLONE F.	Toxicologie
Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
Mme GADEA A.	Pharmacognosie
Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
Mme LEFEVRE L.	Physiologie
Mme LE LAMER A-C. (*)	Pharmacognosie
M. LE NAOUR A.	Toxicologie
M. LEMARIE A.(*)	Biochimie
M. MARTI G.	Pharmacognosie
Mme MONFERRAN S (*)	Biochimie
M. PILLOUX L.	Microbiologie
Mme ROYO J.	Chimie Analytique
M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
Mme TOURRETTE-DIALLO A. (*)	Pharmacie Galénique
Mme VANSTEELANDT M.	Pharmacognosie

(\*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

## Enseignants non titulaires

### Assistants Hospitalo-Universitaires

M. AL SAATI A	Biochimie
Mme BAKLOUTI S.	Pharmacologie
Mme CLARAZ P.	Pharmacie Clinique
Mme CHAGNEAU C.	Microbiologie
Mme DINTILHAC A	Droit Pharmaceutique
M. GRACIA M.	Pharmacologie
Mme RIGOLOT L	Biologie Cellulaire, Immunologie
Mme STRUMIA M.	Pharmacie Clinique

### Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER)

Mme CROSSAY E.	Pharmacognosie
Mme GRISSETI H.	Biochimie
Mme MALLI S.	Pharmacie Galénique
Mme MTAT DALILA D.	Chimie Pharmaceutique
Mme MONIER M.	Microbiologie
M. TABTI R.	Chimie Thérapeutique

## *Serment de Galien*

*En présence des Maîtres de la Faculté, je fais le serment :*

*- D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances*

*- 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 Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;*

*- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité*

*- En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

*- De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession*

*- De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens*

*- De coopérer avec les autres professionnels de santé*

*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.*

# Remerciements

## Aux membres du jury

### **A Madame le Professeur Peggy GANDIA, Présidente du jury**

C'est un honneur de vous avoir en tant que présidente de mon jury de thèse. Je vous remercie pour l'expertise pharmacologique que vous avez pu m'apporter au cours de ces années. J'ai beaucoup apprécié travailler en collaboration avec vous pour la représentation des internes. Ce ne fût pas toujours simple, mais vous avez toujours été disponible pour résoudre les situations problématiques et nous avons pu mener à bien des projets qui ont pu aboutir grâce à votre soutien.

### **A Monsieur le Professeur Pierre DELOBEL, assesseur**

Je vous remercie de l'attention que vous avez pu porter à ce travail et de manière générale sur ce projet que vous portez depuis plusieurs années. C'est un plaisir d'avoir pu y participer. Merci de me faire l'honneur de juger mon travail en apportant toute votre expertise en maladies infectieuses.

### **A Madame le Docteur Aude FERRAN, assesseur**

Merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Merci de m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire à l'école vétérinaire et de m'avoir aidé pour mener à bien ce projet. Votre expertise et votre expérience m'ont permis d'avancer et d'interpréter mes résultats du mieux possible.

### **A Madame le Docteur Clémence MASSIP, Directrice de thèse**

Merci d'avoir accepté que je devienne ton petit padawan. Un grand merci pour ton encadrement, ta bienveillance et ta disponibilité. Merci d'avoir été mon bureau des pleurs pendant ces travaux de longue haleine (n'oublions pas nos petits chats), merci d'avoir calmé mon impulsivité. Tu m'as aidé à fournir un travail de qualité en me ré orientant sur le bon chemin et en apportant de la clarté dans mes idées, pour que tout le monde puisse mieux Y comprendre. Parfois je suis nostalgique, et puis je me souviens de nos fins d'après-midi à lire nos plaques et à notre admiration commune face à un CAMP test, que seules nous pouvons comprendre.

Tu m'as souvent dit que chacun a son grand mannitou de la bactério, aujourd'hui tu es mon mannitou de la bactério, merci de m'avoir transmis tant de choses et de m'avoir permis de progresser.

### **Pour leur aide durant la réalisation de ce travail, je tiens à remercier**

Le docteur **Thomas LANOT**, pour avoir accepté de doser nos solutions d'antibiotiques en pharmacologie. Nous avons pu ainsi éviter des semaines d'impasse.

Le docteur **Camille MANE**, merci d'avoir répondu à toutes mes questions sur la pharmacocinétique de l'oxacilline.

Les techniciens et techniciennes du laboratoire de bactériologie pour leur implication dans la fabrication des milieux de culture et leur aide pour mener à bien ce projet. De manière générale, merci pour toutes les connaissances apportées au cours de ma formation.

Les biologistes de Bactériologie, Marion, Pauline, Camille, Laura, Damien (et Clémence) pour m'avoir transmis l'intérêt pour votre discipline dès mon 1<sup>er</sup> passage chez vous. Merci pour votre bienveillance, votre disponibilité, pour votre investissement dans notre formation et votre transmission de connaissances.

Je remercie particulièrement **Ophélie Gourbeyre** et **Aude Ferran** de l'école vétérinaire pour m'avoir accueilli et permis de réaliser mes expérimentations dans votre laboratoire. Vous m'avez aidée et formée de la meilleure des manières pour que je puisse mener à bien mon travail. Ophélie, merci pour ton implication et pour m'avoir aidé à mettre au point ce fameux protocole avant de commencer. J'ai beaucoup apprécié mes virées matinales à l'ENVT.

Au Docteur **Baptiste Jean**, pour ton analyse des dossiers cliniques des patients et pour ton aide à la réalisation des (nombreuses) courbes de survie que j'ai pu te demander. Merci pour ton implication au cours de ce travail.

## **A mes amis,**

A mes **bombes de Grenoble**, merci pour tout.

D'avoir été là pendant nos années pharma mais encore après. Merci pour votre soutien sans faille pendant mes deux années difficiles de concours, vous êtes des amies en or. Merci à toutes de m'avoir fait découvrir la PHETE et les moments partagés. Tout aura commencé avec la team classique, le début d'une belle amitié. Coline, Blanche, un plaisir de vous avoir ramené de vos soirées Fal, j'en rigole encore.

**Agatouche**, merci pour ta joie de vivre et ton enthousiasme à tout épreuve. Un jour peut être tu réussiras à me sortir du lit pour aller courir.

**FaurePoitrine** merci aussi pour tous ces moments partagés et ta joie de vivre. Cascada me ramène à toi et à ta chorégraphie à chaque fois que je l'écoute. A chaque fois que j'entends Cascada, je pense à toi et ta chorégraphie.

**Zelette**, mon binôme de TP de toujours, avec qui on aura bien galéré parfois mais bien rigolé, ton énergie débordante (et ta maladresse) et ta bonne humeur m'auront souvent remonté le moral.

**Lillette** mon petit boulet, merci d'être toi. Pas merci d'être fan de JLM ça me fatiguera toujours autant mais merci pour ton ouverture d'esprit sur la vie.

**Jul**, merci d'avoir été si importante pendant mes études et notamment pendant le concours. De m'avoir expliqué la science ana quand je ne comprenais rien et d'avoir été là dans les moments plus difficiles. La chambre d'hôtel à Rungis, on finira par en rire, mais ce sont des moments que je n'oublierai jamais.

**ElueUFRavanttout**, merci d'être toi, merci d'être cette épaule sur qui on peut se reposer

**Cocoine**, merci d'être toujours partante pour la PHETE et de m'avoir fait vivre des moments incroyables pendant mes années pharma.

**Barbabitch**, merci de me faire prolonger tous les bons moments vécus ensemble en étant avec moi sur Toulouse. Heureusement que tu es/a été/sera là pour m'écouter, me conseiller et me calmer.

Peu importe où vous vous trouvez, je sais que vous n'oublierez jamais : verre aux mains, verre aux lèvres, SEC.

Mention particulière pour **Yannick** et les valeurs communes que nous partageons depuis ces 3 années passées ensemble à Toulouse : la bonne gastronomie et les bonnes choses de la vie. Aux weeks end que nous avons fait, particulièrement à celui dans l'Aveyron et notre super repas chez BRAS. Le prochain : c'est Gilles Goujon !

## **A mes amies de l'internat**

VOILA ! Au tour du bb de passer sa thèse !

Tout aura donc commencé en bactério ... ou presque.

**Pauline N** et ton petit visage d'ange, à nos apéros au Concorde et à tes stickers et paillettes

A **PL** pour nos 6 mois passés en bactério et ces fameux pélicans que tu m'as fait découvrir au BL

**Emilie**, pour ton soutien pendant notre semestre de bactério, ta petite tête par-dessus la grotte m'aura apporté beaucoup de baume au cœur.

**Lucie T**, merci pour cette belle rencontre, pour tous vos messages d'encouragement, pour nos pintes de Despe au bar la maison, on en aura passé des soirées à refaire le monde.

**Apolline** (le tyran) pour ta/notre franchise légendaire (mais la tienne encore plus), même à distance, heureusement que tu es là pour écouter mes états d'âmes.

**Lucie F** (le 2<sup>ème</sup> tyran) et ton énergie débordante, toujours prête à aller boire un verre. A notre passion commune des gins, du fromage et de la bouffe. Toi aussi, merci d'écouter mes états d'âmes.

Une mention particulière pour toi, **Maëlys** et pour ton aide précieuse dans l'écriture de cette thèse, qui n'aurait pas été la même sans toi. Merci d'avoir pris le temps de m'aider, de me conseiller, de me rassurer, de m'écouter et de me gronder. Surtout, merci pour la dernière relecture et tes remarques toujours constructives. Le plus important, merci pour l'amie que tu es.

**Suzanne**, petit génie qui me fait relativiser, surtout quand on part boire des pintes et des gins. Thanks pour ce magnifique sommaire (+ gestion de mes problèmes informatiques multiples et variés). Merci pour les révisions intenses de ce DU juste pour une ligne sur le CV.

**PP6**, à nos rébellions de garde et aux contrôles de biochimie de la nuit pas validés. Merci d'avoir fait partie de notre trio gagnant avec Suzanne ce semestre, à nos pauses cafés noisette chez Jean entre midi et deux pour refaire le monde, ce semestre n'aurait pas été le même sans vous.

Même si nous finirons toutes par avoir des chemins différents, j'espère que nous arriverons toujours à nous retrouver autour d'un week end Gin & Spa & Chill. Merci d'être vous et de me faire vivre des moments incroyables.

**Thibault**, merci pour ta bonne humeur et ta simplicité. Désolée que tu puisses pas faire parti de mon jury ...

A **Ophélie** et **Clément**, les cross fitteurs. Ophélie la plus grosse des morues, mais aussi la plus grosse fan de fromage. A nos trocs entre reblochons et cancouillotte, belle équipe de bons vivants, on sait qu'on pourra toujours compter sur vous pour une fondue.

Aux piouces **Lamia** et **Inès**, à nos commérages et à nos RDV au Bellini avec des cocktails dilués.. et surtout à ce fameux TWIX. Lamia, merci de me faire relativiser sur tout. Inès merci de me faire rire partout où je te croise. Des amies comme vous ça n'a pas de prix.

## **A mes copains par procuration**

**Gautier** et **Charlotte**, le S de la veine.

Merci de faire partis de ma vie, et de partager avec moi ces moments précieux. Merci pour les belles aventures que vous m'avez permis de vivre et pour toutes les prochaines. Vous m'avez un peu fait devenir backpackeuse, même si j'ai encore besoin d'apprendre à vos côtés. A nos multiples valeurs communes : voyages, bouffe, belles choses (Grands buffets, l'opulence, Mélisandre) et je pense que c'est loin d'être terminé.

**Lucas** et **Alice**, **Manon** et **Clément**, **Sam** et **Aurélie**

A nos nombreux weeks end ensembles et nos rituels du 31 ... Même si nous sommes parfois loin, c'est toujours un plaisir de se retrouver. **Clément**, **Manon**, merci d'avoir pris soin de moi, et de m'avoir offert un cadre exceptionnel pour la dernière ligne droite.

**Aude**, **Mathilde**, **Imad**, **Laetitia**, **Loic**, **Bruno**

Merci pour ce RDV annuel au Secret Santa et aux weeks end que nous avons pu passer ensemble. Je suis très contente que vous fassiez partis de ma vie.

## A ma famille

**Maman**, merci pour tout ce que tu as fait pour moi. Merci une nouvelle fois pour ton implication, notamment dans ce travail que tu as relu de manière attentive. Merci de m'avoir transmis ton perfectionnisme, ta persévérance, ta ténacité et ton envie de réussir. Si j'en suis là aujourd'hui tu y es pour beaucoup. Merci pour ton soutien sans faille et d'avoir œuvré pour que je ne manque de rien. J'espère que tu es fière de moi.

**Albert**, merci pour tes conseils avisés et bienveillants, nos nombreuses discussions sur la vie, ta bonne humeur et ta capacité d'apprécier les choses à leur juste valeur.

### Papa

Merci pour m'avoir transmis ta passion de la gastronomie et de l'épicurisme de la vie et de nous avoir appris à relativiser. Tu as su trouver les bons mots tout au long de ces années d'études en étant toujours à l'écoute. Merci d'avoir respecté les choix que j'ai fait, même si parfois c'est dur de me suivre. En tant que bon banquier, j'espère qu'après ces longues années à payer, tu es fier de ton investissement.

**Adélaïde**, merci pour ton écoute, ta bienveillance et ton ouverture d'esprit. Merci pour tous ces beaux moments passés en compagnie d'**Héloïse** et **Maxence**.

A **Inès**, mon petit bb, mon lggiz, ma petite sœur LLB

Ces quelques lignes ne suffiraient pour t'exprimer à quel point tu es importante. Même si parfois tu me soules, surtout quand tu ne m'acceptes pas dans ton lit, tu es une belle personne et une petite sœur incroyable. Merci pour tous ces allers retours à l'aéroport : sans toi je serais probablement encore au bord de la route. Tu as été là pour moi quand j'en avais besoin et tu as su trouver les bons mots quand ça n'allait pas. Sache que je serais toujours là pour t'épauler dans les moments difficiles.

A mes grands-parents **Sabine** et **André**

**Mamie**, un grand merci pour tout. Merci de prendre soin de moi quand je reviens et me faire à manger, merci d'avoir lavé mon linge quand je n'avais pas le temps. Tu as toujours été là, et tu es, et tu seras toujours là quand j'en ai besoin.

**Papi**, j'espère que tu n'as pas oublié que « comme l'oiseau fait son nid, il s'y couche ». J'espère qu'aujourd'hui, tu es fier de ton petit oiseau, bientôt (ou enfin) diplômé à 30 ans.

A **Sévérine, Lise Andréa** et **Maxime**, à nos virées ensemble, à Vienne, Annecy et autres et à nos après-midis chez papi et mamie à discuter de tout et de rien, merci pour votre soutien et tous les bons moments partagés ensembles, qui n'ont pas de prix.

A mes grands-parents **Vincente** et **Folco**

Merci pour vos multiples attentions comme tous mes paquets de bonbons avec lesquels je repartais le dimanche soir et toutes les pâtes que j'ai pu ramener.

Merci mamie de m'avoir expliqué 50 fois comment faire les lasagnes, les pâtes au saumon et les poivrons. J'ai fini par comprendre que tu ne m'avais pas donné tous les ingrédients : la fameuse crème de saumon.

A mes tantes **Laura** et **Françoise**, mon oncle **JP** (notre passion commune pour la cuisine), à mes cousines et cousin, **Clara, Juliette, Pauline** et **Thomas**

Merci pour votre soutien dès que nécessaire et nos réunions de famille du dimanche, autour de longues discussions.

A mes beaux-parents (même si j'ai pas de bague), **Rita** et **Thierry**

Merci de m'avoir accepté au sein de votre famille, de me supporter et d'avoir accepté nos choix de vie et parfois nos envies d'ailleurs. A tous les moments passés ensemble et aux prochains.

**Elsa** et **Gaël**

A nos moments passés ensemble, à nos futurs weeks ends entre Lyon et Toulouse, ou peut être là où Gaël aura décidé de nous emmener ?

A **Antoine** la luciole drama-Queen

Merci de m'avoir supporté et de continuer à me supporter en toutes circonstances, même lorsque ma mauvaise humeur surgit. Je ne suis pas toujours facile et c'est pour ça que j'admire ta patience, ta bienveillance et ton empathie.

Le moment que tu attendais tant depuis des mois est arrivé, tu vas enfin pouvoir souffler !  
Merci de t'être souvent adapté à mon programme, à mes exigences et à mes contraintes (et aussi d'avoir fait le ménage, les lessives, les courses, le repassage et de m'avoir montré quelques-uns de tes talents culinaires). J'ai hâte de voir ce que la vie nous réserve et de vivre de nouvelles aventures ensemble.

Et le meilleur pour la fin, **Popi**, toujours présent, qui m'aura soutenu tout au long de mes études et mes péripéties.

# Table des matières

Index des figures .....	14
Index des tableaux .....	15
Liste des abréviations .....	16
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>17</b>
<b>PARTIE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>19</b>
<b>I. PLACE DE L'OXACILLINE DANS LES ENDOCARDITES A SAMS ET EFFET INOCULUM .....</b>	<b>19</b>
1. Caractéristiques microbiologiques et habitat de <i>S. aureus</i> .....	19
2. Les endocardites à <i>S. aureus</i> .....	19
3. Résistance de <i>S. aureus</i> par la production de $\beta$ -lactamases .....	22
4. Oxacilline et traitement des endocardites à SAMS .....	23
a. Evolution des recommandations de traitement .....	23
b. L'oxacilline .....	25
5. L'effet inoculum .....	29
a. Bref historique de l'effet inoculum .....	29
b. Effet inoculum et céfazoline .....	29
c. Effet inoculum pour les pénicillines M anti-staphylococciques .....	31
<b>II. SYSTEME AGR ET ENDOCARDITES A STAPHYLOCOQUE DORE .....</b>	<b>38</b>
1. Rôles du système <i>agr</i> .....	38
2. Système <i>agr</i> et biofilm de staphylocoque doré .....	40
a. Biofilm de staphylocoque doré et endocardite infectieuse .....	40
b. Rôle du système <i>agr</i> dans la régulation de la formation du biofilm .....	42
3. Impact en clinique du biofilm et du système <i>agr</i> .....	43
a. Impact de la formation de biofilm .....	43
b. Impact d'une dysfonction du système <i>agr</i> .....	44
c. Lien entre formation de biofilm et système <i>agr</i> .....	45
4. Quantification de la production de biofilm au laboratoire .....	46
<b>PARTIE 2 : PARTIE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>50</b>
<b>I. Matériels et méthodes .....</b>	<b>50</b>
1. Choix des isolats bactériens et rappels des précédentes analyses .....	50
2. Détermination de la sensibilité à l'oxacilline et de l'effet inoculum .....	51
3. Fonctionnalité du système <i>agr</i> et CAMP test .....	55
4. Détermination de la capacité de production de biofilm des bactéries .....	56
5. Analyses statistiques .....	58
<b>II. Résultats .....</b>	<b>59</b>
1. Structure de l'étude .....	59

2.	Distribution des CMI Oxacilline et effet inoculum.....	61
3.	Distribution des différents types de $\beta$ -lactamases staphylococciques .....	64
4.	Remise en perspective en fonction de l'évolution clinique .....	69
5.	CAMP test et fonctionnalité du système <i>agr</i> .....	71
6.	Production de biofilm et effet inoculum .....	74
a.	Sélection des isolats .....	74
b.	Production de biofilm.....	74
<b>III.</b>	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>77</b>
	<b>CONCLUSION.....</b>	<b>88</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>89</b>
	<b>Annexe .....</b>	<b>105</b>
	<b>Article soumis à JAMA Network Open .....</b>	<b>105</b>

# Index des figures

<b>Figure 1</b> : Recommandations de l'ESC 2023 de l'endocardite infectieuse à SAMS.....	25
<b>Figure 2</b> : Structures moléculaires de la pénicilline G et de l'oxacilline.....	26
<b>Figure 3</b> : Représentation schématique du locus <i>agr</i> .....	39
<b>Figure 4</b> : Étapes de formation du biofilm.....	41
<b>Figure 5</b> : Protocole pour la détermination des CMI pour l'oxacilline à inoculum standard et à inoculum élevé .....	53
<b>Figure 6</b> : Lecture des CMI en microdilution en milieu liquide à inoculum standard et à inoculum fort.....	54
<b>Figure 7</b> : Images d'un CAMP test positif (A) et d'un CAMP test négatif (B).....	56
<b>Figure 8</b> : Détermination de la production de biofilm des souches de <i>S. aureus</i> .....	57
<b>Figure 9</b> : Image d'une plaque 96 puits avec souches productrices de biofilms et souches non productrices.....	58
<b>Figure 10</b> : Représentation de la structure de l'étude.....	60
<b>Figure 11</b> : Distribution des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'oxacilline à inoculum standard selon la présence ou l'absence de <i>blaZ</i> .....	61
<b>Figure 12</b> : Répartition des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'oxacilline à inoculum standard et à inoculum élevé selon la présence ou non d'un effet inoculum.....	63
<b>Figure 13</b> : Arbre phylogénétique représentant les 162 souches positives pour le gène <i>blaZ</i> , en fonction de leur séquence en acides aminés, permettant de les classer en pénicillinase A, B, C ou D.....	65
<b>Figure 14</b> : Représentation des différentes $\beta$ -lactamases en fonction de la présence d'un effet inoculum pour l'oxacilline ou la céfazoline, pour les deux ou aucune des deux molécules. Comparaison (test de Fischer) de la proportion de souches présentant un EI pour l'oxacilline.....	66
<b>Figure 15</b> : Représentation des différentes $\beta$ -lactamases (A, B, C) et des souches <i>blaZ</i> négatives en fonction de l'intensité de l'effet inoculum (pas d'effet inoculum, > 2 dilutions, $\leq$ 2 dilutions).....	68
<b>Figure 16</b> : Courbe de survie à un mois de traitement par oxacilline .....	70
<b>Figure 17</b> : Répartition des différentes $\beta$ -lactamases et souches <i>blaZ</i> négatives en fonction de la fonctionnalité du système <i>agr</i> , détecté par la production de $\delta$ hémolysine.....	71
<b>Figure 18</b> : Courbe de survie à un mois en fonction de la présence d'un système <i>agr</i> dysfonctionnel .....	73
<b>Figure 19</b> : Classification des souches en fonction de leur capacité à produire du biofilm et la fonctionnalité du système <i>agr</i> .....	76

## Index des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Distribution des microorganismes chez les patients avec une endocardite infectieuse d'après Selton-Suty et <i>al.</i> .....	20
<b>Tableau 2</b> : Étiologies microbiologiques par région chez 2781 patients avec une endocardite prouvée .....	21
<b>Tableau 3</b> : Présentation des CMI, de l'effet inoculum et de la résistance à l'oxacilline .....	62
<b>Tableau 4</b> : Prévalence de l'effet inoculum de l'oxacilline selon le type de traitement reçu et la présence ou non de <i>blaZ</i> .....	69
<b>Tableau 5</b> : Résultats du CAMP test et effet inoculum pour la céfazoline et l'oxacilline .....	72
<b>Tableau 6</b> : Profil des souches testés pour la quantification du biofilm .....	74
<b>Tableau 7</b> : Production de biofilm des 48 souches testées en fonction du type de pénicillinase et de la présence d'un effet inoculum pour l'oxacilline, pour la céfazoline, pour les deux ou pour aucune des deux molécules .....	75

## Liste des abréviations

<b><i>agr</i></b>	Accessory Gene Regulator
<b>AIP</b>	Auto Induced Peptide
<b>ANSM</b>	Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé
<b>BHI</b>	Bouillon Heart Brain Infusion
<b>CAMP Test</b>	Christie-Atkins-Munch-Pertersen.
<b>CMI</b>	Concentration Minimale Inhibitrice
<b>DFG</b>	Débit de Filtration Glomérulaire
<b>EI</b>	Effet Inoculum
<b>ESC</b>	European Society of Cardiology
<b>EUCAST</b>	European Committee on antimicrobial Suceptibility Testing
<b>IV</b>	Intraveineux
<b>MH</b>	Mueller Hinton
<b>PAS</b>	Pénicilline anti staphylococcique
<b>PLP</b>	Protéines de liaison à la pénicilline
<b>SAMS</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible à la méticilline
<b>SARM</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
<b>Test au XTT</b>	Test aux sels de tétrazolium
<b>TSB</b>	Trypto-caséine soja
<b>UFC</b>	Unité formant colonie

# INTRODUCTION

L'endocardite infectieuse à *Staphylococcus aureus* est un enjeu majeur de santé publique. Il s'agit d'une maladie rare (environ 30 cas par million d'habitants (1)) mais grave entraînant d'une mortalité élevée, estimée entre 20 et 30 % à 6 mois selon les études (2,3) qui peut être à l'origine d'une prolongation du séjour hospitalier (4). La proportion d'endocardite infectieuse à *S. aureus* ne cesse d'augmenter et est passée de 16 % en 1991 à 26 % en 2008 (5). La majorité des souches de *S. aureus* responsables d'endocardites est sensible à la méticilline (248 sur 291 souches, soit 85,2 %) selon une base de données internationales (6).

Les nouvelles recommandations de l'European Society of Cardiology (ESC) concernant le traitement de l'endocardite à *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline (SAMS), parues en 2023, placent désormais les pénicillines anti staphylococciques (PAS) et la céfazoline en traitement de première intention des endocardites à SAMS (4). Plusieurs études ont montré une efficacité comparable entre ces deux molécules (7,8).

Malgré des améliorations dans le diagnostic et la prise en charge, l'incidence et la mortalité de l'endocardite infectieuse sont restées inchangées (9). Suite à des échecs de traitement rapportés sous céfazoline, des études ont été menées afin de déterminer les raisons de ces échecs (10,11). Une des explications avancée est l'existence d'un effet inoculum, en présence de souches de SAMS productrices de pénicillinases (12).

L'effet inoculum se définit comme une augmentation de la CMI d'un facteur  $\geq 4$  lorsqu'un inoculum 100 fois supérieur à l'inoculum standard est utilisé (13). Ce phénomène, observé *in vitro*, peut être à l'origine de l'apparition de souches résistantes à inoculum élevé, ce qui peut être cliniquement pertinent dans une pathologie comme l'endocardite où l'inoculum bactérien est important, allant de  $10^8$  à  $10^{11}$  UFC/g de végétation (9), rendant l'éradication bactérienne difficile.

Les souches de *S. aureus* possèdent également la faculté de produire du biofilm, qui permet de protéger les bactéries du système immunitaire et de diminuer leur interaction avec les anti-infectieux, pouvant alors expliquer leur inefficacité.

Dans ce contexte, la prévalence de l'effet inoculum pour la céfazoline a été étudiée sur des souches de SAMS responsables d'endocardite infectieuse, faisant l'objet d'une thèse réalisée par le Dr CROLLE. Les données microbiologiques ont été mises en relation avec les données cliniques des patients dans le cadre de la thèse (spécialité maladies infectieuses) du Dr JEAN. Les objectifs étaient de comparer l'efficacité de la céfazoline à celle des PAS dans le traitement des endocardites à SAMS, notamment lorsque la souche était porteuse d'une  $\beta$ -lactamase et de déterminer l'impact clinique de cet effet inoculum.

De nombreuses études se sont intéressées à l'effet inoculum pour la céfazoline et à son impact clinique mais très peu d'études ont évalué la présence et l'impact d'un potentiel effet inoculum pour l'oxacilline.

Ce travail a donc pour objectif d'analyser la prévalence de l'effet inoculum pour l'oxacilline des souches de SAMS responsables d'endocardites en France.

La première partie fera l'objet d'une revue de la littérature sur la place de l'oxacilline dans le traitement des endocardites à SAMS et sur l'impact de l'effet inoculum. Une deuxième partie sera consacrée à l'étude d'autres mécanismes potentiellement impliqués dans les échecs thérapeutiques, tels que la dysfonction du système *agr*, régulateur de nombreux facteurs de virulence du staphylocoque et la formation de biofilm.

La partie expérimentale, centrée sur la recherche d'un effet inoculum pour l'oxacilline parmi une collection de SAMS responsables d'endocardite infectieuse, sera décrite dans un second temps. Elle comprend également quelques expérimentations pour tenter d'explorer les mécanismes qui sous-tendent cet effet inoculum. Les résultats seront ensuite présentés et mis en lien avec les données cliniques puis discutés dans une dernière partie.

# PARTIE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

## I. PLACE DE L'OXACILLINE DANS LES ENDOCARDITES A SAMS ET EFFET INOCULUM

### 1. Caractéristiques microbiologiques et habitat de *S. aureus*

*S. aureus* est un cocci à Gram positif qui peut être disposé en paires, en tétrades ou en amas. Il s'agit d'une bactérie immobile, non sporulée et aéro-anaérobie facultatif.

La culture se fait facilement sur gélose au sang Columbia additionnée de 5 % de sang de mouton, sur laquelle sont observées des colonies  $\beta$ -hémolytiques, qui peuvent prendre une teinte jaune. *S. aureus* est une bactérie catalase positive. Presque toutes les souches de *S. aureus* produisent la coagulase, facteur de virulence permettant l'identification présomptive de la bactérie.

*S. aureus* est une bactérie ubiquitaire de la flore commensale : 20 à 30 % des humains sont colonisés en permanence sans qu'aucun symptôme ne soit développé (14).

En fonction de l'expression des facteurs de virulence et des réactions immunitaires de son hôte, *S. aureus* est capable de s'adapter rapidement et de passer d'un état de colonisation à un état pathogène. La porte d'entrée des infections à staphylocoque est le plus souvent cutanée (plaie, cathéters).

Ces infections restent la plupart du temps localisées mais se compliquent parfois par extension loco régionale de l'infection ou par diffusion hématogène de la bactérie, alors responsables d'infections profondes comme les bactériémies, les endocardites ou les ostéomyélites (15).

### 2. Les endocardites à *S. aureus*

L'endocardite infectieuse est une infection de l'endocarde, le plus souvent causée par des bactéries, au décours d'une bactériémie. Certains patients sont plus à risque de développer une endocardite, notamment en cas de pathologie cardiaque préexistante : valve artificielle, cardiopathie cyanogène, malformation cardiaque.

Le profil de l'endocardite a largement évolué au cours de ces dernières années, notamment en raison du vieillissement de la population et de l'évolution des facteurs de risque. L'émergence d'une proportion croissante d'endocardites acquises à l'hôpital (16) est associée à l'augmentation du nombre d'endocardites impliquant *S. aureus* (17).

L'augmentation du nombre de valves prothétiques, du nombre d'implantation de matériel cardiaque (18), ainsi que la consommation de drogues intraveineuses sont des facteurs de risque qui ont contribué au changement de la présentation de l'endocardite (19). Ces changements expliquent que *S. aureus* soit le pathogène le plus fréquent dans les pays industrialisés (9). Les endocardites associées aux soins représentent les formes les plus courantes d'endocardites infectieuses à *S. aureus* (20), tandis que les streptocoques étaient plus fréquemment responsables d'endocardites d'origine communautaire (1).

Le tableau n°1 synthétise les données d'une étude observationnelle réalisée en France sur 845 patients atteints d'endocardites, qui montre que *S. aureus* était responsable de 26,6 % des endocardites (1).

**Tableau 1 : Distribution des microorganismes chez les patients avec une endocardite infectieuse d'après Selton-Suty et al.**

Microorganisms	No. (%) of Patients (n = 497)	
Streptococcaceae	240	(48.3)
Streptococci	180	(36.2)
Oral streptococci <sup>a</sup>	93	(18.7)
Group D streptococci <sup>b</sup>	62	(12.5)
Pyogenic streptococci	25	(5.0)
Enterococci	52	(10.5)
Other Streptococcaceae <sup>c</sup>	8	(1.6)
Staphylococcaceae	180	(36.2)
<i>Staphylococcus aureus</i>	132	(26.6)
Coagulase-negative staphylococci	48	(9.7)
Other microorganisms <sup>d</sup>	42	(8.5)
HACEK group	6	...
Enterobacteriaceae	4	...
<i>Propionibacterium acnes</i>	4	...
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	...
<i>Lactobacillus</i> species	2	...
<i>Corynebacterium</i> species	2	...
<i>Coxiella burnetii</i>	2	...
<i>Bartonella quintana</i>	1	...
<i>Tropheryma whipplei</i>	1	...
<i>Candida</i> species	6	...
Miscellaneous <sup>e</sup>	11	...
≥2 Microorganisms <sup>f</sup>	9	(1.8)
No microorganism identified	26	(5.2)

Une étude prospective de 2781 adultes avec une endocardite infectieuse, provenant de 25 pays, entre juin 2000 et septembre 2005 montre que *S. aureus* est le pathogène le plus fréquemment impliqué dans les endocardites, dans 3 des 4 régions étudiées, comme le montre le tableau ci-dessous (21).

**Tableau 2** : Étiologies microbiologiques par région chez 2781 patients avec une endocardite prouvée

	Total Cohort n = 2781 n (%)	Patients admitted directly to study sites only <sup>a</sup> n= 1558 n (%)	Region				P value for the difference between regions
			North America n = 597 n (%)	South America n = 254 n (%)	Europe n = 1213 n (%)	Other n = 717 n (%)	
<i>S. aureus</i>	869 (31)	487 (31)	256 (43)	43 (17)	339 (28)	231 (32)	<0.001
Coag Neg staph.	304 (11)	161 (10)	69 (12)	18 (7)	156 (13)	61 (9)	0.005
Viridans group strep	483 (17)	288 (19)	54 (9)	66 (26)	198 (16)	165 (23)	<0.001
<i>S. bovis</i>	165 (6)	101 (7)	9 (2)	17 (7)	116 (10)	23 (3)	<0.001
Other strep	162 (6)	101 (7)	38 (6)	16 (6)	66 (5)	42 (6)	0.86
Enterococci	283 (10)	158 (10)	78 (13)	21 (8)	111 (9)	73 (10)	0.05
HACEK	44 (2)	26 (2)	2 (0.3)	6 (2)	19 (2)	17 (2)	0.02
Fungi / yeast	45 (2)	25 (2)	20 (3)	3 (1)	13 (1)	9 (1)	0.002
Polymicrobial	28 (1)	23 (2)	8 (1)	1 (0.4)	13 (1)	6 (1)	0.60
Culture negative	277 (10)	122 (8)	41 (7)	51 (20)	123 (10)	62 (9)	<0.001
Other	121 (4)	66 (4)	22 (4)	12 (5)	59 (5)	28 (4)	0.61

Une méta analyse de 26 études publiées entre 1993 et 2003 a montré que les staphylocoques sont désormais les principaux agents pourvoyeurs d'endocardites, devant les streptocoques oraux et autres streptocoques et les entérocoques (22).

Entre 1999 et 2008, Federspiel et al (17) se sont intéressés aux hospitalisations liées aux endocardites aux USA et ont montré que la majorité des admissions pour endocardite était liée à *S. aureus*. Les endocardites causées par *S. aureus* étaient associées à une probabilité plus élevée de mortalité à l'hôpital que les endocardites liées à des streptocoques ou à des entérocoques (17,5 % contre 8,9 %, p < 0,001).

Une étude américaine plus récente, menée entre 2002 et 2017 sur 421 881 données de patients hospitalisés pour endocardite infectieuse a confirmé ces observations. Les microorganismes impliqués dans les endocardites retrouvaient majoritairement *Staphylococcus aureus* (50,2 %), suivi des streptocoques (25,1 %), des entérocoques (9,7 %) et des Gram négatifs (6,1 %) (23).

### 3. Résistance de *S. aureus* par la production de $\beta$ -lactamases

Selon les études, entre 70 et 90 % des isolats de *S. aureus* présentent une pénicillinase, à l'origine des résistances aux pénicillines A, G, aux carboxypénicillines (ticarcilline) et aux uréidopénicillines (pipéracilline) (24,25).

Les  $\beta$ -lactamases, codées par le gène *blaZ*, sont des enzymes responsables de l'hydrolyse du cycle  $\beta$ -lactam des pénicillines, ce qui les rend inactives. Les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases tels que l'acide clavulanique ou le tazobactam permettent de restaurer l'efficacité des  $\beta$ -lactamines.

Quatre types de  $\beta$ -lactamases produites par *S. aureus* ont été identifiés (A, B, C et D), par des méthodes immunologiques et cinétiques, par leur taux d'hydrolyse de différents substrats et plus récemment par séquençage de l'ADN. Les sous types A, C et D sont portés par un plasmide alors que le type B a un support chromosomique par incorporation d'un phage de groupe II dans le chromosome bactérien (26,27).

Chaque classe présente un profil hydrolytique propre, basé sur des caractéristiques enzymatiques comme la vitesse maximale d'hydrolyse ( $V_{max}$ ), la constante de Michaelis  $K_m$ , l'inverse de l'affinité du substrat pour l'enzyme et l'efficacité de l'enzyme à détruire la pénicilline dans des conditions physiologiques ( $K_m/K_{cat}$ ).

Le profil hydrolytique des  $\beta$ -lactamases de *S. aureus* a surtout été étudié pour les céphalosporines ou pour la pénicilline G puisque les pénicillines M sont supposées stables vis à vis des  $\beta$ -lactamases. Les souches qui produisent une pénicillinase de type A se distinguent par une capacité plus élevée à hydrolyser la céfazoline, en particulier à inoculum élevé alors que les souches de type C ont montré une hydrolyse de la céfazoline 4 fois plus faible (28). L'hydrolyse plus rapide de la céfazoline par les souches de type A est corrélée à la présence des acides aminés sérine et thréonine aux résidus 216 et 128 respectivement (27). Les différences de cinétique entre les enzymes sont expliquées par des substitutions d'acides aminés qui affectent la structure et la fonction en entravant la

liaison du substrat au site actif, en diminuant le  $k_{cat}$ , la constante catalytique qui représente le nombre de molécules de substrat transformé par seconde et par molécule d'enzymes (29). La substitution de la thréonine en alanine en position 128 expliquerait les différentes de cinétique entre les enzymes de type A et D (27).

Les différences d'hydrolyse entre les pénicillinases A, B, et C vis à vis des pénicillines M ont fait l'objet de peu d'études.

Richmond et *al* se sont intéressés à l'hydrolyse de différents substrats dont la cloxacilline et l'oxacilline. L'efficacité d'une enzyme dépend à la fois de la vitesse maximale  $V_{max}$  et de la constante de Michaelis et Menten,  $K_m$ . Cependant, Richmond et son équipe n'ont pas réussi à obtenir des valeurs fiables de  $K_m$  en raison de la grande efficacité de la cloxacilline et l'oxacilline vis à vis des pénicillinases à de faibles concentrations. Les résultats préliminaires montrent que l'enzyme de type A hydrolyserait plus facilement la cloxacilline que l'enzyme de type C. Des valeurs de  $K_m$  ont pu être obtenues pour la méticilline et montrent que  $\beta$ -lactamases de type A et B hydrolysent la méticilline 2 fois plus rapidement que la pénicillinase de type C (30). D'autres études retrouvaient des activités enzymatiques similaires entre les  $\beta$ -lactamases concernant l'hydrolyse de la pénicilline G (28,31).

## 4. Oxacilline et traitement des endocardites à SAMS

### *a. Evolution des recommandations de traitement*

Les recommandations de l'European Society of Cardiology (ESC), publiées en 2015, ont placé l'oxacilline en traitement de première intention des endocardites à SAMS, à raison de 12g par jour en 4 à 6 perfusions, en l'absence d'allergie aux  $\beta$ -lactamines. La céfazoline apparaissait alors comme alternative aux PAS pour les patients atteints d'endocardite infectieuse à SAMS, en cas d'allergie à la pénicilline et sans antécédent de choc anaphylactique (32).

Entre 2016 et 2018, une pénurie de pénicilline M a nécessité une modification des recommandations de prise en charge des endocardites infectieuses à SAMS, plaçant la céfazoline comme la meilleure alternative.

Plusieurs études ont alors été menées pour comparer l'efficacité des PAS *versus* céfazoline ainsi que le profil de tolérance. Ces dernières suggèrent des résultats similaires entre l'oxacilline et la céfazoline dans le traitement des bactériémies à SAMS.

L'étude de Julius Li et *al.* montre que la céfazoline et l'oxacilline sont similaires sur les taux de guérison à la fin du traitement (95 % contre 88 % ;  $p = 0,25$ ). Par contre, le taux d'échec du traitement à 90 jours était plus élevé chez les patients traités par oxacilline que chez les patients traités par céfazoline (47 % vs 24 % ;  $p = 0,04$ ). Le seul facteur prédictif d'échec était la durée plus longue de la bactériémie (7 jours vs 3 jours ;  $p = 0,0002$ ) Un nombre d'effets indésirables supérieur a été retrouvé dans le groupe oxacilline (30 % vs 3 % ;  $p = 0,0006$ ), qui était plus fréquemment interrompue en raison d'événements indésirables (21 % contre 3 % ;  $p = 0,01$ ) (33).

Dans une étude de cohorte observationnelle, menée sur 210 patients traités pour une endocardite infectieuse, aucune différence de mortalité à 90 jours, ni de taux de rechute ou de prolongation de l'hospitalisation n'ont été observés entre un traitement par céfazoline et un traitement par oxacilline. Cependant, un arrêt prématuré du traitement antibiotique en raison d'effets indésirables a été moins fréquent avec la céfazoline qu'avec les PAS (0/53 contre 13/157 patients ;  $p = 0,042$ ) (34). Ces résultats restent à interpréter avec prudence puisque le groupe ayant reçu de la céfazoline était plus petit et que les patients ayant reçu à la fois céfazoline et PAS ont été exclus.

A l'inverse, une étude sur 73 patients atteints d'endocardites (dont 35 traités par cloxacilline et 38 traités par céfazoline), n'a pas noté de différence significative entre le nombre d'évènements hépatiques et rénaux. Aucune différence statistiquement significative n'a été montrée concernant la mortalité à 60 dans les deux groupes (20 % dans le groupe cloxacilline, 23,7 % dans le groupe céfazoline,  $p = 0,56$ ) (35).

En terme de tolérance, les pénicillines sont connues pour leurs effets indésirables comme des réactions d'hypersensibilité, des lésions rénales aiguës ou hépatiques qui apparaissent supérieures à la céfazoline (36,37). Certaines données suggèrent que le profil de tolérance de la céfazoline serait meilleur que celui des PAS. Avec une incidence moindre d'effets indésirables et donc un arrêt moins prématuré du traitement, l'utilisation de la céfazoline semblerait être une alternative intéressante.

En 2023, de nouvelles recommandations sur la prise en charge des endocardites ont été publiées par la société européenne de cardiologie. En effet, en raison de l'augmentation de la population à risque d'endocardite infectieuse, de l'amélioration des techniques diagnostiques et de ruptures d'approvisionnement, les stratégies thérapeutiques ont été actualisées par rapport aux recommandations de 2015. Suite à la publication de données rassurantes sur la mortalité lors de l'utilisation des PAS *versus* céfazoline, cette dernière a été ajoutée à l'arsenal thérapeutique de première intention, à raison de 6g par jour en 3 doses en IV, au même titre que l'oxacilline dans le traitement des endocardites infectieuses à SAMS (4) (**figure 1**).

Recommendations		Class <sup>a</sup>	Level <sup>b</sup>
<b>IE caused by methicillin-susceptible staphylococci</b>			
In patients with NVE due to methicillin-susceptible staphylococci, (flu)cloxacillin or cefazolin is recommended for 4–6 weeks using the following doses: <sup>264,314,316–318</sup>		I	B
<i>Adult antibiotic dosage and route</i>			
(Flu)cloxacillin <sup>c</sup>	12 g/day i.v. in 4–6 doses	I	B
Cefazolin <sup>e</sup>	6 g/day i.v. in 3 doses		
In patients with PVE due to methicillin-susceptible staphylococci, (flu)cloxacillin or cefazolin with rifampin for at least 6 weeks and gentamicin for 2 weeks is recommended using the following doses: <sup>264,314,316–318,320</sup>		I	B
<i>Adult antibiotic dosage and route</i>			
(Flu)cloxacillin <sup>c</sup>	12 g/day i.v. in 4–6 doses		
Cefazolin	6 g/day i.v. in 3 doses		
Rifampin	900 mg/day i.v. or orally in 3 equally divided doses		
Gentamicin <sup>d</sup>	3 mg/kg/day i.v. or i.m. in 1 (preferred) or 2 doses		
<b>Allergy to beta-lactams</b>			
In patients with NVE due to methicillin-susceptible staphylococci who are allergic to penicillin, cefazolin for 4–6 weeks is recommended using the following doses: <sup>322–327</sup>		I	B
<i>Adult antibiotic dosage and route</i>			
Cefazolin <sup>e</sup>	6 g/day i.v. in 3 doses		

IE, infective endocarditis; i.m., intramuscular; i.v., intravenous; NVE, native valve endocarditis; PVE, prosthetic valve endocarditis; U, units.  
<sup>a</sup>Class of recommendation.  
<sup>b</sup>Level of evidence.  
<sup>c</sup>Cloxacillin is not recommended if the patient has penicillin allergy.  
<sup>d</sup>Maximum doses 240 mg/day. High doses are associated with increased risk of nephrotoxicity. Renal function and serum gentamicin concentrations should be monitored once a week. When given in a single daily dose, pre-dose (trough) concentrations should be <1 mg/L and post-dose (peak; 1 h after injection) serum concentrations should be ~10–12 mg/L.  
<sup>e</sup>Cefazolin can replace cloxacillin only in patients with non-immediate-type hypersensitivity reactions to penicillin.

**Figure 1 : Recommandations de l'ESC 2023 de l'endocardite infectieuse à SAMS.**

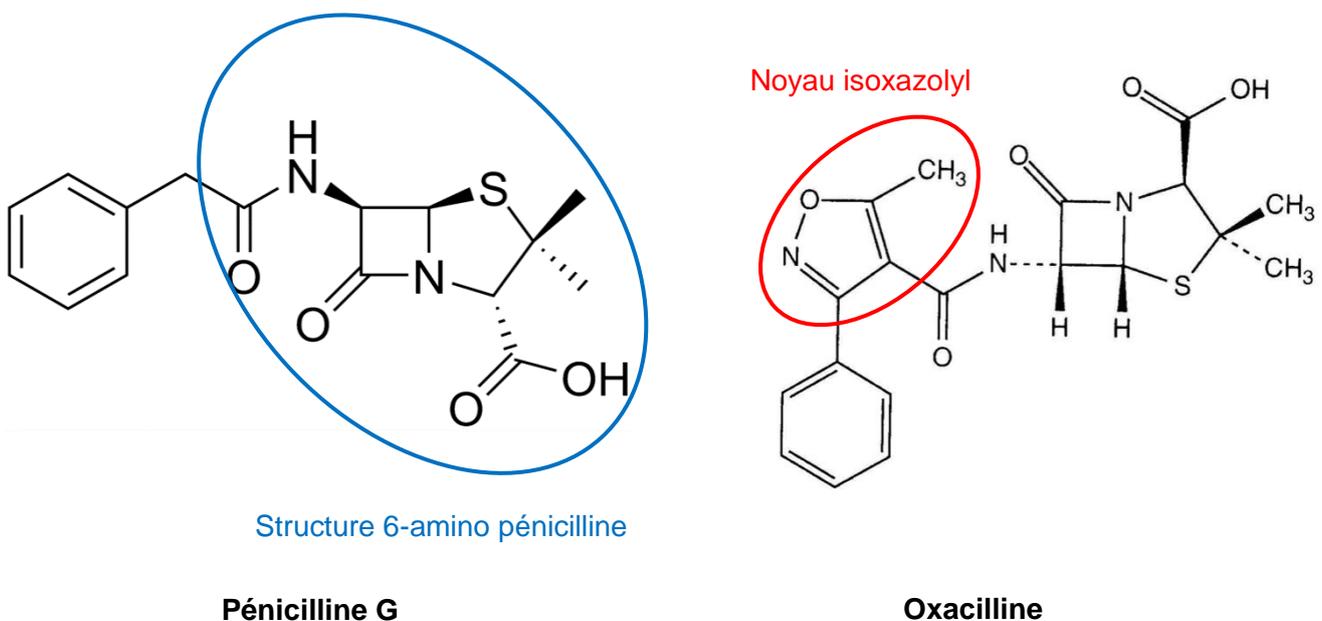
### b. L'oxacilline

L'oxacilline, commercialisée sous le nom de spécialité BRISTOPEN®, est une pénicilline M semi-synthétique, développée dans les années 1960 suite à l'expansion mondiale des clones de *S. aureus* résistants à la pénicilline G.

La méticilline, chef de file des pénicillines M, permet de classer les souches de staphylocoques selon leur profil de sensibilité : staphylocoque sensible à la méticilline (SAMS) ou résistant à la méticilline (SARM), ce qui conditionne le traitement antibiotique. La cloxacilline (ORBENINE®) et l'oxacilline sont les deux molécules commercialisées en France tandis que la flucloxacilline est plutôt utilisée au Royaume Uni et la nafcilline aux Etats-Unis.

Les pénicillines M sont utilisées principalement dans le traitement des infections à SAMS dans divers domaines thérapeutiques, par un mécanisme bactéricide temps dépendant. Elles agissent par inhibition de la synthèse du peptidoglycane, composant de la paroi bactérienne, par analogie structurale avec le substrat des protéines de liaison aux pénicillines (PLP). Longtemps utilisées préférentiellement dans la prise en charge des infections à SAMS, des ruptures de stock en 2016 ont conduit l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM) à proposer comme alternative thérapeutique l'utilisation de la céfazoline.

L'oxacilline se caractérise par l'ajout synthétique d'un noyau isoxazolyl à la structure 6-amino-pénicilline des pénicillines (**figure 2**). Leur chaîne latérale bloque l'accès des  $\beta$ -lactamases au noyau  $\beta$ -lactam. Elles restent donc actives contre les souches productrices de pénicillinases.



**Figure 2 :** Structures moléculaires de la pénicilline G et de l'oxacilline

L'oxacilline administrée par voie orale a une faible biodisponibilité (41 %), en raison de la bio-transformation hépatique de l'oxacilline. L'administration ne peut donc se faire que par voie IV. La liaison aux protéines plasmatiques est de l'ordre de 90 à 95 %, principalement à l'albumine. La diffusion de l'oxacilline est rapide dans la plupart des tissus.

Le paramètre pharmacocinétique/pharmacodynamique prédictif de l'efficacité thérapeutique est le temps durant lequel la concentration de la fraction libre du médicament est supérieure à la CMI ( $T > CMI$ ) (38). Cet intervalle correspond au temps nécessaire pour initier et maintenir l'acylation du site actif de la sérine des protéines liant les pénicillines, permettant l'inhibition de la croissance des bactéries (39).

Des études *in vitro* indiquent que les concentrations en  $\beta$ -lactamines libres doivent être supérieures à la CMI du microorganisme pendant 40 à 60 % de l'intervalle posologique pour permettre une destruction efficace des staphylocoques (38). Les données expérimentales *in vitro* et sur modèle animal ont suggéré que des concentrations en  $\beta$ -lactamines 4 fois supérieures à la CMI 100 % du temps seraient suffisantes pour être efficace (40,41). Pour les patients en soins intensifs, des concentrations supérieures, comprises entre 4 et 8 fois la CMI contribuent à minimiser l'émergence de résistances mais augmentent aussi le risque de toxicité (41,42).

La bactéricidie nécessaire pour obtenir des CMI efficaces, associée à une demi vie comprise entre 30 et 60 minutes chez le sujet normo rénal justifie une administration répétée de l'oxacilline 4 à 6 fois par jour ou une administration prolongée (43) (44).

Le temps où la fraction libre en antibiotique est supérieure à la CMI pourrait être augmenté par une administration en perfusion continue. Cette voie d'administration est rendue plus difficile à cause de la plus stabilité de l'oxacilline, dépendante de plusieurs facteurs, notamment le pH, l'osmolarité, le solvant utilisé et de la température (45,46).

Une étude de cohorte américaine rétrospective entre le 1<sup>er</sup> janvier 2000 et le 31 décembre 2007 a comparé l'administration d'oxacilline en perfusion continue ou en perfusion intermittente pour des patients atteints d'endocardite infectieuse à SAMS. Le premier groupe composé de 28 patients a reçu 2g d'oxacilline pendant 30 minutes toutes les 4h. Le deuxième groupe, composé de 78 patients a reçu 12g d'oxacilline pendant 24h une fois par jour. La mortalité à 30 jours (10 % *versus* 8 %,  $p = 0,7$ ) et la durée d'hospitalisation étaient similaires (25 jours *versus* 20 jours,  $p = 0,4$ ). L'administration en perfusion continue pourrait s'inscrire comme une alternative à la perfusion intermittente (46).

Atteindre une CMI efficace dans les végétations revêt d'une difficulté supplémentaire à cause du fort inoculum bactérien, de la faible vascularisation de l'endocarde et de la présence de biofilm. Les concentrations nécessaires en oxacilline sont plus importantes et nécessitent d'être administrées en IV (Intraveineux) d'autant plus que la diffusion dans les valves et les végétations est mal connue (45).

Actuellement, il n'existe aucune recommandation sur le suivi des concentrations en oxacilline dans le sang (40). Cependant, il est primordial de tenir compte des facteurs liés à l'hôte, à l'âge, au sexe et au terrain sous-jacent pour maîtriser au mieux la pharmacodynamie des  $\beta$ -lactamines, et ce d'autant que l'incidence de l'endocardite a augmenté chez les personnes de plus de 50 ans avec un pic chez les hommes entre 75 et 79 ans (47).

Plusieurs études ont également montré que les paramètres pharmacodynamiques et pharmacocinétiques présentent une variabilité intra et inter individuelle pour les patients d'unités de soins critiques (48,49). En pratique, des dosages sont réalisés pour les patients les plus graves, en cas d'inefficacité du traitement ou lors d'une suspicion de surdosage. Cependant, l'interprétation des dosages plasmatiques en oxacilline n'est actuellement pas standardisée pour les endocardites mais se base sur les recommandations utilisées en réanimation (41).

Le principal risque lié à l'oxacilline est la néphrotoxicité puisque l'élimination de l'oxacilline est principalement réalisée par voie rénale. Des néphropathies immuno-allergiques ont été associées à l'administration d'oxacilline (50). Des adaptations posologiques sont donc nécessaires en cas de DFG (Débit de Filtration Glomérulaire) inférieur à 30 ml/min.

Les autres effets indésirables rencontrés sont des réactions allergiques (rash cutané et éruptions maculo-papuleuses), des troubles gastro-intestinaux et des affections hépato biliaires (augmentation des transaminases parfois associées à de la fièvre, nausées et vomissements). Des réactions de neuro toxicité ont pu être observées, notamment en cas de surdosage ou d'insuffisance rénale à l'origine d'une accumulation rapide et importante de  $\beta$ -lactamines.

## 5. L'effet inoculum

### a. *Bref historique de l'effet inoculum*

Dans les années 1940, il a été observé pour la 1<sup>ère</sup> fois que la taille de l'inoculum pourrait affecter l'activité des antimicrobiens. Eagles et *al* ont par exemple montré que des doses plus importantes de pénicilline étaient nécessaires pour traiter des infections à streptocoque et à pneumocoque (51). Un inoculum élevé pourrait avoir une production de  $\beta$ -lactamase 100 fois supérieure, entraînant une hydrolyse de l'antibiotique et donc son inactivation (52). L'influence de la taille de l'inoculum est un phénomène *in vitro* décrit également pour d'autres couples bactéries/antibiotiques comme *Klebsiella pneumoniae* et la streptomycine (53).

Quelques études animales ont montré que l'effet inoculum décrit *in vitro* se traduit par une pharmacodynamie atténuée *in vivo* (54). L'étude de Soriano et *al.* (55) a décrit cet effet *in vivo* chez le rat avec des isolats d'*Escherichia coli*. Des taux de mortalité faibles (0-10 %) ont été obtenus lorsque des antibiotiques avec un effet inoculum minimal (céfoxitine, cefmétazone et gentamicine) ont été administrés à une dose permettant d'obtenir des taux sériques 3 à 20 fois supérieurs à la CMI avec des inocula faibles ou élevés. Pour les antibiotiques à fort effet inoculum (céfotaxime et aztréonam), la mortalité des animaux était faible uniquement lorsque ces antibiotiques étaient administrés à des doses permettant d'obtenir des concentrations sériques 200 à 1 000 fois supérieures à la CMI (déterminée à inoculum standard). Il est donc nécessaire que les concentrations pour les antibiotiques avec effet inoculum soient supérieures pour atteindre les mêmes taux de mortalité.

### b. *Effet inoculum et céfazoline*

Dans les premières années d'utilisation des céphalosporines dans les bactériémies et endocardites à SAMS, des échecs de traitement (10) ont été constatés et potentiellement incriminés à un effet inoculum observé *in vitro*. La prévalence de l'effet inoculum pour la céfazoline est variable selon les études, allant de 13 à 58 % (56,57). Il faut toutefois noter que la prévalence est variable selon la localisation géographique.

Par exemple, une récente étude de 2024 a étudié la prévalence de l'EI pour la céfazoline sur 110 isolats de SAMS issus d'infections actives et de cas de colonisation. Aucune souche avec un EI pour la céfazoline n'a été mise en évidence (58).

Les souches de SAMS associées à un effet inoculum pour la céfazoline ont été retrouvées le plus souvent pour des souches BlaZ de type A, qui sont associées à une hydrolyse plus rapide de la céfazoline (13,57).

Suite à ce constat, plusieurs études ont été réalisées sur modèle animal et confirment l'hypothèse émise précédemment *in vitro*. La céfazoline est majoritairement hydrolysée par les  $\beta$ -lactamases de type A, lorsqu'elles sont en concentration importante au sein d'un inoculum élevé (59,60).

Certaines études ensuite menées sur des souches de SAMS issues de patients bactériémiques n'ont pas conclu à une différence statistiquement significative en termes de rechute de l'infection ou de mortalité à 30 jours selon la présence ou non d'un effet inoculum pour la céfazoline (56). Dans une autre étude, également réalisée sur des souches issues de bactériémies, l'effet inoculum pour la céfazoline n'a pas influencé de manière significative la probabilité d'échec du traitement (61).

Seules deux études prospectives ont montré que la mortalité dans les bactériémies à SAMS était statistiquement plus élevée lorsque les patients recevaient de la céfazoline et que la souche en question présentait un EI pour la céfazoline.

L'utilisation de la céfazoline et de la nafcilline dans le traitement des bactériémies à SAMS ont été comparées dans une étude de cohorte de l'équipe de Lee et *al.*

L'analyse stratifiée a révélé que les patients infectés par des souches de SAMS pour lesquelles un EI pour la céfazoline était retrouvé, présentaient plus de risques d'échec du traitement (61,5 %) comparativement aux patients infectés par des souches sans effet inoculum (28,9 %,  $p = 0,049$ ). Le même constat a été fait pour la mortalité à un mois, significativement plus élevée pour les patients infectés par une souche avec EI pour la céfazoline (15,4 % vs 0 %,  $p = 0,047$ ) (62).

Une autre étude a été réalisée sur 77 patients présentant une bactériémie à SAMS dont 42 présentaient un effet inoculum pour la céfazoline. L'analyse univariée a démontré que les patients infectés par une souche avec EI pour la céfazoline présentaient une mortalité à 30 jours significativement plus élevée que les patients infectés par un SAMS sans EI pour la céfazoline (39,5 % vs 15,2 %,  $p = 0,034$ ) (63).

Quelques études cliniques sont disponibles concernant l'impact clinique d'un EI pour la céfazoline sur la mortalité. Cependant, l'EI pour l'oxacilline a beaucoup moins été documenté puisque des études réalisées *in vitro* ont conforté le fait que les pénicillines M restaient stables face à l'inactivation par des souches productrices de  $\beta$ -lactamases, contrairement à la céfazoline (59,64).

c. *Effet inoculum pour les pénicillines M anti-staphylococciques*

**Etudes *in vitro***

Plusieurs études menées *in vitro* révèlent une augmentation des CMI entre l'inoculum standard et inoculum élevé pour l'oxacilline ou la nafcilline.

Udekwu et al ont étudié la relation entre l'inoculum et l'efficacité de certains antibiotiques (ciprofloxacine, daptomycine, gentamicine, linézolide, oxacilline et vancomycine). Leur étude révèle que plus la quantité de bactéries dans un site est importante, plus la concentration en antimicrobiens qui interagit avec les bactéries diminue. Les CMI augmentent avec la taille de l'inoculum pour les 6 antibiotiques testés puis se stabilisent au-dessus d'un seuil de densité bactérienne ( $1 \times 10^7$  UFC/mL). Pour l'oxacilline, la CMI augmente d'un facteur 32 entre l'inoculum le plus faible ( $2 \times 10^4$  UFC/mL) et l'inoculum le plus élevé ( $9 \times 10^7$  UFC/mL), alors qu'elle n'est augmentée que d'un facteur 4 pour la vancomycine et le linézolide. Le modèle mathématique testé montre que les traitements basés sur les CMI conventionnelles, c'est à dire indépendantes de la taille de l'inoculum, ne permet pas toujours d'éliminer les infections de forte densité bactérienne (65).

Sabath et al ont déterminé l'efficacité de l'activité anti-staphylococcique de six pénicillines et sept céphalosporines dans le traitement des infections staphylococciques graves. Les 4 méthodes utilisées pour tester l'effet de la  $\beta$ -lactamase sur l'activité des antibiotiques ont montré des résultats similaires : la méticilline et la nafcilline sont les antibiotiques les plus stables vis à vis des  $\beta$ -lactamases staphylococciques. Les autres pénicillines M comme l'oxacilline ne sont pas aussi stables que la nafcilline, mais restent moins susceptibles à l'inactivation par les  $\beta$ -lactamases que les céphalosporines. Pour 52 % des 118 souches, les CMI de l'oxacilline ont été multipliées d'au moins un facteur 4 au contact d'un inoculum bactérien élevé (64).

L'étude de LaPlante et al a évalué l'impact d'inoculum élevé (9,5 x log UFC/g) et d'inoculum modéré (5,5 log UFC/g) sur des souches de SAMS et de SARM. Les activités de la nafcilline, du linézolide, de la vancomycine et daptomycine, seuls ou en association avec de la gentamicine ont été étudiées dans un modèle pharmacodynamique *in vitro* avec stimulation des végétations endocardiques pendant 72h.

A inoculum modéré, la nafcilline, la vancomycine et la daptomycine ont démontré une activité bactéricide équivalente ( $p < 0,01$ ), permettant l'élimination de 99,9 % des bactéries. A inoculum élevé, la nafcilline (pour les SAMS uniquement), la vancomycine et le linézolide n'ont pas exercé d'activité bactéricide pendant les 72h de l'expérience, contrairement à la daptomycine qui a démontré une activité bactéricide à 24h. Pour les SAMS, la CMI de la nafcilline était de 0,5 mg/L à inoculum standard et de 2 mg/L à inoculum élevé, soit une augmentation d'un facteur 4. Le temps où la concentration en nafcilline était supérieure à la CMI était de 100 % à inoculum modéré alors qu'il représentait moins de 38 % de l'intervalle thérapeutique à inoculum élevé. Au final, l'inoculum a eu un impact significatif sur les activités de la nafcilline et de la vancomycine. Bien qu'une augmentation de 16 fois la CMI à inoculum élevé ait été observée pour la daptomycine, son activité bactéricide a été retardée en présence d'un fort inoculum mais sans impact significatif sur la bactéricidie. Le linézolide n'a pas été impacté par l'effet inoculum, ce que les auteurs expliquent par un mécanisme d'action différent. Le linézolide a une activité bactériostatique centrée sur le ribosome et l'inhibition de la synthèse protéique alors que la daptomycine, la nafcilline et la vancomycine ciblent la paroi cellulaire (66).

Une analyse a été menée sur 99 souches de SAMS issues de tous types de prélèvements. Un effet inoculum a été recherché pour la céfazoline, la céphalothine, la céphalexine et la flucloxacilline. Les 4 types de  $\beta$ -lactamases décrites ont été retrouvées : 45 % de  $\beta$ -lactamases de type A, 27 % de type B, 26 % de type C et 1 % de  $\beta$ -lactamases de type D. Un effet inoculum a été retrouvé pour la flucloxacilline pour 38 souches (soit environ 38 %). Sur ces 38 souches, 36 avaient une CMI 4 fois plus élevée à inoculum fort qu'à inoculum standard et 2 souches avaient une CMI 8 fois plus élevée (67).

Néanmoins, une étude menée par Nannini et al n'a pas montré d'EI pour la nafcilline. L'activité de 6 céphalosporines et de la nafcilline a été analysée sur 98 souches de SAMS pour des souches *blaZ* positives et *blaZ* négatives. Ils n'ont pas mis en évidence de différences entre les CMI à inoculum standard (moyenne des CMI 0,4 mg/L) et à inoculum

élevé de la nafcilline (moyenne des CMI de 0,7 mg/L), que ce soit pour des souches productrices de  $\beta$ -lactamases ou non. Par contre, un effet inoculum a été retrouvé pour la cephalexine (particulièrement pour des souches de type A et C) mais aussi pour la céphalothine (plutôt des souches B et C) (68).

Une autre étude, basée un faible échantillon (5 cases reports), n'a pas montré de différences entre les CMI à inoculum standard et à inoculum élevé pour la nafcilline. Deux des 5 souches testées ont montré un effet inoculum pour la céfazoline (69).

### **Etudes animales**

Suite aux observations *in vitro*, quelques études ont été conduites sur des modèles animaux afin de déterminer si l'effet inoculum était également retrouvé.

Dans l'étude de Singh et *al*, un modèle d'endocardite chez le rat a été utilisé pour comparer l'effet *in vivo* de la nafcilline, de la ceftaroline et de la céfazoline. L'effet inoculum a été comparé sur 17 souches de SAMS exprimant une  $\beta$ -lactamase de type A, dont une souche TX0117 qui présente un effet inoculum pour la céfazoline et une souche TX0117c qui ne présente pas de  $\beta$ -lactamase. L'activité des 3 antibiotiques a été testée à inoculum standard ( $10^5$  UFC/mL) et à inoculum élevé ( $10^7$  UFC/mL). Aucun EI n'a été observé pour la nafcilline parmi les 15 souches avec une  $\beta$ -lactamase de type A (CMI de 0,5 mg/L à inoculum standard et CMI de 1 mg/L à inoculum élevé). Par contre, une augmentation de CMI d'un facteur 4 (CMI à 0,5 mg/L à inoculum standard et 2 mg/L à inoculum élevé) a été notée pour les souches TX0117 et TX0117c. Pour la céfazoline, toutes les souches ont présenté un EI sauf la souche TX0117c dépourvue de  $\beta$ -lactamase. Aucune des souches n'a présenté d'EI pour la ceftaroline.

Les résultats de l'étude ont donc montré que la ceftaroline et la nafcilline ne sont pas affectées par l'EI, que ce soit *in vivo* ou *in vitro* contrairement à la céfazoline.

La densité bactérienne dans les végétations 24h après la dernière dose était plus faible pour les rats traités par nafcilline ( $2,1 \log_{10}$  UFC/g) ou par ceftaroline ( $2,3 \log_{10}$  UFC/g), par rapport à ceux traités par céfazoline ( $5,9 \log_{10}$  UFC/g) lorsqu'ils étaient infectés par une souche productrice de  $\beta$ -lactamase de type A. L'activité de la céfazoline a été restaurée lorsque la souche ne présentait pas de  $\beta$ -lactamase (TX0117c) et était alors aussi efficace que la ceftaroline (59).

Dans un autre modèle d'endocardite infectieuse chez le rat, Nannini et al, ont analysé l'activité de la céfazoline, de la daptomycine et de la nafcilline. Les rats ont été infectés par une souche de SAMS productrice de  $\beta$ -lactamase de type A et connue pour présenter un EI pour la céfazoline (CMI de 1  $\mu$ g/ml à inoculum standard et de 64  $\mu$ g/ml à inoculum élevé) et par une souche de SAMS sans  $\beta$ -lactamase. La souche productrice de  $\beta$ -lactamase de type A a présenté un EI pour la daptomycine (CMI de 0,125 mg/L à 4 mg/L) mais aucun EI n'a été retrouvé pour la nafcilline (CMI de 0,25 mg/L à inoculum standard à 0,5 mg/L à inoculum élevé).

Pour les rats infectés avec une souche productrice d'une  $\beta$ -lactamase de type A, la nafcilline et la daptomycine ont permis une réduction plus importante de l'inoculum bactérien dans les végétations (respectivement 1,3 log<sub>10</sub> UFC/g, p = 0,009 et 1,6 log<sub>10</sub> UFC/g, p = 0,024) par rapport à la céfazoline (4 log<sub>10</sub> UFC/g). L'efficacité de la céfazoline toutefois été restaurée lorsque les rats étaient infectés par une souche sans  $\beta$ -lactamase (70).

Chapman et son équipe ont étudié les CMI de 5 céphalosporines (céfamandole, céfazoline, céfoxitine, céphaloridine et céphalothine) et la nafcilline de 26 souches de *S. aureus*, issus de plaies, d'échantillons sanguins et de prélèvements respiratoires. Aucune différence significative entre les CMI à inoculum standard et à inoculum élevé n'a été montrée pour la nafcilline ou la céfoxitine, peu affectées par l'EI. La céfazoline ou la céphaloridine sont les molécules qui ont été le plus touchées par la variation de la taille de l'inoculum.

La pertinence de ces observations *in vitro* a été étudiée dans un modèle d'infection intrapéritonéale de souris. Les souches ont été séparées en deux groupes en fonction de la présence d'un EI ou non. Le groupe I était composé de souches présentant un EI *in vitro* et les souches du groupe II ne présentaient pas ou peu de variations de CMI en fonction de l'inoculum. La production de  $\beta$ -lactamase a ensuite été quantifiée avec et sans induction par la céfazoline. Une production élevée de  $\beta$ -lactamase sans induction a été retrouvée pour les souches du groupe I et la quantité de  $\beta$ -lactamases produite par les souches du groupe II était inférieure à celles du groupe I (p < 0,025).

Selon les auteurs, la survie des animaux après avoir été traité par les antibiotiques était influencée par des différences qualitatives et quantitatives dans la production de  $\beta$ -lactamase, par la faculté de l'antibiotique à être affecté par la taille de l'inoculum et par la concentration d'antibiotiques dans le sang. La mortalité des animaux infectés par des

souches du groupe I, productrices de  $\beta$ -lactamases, était significativement supérieure après un traitement par céfazoline ou céphaloridine ( $p < 0,01$ ). Des doses plus élevées de céfazoline ont été associées à des taux de survie améliorés. La nafcilline a entraîné une mortalité significativement inférieure par rapport à tous les autres antibiotiques ( $p < 0,01$ ), en partie expliqué par sa demi-vie plus longue et par sa résistance supérieure aux  $\beta$ -lactamases. Pour les animaux infectés par des souches du groupe II, le taux de survie était similaire entre la céfazoline, la céphaloridine, la céfalotine ou le céfamandole (71).

### ***Etudes sur l'homme***

Une étude a analysé la fréquence de l'effet inoculum pour différents antibiotiques, et le lien avec le type de BlaZ sur 302 souches de SAMS isolées de patients bactériémiques. Un effet inoculum pour l'oxacilline a été retrouvé pour 20,5 % des souches. Les médianes des CMI pour l'oxacilline étaient de 0,58 mg/L à inoculum standard et de 2,28 mg/L à inoculum élevé ( $p < 0,001$ ). Aucune prépondérance d'un sous-type de  $\beta$ -lactamase n'a été montré. Un effet inoculum était également retrouvé pour les associations avec inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases : 43 % d'EI pour pipéracilline/tazobactam et 65,9 % de souches avec EI pour l'ampicilline/sulbactam. L'EI pour les  $\beta$ -lactamases/inhibiteurs de  $\beta$ -lactamase était associé aux  $\beta$ -lactamases de type C : 93,1 % des souches BlaZ de type C présentaient un EI pour ampicilline/sulbactam, 87,8 % pour pipéracilline/tazobactam. De très rares souches ont présenté un EI pour la ceftriaxone (2,3 %) ou pour le céfépime (0,3 %). Aucun effet inoculum n'a été retrouvé pour le méropénème (0 %).

La mortalité à 3 mois des patients ayant reçu des associations avec inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases a été étudiée. Les patients traités par ampicilline/sulbactam en traitement empirique et dont la souche présentait un effet inoculum pour cet antibiotique présentaient une mortalité à 3 mois supérieure par rapport à celle des patients dont la souche ne présentait pas d'EI (50.0% vs 7.7%,  $p = 0.01$ ). Aucune différence de mortalité à 3 mois n'a été montrée pour la pipéracilline/tazobactam en cas de traitement empirique selon la présence ou non d'un EI (38,9 % vs 34,8 %,  $p = 0,79$ ).

Les traitements par  $\beta$ -lactamases/inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases sont également sujets à l'EI et pourraient être responsables d'échecs cliniques, en particulier lorsque les souches sont de type BlaZ C (72).

Un cas d'endocardite à SAMS sur valve native en échec de traitement par la céfazoline, ensuite relayé par de la nafcilline a conduit à des explorations microbiologiques complémentaires. Les CMI pour la céfazoline, le céfamandole et la céfalotine étaient supérieures à inoculum fort par rapport à l'inoculum standard. L'EI retrouvé pour la céfazoline peut s'expliquer par le fait que la souche était productrice d'une  $\beta$ -lactamase de type A, associée à une destruction plus rapide de la céfazoline. Cependant, la nafcilline ne semble pas être affectée par l'EI, aucune différence de CMI n'a été mise en évidence entre l'inoculum standard et l'inoculum élevé (0,5 mg/L pour les 3 inocula testés) (73).

Une autre étude a évalué l'impact de l'effet inoculum pour la céfazoline sur 220 souches de SAMS issues de patients atteints de bactériémies. Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les CMI pour la nafcilline et pour le cefuroxime entre l'inoculum standard et l'inoculum élevé. Par contre, un effet inoculum pour la céfazoline a été retrouvé pour 13 % des souches testées, dont la majorité était des  $\beta$ -lactamases de type A (79 % des souches). Aucune différence n'a été constatée entre la mortalité des patients traités par céfazoline et dont la souche présentait un effet inoculum, par rapport aux souches sans EI pour la céfazoline. Ce résultat est à interpréter avec précaution puisqu'un faible nombre de patients (n = 77, soit 35 %) avait été traité par céfazoline (56).

La prévalence de l'EI des souches de SAMS ainsi que l'impact clinique ont également été étudiés dans d'autres pathologies à fort inoculum bactérien, notamment dans la mucoviscidose. La céfazoline, la céfépime, le méropénème, le ceftazidime, la pipéracilline/tazobactam et la cloxacilline ont été testés sur 96 souches de SAMS issues d'expectorations. Un effet inoculum pour la cloxacilline a été retrouvé pour 13,5 % des souches. D'autres molécules ont présenté un EI comme la pipéracilline tazobactam (34,4 % des souches) ou la céfazoline (25 % des souches). L'EI pour la pipéracilline-tazobactam était associé à BlaZ de type C alors que l'EI pour la céfazoline était associé à BlaZ de type A. Le critère de jugement principal de l'étude était le déclin de la fonction pulmonaire sur 4 ans, qui ne différait pas en fonction de la présence d'un EI pour la céfazoline ou pour la pipéracilline/tazobactam (74).

Une autre étude, sur les bronchectasies non mucoviscidosiques, a étudié le type de  $\beta$ -lactamase par le séquençage du gène *blaZ* et la prévalence de l'effet inoculum sur 60 souches de SAMS provenant d'expectorations. La prévalence de « l'effet inoculum prononcé », défini par une souche sensible à inoculum standard mais résistante à

inoculum élevé a également été étudiée. L'antibiotique qui présentait le plus de souches avec un EI était la pipéracilline-tazobactam, pour 36,7 % des souches et 17 % des souches avaient un EI prononcé. L'EI pour la céfazoline a été retrouvé dans 23 % des souches, et aucune souche n'avait un EI prononcé. Une association entre l'EI pour la céfazoline et *blaZ* de type A ( $p < 0,001$ ) a été retrouvée, ainsi qu'entre l'EI pour la pipéracilline/tazobactam et les souches *blaZ* de type C ( $p < 0,001$ ). Un effet inoculum pour l'oxacilline était présent pour 12 % des souches, et aucune n'avait d'EI prononcé (75).

L'ensemble de ces données montre que l'effet inoculum pour l'oxacilline pourrait, à l'instar de la céfazoline, expliquer les échecs de traitement dans les endocardites à SAMS. D'autres phénomènes doivent également être explorés en parallèle, comme le système *agr* (Accessory Gene Regulator), impliqué dans la régulation de la virulence de *S. aureus* (76).

## II. SYSTEME AGR ET ENCOCARDITES A STAPHYLOCOQUE DORE

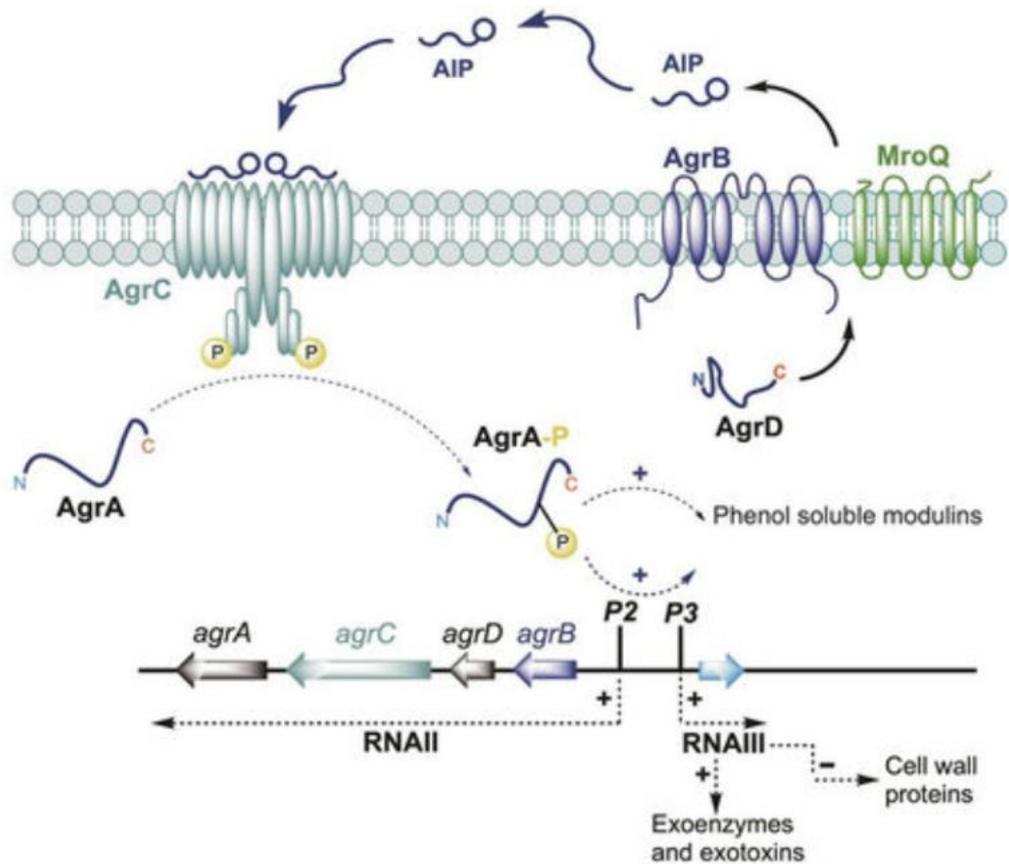
### 1. Rôles du système *agr*

De nombreux facteurs de virulence produits par le staphylocoque doré, y compris les toxines aussi appelées hémolysines ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\delta$  hémolysines) sont régulés par un système à deux composantes : un système régulateur transcriptionnel et un système de détection de *quorum sensing*, avec *agr* comme régulateur de gène accessoire. Le *quorum sensing* est un processus de communication, laissant la possibilité aux bactéries de partager des informations sur la densité cellulaire et d'ajuster l'expression des gènes en conséquence.

Le locus du régulateur du gène accessoire *agr* est composé de deux transcrits : l'ARN II active la transcription d'*agrA*, *agrC*, *agrD*, *agrB* et ARN III, l'effecteur de la régulation du gène cible. Ces deux transcrits sont pilotés respectivement par les promoteurs P2, responsable du circuit d'autorégulation des AIP (peptides auto inducteurs) et P3. *AgrD* est le précurseur pro peptide du peptide auto inducteur (AIP). *AgrD* est clivé par *agrB*, une peptidase transmembranaire pour former et libérer les AIP au niveau extracellulaire. Les AIP se lient ensuite au récepteur *agrC* et est activé par autophosphorylation d'une histidine kinase. Le phosphate est transféré au régulateur de réponse *agrA* qui entretient le circuit d'auto activation des molécules de signal AIP et active les deux promoteurs P2 et P3. Cette activation dépend de la concentration extracellulaire d'AIP qui signale la densité cellulaire (figure 3) (77).

L'ARN III active aussi la transcription de *hld*, un gène responsable de la  $\delta$ -toxine, dont l'expression permet de renseigner la fonctionnalité du système *agr* (78,79).

Le système *agr* module l'expression de facteurs de virulence en réponse aux peptides auto inducteurs. Ce système est aussi impliqué dans la colonisation, la formation de biofilm et la virulence de *S. aureus* (80).



**Figure 3 :** Représentation schématique du locus *agr* (77)

Le *quorum sensing* est activé pendant la transition de la phase de croissance exponentielle à la phase de croissance stationnaire par un mécanisme d'auto-régulation qui signale l'état de la densité cellulaire (81). Lorsque la densité cellulaire est élevée, *agr* entraîne une diminution de la production de facteurs associés à la paroi cellulaire, ce qui provoque la dispersion du biofilm, la propagation de l'infection et une augmentation simultanée des exoprotéines, y compris la production de protéases, d'hémolysines et de super-antigènes (82). Des mutations du système *agr* peuvent changer l'expression des hémolysines et avoir un impact sur les phénotypes bactériens, ce qui contribue à la pathogénicité et à sa capacité de coloniser l'hôte (79,83).

Le locus *agr* est conservé chez tous les staphylocoques. La découverte de régions hypervariables dans certaines séquences d'acides aminés de peptides activés par *agr* a conduit à la division des isolats de *S. aureus* en 4 groupes *agr* de spécificité différente (77,84).

Une étude a évalué la relation entre le groupe *agr* et son implication en pathologie humaine, en étudiant 198 souches de *S. aureus*. Les maladies médiées par des exfoliatines seraient liées au groupe *agr* IV tandis que l'endocardite infectieuse a été associée à *agr* I et *agr* II. Les auteurs expliquent ce résultat par le fait que les allèles *agr* et les gènes des toxines ont évolué en parallèle des souches parentales et que le transfert horizontal n'aurait eu qu'un rôle limité. Ces résultats montrent que la pathogénicité bactérienne spécifique est associée à un clone ou à un groupe de clones (85).

L'isolement de souches de *S. aureus* n'exprimant pas ou peu *agr* soulève la question de son rôle précis dans les infections invasives à *S. aureus* (86). Certaines études ont notamment mis en évidence une diminution de l'activité bactéricide de la vancomycine et une dysfonction du système *agr* (80,87,88). Le mécanisme n'est pas élucidé mais la perte de la fonction *agr* entraînerait une moins bonne activité bactéricide de la vancomycine par différents mécanismes : l'acquisition de mutations dans les locus d'*agr*, altération de la voie d'autolyse suite à la diminution de la production d'hydrolase ou encore par l'augmentation de la quantité de biofilm produite (89).

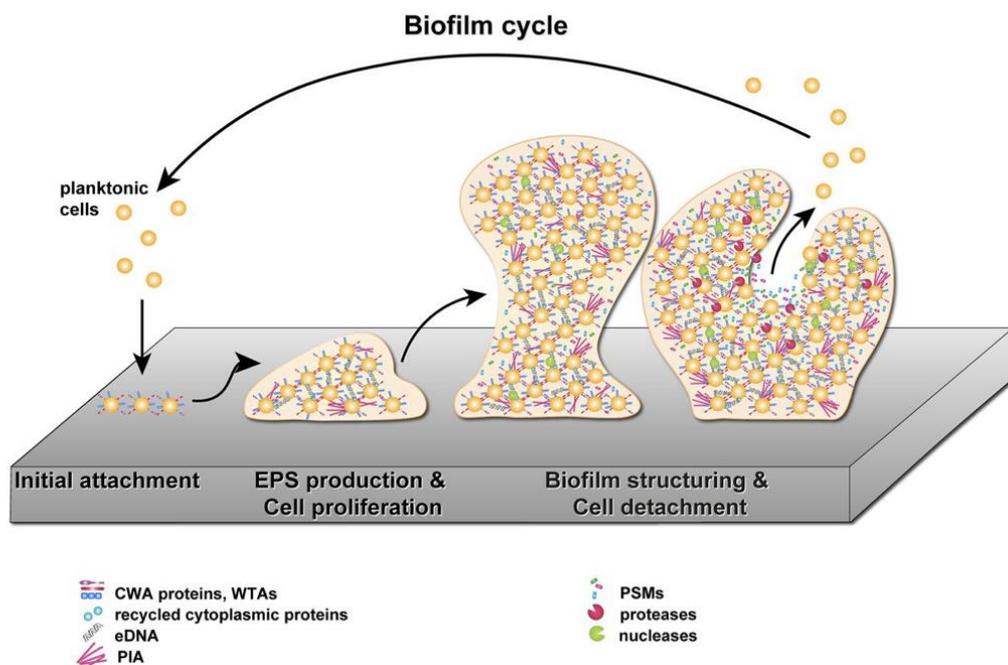
## 2. Système *agr* et biofilm de staphylocoque doré

La formation de biofilm joue un rôle majeur au cours du processus d'infection. Les micro-organismes associés à la formation d'un biofilm seraient impliqués dans 80 % des infections bactériennes, selon l'Institut national de la santé (90). La formation de biofilm a été décrite dans plusieurs infections telles que les infections chroniques des plaies, les infections récurrentes des voies urinaires ou les infections ostéo articulaires. *S. aureus* fait partie des bactéries fréquemment isolées dans les biofilms, tout comme *Staphylococcus epidermidis* ou *Pseudomonas aeruginosa* (91).

### a. Biofilm de staphylocoque doré et endocardite infectieuse

Lors d'une bactériémie, la valve cardiaque est susceptible d'être colonisée par des bactéries, qui se fixent et forment une végétation composée de bactéries, de fibrine et de cellules immunitaires, à l'origine de la formation d'un biofilm.

La figure 4 illustre les 3 phases de la formation du biofilm comme décrit majoritairement dans la littérature. La formation du biofilm débute par l'adhésion réversible des bactéries à une surface solide, à l'aide de cellules planctoniques. Puis, les bactéries, qui représentent 5 à 35 % du volume du biofilm (92), prolifèrent et forment des micro-colonies à la surface capables de produire des substances polymériques extracellulaires, de l'ADN environnemental, des acides téichoïques et diverses protéines, permettant la fixation définitive (91). Le biofilm est ensuite dispersé grâce à l'action de diverses enzymes (nucléases et protéases), et stimulé par des forces mécaniques. Les bactéries se détachent alors du biofilm pour aller coloniser de nouvelles niches et disséminer l'infection. Récemment, un modèle de biofilm en 5 phases a été décrit, et comprend une étape de synthèse de substances polymériques extracellulaires et une étape de maturation.



**Figure 4 :** Étapes de formation du biofilm (93)

Les biofilms dotés de fortes propriétés adhérentes offrent un avantage de survie aux bactéries qui le composent. En effet, même si la dose utilisée est à priori efficace sur des bactéries planctoniques, la diffusion de l'antibiotique au sein du biofilm est plus difficile et une partie de la dose, séquestrée dans le biofilm n'atteint pas sa cible. Les infections liées au biofilm sont 10 à 1000 fois plus résistantes aux effets des anti infectieux, réduisant ainsi l'arsenal thérapeutique à disposition (93,94). L'éradication bactérienne est difficile en raison d'une élimination réduite par le système immunitaire. La présence de bactéries

dormantes au sein du biofilm, dont l'activité métabolique est réduite et la multiplication ralentie ne sont pas ciblées par les antibiotiques qui agissent principalement sur des bactéries en cours de multiplication. Ces dernières sont donc capables de s'adapter et de survivre dans un environnement hostile malgré le traitement antibiotique.

La combinaison de ces facteurs augmente la capacité de résistance aux antibiotiques.

Le traitement des infections liées au biofilm est donc plus complexe et nécessite par exemple des doses d'antibiotiques plus élevées et/ou l'association de plusieurs antibiotiques pour cibler les bactéries au cœur du biofilm.

#### *b. Rôle du système agr dans la régulation de la formation du biofilm*

Chaque étape de la formation du biofilm est finement régulée, avec l'intervention de nombreux effecteurs. Certains de ces systèmes sont interconnectés avec le système *quorum sensing*, principalement *agr*. Ce dernier joue un rôle clé et est associé à la pathogénèse de *S. aureus* par la formation de biofilms. Le système *agr* est responsable du désassemblage du biofilm et contrôle donc négativement sa production (95,96).

L'étude de Boles et al, indique que l'induction d'*agr* dans les biofilms établis de *S. aureus* permet le détachement des cellules. Dans le modèle de biofilm créé, la dispersion du biofilm est entraînée par la réactivation du système *agr*. Les résultats de l'étude révèlent qu'*agr* est un régulateur important entre les modes de vie planctoniques et biofilms en contribuant à la dispersion du biofilm et à la colonisation de nouveaux sites d'infection (97). Une augmentation du taux d'AIP peut entraîner la dispersion du biofilm par l'augmentation des protéases extracellulaires (98).

L'étude de Yarwood et al a montré que les bactéries se dispersant du biofilm présentaient des niveaux élevés d'*agr* tandis que les bactéries présentes dans le biofilm présentaient des niveaux d'*agr* moindres (99), en accord avec l'étude de Vuong et al (100). Ces données sont confirmées par une autre étude qui montre que l'épaisseur du biofilm est plus importante pour les mutants *agr*. Ce résultat, provoqué par un développement anormal du biofilm, est lié à une absence de structuration, dépendante de peptides tensioactifs appelés modulines solubles dans le phénol, dont fait partie la  $\delta$  toxine, elles-mêmes régulées par le *quorum sensing* (101).

Les mutations dans le *quorum sensing* d'*agr* sont maintenant connues pour être associées à la formation de biofilms plus compacts, à cause de la perte de leur capacité de dissémination.

D'autres systèmes de *quorum sensing* ont également été décrits, comme luxS, qui régulerait l'adhésion cellulaire (96). La formation du biofilm serait également régulée par l'expression de PIA (polysaccharide intracellular adhesin), issu du gène icaA/DBC, responsable de l'adhésion entre les cellules (102). Des facteurs environnementaux tels que le pH ou la disponibilité en nutriments ou d'autres systèmes régulateurs (Fur, Sae et Rot) sont aussi impliqués dans la régulation du biofilm (103).

### 3. Impact en clinique du biofilm et du système *agr*

#### a. Impact de la formation de biofilm

Il est maintenant établi que la capacité de formation de biofilm de *S. aureus* contribue à la résistance aux antibiotiques. Un certain nombre d'études se sont intéressées au lien entre la résistance à la méticilline et la formation accrue de biofilm (104,105). Le nombre d'études en lien entre la formation de biofilm et souches sensibles à la méticilline est plus limité.

Une étude écossaise a comparé la capacité de formation du biofilm de 972 souches de *S. aureus*, provenant de diverses matrices biologiques. Sur les 209 isolats de SAMS, 43,5 % étaient modérément producteurs de biofilm et 28,5 % ont produit des biofilms non quantifiables. Aucune corrélation significative n'a été mise en évidence entre la résistance à la méticilline et la formation de biofilm ( $p = 0,77$ ) (106).

Une autre étude a démontré la relation entre la capacité de formation du biofilm et d'autres caractéristiques bactériennes (type clonal, lieu de collecte de l'isolat). Sur les 8 souches de SAMS testées, toutes produisaient du biofilm. Aucune différence significative dans la formation de biofilm n'a été observée entre les SARM et les SAMS ( $p = 0,40$ ), ce qui confirme le résultat de l'étude présentée précédemment, malgré la faible taille de la cohorte (107).

Les difficultés de traitement entraînées par la synthèse de biofilm pourraient expliquer certains échecs de traitement et par conséquent l'augmentation de mortalité.

L'étude de Gembe et al a étudié l'association entre la production de biofilm et un pronostic défavorable chez des 485 patients avec bactériémie. Un pronostic défavorable a été défini par une mortalité à 30 jours, ou par la présence d'une endocardite infectieuse ou d'une bactériémie persistante ou récurrente. La production de biofilm a été quantifiée avec du

cristal violet et l'activité métabolique des bactéries a été mesurée par le test aux sels de tétrazolium. Dans 41 % des cas, le pronostic était défavorable mais n'était pas significativement associé à la production de biofilm pour les patients avec une bactériémie à *S. aureus* (108).

Une autre étude a analysé la capacité de production de biofilm 6 SAMS dont 5 étaient productrices de biofilm. En analyse univariée, les souches de SAMS productrices de biofilm étaient plus susceptibles d'être associées à une rechute ou réinfection et à une infection chronique (17 % vs 1 %,  $p < 0,01$ ) que les souches non productrices de biofilm. Ce lien n'a pas été retrouvé lors de l'analyse multivariée, aucun facteur n'était associé à une rechute/réinfection ou à une infection chronique. La petite taille de l'échantillon, (6 isolats de SAMS dont 5 souches productrices de biofilm) est un facteur limitant à prendre en compte dans l'interprétation de ces données (109).

#### *b. Impact d'une dysfonction du système agr*

Un système *agr* dysfonctionnel a été associé à la persistance de la bactériémie et à une mortalité plus importante (110), déjà décrit dans les infections invasives à SARM (111).

Lee et son équipe se sont intéressés au lien entre la dysfonction du système *agr* et la mortalité dans le cas de patients atteints de bactériémies à SAMS. Sur les 244 souches de SAMS testées, 91 avaient un système *agr* dysfonctionnel. La mortalité à 90 jours n'était pas supérieure pour les souches présentant un système *agr* dysfonctionnel ( $p = 0,82$ ) (112).

L'étude de Schweizer et al a également étudié la relation entre la dysfonction d'*agr* et la mortalité à 30 jours chez 756 patients bactériémiques à *S. aureus*, dont 40 % étaient des SAMS. La majorité de la cohorte (86 %) a reçu de la vancomycine pendant l'hospitalisation. Un système *agr* dysfonctionnel a été détecté pour 22 % des souches et était significativement associé à une mortalité à 30 jours supérieure à celle des patients infectés par une souche avec système *agr* fonctionnel (RR = 1,52, 95 % IC 1,05 à 2,21). Une des explications avancées est la moins bonne bactéricidie de la vancomycine lorsque *agr* est dysfonctionnel, déjà décrite dans de précédentes études (110).

L'étude de Gagnaire et al a montré que l'infection chronique à *S. aureus* et la résistance aux glycopeptides étaient indépendantes mais significativement associées au déficit en toxine  $\delta$  ( $p = 0,048$  ; IC95 : 1,01–10,24 ;  $p = 0,023$  ; IC 95 % : 1,20–12,76, respectivement).

Ils ont également démontré une association entre une dysfonction d'*agr* et la résistance à la méticilline sur 168 isolats en analyse univariée ( $p = 0,035$ ) (113).

L'effet inoculum a été associé à la présence d'un système *agr* dysfonctionnel dans certaines études dans les bactériémies à SAMS.

Une étude s'est intéressée au lien entre l'effet inoculum pour la céfazoline et une dysfonction du système *agr* dans laquelle 146 souches de SAMS issues de patients bactériémiques ont été étudiées. Un effet inoculum pour la céfazoline a été retrouvé dans 11 % des souches. Sur ces 146 souches, 125 souches étaient positives pour le gène *blaZ*, dont majoritairement des  $\beta$ -lactamase de type A. Parmi les souches de type A, l'effet inoculum était plus fréquent parmi les souches avec un système *agr* dysfonctionnel par rapport aux souches avec un système *agr* normal (69,2 % vs 14,9 % ;  $P = 0,025$ ) (114).

Une autre étude menée par Lee et al sur 195 souches de SAMS isolées de bactériémies a montré une dysfonction du système *agr* pour 67 isolats (34,3 % des souches). Un effet inoculum pour la céfazoline a été retrouvé pour 10 souches (14,9 %) qui présentaient un système *agr* dysfonctionnel. Aucune association n'a été montrée entre la dysfonction d'*agr* et l'effet inoculum.

Le génotypage d'*agr* a également été réalisé par PCR. La proportion d'*agr* dysfonctionnel était significativement plus élevée dans parmi *agr* de type III que dans les autres génotypes. Le type III a été associé à une plus grande prévalence d'effet inoculum pour la céfazoline que les autres génotypes d'*agr* (40 % vs 10 %,  $p < 0,001$ ). Le génotype III a également présenté une association positive avec les souches *BlaZ* de type A (115).

### c. Lien entre formation de biofilm et système *agr*

Le système *agr* est impliqué dans la régulation de la formation du biofilm. En cas de système *agr* dysfonctionnel, la production et la persistance du biofilm pourraient être augmentées.

L'étude de Vuong et al a analysé sur 105 souches de *S. aureus* le lien entre la formation de biofilm et la fonctionnalité du système *agr*, mesurée par la production de  $\delta$  toxine en HPLC.

Sur l'ensemble des souches, 78 % avaient une  $\delta$  hémolysine négative et étaient associées à une forte production de biofilm ( $\chi^2 = 54.834$  and  $p < 0,001$ ). Seulement 6 % des souches

*agr* fonctionnel formaient du biofilm. Une corrélation entre le génotype *agr* et la formation de biofilm a été mise en évidence : un phénotype *agr* dysfonctionnel était à l'origine de la persistance de l'infection. Il a été émis que la  $\delta$  toxine pourrait également être impliquée en empêchant l'adhésion des cellules staphylococciques aux surfaces, à cause de ses propriétés de surfactant (100).

La capacité de formation de biofilm pourrait être liée au génotype *agr* mais les données sont contradictoires.

Une étude a montré que les isolats de type *agr* III avaient une capacité de formation du biofilm plus importante ( $p < 0,001$ ) que les souches *agr* de type I ( $p = 0,003$ ) (116).

Les données de l'étude de Croes et al n'ont pas démontré de relation entre le génotype *agr* et la capacité à produire un biofilm, même si les souches *agr* de type I avaient une tendance à former une plus grande quantité de biofilm. La formation de biofilm serait plutôt associée à la lignée clonale qu'à un certain génotype d'*agr* (117).

#### 4. Quantification de la production de biofilm au laboratoire

Différentes approches ont été axées sur la quantification du biofilm : des systèmes à flux continu et des systèmes statiques. Ces derniers nécessitent peu d'équipements spécialisés, ont un faible coût et sont simples à mettre en place.

Un des premiers modèles utilisés est celui de Christensen et al, utilisé pour quantifier l'adhérence des staphylocoques à coagulase négative aux dispositifs médicaux par mesure de la densité optique (118).

D'autres techniques statiques existent comme le dosage de l'interface air-liquide, car certaines bactéries préfèrent la croissance en condition aérobie et sont susceptibles de former plus facilement des biofilms à l'interface entre le milieu et l'air. La formation du biofilm est ensuite observée par microscopie à contraste de phase.

Un autre protocole, le biofilm de colonies, permet d'évaluer les propriétés de résistances aux antibiotiques sur une colonie de bactéries cultivées sur une membrane semi-perméable posée sur une plaque d'agar. (119).

La majorité des dosages statiques utilisent des plaques de microtitration à 96 puits comme support de formation du biofilm en raison d'un faible coût et de sa facilité d'utilisation.

Une étude a montré que la quantification du biofilm par méthode spectrophotométrique sur plaque de microtitration était bien corrélée avec les résultats obtenus sur des modèles *in vivo* (120). Certaines méthodes sont basées sur la quantification de la matrice et des bactéries vivantes et mortes comme la méthode semi-quantitative au cristal violet. Le cristal violet est un colorant violet basique qui se lie aux molécules membranaires chargées négativement et aux polysaccharides. Ce colorant colore non seulement les cellules mais aussi tout matériau adhérent à la surface de la plaque, ce qui peut entraîner une surestimation du nombre de bactéries adhérentes (119). Afin de quantifier uniquement le biofilm, des étapes de lavage successives sont nécessaires. Ces étapes doivent être réalisées avec précaution car elles sont à risque de détacher le biofilm formé sur les surfaces en polystyrène.

Il existe cependant des méthodes qui permettent de distinguer les bactéries mortes des cellules vivantes, en se basant sur leur activité métabolique. Ces tests incluent l'utilisation de sels de tétrazolium, (test au XTT), basés sur la réduction du XTT en formazan soluble dans l'eau par les bactéries métaboliquement actives. Son absorbance est proportionnelle au nombre de bactéries avec activité métabolique (121).

Un autre test de viabilité est fondé sur la réduction de la résazurine, initialement bleu non fluorescent en résorufine rose fluorescent par les cellules métaboliquement actives, dont les bactéries. D'autres composés ont été utilisés pour la quantification du biofilm comme le diacétate de fluorescéine non coloré et non fluorescent converti par les cellules microbiennes en fluorescéine jaune fluorescent, grâce à des estérases non spécifiques. La matrice du biofilm peut être quantifiée par un colorant bleu, le 1,9 diméthylméthylène (DMMB), qui forme un produit de complexation insoluble avec les polysaccharides sulfatés de la matrice du biofilm. La quantité de colorant libérée est ensuite mesurée par spectrophotométrie et reflète la quantité de polysaccharides présents dans la matrice du biofilm.

Une étude a comparé 6 méthodes de détermination du biofilm en plaques 96 puits, en utilisant différents microorganismes dont *S. aureus*. La majorité des tests ont montré une excellente répétabilité pour une quantification du biofilm en routine. Ce sont des tests simples à mettre en place, rapides et adaptés à la quantification du biofilm. Le test au XTT n'a pas montré de valeur ajoutée pour la quantification des cellules par rapport à d'autres tests de viabilité. Comme énoncé précédemment, cette étude soulève un des

inconvénients de l'utilisation du cristal violet : l'absence de distinction des cellules vivantes par rapport aux cellules mortes (114).

Une autre étude s'est intéressée à la corrélation entre la quantification du biofilm par le cristal violet et la mesure de l'activité métabolique des bactéries par le test au XTT sur 492 souches de *S. aureus* isolées de patients bactériémiques. Aucune corrélation entre la formation de biofilm et l'activité métabolique n'a été mise en évidence. Certaines souches ont montré une activité métabolique élevée et une faible production de biofilm, ce qui suggère que ces deux paramètres doivent être évalués en parallèle (123).

Plusieurs méthodes sont utilisées pour la quantification du biofilm *in vitro* mais aucune d'entre elles n'est standardisée. D'importantes différences peuvent être observées en fonction des conditions expérimentales utilisées (milieu, température, apport en nutriments, concentration en glucose, force ionique, concentration en sels) puisque la formation du biofilm est fortement liée aux conditions environnementales.

Les propriétés électrostatiques des surfaces en polystyrène sont influencées par le pH. Son influence sur la formation du biofilm a été analysée par Zmantar et *al* sur 46 souches de *S. aureus*. La formation de biofilm était plus faible à des pH extrêmes (pH 3 et pH 12), alors qu'elle était modérée à pH 7 (124). Ces données sont confirmées par l'étude d'Hamadi et *al* qui a montré la forte adhérence des *S. aureus* à de pH 4 à 6 et une faible adhésion à pH acide et alcalin (125).

La supplémentation du milieu en glucose est également un élément déterminant pour la formation de biofilm. L'étude de Boles et *al* a montré qu'en l'absence de glucose, les bactéries n'ont pas adhéré entre elles et aucun biofilm n'a été formé contrairement à ce qui est observé lors de l'ajout de 0,2 % de glucose (97).

Une autre étude a montré que la formation de biofilm était augmentée avec des concentrations jusqu'à 0,5 % de glucose, que ce soit pour le SAMS ou le SARM. La présence de glucose serait impliquée dans l'augmentation de l'adhérence des bactéries aux surfaces (117).

La composition du milieu est un autre paramètre qui influence la capacité des bactéries à produire du biofilm.

Différents facteurs influençant la production de biofilm ont été évalués sur 61 souches de *S. aureus* : le saccharose, le glucose et le chlorure de sodium. Testés individuellement, aucun n'a montré de différence significative sur la formation de biofilm. Cependant, une augmentation de la production de biofilm a été observée après supplémentation avec ces 3 composés ( $p = 0,037$ ). De meilleurs résultats ont été obtenus après une incubation de 24h par rapport à 18h ( $p = 0,0015$ ).

Le milieu utilisé peut également avoir un impact sur la capacité de formation des souches de *S. aureus*. Le bouillon BHI (Brain Heart Infusion) s'est avéré plus efficace dans la formation de biofilm que le bouillon TSB (Trypticase soja) ( $p = 0,00019$ ,  $p < 0,05$ ) (126).

A l'inverse, une autre étude a montré que le bouillon TSB supplémenté avec 1 % de glucose permettait d'obtenir de meilleurs résultats que le bouillon BHI, avec une incubation des cultures pendant 24h. Aucune différence n'a été observée entre une supplémentation de 1 ou 2 % de glucose ( $p > 0,05$ ) (92).

L'évaluation du biofilm, souvent réalisée en conditions statiques, pourrait ne pas reproduire l'exacte réalité des conditions *in vivo*.

Une étude a utilisé deux modèles expérimentaux dynamiques et un modèle statique. Dans le premier modèle dynamique, les plaques ont été incubées sur un agitateur horizontal pendant 24h. L'agitation des cultures améliore l'oxygénation et fournit des conditions de croissance plus favorables. Dans le deuxième modèle dynamique, une bille de verre a été placée dans chaque puits puis les plaques ont été incubées. La formation de biofilm pour *S. aureus* a été équivalente entre le modèle statique et le modèle dynamique sans billes de verre. La présence des billes de verre a réduit la quantité de biofilm formée, ce qui peut être expliqué par une meilleure oxygénation sous agitation dans le premier modèle (127).

## **PARTIE 2 : PARTIE EXPERIMENTALE**

Suite à l'étude sur la prévalence de l'EI pour la céfazoline, nous nous sommes interrogés sur la possible expression d'un EI pour l'oxacilline des souches de SAMS responsables d'endocardites, infections où un fort inoculum bactérien est retrouvé.

En effet, très peu d'études se sont intéressées à l'effet inoculum pour l'oxacilline *in vitro* ni à son potentiel impact clinique. La complexité et la variété des mécanismes impliqués laissent supposer que plusieurs mécanismes pourraient être interconnectés pour expliquer un impact clinique. Dans un second temps, nous avons évalué la fonctionnalité du système *agr* pour chaque souche et leur capacité de formation de biofilm.

### **I. Matériels et méthodes**

#### **1. Choix des isolats bactériens et rappels des précédentes analyses**

Une étude tri-centrique rétrospective a été menée à partir de souches de SAMS provenant de l'hôpital Bichat (APHP), du CHU de Rennes et du CHU de Toulouse. Elles ont été recueillies de janvier 2016 à décembre 2021. Ces souches ont été isolées à partir d'hémocultures de patients présentant une endocardite certaine ou probable selon les critères de Duke. Ces patients ont été traités soit par céfazoline soit par des pénicillines anti-staphylococciques (PAS), à savoir cloxacilline ou oxacilline. Les souches responsables d'infections polymicrobiennes, d'infections de prothèses endovasculaires ou les infections traitées par d'autres antibiotiques que la cloxacilline ou la céfazoline dans les 48 premières heures de traitement ont été exclues.

Au total, 220 souches ont pu être incluses dans cette étude.

Les souches ont été conservées au laboratoire de bactériologie-hygiène dans des tubes collection au congélateur à -80°C. Chaque isolat a été repiqué sur gélose Columbia au sang (COS), incubée 24h à 35 ± 2°C.

L'identification de chaque souche bactérienne a été vérifiée lors d'un précédent travail (thèse réalisée par Dr Maëlys CROLLE, spécialité Biologie Médicale) par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight. Biotyper®, Bruker). Une partie du gène *blaZ* a été séquencée afin de déterminer le type de

pénicillinase (A, B, C et D) de chaque souche. Puis, l'effet inoculum pour la céfazoline a été recherché pour les souches porteuses de ce gène par technique de microdilution en milieu liquide. Le diamètre d'inhibition de la pénicilline G a également été déterminé pour chaque souche.

En parallèle, le Dr Baptiste JEAN (interne en Maladies infectieuses) a examiné les dossiers cliniques de chaque patient et étudié la mortalité à 30 jours après la première hémoculture négative ainsi que le délai de négativation des hémocultures, en fonction du traitement.

## 2. Détermination de la sensibilité à l'oxacilline et de l'effet inoculum

Dans cette étude, l'effet inoculum pour l'oxacilline a été étudié pour la totalité des souches, y compris les souches *blaZ* négatives.

La détermination des CMI de l'oxacilline a été réalisée par une méthode de microdilution en milieu liquide, conformément aux recommandations du Comité Européen des Tests de Sensibilité aux Antimicrobiens (EUCAST). Deux inoculums bactériens ont été utilisés : un inoculum standard ( $2.10^5$  UFC/mL) et un inoculum élevé ( $2.10^7$  UFC/mL) (128) (129).

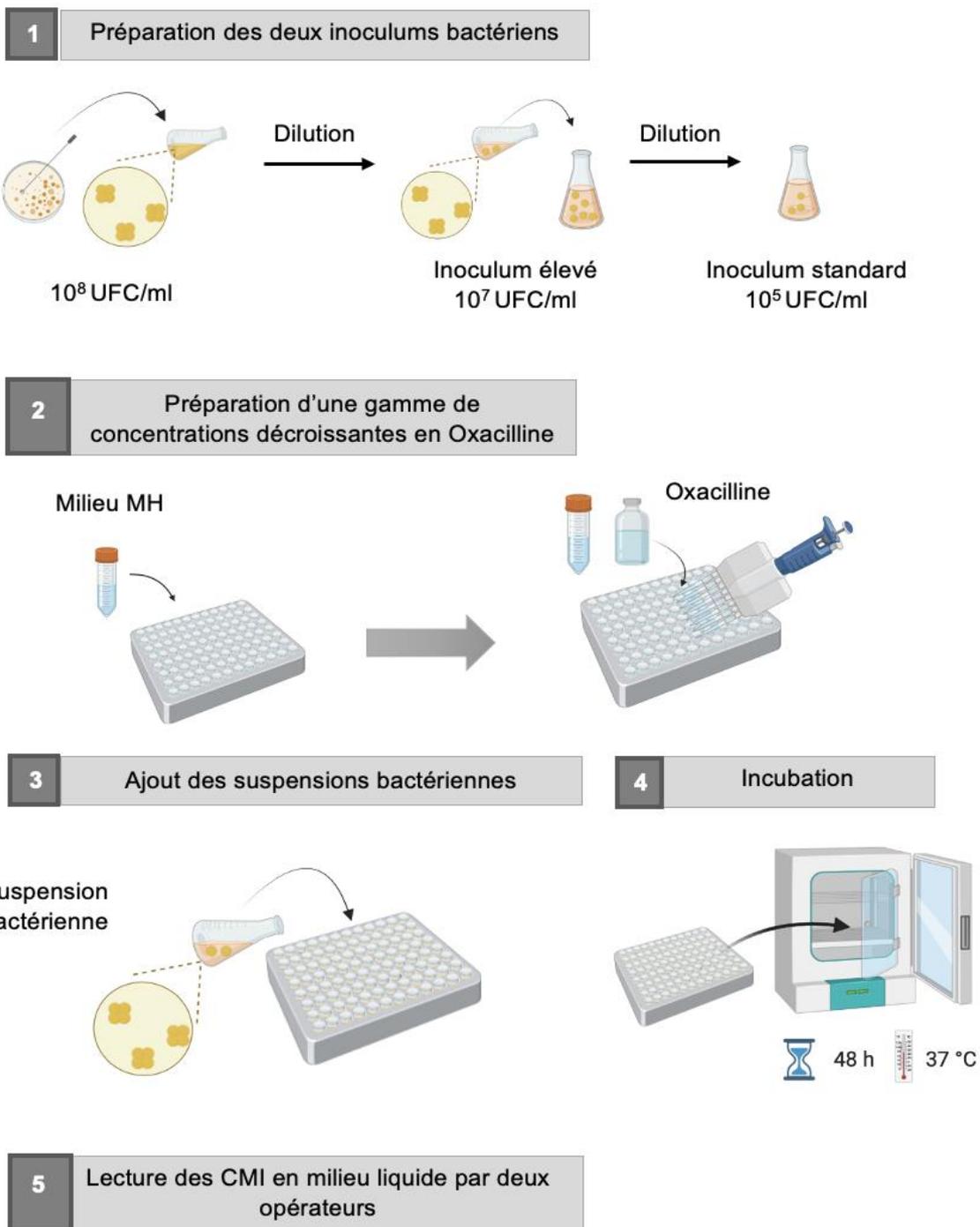
A partir d'une poudre commerciale d'oxacilline pour injection IV (1g pour 5mL), une suspension mère a été réalisée dans du bouillon Mueller-Hinton hypersalé (Cation-Adjusted Mueller-Hinton Broth + 2 % NaCl). Cette suspension mère de concentration égale à 91,3 mg/L, contrôlée par le laboratoire de pharmacologie-toxicologie, a été diluée pour obtenir, par dilutions en cascade, une gamme de concentrations décroissantes d'oxacilline allant de 64 à 0,06 mg/L. Ces concentrations ont ensuite été réparties dans 11 des 12 puits d'une plaque 96 puits. Le dernier puits était réservé au témoin de croissance bactérienne, sans ajout d'antibiotique. La souche de référence ATCC 29213 a été utilisée comme souche contrôle.

Afin de préparer les deux inoculums bactériens, chaque souche a été mise en suspension dans du sérum physiologique afin d'obtenir une turbidimétrie de 0,5 Mc Farland, soit environ  $10^8$  UFC/mL. L'inoculum fort ( $10^7$  UFC/mL) a été obtenu par dilution de cette suspension bactérienne dans du bouillon Mueller Hinton (MH). L'inoculum standard d'une concentration de  $10^5$  UFC/mL a été obtenu par dilution au 100<sup>ème</sup> de l'inoculum fort dans du bouillon MH. Ces suspensions bactériennes ont ensuite été déposées dans chaque

puits. Les plaques ont ensuite été incubées pendant 48h à 37°C. La figure 5 synthétise les différentes étapes du protocole appliqué pour la détermination des CMI en milieu liquide. Après incubation, chaque plaque a été lue par deux opérateurs. La CMI correspondait au 1<sup>er</sup> puits sans croissance bactérienne visible (figure 6).

L'analyse a été réalisée en double pour chaque souche. Lorsqu'une discordance entre les valeurs de CMI d'oxacilline était observée, la CMI a été recontrôlée une 3<sup>ème</sup> fois par la même technique.

## Protocole

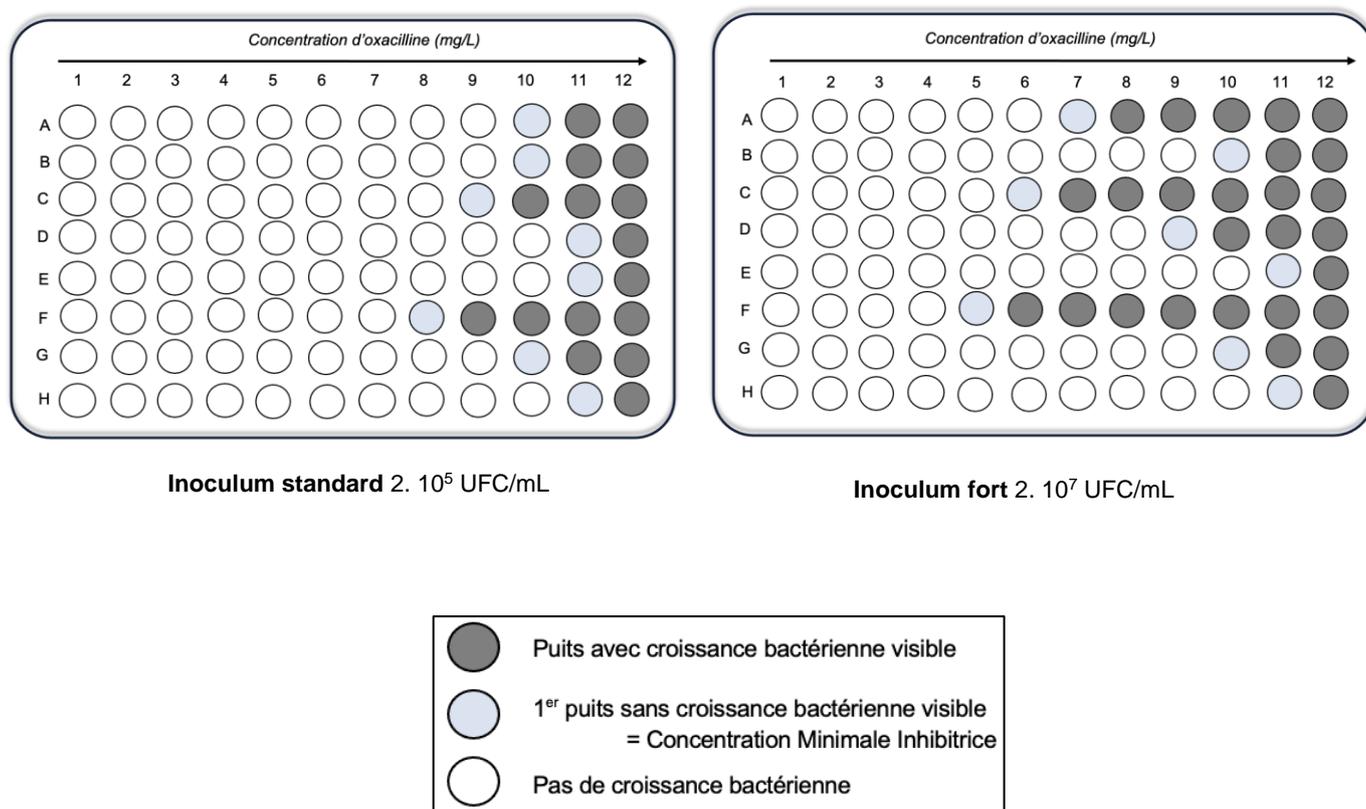


**Figure 5** : Protocole pour la détermination des CMI pour l'oxacilline à inoculum standard et à inoculum élevé

L'effet inoculum pour l'oxacilline a été défini, à l'instar de l'effet inoculum pour la céfazoline, comme une augmentation de la CMI d'un facteur 4 lorsqu'un inoculum d'une concentration 100 fois supérieure aux recommandations est utilisé (13).

Ainsi, dans l'exemple de la figure 6, les souches A, C, D, et F présentent une augmentation de la CMI de l'oxacilline d'au moins un facteur 4 entre l'inoculum standard et l'inoculum fort. Ces souches présentent un effet inoculum.

Les autres souches présentent une augmentation de la CMI d'un facteur  $\leq 4$  entre l'inoculum standard et l'inoculum fort. Ces souches ne présentent pas d'effet inoculum.



*Correspondance entre les puits et les concentrations en Oxacilline en mg/L*

Puits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
[Oxacilline] mg/L	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,006	0

**Figure 6** : Lecture des CMI en microdilution en milieu liquide à inoculum standard et à inoculum fort

### 3. Fonctionnalité du système *agr* et CAMP test

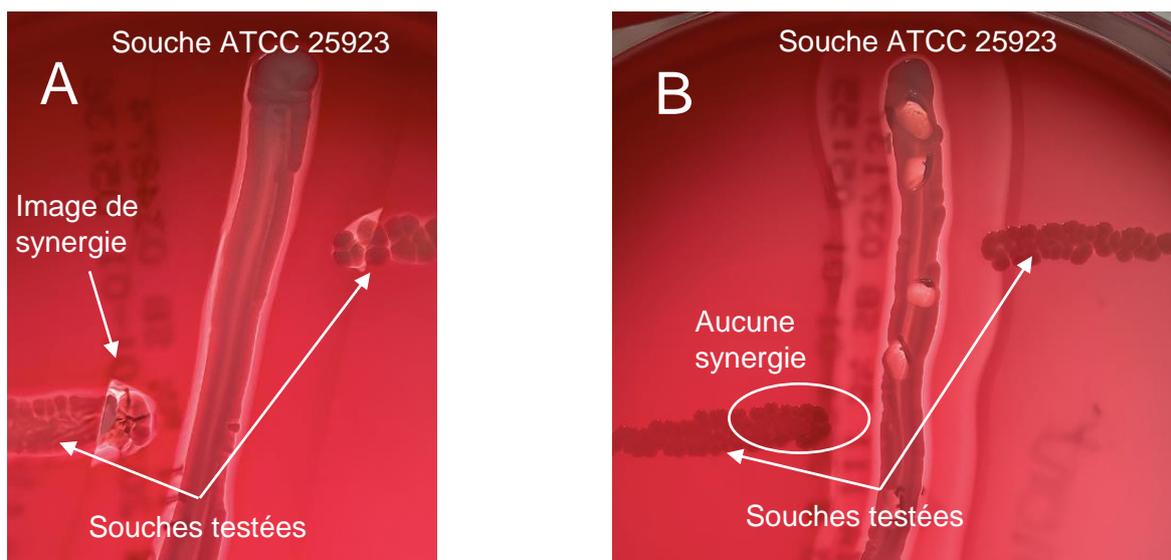
La production des hémolysines est régie par le système *agr*, régulateur de la virulence des staphylocoques. La fonctionnalité ce de système peut être évaluée par un test phénotypique simple, le CAMP test (130). Décrit en 1944 par Christie et *al* (122), il était initialement utilisé pour l'identification de *Streptococcus agalactiae*.

Il consiste en la réalisation d'une strie avec la souche de référence au centre d'une gélose Columbia à 5% de sang de mouton. Puis, avec une suspension d'inoculum  $10^5$  UFC/ml d'une souche de *S. aureus* à tester, une strie est faite perpendiculairement à la souche de référence, à une distance de 0,5 cm de la strie centrale, comme l'illustre la figure 7. Les géloses sont ensuite incubées à 37°C en air ambiant pendant 24 heures. Un CAMP test a été réalisé lorsque les souches de *S. aureus* ne présentaient pas d'hémolyse initiale après ensemencement sur une gélose COS.

La production d'une  $\delta$ -hémolysine, aussi appelée  $\delta$ -toxine permet de renseigner sur la fonctionnalité du système *agr*. Les  $\beta$ -hémolysines et les  $\delta$ -hémolysines d'une souche *S. aureus* de référence (ATCC 25923) agissent ensemble dans la lyse des globules rouges de mouton sur gélose au sang.

En cas de système *agr* fonctionnel, la  $\delta$  hémolysine est normalement produite par la souche testée. Elle entraîne une zone d'hémolyse accrue dans les zones de contact avec la  $\beta$ -hémolysine de la souche de *S. aureus* de référence (figure 7 image A).

L'absence d'hémolyse synergique entre la souche testée et la souche de référence traduit l'absence de production de  $\delta$ -hémolysine, mettant en évidence une dysfonction du système *agr* (figure 7, image B) (80).



**Figure 7** : Images d'un CAMP test positif (A) et d'un CAMP test négatif (B)

#### 4. Détermination de la capacité de production de biofilm des bactéries

La faculté de *S. aureus* à produire du biofilm est bien établie, notamment dans les infections à fort inoculum bactérien et peut contribuer aux échecs de traitement. Nous avons jugé pertinent de quantifier la production de biofilm des souches de notre cohorte. Cette expérimentation a été réalisée en collaboration avec le Dr Aude FERRAN et Ophélie GOURBEYRE de l'école vétérinaire de Toulouse.

Afin de préparer les plaques de culture, chaque souche testée a été mise en suspension dans du sérum physiologique afin d'obtenir une densité optique (DO) d'environ 0,08.

La suspension obtenue a été diluée au 100<sup>ème</sup> dans du MHB (Milieu Heart Brain), puis une deuxième dilution au 100<sup>ème</sup> a été réalisée avant de distribuer 200  $\mu$ L de cette suspension finale dans chaque puits.

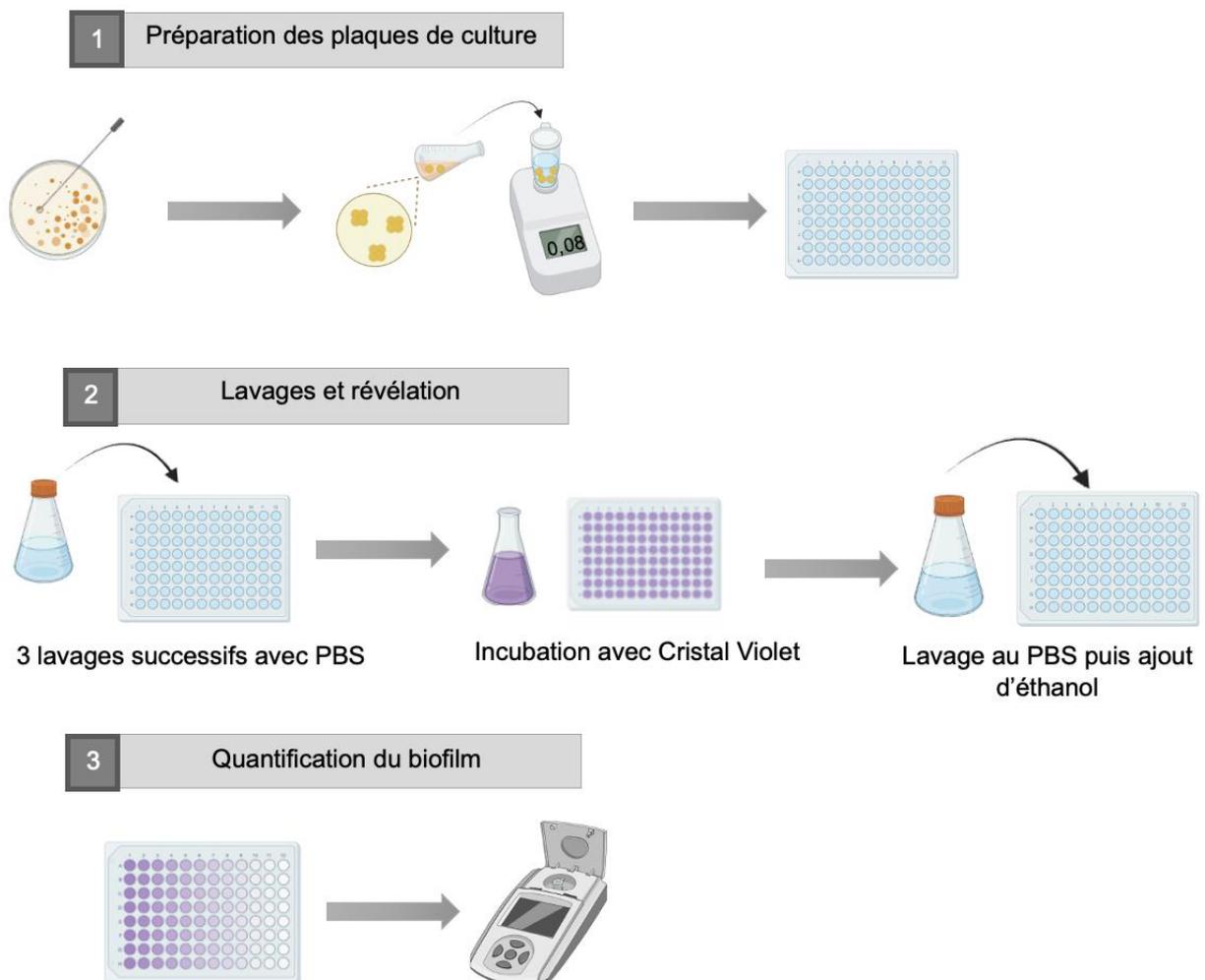
Chaque ligne de la plaque correspondait à une souche bactérienne différente. La souche *S. aureus* ATCC 29213 a été utilisée comme souche productrice de biofilm de référence.

Dans chaque plaque, une ligne contenait uniquement du témoin négatif avec du milieu MHB sans bactérie afin d'objectiver la croissance bactérienne dans les autres puits.

Les plaques ont été incubées 48h à 37°C afin de permettre une création de biofilm suffisante.

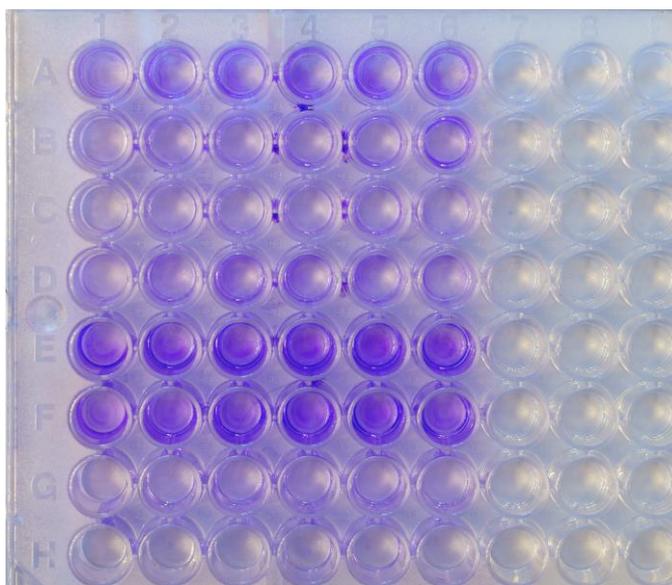
La quantité de biofilm a été mesurée au bout de 48h, grâce à un colorant, le cristal violet, dilué à 0,25 % dans de l'eau ultra pure. Pour cela, chaque plaque a été rincée 3 fois avec du PBS, puis 200  $\mu$ L de cristal violet a été ajouté. Un nouveau rinçage avec du PBS a été effectué après incubation des plaques pendant 3 minutes à température ambiante. Une fois les plaques bien sèches, de l'éthanol à 96 % a été ajouté dans chaque puits (figure 8). La densité optique a été mesurée au Fluostar à 595 nm. Afin de connaître l'absorbance de chaque souche, la valeur d'absorbance du blanc a été soustraite à la valeur d'absorbance de chaque souche.

## Protocole



**Figure 8** : Détermination de la production de biofilm des souches de *S. aureus*

Les résultats de la quantification du biofilm pour certaines souches de *S. aureus* sont exposées dans la figure 9. La souche ATCC, en A, est productrice de biofilm. Un témoin, constitué uniquement de milieu MH se trouve en H. Les souches à tester sont sur les lignes B à G. Les souches E et F présentent une forte coloration violette, liée au cristal violet, et sont associées à la production de biofilm. La souche D produit une quantité de biofilm moyenne. Les souches B, C et G ont une teinte comparable à celle du témoin, et produisent moins de biofilm que la souche ATCC.



**Figure 9** : Image d'une plaque 96 puits avec souches productrices de biofilms et souches non productrices

## 5. Analyses statistiques

Le logiciel GraphPad Prism (version 7) a été utilisé pour les analyses statistiques.

Pour toutes les analyses réalisées, une différence statistiquement significative était considérée en cas de valeur de p (p-value) inférieure à 0.05.

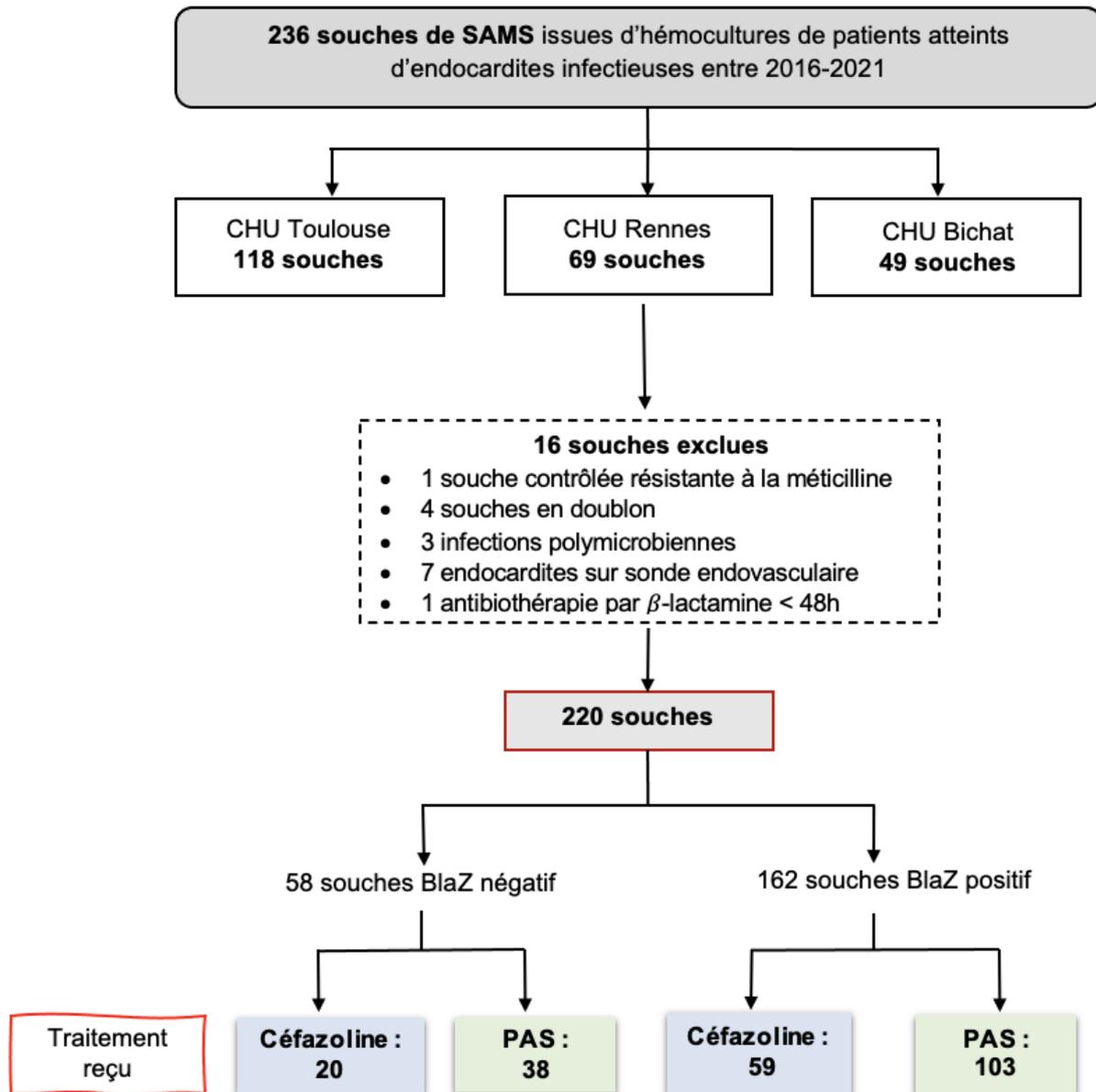
## II. Résultats

### 1. Structure de l'étude

Dans notre étude, menée de 2016 à 2021, 236 souches de 3 hôpitaux différents ont été incluses : 118 du CHU de Toulouse, 69 du CHU de Rennes et 49 de l'hôpital Bichat. Au final, 16 souches ont dû être exclues de l'étude pour des raisons diverses et 220 souches ont été incluses dans la cohorte. Parmi ces 220 souches, 162 possédaient le gène *blaZ*. Sur ces 162 souches *blaZ* positives, 59 provenaient de patients traités par céfazoline et 103 par PAS (cloxacilline ou oxacilline). Sur les 58 souches *blaZ* négatives, 20 étaient issues de patients traités par céfazoline et 38 par PAS (figure 10)

Dans ce travail, l'effet inoculum de l'oxacilline a été étudié pour l'ensemble des souches (n = 220).

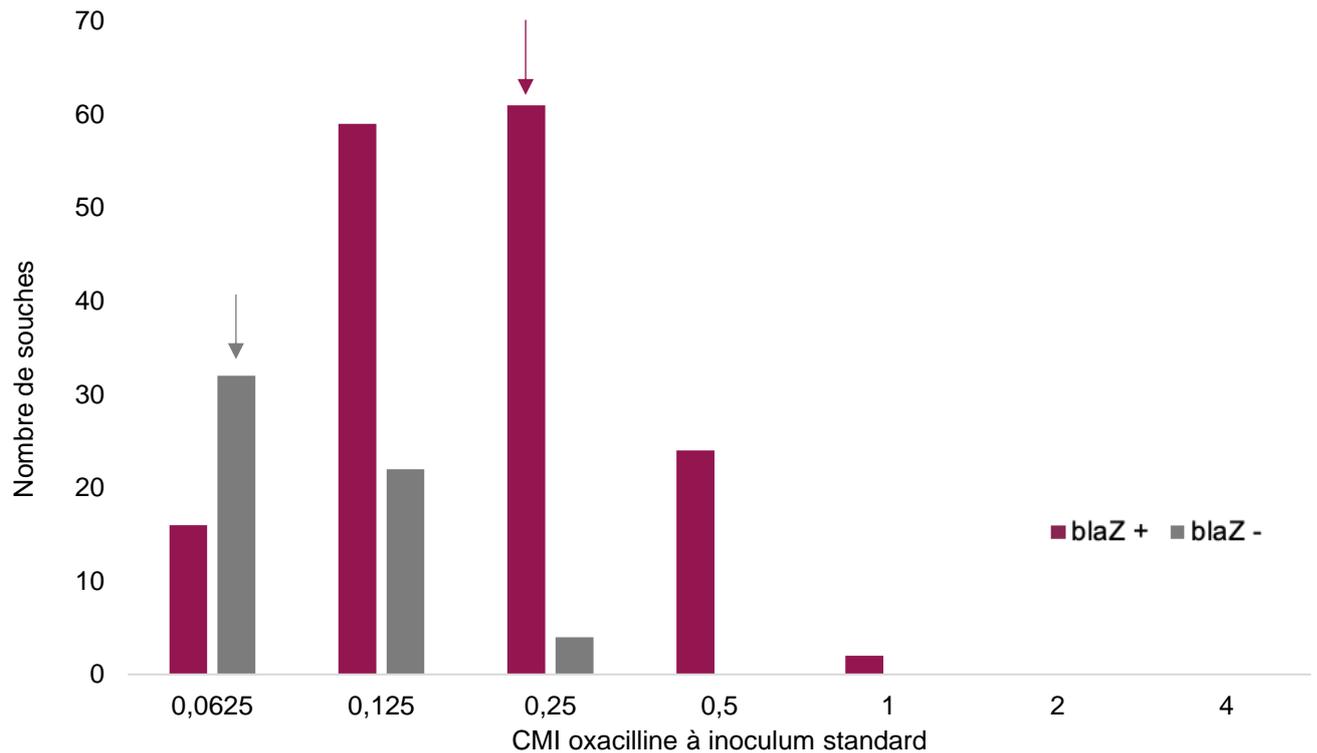
L'analyse portera d'abord sur les données microbiologiques de l'ensemble des souches testées puis, une deuxième partie sera consacrée à l'effet inoculum de l'oxacilline en fonction du traitement reçu par le patient. Une troisième partie abordera la capacité des souches à produire du biofilm en fonction de la présence ou non d'un effet inoculum.



**Figure 10** : Représentation de la structure de l'étude

## 2. Distribution des CMI Oxacilline et effet inoculum

A inoculum standard, la médiane des CMI des souches *blaZ* positives (0,25 mg/L) était statistiquement différente de celle des souches *blaZ* négatives (0,0625 mg/L ;  $p < 0,0001$  selon le test de Mann-Whitney, figure 11).



**Figure 11** : Distribution des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'oxacilline à inoculum standard selon la présence ou l'absence de *blaZ*

La médiane des CMI est représentée par les flèches de couleur, en fonction de la présence de *blaZ*.

Un effet inoculum pour l'oxacilline a été retrouvé pour 86 souches sur les 220 souches testées soit 39 %. Parmi les souches *blaZ* négatives, 3 ont présenté un effet inoculum (1,36 %). Pour les souches productrices de pénicillinase, 83 ont présenté un effet inoculum pour l'oxacilline, soit environ la moitié des souches productrices de pénicillinases (83 souches sur 162, 51 %), comme le montre le tableau 3.

**Tableau 3** : Présentation des CMI, de l'effet inoculum et de la résistance à l'oxacilline

	Inoculum standard		Inoculum fort	
	N = 220		N = 220	
	<i>blaZ</i> négatives	<i>blaZ</i> positives	<i>blaZ</i> négatives	<i>blaZ</i> positives
CMI : Valeur min-max (mg/L)	0,0625-0,25	0,0625-1	0,0625-1	0,0625-4
CMI : Médiane (mg/L)	0,0625	0,25	0,125	0,5
Effet inoculum <sup>(a)</sup> n, (%)	-	-	3/58 (5,17 %)	83/162 (51,2 %)
Souches résistantes <sup>(b)</sup> n (%)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	5 (2,3)

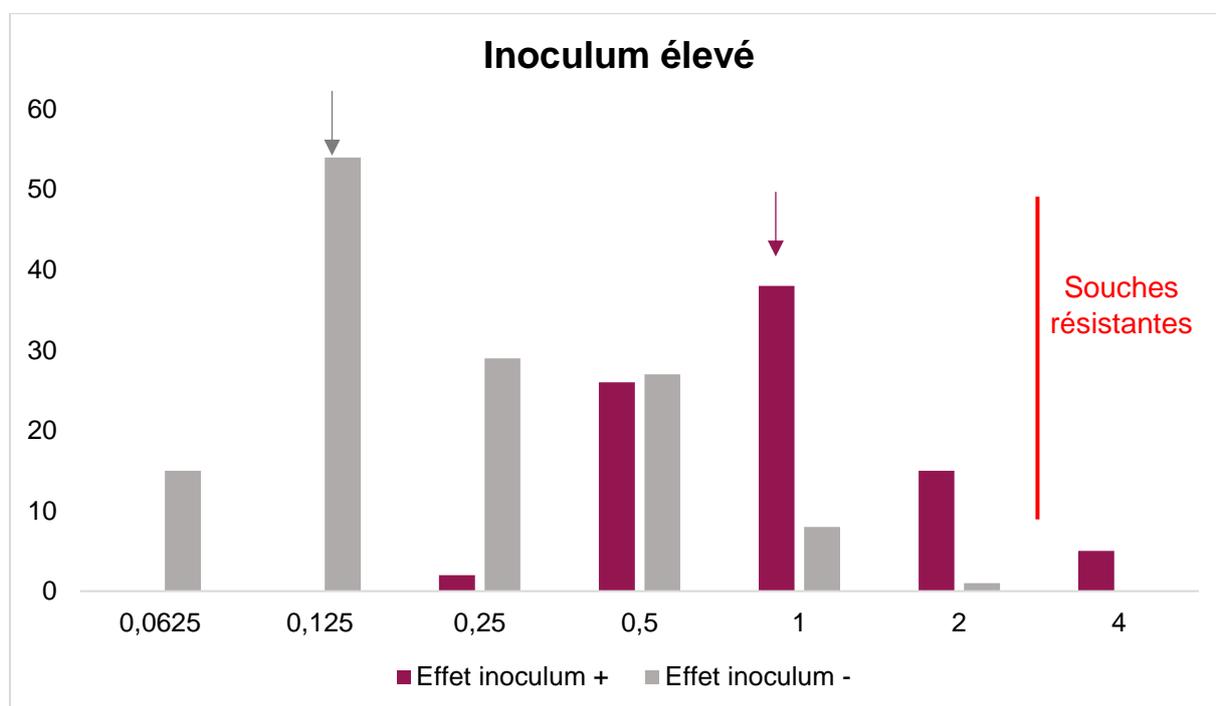
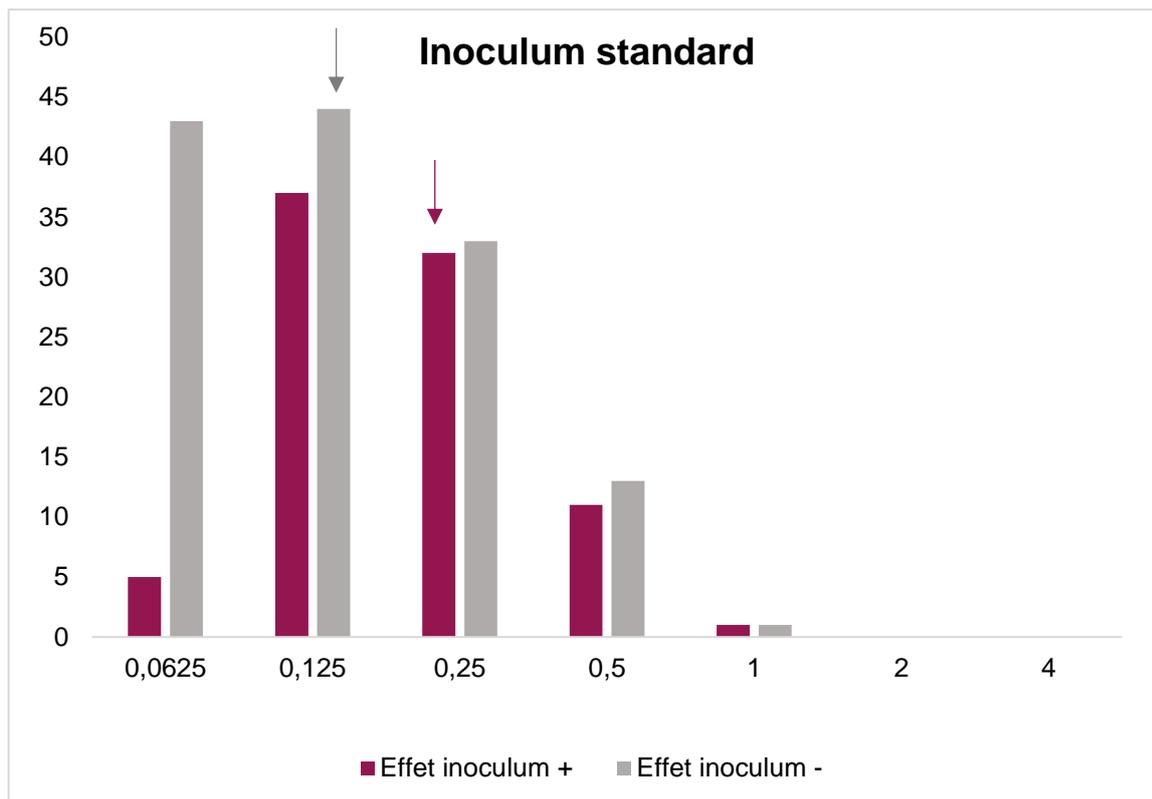
(a) Défini par une augmentation de la CMI d'un facteur  $\geq 4$  à inoculum fort par rapport à la CMI de l'inoculum standard.

(b) Définies par une CMI  $> 2$  mg/L

Pour l'oxacilline, nous avons considéré qu'une CMI  $> 2$  mg/L était associée à une résistance, en l'absence de concentration critique clinique décrite par l'EUCAST (129). En effet, ce seuil de 2 mg/L est décrit par l'EUCAST comme permettant de séparer de façon discriminante les souches de SAMS des souches de SARM. Ainsi, à inoculum standard, toutes les souches de SAMS de notre collection avaient une CMI  $\leq 2$  mg/L. A inoculum élevé, 97,7 % des souches conservent une CMI inférieure ou égale à 2 mg/L. Une résistance à l'oxacilline à inoculum élevé a été objectivée pour 5 souches (CMI = 4 mg) productrices de pénicillinases (2,3 %, 5 sur 220).

Si on s'intéresse à la distribution des CMI pour l'oxacilline à inoculum standard, il existe une différence statistiquement significative selon la présence ou non d'un effet inoculum (figure 12, médiane de 0,125 mg/L pour les souches sans effet inoculum vs 0,25 mg/L pour les souches sans effet inoculum,  $p = 0,0003$ , test de Mann-Whitney).

A inoculum élevé, les médianes des CMI pour l'oxacilline étaient également statistiquement différentes pour les souches qui expriment un effet inoculum pour l'oxacilline par rapport aux souches sans effet inoculum (0,125 mg/L vs 1 mg/L,  $p < 0,0001$ , Test de Mann-Whitney).



**Figure 12** : Répartition des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'oxacilline à inoculum standard et à inoculum élevé selon la présence ou non d'un effet inoculum, pour l'ensemble des souches.

La médiane des CMI est représentée par les flèches de couleur, en fonction de la présence d'un effet inoculum.

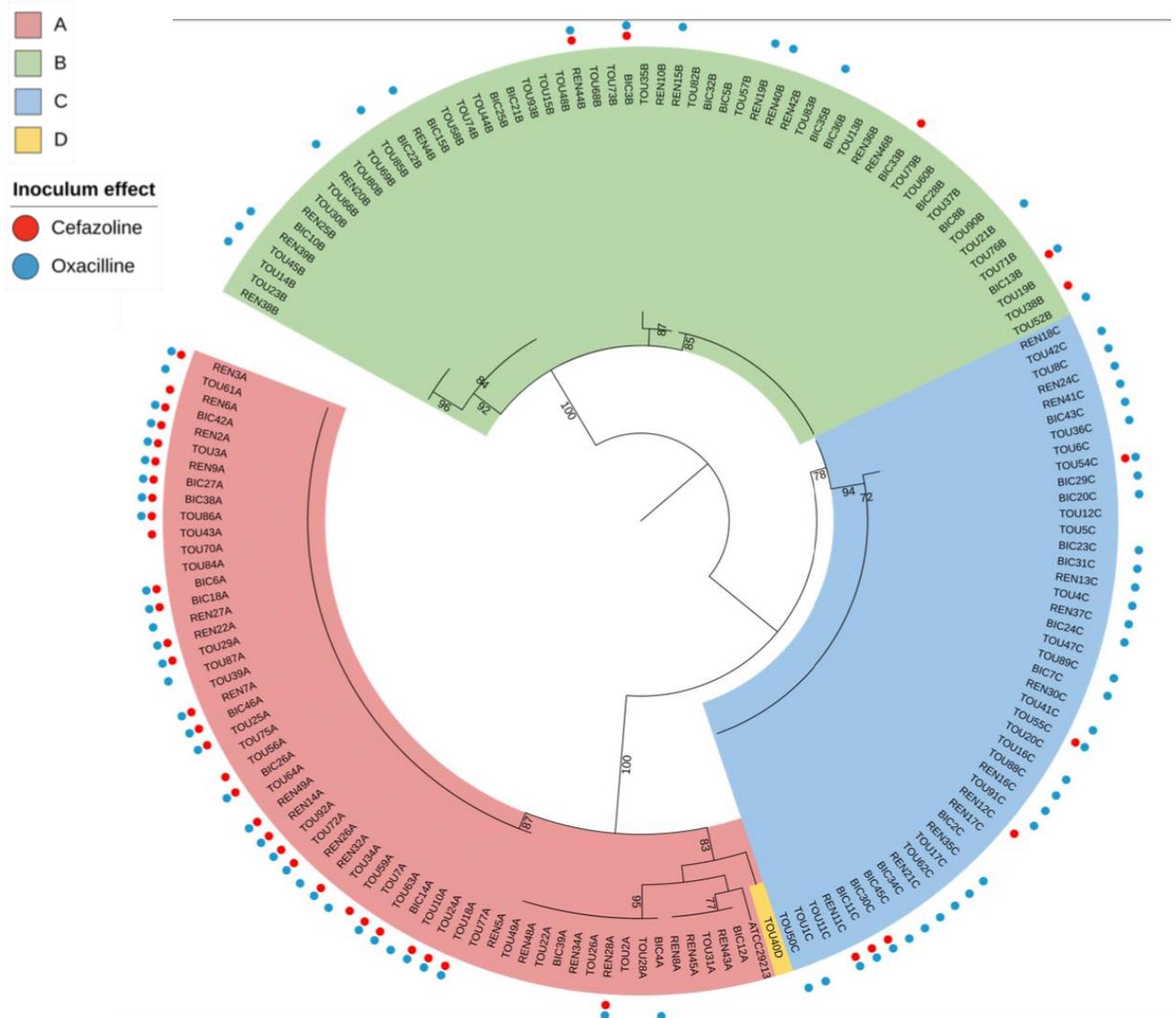
### 3. Distribution des différents types de $\beta$ -lactamases staphylococciques

L'amplification de 355 paires de bases du gène *blaZ* a montré que 58 souches (26,4 %) ne possèdent pas de pénicillinase. Le séquençage partiel du gène a ensuite permis de classer les 162 souches *blaZ* positives en fonction du type de pénicillinase.

Un effet inoculum pour l'oxacilline a été montré pour 58,62 % des souches de type A (34 sur 58 souches), 75,56 % des souches de type C (34 souches sur 45) et 25,86 % des souches avec une pénicillinase de type B (15 sur 58 souches), illustré par la figure 13.

Trente-cinq souches (15,9%) présentent à la fois un effet inoculum pour l'oxacilline et pour la céfazoline. Ce sont majoritairement des souches avec une pénicillinase de type A (77 %, 27 souches sur 35). Environ un tiers des souches (32 %) ne présentent ni un effet inoculum pour la céfazoline ni pour l'oxacilline. La majorité de ces souches (57 %, 41 souches sur 72) possède une pénicillinase de type B. Très peu de souches ont un effet inoculum uniquement pour la céfazoline (n = 7, soit 3,1 % des souches totales).

Un effet inoculum pour l'oxacilline, sans effet inoculum pour la céfazoline associé est retrouvé pour 48 souches, majoritairement des souches BlaZC (29 souches sur 48).

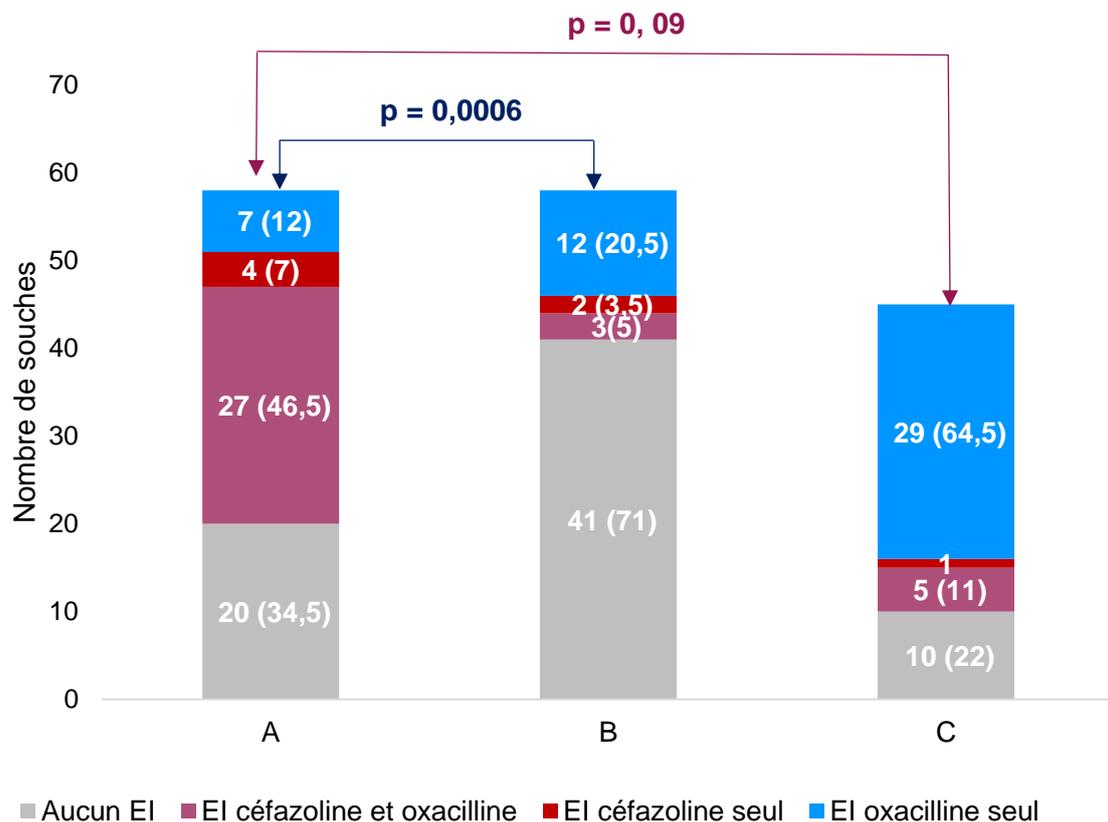


**Figure 13** : Arbre phylogénétique représentant les 162 souches positives pour le gène *blaZ*, en fonction de leur séquence en acides aminés, permettant de les classer en pénicillinase A, B, C ou D.

Les souches sont nommées par les trois premières lettres de l'hôpital où elles ont été isolées (TOU pour Toulouse, REN pour l'hôpital de Rennes et BIC pour l'hôpital Bichat. La dernière lettre correspond au type de *Blaz*.

Les souches qui présentent un effet inoculum pour la céfazoline sont marquées d'un point rouge et les souches qui présentent un effet inoculum pour l'oxacilline sont marquées d'un point bleu. Les 3 souches *blaZ* négatives mais qui présentaient un effet inoculum pour l'oxacilline (1,4 % des souches) ne sont pas représentées sur cette figure.

Les souches qui présentent un effet inoculum pour l'oxacilline sont majoritairement associées aux pénicillinases de types A et C : 34 souches sur 86 pour BlaZA, 34 souches sur 86 pour BlaZC, soit 79 % des souches avec effet inoculum pour l'oxacilline (figure 14). En effet, la distribution des souches présentant un effet inoculum pour l'oxacilline est statistiquement différente en fonction du type de pénicillinase A, B, C ou sans pénicillinase (test de Fisher ;  $p < 0,0001$ ). Une différence significative dans la répartition des souches présentant un effet inoculum pour l'oxacilline existe entre les souches BlaZ B et les souches *blaZ* négatives (test de Fisher ;  $p = 0,0038$ ) d'une part, et les souches BlaZA et BlaZB (test de Fisher ;  $p = 0,0006$ ) d'autre part. Aucune différence significative n'a été montrée sur la proportion de souches avec un effet inoculum pour l'oxacilline entre les pénicillinases de type A et C (test de Fisher ;  $p = 0,09$ ).



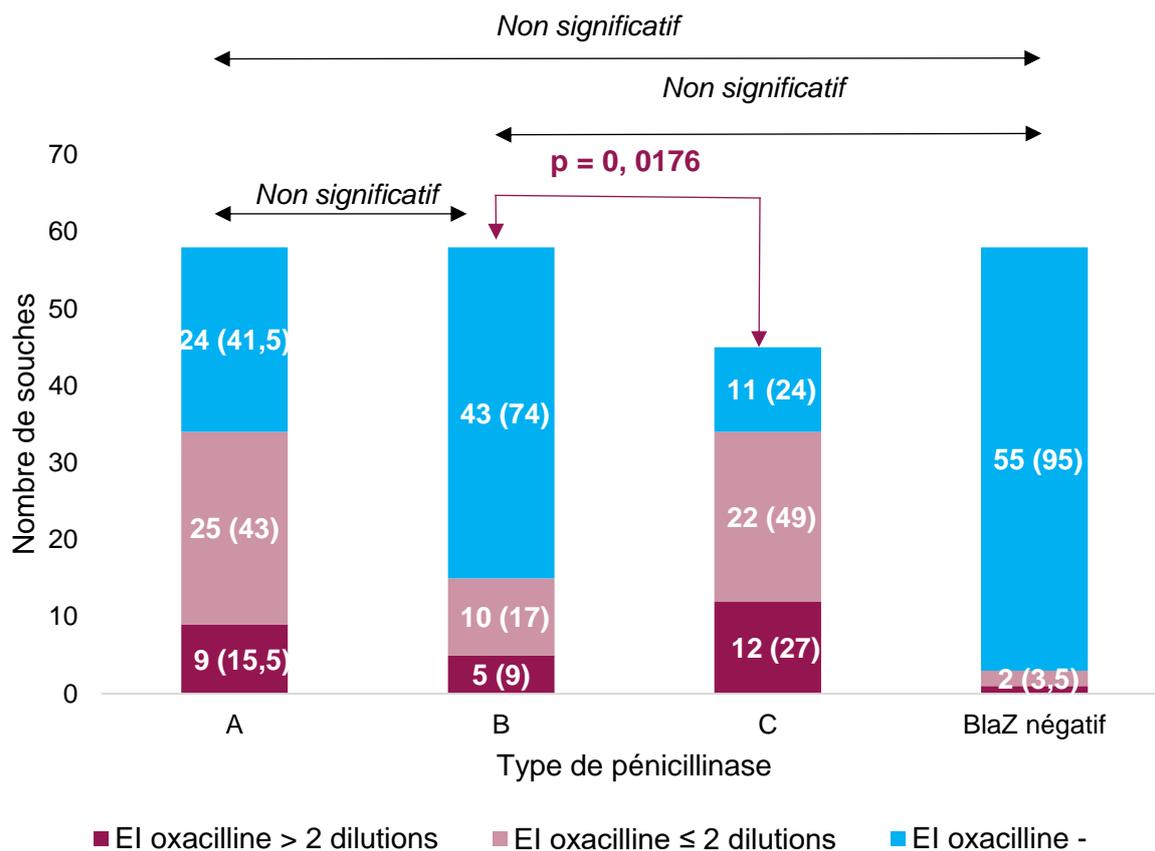
**Figure 14** : Représentation des différentes  $\beta$ -lactamases en fonction de la présence d'un effet inoculum pour l'oxacilline ou la céfazoline, pour les deux ou aucune des deux molécules. Comparaison (test de Fisher) de la proportion de souches présentant un EI pour l'oxacilline

EI = effet inoculum

A inoculum standard, il existe une différence statistiquement significative ( $p < 0,001$ ) entre les médianes des CMI pour l'oxacilline des types A, B, C et des souches *blaZ* négatives, selon le test de Kruskal Wallis. Aucune différence n'est montrée entre les types A et B ( $p = 0,4749$ ) et entre les types B et C ( $p > 0,9999$ ). Il existe cependant une différence significative entre les médianes des CMI de l'oxacilline pour les types A et C ( $p = 0,00693$ ).

Sur les 86 souches possédant un effet inoculum pour l'oxacilline, 27 (31,4 %) ont plus de 2 dilutions d'écart entre les inoculum forts et standards, ce qui représente 12,3 % de l'ensemble des souches. Il n'existe pas de différence significative (tests de Fisher) concernant la possibilité d'avoir un effet inoculum plus marqué entre les souches productrices de pénicillinases de type BlaZA ou BlaZB ou BlaZC et les souches *blaZ* négatives.

Parmi les souches productrices de pénicillinase, la répartition des souches possédant un effet inoculum plus marqué pour l'oxacilline (plus de 2 dilutions d'écart entre les inoculum forts et standards) diffère en fonction du type de pénicillinase (test de Fisher ;  $p < 0,0001$ ). En comparant 2 à 2 les proportions de souches possédant un effet inoculum plus prononcé en fonction des types de pénicillinases, la seule différence statistiquement significative se retrouve entre les pénicillinases de type B vs C (test de Fisher,  $p = 0,0176$ , figure 15).



**Figure 15** : Représentation des différentes  $\beta$  lactamases (A, B, C) et des souches blaZ négatives en fonction de l'intensité de l'effet inoculum (pas d'effet inoculum, > 2 dilutions, ≤ 2 dilutions)  
 ns : non significatif  
 EI = effet inoculum

#### 4. Remise en perspective en fonction de l'évolution clinique

Au total, 141 patients ont été traités par PAS, soit 64 %. Une pénicillinase était présente pour 103 souches (soit 73 %), 38 souches ne possédaient pas le gène *blaZ* (27 %).

Aucune différence significative ( $p = 0,31$ , test de Fisher) n'a été montrée entre le nombre de souches avec effet inoculum pour l'oxacilline selon que le patient soit traité par céfazoline ou PAS (tableau 4). Les distributions des CMI de l'oxacilline étaient similaires entre les patients traités par céfazoline ou par PAS à inoculum standard ( $p = 0,5954$ , test de Fisher). Par ces tests statistiques, nous nous sommes affranchis des biais potentiels et nous nous sommes assurés que les groupes étaient comparables.

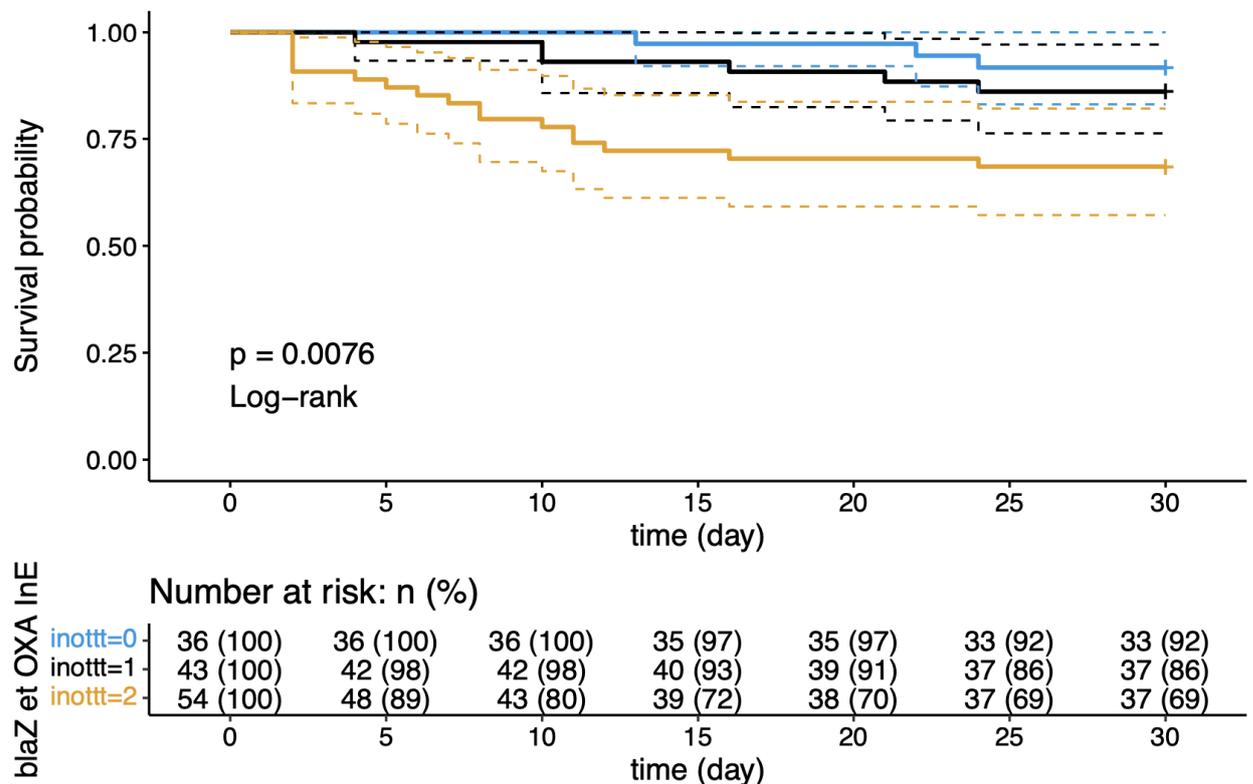
**Tableau 4** : Prévalence de l'effet inoculum de l'oxacilline selon le type de traitement reçu et la présence ou non de *blaZ*

PAS : Pénicilline anti staphylococcique

Traitement	Céfazoline (n = 79)		PAS (n = 141)		Total
	<i>blaZ</i> négatives	<i>blaZ</i> positives	<i>blaZ</i> négatives	<i>blaZ</i> positives	
Présence	1 (1,3 %)	26 (33)	2 (1,4)	57 (40,4)	86
Absence	19 (24 %)	33 (41,7)	36 (25,5)	46 (32,7)	134
Total	20	59	38	103	220

Dans le groupe de patients traités par oxacilline, l'infection par une souche présentant un effet inoculum pour l'oxacilline était un facteur de mauvais pronostic sur la survie à 30 jours ( $p = 0,0076$ , test du Log-rank) comme montré sur la figure 16.

Les courbes de survie de Kaplan-Meier des patients infectés par une souche *blaZ* négative (courbe bleu) et des patients infectés par une souche *blaZ* positive mais sans effet inoculum pour l'oxacilline (courbe noire) étaient quasiment superposables (figure 16). Ces patients, tous traités par oxacilline présentaient un taux de survie à un mois similaire.



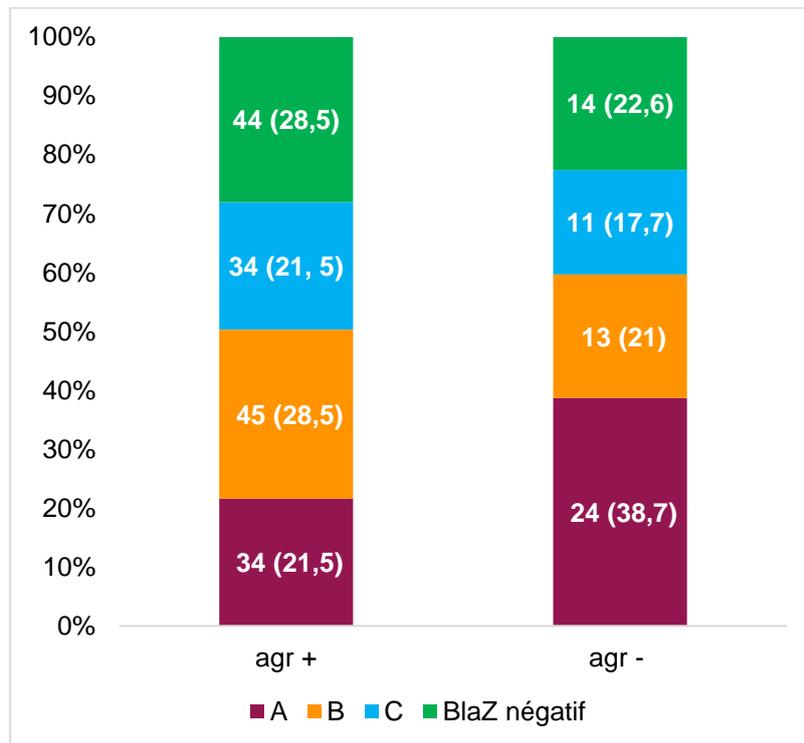
**Figure 16** : Courbe de survie à un mois de traitement par oxacilline

Les 3 courbes concernent les patients traités par oxacilline. La courbe bleue représente les patients infectés par des souches *blaZ* négatives, la courbe noire les patients infectés par des souches *blaZ* positives sans effet inoculum pour l'oxacilline et la courbe orange les patients infectés par les souches *blaZ* positives avec effet inoculum pour l'oxacilline.

## 5. CAMP test et fonctionnalité du système *agr*

Sur les 220 souches étudiées, 115 étaient directement hémolytiques après pousse sur gélose COS, soit 52,3 % des souches. Pour les 105 souches restantes, un test phénotypique complémentaire, le CAMP test a été réalisé et 59 % (62 sur 105 souches) d'entre elles n'étaient pas hémolytiques. Ces souches ne produisant pas de  $\delta$ -hémolysine ont été associées dans la littérature à un système *agr* dysfonctionnel.

Les souches avec *agr* dysfonctionnel possédaient une pénicillinase dans 77 % des cas (48 souches sur 62). Les souches productrices de pénicillinase avec système *agr* dysfonctionnel étaient plutôt associées au type A (38,7 %, 24 sur 62 souches *agr*-). Sur les 58 souches avec une pénicillinase de type A, 41 % avaient un CAMP test négatif, contre 21 % pour le type B et 25 % des souches de type C. Environ un quart des souches *blaZ* négatives étaient associées à un système *agr* dysfonctionnel (14 souches sur 58, 24,4 %, figure 17).



**Figure 17 :** Répartition des différentes  $\beta$ -lactamases et souches *BlaZ* négatif en fonction de la fonctionnalité du système *agr*, détecté par la production de  $\delta$  hémolysine

Cependant, il n'y a pas de lien statistiquement significatif entre la présence ou l'absence de *blaZ* et la présence d'un système *agr* dysfonctionnel (test de Fisher ;  $p = 0,4979$ ), ni entre le type de pénicillinase et la présence d'un système *agr* dysfonctionnel (test de Fisher ;  $p = 0,4343$ ).

Parmi les souches qui présentent un effet inoculum pour l'oxacilline, 27 présentent un système *agr* non fonctionnel, soit 31 %.

Sur les 42 souches qui présentent un effet inoculum pour la céfazoline, 14 sont associées à un système *agr* dysfonctionnel (33 %). Sur ces 14 souches, 13 présentent un effet inoculum également pour l'oxacilline (tableau 5). La majorité des souches ayant un système *agr* dysfonctionnel (66 %, 41 souches sur 62) a présenté un effet inoculum, soit pour la céfazoline, soit pour l'oxacilline, soit pour les deux molécules. Sur ces 62 souches, 21 souches n'ont présenté aucun effet inoculum.

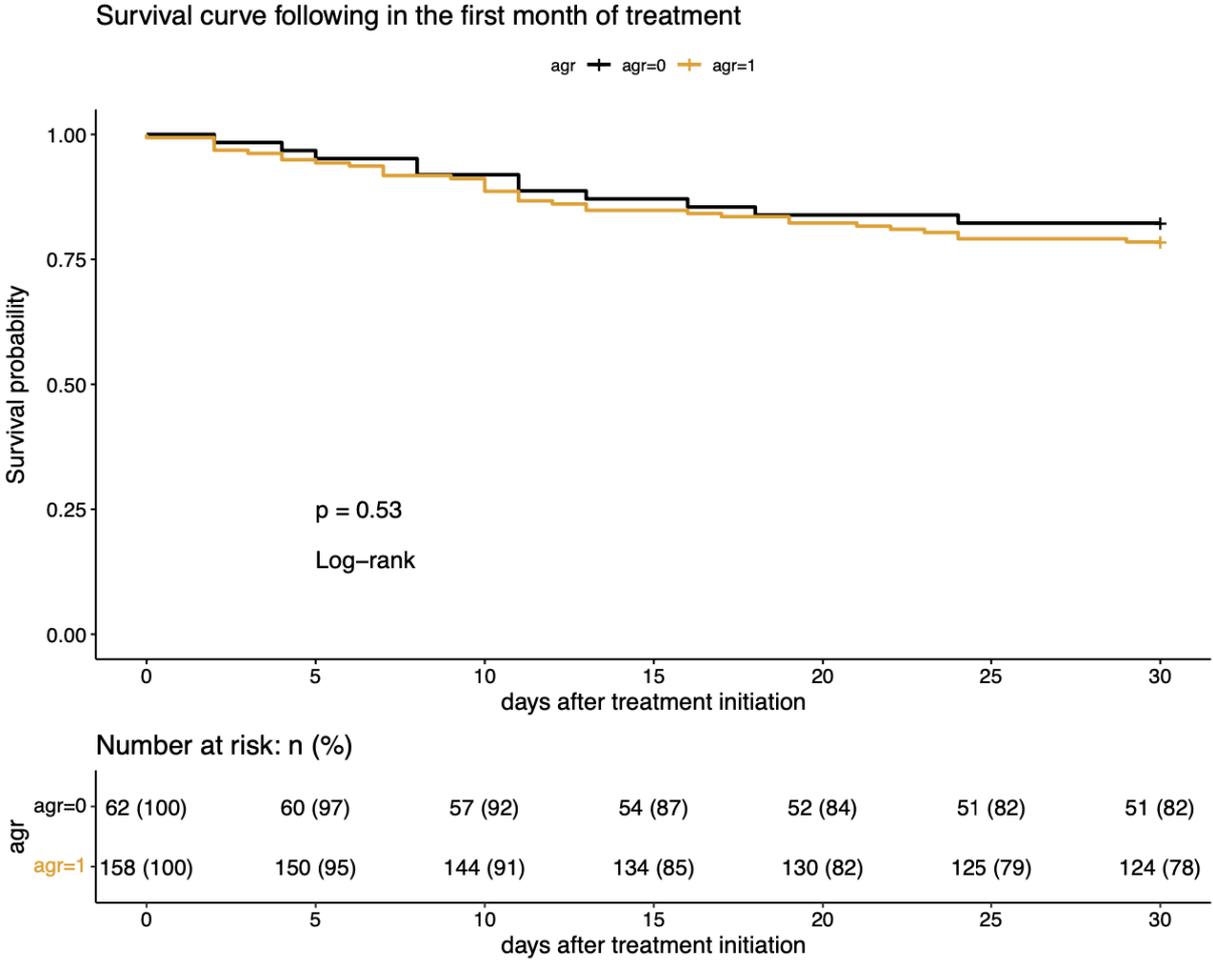
**Tableau 5 : Résultats du CAMP test et effet inoculum pour la céfazoline et l'oxacilline**

El oxacilline	El céfazoline	Souche productrice de $\delta$ hémolysine (n)	Souche non productrice de $\delta$ hémolysine (n)	Total
+	-	59	27	86
-	+	28	14	42
+	+	22	13	35
-	-	51	21	72

Que ce soit pour l'ensemble des souches ou uniquement les souches *blaZ* positives, aucune différence statistiquement significative n'a été retrouvée entre la présence d'un effet inoculum pour l'oxacilline en fonction de la présence ou l'absence d'*agr* (test de Fisher,  $p = 0,4436$  et  $p = 0,7315$  respectivement). Aucun lien entre l'effet inoculum pour la céfazoline et le système *agr* n'a été mis en évidence ( $p = 0,5600$ ).

La plupart des patients infectés par des souches avec un système *agr* dysfonctionnel ont reçu un traitement par oxacilline (67,7 %, 42 souches sur 62 souches avec système *agr* dysfonctionnel), ce qui représente 29,7 % de l'ensemble des patients traités par PAS.

En mettant en corrélation les tests microbiologiques réalisés et les données cliniques des patients, il n'existe pas d'impact du système agr sur la probabilité de survie à 30 jours (p = 0,53, log-rank, figure 18).



**Figure 18 :** Courbe de survie à un mois en fonction de la présence d'un système agr dysfonctionnel

La courbe noire représente les patients avec un système agr dysfonctionnel, la courbe orange représente les patients avec un système agr fonctionnel.

## 6. Production de biofilm et effet inoculum

### a. Sélection des isolats

La production de biofilm a été étudiée sur un échantillon de 48 souches, ce qui représente 22 % de l'ensemble des souches. Les souches testées ont été sélectionnées en fonction de la présence ou non d'un effet inoculum pour l'oxacilline et pour la céfazoline et en fonction du type de pénicillinase, afin qu'elles soient représentatives de l'ensemble de notre panel.

Le tableau 6 présente les souches utilisées pour la quantification du biofilm, échantillonnées de manière à être les plus représentatives de l'intégralité de notre cohorte.

**Tableau 6** : Profil des souches testés pour la quantification du biofilm

El céfazoline	El oxacilline	A	B	C	<i>blaZ</i> négatives	Total
+	-	4	2	1	2	9
-	+	4	4	5	3	16
+	+	4	3	3	0	10
-	-	4	5	4	0	13
Total		16	14	13	5	48

Sur les 48 souches testées, 16 ont présenté un CAMP test négatif (33,33 %).

### b. Production de biofilm

Il n'existe pas de consensus sur la catégorisation des isolats de *S. aureus* en fonction de leur capacité à former un biofilm. Nous avons choisi de catégoriser la production de biofilm en 3 groupes, à l'instar de la catégorisation utilisée dans plusieurs études (106,132). La souche de référence *S. aureus* ATCC 29213 a été utilisée comme contrôle positif.

Les souches de *S. aureus* associées à une formation de biofilm  $\geq 75$  % du contrôle positif ont été qualifiées de fortes productrices de biofilm, les souches qui ont produit entre 25 et 75 % de biofilm par rapport au contrôle positif ont été classées en productrices modérées de biofilm. Enfin, les souches où moins de 25 % de biofilm a été formé ont été qualifiées comme faibles productrices de biofilm (132).

Les souches produisent toutes du biofilm mais à différents degrés : 42 % des souches en produisent beaucoup, 48 % des souches produisent du biofilm de manière plus modérée et 10 % sont associées à une faible production de biofilm (tableau 7).

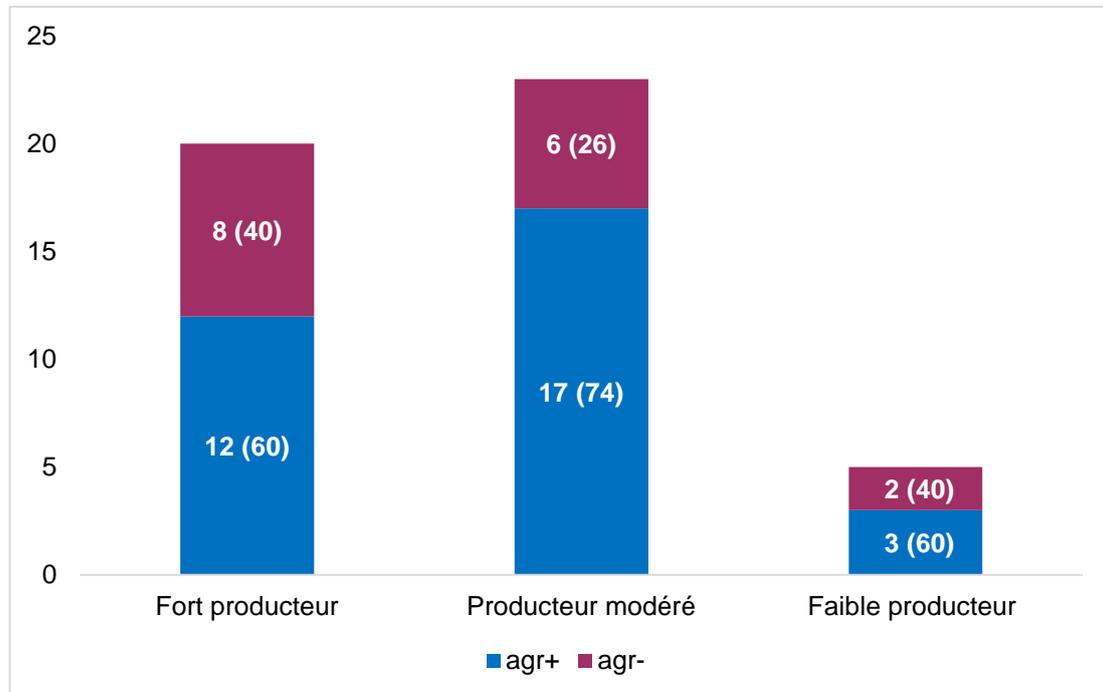
**Tableau 7** : Production de biofilm des 48 souches testées en fonction du type de pénicillinase et de la présence d'un effet inoculum pour l'oxacilline, pour la céfazoline, pour les deux ou pour aucune des deux molécules

Pénicillinase	Production		Faible production		
	forte de biofilm	modérée de biofilm	de biofilm		
A	2 (10 %)	11 (48 %)	3 (60 %)		16
B	8 (40 %)	5 (22 %)	1 (20 %)		14
C	8 (40 %)	4 (17 %)	1 (20 %)		13
BlaZ N	2 (10 %)	3 (13 %)	0 (0 %)		5
Total	20 (42 %)	23 (48 %)	5 (10 %)		48

EI céfazoline	EI Oxacilline	Production		Faible production		
		forte de biofilm	modérée de biofilm	de biofilm		
+	-	2	4	1		7
-	+	7	4	2		13
+	+	4	5	1		10
-	-	5	7	1		13
Total		18 (42 %)	20 (46,5 %)	5 (11,5 %)		43

Un système *agr* dysfonctionnel a été retrouvé pour un tiers des souches testées (16 souches sur 48). La moitié de ces souches avait une forte production de biofilm. Parmi les souches fortement productrices de biofilm, un système *agr* dysfonctionnel a été retrouvé pour 40 % des souches (figure 19)



**Figure 19** : Classification des souches en fonction de leur capacité à produire du biofilm et la fonctionnalité du système *agr*

Lors de la réalisation d'un duplicat pour chaque souche afin d'obtenir des résultats robustes, nous n'avons pas obtenu de résultats reproductibles. Les expérimentations ont alors été reconduites une seconde fois en changeant de matériel (utilisation de plaques 12 puits au lieu de plaques 96 puits, changement des milieux) et réalisant les manipulations à 2 opérateurs. Une variabilité inter et intra opérateur a une nouvelle fois été retrouvée. Par conséquent, cette technique présente une mauvaise reproductibilité et répétabilité et les résultats obtenus ne peuvent être considérés comme fiables.

### III. DISCUSSION

Notre travail s'inscrit dans la continuité de l'étude menée par les Drs Maëlys CROLLE et Baptiste JEAN sur l'effet inoculum pour la céfazoline et son impact sur la mortalité dans l'endocardite à SAMS.

L'objectif principal de notre travail a été d'étudier cette fois-ci les conséquences de l'effet inoculum pour l'oxacilline sur la survie dans l'endocardite infectieuse à SAMS et de tenter d'explorer les mécanismes sous-jacents.

L'impact de la pénicillinase *BlaZ* sur la survie à 30 jours a été confirmé dans notre étude. Les souches productrices de pénicillinases présentent des CMI supérieures à inoculum élevé et à inoculum standard. Ces dernières sont responsables d'une mortalité plus importante à 30 jours par rapport aux souches non productrices de pénicillinases (survie de 92 % pour les patients infectés par une souche non productrice de pénicillinase *versus* 76 % pour les patients porteurs d'une souche productrice de pénicillinase, test du log rank ;  $p = 0,044$ , données non présentées).

Cependant, la présence de la pénicillinase *BlaZ* n'est pas suffisante pour expliquer l'impact sur la survie des patients atteints d'endocardites à SAMS. Associé à la présence de *blaZ*, l'effet inoculum pour l'oxacilline pourrait expliquer la mortalité observée.

En effet, dans notre étude, pour les patients traités par oxacilline, la présence d'un effet inoculum pour l'oxacilline était un facteur de mauvais pronostic sur la survie à 1 mois, par rapport aux patients infectés par une souche sans effet inoculum pour l'oxacilline. La survie à 30 jours pour les patients porteurs d'une souche *blaZ* positive associée à un effet inoculum pour l'oxacilline était de 69 % (test du log-rank,  $p = 0,035$ ). Les patients infectés par une souche productrice de pénicillinase mais qui ne présentait pas d'effet inoculum pour l'oxacilline présentaient une survie de 86 %. La survie des patients infectés par une souche ne produisant pas d'effet inoculum se rapproche de la survie des patients infectés par une souche non productrice de pénicillinase (92 %, test du log-rank,  $p = 0,0076$ ).

Ces données montrent que la production d'une pénicillinase n'est pas le seul mécanisme impliqué mais que l'effet inoculum est aussi en cause dans la survie des patients atteints d'endocardites à SAMS.

L'effet inoculum pour l'oxacilline a très peu été étudié *in vitro* (65,72) car les PAS sont décrites dans la littérature comme stables vis à vis des pénicillinases BlaZ (71).

Notre étude démontre donc qu'une proportion non négligeable de souches de SAMS présente un effet inoculum pour l'oxacilline (39,09 %) mais aussi l'impact clinique de cet effet, ce qui n'a jamais été montré à notre connaissance.

Compte tenu du faible nombre d'études disponibles sur l'effet inoculum pour l'oxacilline, nous nous sommes intéressés aux données disponibles pour une autre pénicilline M utilisée aux Etats-Unis, la nafcilline. Cependant, nous pouvons supposer que la nafcilline ne se comporte pas exactement à l'identique de l'oxacilline. L'étude de Sabath et *al.* a montré que l'oxacilline était affectée par l'effet inoculum mais pas la nafcilline, qui présenterait une meilleure stabilité vis à vis des  $\beta$ -lactamases (64). Des différences structurelles ou conformationnelles entre les deux molécules pourraient entraîner une affinité différente pour les pénicillinases. L'extrapolation de l'effet inoculum pour l'oxacilline en se basant par rapport à la nafcilline est donc à considérer avec précaution.

Des différences concernant la présence d'un effet inoculum sont retrouvées selon les études. Certaines ont mis en évidence la présence d'un effet inoculum, que ce soit pour la nafcilline (66) ou pour l'oxacilline (64,72) alors que d'autres n'ont pas retrouvé d'effet inoculum (68,71).

Les différences observées entre les études peuvent être expliquées en fonction de la définition de l'effet inoculum choisie. Dans notre étude, la définition utilisée est qu'une souche possède un effet inoculum lorsque sa CMI est augmentée d'un facteur 4 entre inoculum standard et inoculum élevé (définition utilisée par Livorsi *et al* (13)). Certaines études considèrent qu'une souche présente un effet inoculum dès lors qu'elle devient résistante à inoculum élevé (CMI > 2 mg/L pour l'oxacilline).

Dans l'étude de George et *al.*, lorsque la définition de Livorsi est utilisée, 70,7 % des souches présentent un effet inoculum pour la céfazoline. Cette proportion diminue à 14,3 % de souches avec effet inoculum lorsque la seconde définition est utilisée (67), ce qui nécessite d'être prudent en fonction de la définition utilisée.

De plus, les disparités retrouvées concernant la prévalence de l'effet inoculum peuvent s'expliquer par des différences de répartition géographique, en fonction du regroupement clonal des isolats de SAMS. L'étude de Mossman et *al* avait mis en évidence une association entre effet inoculum pour la céfazoline et le variant ST30 ( $p = 0,0003$ ) (75).

Par ailleurs, la question des mécanismes sous-jacents à l'effet inoculum se pose, même si la pénicillinase BlaZ semble avoir un rôle non négligeable.

La surexpression du gène *blaZ* pourrait être une des pistes pour expliquer son impact. Des mutations dans le régulateur de *blaZ*, BlaI, pourraient conduire à une dérégulation de l'expression de *blaZ*, entraînant la production d'une plus grande quantité d'enzymes (133).

L'hyperproduction de BlaZ pourrait expliquer que certaines souches de notre étude (27 souches sur 220) ont présenté un effet inoculum plus prononcé (supérieure à deux dilutions entre inoculum standard et inoculum fort) pour l'oxacilline. Il aurait été intéressant de savoir si ces souches présentaient une mortalité supérieure aux souches présentant un effet inoculum classique. Cette comparaison n'a pas été effectuée en raison d'un effectif de souches trop faible.

Un effet inoculum prononcé, défini cette fois-ci comme une souche sensible à inoculum standard mais résistante à inoculum élevé, a déjà été évalué *in vitro* pour certaines  $\beta$ -lactamines dans des pathologies pulmonaires (mucoviscidose, bronchiectasies). Dans ces études, aucune souche avec un effet inoculum plus prononcé n'a été retrouvée pour la céfazoline, mais respectivement 31,3 % et 16,7 % des SAMS présentaient un effet inoculum prononcé pour la tazocilline (74,75).

Une étude de 1983 de Chapman et al a montré que l'augmentation de la taille de l'inoculum entraîne une augmentation des CMI variable selon les souches et les  $\beta$ -lactamines. La céfazoline était la molécule la plus affectée et la nafcilline n'a pas été touchée par l'effet inoculum (étaient testées : nafcilline, céfazoline, cephaloridine, cefamandole, cephalotine, cefoxitine).

Un effet inoculum plus important était retrouvé pour les souches qui présentaient des niveaux élevés de  $\beta$ -lactamases, par rapport aux souches exprimant une quantité plus faible. La production de  $\beta$ -lactamases était évaluée de façon indirecte par un test colorimétrique utilisant une céphalosporine chromogénique, la nitrocéphine. Ces observations *in vitro* ont ensuite été étudiées sur un modèle murin de bactériémie. Il a été déduit que les différences de survie observées étaient influencées par des différences quantitatives dans la production de  $\beta$ -lactamases et par la taille de l'inoculum qui potentialiserait l'action de la pénicillinase (71).

Une autre étude a quantifié la production de protéines BlaZ par Western Blot pour 17 souches de SAMS de type BlaZ A, avec et sans effet inoculum pour la céfazoline. Ces souches ont été traitées par céfazoline afin d'induire une production de BlaZ maximale. En phase stationnaire et sans céfazoline, la production de BlaZ était plus élevée dans le groupe avec effet inoculum pour la céfazoline que dans le groupe sans effet inoculum ( $p = 0,02$ ). En présence de céfazoline, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre l'effet inoculum et la quantité de  $\beta$ -lactamase produite, puisque les deux groupes présentaient une augmentation d'intensité ( $p = 0,06$ ). Il a été noté une augmentation plus importante de la quantité de BlaZ pour les souches sans effet inoculum entre l'état basal et lors du traitement par céfazoline. Ce résultat, bien qu'étudié sur un faible nombre d'échantillons (6 souches dont 3 avec effet inoculum pour la céfazoline) suggère que l'hyperproduction de  $\beta$ -lactamase n'est pas le seul facteur causal responsable de l'effet inoculum (57).

Par ailleurs, la dégradation de l'antibiotique est augmentée lors de la mort d'une sous population de bactéries qui libère à cette occasion des enzymes défensives pour protéger les bactéries survivantes (134). Des enzymes BlaZ extracellulaires pourraient être libérées et chélater des molécules d'antibiotiques.

Une hypothèse supplémentaire pour expliquer l'effet inoculum en lien avec la production de pénicillinase serait celle d'une spécificité hydrolytique des différents types de BlaZ.

L'étude réalisée par les Drs CROLLES et JEAN sur l'effet inoculum pour la céfazoline a montré que 72,8 % des souches avec effet inoculum étaient des souches BlaZ de type A. En 1965, Richmond et *al.* ont décrit des différences sur la capacité d'hydrolyse des pénicillinases A, B et C, en fonction de la  $\beta$ -lactamine testée (30). Dès les premières descriptions de l'effet inoculum pour la céfazoline, il a été montré que les pénicillinases de type A hydrolysaient plus facilement les céphalosporines de 1<sup>e</sup> génération (13,57,59,60). Ces variations dans l'hydrolyse du substrat ou dans l'affinité de BlaZ pour son substrat ( $K_m$ ) pourraient résulter de la très légère variation dans la séquence primaire d'acides aminés en fonction du type de BlaZ (29).

Voladri et *al.* ont ainsi montré que la substitution de la sérine 216 de la pénicillinase BlaZ A par une asparagine transformait son profil enzymatique, qui devenait indiscernable de celui d'une pénicillinase BlaZ C (les enzymes BlaZC possédant une asparagine en position 216) (29).

Dans notre étude, l'effet inoculum pour l'oxacilline était retrouvé pour 58,62 % des souches *BlaZ* de type A (34 souches sur 58) et pour 75,56 % des souches *BlaZ* de type C (34 souches sur 45).

De rares études se sont intéressées au profil hydrolytique des pénicillines M, en raison de leur stabilité supposée vis à vis des  $\beta$ -lactamases. Par ailleurs, comme la cloxacilline et l'oxacilline exercent une forte activité inhibitrice sur les pénicillinases, cela ne permet pas, lors d'étude enzymatiques d'obtenir des valeurs fiables de  $K_m$  (30).

Un effet inoculum pour l'oxacilline a été retrouvé pour 3 souches non productrices de pénicillinase dans notre étude. A notre connaissance, il n'existe pas de données disponibles dans la littérature sur la présence d'un effet inoculum pour l'oxacilline pour les souches *blaZ* négatives.

L'étude de Chong et *al.* a cependant étudié l'effet inoculum pour la céfazoline et la nafcilline pour les souches *blaZ* négatives et aucune d'entre elles n'a présenté d'effet inoculum pour ces deux molécules (56). Livorsi et *al.*, ont montré que 50 souches présentaient un effet inoculum pour la céfazoline dont 3 souches *blaZ* négatives (13). Compte tenu de ces résultats, notre étude nécessite d'être complétée et l'effet inoculum pour la céfazoline devrait être testé pour les 58 souches *blaZ* négatives.

Ce résultat souligne que la présence seule de *blaZ* ne permet pas d'expliquer les échecs de traitement rencontrés. En effet, l'effet inoculum pour l'oxacilline (ou la cefazoline) prédomine chez les SAMS producteurs de pénicillinases, mais la surproduction de *blaZ* seule ne suffit peut-être pas à expliquer la totalité de ce phénomène d'effet inoculum.

L'effet inoculum implique d'autres mécanismes qui pourraient expliquer que certaines souches non productrices de pénicillinases aient aussi un effet inoculum.

Au sein du biofilm présent sur les végétations, les bactéries mettent en place des mécanismes de persistance et entrent en dormance, entraînant une multiplication ralentie voire quasi-nulle. Les souches avec effet inoculum pourraient avoir plus de facultés à atteindre la phase stationnaire puis à entrer dans cette phase de dormance. Ces bactéries posent un réel problème thérapeutique puisque la plupart des antibiotiques, dont les  $\beta$ -lactamines ciblent des bactéries qui se multiplient.

Une étude sur modèle murin de myosite streptococcique a montré pour *Streptococcus pyogenes* que l'affinité pour les PLP diminue au fur et à mesure de l'entrée dans la phase stationnaire, conduisant à l'altération et donc à la perte de certaines PLP (135). La perte de deux PLP pendant la phase stationnaire a également été décrite pour d'autres bactéries telles que *Haemophilus influenzae*. On peut donc supposer que le même type de mécanisme pourrait aussi être retrouvé pour *S. aureus* (136).

La capacité des anti infectieux à interagir avec les bactéries dans l'endocardite infectieuse est entravée par la constitution du biofilm, qui constitue un défi supplémentaire pour que les antibiotiques atteignent leur cible. Même si les antibiotiques parviennent à pénétrer au sein du biofilm, nous pouvons supposer que la pénétration est retardée et que les concentrations efficaces ne sont pas toujours obtenues.

De nombreuses données ont montré que la plupart des isolats de *S. aureus* sont aptes à former du biofilm *in vitro*, mais la quantité de biofilm formée diffère selon les souches et selon le type d'infection (106). L'étude du biofilm a suscité notre intérêt car il pourrait être associé à un pronostic plus défavorable. Des expérimentations complémentaires sont nécessaires puisque cela a été montré dans une seule étude de petite taille (109).

Aucune analyse statistique n'a pu être réalisée pour étudier l'association entre effet inoculum et biofilm dans notre analyse puisque nos expérimentations ont fait preuve d'une mauvaise répétabilité et reproductibilité sans permettre l'obtention de résultats exploitables. De nombreux modèles *in vitro* ont été élaborés pour quantifier la production de biofilm par *S. aureus* et de nombreux facteurs (milieu utilisé, ajout de nutriments, concentration en glucose, pH), peuvent affecter de manière significative les résultats *in vitro* (137). Aucun protocole pour la détermination du biofilm n'est standardisé, notamment en raison de la multitude de paramètres influençant la formation de biofilm, qui dépendent à la fois des conditions de culture et de la souche en question.

Une plus grande reproductibilité serait peut-être obtenue par la mesure de l'activité métabolique à la résazurine, bien qu'il semblerait que les conditions expérimentales soient une nouvelle fois difficiles à standardiser. Ce test est très sensible à au métabolisme respiratoire des bactéries et le temps de réduction est directement lié à l'espèce et à la souche (138). Même si la résazurine s'intéresse uniquement aux bactéries viables, elle pourrait s'inscrire comme alternative ou comme complément de la coloration au cristal violet. Si d'autres expérimentations sont amenées à être faites après ajustement du protocole, il pourrait être intéressant de tester la formation de biofilm par rapport à la

fonctionnalité du système *agr* puisque les souches *agr* fonctionnelles ont été associées à la dispersion du biofilm (97,100).

Le *quorum sensing*, associé au système *agr* joue un rôle dans la régulation de la formation du biofilm. Ce système revêt d'une importance considérable dans les infections à fort inoculum bactérien. En effet, en réponse à une forte densité bactérienne, il peut directement médier l'expression de protéines diminuant la sensibilité aux antibiotiques et réguler les facteurs de virulence.

Dans notre travail, un système *agr* dysfonctionnel a été retrouvé pour 28,1 % des souches, ce qui concorde avec les données de l'étude de Lee *et al* où 34,5 % des souches avaient un système *agr* dysfonctionnel (115). Nous n'avons pas mis en évidence d'impact clinique pour les souches *agr*- par rapport aux souches *agr*+ ( $p = 0,53$ , test du log-rank). Ce résultat est en accord avec l'étude de Lee *et al* (112), où 244 souches de SAMS issues de divers prélèvements ont été analysées (bactériémies, poumons, peau, tissus mous). La mortalité à 30 jours n'était pas supérieure pour les souches ayant un système *agr* dysfonctionnel par rapport aux souches avec *agr* fonctionnel ( $p = 0,82$ ).

Nous n'avons pas retrouvé d'association statistiquement significative entre une altération d'*agr* et la présence d'un effet inoculum, que ce soit pour la céfazoline ou pour l'oxacilline. Dans l'étude de Lee *et al*, 14,9 % des souches avec un système *agr*- ont présenté un effet inoculum pour la céfazoline mais aucune association entre ces deux paramètres n'a été retrouvée (115). L'étude de Wi *et al* a montré que parmi les BlaZ de type A uniquement, l'effet inoculum pour la céfazoline était plus fréquent pour les souches avec *agr* dysfonctionnel que pour les souches avec un système *agr* normal (69,2 % contre 14,9 % ;  $P = 0,025$ ) (114). Cette association n'a pas été retrouvée dans notre collection.

Lee et son équipe ont mis en évidence une association entre l'effet inoculum et le génotype d'*agr*, plutôt qu'entre effet inoculum et dysfonction du système *agr*. Les souches de SAMS avec un *agr* de type III ont présenté une prévalence plus importante d'effet inoculum (*agr* III 43,8 % *versus* non *agr* III 5,5 %,  $P < 0,01$ ) (115).

Il existe des données dans la littérature montrant l'association entre le génotype *agr* et certaines infections. L'endocardite aurait été associé à *agr* I et II. Selon Jarraud *et al*, l'activation des facteurs de virulence peut être plus efficace grâce à la combinaison de certains allèles d'*agr*, de certains gènes de toxines et d'un contexte génétique particulier (85). Dans ce contexte, la réalisation d'études plus approfondies sur les différents

génotypes *agr* pourrait étudier un lien de causalité avec l'effet inoculum ou avec la formation de biofilm (116).

La technique du CAMP test, utilisée historiquement pour la détection de la fonctionnalité du système *agr* est une technique semi-quantitative imparfaite et incomplète. En effet, ce test, bien que simple à mettre en œuvre manque de spécificité et est sujet à une variation inter opérateur lors de la lecture. Elle peut également ne pas s'avérer suffisamment sensible en cas de souches faiblement hémolytiques. D'autres méthodes plus performantes et plus complètes pourraient être utilisées pour détecter la fonctionnalité du système *agr* en obtenant des résultats plus robustes.

La détection et la quantification basée sur l'amplification en duplex en temps réel de la séquence d'acides nucléiques a été utilisée dans l'étude de Chen et *al.* En utilisant l'effecteur de la réponse *agr*, l'ARN III, la détermination rapide de la fonctionnalité d'*agr* a pu être effectuée (139). Il a également été montré que la toxine  $\delta$  pouvait être mise en évidence par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (140). Une étude a mis en place la détection de la  $\delta$  toxine, à l'aide du spectromètre de masse MALDI-TOF, qui permettrait la détection simplifiée de la fonctionnalité du système *agr* (113).

L'augmentation de la mortalité à 30 jours si le patient présente une endocardite à SAMS traitée par oxacilline et qu'il présente une souche avec un effet inoculum pour l'oxacilline soulève la question d'une adaptation microbiologique en routine.

Différentes PCR conventionnelles, dont la détection par PCR en temps réel, ont été décrites pour la détection du gène *blaZ* (141). La détermination du type de  $\beta$ -lactamase n'a en pratique pas d'intérêt puisque tous les types de pénicillinases peuvent présenter un effet inoculum. Une étude a séquencé l'intégralité de la séquence du gène *blaZ* et a montré que seul l'allotype BlaZ-2 (de type A) était significativement associé à la présence d'un effet inoculum pour la céfazoline. Les allotypes de *blaZ* pourraient être plus précis pour détecter les souches avec effet inoculum (142).

L'intérêt de la recherche du gène *blaZ* réside dans la possibilité de traiter par pénicilline G les souches dépourvues de *blaZ*. Cet antibiotique, au spectre moins large, présente une meilleure écologie ainsi qu'une meilleure efficacité. Cependant, la recherche de *blaZ* en biologie moléculaire en routine n'est pas réalisable et ne serait pas suffisante pour adapter l'antibiothérapie.

Des travaux complémentaires pourraient être menés pour quantifier la production de BlaZ en utilisant de la RT-PCR pour déterminer si une hyperproduction pourrait être corrélée à l'effet inoculum. Aussi, il pourrait être pertinent de doser la quantité de BlaZ pour les 27 souches qui présentaient un effet inoculum plus prononcé, qui pourrait être le résultat d'une surexpression de BlaZ, par rapport aux souches qui ne présentent pas d'effet inoculum.

Compte tenu du fait que de rares souches non productrices de pénicillinases puissent avoir un effet inoculum, nos pratiques bactériologiques doivent être en capacité de le détecter rapidement. Cette détection permettrait d'orienter le clinicien sur le choix de l'antibiothérapie la plus adaptée. La méthode de référence en microdilution recommandée par l'EUCAST serait trop fastidieuse à mettre en place en routine puisqu'elle nécessite du temps et une expertise dans l'interprétation des résultats.

Une équipe a développé une méthode de détection capable de différencier les souches BlaZ de type A et BlaZ de type C. Ces dernières seraient différenciables à l'aide de disques de céfazoline, céphalotine et d'oxacilline disposés sur une gélose. Il paraît difficile d'utiliser cette méthode en routine de manière fiable puisque toutes les souches de type A et C ne présentent pas d'effet inoculum pour la céfazoline (27 souches sur 58 et 39 sur 45 respectivement ne présentent pas d'effet inoculum).

Bien que le nombre de souches BlaZ de type B qui présentent un effet inoculum pour la céfazoline soit faible (5 sur 58 dans notre étude), la mise en œuvre et l'interprétation de ce test n'est pas conçu pour détecter l'effet inoculum mais se limite à la détection du type de pénicillinase A ou C (67).

Un test colorimétrique permettant la détection de l'effet inoculum pour la céfazoline en moins de 3h a été développé par Rincon et son équipe. Ce test est basé sur l'utilisation de la nitrocéfine, une céphalosporine chromogène dépourvue de propriétés antimicrobiennes, après induction par l'ampicilline. Un changement de couleur (du jaune au rouge) s'opère lorsque BlaZ hydrolyse le cycle  $\beta$ -lactame de la nitrocéfine. La sensibilité et la spécificité du test étaient respectivement de 82,5 % et de 88,9 %. Ce test a présenté de moins bonnes performances pour les pénicillinases de type B et C par rapport à celles du type A (sensibilités de 53,3 %, 72, 3 % et 92,7 % respectivement) (143).

Ces deux méthodes présentent des limites : elles n'ont été évaluées que pour l'effet inoculum pour la céfazoline et sur un nombre limité de souches dans une zone

géographique déterminée. D'autre part, elles ne mettent pas en évidence directement l'effet inoculum pour une molécule donnée : ce ne sont que des méthodes indirectes.

En routine au laboratoire, les CMI (inoculum standard) sont le plus souvent déterminées à l'aide d'épsilomètres en milieu gélosé, et non par méthode de microdilution en milieu liquide. Il serait intéressant de déterminer, sur l'ensemble de notre cohorte, si la méthode de détermination en milieu gélosé peut être adaptée pour simuler un inoculum élevé et ainsi détecter un éventuel effet inoculum pour la céfazoline ou l'oxacilline.

Des expérimentations restent encore à mener sur l'effet inoculum puisqu'il ne peut pas être exclu que d'autres antibiotiques soient touchés. Même si la daptomycine, antibiotique utilisé contre les bactéries Gram positif, semble être moins affectée par l'effet inoculum, il ne peut être écarté (66,70).

Une autre piste pour faire face à ce phénomène serait l'association d'une  $\beta$ -lactamine à un inhibiteur de  $\beta$ -lactamase tel que l'acide clavulanique, qui pourrait restaurer l'activité de la 1<sup>ère</sup> molécule. Miller et *al* ont montré sur un modèle d'endocardite infectieuse du rat une réduction significative du nombre de bactéries (souche de *S. aureus* connue avec un effet inoculum pour la céfazoline) en cas de co-administration de céfazoline et d'acide clavulanique par rapport à l'administration de céfazoline seule. En présence d'inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases, les CMI ont diminué à inoculum élevé (144). L'utilisation d'inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases associés à une  $\beta$ -lactamine pour remédier à l'effet inoculum supposerait que celui-ci soit uniquement lié à *blaZ*.

Une étude a montré que les associations  $\beta$ -lactamines/inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases (ampicilline/sulbactam et pipéracilline/tazobactam) présentent également un effet inoculum (65,9 % et 43 % respectivement), plutôt associé aux  $\beta$ -lactamases de type C (72). D'autre part, il est difficile de prédire la capacité des inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases à atteindre leur cible et de diffuser au sein de la végétation *in vivo* en concentrations suffisantes. Lorsque l'effet inoculum est moins prononcé, un dosage du médicament et une augmentation des doses pourrait suffire pour palier à l'effet inoculum.

Enfin, il semble y avoir dans nos résultats, une décorrélation entre la magnitude de l'effet inoculum *in vitro* et l'impact *in vivo*. *In vitro*, l'effet inoculum se traduit par une augmentation le plus souvent modérée des CMI en présence d'un fort inoculum bactérien et dans de rares cas seulement, par l'apparition de résistances (5 souches sont devenues résistantes dans notre étude à inoculum fort). En revanche, pour le patient, l'effet inoculum présente

un impact majeur, se traduisant en terme de mortalité à 30 jours en cas d'utilisation d'une  $\beta$ -lactamine pour laquelle la souche infectante présente un effet inoculum.

Plusieurs raisons peuvent être évoquées pour expliquer ce constat.

D'une part, la diffusion de l'antibiotique au sein du biofilm et des végétations, n'est pas prise en compte, tout comme les caractéristiques intrinsèques liées au patient (pharmacodynamie, altérations d'organes) et la réponse de son système immunitaire. D'autre part, les souches de SAMS utilisées dans notre étude sont isolées d'hémocultures et sont donc planctoniques. Elles ont probablement subi des modifications phénotypiques ou de l'expression de leurs gènes lors de leur passage dans le sang et ne sont peut-être pas strictement identiques à celles présentes initialement dans le biofilm de la végétation. Ces bactéries issues d'hémocultures pourraient être plutôt avoir un système *agr* fonctionnel contrairement aux bactéries présentes à l'intérieures du biofilm de la végétation qui auraient tendance à avoir un système *agr* altéré, comme décrit dans l'étude de Yarwood et al (99). Il a également été montré que la négativité du système *agr* est généralement sélectionnée *in vivo*, ce qui explique que les infections chroniques soient souvent associées à une dysfonction du système *agr* (145).

Afin de tirer les meilleures conclusions, il paraît pertinent de proposer un modèle de biofilm simulant une végétation cardiaque pour de se rapprocher au maximum de la réalité, comme cela a déjà été fait par Swchartz et al. Ce modèle de biofilm permettrait de comprendre l'évolution du biofilm au cours d'une infection et d'évaluer de nouvelles stratégies thérapeutiques (146,147).

## CONCLUSION

L'impact de *blaZ* dans l'issue thérapeutique des endocardites à SAMS est à nouveau démontré. Cependant, il n'est pas suffisant à lui seul pour expliquer les échecs thérapeutiques rencontrés. Une proportion non négligeable de souches avec un effet inoculum pour l'oxacilline (39 %) a été mise en évidence parmi les souches de SAMS responsables d'endocardites infectieuses. Il s'agissait principalement de souches possédant le gène *blaZ* de type A et C tandis que l'effet inoculum pour la céfazoline était plutôt associé aux souches possédant une pénicillinase de type A. Certaines souches ont présenté à la fois un effet inoculum pour l'oxacilline et pour la céfazoline.

La présence *in vitro* d'un inoculum est décrit pour la céfazoline et quelques études décrivent la possibilité d'un effet inoculum pour l'oxacilline. Toutefois, des questionnements subsistent encore quant à sa significativité en termes d'impact clinique. Dans notre étude, l'oxacilline a été associé à un risque accru de mortalité à un mois chez les patients atteints d'endocardites à SAMS infectés par une souche avec un effet inoculum pour l'oxacilline. A notre connaissance, aucune autre étude n'a montré d'association entre effet inoculum pour l'oxacilline et échecs de traitements dans les endocardites à *S. aureus*. D'autres études doivent être menées afin de déterminer si d'autres antibiotiques sont sujets à l'effet inoculum ou si l'efficacité antibiotique pourrait être restaurée par l'ajout d'un inhibiteur de  $\beta$ -lactamases.

En pratique, la mise au point d'une méthode fiable et efficace pour détecter l'effet inoculum en routine est essentielle pour être en capacité d'orienter rapidement le clinicien et le guider sur le choix de l'antibiothérapie optimale.

Aucune des hypothèses discutées ne semble expliquer à elles seules l'importance de la mortalité constatée dans les endocardites infectieuses. Le mécanisme complet de l'effet inoculum n'est encore pas complètement élucidé mais il semblerait qu'il ne soit pas uniquement lié à *blaZ* et que plusieurs facteurs soient impliqués et interagissent de manière conjointe. La compréhension de l'effet inoculum nécessite des études approfondies pour déterminer l'ensemble des mécanismes sous-jacents et les implications cliniques qui en découlent.

# BIBLIOGRAPHIE

1. Selton-Suty C, Célard M, Le Moing V, Doco-Lecompte T, Chirouze C, lung B, et al. Preeminence of *Staphylococcus aureus* in Infective Endocarditis: A 1-Year Population-Based Survey. *Clinical Infectious Diseases*. 1 mai 2012;54(9):1230-9.
2. Slipczuk L, Codolosa JN, Davila CD, Romero-Corral A, Yun J, Pressman GS, et al. Infective endocarditis epidemiology over five decades: a systematic review. *PLoS One*. 2013;8(12):e82665.
3. Rajani R, Klein JL. Infective endocarditis: A contemporary update. *Clin Med (Lond)*. janv 2020;20(1):31-5.
4. Delgado V, Ajmone Marsan N, de Waha S, Bonaros N, Brida M, Burri H, et al. 2023 ESC Guidelines for the management of endocarditis: Developed by the task force on the management of endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC) Endorsed by the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS) and the European Association of Nuclear Medicine (EANM). *European Heart Journal*. 14 oct 2023;44(39):3948-4042.
5. Duval X, Delahaye F, Alla F, Tattevin P, Obadia JF, Le Moing V, et al. Temporal Trends in Infective Endocarditis in the Context of Prophylaxis Guideline Modifications: Three Successive Population-Based Surveys. *Journal of the American College of Cardiology*. 29 mai 2012;59(22):1968-76.
6. Miro JM, Anguera I, Cabell CH, Chen AY, Stafford JA, Corey GR, et al. *Staphylococcus aureus* Native Valve Infective Endocarditis: Report of 566 Episodes from the International Collaboration on Endocarditis Merged Database. *Clinical Infectious Diseases*. 15 août 2005;41(4):507-14.
7. Paul M, Zemer-Wassercug N, Talker O, Lishtzinsky Y, Lev B, Samra Z, et al. Are all beta-lactams similarly effective in the treatment of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* bacteraemia? *Clinical Microbiology and Infection*. 1 oct 2011;17(10):1581-6.
8. Lecomte R, Bourreau A, Deschanvres C, Issa N, Le Turnier P, Gaborit B, et al. Comparative outcomes of cefazolin versus antistaphylococcal penicillins in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* infective endocarditis: a *post hoc* analysis of a prospective multicentre French cohort study. *Clinical Microbiology and Infection*. 1 juill 2021;27(7):1015-21.

9. Baddour LM, Wilson WR, Bayer AS, Fowler VG, Tleyjeh IM, Rybak MJ, et al. Infective Endocarditis in Adults: Diagnosis, Antimicrobial Therapy, and Management of Complications. *Circulation*. 13 oct 2015;132(15):1435-86.
10. Bryant RE, Alford RH. Unsuccessful Treatment of Staphylococcal Endocarditis With Cefazolin. *JAMA*. 7 févr 1977;237(6):569-70.
11. Quinn EL, Pohlod D, Madhavan T, Burch K, Fisher E, Cox F. Clinical Experiences with Cefazolin and Other Cephalosporins in Bacterial Endocarditis. *The Journal of Infectious Diseases*. 1 oct 1973;128(Supplement\_2):S386-91.
12. Regamey C, Libke RD, Engelking ER, Clarke JT, Kirby MM. Inactivation of cefazolin, cephaloridine, and cephalothin by methicillin-sensitive and methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*. mars 1975;131(3):291-4.
13. Livorsi DJ, Crispell E, Satola SW, Burd EM, Jerris R, Wang YF, et al. Prevalence of blaZ Gene Types and the Inoculum Effect with Cefazolin among Bloodstream Isolates of Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 23 juill 2012;56(8):4474-7.
14. Mostofsky E, Lipsitch M, Regev-Yochay G. Is methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* replacing methicillin-susceptible *S. aureus*? *J Antimicrob Chemother*. oct 2011;66(10):2199-214.
15. Institut Pasteur [Internet]. 2016 [cité 19 nov 2023]. Staphylocoque. Disponible sur: <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/staphylocoque>
16. Ben-Ami R, Giladi M, Carmeli Y, Orni-Wasserlauf R, Siegman-Igra Y. Hospital-acquired infective endocarditis: should the definition be broadened? *Clin Infect Dis*. 15 mars 2004;38(6):843-50.
17. Federspiel JJ, Stearns SC, Peppercorn AF, Chu VH, Fowler VG. Endocarditis Trends in the United States Demonstrate Increasing Rates of *Staphylococcus aureus*: 1999–2008. *Arch Intern Med*. 27 févr 2012;172(4):363-5.
18. Iung B, Baron G, Butchart EG, Delahaye F, Gohlke-Bärwolf C, Levang OW, et al. A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease. *Eur Heart J*. juill 2003;24(13):1231-43.
19. Slipczuk L, Codolosa JN, Davila CD, Romero-Corral A, Yun J, Pressman GS, et al. Infective endocarditis epidemiology over five decades: a systematic review. *PLoS One*.

2013;8(12):e82665.

20. Fowler VG, Miro JM, Hoen B, Cabell CH, Abrutyn E, Rubinstein E, et al. Staphylococcus aureus endocarditis: a consequence of medical progress. *JAMA*. 22 juin 2005;293(24):3012-21.

21. 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-Pro prospective Cohort Study. *Arch Intern Med*. 9 mars 2009;169(5):463-73.

22. Moreillon P, Que YA. Infective endocarditis. *The Lancet*. 10 janv 2004;363(9403):139-49.

23. Muhammad Zia Khan; Khan, Muhammad U; Moinuddin Syed; Balla, Sudarshan. Trends in Microbiology Data and Association With Mortality in Infective Endocarditis (2002-2017) [Internet]. [cité 31 mai 2024]. Disponible sur: <https://www.proquest.com/openview/eae49f2cc3c33a061c826ffdcc807713/1?pq-origsite=gscholar&cbl=41200>

24. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus. *J Clin Invest*. 1 mai 2003;111(9):1265-73.

25. Wang SK, Gilchrist A, Loukitcheva A, Plotkin BJ, Sagar IM, Gross AE, et al. Prevalence of a Cefazolin Inoculum Effect Associated with bla<sub>Z</sub> Gene Types among Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus Isolates from Four Major Medical Centers in Chicago. *Antimicrob Agents Chemother*. août 2018;62(8):e00382-18.

26. Quincampoix JC, Mainardi JL. Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif.

27. Voladri RK, Kernodle DS. Characterization of a chromosomal gene encoding type B beta-lactamase in phage group II isolates of Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother*. déc 1998;42(12):3163-8.

28. Zygmunt DJ, Stratton CW, Kernodle DS. Characterization of four beta-lactamases produced by Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother*. févr 1992;36(2):440-5.

29. Voladri RK, Tummuru MK, Kernodle DS. Structure-function relationships among wild-type variants of Staphylococcus aureus beta-lactamase: importance of amino acids 128 and 216. *J Bacteriol*. déc 1996;178(24):7248-53.

30. Richmond MH. Wild-type variants of exopenicillinase from *Staphylococcus aureus*. *Biochem J.* mars 1965;94(3):584-93.
31. Kernodle DS, McGraw PA, Stratton CW, Kaiser AB. Use of extracts versus whole-cell bacterial suspensions in the identification of *Staphylococcus aureus* beta-lactamase variants. *Antimicrob Agents Chemother.* mars 1990;34(3):420-5.
32. Habib G, Lancellotti P, Antunes MJ, Bongiorno MG, Casalta JP, 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.
33. Li J, Echevarria KL, Hughes DW, Cadena JA, Bowling JE, Lewis JS. Comparison of Cefazolin versus Oxacillin for Treatment of Complicated Bacteremia Caused by Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* sept 2014;58(9):5117-24.
34. Lecomte R, Bourreau A, Deschanvres C, Issa N, Le Turnier P, Gaborit B, et al. Comparative outcomes of cefazolin versus antistaphylococcal penicillins in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* infective endocarditis: a *post hoc* analysis of a prospective multicentre French cohort study. *Clinical Microbiology and Infection.* 1 juill 2021;27(7):1015-21.
35. Masson E. EM-Consulte. [cité 1 juin 2024]. (Cl)oxacilline *versus* céfazoline pour le traitement des endocardites infectieuses à *Staphylococcus aureus* sensibles à la méthicilline : une étude quasi-expérimentale. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/it/article/1383100/cloxacilline-versus-cefazoline-pour-le-traitement->
36. Youngster I, Shenoy ES, Hooper DC, Nelson SB. Comparative Evaluation of the Tolerability of Cefazolin and Nafcillin for Treatment of Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Infections in the Outpatient Setting. *Clinical Infectious Diseases.* 1 août 2014;59(3):369-75.
37. Flynt LK, Kenney RM, Zervos MJ, Davis SL. The Safety and Economic Impact of Cefazolin versus Nafcillin for the Treatment of Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections. *Infect Dis Ther.* 1 juin 2017;6(2):225-31.
38. Campbell PO, Chin PKL, Dalton SC, Metcalf SCL, Douglas NM, Chambers ST.

Frequency of pharmacological target attainment with flucloxacillin and cefazolin in invasive methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* infection: a prospective cohort study in hospitalized patients. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 1 janv 2023;61(1):106695.

39. Tilanus A, Drusano G. Optimizing the Use of Beta-Lactam Antibiotics in Clinical Practice: A Test of Time. *Open Forum Infectious Diseases*. 1 juill 2023;10(7):ofad305.

40. Tattevin P, Tribut O, Arvieux C, Dupont M, Flicoteaux R, Desbordes L, et al. Use of high-performance liquid chromatography (HPLC) to monitor  $\beta$ -lactam plasma concentrations during the treatment of endocarditis. *Clinical Microbiology and Infection*. 1 janv 2005;11(1):76-9.

41. Optimization of the treatment with beta-lactam antibiotics in critically ill patients—guidelines from the French Society of Pharmacology and Therapeutics (Société Française de Pharmacologie et Thérapeutique—SFPT) and the French Society of Anaesthesia and Intensive Care Medicine (Société Française d’Anesthésie et Réanimation—SFAR) - PMC [Internet]. [cité 9 sept 2024]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6441232/>

42. Delattre IK, Taccone FS, Jacobs F, Hites M, Dugernier T, Spapen H, et al. Optimizing  $\beta$ -lactams treatment in critically-ill patients using pharmacokinetics/pharmacodynamics targets: are first conventional doses effective? *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 3 juill 2017;15(7):677-88.

43. Réévaluation des pénicillines du groupe M administrées par voies orale et injectable : OXACILLINE ET CLOXACILLINE [Internet]. [cité 24 juill 2024]. Disponible sur: [https://archive.ansm.sante.fr/var/ansm\\_site/storage/original/application/a58417138c4caf9a5ea2913e90a239c5.pdf](https://archive.ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/a58417138c4caf9a5ea2913e90a239c5.pdf)

44. Roberts JA, Croom K, Adomakoh N. Continuous infusion of beta-lactam antibiotics: narrative review of systematic reviews, and implications for outpatient parenteral antibiotic therapy. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 3 avr 2023;21(4):375-85.

45. Bellouard R, Rambaud A, Delaunay C, Dailly É, Lecomte R, Deschanvres C, et al. Development and validation of a dosing nomogram for continuous infusion cloxacillin in infective endocarditis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 4 avr 2023;78(4):965-74.

46. Hughes DW, Frei CR, Maxwell PR, Green K, Patterson JE, Crawford GE, et al. Continuous versus Intermittent Infusion of Oxacillin for Treatment of Infective Endocarditis

Caused by Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* mai 2009;53(5):2014-9.

47. Selton-Suty C, Célard M, Le Moing V, Doco-Lecompte T, Chirouze C, lung B, et al. Preeminence of *Staphylococcus aureus* in Infective Endocarditis: A 1-Year Population-Based Survey. *Clinical Infectious Diseases.* 1 mai 2012;54(9):1230-9.

48. Taccone FS, Laterre PF, Dugernier T, Spapen H, Delattre I, Wittebole X, et al. Insufficient  $\beta$ -lactam concentrations in the early phase of severe sepsis and septic shock. *Crit Care.* 2010;14(4):R126.

49. Gonçalves-Pereira J, Póvoa P. Antibiotics in critically ill patients: a systematic review of the pharmacokinetics of  $\beta$ -lactams. *Crit Care.* 2011;15(5):R206.

50. Résumé des Caractéristiques du Produit [Internet]. [cité 24 juill 2024]. Disponible sur: <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0380774.htm>

51. Eagle H et al. The effect of the size of the inoculum and the age of the infection on the curative dose of penicillin in experimental infections with *Streptococci*, *Pneumococci* and *Treponma pallidum*. *J Exp Med.* 30 nov 1949;90(6):595-607.

52. Li J, Echevarria KL, Traugott KA.  $\beta$ -Lactam Therapy for Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia: A Comparative Review of Cefazolin versus Antistaphylococcal Penicillins. *Pharmacotherapy.* mars 2017;37(3):346-60.

53. Linton AH. INFLUENCE OF INOCULUM SIZE ON ANTIBIOTIC ASSAYS BY THE AGAR DIFFUSION TECHNIQUE WITH *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* AND *STREPTOMYCIN*. *J Bacteriol.* juill 1958;76(1):94-103.

54. Lenhard JR, Bulman ZP. Inoculum effect of  $\beta$ -lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother.* 1 oct 2019;74(10):2825-43.

55. Soriano F, Santamaría M, Ponte C, Castilla C, Fernández-Roblas R. In vivo significance of the inoculum effect of antibiotics on *Escherichia coli*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* juin 1988;7(3):410-2.

56. Chong YP, Park S -J., Kim ES, Bang KM, Kim MN, Kim SH, et al. Prevalence of blaZ gene types and the cefazolin inoculum effect among methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* blood isolates and their association with multilocus sequence types and clinical outcome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1 févr 2015;34(2):349-55.

57. Lee SH, Park WB, Lee S, Park S, Kim SW, Lee JM, et al. Association between Type A bla<sub>Z</sub> Gene Polymorphism and Cefazolin Inoculum Effect in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 21 oct 2016;60(11):6928-32.
58. Tsuji S, Gotoh K, Manabe T, Iio K, Fukushima S, Matsushita O, et al. Cefazolin inoculum effect in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 1 sept 2024;110(1):116399.
59. Singh KV, Tran TT, Nannini EC, Tam VH, Arias CA, Murray BE. Efficacy of Ceftaroline against Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Exhibiting the Cefazolin High-Inoculum Effect in a Rat Model of Endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother*. 27 juin 2017;61(7):e00324-17.
60. Fields MT, Herndon BL, Bamberger DM. beta-Lactamase-mediated inactivation and efficacy of cefazolin and cefmetazole in *Staphylococcus aureus* abscesses. *Antimicrob Agents Chemother*. févr 1993;37(2):203-6.
61. LeeShinwon, Tae K, KimHye-In, Ha C, LeeJong-Myung, Gyun C, et al. Clinical Implications of Cefazolin Inoculum Effect and  $\beta$ -Lactamase Type on Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Microbial Drug Resistance* [Internet]. 3 déc 2014 [cité 3 janv 2023]; Disponible sur: <https://www.liebertpub.com.proxy.insermbiblio.inist.fr/doi/10.1089/mdr.2013.0229>
62. Lee S, Song KH, Jung SI, Park WB, Lee SH, Kim YS, et al. Comparative outcomes of cefazolin versus nafcillin for methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a prospective multicentre cohort study in Korea. *Clinical Microbiology and Infection*. févr 2018;24(2):152-8.
63. Miller WR, Seas C, Carvajal LP, Diaz L, Echeverri AM, Ferro C, et al. The Cefazolin Inoculum Effect Is Associated With Increased Mortality in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Open Forum Infect Dis*. 23 mai 2018;5(6):ofy123.
64. L D Sabath. Effect of Inoculum and of Beta-Lactamase on the Anti-Staphylococcal Activity of Thirteen Penicillins and Cephalosporins [Internet]. [cité 15 juill 2024]. Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/epdf/10.1128/aac.8.3.344>
65. Udekwu KI, Parrish N, Ankomah P, Baquero F, Levin BR. Functional relationship between bacterial cell density and the efficacy of antibiotics. *J Antimicrob Chemother*. avr 2009;63(4):745-57.

66. LaPlante KL, Rybak MJ. Impact of High-Inoculum *Staphylococcus aureus* on the Activities of Nafcillin, Vancomycin, Linezolid, and Daptomycin, Alone and in Combination with Gentamicin, in an In Vitro Pharmacodynamic Model. *Antimicrob Agents Chemother.* déc 2004;48(12):4665-72.
67. George CRR, Lahra MM, Nguyen T, Gatus B. Disc Test for Detecting *Staphylococcus aureus* Strains Producing Type A and Type C  $\beta$ -Lactamases. *Microbiol Spectr.* 11(4):e00220-23.
68. Nannini EC, Stryjewski ME, Singh KV, Rude TH, Corey GR, Fowler VG, et al. Determination of an Inoculum Effect with Various Cephalosporins among Clinical Isolates of Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* mai 2010;54(5):2206-8.
69. Reymann MT, Holley HP, Cobbs CG. Persistent bacteremia in staphylococcal endocarditis. *The American Journal of Medicine.* 1 nov 1978;65(5):729-37.
70. Nannini EC, Singh KV, Arias CA, Murray BE. In Vivo Effects of Cefazolin, Daptomycin, and Nafcillin in Experimental Endocarditis with a Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Strain Showing an Inoculum Effect against Cefazolin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 16 août 2013;57(9):4276-81.
71. Chapman SW, Steigbigel RT. Staphylococcal beta-lactamase and efficacy of beta-lactam antibiotics: in vitro and in vivo evaluation. *J Infect Dis.* juin 1983;147(6):1078-89.
72. Song KH, Jung SI, Lee S, Park S, Kim ES, Park KH, et al. Inoculum effect of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* against broad-spectrum beta-lactam antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1 janv 2019;38(1):67-74.
73. Nannini EC, Singh KV, Murray BE. Relapse of Type A  $\beta$ -Lactamase–Producing *Staphylococcus aureus* Native Valve Endocarditis during Cefazolin Therapy: Revisiting the Issue.
74. Svishchuk J, Ebbert K, Waddell B, Izydorczyk C, Acosta N, Somayaji R, et al. Epidemiology and impact of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* with  $\beta$ -lactam antibiotic inoculum effects in adults with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 67(12):e00136-23.
75. Mossman AK, Svishchuk J, Waddell BJM, Izydorczyk CS, Buckley PT, Hilliard JJ, et al. *Staphylococcus aureus* in Non–Cystic Fibrosis Bronchiectasis: Prevalence and

Genomic Basis of High Inoculum  $\beta$ -Lactam Resistance. *Annals ATS*. août 2022;19(8):1285-93.

76. Dunman PM, Murphy E, Haney S, Palacios D, Tucker-Kellogg G, Wu S, et al. Transcription Profiling-Based Identification of *Staphylococcus aureus* Genes Regulated by the *agr* and/or *sarA* Loci. *Journal of Bacteriology*. 15 déc 2001;183(24):7341-53.

77. Williams P, Hill P, Bonev B, Chan WC. Quorum-sensing, intra- and inter-species competition in the staphylococci. *Microbiology (Reading)*. 14 août 2023;169(8):001381.

78. Sakoulas G, Eliopoulos GM, Moellering RC, Wennersten C, Venkataraman L, Novick RP, et al. Accessory Gene Regulator (*agr*) Locus in Geographically Diverse *Staphylococcus aureus* Isolates with Reduced Susceptibility to Vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother*. mai 2002;46(5):1492-502.

79. Traber K, Novick R. A slipped-mispairing mutation in *AgrA* of laboratory strains and clinical isolates results in delayed activation of *agr* and failure to translate  $\delta$ - and  $\alpha$ -haemolysins. *Molecular Microbiology*. 2006;59(5):1519-30.

80. Sakoulas G, Eliopoulos GM, Moellering RC, Wennersten C, Venkataraman L, Novick RP, et al. Accessory Gene Regulator (*agr*) Locus in Geographically Diverse *Staphylococcus aureus* Isolates with Reduced Susceptibility to Vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother*. mai 2002;46(5):1492-502.

81. Novick RP, Muir TW. Virulence gene regulation by peptides in staphylococci and other Gram-positive bacteria. *Current Opinion in Microbiology*. 1 févr 1999;2(1):40-5.

82. Wang B, Muir TW. Regulation of Virulence in *Staphylococcus aureus* : Molecular Mechanisms and Remaining Puzzles. *Cell Chemical Biology*. févr 2016;23(2):214-24.

83. Villaruz AE, Wardenburg JB, Khan BA, Whitney AR, Sturdevant DE, Gardner DJ, et al. A point mutation in the *agr* locus rather than expression of the Panton-Valentine leukocidin caused previously reported phenotypes in *Staphylococcus aureus* pneumonia and gene regulation. *J Infect Dis*. 1 sept 2009;200(5):724-34.

84. Jarraud S, Lyon GJ, Figueiredo AMS, Gérard L, Vandenesch F, Etienne J, et al. Exfoliatin-Producing Strains Define a Fourth *agr* Specificity Group in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. nov 2000;182(22):6517-22.

85. Jarraud S, Mougél C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* Genetic Background, Virulence Factors,

- agr Groups (Alleles), and Human Disease. *Infection and Immunity*. févr 2002;70(2):631-41.
86. Fowler, Jr. VG, Sakoulas G, McIntyre LM, Meka VG, Arbeit RD, Cabell CH, et al. Persistent Bacteremia Due to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection Is Associated with agr Dysfunction and Low-Level In Vitro Resistance to Thrombin-Induced Platelet Microbicidal Protein. *J INFECT DIS*. 15 sept 2004;190(6):1140-9.
87. Rossato AM, Primon-Barros M, Dias CAG, d'Azevedo PA. Vancomycin MIC and agr dysfunction in invasive MRSA infections in southern Brazil. *Braz J Microbiol*. 19 oct 2020;51(4):1819-23.
88. Viedma E, Sanz F, Orellana MA, San Juan R, Aguado JM, Otero JR, et al. Relationship between agr dysfunction and reduced vancomycin susceptibility in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* causing bacteraemia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. janv 2014;69(1):51-8.
89. Sakoulas G, Eliopoulos GM, Fowler VG, Moellering RC, Novick RP, Lucindo N, et al. Reduced Susceptibility of *Staphylococcus aureus* to Vancomycin and Platelet Microbicidal Protein Correlates with Defective Autolysis and Loss of Accessory Gene Regulator (agr) Function. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. juill 2005;49(7):2687-92.
90. National Institute of Health. Research on microbial biofilms [Internet]. [cité 14 sept 2024]. Disponible sur: <https://grants.nih.gov/grants/guide/pa-files/pa-03-047.html>
91. Römling U, Balsalobre C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *J Intern Med*. déc 2012;272(6):541-61.
92. Cruz CD, Shah S, Tammela P. Defining conditions for biofilm inhibition and eradication assays for Gram-positive clinical reference strains. *BMC Microbiology*. 3 nov 2018;18(1):173.
93. 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.
94. Mah TFC, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*. 1 janv 2001;9(1):34-9.
95. Le KY, Otto M. Quorum-sensing regulation in staphylococci—an overview. *Front Microbiol* [Internet]. 27 oct 2015 [cité 5 août 2024];6. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2015.01174/full>

96. Kong KF, Vuong C, Otto M. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *International Journal of Medical Microbiology*. 6 avr 2006;296(2):133-9.
97. Boles BR, Horswill AR. agr-Mediated Dispersal of *Staphylococcus aureus* Biofilms. *PLoS Pathog*. 25 avr 2008;4(4):e1000052.
98. A Review of Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus* and Its Regulation Mechanism - PMC [Internet]. [cité 20 août 2024]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9854888/>
99. Yarwood JM, Bartels DJ, Volper EM, Greenberg EP. Quorum Sensing in *Staphylococcus aureus* Biofilms. *J Bacteriol*. mars 2004;186(6):1838-50.
100. Vuong C, Saenz HL, Götz F, Otto M. Impact of the agr Quorum-Sensing System on Adherence to Polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Infectious Diseases*. 1 déc 2000;182(6):1688-93.
101. Periasamy S, Joo HS, Duong AC, Bach THL, Tan VY, Chatterjee SS, et al. How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 24 janv 2012;109(4):1281-6.
102. Mathur et al. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci : an evaluation of three different screening methods [Internet]. 2006 [cité 20 août 2024]. Disponible sur: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S025508572102466X?fr=RR-9&ref=pdf\\_download&rr=8b630affdf974c67](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S025508572102466X?fr=RR-9&ref=pdf_download&rr=8b630affdf974c67)
103. Katrin Schilcher. *Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies* [Internet]. [cité 5 août 2024]. Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/membr.00026-19>
104. Sibabrata Bhattacharya, Raunak Bir, Tapan Majumdar. Evaluation of Multidrug Resistant *Staphylococcus aureus* and their Association with Biofilm Production in a Tertiary Care Hospital, Tripura, Northeast India - PMC [Internet]. 2015 [cité 5 août 2024]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4606231/>
105. Kwon AS, Park GC, Ryu SY, Lim DH, Lim DY, Choi CH, et al. Higher biofilm formation in multidrug-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 1 juill 2008;32(1):68-72.
106. Smith K, Perez A, Ramage G, Lappin D, Gemmell CG, Lang S. Biofilm formation

by Scottish clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*. 1 août 2008;57(8):1018-23.

107. Sanchez CJ, Mende K, Beckius ML, Akers KS, Romano DR, Wenke JC, et al. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC Infect Dis*. 29 janv 2013;13(1):47.

108. Guembe M, Alonso B, Lucio J, Pérez-Granda MJ, Cruces R, Sánchez-Carrillo C, et al. Biofilm production is not associated with poor clinical outcome in 485 patients with *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Clinical Microbiology and Infection*. 1 juin 2018;24(6):659.e1-659.e3.

109. Barsoumian AE, Mende K, Sanchez CJ, Beckius ML, Wenke JC, Murray CK, et al. Clinical infectious outcomes associated with biofilm-related bacterial infections: a retrospective chart review. *BMC Infect Dis*. 7 juin 2015;15(1):223.

110. Schweizer ML, Furuno JP, Sakoulas G, Johnson JK, Harris AD, Shardell MD, et al. Increased Mortality with Accessory Gene Regulator (*agr*) Dysfunction in *Staphylococcus aureus* among Bacteremic Patients. *Antimicrob Agents Chemother*. mars 2011;55(3):1082-7.

111. Park SY, Chong YP, Park HJ, Park KH, Moon SM, Jeong JY, et al. *agr* dysfunction and persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia in patients with removed eradicable foci. *Infection*. 1 févr 2013;41(1):111-9.

112. Lee JE, Lee S, Park S, Lee SO, Lee SH. Impact of *agr* Functionality on the Outcome of Patients with Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Microbiol Spectr*. 9(1):10.1128/spectrum.00116-21.

113. Gagnaire J, Dauwalder O, Boisset S, Khau D, Freydière AM, Ader F, et al. Detection of *Staphylococcus aureus* Delta-Toxin Production by Whole-Cell MALDI-TOF Mass Spectrometry. *PLoS One*. 6 juill 2012;7(7):e40660.

114. Wi YM, Park YK, Moon C, Ryu SY, Lee H, Ki HK, et al. The cefazolin inoculum effect in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* blood isolates: their association with dysfunctional accessory gene regulator (*agr*). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 1 nov 2015;83(3):286-91.

115. Lee SO, Lee S, Park S, Lee JE, Lee SH. The Cefazolin Inoculum Effect and the Presence of type A *blaZ* Gene according to *agr* Genotype in Methicillin-Susceptible

- Staphylococcus aureus Bacteremia. Infect Chemother. déc 2019;51(4):376-85.
116. Kwiecinski JM, Jacobsson G, Horswill AR, Josefsson E, Jin T. Biofilm formation by Staphylococcus aureus clinical isolates correlates with the infection type. Infect Dis (Lond). juin 2019;51(6):446-51.
117. Croes S, Deurenberg RH, Boumans MLL, Beisser PS, Neef C, Stobberingh EE. Staphylococcus aureus biofilm formation at the physiologic glucose concentration depends on the S. aureus lineage. BMC Microbiol. 28 oct 2009;9:229.
118. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. J Clin Microbiol. déc 1985;22(6):996-1006.
119. Merritt JH, Kadouri DE, O'Toole GA. Growing and Analyzing Static Biofilms. Curr Protoc Microbiol. juill 2005;0 1:Unit-1B.1.
120. Ferreira FA, Souza RR, Bonelli RR, Américo MA, Fracalanza SEL, Figueiredo AMS. Comparison of in vitro and in vivo systems to study *ica*-independent *Staphylococcus aureus* biofilms. Journal of Microbiological Methods. 1 mars 2012;88(3):393-8.
121. Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, Glasebrook AL. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. Journal of Immunological Methods. 13 sept 1991;142(2):257-65.
122. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. Journal of Microbiological Methods. 1 févr 2008;72(2):157-65.
123. Alonso B, Lucio J, Pérez-Granda MJ, Cruces R, Sánchez-Carrillo C, Bouza E, et al. Does biomass production correlate with metabolic activity in *Staphylococcus aureus*? Journal of Microbiological Methods. 1 déc 2016;131:110-2.
124. Zmantar T, Kouidhi B, Miladi H, Mahdouani K, Bakhrouf A. A Microtiter plate assay for Staphylococcus aureus biofilm quantification at various pH levels and hydrogen peroxide supplementation.
125. Hamadi. Effect of pH on distribution and adhesion of Staphylococcus aureus to glass: Journal of Adhesion Science and Technology: Vol 19, No 1 [Internet]. 2012 [cité 15 sept 2024]. Disponible sur:

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1163/1568561053066891>

126. Singh AK, Prakash P, Achra A, Singh GP, Das A, Singh RK. Standardization and Classification of In vitro Biofilm Formation by Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Glob Infect Dis*. 2017;9(3):93-101.
127. Stepanović S, Vuković D, Ježek P, Pavlović M, Švabic-Vlahović M. Influence of Dynamic Conditions on Biofilm Formation by Staphylococci. *EJCMID*. 1 juill 2001;20(7):502-4.
128. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*. août 2003;9(8):ix-xv.
129. CASFM2024\_V1.0.pdf [Internet]. [cité 5 août 2024]. Disponible sur: [https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2024/06/CASFM2024\\_V1.0.pdf](https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2024/06/CASFM2024_V1.0.pdf)
130. Cheung GYC, Duong AC, Otto M. Direct and synergistic hemolysis caused by *Staphylococcus* phenol-soluble modulins: implications for diagnosis and pathogenesis. *Microbes and Infection*. 1 avr 2012;14(4):380-6.
131. Christie K, Atkins N, Munch-Petersen E. A Note on a Lytic Phenomenon Shown by Group B Streptococci. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*. 1944;22(3):197-200.
132. Lade H, Park JH, Chung SH, Kim IH, Kim JM, Joo HS, et al. Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates is Differentially Affected by Glucose and Sodium Chloride Supplemented Culture Media. *J Clin Med*. 2 nov 2019;8(11):1853.
133. Cohen S, Sweeney HM. Constitutive Penicillinase Formation in *Staphylococcus aureus* Owing to a Mutation Unlinked to the Penicillinase Plasmid. *J Bacteriol*. avr 1968;95(4):1368-74.
134. Lenhard JR, Bulman ZP. Inoculum effect of  $\beta$ -lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother*. oct 2019;74(10):2825-43.
135. Stevens et al. Penicillin-Binding Protein Expression at Different Growth Stages Determines Penicillin Efficacy In Vitro and In Vivo: An Explanation for the Inoculum Effect | *The Journal of Infectious Diseases* | Oxford Academic [Internet]. 1993 [cité 23 août 2024]. Disponible sur: <https://academic.oup.com/jid/article-abstract/167/6/1401/953918?redirectedFrom=fulltext&login=false>
136. Mendelman PM, Chaffin DO. Two penicillin binding proteins of *Haemophilus*

*influenzae* are lost after cells enter stationary phase. FEMS Microbiology Letters. déc 1985;30(3):399-402.

137. Kwiecinski J, Kahlmeter G, Jin T. Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus* Isolates from Skin and Soft Tissue Infections. Curr Microbiol. 1 mai 2015;70(5):698-703.

138. Pantanella F, Valenti P, Natalizi T, Passeri D, Berlutti F. Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use.

139. Chen L, Shopsin B, Zhao Y, Smyth D, Wasserman GA, Fang C, et al. Real-time nucleic acid sequence-based amplification assay for rapid detection and quantification of *agr* functionality in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. J Clin Microbiol. mars 2012;50(3):657-61.

140. Otto M, Götz F. Analysis of Quorum Sensing Activity in Staphylococci by RPHPLC of Staphylococcal  $\delta$ -Toxin. BioTechniques. 1 juin 2000;28(6):1088-96.

141. Pereira LA, Harnett GB, Hodge MM, Cattell JA, Speers DJ. Real-Time PCR Assay for Detection of *bla<sub>Z</sub>* Genes in *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates. J Clin Microbiol. avr 2014;52(4):1259-61.

142. Carvajal LP, Rincon S, Echeverri AM, Porrás J, Rios R, Ordoñez KM, et al. Novel Insights into the Classification of Staphylococcal  $\beta$ -Lactamases in Relation to the Cefazolin Inoculum Effect. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 21 avr 2020;64(5):e02511-19.

143. Rincon S, Carvajal LP, Gomez-Villegas SI, Echeverri AM, Rios R, Dinh A, et al. A Test for the Rapid Detection of the Cefazolin Inoculum Effect in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*. Journal of Clinical Microbiology. 19 mars 2021;59(4):e01938-20.

144. Miller WR, Singh KV, Arias CA, Murray BE. Adjunctive Clavulanic Acid Abolishes the Cefazolin Inoculum Effect in an Experimental Rat Model of Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* Endocarditis. Antimicrob Agents Chemother. 24 oct 2018;62(11):e01158-18.

145. Traber KE, Lee E, Benson S, Corrigan R, Cantera M, Shopsin B, et al. *agr* function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. Microbiology (Reading, England). août 2008;154(Pt 8):2265.

146. Schwartz FA, Christophersen L, Laulund AS, Lundquist R, Lerche C, Rude Nielsen P, et al. Novel human in vitro vegetation simulation model for infective endocarditis.

APMIS. 2021;129(11):653-62.

147. Schwartz FA, Nielsen L, Struve Andersen J, Bock M, Christophersen L, Sunnerhagen T, et al. Dynamics of a *Staphylococcus aureus* infective endocarditis simulation model. APMIS. août 2022;130(8):515-23.

# Annexe :

## Article soumis à JAMA Network Open

1 **Beta-lactam inoculum effect and clinical outcome in patients with methicillin-susceptible**  
2 ***Staphylococcus aureus* infective endocarditis**

3  
4 Baptiste Jean, MD<sup>a</sup>, Maelys Crolle, PharmD<sup>b\*</sup>, Candice Pollani<sup>b\*</sup>, Adèle Le Guilloux<sup>c</sup>, Guillaume  
5 Martin-Blondel, PhD<sup>a,d</sup>, Pierre Tattevin, PhD<sup>e</sup>, Audrey Le Bot, MD<sup>f</sup>, David Luque Paz, MD<sup>e</sup>, François  
6 Guérin, PhD<sup>g</sup>, Vincent Cattoir, PhD<sup>g</sup>, Laurence Armand-Lefevre, PhD<sup>h</sup>, Signara Gueye<sup>h</sup>, François-Xavier  
7 Lescure, PhD<sup>i</sup>, Xavier Duval, PhD<sup>j</sup>, Clémence Massip, PhD<sup>b</sup>, Pierre Delobel, PhD<sup>a,d</sup>

8  
9 <sup>a</sup> Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, *CHU de Toulouse, Université Paul Sabatier Toulouse*  
10 *III, France*

11 <sup>b</sup> Laboratoire de Bactériologie-Hygiène, *CHU de Toulouse, Université Paul Sabatier Toulouse III,*  
12 *France*

13 <sup>c</sup> Unité Méthodologie, Data Management, Analyses Statistiques, *Centre d'Investigation Clinique 1436,*  
14 *Service de pharmacologie médicale, CHU de Toulouse, France*

15 <sup>d</sup> *Institut Toulousain des Maladies Infectieuses et Inflammatoires (Infinity) INSERM UMR1291 - CNRS*  
16 *UMR5051 - Université Toulouse III*

17 <sup>e</sup> Service des Maladies Infectieuses et Réanimation Médicale, *CHU de Rennes, Université de Rennes,*  
18 *France*

19 <sup>f</sup> Service des Maladies Infectieuses et Réanimation Médicale, *CHU de Rennes, France*

20 <sup>g</sup> Service de Bactériologie et Hygiène Hospitalière, *CHU Rennes, France*

21 <sup>h</sup> Laboratoire de Bactériologie, *Hôpital Bichat-Claude Bernard, AP-HP, Université Paris Cité, IAME,*  
22 *INSERM UMR 1137, Paris, France*

23 <sup>i</sup> Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, *CHU Bichat, Université Paris Cité, IAME, INSERM*  
24 *UMR 1137, Paris, France*

25 <sup>j</sup> Centre d'Investigation Clinique, *AP-HP, Hôpital Bichat, INSERM CIC 1425, Université Paris Cité, IAME,*  
26 *INSERM, Paris, France*

27 *\*contributed equally*

28  
29 Correspondence to: Prof. P. Delobel. INSERM UMR1291, Toulouse, F-31300, France. Tel: +33 5 61 77  
30 75 08; fax: +33 5 61 77 21 38; e-mail: [delobel.p@chu-toulouse.fr](mailto:delobel.p@chu-toulouse.fr)

31 ORCID: 0000-0002-2874-3581

32

33 Article word count:3289

34 Abstract word count: 350

35 **Key points**

36 **Question:** Is the clinical outcome of methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) infective endocarditis  
37 dependent on some underappreciated phenotypic characteristics of the bacterial strains and the  $\beta$ -  
38 lactam used?

39 **Findings:** In this case series, first-month mortality in infective left-sided endocarditis due to MSSA  
40 strains appears to be independently associated with the presence of *blaZ* and an inoculum effect,  
41 and this may account for some differences in efficacy between anti-staphylococcal penicillin and  
42 cefazolin.

43 **Meaning:** Characterizing the presence of *blaZ* and an inoculum effect may therefore help to select  
44 the best treatment for MSSA infective endocarditis and improve clinical outcomes.

45

46 **Abstract**

47

48 **Importance:** Infective endocarditis (IE) caused by *Staphylococcus aureus* is associated with high  
49 mortality, approximately 20-30%, mostly in the first month, with no improvement in recent decades.  
50 Current opinion is that anti-staphylococcal penicillin and cefazolin are equally effective in treating  
51 methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) IE, and both are recommended as possible first-line  
52 treatments. The majority of MSSA strains carry the  $\beta$ -lactamase *blaZ* gene and some *blaZ*-positive  
53 strains exhibit an inoculum effect, i.e., increased minimum inhibitory concentrations at high  
54 inoculum. This reduced susceptibility to an antibiotic at high bacterial inoculum may be particularly  
55 relevant in IE, where vegetations have very high bacterial densities.

56 **Objective:** To evaluate the association between phenotypic characteristics of *S. aureus* isolates,  $\beta$ -  
57 lactam used, and outcome in patients with MSSA IE.

58 **Exposure:** Retrospective identification of all MSSA IE cases treated in three French university  
59 hospitals between 2016 and 2022. *S. aureus* IE cases, involving native or prosthetic valves, for which  
60 bacterial strains were available were included.

61 **Main outcomes and measures:** MSSA isolates were tested for the presence of *blaZ* and for inoculum  
62 effects to cefazolin and oxacillin. The relationship between first month mortality and the  $\beta$ -lactam  
63 used, the presence of *blaZ* and the presence of an inoculum effect to the treatment received was  
64 evaluated.

65 **Results:** We included 216 patients with MSSA IE, median age 65 years, 70% male, treated with  
66 antistaphylococcal penicillin (64%) or cefazolin (36%). One-month mortality of left-sided IE was  
67 24.4%, with no overall difference between patients treated with antistaphylococcal penicillin or  
68 cefazolin. However, one-month mortality was higher in patients infected with *blaZ*-positive strains  
69 than with *blaZ*-negative strains (29.5% vs. 11.8%,  $P=0.01$ ), and with strains with an inoculum effect to  
70 the  $\beta$ -lactam received than with strains without an inoculum effect (40.3% vs. 19.4%;  $P=0.005$ ). On  
71 multivariable analysis, the presence of an inoculum effect was independently associated with first  
72 month mortality (HR 2.84 [1.28-6.30],  $P=0.01$ ).

73 **Conclusions and relevance:** In this case series of MSSA IE, the presence of an inoculum effect to the  
74  $\beta$ -lactam received was a risk factor for death in the first month. Phenotyping MSSA isolates for  
75 inoculum effect may guide  $\beta$ -lactam choice and improve outcomes.

76 **Introduction**

77 Infective endocarditis (IE) caused by *Staphylococcus aureus* is associated with high mortality,  
78 estimated at 20% to 30% within 6 months. This mortality rate has remained stable since the 1980s.<sup>1</sup>  
79 In Europe, methicillin resistance has decreased significantly over the past two decades, and most IEs  
80 are now caused by methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA). The 2023 European Society of Cardiology  
81 recommendations suggest cefazolin (CFZ) or antistaphylococcal penicillins (ASP) as first-line  
82 treatment.<sup>2</sup>

83 The majority of clinical *S. aureus* isolates carry the *blaZ* gene encoding a class-A  $\beta$ -lactamase  
84 (penicillinase). Four types of BlaZ  $\beta$ -lactamases (from A to D) have been characterized on the basis of  
85 substrate specificity and amino acid sequence.<sup>3,4</sup> Some *blaZ*-positive *S. aureus* strains exhibit an  
86 inoculum effect (InE), i.e. increased minimum inhibitory concentrations (MICs) at high inoculum,  
87 which may be clinically relevant in IE due to the high inoculum in vegetations.<sup>5</sup> Despite the  
88 description of an InE to CFZ, the overall efficacy of CFZ has been found to be similar to that of ASP in  
89 several cohorts of MSSA IE.<sup>6-8</sup> More recently, an InE to oxacillin (OXA) has also been described, but its  
90 clinical impact remains unknown.<sup>9</sup>

91

92 The aims of this study are i) to investigate the characteristics of MSSA isolates responsible for IE, in  
93 particular the presence of *blaZ*, CFZ InE and OXA InE; ii) to analyze the association between these  
94 characteristics and the occurrence of death within one month of follow-up.

95

96 **Methods**

97 **Study design**

98 This retrospective, multicenter study included patients with MSSA IE between February 2016 and  
99 February 2022 at three French university hospitals located in three different regions, each with a  
100 cardiac surgery department (Paris-Bichat; Rennes; Toulouse). Patients were identified by cross-  
101 referencing data from the « Programme de Médicalisation des Systèmes d'Information » (PMSI),  
102 coded as "endocarditis" with the list of blood cultures positive for *Staphylococcus aureus*. For one  
103 center, patients were identified from a previously established cohort.

104 This study conforms to the STROBE checklist for case series.

105

106 **Inclusion and exclusion criteria**

107 Only patients with definite or possible *S. aureus* infective endocarditis according to the Duke 2015  
108 criteria, involving native or prosthetic valves and for whom clinical isolates were available were

109 included. Exclusion criteria for the analysis were IE on cardiac implantable electronic devices (CIED),  
110 vascular prosthesis infection, polymicrobial IE, methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) IE, and patients  
111 who either did not receive  $\beta$ -lactam, or were treated for less than 72 hours with any of the  $\beta$ -lactam  
112 agents of interest (ASP and CFZ) or whose targeted treatment with ASP or CFZ was initiated after 120  
113 hours.

#### 114 **Ethics statement**

115 The project has been registered with the French National Commission for Information and Freedom  
116 (*Commission Nationale de l'Information et des Libertés*) (MR005 declaration: 2206725 v 0) and  
117 approved by the French Committee on Ethics in Research on Infectious and Tropical Diseases (*Comité*  
118 *d'Éthique de Recherche en Maladies Infectieuses et Tropicales*, CER-MIT n° 2023-0703). In accordance  
119 with French regulations for retrospective non-interventional studies, living participants were invited  
120 by letter to express any refusal to have their medical data included in the study. All data were  
121 anonymized.

#### 122 **Data collection**

123 Data were collected from electronic medical records using a standardized questionnaire, and  
124 bacteriological data were extracted from each center's electronic laboratory record. Some variables  
125 used to calculate the SOFA score were scored as 0 in the absence of data in the patient's electronic  
126 medical record (e.g. absence of P/F data because arterial gasometry was not performed). The SOFA  
127 score was not calculated for patients who were transferred to one of the recruiting centers more  
128 than 72 hours after initiation of the  $\beta$ -lactam of interest.

129

#### 130 **Determination of *blaZ* type**

131 All bacterial strains were centralized in the laboratory of the University Hospital of Toulouse for  
132 determination of *blaZ* type and inoculum effect testing. Bacterial DNA from each strain was extracted  
133 from colonies obtained after overnight incubation on Columbia blood agar (COS; Becton Dickinson,  
134 France) at  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . DNA extraction was performed using enzymatic (mutanolysin) and thermal lysis  
135 methods. As previously described<sup>10</sup>, a 355-bp region of the *blaZ* gene was amplified and sequenced  
136 using the following primers: CAAAGATGATATAGTTGCTTATTC and CATATGTTATTGCTTGACCCAC.  
137 Sequence analysis was performed using SnapGene 6.0 software. The  $\beta$ -lactamase type was  
138 determined based on the amino acids at positions 128 and 216 encoded by the *blaZ* gene.<sup>3</sup> *S. aureus*  
139 ATCC 29213 (a low activity type A  $\beta$ -lactamase producer) and *S. aureus* ATCC 25923 (a  $\beta$ -lactamase  
140 negative strain) were used as positive and negative controls, respectively. Phylogenetic analysis was

141 performed by aligning the sequences of the PCR products using MAFFT (v7.505). The maximum  
142 likelihood tree was then constructed with IQ-TREE (v2.0.3)<sup>11</sup>, using the HKY+F evolutionary model  
143 (ModelFinder)<sup>12</sup> and the ultrafast bootstrap (UFBoot2)<sup>13</sup> for branch support.

#### 144 **Inoculum effect testing**

145 Bacterial identification was confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry (MALDI Biotyper, Bruker).  
146 Cefazolin and oxacillin MICs were determined for *blaZ*-positive strains by the broth microdilution  
147 reference method according to EUCAST recommendations, with the following exceptions: MICs were  
148 determined using standard ( $2.10^5$  CFU/ml) and high ( $2.10^7$  CFU/ml) inocula. As recommended, NaCl  
149 (2% w/v) was added in the cation-adjusted Muller Hinton broth for oxacillin testing. The *S. aureus*  
150 ATCC 29213 reference strain was used as a control. All MICs were determined in duplicate and read  
151 by two observers blinded to the type of *blaZ*. If there was a single dilution discrepancy between the  
152 two independent MIC determinations, a triplicate was performed. Replicates never differed by more  
153 than twofold. InE was defined as a fourfold increase in MIC between standard and high inoculum.<sup>14</sup>

#### 154 **Statistical analysis**

155 Descriptive statistics were presented using numbers (%) for categorical variables and medians with  
156 interquartile range [IQR] for quantitative variables. The Chi<sup>2</sup> test was used to compare the  
157 distribution of the genotypic characteristics of *blaZ* (absence, A, B, C) between the 3 centers (Paris-  
158 Bichat; Rennes; Toulouse) and to test associations between *blaZ* (presence and type) and inoculum  
159 effect to cefazolin and ASP.

160 Survival analysis was performed with the primary endpoint being the occurrence of death in the first  
161 month: event was the death (all causes) and delay was the time between the start of antibiotic  
162 treatment (including probabilistic treatment before targeting to cefazolin or ASP) and the death or  
163 the censoring (day 30). Survival curves were plotted using the Kaplan-Meier method and compared  
164 by treatment using the log-rank test. The same methods were used to compare the survival curves  
165 between *blaZ* (presence and type) and the survival curves between inoculum effect to cefazolin and  
166 oxacillin.

167 Univariable and multivariable Cox regression models were constructed to identify factors associated  
168 with the occurrence of death in the first month after the start of antibiotic treatment. Potential  
169 factors were: Charlson comorbidity index (total quantitative score), age (years), history of stroke and  
170 transient ischemic attack (presence/absence), pulmonary pathology (presence/absence), diabetes  
171 (presence/absence), chronic renal failure (presence/absence), SOFA score (total quantitative score),  
172 surgery within the first 15 days (yes/no), vegetation size (mm), perforation or regurgitation (yes/no);

173 inoculum effect (presence of InE/absence of *blaZ* or InE). Each model (univariable and multivariable)  
174 was adjusted for  $\beta$ -lactam treatment received. First, each factor was tested in a univariable model.  
175 Second, a complete multivariable model was constructed. The variable “surgery within the first 15  
176 days”, previously identified in the literature as a protective factor, was included in the multivariable  
177 model, although it was not significantly associated with mortality in the univariate analysis. Finally,  
178 factors with a P value of less than 20% were included to obtain a final multivariable model using the  
179 stepwise selection method. The proportional hazards assumption was tested by plotting Schoenfeld  
180 residuals against event times for each of the factors in each model. Sensitivity analyses were also  
181 performed: one with adjustment for clinical center instead of  $\beta$ -lactam treatment and the other by  
182 replacing the Charlson comorbidity index (total quantitative score) with the variables included in it  
183 (age, history of stroke and transient ischemic attack, pulmonary pathology, diabetes, chronic kidney  
184 failure). Because of the lower mortality in patients with right-sided infective endocarditis (2.8% in  
185 right-sided vs. 24.4% in left-sided IE), all survival analyses were performed only in patients with left-  
186 sided IE (n=180), and Cox regression models were restricted to subjects with complete data for the  
187 variables analyzed (n=122), rather than imputing values for missing data.  
188 The  $\alpha$ -risk was set at 5%. All tests were 2-sided. All analyses were performed using R statistical  
189 software (v4.3.1; R Core Team 2021).

190

## 191 **Results**

### 192 **Population description**

193 We identified 245 patients with possible or definite MSSA IE treated between February 2016 and  
194 February 2022 at the participating sites, for whom *S. aureus* strains were still available in the  
195 bacteriology laboratory. Of these, 28 patients were subsequently excluded for the following reasons:  
196 IE on CIED (n=14), polymicrobial IE (n=6), final diagnosis of methicillin-resistant *S. aureus* IE (n=2),  
197 MSSA IE cases not receiving or receiving too late the  $\beta$ -lactam of interest (n=7). A total of 216  
198 patients were therefore selected for the descriptive analysis (Figure 1).

199 The median age of the patients was 65 years [49-73]. The male to female sex ratio was 2.4 (152/64).  
200 Patients had a median Charlson comorbidity index of 3 [1-6]. Intravenous drug use was observed in  
201 14.8% of patients. The median SOFA score at baseline was 4 [2-7]. According to the Duke 2015  
202 criteria, 90.3% of episodes met the definition of a definite IE, while 9.7% met the definition of a  
203 possible IE. Most episodes of IE were due to aortic involvement (35.2%), followed by mitral (27.8%)  
204 and tricuspid (16.6%) involvement, while 12.5% of episodes were polyvalvular IE. Three quarters of  
205 the episodes occurred on native valves, and one quarter on prosthetic valves. Vegetation size was

206 reported in 76.9% of cases, with a median size of 13 mm [8-20]. Mortality rates were 14.8% (32/216)  
207 at day 15 and 20.8% (45/216) at day 30. Regarding initial treatment, 35.6% of the cohort received  
208 CFZ, while 64.4% received ASP. The *blaZ* gene was carried by 73.6% (159/216) of the strains, and *blaZ*  
209 types A and B were equally represented, each accounting for 26.4% of the strains, while type C  
210 accounted for 20.4% of the strains. Only one strain carried *blaZ* type D (Table1). There was no  
211 difference observed in the distribution of *blaZ* types between the three centers ( $P=0.47$ ,  $\text{Chi}^2$  test)  
212 (eFigure 1 in the Supplement).

213

214 OXA InE was observed in 51.6% (82/159) of *blaZ*-positive strains, and 3.1% (5/159) of strains had an  
215 oxacillin MIC greater than 2 mg/L at high inoculum. CFZ InE was observed in 25.8 % (41/159) of the  
216 *blaZ*-positive strains. However, none of the strains were classified as resistant to CFZ at high  
217 inoculum, *i.e.* all the MICs were below the EUCAST breakpoint of 16 mg/L. 21.4% of the *blaZ*-positive  
218 strains had both OXA and CFZ InE, 30.2% had OXA InE but not CFZ InE, 4.4% had CFZ InE but not OXA  
219 InE, and 44.0% had neither ( $P<0.001$ ,  $\text{Chi}^2$  test). OXA InE was associated with *blaZ* types A and C  
220 (57.9% and 77.2% of *blaZ* A and C strains, respectively), compared to only 26.3% of *blaZ* type B  
221 ( $P<0.001$ ,  $\text{Chi}^2$  test). CFZ InE was associated with *blaZ* type A (52.6% of *blaZ* A strains), compared to  
222 8.8% and 13.6% for types B and C respectively ( $P<0.001$ ,  $\text{Chi}^2$  test). Most *blaZ* type A strains with CFZ  
223 InE had sequence similarities for the 355 bp examined (Figure 2).

224

#### 225 **Association between phenotypic characteristics of *blaZ*-positive strains and treatment outcome in** 226 **left-sided IE**

227 Because of the low mortality in the right-sided infective endocarditis group (2.8%, 1/36), our survival  
228 analyses focused on left-sided infective endocarditis (24.4% mortality, 44/180). One-month mortality  
229 in the CFZ group was 27.4% (17/62) compared with 22.9% (27/118) in the ASP group, a nonsignificant  
230 difference ( $P=0.56$ , log-rank test, Figure 3A). In contrast, one-month mortality in the *blaZ*-positive  
231 group was 29.5% (38/129) compared with 11.8% (6/51) in the *blaZ*-negative group, regardless of  
232 which beta-lactam they received ( $P=0.01$ , log-rank test). The difference in survival occurred mostly  
233 within the first 15 days of treatment, with a mortality rate of 5.9% (3/51) in the *blaZ*-negative group  
234 versus 21.7% (28/129) in the *blaZ*-positive group, reflecting a difference of 15.8% at day 15 and  
235 17.7% at day 30 (Figure 3B). Among patients infected with *blaZ*-positive strains, there was no  
236 significant difference in the occurrence of death in the first month according to *blaZ* type ( $P=0.22$ ,  
237 log-rank test, eFigure 2 in the Supplement).

238 We then examined whether the presence of an InE to the treatment received was associated with  
239 the occurrence of death in the first month in the *blaZ*-positive group. One-month mortality was

240 40.3% (25/62) in the group with InE-positive strains to the  $\beta$ -lactam received compared with 19.4%  
241 (13/67) in the group with InE-negative strains ( $P=0.005$ , log-rank test, Figure 3C). Mortality in the InE-  
242 negative group was similar to that in the *blaZ*-negative group (19.4% vs. 11.8%,  $P=0.25$ , log-rank  
243 test).

244 The occurrence of death in the first month was also examined according to CFZ and ASP subgroups:  
245 among patients infected with a *blaZ*-positive strain and treated with CFZ, there was a significant  
246 difference in one-month mortality between patients infected with CFZ InE-positive strains vs. CFZ  
247 InE-negative strains (53.3% vs. 20.0%,  $P=0.01$ , log-rank test, eFigure 3A in the Supplement). Similarly,  
248 among patients infected with a *blaZ*-positive strain and treated with ASPs, there was a trend toward  
249 higher one-month mortality in patients infected with OXA InE-positive strains vs. OXA InE-negative  
250 strains (36.2% vs. 18.9%,  $P=0.06$ , log-rank test, eFigure 3B in the Supplement). This impact of InE on  
251 one-month mortality was specific to the  $\beta$ -lactam used, as there was no difference in one-month  
252 mortality between the OXA InE-positive strain group and the OXA InE-negative strain group in CFZ-  
253 treated patients (40% vs. 26%,  $P=0.19$ , log-rank test, eFigure 3C in the Supplement), nor between the  
254 CFZ InE-positive and CFZ InE-negative strain groups in ASP-treated patients (20% vs. 31.3%,  $P=0.37$ ,  
255 log-rank test, eFigure 3D in the Supplement).

#### 256 **Risk factors for mortality in left-sided MSSA IE**

257 Univariable and multivariable analyses of parameters associated with the occurrence of death in the  
258 first month of left-sided IE were performed using Cox regression. Table 2 summarizes the variables  
259 for which the univariable analysis showed an association with one-month mortality with  $P<0.2$ . In the  
260 final model of multivariable analysis, 4 variables remained independently associated with the  
261 occurrence of death in the first month, after adjustment for the  $\beta$ -lactam received: the Charlson  
262 comorbidity index with a HR of 1.22, 95% CI [1.10-1.36],  $P<0.001$ ; the SOFA score with a HR of 1.14  
263 [1.05-1.23],  $P=0.001$ ; the vegetation size with a HR of 1.04 [1.01-1.07],  $P=0.02$ ; and the presence of  
264 an InE to the treatment received with a HR of 2.84 [1.28-6.30],  $P=0.01$  (Table 2). Results were globally  
265 similar when adjusted for clinical center (eTable 1 in the Supplement). Sensitivity analyses of  
266 multivariable Cox models including the variables comprising the Charlson comorbidity index instead  
267 of the total score were also performed. (eTable 2 in the Supplement).

268

269 **Discussion**

270

271 The main finding of this multicenter study is the independent association between *blaZ* presence and  
272 InE and the mortality of MSSA in left-sided infective endocarditis. Indeed, the presence of an InE to  
273 the  $\beta$ -lactam received was an independent risk factor for the occurrence of death in the first month.  
274 Overall survival did not differ between the use of ASP and CFZ, which is consistent with the results of  
275 several studies comparing ASP with CFZ in MSSA bacteremia.<sup>15–18</sup> However, in all these studies, ASPs  
276 and CFZ were compared as a whole, without separating each  $\beta$ -lactam received according to the  
277 presence or absence of *blaZ* and InE.

278

279 InE to  $\beta$ -lactam antibiotics has been described mainly for CFZ,<sup>10,19</sup> but is less known for ASPs,  
280 although it was common in our study (about half of *blaZ*-positive strains). To our knowledge, the  
281 association between OXA InE and ASP treatment failure in MSSA infection has not been previously  
282 described. InE was associated with mortality only in patients treated with the  $\beta$ -lactam showing InE  
283 against that  $\beta$ -lactam. These data support the idea of a hydrolytic specificity of BlaZ. The reduced  
284 susceptibility to oxacillin at high inoculum is consistent with the concept of borderline oxacillin-  
285 resistant *Staphylococcus aureus* (BORSA), where resistance to ASPs in these strains is associated with  
286 the overexpression of *blaZ*.<sup>20</sup> Furthermore, *blaZ* expression can be regulated by exposure to  $\beta$ -lactam  
287 antibiotics.<sup>21</sup> Therefore, exploring the hydrolytic profile of BlaZ and the amount of enzymes produced  
288 by different strains may help to optimize antibacterial treatment.

289

290 Our results show a significant proportion of *blaZ*-negative strains, accounting for about a quarter of  
291 this French cohort, confirming the results of previous studies indicating an increase in the frequency  
292 of *blaZ*-negative strains in European countries, but also in China or the USA.<sup>22,23</sup> The prevalence of  
293 *blaZ*-positive isolates increased sharply in the decades following the widespread use of penicillins.  
294 The resurgence of *blaZ*-negative MSSA raises questions about the determinants involved in this  
295 dynamic. Furthermore, the identification of *blaZ*-negative isolates may enable the use of penicillin G  
296 against these strains. Notably, these strains have significantly lower penicillin G MICs compared to  
297 ASP and CFZ.<sup>24</sup> In addition, penicillin G has the potential to mitigate the environmental impact of  
298 prolonged antibiotic therapy for IE.

299

300 The influence of phenotypic characteristics of BlaZ on therapeutic outcome suggests new therapeutic  
301 perspectives. The use of phenotypic characteristics of MSSA isolates, such as InE determination, may  
302 help in the future to select the optimal  $\beta$ -lactam agent. It may also prompt consideration of adding  $\beta$ -  
303 lactamase inhibitors such as clavulanic acid to conventional therapy against  $\beta$ -lactamase-producing

304 strains. While gene sequencing remains the reference diagnostic for *blaZ* detection and typing, its  
305 application in daily routine remains challenging. Moreover, it does not seem sufficient to predict InE.  
306 By contrast, determining the presence of an InE to CFZ or OXA could be implemented in routine  
307 practice by adapting commercial broth microdilution methods with standard and high inocula.

308

309 Our study has several limitations. First, as a retrospective and observational study, it is at risk of bias  
310 due to factors such as selection and information bias. The choice of treatment may have been  
311 influenced by the clinical severity of the patients. However, this bias is partially mitigated by the  
312 predominant use of CFZ from 2016 to 2018, during the prolonged and complete ASP shortage, which  
313 reduces the risk of indication bias. Another important parameter in IE treatment is achieving optimal  
314 antibiotic concentration in this context of high inoculum infection. Therapeutic drug monitoring was  
315 not systematically performed in our study, which may have affected therapeutic efficacy. Despite  
316 the reasonable sample size, the number of subjects in subgroup analyses remains limited, which may  
317 affect the generalizability of our findings. In addition, there is a potential risk of confounding by  
318 circulating local clones, although the inclusion of multiple centers mitigates this risk. We performed  
319 adjustment for either the  $\beta$ -lactam received or the clinical center in Cox regression analyses to  
320 account for these potential biases, and in all models, the presence of *blaZ* and InE remained a factor  
321 independently associated with the occurrence of death in the first month. However, it should be  
322 emphasized that our results were obtained in the context of high-inoculum infection and may not  
323 apply to *S. aureus* isolates responsible for other sites of infection with lower inoculum than in IE.

324

325 In conclusion, left-sided MSSA IEs remain associated with high mortality rates, of 24.4% at one  
326 month, mostly within the first two weeks, highlighting the importance of early optimization of  
327 treatment strategies. Our study highlights the association between MSSA isolate characteristics,  
328 particularly the presence of *blaZ* and InE, the  $\beta$ -lactam agent used, and the outcomes, suggesting  
329 that the choice of  $\beta$ -lactam agent could be guided by phenotypic characteristics of the isolates based  
330 on early and reliable microbiological testing. In addition, the 25% prevalence of *blaZ*-negative isolates  
331 may allow greater use of penicillin G. Our results highlight the potential value of phenotypic testing  
332 of MSSA isolates to allow tailored optimization of antibacterial treatment in IE to improve outcome,  
333 and prompt further consideration of its implications for other high-inoculum infections.

334

### 335 **Contributors**

336 B.J., M.C., C.P., and C.M. contributed to the project design, set up methods, and performed the  
337 experiments; P.D., G.M.-B., P.T., A.L.B., D. L.P., F.G., V.C., L.A.-L., S.G., F.-X. L., X.D., and C.M. recruited

338 participants and provided samples; B.J., M.C. and C.P., processed the samples, performed the  
339 experiments and analyzed data ; B.J., M.C., C.P., C.M. and P.D. had accessed to the underlying data  
340 and verified, analyzed and interpreted them; B.J., and A.L.-G. performed statistical analyses ; B.J., and  
341 P.D. wrote the manuscript; G.M.-B., P.T., V.C., L.A.-L., F.-X. L., X.D., A.L.-G. and C.M., reviewed the  
342 draft; C.M. and P.D. conceived the project and directed the research. All authors have read and  
343 approved the final version of the manuscript.

344

345 **Declaration of interests**

346 We declare no competing interests

347 **Data sharing**

348 Data are available upon request. Correspondence and requests for materials should be addressed to  
349 P.D.

350

351 **Acknowledgments**

352 We thank each member of the Cefazolin High Inoculum effect in MSSA Endocarditis tREatment  
353 project (CHIMERE project), which included all patients in three centers, Justine Latour for the  
354 phylogenetic analysis, Thomas Lanot for the pharmacological analyses (determination of CFZ and  
355 OXA concentrations), and Vanessa Rousseau and Agnès Sommet for their help with the review of the  
356 statistical analyses. We are also grateful to Laurent Cavalie and the technical staff of the molecular  
357 bacteriology laboratory of the University Hospital of Toulouse for their contribution to the molecular  
358 analyses.

359

360

361 **References**

- 362 1. Slipczuk L, Codolosa JN, Davila CD, et al. Infective Endocarditis Epidemiology Over Five Decades:  
363 A Systematic Review. Schlievert PM, ed. *PLoS ONE*. 2013;8(12):e82665.  
364 doi:10.1371/journal.pone.0082665
- 365 2. Delgado V, Ajmone Marsan N, de Waha S, et al. 2023 ESC Guidelines for the management of  
366 endocarditis: Developed by the task force on the management of endocarditis of the European  
367 Society of Cardiology (ESC) Endorsed by the European Association for Cardio-Thoracic Surgery  
368 (EACTS) and the European Association of Nuclear Medicine (EANM). *Eur Heart J*.  
369 2023;44(39):3948-4042. doi:10.1093/eurheartj/ehad193
- 370 3. Voladri RKR, Kernodle DS. Characterization of a Chromosomal Gene Encoding Type B  $\beta$ -  
371 Lactamase in Phage Group II Isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*.  
372 1998;42(12):3163-3168. doi:10.1128/AAC.42.12.3163
- 373 4. Zygmunt DJ, Stratton CW. Characterization of Four 13-Lactamases Produced by *Staphylococcus*  
374 *aureus*. *ANTIMICROB AGENTS CHEMOTHER*. 1992;36.
- 375 5. Nannini EC, Singh KV, Arias CA, Murray BE. In vivo effects of cefazolin, daptomycin, and nafcillin  
376 in experimental endocarditis with a methicillin-susceptible staphylococcus aureus strain showing  
377 an inoculum effect against cefazolin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(9):4276-4281.  
378 doi:10.1128/AAC.00856-13
- 379 6. Lefèvre B, Hoen B, Goehringer F, et al. Antistaphylococcal penicillins vs. cefazolin in the  
380 treatment of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* infective endocarditis: a quasi-  
381 experimental monocentre study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2021;40(12):2605-2616.  
382 doi:10.1007/s10096-021-04313-3
- 383 7. Lecomte R, Bourreau A, Deschanvres C, et al. Comparative outcomes of cefazolin versus  
384 antistaphylococcal penicillins in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* infective  
385 endocarditis: a post hoc analysis of a prospective multicentre French cohort study. *Clin Microbiol*  
386 *Infect*. 2021;27(7):1015-1021. doi:10.1016/j.cmi.2020.08.044
- 387 8. Bourreau A, Le Mabecque V, Broquet A, Caillon J. Prevalence of a cefazolin inoculum effect  
388 associated with blaZ gene types, and clinical outcomes among methicillin-susceptible  
389 *Staphylococcus aureus* blood isolates of patients with infective endocarditis. *Infect Dis Now*.  
390 2023;53(1):104626. doi:10.1016/j.idnow.2022.09.021
- 391 9. Song KH, Jung SI, Lee S, et al. Inoculum effect of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*  
392 against broad-spectrum beta-lactam antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019;38(1):67-74.  
393 doi:10.1007/s10096-018-3392-6
- 394 10. Nannini EC, Stryjewski ME, Singh KV, et al. Inoculum Effect with Cefazolin among Clinical Isolates  
395 of Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*: Frequency and Possible Cause of Cefazolin  
396 Treatment Failure. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(8):3437-3441.  
397 doi:10.1128/AAC.00317-09
- 398 11. Nguyen LT, Schmidt HA, Von Haeseler A, Minh BQ. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic  
399 Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Mol Biol Evol*. 2015;32(1):268-274.  
400 doi:10.1093/molbev/msu300

- 401 12. Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TKF, Von Haeseler A, Jermiin LS. ModelFinder: fast model  
402 selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat Methods*. 2017;14(6):587-589.  
403 doi:10.1038/nmeth.4285
- 404 13. Hoang DT, Chernomor O, Von Haeseler A, Minh BQ, Vinh LS. UFBoot2: Improving the Ultrafast  
405 Bootstrap Approximation. *Mol Biol Evol*. 2018;35(2):518-522. doi:10.1093/molbev/msx281
- 406 14. Livorsi DJ, Crispell E, Satola SW, et al. Prevalence of blaZ gene types and the inoculum effect with  
407 cefazolin among bloodstream isolates of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*.  
408 *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(8):4474-4477. doi:10.1128/AAC.00052-12
- 409 15. Bidell MR, Patel N, O'Donnell JN. Optimal treatment of MSSA bacteraemias: a meta-analysis of  
410 cefazolin versus antistaphylococcal penicillins. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(10):2643-2651.  
411 doi:10.1093/jac/dky259
- 412 16. Rindone JP, Mellen CK. Meta-analysis of trials comparing cefazolin to antistaphylococcal  
413 penicillins in the treatment of methicillin-sensitive *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* bacteraemia. *Br J Clin*  
414 *Pharmacol*. 2018;84(6):1258-1266. doi:10.1111/bcp.13554
- 415 17. Lee BJ, Wang SK, Constantino-Corpuz JK, et al. Cefazolin vs. anti-staphylococcal penicillins for  
416 treatment of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bloodstream infections in acutely ill  
417 adult patients: Results of a systematic review and meta-analysis. *Int J Antimicrob Agents*.  
418 2019;53(3):225-233. doi:10.1016/j.ijantimicag.2018.11.013
- 419 18. Weis S, Kesselmeier M, Davis JS, et al. Cefazolin versus anti-staphylococcal penicillins for the  
420 treatment of patients with *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Clin Microbiol Infect*.  
421 2019;25(7):818-827. doi:10.1016/j.cmi.2019.03.010
- 422 19. Miller WR, Seas C, Carvajal LP, et al. The Cefazolin Inoculum Effect Is Associated With Increased  
423 Mortality in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Open Forum Infect Dis*.  
424 2018;5(6):ofy123. doi:10.1093/ofid/ofy123
- 425 20. Hryniewicz MM, Garbacz K. Borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* (BORSA) – a  
426 more common problem than expected? *J Med Microbiol*. 2017;66(10):1367-1373.  
427 doi:10.1099/jmm.0.000585
- 428 21. Clarke SR, Dyke KGH. The signal transducer (BlaRI) and the repressor (Blal) of the *Staphylococcus*  
429 *aureus*  $\beta$ -lactamase operon are inducible. *Microbiology*. 2001;147(4):803-810.  
430 doi:10.1099/00221287-147-4-803
- 431 22. Jin Y, Zhou W, Zhan Q, et al. Genomic epidemiology and characterisation of penicillin-sensitive  
432 *Staphylococcus aureus* isolates from invasive bloodstream infections in China: an increasing  
433 prevalence and higher diversity in genetic typing be revealed. *Emerg Microbes Infect*.  
434 2022;11(1):326-336. doi:10.1080/22221751.2022.2027218
- 435 23. Chabot MR, Stefan MS, Friderici J, Schimmel J, Larioza J. Reappearance and treatment of  
436 penicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in a tertiary medical centre. *J Antimicrob*  
437 *Chemother*. Published online September 4, 2015:dkv270. doi:10.1093/jac/dkv270
- 438 24. Gudiol C, Cuervo G, Shaw E, Pujol M, Carratalà J. Pharmacotherapeutic options for treating  
439 *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Expert Opin Pharmacother*. 2017;18(18):1947-1963.  
440 doi:10.1080/14656566.2017.1403585

441 **Table 1:** Description of study patients with methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* infective  
 442 endocarditis.  
 443

Characteristic	N = 216 <sup>1</sup>
<b>DEMOGRAPHIC DATA</b>	
Age (years)	65 [49-73]
Sexe ratio Male/Female	152 (70.4%)/64 (29.6%)
Intravenous drug user	32 (14.8%)
Charlson comorbidity index	3 [1-6]
SOFA score	4 [2-7]
Unknown	16 (7.4%)
<b>OUTCOME DATA</b>	
<b>Neurological complications of infective endocarditis</b>	86 (39.8%)
Emboli or stroke	83 (38.4%)
Hematoma or abscess	29 (13.4%)
Mycotic aneurysm	7 (3.2%)
<b>Bacteremia duration (days)</b>	3.25 [1.2-5.9]
Unknown	2 (0.9%)
<b>D15 death</b>	32 (14.8%)
<b>D30 death</b>	45 (20.8%)
<b>PATHOLOGY DATA</b>	
<b>Modified Duke classification</b>	
Definite endocarditis	195 (90.3%)
Possible endocarditis	21 (9.7%)
<b>Affected valve</b>	
Aortic	76 (35.2%)
Mitral	60 (27.8%)
Tricuspid	36 (16.6%)
Multiple	27 (12.5%)
Indetermined and other	17 (7.9%)
<b>Valve type</b>	
Native valve	161 (74.5%)
Prosthetic valve	55 (25.5%)
<b>Vegetation size (mm)</b>	13 [8-20]
Unknown	50 (23.1%)
<b>Intracardiac abscess</b>	47 (21.8%)
<b>Perforation or regurgitation</b>	34 (15.7%)
<b>Atrio ventricular block grade III</b>	19 (8.8%)
<b>BACTERIOLOGICAL DATA</b>	

<b>blaZ presence</b>	159 (73.6%)
<b>blaZ type</b>	
Absence	57 (26.4%)
A	57 (26.4%)
B	57 (26.4%)
C	44 (20.4%)
D	1 (0.4%)
<b>Cefazolin inoculum effect</b>	
Absence	118 (54.6%)
Presence	41 (19.0%)
Not available ( <i>blaZ</i> negative)	57 (26.4%)
<b>Oxacillin inoculum effect</b>	
Absence	77 (35.6%)
Presence	82 (38.0%)
Not available ( <i>blaZ</i> negative)	57 (26.4%)
<b>TREATMENT DATA</b>	
<b>B-lactam used</b>	
Cefazolin	77 (35.6%)
Anti Staphylococcal Penicillins	139 (64.4%)
<b>Surgery within the first 15 days</b>	62 (28.7%)
<b>Aminoglycoside usage</b>	73 (33.8%)

444

<sup>1</sup>n (%); Median [IQR]

445 **Table 2:** Univariable and multivariable Cox regression models of factors associated with the occurrence of first-month death in left-sided IE after adjustment  
 446 for treatment received.

Variables	Univariable analysis adjusted for treatment received			Complete model 1 adjusted for treatment received			Model 2 with selection adjusted for treatment received		
	HR	[95% CI]	p value	HR	[95% CI]	p value	HR	[95% CI]	p value
<b>Charlson comorbidity index</b> (per one point increase)	1.18	[1.07-1.30]	<b>0.001</b>	1.19	[1.06-1.33]	<b>0.002</b>	1.22	[1.10-1.36]	<b>&lt;0.001</b>
<b>Age</b> (per one year increase)	1.03	[1.00-1.05]	<b>0.04</b>	NA					
<b>History of stroke and transient ischemic attack</b> (reference=no)	2.05	[0.70-6.00]	0.19	NA					
<b>Pulmonary pathology</b> (reference=no)	2.59	[0.99-6.77]	0.05	NA					
<b>Diabetes</b> (reference=no)	1.33	[0.82-2.14]	0.25	NA					
<b>Chronic renal failure</b> (reference=no)	3.36	[1.65-6.84]	<b>0.001</b>	NA					
<b>SOFA score</b> (per one point increase)	1.15	[1.07-1.24]	<b>&lt;0.001</b>	1.14	[1.05-1.24]	<b>0.001</b>	1.14	[1.05-1.23]	<b>0.001</b>
<b>Surgery within the first 15 days</b> (reference=no)	0.81	[0.38-1.72]	0.59	0.52	[0.20-1.31]	0.17	NS		
<b>Vegetation size</b> (per one mm increase)	1.06	[1.02-1.09]	<b>0.002</b>	1.05	[1.01-1.09]	<b>0.01</b>	1.04	[1.01-1.07]	<b>0.02</b>
<b>Perforation or regurgitation</b> (reference=no)	2.17	[0.98-4.81]	0.06	1.74	[0.76-4.01]	0.19	NS		
<b>Inoculum effect (InE)</b> (reference= absence of <i>blaZ</i> or InE)	2.59	[1.25-5.35]	<b>0.01</b>	2.80	[1.26-6.36]	<b>0.01</b>	2.84	[1.28-6.30]	<b>0.01</b>

447 NA: Not analyzed in these models because the global Charlson comorbidity index was used instead  
 448 NS: Not selected during stepwise selection

- 17 -

450 **Figures legends**

451

452 **Figure 1. Flowchart of the study**

453 (MRSA, Meticillin resistant *Staphylococcus aureus*; IE, Infective Endocarditis; CIED, cardiac  
 454 implantable electronic devices).

455

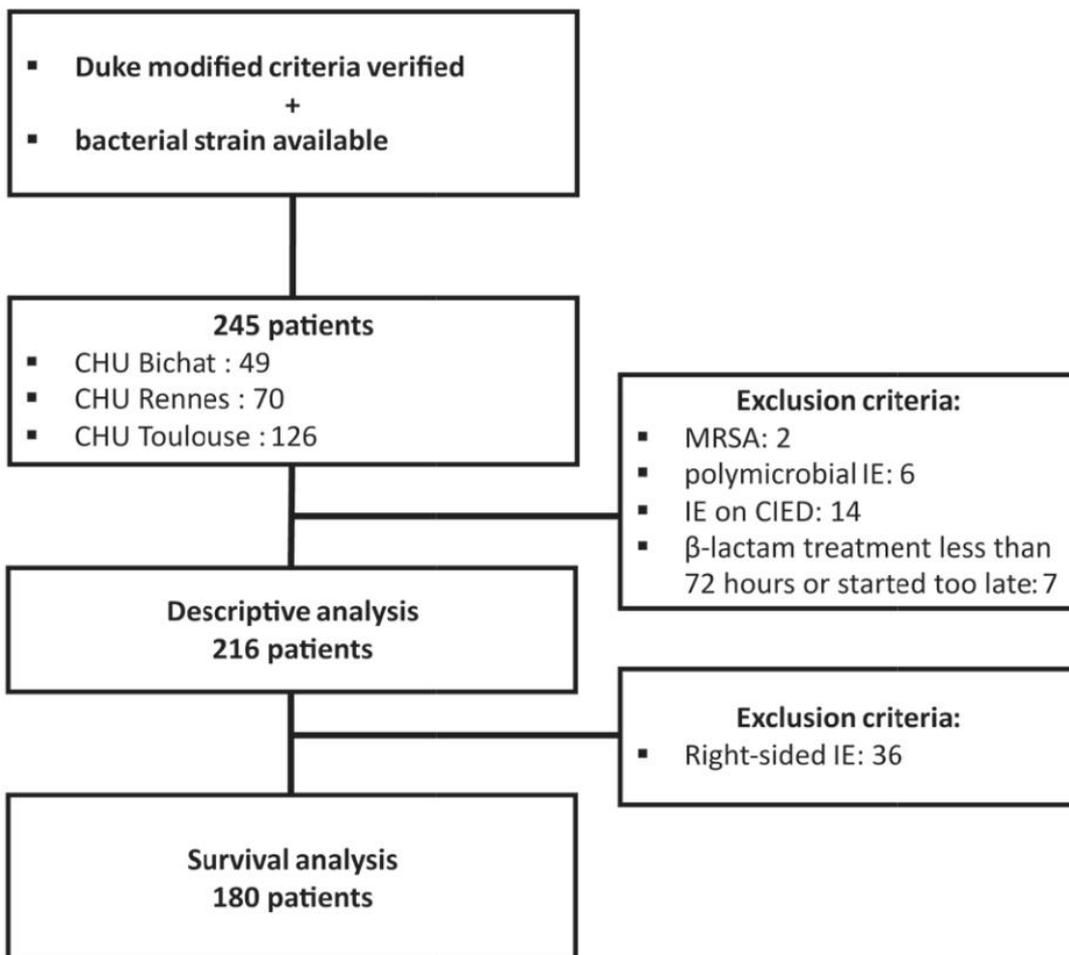
456 **Figure 2. Phylogenetic tree of the 159 *blaZ*-positive *Staphylococcus aureus* strains**

457 Maximum likelihood phylogenetic tree based on alignment of 355 bp PCR products  
 458 from *blaZ* amplification. Strains with a cefazolin inoculum effect and strains with an oxacillin  
 459 inoculum effect are marked with a red and blue dot, respectively. Bootstrap values are only shown  
 460 above 70. The name of each strain corresponds to the first three letters of the hospital where it was  
 461 isolated (*i.e.* BIC for Bichat hospital, REN for Rennes hospital and TOU for Toulouse hospital),  
 462 followed by an increasing number for each hospital and finally the letter corresponding to  
 463 the *blaZ* type.

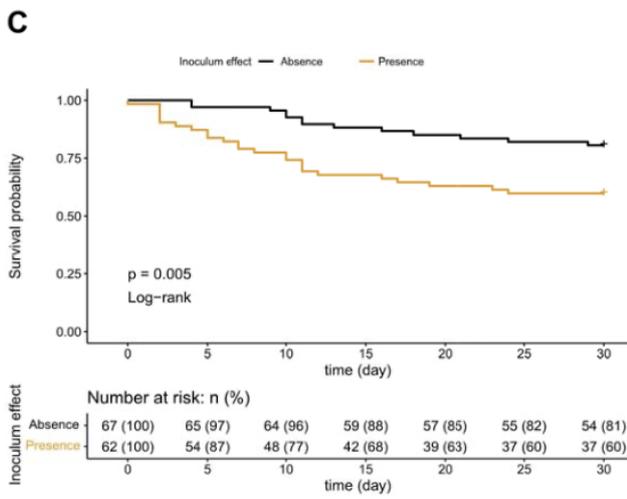
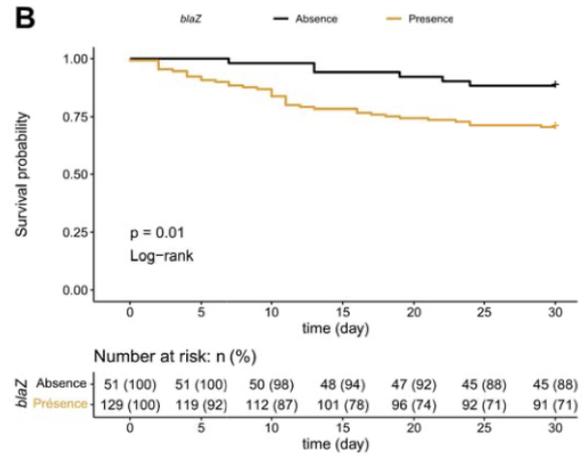
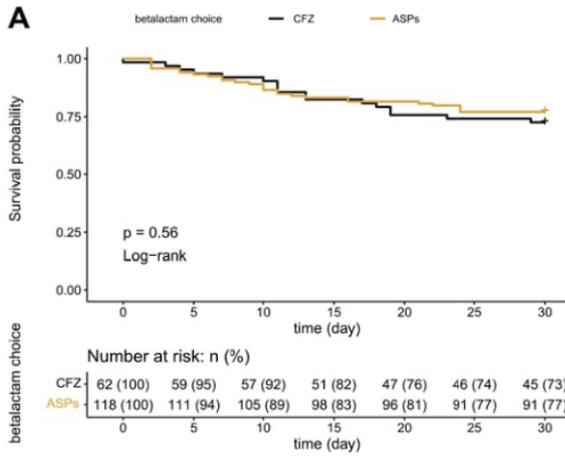
464

465 **Figure 3: One-month survival curves in MSSA left-sided infective endocarditis**

466 Kaplan-Meier survival curves according to the treatment with cefazoline (CFZ) or anti-staphylococcal  
 467 penicillin (ASP) (A), the presence or absence of *blaZ* (B), and the presence or absence of an inoculum  
 468 effect (InE) in the *blaZ*-positive group (C).







1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22

## SUPPLEMENTAL TABLES AND FIGURES

### **Beta-lactam inoculum effect and clinical outcome in patients with methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* infective endocarditis**

#### **Supplemental Tables**

**eTable 1.** Univariable and multivariable Cox regression models of factors associated with the occurrence of first-month death in left-sided IE after adjustment for clinical center

**eTable 2.** Sensitivity analyses of multivariable Cox regression models of factors associated with the occurrence of first-month death in left-sided IE

#### **Supplemental Figures**

**eFigure 1.** *blaZ* type frequency by clinical center

**eFigure 2.** One-month survival curves in MSSA left-sided infective endocarditis according to *blaZ* type

**eFigure 3.** One-month survival curves in MSSA left-sided infective endocarditis in patients infected with a *blaZ*-positive strain according to the presence or absence of an inoculum effect to the  $\beta$ -lactam received

23 eTable 1: Univariable and multivariable Cox regression models of factors associated with the occurrence of first-month death in left-sided IE after  
 24 adjustment for clinical center

Variables	Univariable analysis adjusted for clinical center			Complete model 1 adjusted for clinical center			Model 2 with selection adjusted for clinical center		
	HR	[95% CI]	p value	HR	[95% CI]	p value	HR	[95% CI]	p value
<b>Charlson comorbidity index</b> (per one point increase)	1.17	[1.06-1.29]	<b>0.001</b>	1.17	[1.05-1.31]	<b>0.003</b>	1.21	[1.09-1.34]	<b>&lt;0.001</b>
<b>Age</b> (per one year increase)	1.03	[1.00-1.05]	0.05	NA					
<b>History of stroke and transient ischemic attack</b> (reference=no)	2.10	[0.73-6.05]	0.17	NA					
<b>Pulmonary pathology</b> (reference=no)	2.56	[0.98-6.71]	0.06	NA					
<b>Diabetes</b> (reference=no)	1.32	[0.82-2.14]	0.25	NA					
<b>Chronic renal failure</b> (reference=no)	3.34	[1.63-6.82]	<b>0.001</b>	NA					
<b>SOFA score</b> (per one point increase)	1.13	[1.05-1.22]	<b>0.001</b>	1.12	[1.03-1.22]	<b>0.01</b>	1.12	[1.03-1.22]	<b>0.01</b>
<b>Surgery within the first 15 days</b> (reference=no)	0.78	[0.37-1.68]	0.53	0.44	[0.16-1.21]	0.11	NS		
<b>Vegetation size</b> (per one mm increase)	1.05	[1.02-1.09]	<b>0.003</b>	1.05	[1.01-1.09]	<b>0.02</b>	1.03	[1.00-1.07]	0.06
<b>Perforation or regurgitation</b> (reference=no)	2.21	[1.00-4.87]	<b>0.05</b>	1.83	[0.78-4.28]	0.16	NS		
<b>Inoculum effect (lnE)</b> (reference= absence of blaZ or lnE)	2.32	[1.14- 4.70]	<b>0.02</b>	2.26	[1.04-4.89]	<b>0.04</b>	2.25	[1.06-4.78]	<b>0.03</b>

25 NA: Not analyzed in the models because the global Charlson comorbidity index was used instead  
 26 NS: Not selected during stepwise selection  
 27

- 2 -

28 eTable 2. Sensitivity analyses of multivariable Cox regression models of factors associated with the occurrence of first-month death in left-sided IE  
 29

Variables	Univariable analysis adjusted for treatment received			Complete model 1 adjusted for treatment received			Model 2 with selection adjusted for treatment received		
	HR	[95% CI]	p value	HR	[95% CI]	p value	HR	[95% CI]	p value
<b>Charlson comorbidity index</b> (per one point increase)	1.18	[1.07-1.30]	<b>0.001</b>	NA					
<b>Age</b> (per one year increase)	1.03	[1.00-1.05]	<b>0.04</b>	1.03	[1.00-1.06]	<b>0.05</b>	1.03	[1.00-1.06]	0.06
<b>History of stroke and transient ischemic attack</b> (reference=no)	2.05	[0.70-6.00]	0.19	2.58	[0.76-8.79]	0.13	2.64	[0.87-8.05]	0.09
<b>Pulmonary pathology</b> (reference=no)	2.59	[0.99-6.77]	0.05	1.26	[0.44-3.59]	0.66	NS		
<b>Diabetes</b> (reference=no)	1.33	[0.82-2.14]	0.25	1.34	[0.76-2.36]	0.31	NS		
<b>Chronic renal failure</b> (reference=no)	3.36	[1.65-6.84]	<b>0.001</b>	0.85	[0.32-2.30]	0.75	NS		
<b>SOFA score</b> (per one point increase)	1.15	[1.07-1.24]	<b>&lt;0.001</b>	1.14	[1.05-1.24]	<b>0.001</b>	1.14	[1.05-1.24]	<b>0.002</b>
<b>Surgery within the first 15 days</b> (reference=no)	0.81	[0.38-1.72]	0.59	0.52	[0.20-1.31]	0.17	0.39	[0.15-1.06]	0.07
<b>Vegetation size</b> (per one mm increase)	1.06	[1.02-1.09]	<b>0.002</b>	1.05	[1.01-1.09]	<b>0.01</b>	1.06	[1.02-1.10]	<b>0.003</b>
<b>Perforation or regurgitation</b> (reference=no)	2.17	[0.98-4.81]	0.06	1.74	[0.76-4.01]	0.19	2.07	[0.90-4.76]	0.09
<b>Inoculum effect (lnE)</b> (reference= absence of blaZ or lnE)	2.59	[1.25-5.35]	<b>0.01</b>	2.80	[1.26-6.36]	<b>0.01</b>	2.84	[1.28-6.30]	<b>0.01</b>

30 NA: Not analyzed in the models because the variables comprising the Charlson comorbidity index were used instead of the total score  
 31 NS: Not selected during stepwise selection

- 3 -

Variables	Univariable analysis adjusted for clinical center			Complete model 1 adjusted for clinical center			Model 2 with selection adjusted for clinical center		
	HR	[95% CI]	p value	HR	[95% CI]	p value	HR	[95% CI]	p value
<b>Charlson comorbidity index</b> (per one point increase)	1.17	[1.06-1.29]	<b>0.001</b>	NA					
<b>Age</b> (per one year increase)	1.03	[1.00-1.05]	0.05	1.03	[1.00-1.06]	0.07	1.03	[1.00-1.06]	0.07
<b>History of stroke and transient ischemic attack</b> (reference=no)	2.10	[0.73-6.05]	0.17	3.07	[0.88-10.69]	0.08	3.03	[1.00-9.17]	<b>0.05</b>
<b>Pulmonary pathology</b> (reference=no)	2.56	[0.98-6.71]	0.06	1.11	[0.38-3.26]	0.85	NS		
<b>Diabetes</b> (reference=no)	1.32	[0.82-2.14]	0.25	1.40	[0.81-2.43]	0.23	NS		
<b>Chronic renal failure</b> (reference=no)	3.34	[1.63-6.82]	<b>0.001</b>	0.87	[0.32-2.41]	0.79	NS		
<b>SOFA score</b> (per one point increase)	1.13	[1.05-1.22]	<b>0.001</b>	1.12	[1.03-1.22]	<b>0.01</b>	1.12	[1.03-1.22]	<b>0.01</b>
<b>Surgery within the first 15 days</b> (reference=no)	0.78	[0.37-1.68]	0.53	0.39	[0.12-1.21]	0.10	0.37	[0.13-1.07]	0.07
<b>Vegetation size</b> (per one mm increase)	1.05	[1.02-1.09]	<b>0.003</b>	1.05	[1.01-1.10]	<b>0.01</b>	1.06	[1.01-1.10]	<b>0.01</b>
<b>Perforation or regurgitation</b> (reference=no)	2.21	[1.00-4.87]	<b>0.05</b>	2.35	[0.92-5.96]	0.07	2.16	[0.92-5.11]	0.08
<b>Inoculum effect (InE)</b> (reference= absence of <i>blaZ</i> or InE)	2.32	[1.14-4.70]	<b>0.02</b>	2.47	[1.06-5.75]	<b>0.04</b>	2.38	[1.06-5.38]	<b>0.04</b>

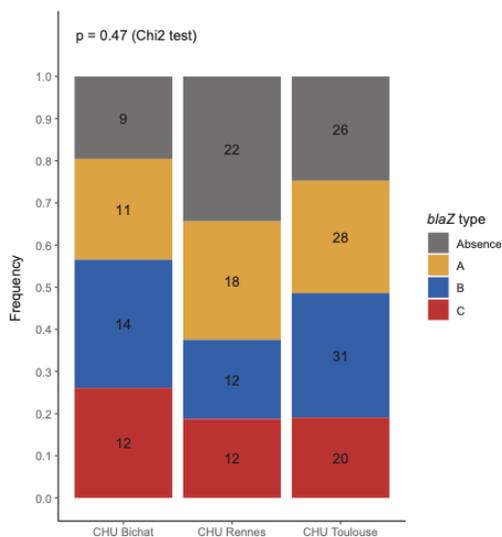
32 NA: Not analyzed in the models because the variables comprising the Charlson comorbidity index were used instead of the total score  
33 NS: Not selected during stepwise selection

34

- 4 -

35 **eFigure 1. *blaZ* type frequency by clinical center**

36



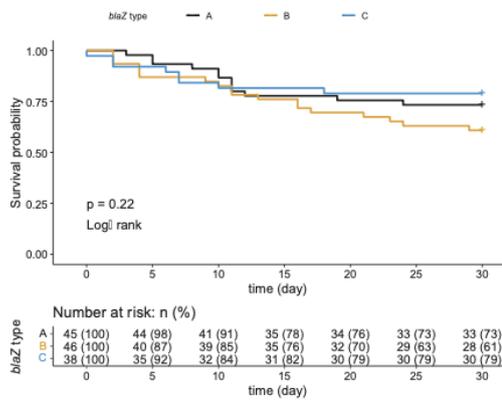
37

38

39 The  $\beta$ -lactamase type was determined on the basis of the amino acids at positions 128 and 216  
40 encoded by the *blaZ* gene.

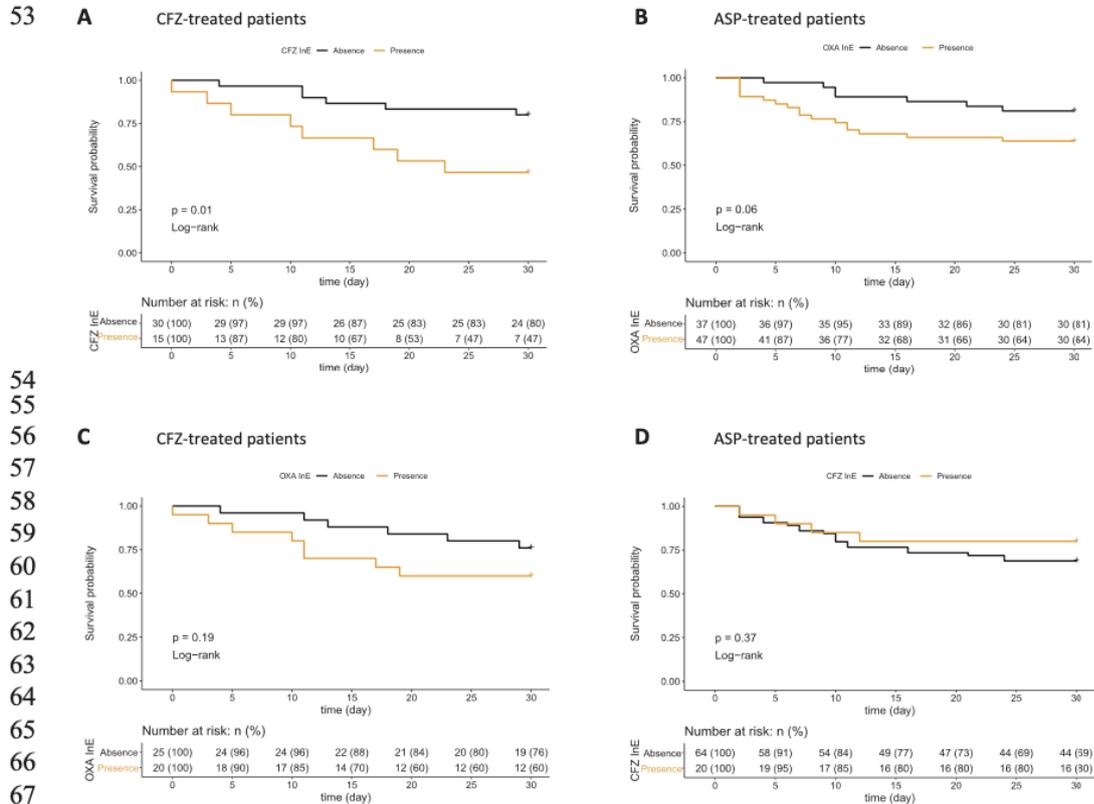
41

42 **eFigure 2. One-month survival curves in MSSA left-sided infective endocarditis according to *blaZ***  
 43 **type**



44  
 45  
 46 Survival curves in MSSA left-sided IE plotted using the Kaplan-Meier method and compared by *blaZ*  
 47 type (in black: type A; in orange: type B; in blue: type C) using the log-rank test.  
 48

49 **eFigure 3. One-month survival curves in MSSA left-sided infective endocarditis in patients infected**  
 50 **with a *blaZ*-positive strain according to the presence or absence of an inoculum effect to the  $\beta$ -**  
 51 **lactam received**  
 52



69 Survival curves in MSSA left-sided IE plotted using the Kaplan-Meier method in patients with a *blaZ*-  
 70 positive strain in patients treated with CFZ and having a CFZ inoculum effect (A); in patients treated  
 71 with ASP and having an OXA inoculum effect (B); in patients treated with CFZ and having an OXA  
 72 inoculum effect (C); and in patients treated with ASP and having a CFZ inoculum effect (D).  
 73 Comparisons were made using the log-rank test.  
 74

**STUDY OF THE OXACILLIN INOCULUM EFFECT OF METHICILLIN-SUCEPTIBLE  
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS* STRAINS RESPONSIBLE OF INFECTIVE ENDOCARDITIS**

Infective endocarditis caused by methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* is a serious infection with a persistent mortality rate, despite clinical and therapeutic improvements. Following the reported treatment failures with cefazolin, studies have investigated the impact of the inoculum effect, which may explain these treatments failures. Our tri-centric retrospective study composed of patients treated with cefazolin or penicillin M from January 2016 to December 2021 revealed a significant proportion of strains with an oxacillin inoculum effect (35.09%). The oxacillin inoculum effect was associated with higher mortality in patients who were treated with penicillin M, similar to what we've already shown for cefazolin in the 1st part of our study. Several mechanisms are probably involved in this phenomenon and interact with each other (overproduction of penicillinases, biofilm, dormancy). Laboratory tests need to be adapted to routinely detect the inoculum effect, in order to guide clinicians towards the most appropriate antibiotic therapy for the patient.

# ETUDE DE L'EFFET INOCULUM POUR L'OXACILLINE DE SOUCHES DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SENSIBLES A LA METICILLINE RESPONSABLES D'ENDOCARDITES INFECTIEUSES

**Auteur :** POLLANI Candice

Toulouse, le 11 Octobre 2024

## RESUME en français

L'endocardite infectieuse à *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline est une infection grave avec une mortalité inchangée malgré des améliorations cliniques et thérapeutiques. Suite à des échecs de traitement rapportés sous céfazoline, des études ont étudié l'impact de l'effet inoculum qui pourrait expliquer ces échecs de traitements. Notre étude rétrospective tri-centrique menée sur des patients traités par céfazoline ou par pénicilline M de Janvier 2016 à Décembre 2021 a permis de mettre en évidence une proportion non négligeable de souches avec effet inoculum pour l'oxacilline (35,09 %). L'effet inoculum pour l'oxacilline a été associée à une mortalité supérieure pour les patients traités par pénicilline M, de façon similaire à ce qui avait été montré pour la céfazoline dans la 1<sup>ère</sup> partie de notre étude. Plusieurs mécanismes sont probablement impliqués dans ce phénomène et interagissent entre eux (surproduction de pénicillinases, biofilm, dormance). Nos pratiques bactériologiques doivent s'adapter pour permettre de détecter l'effet inoculum en routine afin de guider le clinicien vers l'antibiothérapie la plus pertinente pour le patient.

---

## Titre et résumé en Anglais :

Voir au recto de la dernière page de la thèse

---

**DISCIPLINE administrative :** Pharmacie - BIOLOGIE MEDICALE

---

**MOTS-CLES :** Effet inoculum, endocardite infectieuse, *Staphylococcus aureus*, oxacilline

---

**INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :**

Laboratoire de Bactériologie – Hygiène  
CHU de TOULOUSE  
Institut Fédératif de Biologie  
330 Avenue de Grande Bretagne  
31300 Toulouse

**Directeur de thèse :** Madame le Docteur MASSIP Clémence