THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Faculté Médecine et Pharmacie)
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

École Doctorale 649 :
« *Rosalind Franklin* » - Énergie – Environnement - Biosanté

Secteur de Recherche :
Pharmacologie et Sciences du médicament

Présentée par :

Noémie PREBONNAUD

****

Etude pharmacocinétique/pharmacodynamique du linézolide utilisé dans le traitement des infections neuroméningées associées aux soins

****

Directrices de Thèse :
Sandrine MARCHAND, Alexia CHAUZY et Claire DAHYOT-FIZELIER

****

Soutenue le 06 mai 2025

devant la Commission d'Examen

****

JURY

Pr Pierre TATTEVIN	Université de Rennes	Président
Pr Vincent JULLIEN	Université Sorbonne Paris Nord	Rapporteur
Dr Romain GUILHAUMOU	Université d'Aix-Marseille	Rapporteur
Pr Pierre TATTEVIN	Université de Rennes	Examinateur
Pr Sandrine MARCHAND	Université de Poitiers	Directrice de thèse
Dr Alexia CHAUZY	Université de Poitiers	Co-directrice de thèse
Pr Claire DAHYOT-FIZELIER	Université de Poitiers	Co-directrice de thèse

"Only those who will risk going too far can possibly find out how far one can go."

Thomas Stearns Eliot,

Preface to Transit of Venus: Poems by Harry Crosby,

1931

Remerciements

Au Dr Romain Guilhaumou et au Pr Vincent Jullien, je vous remercie sincèrement d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Je vous souhaite une bonne lecture.

Au Pr Pierre Tattevin, je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et d'examiner ce travail. Je vous souhaite une bonne lecture.

Au Pr Sandrine Marchand, toi et moi c'est une longue histoire ! D'abord, comme enseignante, tu m'auras communiqué ta passion pour la PK mais aussi pour l'enseignement. Et puis, l'histoire continue lorsque tu as accepté de m'accueillir dans le laboratoire et de diriger cette thèse. Je te remercie infiniment pour cette opportunité. Je crois que grâce à toi, j'aurais beaucoup évolué tant professionnellement que personnellement. Tu m'auras toujours poussé un peu plus loin et je te remercie pour cela, pour ton aide, tous tes conseils, ta bienveillance et ta confiance (merci aussi pour les muffins en cette fin de rédaction !! 😋). Je suis heureuse de savoir que l'histoire ne s'arrêtera pas là et de pouvoir continuer à travailler avec toi encore pour quelques années.

Au Dr Alexia Chauzy, je te remercie de m'avoir accompagné tout au long de cette thèse. Tu m'auras suivi de près, initié aux hollow-fiber et à la modélisation (et c'était pas gagné !). Je te remercie pour ta patience et ta bienveillance. Merci pour tous les échanges que l'on a pu avoir sur ce travail, pour les réflexions, ou tout simplement pour m'avoir aidé à mettre de l'ordre dans mes idées, surtout lors de la rédaction. Merci infiniment pour ton aide et ton soutien durant toute cette thèse et surtout pour cette dernière ligne droite ! Je suis ravie de pouvoir continuer à travailler avec toi après cette thèse et de partager ton bureau (bientôt notre panneauuuu 🐮 !).

Au Pr Claire Dahyot-Fizelier, je te remercie d'avoir accepté de co-diriger cette thèse et d'avoir initié cette thématique. Merci pour tes conseils et ton aide sur les parties plus cliniques de ce travail.

A mes directrices de thèse, merci infiniment pour votre aide et pour toutes les relectures de ce travail !!

Un grand merci à toi Isabelle, tu auras été mon binôme sur cette fin de thèse. Merci infiniment pour ton aide, ton soutien et ton calme à toute épreuve ! Je continuerai de travailler avec toi avec grand plaisir (même si tu dis que c'est toujours de ma faute quand quelque chose ne marche pas.. 😜)!

A Michael, merci d'avoir repris le flambeau et d'avoir contribuer à une partie de ce travail. Tu auras été d'une aide précieuse !!

A Carine, je voudrais te remercier de m'avoir aidé pour une partie de ce travail.

Vincent, merci infiniment pour tout le temps que tu as pris pour répondre à toutes les questions que j'ai pu avoir sur R, la modélisation, et pour ta patience lors de ces petits rappels de maths ! Merci également pour ton aide, tes conseils, ton soutien et tes blagues 😗 !

A Jérémy, je ne compte plus les échanges que l'on a pu avoir durant cette thèse. Merci d'avoir partagé avec moi un bout de cette aventure et de m'avoir soutenue. Je te remercie d'avoir contribué aux réflexions que j'ai pu avoir sur ce travail, pour tes conseils et pour toutes tes idées.

Fred, tu m'as donné le gout de la recherche lors de ce premier stage de M1, je n'oublierai jamais cette passion que tu dégages et qui est si inspirante. Merci pour tous tes conseils, tes questions toujours pertinentes et tous les fous rires !

Julien, pour mon stage de M2 qui m'aura fait découvrir la microbiologie et qui m'aura convaincu de mon intérêt pour cette discipline. Merci également, pour tous les échanges et les réflexions que l'on a pu avoir lors de ma thèse.

Jonathan, que dire… Merci pour nos vacheries qui nous permettent de travailler dans la bonne humeur (ou pas..) et de bien rigoler (même si je ne sais pas si je vais bien rire et te remercier après tes super idées pour fêter ma fin de thèse… 😨).

Laure, merci d'avoir pris le temps de vérifier mes protocoles au début de ma thèse et d'avoir répondu à mes interrogations. J'ai hâte de continuer à t'entendre râler et d'essayer de te faire rire dans ces moments-là 😉 !

A Hélène et Christophe, merci pour votre aide, vos conseils et d'avoir pris le temps de répondre à mes interrogations sur l'analytique.

A mémééééére ou mama Agnès, merci pour ton aide, ta gentillesse et ta bienveillance. Tu es la maman du labo et aussi le petit clown 🤡. Merci de contribuer à la bonne humeur du labo !

Chloé, merci beaucoup pour tous tes conseils, ton soutien et tes petites attentions en cette fin de thèse avec les petits gâteaux et les petits GIF rigolos ! Merci pour ton rire si communicatif 😆.

A Nicolas, merci de me faire toujours rire par ta zen attitude et tes questions toujours très pertinentes…!

A tous les thésards et stagiaires, passés et présents, merci de m'avoir fait découvrir l'escalade et la fondue savoyarde ! Merci pour les sessions sportives, les repas, les apéros et merci pour votre soutien !

A tous les membres du laboratoire de l'U1070, merci pour nos discussions, pour les afterworks et tout simplement merci d'être vous. C'est grâce à chacun de vous qu'il y a cette bonne ambiance dans le laboratoire et que je prends plaisir à travailler ici.

A tous les membres du laboratoire de pharmaco-toxico, merci pour votre accueil et votre compréhension en cette fin de thèse.

A mes amis, je sais que mon parcours est un peu obscur pour certains d'entre vous mais vous avez été d'un grand soutien tout le long, ça y est la fin est proche ! Merci infiniment pour tous les bons moments partagés ensemble et bientôt les prochains !

A mes proches, ma famille, merci pour votre soutien et vos encouragements pendant toutes ces années !

A mes parents, je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous avez fait pour moi. C'est grâce à vous que j'en suis là aujourd'hui. Merci pour votre soutien et votre amour. Je suis tellement reconnaissante ! Je vous aime.

Table des matières

Liste des publications 8

Liste des communications orales 9

Liste des abréviations 11

Liste des figures 13

Liste des tableaux 18

Introduction 19

1. Le cerveau, un organe bien protégé 20

1.1. Les méninges 20

1.2. Les barrières cérébrales 22

1.2.1. La barrière hémato-encéphalique (BHE) 23

1.2.2. La barrière hémato-liquidienne (BHL) 26

1.3. Le liquide cérébrospinal (LCS) 27

2. Les infections neuro-méningées associées aux soins 32

2.1. Principe de la dérivation ventriculaire externe 33

2.2. Physiopathologie 34

2.3. Diagnostic clinique et biologique 37

2.4. Traitement 40

2.4.1. Traitement empirique 40

2.4.2. Détermination de la sensibilité bactérienne 41

2.4.3. Traitement spécifique des Staphylococcus spp. 43

3. Linézolide : une posologie à optimiser ? 45

3.1. Mécanisme d'action 45

3.2. Distribution dans le LCS 47

3.3. Evaluation PK/PD du linézolide 49

3.3.1. Les index PK/PD 49

3.3.2. La probabilité d'atteindre la cible 52
4. Modèles *in vitro* pour l'évaluation PK/PD 56
4.1. Les courbes de bactéricidies en condition statique 56
4.2. Les courbes de bactéricidie en condition dynamique 58
4.2.1. Modèle à un compartiment 58
4.2.2. Modèle à deux compartiments 59
5. Analyse des données par modélisation mathématique 64
5.1. Modèle pharmacocinétique 64
5.2. Modèle bactérien 65
5.3. Modèle d'effet 65
5.4. Modèle de résistance 66
5.4.1. Modèle d'adaptation 66
5.4.2. Modèle de sous-population 67
Objectifs de la thèse 70
Travail expérimental 72
Partie 1 : Définition de l'index PK/PD du linézolide pour les infections cérébrales 73
Partie 2 : Développement d'une approche expérimentale et computationnelle pour reproduire les profils PK tissulaires dans un modèle *in vitro* d'infection 100
Partie 3 : Étude PK/PD du linézolide vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* dans un modèle HFIM simulant les concentrations cérébrales 151
Discussion et perspectives 179
Conclusion 191
Références 193

Liste des publications

N. Prébonnaud, M. Burtin, S. Marchand, N. Grégoire, C. Dahyot-Fizelier, V. Aranzana-Climent, A. Chauzy. Simulation-based prediction of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) index for linezolid to treat cerebral infections in critically ill patients. Article en écriture.

N. Prébonnaud, A. Chauzy, N. Grégoire, C. Dahyot-Fizelier, C. Adier, S. Marchand, V. Aranzana-Climent. A freely accessible, adaptable hollow-fiber setup to reproduce first-order absorption: illustration with linezolid cerebrospinal fluid pharmacokinetic data. Préprint disponible sur bioRxiv, doi 10.1101/2024.12.19.629487. Accepté le 28/03/2025 dans Microbiology Spectrum.

N. Prébonnaud, A. Chauzy, I. Martin, C. Adier, J. Moreau, C. Dahyot-Fizelier, S. Marchand. Cerebrospinal fluid versus Mueller-Hinton broth for *in vitro* PK/PD studies of antibiotics targeting cerebromeningeal infections: impact on the growth of *Staphylococcus aureus* and the effect of linezolid. Article en écriture.

Liste des communications orales

Noémie Prébonnaud, Alexia Chauzy, Marie Carine Dominique, Christophe Adier, Isabelle Martin, Ombeline Remy, Sandrine Marchand, Claire Dahyot-Fizelier – Linezolid and meropenem efficacy in artificial cerebrospinal fluid compared to Mueller-Hinton broth in an *in vitro* hollow-fiber infection model – *Session PK/PD en anesthésie et réanimation, Société Française d'Anesthésie et de Réanimation (SFAR), Paris, France, 19 Septembre 2024*

Noémie Prébonnaud, Alexia Chauzy, Christophe Adier, Isabelle Martin, Claire Dahyot-Fizelier, Sandrine Marchand – Impact of *in vitro* use of artificial cerebrospinal fluid compared to Mueller-Hinton broth on the efficacy of linezolid against Staphylococcus aureus in a hollow-fiber model – *ePoster flash Session, Tiny tubes, big insights: hollow fiber models illuminate anti-infective PK/PD, European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Barcelona, Spain, 28th April 2024*

Noémie Prébonnaud, Alexia Chauzy, Marie Dominique, Christophe Adier, Isabelle Martin, Claire Dahyot-Fizelier, Sandrine Marchand – Linezolid and meropenem *in vitro* efficacy in artificial cerebrospinal fluid compared to Mueller-Hinton broth in hollow-fiber – *Young Investigator Oral session, International Society of Anti-infective Pharmacology (ISAP) Meeting, Barcelona, Spain, 26th April 2024*

Noémie Prébonnaud, Alexia Chauzy, Claire Dahyot-Fizelier, Sandrine Marchand – Predicting antibacterial efficacy of linezolid on *Staphylococcus aureus* in cerebral infections using *in vitro* hollow fiber model and pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling – *Journée de Microbiologie et d'Immunologie Poitevine, Poitiers, France, 30 Novembre 2023*

Noémie Prébonnaud, Alexia Chauzy, Claire Dahyot-Fizelier, Sandrine Marchand – Predicting antibacterial efficacy of linezolid on *Staphylococcus aureus* in cerebral infections using *in vitro* hollow fiber model and pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling – *TAE/SAS Research Bites session, European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Copenhagen, Denmark, 15th April 2023*

Noémie Prébonnaud, Alexia Chauzy, Claire Dahyot-Fizelier, Sandrine Marchand – Predicting antibacterial efficacy of linezolid on *Staphylococcus aureus* in cerebral infections using *in vitro* hollow fiber model and pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling – *Young Investigator Oral session, International Society of Anti-infective Pharmacology (ISAP) Meeting, Copenhagen, Denmark, 14th April 2023*

Noémie Prébonnaud, Alexia Chauzy, Claire Dahyot-Fizelier, Sandrine Marchand – Pharmacocinétique-pharmacodynamie du linézolide sur *Staphylococcus aureus* par Hollow-Fiber – *Session PK/PD : efficacité et toxicité, Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI), Paris, France, 12 Décembre 2022*

Noémie Prébonnaud, Alexia Chauzy, Claire Dahyot-Fizelier, Sandrine Marchand – Pharmacocinétique-pharmacodynamie du linézolide sur *Staphylococcus aureus* par Hollow-Fiber – *Journée de Microbiologie et d'Immunologie Poitevine, Poitiers, France, 24 Novembre 2022*

Liste des abréviations

ABC	*ATP-binding cassette transporters* ou transporteurs ABC
AUC	*Area under the curve* ou Aire sous la courbe
BCRP	*Breast Cancer Resistance* Protein ou Protéine de résistance au cancer du sein
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BHL	Barrière hémato-liquidienne
CLSI	*Clinical and Laboratory Standards Institute*
CMI	Concentration minimale inhibitrice
DVE	Dérivation ventriculaire externe
DVI	Dérivation ventriculaire interne
ECS	Espace extra-capillaire
ELF	*Epithelial lining fluid* ou liquide de revêtement épithélial
EMA	*European Medicines Agency*
EUCAST	*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
FDA	*Food and Drug Administration*
FDA	*Food and Drug Administration*
HFIM	Modèle d'infection *in vitro d'hollow-fiber*
I	Bactérie sensible à forte dose
ICS	Espace intra-capillaire
IDSA	*Infectious Diseases Society of America*
JAM	Molécules d'adhésion de jonction
LCS	Liquide cérébrospinal
LCSa	Liquide cérébrospinal artificiel
LCSh	Liquide cérébrospinal humain
MHA	Mueller-Hinton Agar
MHB	Mueller-Hinton Broth
MRP	*Multidrug Resistance-associated Proteins* ou Protéines associées à la résistance aux médicaments
PCR	*Polymerase Chain Reaction*
PD	Pharmacodynamique
P-gp	P-glycoprotéine
PK	Pharmacocinétique
PK/PD	Pharmacocinétique/Pharmacodynamique

PTA	*Probability of target attainment* ou Probabilité d'atteindre la cible
PTC	Centre de la peptidyl-transférase
R	Bactérie résistante
S	Bactérie sensible à posologie standard
SARM	*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline
SERM	*Staphylococcus epidermidis* résistant à la méticilline
SNC	Système nerveux central
TKC	*Time-Kill curves*
ZO	Zonula occludens

Liste des figures

Figure 1. Représentation schématique du système nerveux central. Le système nerveux central comporte l'encéphale, incluant le cerveau, le tronc cérébral et le cervelet, ainsi que la moelle spinale ou moelle épinière. La coupe sagittale illustre le diencéphale, en couleur, qui est situé entre les deux hémisphères cérébraux. Créée avec Smart Servier Medical Art (3). 20

Figure 2. Représentation schématique des méninges sur une coupe frontale. L'arachnoïde et la pie-mère constituent les leptoméninges. Les méninges sont composées des leptoméninges et de la dure-mère. L'espace sous-arachnoïdien est rempli de liquide cérébrospinal (LCS). Le sinus sagittal supérieur est un sinus veineux recueillant le sang veineux de l'encéphale et le LCS en provenance des villosités arachnoïdiennes. D'après (2). 21

Figure 3. Représentation schématique des barrières cérébrales. La barrière hémato-encéphalique sépare le sang du parenchyme cérébral et la barrière hémato-liquidienne sépare le sang du liquide cérébrospinal. Adaptée à partir de (12). 22

Figure 4. Représentation schématique des principaux constituants de la barrière hémato-encéphalique. Adaptée à partir de (15). 23

Figure 5. Représentation schématique des jonctions serrées et adhérentes reliant les cellules endothéliales des capillaires de la barrière hémato-encéphalique. ZO-1 : zonula occludens-1. JAM : molécules d'adhésion de jonction. PECAM-1 : molécules d'adhésion des cellules endothéliales aux plaquettes-1. Adaptée à partir de (15). 24

Figure 6. Transports à travers la BHE. Dans les conditions physiologiques, les jonctions serrées bloquent le transport paracellulaire, ce qui est symbolisé par la croix rouge. Adaptée à partir de (17). 25

Figure 7. Structure de la barrière hémato-liquidienne (BHL). LCS : liquide cérébrospinal. Adaptée à partir de (15). 26

Figure 8. Représentation schématique du système ventriculaire cérébral. Le système ventriculaire cérébral est composé de quatre ventricules. Les deux principaux sont les ventricules latéraux qui sont situés symétriquement dans les hémisphères cérébraux. Ils sont reliés au 3ème ventricule par le foramen de Monro, lui-même relié au 4ème ventricule par l'aqueduc de Sylvius. Le 4ème ventricule cérébral se prolonge pour former le canal central de la moelle spinale. Chaque ventricule possède un plexus choroïde sécrétant le LCS. Les foramens de Luschka et de Magendie permettent l'écoulement du LCS vers l'espace sous-arachnoïdien. Adaptée à partir de (1) 27

Figure 9. Représentation schématique de la sécrétion du LCS par les plexus choroïde. L'encart de gauche présente la structure d'un plexus choroïde, montrant des cellules épithéliales reposant sur une membrane basale, sous laquelle se trouvent des capillaires au sein du stroma. L'encart de droite

montre les transporteurs ioniques situés à l'extrémité apicale et basale de la cellule épithéliale choroïdienne. Adaptée d'après (1)..... 28
Figure 10. Circulation du liquide cérébrospinal. Le LCS circule depuis les quatre ventricules vers l'espace sous-arachnoïdien en passant par les foramens de Luschka et le foramen de Magendie. Il est résorbé dans le sang veineux du sinus sagittal supérieur en passant par les granulations arachnoïdiennes. Adaptée à partir de (1). 30
Figure 11. Taux d'infection selon les différentes procédures à l'origine des infections neuro-méningées associées aux soins. C : Craniotomie, DLE : Dérivation lombaire externe, DVE : dérivation ventriculaire externe, DVI : dérivation ventriculaire interne, TC : traumatisme crânien. D'après (44–48). 32
Figure 12. Schéma représentant une dérivation ventriculaire externe. D'après Merlin Evans (49). . 33
Figure 13. Voies de contamination de la dérivation ventriculaire externe (DVE). Le liquide cérébrospinal peut s'infecter par voie extraluminale ou par voie intraluminale lors de l'insertion ou lors de manipulations de la DVE..... 35
Figure 14. Diagramme circulaire représentant les germes retrouvés dans 523 cultures positives de liquide cérébrospinal. D'après (43). 36
Figure 15. Représentation schématique de la ponction lombaire. Créée avec Biorender.com. 37
Figure 16. Diagramme décisionnel pour le diagnostic des infections neuro-méningées associées aux soins. Adaptée d'après (42). 40
Figure 17. Protocole de détermination de la CMI. Créée avec Biorender.com..... 41
Figure 18. Appareil semi-automatisé Vitek®2 avec un exemple de carte. D'après (78)..... 42
Figure 19. Antibiogramme d'une souche de *Serratia marcescens*. La bactérie est probablement sensible à l'antibiotique contenu dans le deuxième disque (situé sur la ligne du haut, en partant de la gauche), tandis qu'elle se montre résistante à celui du troisième disque, puisqu'il y a croissance de la bactérie au contact de ce dernier. D'après (81)..... 43
Figure 20. Traduction protéique inhibée par le linézolide. La traduction protéique comprend trois étapes : l'initiation, suivie de l'élongation, puis de la terminaison. Le linézolide est représenté par un losange rose. Son impact, illustré par des croix roses, montre qu'il inhibe la traduction protéique dès la phase d'initiation, empêchant ainsi l'élongation et la terminaison de se dérouler. E, P et A symbolise les différents sites de la peptidyl-transférase. Créée avec Biorender.com. 46
Figure 21. Structure chimique du linézolide. D'après (90,99,100). 47
Figure 22. Profils pharmacocinétiques des concentrations libres dans le plasma et le LCS pour un des patients inclus dans l'étude PK-Pop-LCR...... 48
Figure 23. Représentation schématique de la PK, la PD et de la PK/PD. D'après (106). 49

Figure 24. Les trois index PK/PD couramment utilisés. *f* signifiant *free*, c'est-à-dire que ce sont les concentrations libres qui sont utilisées. D'après (114). 50
Figure 25. Relation entre la variation du nombre de *Staphylococcus aureus* observée à 24 h par rapport à l'inoculum initial dans la cuisse de souris pour les trois index PK/PD (AUC/MIC, T>MIC, C_{max}/CMI) du linézolide. Les points correspondent à la variation des comptages bactériens observée à 24 h pour un schéma posologique par rapport à l'inoculum initial pour deux souris. La ligne correspond à la courbe de corrélation après ajustement avec le modèle E_{max} sigmoïde. Adaptée à partir de (122). 52
Figure 26. Structure du modèle de pharmacocinétique de population développé dans l'étude PK-POP-LCR. Q_{in} correspondant au débit d'entrée du linézolide vers le LCS et Q_{out} correspondant au débit de sortie du linézolide vers le plasma. CL correspond à la clairance du linézolide. Deb correspond au débit d'élimination du linézolide par la DVE. 53
Figure 27. Représentation des PTA pour un index PK/PD du linézolide d'AUC/CMI supérieur à 100. La gamme de CMI retrouvée pour les bactéries étudiées est présentée en abscisse. La distribution des CMI, c'est-à-dire la fréquence de la CMI est présentée sur l'axe des ordonnées de droite avec les histogrammes pour les SARM (gris foncé) et les SERM (gris clair). Les PTA pour différents schémas posologiques sont représentés par les lignes avec la dose journalière de 1200 mg (rouge), 1800 mg (bleu) et 2700 mg (rose). Les PTA sont exprimés en pourcentage sur l'axe des ordonnées de gauche. 54
Figure 28. Protocole de réalisation d'une TKC. Créée avec BioRender.com. 57
Figure 29. Représentation schématique d'un modèle *in vitro* d'infection à un compartiment. D'après (131). 58
Figure 30. Représentation schématique du modèle d'*hollow-fiber.* Les flèches noires correspondent à la direction du flux. Les flèches vertes indiquent les sites de prélèvements. La ligne en pointillés gris représente l'incubateur à 37°C ± 2°C. La ligne en pointillés bleus correspond à la boîte réfrigérée (2-10°C). Créée avec BioRender.com. 59
Figure 31. Coupe transversale de la cartouche de dialyse utilisée dans l'HFIM. Créée avec BioRender.com. 60
Figure 32. Profils pharmacocinétiques moyens du ceftolozane et du tazobactam dans le plasma et le liquide de revêtement épithélial (ELF). Les concentrations de ceftolozane sont présentées sur le graphique de gauche tandis que celui de droite présente les concentrations de tazobactam. Les concentrations plasmatiques obtenues pour la première dose sont indiquées en rouge, celles de la dernière dose en noir, et les concentrations dans l'ELF pour la dernière dose en bleu. Issue de (141). 61

Figure 33. Concentrations de ceftolozane et de tazobactam reproduites dans l'HFIM. Les concentrations de ceftolozane sont présentées sur le graphique de gauche tandis que celui de droite présente les concentrations de tazobactam. La ligne pleine correspond à ce qu'ils cherchaient à reproduire et les points correspondent aux concentrations réellement observées. Issue de (142).... 62
Figure 34. Représentation schématique d'un modèle PK mono-compartimental. C correspond à la concentration d'antibiotique. ke correspond à la constante de vitesse d'élimination de l'antibiotique. k_{deg} correspond à la constante de vitesse de dégradation de l'antibiotique. Créée avec draw.io (163). 64
Figure 35. Représentation schématique d'un modèle bactérien pour une population bactérienne homogène. B correspond à une population bactérienne homogène. k_{growth} correspond à la constante de vitesse de croissance bactérienne tandis que k_{death} correspond à la constante de vitesse de mort bactérienne. Créée avec draw.io (163). 65
Figure 36. Représentation schématique d'un modèle d'adaptation. S correspond à une population bactérienne homogène. k_{growth}, correspond à la constante de vitesse de croissance bactérienne tandis que k_{death} correspond à la constante de vitesse de mort bactérienne. C correspond à la concentration en antibiotique. ke correspond à la constante de vitesse d'élimination de l'antibiotique. AR_{off} et AR_{on} représentent respectivement la proportion de bactéries non adaptées et adaptées. k_{on} correspond à la constante de vitesse de passage d'un état non adapté à adapté. k_{off} correspond à la constante de vitesse de passage d'un état adapté à non adapté. Créée avec draw.io (163)..... 67
Figure 37. Représentation schématique d'un modèle avec deux sous-populations bactérienne. S et R correspondent aux sous-populations bactérienne, respectivement, sensible et résistante. k_{growth}, correspond à la constante de vitesse de croissance bactérienne tandis que k_{death} correspond à la constante de vitesse de mort bactérienne. C correspond à la concentration en antibiotique. ke correspond à la constante de vitesse d'élimination de l'antibiotique. Un effet sur la population S (Effet_S) est distingué de celui sur la population R (Effet_R). Créée avec draw.io (163). 67
Figure 38. Représentation schématique d'un modèle de persistance. S correspond à la sous-population sensible et R correspond à la sous-population persistante. Le transfert de la population S vers la population R est caractérisé par la constante de vitesse k_{SR} et inversement par k_{RS}. k_{growth} correspond à la constante de vitesse de croissance bactérienne tandis que k_{death} correspond à la constante de vitesse de mort bactérienne. C correspond à la concentration en antibiotique. ke correspond à la constante de vitesse d'élimination de l'antibiotique. Créé avec draw.io (163)..... 68
Figure 39. Comparaison des comptages bactériens de SA29213 obtenus après simulations avec le modèle PD développé à partir des TKC et ceux observés en HFIM sur 30 h. La ligne violette correspond aux comptages bactériens simulés par le modèle PD développé à partir des TKC réalisées sur la souche SA29213 de l'article 1 de la thèse. Les points correspondent aux comptages bactériens observés lors

de la réalisation des HFIM reproduisant les concentrations de linézolide observées dans le LCS des patients de réanimation pour trois schémas posologiques. Les HFIM ont été réalisés dans du MHB (article 3 de la thèse). 182
Figure 40. Comparaison des comptages bactériens de SA29213 obtenus après simulations avec le modèle PD développé à partir des TKC et ceux observés en HFIM sur 96 h. La ligne violette correspond aux comptages bactériens simulés par le modèle PD développé à partir des TKC réalisées sur la souche SA29213 (article 1 de la thèse). Les points correspondent aux comptages bactériens observés lors de la réalisation des HFIM reproduisant les concentrations de linézolide observées dans le LCS des patients de réanimation pour trois schémas posologiques. Les HFIM ont été réalisés dans du MHB (article 3 de la thèse). 183
Figure 41. Evolution du nombre de bactéries en fonction de la taille des cellules pour le LCSa, LCSh et MHB (n=1). Analyse de 100 µL d'une population à 10^6 UFC/mL à T0. La ligne bleue correspond à la médiane du pic obtenu dans le MHB. 186
Figure 42. Evolution de la population de SA29213 ayant intégré la D-Alanine marquée dans le MHB, LCSa et LCSh en absence d'antibiotique (n=3 dans le MHB, n=2 pour LCSh et LCSa). Les points correspondent aux valeurs obtenues pour chaque réplicat. La ligne correspond à la moyenne. 187
Figure 43. Courbes de croissance dans le MHB, le LCSh et le LCSa (n = 2, sauf PA 167, n = 3) de neuf souches de *Pseudomonas aeruginosa*. Sept souches cliniques et deux souches de référence : PA 218 qui correspond à *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et PA 167 qui correspond à *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692 ont été testées. Les lignes correspondent aux dénombrements bactériens dans le MHB (jaune), le LCSh (rouge) et le LCSa (bleu). La ligne en pointillés correspond à la limite de quantification. 188
Figure 44. Dénombrements bactériens d'une souche de référence de *Pseudomonas aeruginosa* (PA167) et d'une souche clinique (PA640) observés pendant les TKC (n = 1) effectuées dans le MHB, le LCSh et le LCSa. Les lignes correspondent aux dénombrements bactériens et chaque couleur correspond à une concentration de méropénème en mg/L. 189
Figure 45. Schéma représentatif d'un HFIM miniaturisé. 190

Liste des tableaux

Tableau 1. Composition du LCS comparée à celle dans le plasma. 29

Tableau 2. Analyse macroscopique, cytologique et biochimique du LCS normal et en cas de méningite bactérienne. D'après (35,36,61).↑ : augmentation, ↓ : diminution. 38

Introduction

1. Le cerveau, un organe bien protégé

Les infections neuro-méningées sont des atteintes du système nerveux central (SNC). Le SNC est composé de l'encéphale et de la moelle spinale ou moelle épinière (1,2). L'encéphale, situé dans la boite crânienne, comprend les hémisphères cérébraux ou cerveau, le diencéphale qui est entouré par les deux hémisphères cérébraux, le tronc cérébral qui se trouve dans la continuité du diencéphale et enfin le cervelet (2). Une représentation schématique du SNC est présentée dans la **Figure 1**.

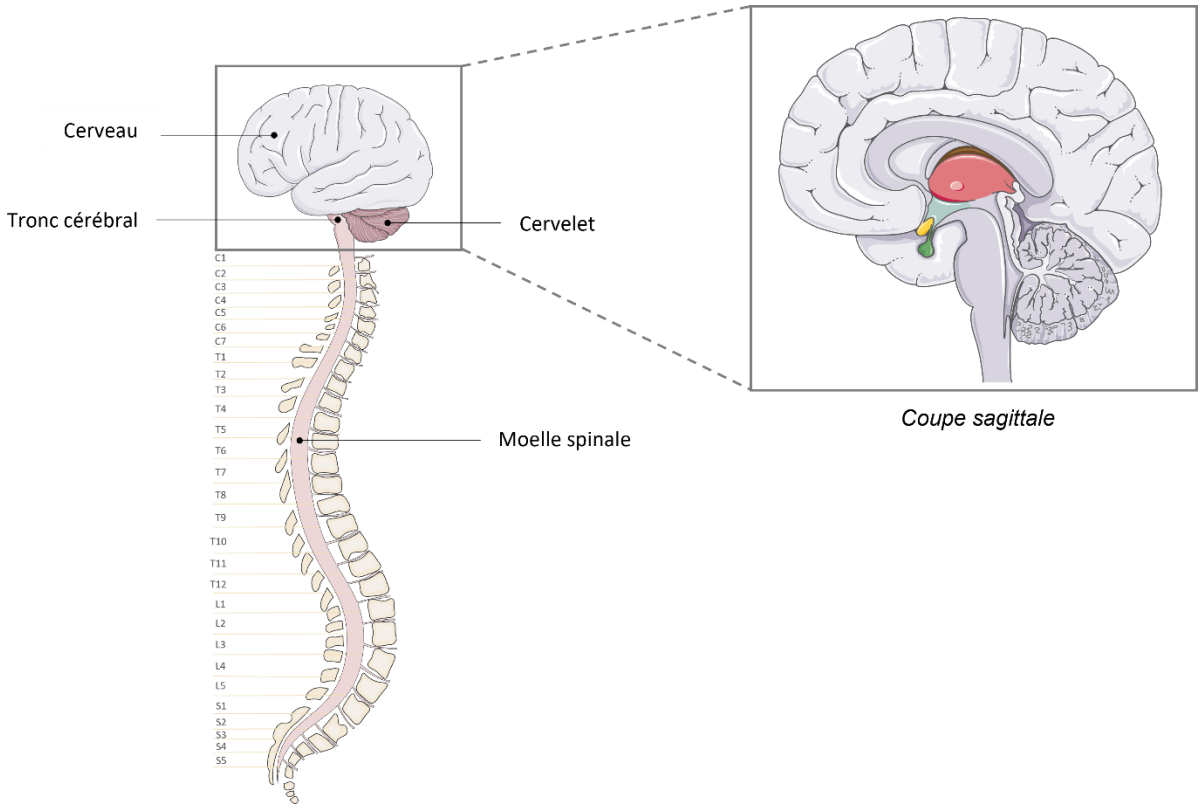


Figure 1. Représentation schématique du système nerveux central. Le système nerveux central comporte l'encéphale, incluant le cerveau, le tronc cérébral et le cervelet, ainsi que la moelle spinale ou moelle épinière. La coupe sagittale illustre le diencéphale, en couleur, qui est situé entre les deux hémisphères cérébraux. Créée avec Smart Servier Medical Art (3).

Le SNC, étant fragile, est protégé contre les chocs et les traumatismes, d'abord par le crâne et la colonne vertébrale, puis par les méninges et enfin par le liquide cérébrospinal (LCS) (1,2). Au-delà de cette protection mécanique, les barrières cérébrales limitent l'entrée, depuis le sang, des médicaments et autres molécules exogènes potentiellement neurotoxiques (4).

1.1. Les méninges

Les méninges se composent de trois membranes distinctes : la dure-mère, l'arachnoïde et la pie-mère (1,2,5–7). Une représentation schématique des différentes membranes constituant les méninges est présentée dans la **Figure 2**.

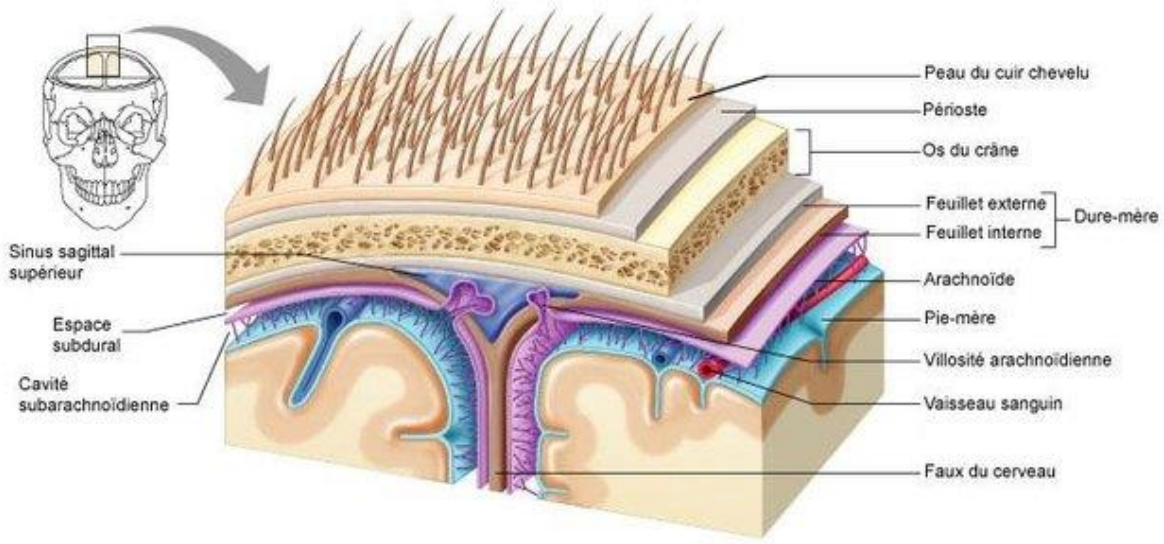


Figure 2. Représentation schématique des méninges sur une coupe frontale. L'arachnoïde et la pie-mère constituent les leptoméninges. Les méninges sont composées des leptoméninges et de la dure-mère. L'espace sous-arachnoïdien est rempli de liquide cérébrospinal (LCS). Le sinus sagittal supérieur est un sinus veineux recueillant le sang veineux de l'encéphale et le LCS en provenance des villosités arachnoïdiennes. D'après (2).

La dure-mère, également appelée pachyméninge, est la membrane la plus externe des méninges. Elle recouvre les leptoméninges, qui comprennent l'arachnoïde et la pie-mère (1,5). Accolée à la boîte crânienne, la dure-mère est une membrane épaisse, inélastique et vascularisée (1,5). Elle est constituée de deux couches distinctes :

- un feuillet externe, ou couche périostée, riche en vaisseaux sanguins (5,6),
- et un feuillet interne, ou couche méningée qui, d'une part, s'enfonce dans l'encéphale pour former des cloisons, comme la faux du cerveau qui sépare les deux hémisphères cérébraux et, d'autre part, se prolonge autour de la moelle spinale pour constituer la dure-mère spinale (2,6).

Ces deux couches sont généralement soudées, sauf dans certaines régions de l'encéphale où elles se séparent pour former des sinus veineux, qui assurent le drainage du sang veineux cérébral (1,2,5,6). Autour de ces sinus veineux, des vaisseaux lymphatiques ont été récemment mis en évidence (8).

Sous la dure-mère se situe l'arachnoïde qui correspond à la couche externe des leptoméninges (1,5). C'est une membrane fine et peu vascularisée (1,5,7). Elle émet des prolongements, appelés trabécules arachnoïdiens, qui s'étendent dans l'espace sous-arachnoïdien jusqu'à la pie-mère (2,5,7). L'espace sous-arachnoïdien est rempli de LCS et traversé par des vaisseaux sanguins (1,2,5,7). L'arachnoïde forme des granulations ou villosités arachnoïdiennes en traversant la dure-mère à

certains endroits pour rejoindre la lumière des sinus veineux. Ces granulations ont pour but d'éliminer le LCS dans le sang veineux des sinus veineux (1,2,7).

Enfin, l'enveloppe la plus interne, la pie-mère, est une membrane fine, délicate et vascularisée (1,2,5). Elle adhère étroitement à tous les replis de l'encéphale (1,2,5) et à la moelle spinale (2).

1.2. Les barrières cérébrales

Sous la pie-mère se trouve le parenchyme cérébral, un tissu principalement composé de neurones et de cellules gliales (2). C'est un tissu richement vascularisé grâce à de nombreux capillaires qui assurent ses besoins énergétiques importants. Toutefois, pour garantir son bon fonctionnement, il est nécessaire de maintenir l'homéostasie du milieu extracellulaire. En effet, certains acides aminés, tels que le glutamate et la glycine, agissent comme neurotransmetteurs et leur concentration plasmatique varie selon l'apport protéique des repas. De la même manière, une activité sportive intensive va augmenter les concentrations en potassium et en protons, impliquées dans la régulation de l'influx nerveux et l'excitabilité neuronale. Des variations importantes de ces composés dans l'espace extracellulaire du parenchyme cérébral perturberaient l'activité neuronale et détruiraient les tissus nerveux (1,2,4). Ainsi, les échanges entre le sang et l'espace extracellulaire du parenchyme cérébral doivent être strictement contrôlés. Pour cela, deux barrières physiologiques assurent cette régulation : la barrière hémato-encéphalique (BHE), qui sépare le sang de l'espace extracellulaire du parenchyme cérébral, et la barrière hémato-liquidienne (BHL), qui délimite le compartiment sanguin du LCS (4,9–11). Une représentation schématique est présentée dans la **Figure 3**.

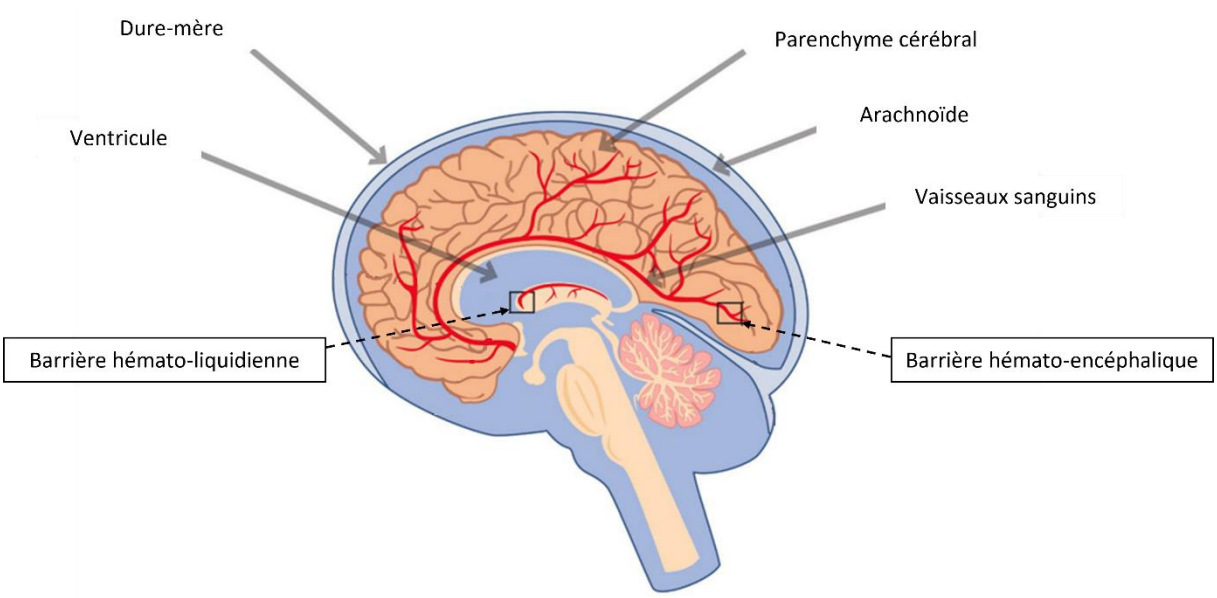


Figure 3. Représentation schématique des barrières cérébrales. La barrière hémato-encéphalique sépare le sang du parenchyme cérébral et la barrière hémato-liquidienne sépare le sang du liquide cérébrospinal. Adaptée à partir de (12).

1.2.1. La barrière hémato-encéphalique (BHE)

La principale barrière est la BHE, qui offre une vaste surface d'échange, estimée entre 12 et 18 m² chez l'adulte (10). C'est une membrane semi-perméable séparant le sang de l'espace extracellulaire du parenchyme cérébral (13,14). Elle est formée par les cellules endothéliales des capillaires se trouvant dans le parenchyme cérébral, de péricytes, d'une membrane basale, de cellules gliales telles que les astrocytes et la microglie, ainsi que des neurones. L'ensemble constitue ce qu'on appelle l'unité neurovasculaire (4,9,15,16). Une représentation schématique de la BHE est présentée dans la **Figure 4**.

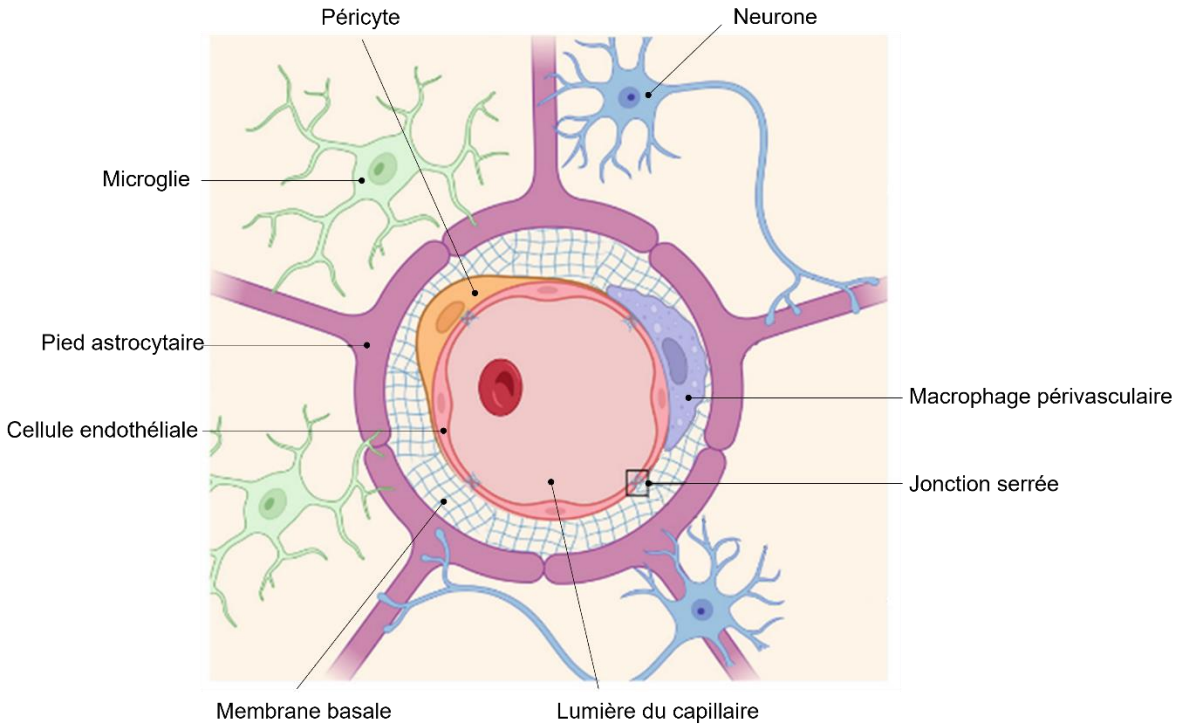


Figure 4. Représentation schématique des principaux constituants de la barrière hémato-encéphalique. Adaptée à partir de (15).

Contrairement aux capillaires retrouvés dans d'autres organes, ceux dans le cerveau sont formés d'une couche de cellules endothéliales non fenestrées, reliées par des jonctions serrées et adhérentes, constituant ainsi une barrière bloquant la diffusion paracellulaire et, par conséquent, le passage d'ions et de molécules solubles dans l'eau (1,4,14,15).

Les jonctions serrées sont constituées de protéines transmembranaires, principalement des occludines, des claudines et des molécules d'adhésion de jonction (JAM), ainsi que de protéines cytoplasmiques telles que la zonula occludens-1 (ZO-1), qui sont reliées au cytosquelette d'actine des cellules endothéliales (4,10,15,16). Les jonctions adhérentes permettent l'assemblage des jonctions serrées (10,15). Elles sont principalement composées de la cadhérine, une protéine

transmembranaire, ainsi que de la caténine et de la p120, des protéines cytoplasmiques qui se fixent au cytosquelette d'actine des cellules endothéliales (4,10,15,16). Une représentation schématique des jonctions serrées et adhérentes est présentée dans la **Figure 5**.

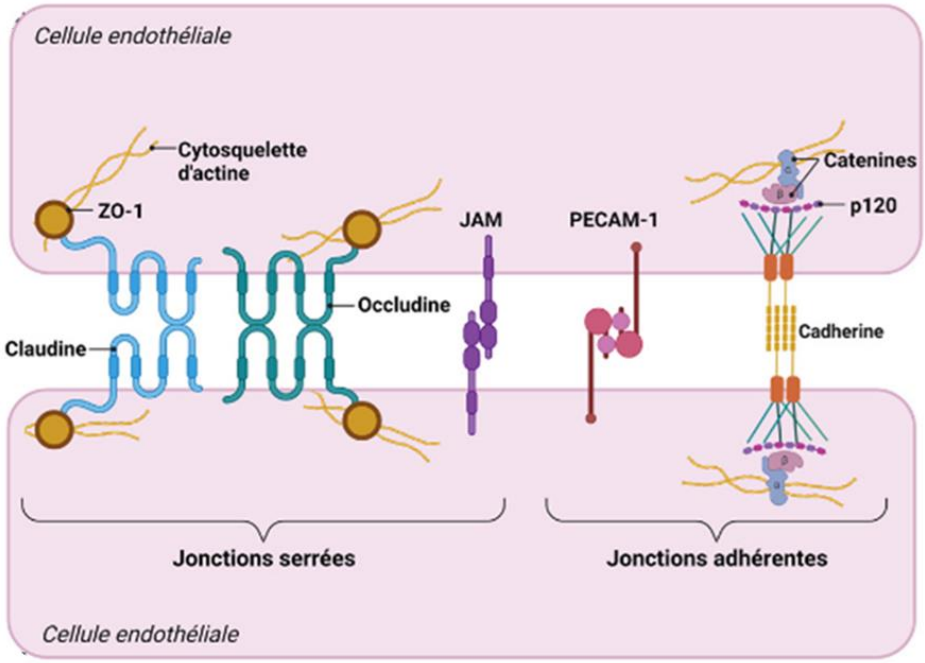


Figure 5. Représentation schématique des jonctions serrées et adhérentes reliant les cellules endothéliales des capillaires de la barrière hémato-encéphalique. ZO-1 : zonula occludens-1. JAM : molécules d'adhésion de jonction. PECAM-1 : molécules d'adhésion des cellules endothéliales aux plaquettes-1. Adaptée à partir de (15).

De plus, l'activité vésiculaire des cellules endothéliales est réduite, limitant ainsi le transport de solutés par cette voie (4,10,13–16). Ainsi, pour maintenir l'homéostasie, les cellules endothéliales de la BHE sont équipées de pompes ioniques, telles que la pompe Na^+, K^+-ATPase, qui régule les concentrations de sodium et de potassium dans l'espace extracellulaire du parenchyme cérébral, ainsi que de co-transporteurs Na^+, K^+, Cl^- (4,13). De plus, des canaux de type aquaporine permettent la diffusion de l'eau (1). Le glucose, les acides aminés et d'autres nutriments sont acheminés vers l'espace extracellulaire du parenchyme cérébral par l'intermédiaire de transporteurs spécifiques, dont GLUT-1 pour le glucose (10,15,16). Les molécules plus grosses, telles que l'insuline et la transferrine, par exemple, seront apportées par transcytose médiée par des récepteurs (4,10,11). En outre, les cellules endothéliales de la BHE sont pourvues de pompes d'efflux appartenant à la famille de transporteurs ABC, tels que la P-glycoprotéine (P-gp, ABCB1), les protéines associées à la résistance aux médicaments (MRP ou ABCC) et la protéine de résistance au cancer du sein (BCRP, ABCG2), permettant d'éliminer les substances toxiques pour le tissu neuronal, telles que les métabolites endogènes et les médicaments (4,10). Toutefois, certains gaz essentiels comme l'oxygène et le dioxyde de carbone, ainsi

que les petites molécules lipophiles (< 400 Dalton), traversent la BHE par diffusion passive (1,4,10). Les différents modes de transport à travers la BHE sont résumés dans la **Figure 6**.

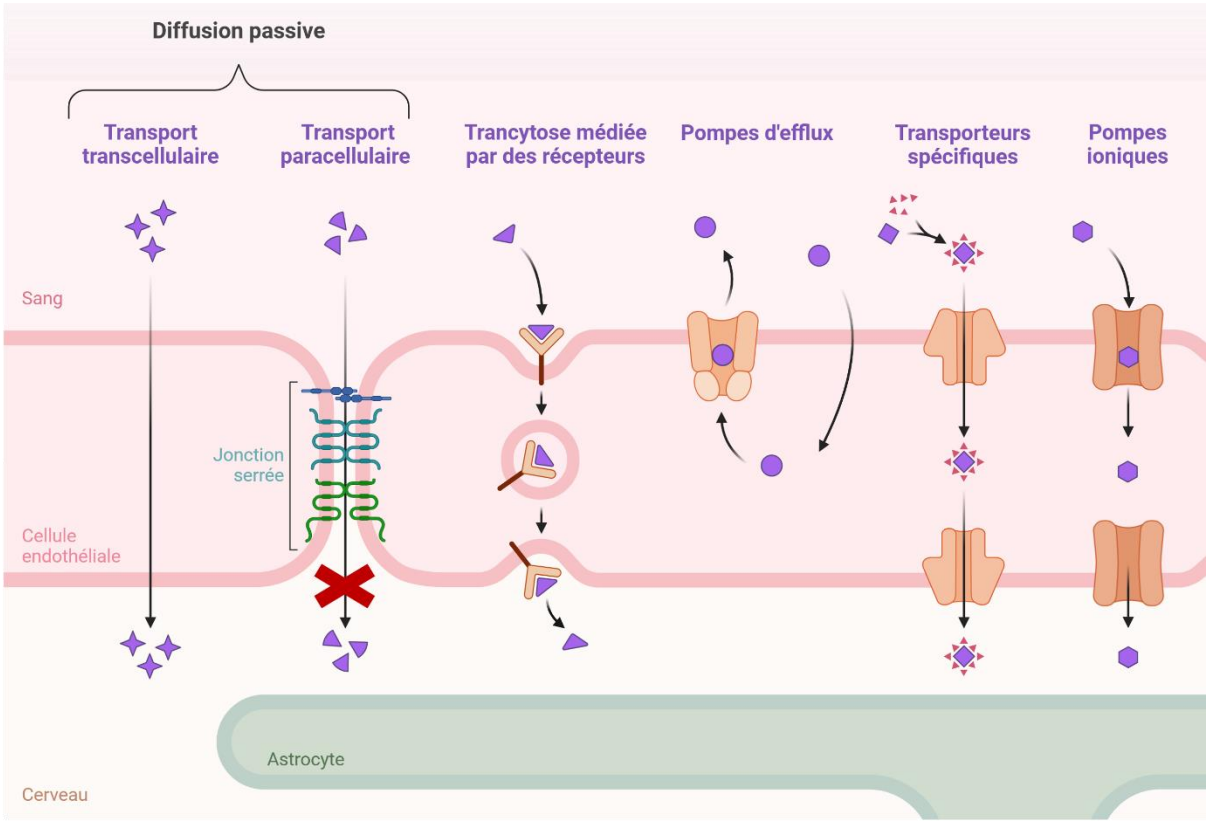


Figure 6. Transports à travers la BHE. Dans les conditions physiologiques, les jonctions serrées bloquent le transport paracellulaire, ce qui est symbolisé par la croix rouge. Adaptée à partir de (17).

Les cellules endothéliales sont en grande partie recouvertes de cellules murales, appelées péricytes, qui sont intégrées dans la membrane basale (15,16). Avec les cellules endothéliales, les péricytes contribuent à la production de cette membrane (15). Les péricytes ont pour rôle d'assurer l'intégrité de la BHE, favoriser l'angiogenèse et maintenir la stabilité des capillaires. Ils sont dotés de capacité contractile, permettant ainsi de réguler le débit sanguin cérébral, et de capacité phagocytaire, contribuant à l'élimination des déchets (4,15,16).

La membrane basale est constituée de deux membranes : la membrane basale endothéliale, sécrétée par les cellules endothéliales et les péricytes, ainsi que d'une membrane basale parenchymateuse, sécrétée par les astrocytes. Cette membrane basale apporte un soutien structurel aux capillaires de la BHE et constitue une barrière supplémentaire à traverser pour atteindre l'espace extracellulaire du parenchyme cérébral (11,15,16).

Les astrocytes sont les cellules gliales les plus importantes dans le parenchyme cérébral (2,4,15,16). Grâce à leurs prolongements appelés pieds, ils recouvrent presque totalement les capillaires et se situent à l'interface entre les neurones et ces derniers, où ils relaient le signal nerveux

et régulent le débit sanguin des capillaires cérébraux (4,16). Ils vont également recapter les neurotransmetteurs libérés par les neurones (2,4).

En outre, des cellules immunitaires cérébrales sont également présentes au niveau de la BHE. Elles incluent les microglies et les macrophages périvasculaires, qui s'activent en réponse à une inflammation (10). Les microglies sont les cellules immunitaires résidentes dans le parenchyme cérébral depuis le développement embryonnaire (4,10,16). Dérivées des macrophages, elles ont la capacité de phagocyter des pathogènes et de jouer un rôle de cellules présentatrices de l'antigène (1). Les macrophages périvasculaires, quant à eux, sont principalement impliqués dans la phagocytose des débris cellulaires (16).

1.2.2. La barrière hémato-liquidienne (BHL)

La BHL constitue la deuxième barrière cérébrale puisqu'elle représente une surface d'échange de seulement 0.021 m^2 (18). Elle est principalement formée par les cellules épithéliales des plexus choroïdes et complétée par la membrane arachnoïdienne des méninges, délimitant ainsi le sang du LCS (19,20).

Les plexus choroïdes sont situés à l'intérieur de chaque ventricule cérébral et consiste en une monocouche de cellules épithéliales reposant sur une membrane basale, sous laquelle se situe un stroma contenant des capillaires (19,21,22). Contrairement à la BHE, l'endothélium de la BHL est fenestré, avec des cellules endothéliales reliées par des jonctions gap, ce qui ne constitue pas une barrière (19,20,23). La barrière est formée par les cellules épithéliales des plexus choroïdes qui sont reliées entre elles par des jonctions serrées, inhibant ainsi la diffusion paracellulaire des molécules hydrosolubles (11,22). Une représentation schématique de la BHL est présentée dans la **Figure 7**.

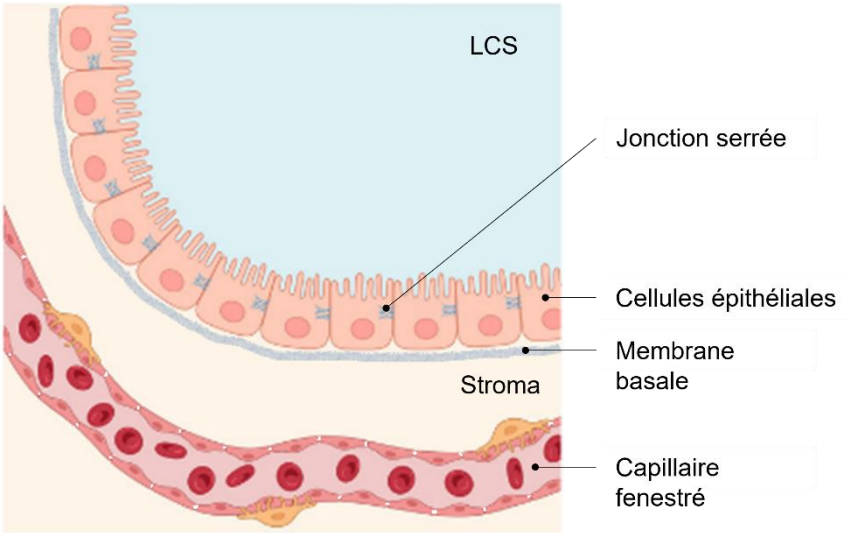


Figure 7. Structure de la barrière hémato-liquidienne (BHL). LCS : liquide cérébrospinal. Adaptée à partir de (15).

Comme pour la BHE, les gaz essentiels vont traverser la BHL par diffusion passive (19,22). Les cellules épithéliales de la BHL sont pourvues de pompes ioniques, permettant la diffusion des ions Na^+, K^+, Cl^- et HCO_3^- principalement, de canaux de type aquaporine pour la diffusion de l'eau, et de transporteurs spécifiques pour la diffusion de glucose et d'acide-aminés. Toutefois, l'expression de ces différents transporteurs diffère entre les deux barrières, en termes de quantité et de répartition entre les pôles apical et basal (19,22). Par exemple, la P-gp est bien moins exprimée au niveau des cellules épithéliales de la BHL comparé à la BHE (22). Ces différents transporteurs contribuent à la régulation de la composition du LCS, dont la sécrétion constitue le principal rôle des plexus choroïdes (24–26).

1.3. Le liquide cérébrospinal (LCS)

Le LCS est un liquide clair, aqueux, dérivé du plasma dans lequel le SNC flotte (1,25). Chez l'adulte, le volume total de LCS est d'environ 150 mL (1,2,19,25). Ce liquide occupe l'espace sous-arachnoïdien cérébral et spinal, ainsi que le canal central de la moelle spinale, pour un volume total de 125 mL, tandis que les 25 mL restants se trouvent dans le système ventriculaire (9,24,27).

Le système ventriculaire cérébral est présenté dans la **Figure 8**. Il se compose des deux ventricules latéraux, qui sont les plus grands et situés symétriquement dans chaque hémisphère cérébral, du troisième ventricule situé dans le diencéphale et du quatrième ventricule localisé au niveau du tronc cérébral (1,2).

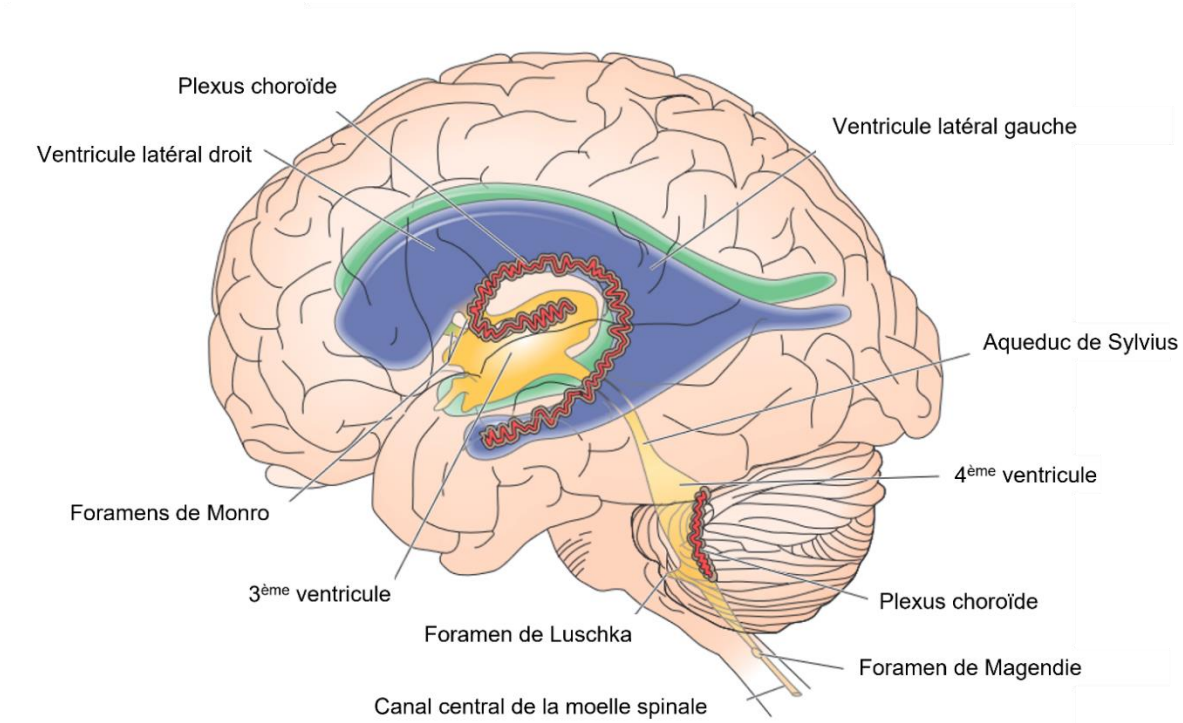


Figure 8. Représentation schématique du système ventriculaire cérébral. Le système ventriculaire cérébral est composé de quatre ventricules. Les deux principaux sont les ventricules latéraux qui sont

situés symétriquement dans les hémisphères cérébraux. Ils sont reliés au 3ème ventricule par le foramen de Monro, lui-même relié au 4ème ventricule par l'aqueduc de Sylvius. Le 4ème ventricule cérébral se prolonge pour former le canal central de la moelle spinale. Chaque ventricule possède un plexus choroïde sécrétant le LCS. Les foramens de Luschka et de Magendie permettent l'écoulement du LCS vers l'espace sous-arachnoïdien. Adaptée à partir de (1)

Les ventricules sont tapissés par un épithélium épendymaire, qui forme une barrière entre le LCS et le parenchyme cérébral (19). A l'intérieur de chaque ventricule se trouve un plexus choroïde (**Figure 8**) qui sécrète environ 80 % du LCS, tandis que les 20 % restants proviendraient d'autres structures, comme les capillaires de la BHE situés dans le parenchyme cérébral (19,23).

La sécrétion du LCS se fait en deux étapes : d'abord, une filtration passive du sang à travers l'endothélium des capillaires fenestrés des plexus choroïdes, suivie d'une sécrétion régulée par des transports actifs d'ions, notamment de sodium, de chlorures et de bicarbonates, au niveau des cellules épithéliales des plexus choroïdes, ainsi que par des transports spécifiques permettant l'apport de glucose, d'acides aminés et de neurotransmetteurs (1,23). Une représentation schématique de la sécrétion du LCS est présentée dans la **Figure 9**.

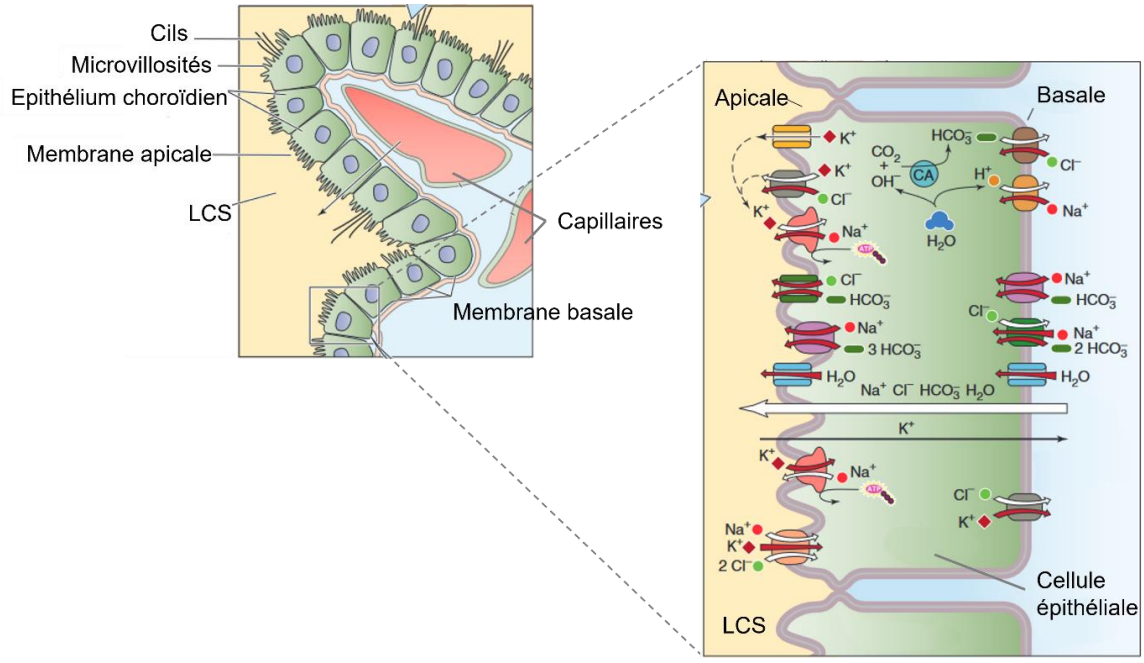


Figure 9. Représentation schématique de la sécrétion du LCS par les plexus choroïde. L'encart de gauche présente la structure d'un plexus choroïde, montrant des cellules épithéliales reposant sur une membrane basale, sous laquelle se trouvent des capillaires au sein du stroma. L'encart de droite montre les transporteurs ioniques situés à l'extrémité apicale et basale de la cellule épithéliale choroïdienne. Adaptée d'après (1).

Ainsi, le LCS ne constitue pas uniquement un ultrafiltrat du sang (1,19,27), ce qui explique pourquoi les concentrations en potassium et en protéines, par exemple, sont plus faibles dans le LCS que dans le sang (1). Les compositions du plasma et du LCS sont présentées dans le **Tableau 1**.

Tableau 1. Composition du LCS comparée à celle dans le plasma.

Soluté	Plasma	Références	CSF	Références
Na^+ (mM)	136-145	(28,29)	135-150	(1,26,30–33)
K^+ (mM)	3,4-4,5	(28,29)	2,6-3,0	(1,26,30–33)
Ca^{2+} (mM)	2,15-2,5	(28,29)	1,0-1,4	(1,26,30–33)
Mg^{2+} (mM)	0,66-1,07	(28)	1,1-1,5	(1,26,30–33)
Cl^- (mM)	98-107	(28,29)	111,9-130	(1,26,30–33)
HCO_3^- (mM)	22-29	(1,28,29)	22-27	(1,26,30,32,33)
Phosphates (mM)	0,81-1,45	(28)	0,4-1,1	(1,26,30–33)
Glucose (mM)	4,1-6,05	(28,29)	2,8-4,4	(30–33)
Protéines (g/L)	64-83	(1,28,29)	0,1-0,4	(1,26,30,31)
Acide-aminés (mM)	2,6	(1)	0,7	(1,26)
pH	7,35-7,45	(28)	7,28-7,33	(1,26,30–33)
Osmolarité (mOsm)	290	(28)	280-300	(1,26,30–32)

Le LCS serait sécrété à un débit d'environ 0,3 à 0,4 mL/min (9,23,29), ce qui correspond à une production journalière d'environ 500 mL (1,9,19,25). Etant donné que le volume total de LCS est d'environ 150 mL, celui-ci serait entièrement renouvelé environ trois fois par jour (1,9,19). Toutefois, la composition du LCS peut varier, avec par exemple, la concentration de glucose, qui fluctue au cours de la journée en fonction de l'alimentation, avec des valeurs comprises entre 2,8 et 4,4 mM (34). Toutefois, la concentration en glucose représente généralement 2/3 de la glycémie (35,36).

Le LCS sécrété dans les ventricules latéraux rejoint ensuite le troisième ventricule par les foramens de Monro puis le quatrième ventricule par l'aqueduc de Sylvius (**Figure 8**). Le LCS s'écoule ensuite dans le canal central de la moelle spinale qui est en continuité du quatrième ventricule. Il rejoint l'espace sous-arachnoïdien par les deux foramens de Luschka situés latéralement et par le foramen de Magendie (1,19,25). Une représentation schématique de la circulation du LCS est présentée dans la **Figure 10**.

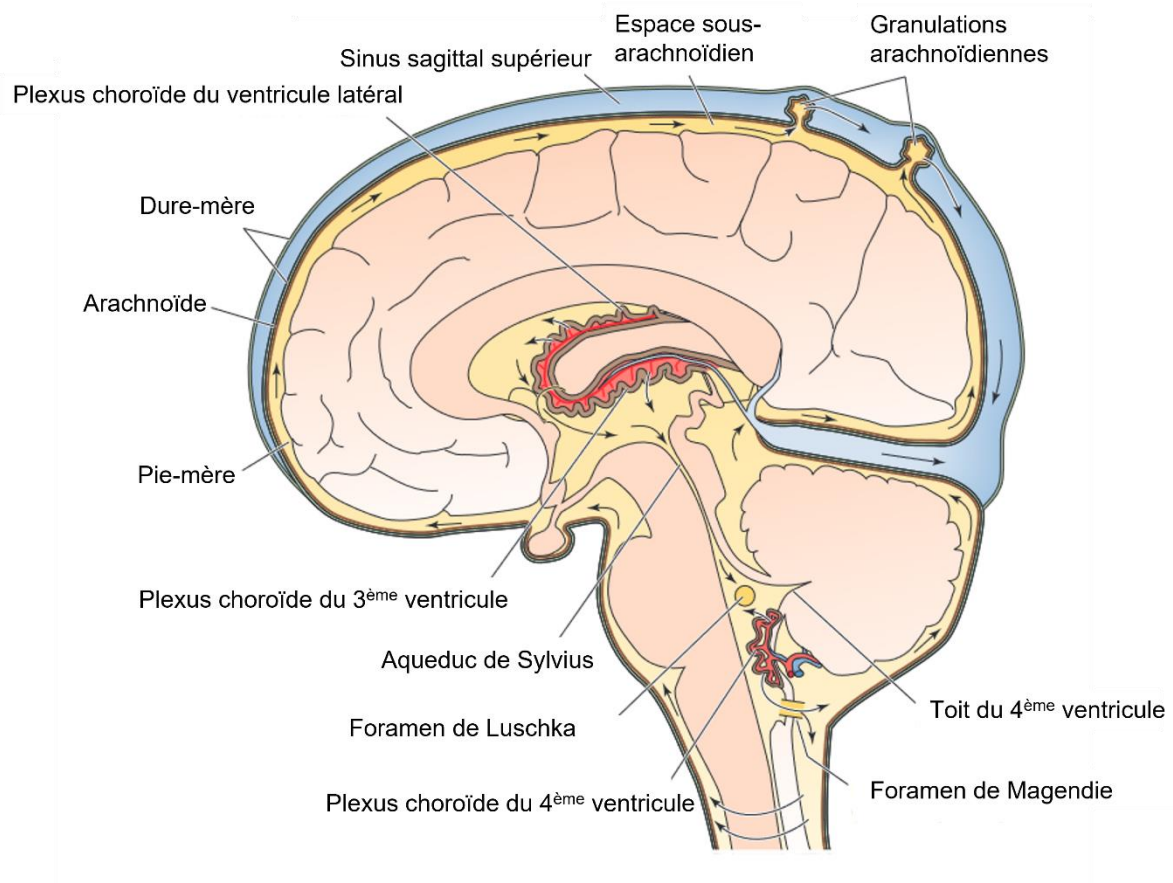


Figure 10. Circulation du liquide cérébrospinal. Le LCS circule depuis les quatre ventricules vers l'espace sous-arachnoïdien en passant par les foramens de Luschka et le foramen de Magendie. Il est résorbé dans le sang veineux du sinus sagittal supérieur en passant par les granulations arachnoïdiennes. Adaptée à partir de (1).

Le volume de LCS est normalement constant, tout comme la pression intracrânienne, qui est normalement comprise entre 5 et 15 mmHg chez l'adulte (1,19,25–27). Afin que le volume et la pression restent constants, le LCS est éliminé à la même vitesse qu'il est produit. Historiquement, il a été admis que l'élimination du LCS depuis l'espace sous-arachnoïdien s'effectuait en rejoignant le sang veineux du sinus sagittal supérieur par l'intermédiaire des granulations arachnoïdiennes (1,2,19,23,25,26) (**Figure 10**). Ces granulations sont sensibles à la pression, et éliminent le LCS lorsque la pression intracrânienne augmente. Cette élimination est à sens unique puisque le sang veineux ne peut pas rejoindre le LCS (1,23,29). Toutefois, cette voie d'élimination du LCS ne serait pas la seule puisque certaines études suggèrent une élimination du LCS également par l'intermédiaire des vaisseaux lymphatiques, formant ainsi le système glymphatique (8,23,26,37).

Le LCS protège le système nerveux central des traumatismes en réduisant son poids effectif d'environ 1400 g à moins de 50 g grâce à la flottabilité qu'il procure (1,25,29). Toutefois, ce n'est pas sa seule fonction. En effet, le LCS permet de maintenir l'homéostasie et d'apporter des nutriments, des hormones, des immunoglobulines tout en éliminant les déchets métaboliques (9,25,29). En outre,

le LCS est utilisé comme élément diagnostic puisque sa composition change en cas d'infection neuro-méningée ou de maladie neuro-dégénératives.

2. Les infections neuro-méningées associées aux soins

Les infections neuro-méningées sont dites associées aux soins lorsqu'elles apparaissent à la suite de la prise en charge d'un patient et qu'elles n'étaient ni présentes ni en incubation au moment de celle-ci. Un délai de 48 h après l'hospitalisation a été défini pour considérer une infection comme associée aux soins (38). Ces infections surviennent après une procédure invasive, telle que la pose permanente ou temporaire de cathéter ventriculaire ou lombaire, l'administration intrathécale de médicaments, la réalisation d'une craniotomie, une ponction lombaire, la pose de stimulateur cérébral profond, ou encore suite à un traumatisme crânien (39,40). Elles se manifestent principalement par des méningites ou des ventriculites, correspondant respectivement à une inflammation de l'espace sous-arachnoïdien et des ventricules cérébraux (35,41–43). Plus rarement, elles conduisent à des empyèmes sous-duraux, des abcès cérébraux et des ostéomyélites (42,43). La fréquence des méningites et des ventriculites selon les différentes procédures est représentée dans la **Figure 11**.

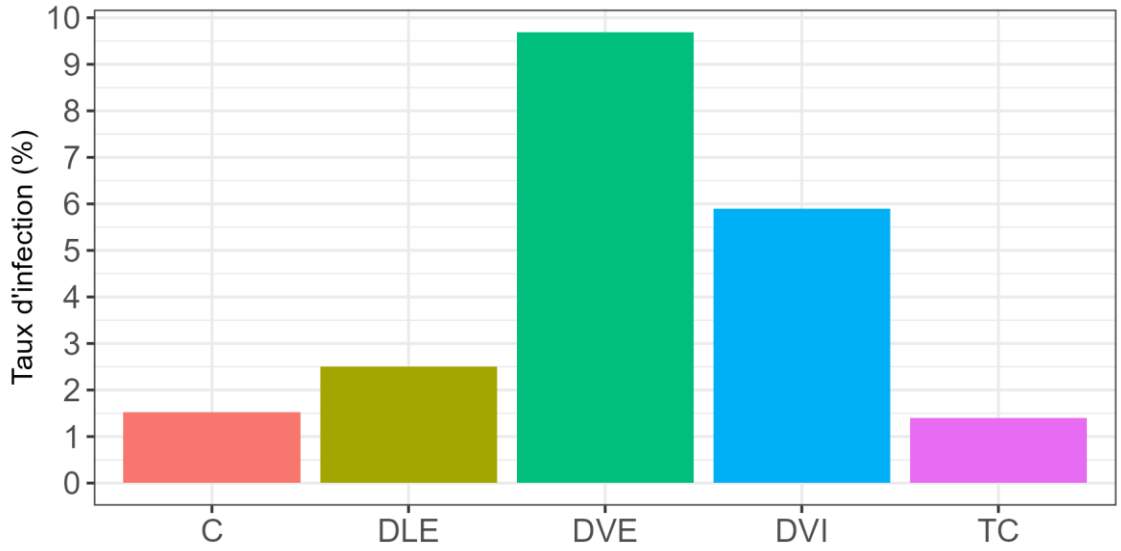


Figure 11. Taux d'infection selon les différentes procédures à l'origine des infections neuro-méningées associées aux soins. C : Craniotomie, DLE : Dérivation lombaire externe, DVE : dérivation ventriculaire externe, DVI : dérivation ventriculaire interne, TC : traumatisme crânien. D'après (44–48).

Les méningites et les ventriculites sont retrouvées le plus fréquemment suite à la pose de cathéters, également appelés dérivations, avec un taux d'infection moyen d'environ 10 % pour les dérivations ventriculaires externes (DVE), 5,9 % pour les dérivations ventriculaires internes (DVI) et 2,5 % pour les dérivations lombaires externes (43,46–48). En comparaison, le taux d'infection après une craniotomie ou un traumatisme crânien est plus faible, respectivement autour de 1,5 et 1,4 % (44,45).

Ce travail de thèse s'est concentré sur les infections neuro-méningées associées aux soins liées aux DVE.

2.1. Principe de la dérivation ventriculaire externe

La DVE consiste à insérer, de manière temporaire, un cathéter au sein d'un ventricule cérébral dans le but d'évacuer le LCS vers l'extérieur. La partie distale du cathéter est liée à un système de collecte composé de ports, utilisés pour mesurer la pression intracrânienne, prélever du LCS ou pour injecter des médicaments, et d'un sac de collecte (40). Une représentation de la DVE est présentée dans la **Figure 12**.

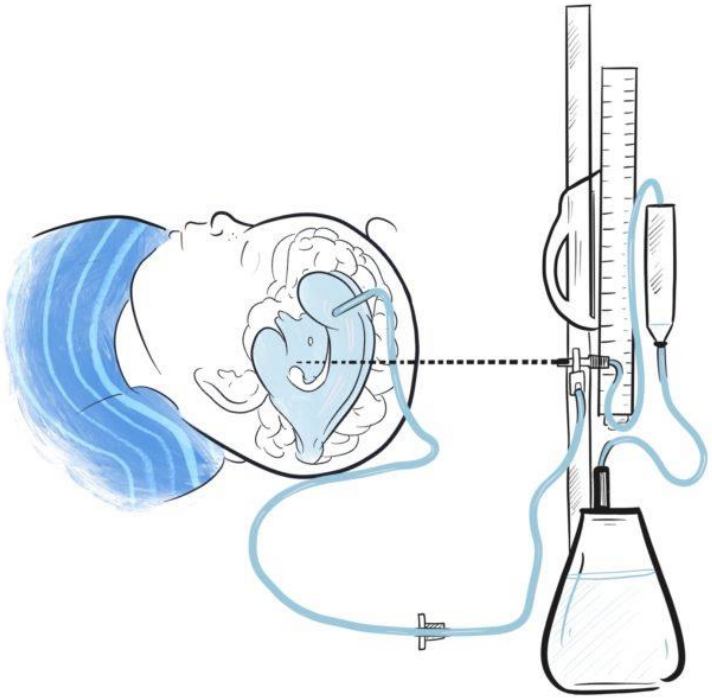


Figure 12. Schéma représentant une dérivation ventriculaire externe. D'après Merlin Evans (49).

Cette procédure est utilisée notamment pour surveiller et traiter une hypertension intracrânienne (40). Une augmentation de la pression intracrânienne supérieure à 30 mmHg est considérée comme pathologique et constitue un risque vital si elle excède 40 mmHg (19). L'augmentation de la pression intracrânienne peut être liée à une accumulation de LCS dans les ventricules, appelée hydrocéphalie. Ce phénomène peut se produire suite à un déséquilibre entre la production et l'élimination du LCS, ou bien être secondaire à une hémorragie sous-arachnoïdienne, intracérébrale ou intraventriculaire, ainsi qu'à la présence de tumeurs obstruant la circulation du LCS (25,40,46). La DVE est également posée en relais d'une ablation d'une DVI, notamment en cas d'infection du dispositif (39,40). Les DVI sont des dispositifs permanents, incluant les dérivations ventriculo-péritonéales, ventriculo-atriales et

ventriculo-pleurales, évacuant le LCS respectivement vers le péritoine, l'atrium cardiaque et l'espace pleural (42).

Des complications non-infectieuses de ces dispositifs peuvent survenir, telles que des hémorragies au site d'insertion ou intraventriculaires, ainsi qu'une obstruction du cathéter. Toutefois, les complications infectieuses sont majoritaires (50). Leur incidence moyenne est d'environ 10 %, avec un taux d'infection de 11,4/1000 cathéters-jours rapporté dans une méta-analyse de 2015 incluant 35 études (43,46).

Le risque d'infection associée à la DVE est favorisé par des prélèvements fréquents de LCS et par une durée de dérivation prolongée, supérieure à 5 ou 10 jours selon les études (46,51,52). D'autres facteurs de risque ont été rapportés, notamment la présence d'une hémorragie sous-arachnoïdienne ou intraventriculaire, une fracture du crâne avec fuite de LCS, ou encore une injection dans le cathéter (46).

Bien que rares, ces infections sont sévères puisqu'elles conduisent au décès dans plus de 30 % des cas sur un an et à des séquelles neurologiques graves dans plus de 60 % des cas, pouvant aller d'un handicap modéré à sévère jusqu'à un état végétatif persistent (53,54).

2.2. Physiopathologie

Les infections neuro-méningées se caractérisent par une infection du LCS, localisé dans l'espace sous-arachnoïdien en cas de méningite et/ou dans le ventricule cérébral en cas de ventriculite. Normalement, le LCS est difficile d'accès grâce aux différents niveaux de protection évoqués précédemment, tels que le crâne, les méninges et les barrières cérébrales. Cependant, l'insertion d'une DVE entraine une rupture de ces protections, créant ainsi un accès direct à l'espace sous-arachnoïdien et aux ventricules cérébraux.

Les micro-organismes présents sur la flore cutanée ou dans l'environnement hospitalier, peuvent, par conséquent, être directement introduits lors de la pose en cas de défaut d'asepsie, ou bien coloniser le dispositif suite à des manipulations répétées lors de prélèvement ou d'injection, et infecter secondairement le LCS par voie intraluminale ou extraluminale comme illustré dans la **Figure 13** (39,40,55,56).

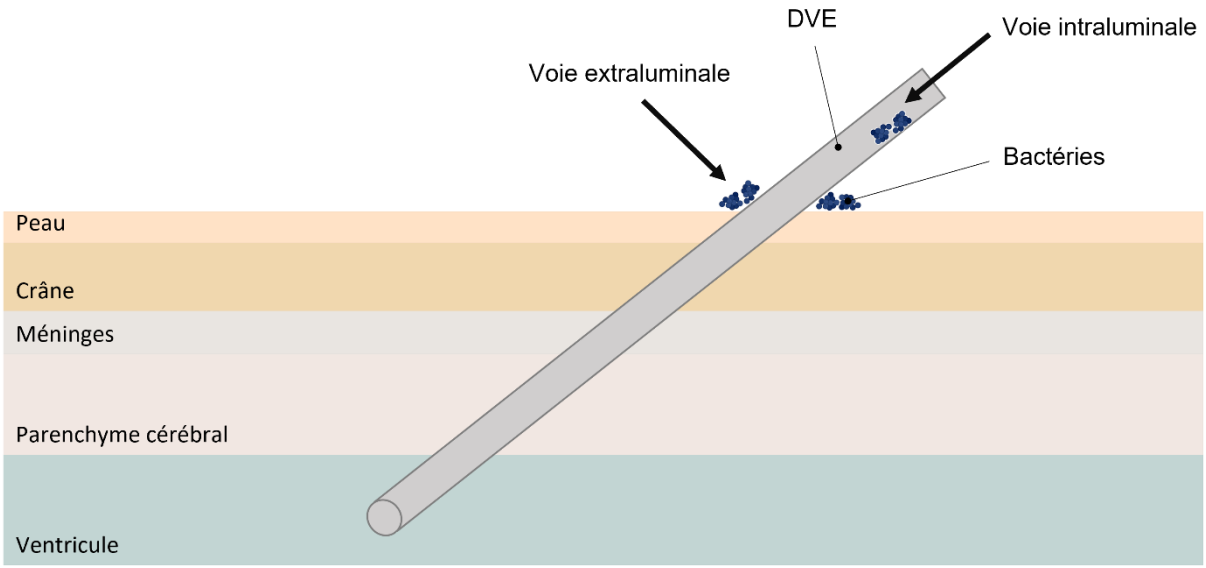


Figure 13. Voies de contamination de la dérivation ventriculaire externe (DVE). Le liquide cérébrospinal peut s'infecter par voie extraluminale ou par voie intraluminale lors de l'insertion ou lors de manipulations de la DVE.

Les micro-organismes les plus fréquemment impliqués sont ceux de la flore cutanée, tels que les Staphylocoques à coagulase négative, particulièrement, *Staphylococcus epidermidis*, ainsi que *Staphylococcus aureus* et, plus rarement, *Cutibacterium acnes* (40,46,53,57). Des bactéries à Gram négatif, présentes notamment dans l'environnement hospitalier, comme *Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter cloacae, Serratia marcescens*, *Klebsiella* spp*., Escherichia coli*, *Acinetobacter baumanii*, *Citrobacter* spp., peuvent également être en cause (40,53,58). La répartition des micro-organismes retrouvés dans 523 cultures de LCS issus de patients possédant une DVE est présentée dans la **Figure 14**.

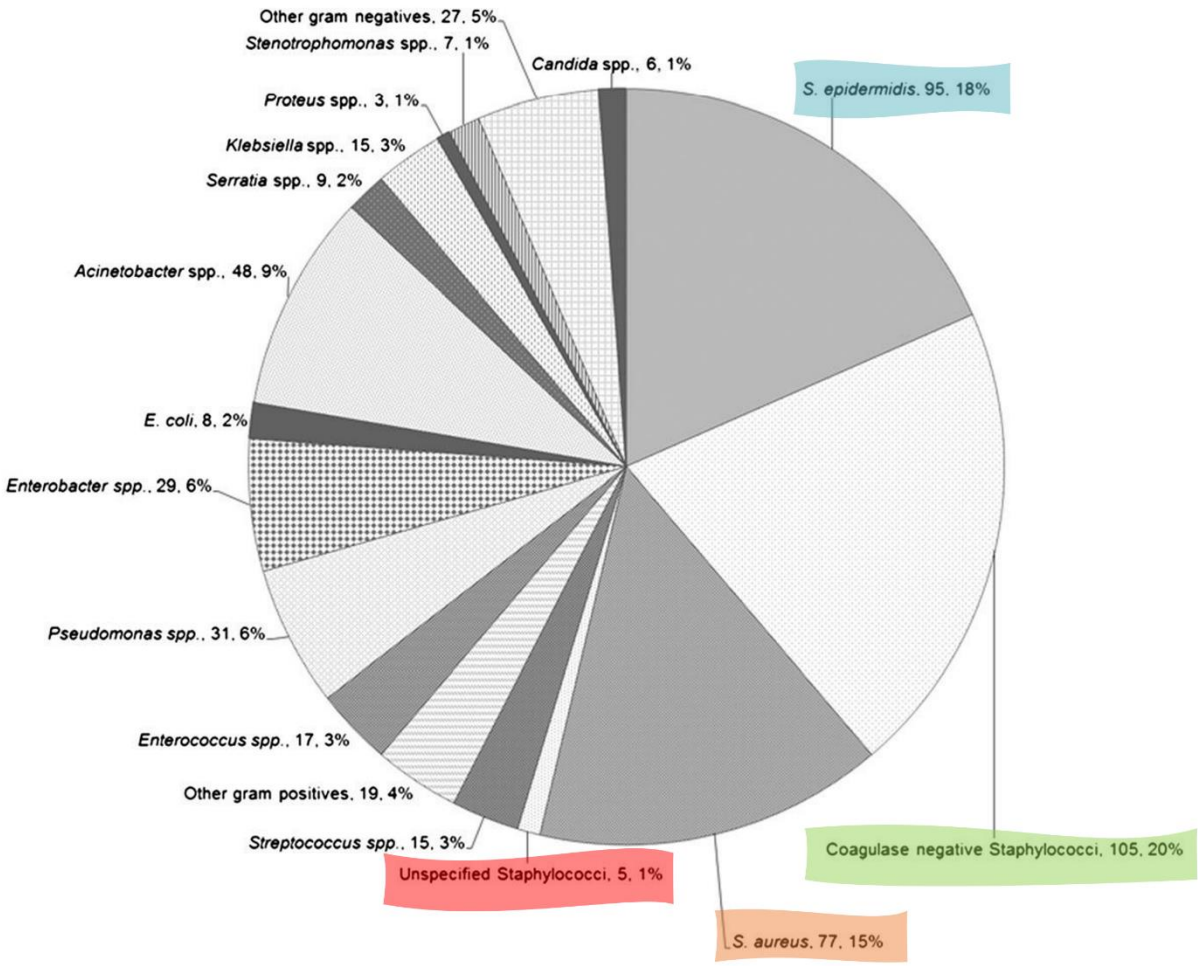


Figure 14. Diagramme circulaire représentant les germes retrouvés dans 523 cultures positives de liquide cérébrospinal. D'après (43).

Dans 64 % des cas, des bactéries à Gram positif étaient en cause avec en majorité des Staphylocoques à coagulase négative (38 %) dont *Staphylococcus epidermidis* suivi de *Staphylococcus aureus* (15 %). Des bactéries à Gram négatif étaient en cause dans 35 % des cas incluant des entérobactéries, ainsi que les genres *Pseudomonas* et *Acinetobacter*. De manière plus rare, 1 % était lié à *Candida* spp. (43). Toutefois, bien que l'incidence des bactéries à Gram négatif soit en augmentation, les *Staphylococcus* spp. restent la cause la plus importante de ces infections associées aux soins (53,58).

Lorsque ces bactéries atteignent le LCS, le lipopolysaccharide est reconnu par les cellules immunitaires résidentes de la BHE, les microglies, qui initient une cascade inflammatoire. Elle se caractérise par la libération de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1β, TNF-α), d'agents vasoactifs et de radicaux libres. Les astrocytes et les péricytes réagissent aux cytokines pro-inflammatoires et en produisent à leur tour. Ces médiateurs pro-inflammatoires conduisent à une augmentation de la perméabilité de la BHE, due à l'ouverture des jonctions serrées, qui peut varier d'une ouverture légère et transitoire à une rupture chronique. Cette augmentation de la perméabilité permet l'infiltration de

composés du sang au niveau du parenchyme cérébral, par voie transcellulaire et paracellulaire. Cela inclut des protéines et des cellules immunitaires, comme les leucocytes, les monocytes et les macrophages, entraînant une inflammation des méninges et des ventricules, ainsi que l'apparition des symptômes cliniques. Des changements dans les systèmes de transports sont également possibles avec une altération de l'expression de la P-gp par exemple (4,10,15).

Cependant, certaines bactéries, comme les staphylocoques à coagulase négative et *Cutibacterium acnes*, induisent une inflammation minimale, rendant le diagnostic de ces infections difficiles (40).

2.3. Diagnostic clinique et biologique

Classiquement, la méningite est caractérisée cliniquement par de la fièvre et un syndrome méningé incluant céphalées avec photophobie et phonophobie, vomissements et raideur de la nuque (35,59). Les signes cliniques étant non spécifiques, une ponction lombaire, consistant à insérer une aiguille entre les vertèbres L4 et L5 jusqu'à l'espace sous-arachnoïdien spinal doit être réalisée, en urgence, afin de recueillir du LCS (**Figure 15**) (25).

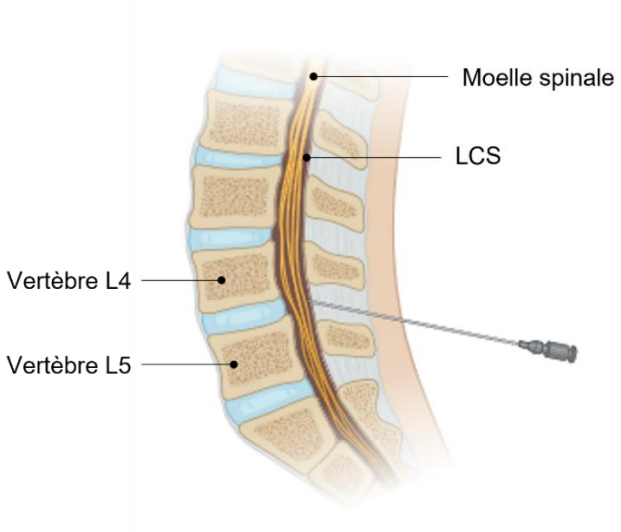


Figure 15. Représentation schématique de la ponction lombaire. Créée avec Biorender.com.

Le LCS prélevé subit une analyse macroscopique, cytologique, biochimique, et microbiologique (35,36). L'analyse macroscopique du LCS, normalement clair comme de l'eau de roche, révèle un aspect trouble voire purulent en cas d'infection bactérienne (35,36,60). L'analyse cytologique identifie et quantifie les cellules présentes dans le LCS. En cas de méningite bactérienne, elle révèle généralement plus de 1000 leucocytes/mL avec une prédominance de polynucléaires neutrophiles (35,36,60). Elle permet aussi de détecter des hématies, suggérant une hémorragie sous-arachnoïdienne (35). L'analyse biochimique du LCS mesure classiquement la glycorachie et la protéinorachie, ainsi que l'acide lactique et la procalcitonine (36). La glycorachie, interprétée en

fonction de la glycémie, est diminuée en cas de méningite bactérienne, tandis que la protéinorachie est augmentée (61). Les principales perturbations en cas de méningite bactérienne sont présentées dans le **Tableau 2**.

Tableau 2. Analyse macroscopique, cytologique et biochimique du LCS normal et en cas de méningite bactérienne. D'après (35,36,61).↑ : augmentation, ↓ : diminution.

	Aspect LCS	Cytologie	Glycorachie	Protéinorachie
Normal	« Eau de roche »	< 5 cellules /mL	$\frac{Glucose_{LCS}}{Glucose_{Sang}}$ > 0,4	< 0,4 g/L
Bactérie	Trouble, purulent	↑↑	↓↓	↑↑

Toutefois, ces signes cliniques, cytologiques et biochimiques peuvent être absents ou subtiles dans le cas des infections neuro-méningées associées aux soins. De plus, même s'ils sont présents, ils restent non spécifiques (40). En effet, une étude sur 230 patients porteurs de DVE, dont 22 ont développé une infection associée à celle-ci, n'a mis en évidence aucune différence entre les patients infectés et non infectés en termes de nombre de leucocytes, de protéinorachie, de glycorachie et du ratio entre la glycorachie et la glycémie (62). De plus, ces signes peuvent également être présents en cas de méningite aseptique, causée par l'inflammation induite par la procédure, sans infection du LCS (53,63). En outre, les méningites aseptiques peuvent représenter jusqu'à 70 % des cas chez les patients porteurs de DVE (63).

Une étude anglaise, portant sur 495 DVE, a identifié 46 cas suspectés d'infection, dont 26 ont été confirmés. Les analyses clinique et biologique (présence de fièvre, du syndrome méningé, de convulsions, d'une altération de la conscience, nombre de leucocytes, glycorachie) ont été réalisées sur ces 46 cas et comparées entre les cas suspectés et confirmés. Aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes, à l'exception de l'altération de la conscience, qui était significativement plus fréquente (46 %) chez les cas confirmés que chez les cas suspectés (10 %) (57). Ainsi, cliniquement, l'altération de la conscience semble être le signe clinique le plus évocateur et discriminant de ces infections neuro-méningées associées aux soins (39,53,54,57). Plus rarement, un érythème autour du cathéter peut également être retrouvé (40).

Néanmoins, le dosage des lactates et de la procalcitonine pourraient permettre de distinguer une infection neuro-méningée associées aux soins d'une méningite aseptique (40,53,64). Une étude sur 178 patients a montré que les concentrations de procalcitonine et de lactates étaient significativement plus élevées chez les patients ayant développé une infection neuro-méningée associée aux soins comparé aux patients non infectés. Les valeurs seuils de cette étude était de 0,075

ng/mL pour la procalcitonine et de 3,45 mmol/L pour les lactates (64). Toutefois, les valeurs seuils pour les lactates sont variables d'une étude à une autre selon le matériel utilisé, avec des valeurs comprises entre 3,45 et 5,4 mmol/L (65,66).

Ainsi, l'analyse microbiologique est essentielle, pour établir le diagnostic d'infection (40,42). Elle consiste d'abord à réaliser un examen direct par coloration de Gram suivi par une mise en culture du LCS, qui peut durer jusqu'à 10 jours pour être en mesure de détecter les bactéries à croissance lente, comme le *Cutibacterium acnes* (40,53). Un examen direct et une culture négative n'excluent pas la présence d'une infection. En effet, ces résultats négatifs peuvent être faussés par une antibiothérapie initiée avant le prélèvement du LCS, représentant jusqu'à 50 % des cas, selon une étude réalisée sur 215 patients (40,42,53,55). Une autre étude, sur 326 patients ayant une infection neuro-méningée associée aux soins, a montré une diminution de la sensibilité de la coloration de Gram de 25,7 % à 13,4 % en cas d'antibiothérapie débutée avant le prélèvement de LCS et 66,1 % à 48,5 % en ce qui concerne la culture du LCS (67). Pour pallier au manque de sensibilité, il est possible d'utiliser des techniques de biologie moléculaire, telle que la *Polymerase Chain Reaction* (PCR). La PCR a permis de détecter la présence de *Staphylococcus aureus* résistant ou non à la méticilline ou de *Cutibacterium acnes* sur 42 LCS dont la culture était négative (68). Dans cette même étude, il n'y avait aucun faux négatif, c'est-à-dire qu'il n'y avait aucune PCR négative lorsque les cultures étaient positives, indiquant, en plus de sa rapidité, une bonne sensibilité de cette technique (68). Cependant, bien que cette technique ait permis de détecter la présence d'une bactérie dans le LCS, elle ne permet pas d'établir l'antibiogramme, qui nécessite une mise en culture. De plus, la présence d'une bactérie dans le LCS n'est pas forcément synonyme d'infection. En effet, en l'absence de perturbation clinique, cytologique et biochimique du LCS, une seule culture de LCS positive est associée à une contamination, tandis que plusieurs cultures de LCS sont associées à une colonisation. On parle d'infection en cas de culture unique ou multiple de LCS positive associées à des perturbations cytologiques et/ou biochimiques, ou à des perturbations cliniques et cytologiques (40).

Par conséquent, le diagnostic d'infection neuro-méningée associée aux soins est multifactoriel. Un diagramme décisionnel est présenté dans la **Figure 16**.

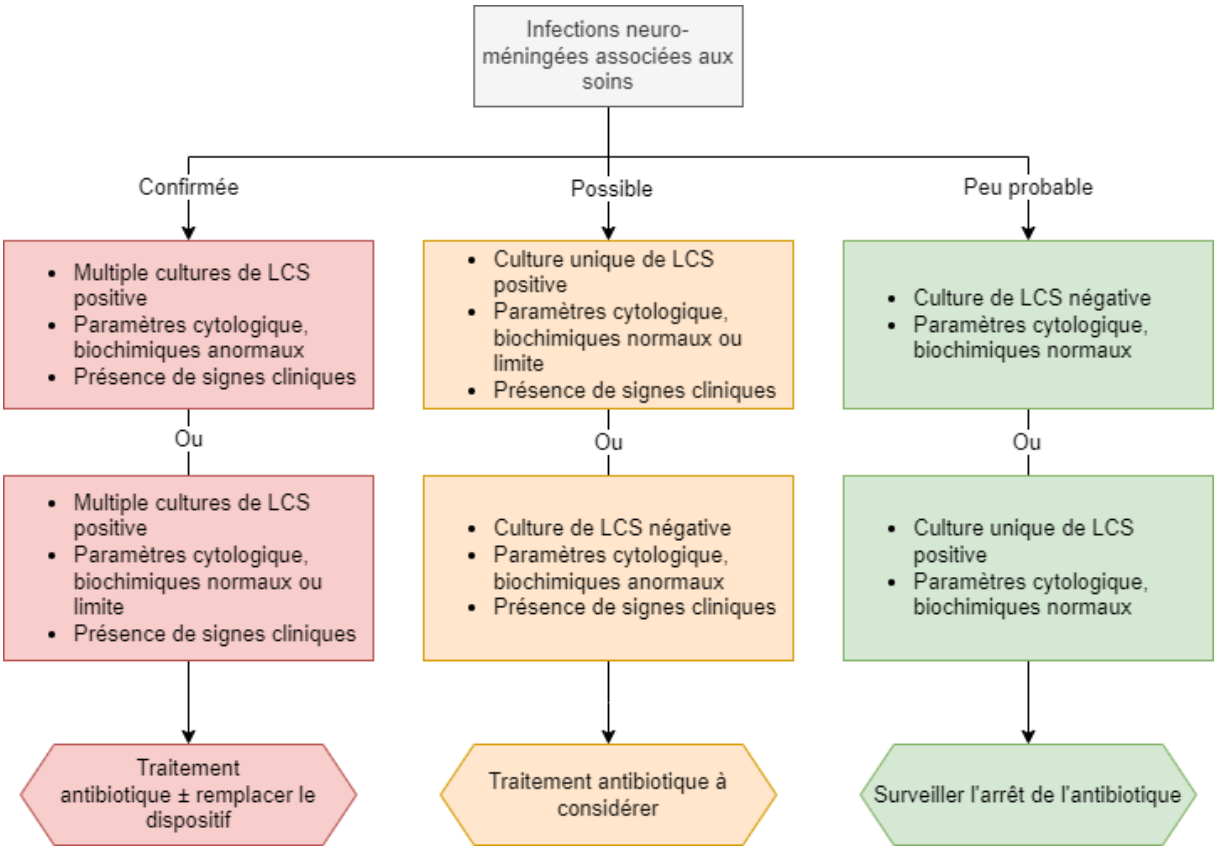


Figure 16. Diagramme décisionnel pour le diagnostic des infections neuro-méningées associées aux soins. Adaptée d'après (42).

2.4. Traitement

Le traitement des infections cérébrales est complexe en raison de la BHE, qui limite la diffusion des antibiotiques. Cette diffusion dépend de plusieurs facteurs, comme le poids moléculaire, la liposolubilité, l'ionisation et le pourcentage de fixation aux protéines plasmatiques (1,69,70). L'inflammation augmente la perméabilité de la BHE, facilitant ainsi le passage des antibiotiques, bien qu'elle reste limitée voire inexistante dans les infections neuro-méningées associées aux soins (71). Ainsi, pour être efficace, l'antibiotique doit idéalement avoir un faible poids moléculaire (< 400 Dalton), être liposoluble, non chargé, et faiblement fixé aux protéines plasmatiques, car seule la forme non ionisée et libre du médicament peut traverser les membranes lipidiques des cellules de la BHE (69,70,72). De plus, il ne doit pas être un substrat des pompes d'efflux (69).

2.4.1. Traitement empirique

Une fois le diagnostic d'infection neuro-méningée posé, l'*Infectious Diseases Society of America* (IDSA) recommande un traitement empirique composé de vancomycine associé à une béta-lactamine anti-*pseudomonas* (Céfépime, Ceftazidime ou Méropénème). Ce traitement est adapté après identification du micro-organisme en cause et détermination de sa sensibilité aux anti-infectieux (40).

2.4.2. *Détermination de la sensibilité bactérienne*

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est la méthode la plus couramment utilisée pour déterminer la sensibilité d'une bactérie à un antibiotique donné. Elle est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique permettant d'inhiber la pousse bactérienne à l'œil nu après une période d'incubation d'environ 16 à 24 h et est généralement exprimée en mg/L (73).

Plusieurs méthodes permettent de la déterminer, notamment la microdilution en milieu liquide, qui constitue la méthode de référence. Cette méthode est standardisée par deux organismes : l'EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) (74) en Europe et le CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (75) aux Etats-Unis. Elle est traditionnellement réalisée dans une plaque à 96 puits qui est remplie avec l'antibiotique d'intérêt dilué en série (suite géométrique de raison 2) dans du Mueller-Hinton Broth (MHB), sauf dans la dernière colonne afin d'avoir un contrôle positif de la croissance bactérienne sans antibiotique. La plaque est ensuite inoculée avec la bactérie d'intérêt pour obtenir un inoculum final à 5 x 10^5 UFC/mL. L'inoculum est préparé à partir de colonies provenant d'une culture sur gélose Mueller-Hinton Agar (MHA), mises en suspension dans du MHB. La CMI est déterminée après incubation en aérobiose à 35 ± 2 °C pendant 16 à 24 h (**Figure 17**).

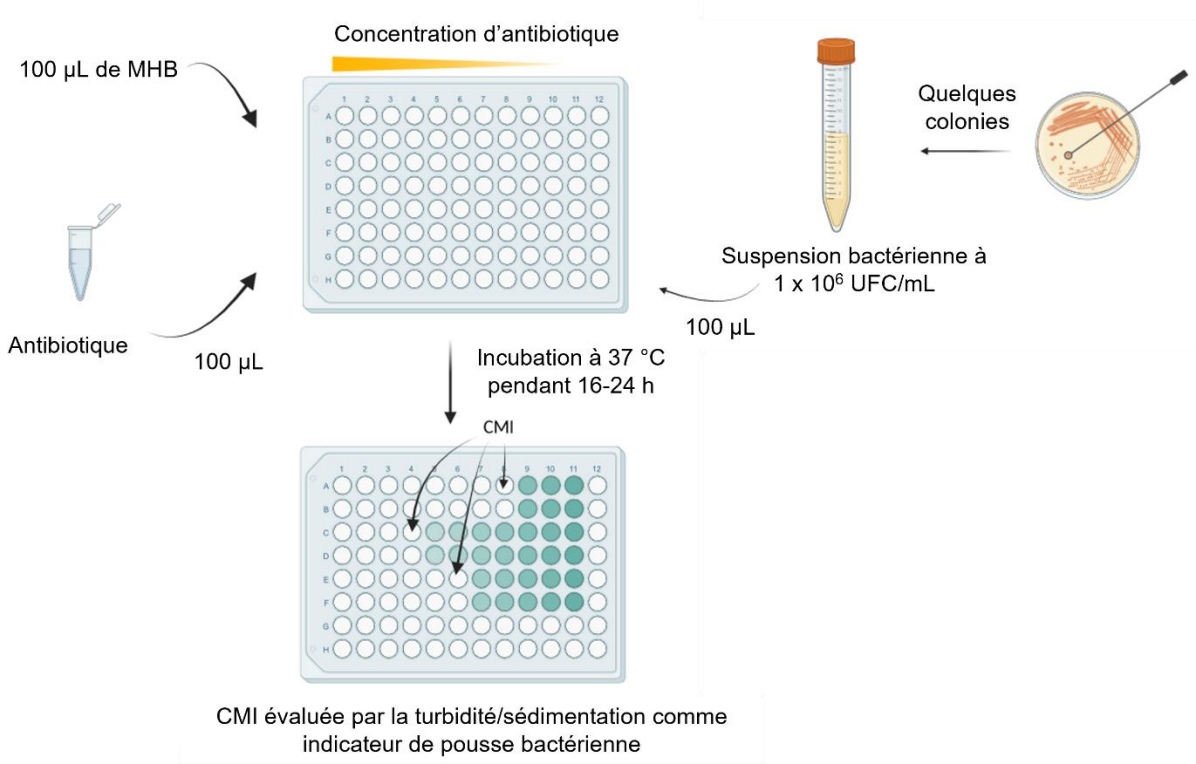


Figure 17. Protocole de détermination de la CMI. Créée avec Biorender.com.

Après détermination de la CMI, la valeur mesurée est comparée à la concentration critique ou breakpoint défini par l'EUCAST ou le CLSI permettant de classer la bactérie étudiée comme sensible à une posologie standard (S), sensible à forte dose (I) ou résistante (R) (75–77).

Basé sur le même principe, des appareils semi-automatisés ont été développés afin d'augmenter la rapidité d'exécution, notamment en laboratoire hospitalier. C'est le cas, par exemple du Vitek®2, commercialisé par Biomérieux, où les plaques 96 puits sont remplacées par des cartes jetables, comme illustré dans la **Figure 18**.



Figure 18. Appareil semi-automatisé Vitek®2 avec un exemple de carte. D'après (78)

Chaque carte contient 64 puits remplis de concentrations croissantes d'antibiotique dilué dans du bouillon de culture. Un contrôle positif de la croissance bactérienne sans antibiotique est également présent. Il existe plusieurs types de cartes, dont le panel d'antibiotiques varie selon le micro-organisme testé. L'appareil mesure la turbidité des puits pour évaluer la croissance bactérienne et déterminer la CMI sur une durée d'incubation d'environ 18 h (79,80).

Une autre méthode couramment utilisée en clinique, l'antibiogramme, repose sur la diffusion en milieu gélosé. La réalisation d'un antibiogramme consiste à déposer des disques imprégnés d'antibiotiques à des concentrations fixes sur une gélose préalablement ensemencée d'une suspension bactérienne à 0.5 McFarland (≈ 10^8 UFC/mL) de la bactérie d'intérêt. Après incubation de la gélose pendant 16 à 20 h, les diamètres d'inhibitions sont mesurés pour chaque disque et sont comparés aux diamètres critiques définis par l'EUCAST ou le CLSI permettant, à nouveau, de classer la bactérie étudiée comme S, I ou R (75–77). Un exemple est présenté dans la **Figure 19**.



Figure 19. Antibiogramme d'une souche de *Serratia marcescens*. La bactérie est probablement sensible à l'antibiotique contenu dans le deuxième disque (situé sur la ligne du haut, en partant de la gauche), tandis qu'elle se montre résistante à celui du troisième disque, puisqu'il y a croissance de la bactérie au contact de ce dernier. D'après (81).

2.4.3. Traitement spécifique des Staphylococcus spp.

Une fois la sensibilité bactérienne déterminée, il est recommandé en première intention d'utiliser la vancomycine seule pour les Staphylocoques résistants à la méticilline et les Staphylocoques à coagulase négative dont la CMI est inférieure à 1 mg/L. Le traitement est administré pour une durée comprise entre 10 et 14 jours (40).

Le linézolide est une alternative à la vancomycine pour les patients ne pouvant pas en recevoir en cas d'allergie, d'insuffisance rénale ou bien lorsque la CMI est supérieure ou égale à 1 mg/L. La daptomycine et le cotrimoxazole sont également recommandés en seconde intention (40).

Pourtant, la vancomycine est connue pour être une molécule hydrophile de haut poids moléculaire (1448 Dalton), ce qui ne lui permet pas de traverser facilement la BHE (82,83). Bien que l'inflammation augmente la pénétration de la vancomycine dans le LCS d'environ 6 %, elle reste faible puisqu'elle est d'environ 20 % (50,84). De plus, comme mentionné précédemment, l'inflammation est réduite dans le contexte des infections neuro-méningées associées aux soins, notamment celles causées par les Staphylocoques à coagulase négative et *Cutibacterium acnes*. Ainsi, après administration intraveineuse de vancomycine à la posologie usuelle de 500 mg 4 fois par jour chez des patients porteurs de DVE infectées par *Staphylococcus* spp., l'étude de Pfausler *et al*. a montré que les concentrations dans le

LCS étaient plus de 10 fois inférieures à celles observées dans le sérum. En effet, malgré que les concentrations résiduelles dans le sérum étaient conformes aux recommandations de 15 à 20 mg/L, la concentration moyenne dans le LCS n'était que d'environ 1,4 ± 0,3 mg/L (40,85).

En outre, il est recommandé d'utiliser la vancomycine lorsque les souches bactériennes ont une CMI inférieure à 1 mg/L. Cependant, selon les données de l'EUCAST, les CMI des *Staphylococcus aureus* varient entre 0,06 et 2 mg/L, avec une majorité des souches présentant une CMI à 1 mg/L. Pour *Staphylococcus epidermidis*, elles se situent entre 0,125 et 4 mg/L, avec une majorité des souches ayant une CMI à 2 mg/L. Quant à *Staphylococcus capitis*, elles se situent entre 0,25 et 4 mg/L, avec une majorité à 1 mg/L (86). Ainsi, la vancomycine ne serait pas recommandée pour la majorité des souches bactériennes impliquées dans ces infections puisqu'elles présentent une CMI pour la vancomycine supérieure ou égale à 1 mg/L. Par conséquent, pour atteindre une concentration efficace dans le LCS pour traiter la majorité des souches de *Staphylococcus* spp., une augmentation des doses de vancomycine serait nécessaire. Toutefois, des concentrations plasmatiques élevées sont responsables de néphrotoxicité et d'ototoxicité (87).

Ainsi, en raison de sa diffusion limitée, de la distribution des CMI et de sa toxicité, son utilisation en première intention est remise en question au profit des antibiotiques de seconde intention, qui ont une meilleure distribution dans le LCS, comme le linézolide (88).

3. Linézolide : une posologie à optimiser ?

Le linézolide est le premier antibiotique de la famille des Oxazolidinones (89–91). Les oxazolidinones sont des molécules synthétiques qui ont été initialement développées par DuPont de Nemours & CO. Inc. puis par la Pharmacia Corporation dans les années 90 (92,93) donnant lieu au linézolide qui a été approuvé sous la spécialité Zyvox® le 18 avril 2000 par la Food and Drug Administration (FDA) (89,90,94).

3.1. Mécanisme d'action

Le linézolide inhibe la synthèse protéique par un mécanisme d'action unique, distinct de celui des autres antibiotiques ciblant ce processus (91). Contrairement à ces derniers, qui interviennent souvent à des étapes plus avancées, le linézolide empêche la formation du complexe d'initiation, c'est-à-dire l'assemblage des sous-unités ribosomales 50S et 30S, point de départ de la traduction protéique (95). Plus précisément, le linézolide se fixe sur l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S, au niveau du site A du centre de la peptidyl-transférase (PTC), prenant la place normalement occupée par l'ARN de transfert entrant (91,96). Une représentation schématique de la traduction protéique avec inhibition par le linézolide est présentée dans la **Figure 20**.

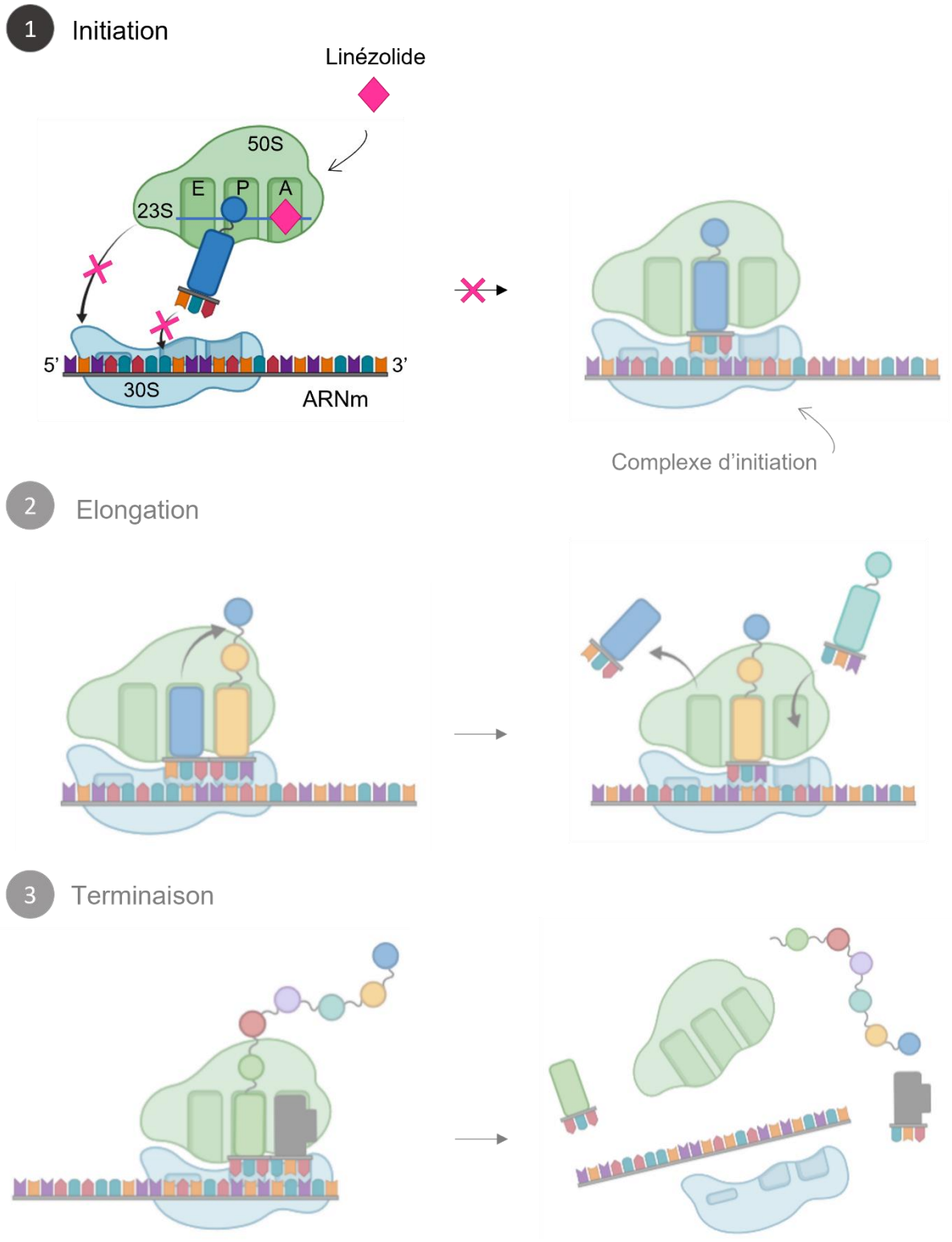


Figure 20. Traduction protéique inhibée par le linézolide. La traduction protéique comprend trois étapes : l'initiation, suivie de l'élongation, puis de la terminaison. Le linézolide est représenté par un losange rose. Son impact, illustré par des croix roses, montre qu'il inhibe la traduction protéique dès la phase d'initiation, empêchant ainsi l'élongation et la terminaison de se dérouler. E, P et A symbolise les différents sites de la peptidyl-transférase. Créée avec Biorender.com.

Le linézolide est actif majoritairement contre les bactéries à Gram positif (95). Le manque d'activité sur les bactéries à Gram négatif serait lié à la présence de pompes d'efflux qui éliminent le linézolide plus rapidement qu'il ne peut s'accumuler à des niveaux intracellulaires efficaces. Il a notamment été décrit que le linézolide serait un substrat de la pompe d'efflux AcrAB retrouvée chez les bactéries à Gram négatif, notamment chez les Entérobactéries (93,97).

Par conséquent, le linézolide a été approuvé par la FDA pour le traitement des bactéries à Gram positif telles que *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline dans les pneumonies nosocomiales et les infections cutanées compliquées, *Streptococcus pneumoniae* dans les pneumonies communautaires et *Enterococcus faecium* résistant à la vancomycine dans les bactériémies (94).

Malgré ces indications, et contrairement à la vancomycine, le linézolide semble être un antibiotique intéressant dans le traitement des infections neuro-méningées puisque, ses caractéristiques lui confèrent une bonne pénétration dans le LCS.

3.2. Distribution dans le LCS

Le linézolide est une molécule de faible poids moléculaire d'environ 337 Dalton, dont la structure chimique est présentée dans la **Figure 21** (98).

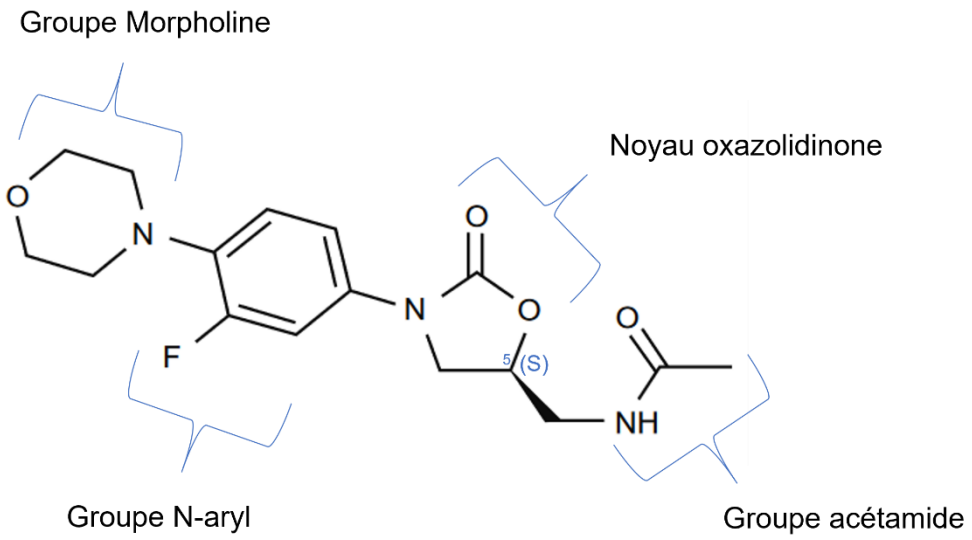


Figure 21. Structure chimique du linézolide. D'après (90,99,100).

L'activité antimicrobienne du linézolide est associée principalement à la configuration S du groupe acétamide situé en position 5 du noyau oxazolidinone, qui interagit avec la PTC. L'atome de fluor présent sur le groupe N-aryl augmente l'activité antimicrobienne et réduit les effets indésirables (89,90,99,100). En outre, le groupe morpholine permet de moduler la solubilité (99,100).

En raison de sa structure chimique, le linézolide est une base faible avec un pKa de 1,8, qui est bien inférieur au pH du plasma de 7,4 et du LCS de 7,3. Ainsi, il se trouve majoritairement sous sa forme non ionisée dans ces deux milieux (101). De plus, il possède des propriétés amphiphiles et une faible fixation protéique, d'environ 31 % (69,70,89,99,102). Ces caractéristiques, associées à son faible poids moléculaire (< 400 Dalton), lui confèrent une bonne capacité à traverser la BHE. En effet, selon la littérature, sa pénétration dans le LCS est de l'ordre de 80 % (70,103,104).

La distribution du linézolide dans le LCS a également été déterminée par notre équipe dans le cadre d'un programme hospitalier de recherche clinique national (n°16-0501), intitulé PK-Pop-LCR. Cette étude visait, d'abord, à déterminer la distribution de 9 antibiotiques administrés par voie intraveineuse, dont le linézolide, dans le LCS de patients infectés de réanimation porteurs d'une DVE. Elle avait ensuite, pour objectif d'évaluer l'efficacité des schémas posologiques utilisés par une analyse pharmacocinétique/pharmacodynamique (PK/PD).

Un total de 25 patients de réanimation ayant reçu du linézolide ont été inclus dans l'étude dont environ 50 % d'entre eux présentaient une infection cérébrale. Des prélèvements de sang et de LCS par l'intermédiaire de la DVE ont été réalisés à différents temps sur ces patients puis analysés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem afin d'obtenir les profils pharmacocinétiques dans le plasma et le LCS (105). Un exemple de ces profils observés pour un patient est présenté dans la **Figure 22**.

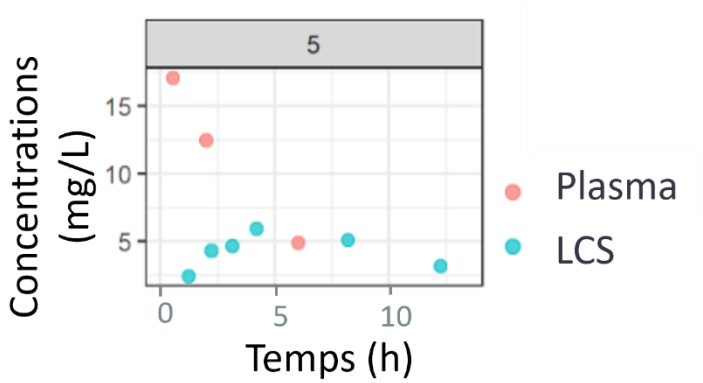


Figure 22. Profils pharmacocinétiques des concentrations libres dans le plasma et le LCS pour un des patients inclus dans l'étude PK-Pop-LCR.

Bien que les profils pharmacocinétiques différaient (**Figure 22**), les aires sous la courbe (AUC) étaient équivalentes puisque le ratio entre l'AUC libre dans le LCS et l'AUC libre dans le plasma était d'environ 85 %, indiquant une bonne pénétration du linézolide dans le LCS avec ou sans inflammation cérébrale (105).

3.3. Evaluation PK/PD du linézolide

L'efficacité d'un antibiotique dépend à la fois de sa pharmacocinétique (PK), qui évalue l'impact de l'organisme sur la molécule, caractérisée par différentes phases (absorption, distribution, métabolisme et élimination), et de sa pharmacodynamie (PD), qui mesure la sensibilité de la bactérie à la molécule. Ainsi, la PK étudie l'évolution des concentrations d'un antibiotique au cours du temps, tandis que la PD s'intéresse à l'effet en fonction de la concentration de l'antibiotique. La PK/PD combine les deux disciplines afin d'évaluer l'effet d'un antibiotique sur une bactérie au cours du temps (**Figure 23**).

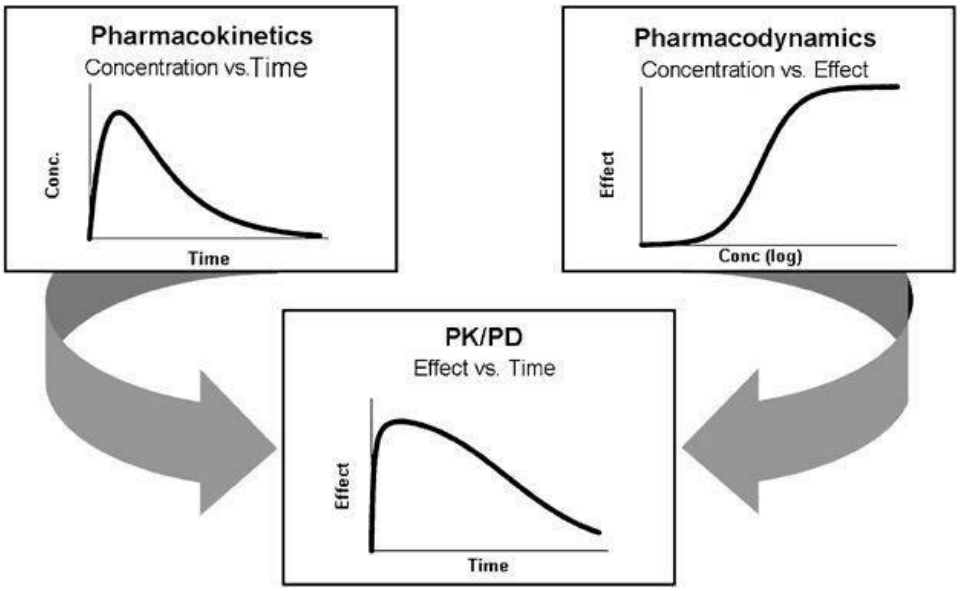


Figure 23. Représentation schématique de la PK, la PD et de la PK/PD. D'après (106).

L'étude de la relation PK/PD est requise par l'*European Medicines Agency* (EMA) et la FDA pour la mise sur le marché de nouveaux antibiotiques (107,108). Différentes approches sont utilisées pour analyser la relation PK/PD des antibiotiques, comme des modèles *in vitro* et des modèles *in vivo* d'infections murins. La connaissance de la relation PK/PD est nécessaire dans le but de définir le schéma posologique optimal, qui maximise l'efficacité tout en limitant la toxicité et l'apparition de résistance (109,110).

En pratique clinique, l'adaptation d'un traitement antibiotique se fait selon les index PK/PD déterminés lors des études pré-cliniques. L'origine de ces index remonte à 1950 avec les travaux d'Eagle *et al*. qui ont démontré que l'efficacité d'un traitement dépend non seulement de la dose administrée, mais aussi de la PK de la molécule utilisée (111,112).

3.3.1. Les index PK/PD

Trois index PK/PD ont été définis, reliant la PK d'une molécule donnée à sa PD sur une bactérie donnée. Le paramètre PD utilisé est la CMI de cette molécule sur la bactérie étudiée. Les index PK/PD

sont généralement basés sur les concentrations libres d'antibiotiques, symbolisées par le *f* pour *free* (113), puisque, comme évoqué précédemment, ce sont celles qui diffuseront jusqu'au site infectieux et exerceront un effet sur la bactérie. Les trois index PK/PD sont illustrés dans la **Figure 24**.

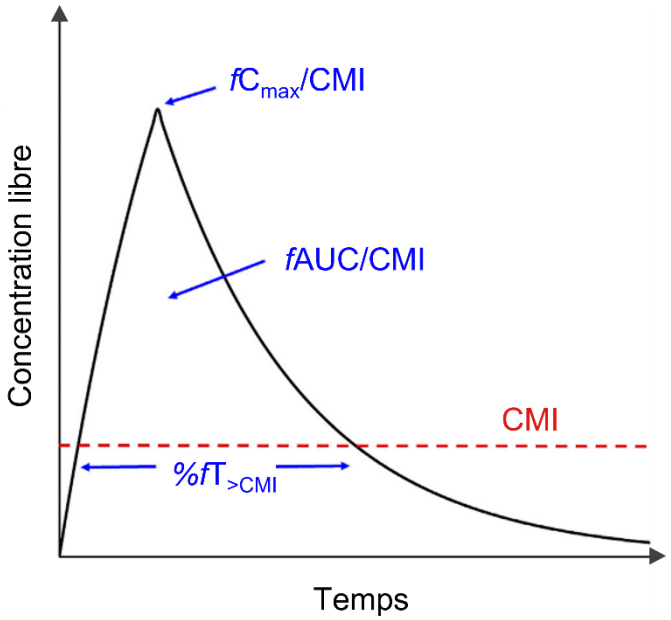


Figure 24. Les trois index PK/PD couramment utilisés. *f* signifiant *free*, c'est-à-dire que ce sont les concentrations libres qui sont utilisées. D'après (114).

On distingue les antibiotiques dits temps-dépendant, comme les béta-lactamines, dont l'efficacité est liée au pourcentage de temps durant lequel la concentration d'antibiotique libre est supérieure à la CMI (*f*T > CMI), des antibiotiques concentration-dépendant, comme les aminosides, dont l'efficacité dépend du rapport entre la concentration libre maximale et la CMI (fC_{max}/CMI), et enfin des antibiotiques AUC-dépendant, comme les tétracyclines, dont l'efficacité dépend du rapport entre l'AUC des concentrations libres au cours du temps et la CMI (*f*AUC/CMI) (113,115,116). Ainsi, dans le cas d'un antibiotique concentration-dépendant, la dose sera augmentée afin que la C_{max} soit X fois supérieure à la CMI si ce n'était pas déjà le cas, X correspondant à 8 à 10 fois la CMI pour les aminosides (117). En revanche, pour un antibiotique temps-dépendant, il sera préférable de réduire l'intervalle de prise entre les doses afin de maximiser la durée pendant laquelle les concentrations libres restent au-dessus de la CMI de la bactérie.

Ces index PK/PD sont généralement déterminés en réalisant des études de fractionnement de dose sur des modèles *in vivo* d'infection murins, pendant 24 h. Les souris sont rendues neutropéniques, puis infectées par la bactérie d'intérêt, classiquement dans la cuisse ou le poumon. Le traitement par l'antibiotique d'intérêt est ensuite administré, et des prélèvements plasmatiques sont effectués à différents temps pour obtenir la PK. Après 24 h, les souris sont sacrifiées et les organes récupérés,

broyés et ensemencés pour déterminer le nombre de bactéries pour chaque organe (115,116,118,119).

Ainsi, pour une même dose journalière, plusieurs profils pharmacocinétique distincts peuvent être obtenus selon le schéma de fractionnement adopté. Par exemple, une dose journalière de 1000 mg peut être fractionnée toutes les 12 h, toutes les 6 h et toutes les 3 h, générant ainsi trois schémas de fractionnement distincts et donc trois groupes de souris distincts, un groupe recevant un schéma de fractionnement. Pour chaque groupe de souris, les index PK/PD sont calculés en fonction des profils pharmacocinétique obtenus, qui peuvent varier d'une souris à l'autre en raison de la variabilité interindividuelle, ainsi qu'à partir de la CMI de la bactérie étudiée. Ces index sont reliés au comptage bactérien réalisé à 24 h en ajustant un modèle E_{max} sigmoïde (**Équation 1**).

$$E = E_0 - \frac{PD_{max} \times X^{\gamma}}{EC_{50}^{\gamma} + X^{\gamma}} \quad \textbf{(Équation 1)}$$

Où E représente la variation des comptages bactériens obtenus après 24 h de traitement par rapport à l'inoculum initial (exprimée en $\Delta\log_{10}$ UFC/mL), E_0 correspond à la variation des comptages bactériens après 24 h par rapport à l'inoculum initial en absence d'antibiotique, X désigne l'un des trois index PK/PD définis précédemment, PD_{max} correspond à l'effet maximal, lorsque l'augmentation de l'exposition n'entraîne plus de mort bactérienne, EC_{50} représente la valeur de X nécessaire pour atteindre 50 % de PD_{max}, et γ est le paramètre caractérisant la sigmoïdicité de la courbe. Ce modèle E_{max} sigmoïde va permettre de tracer une courbe de corrélation.

L'index PK/PD décrivant le mieux l'effet observé correspond à celui présentant la meilleure corrélation, c'est-à-dire avec le coefficient de détermination (R^2) le plus élevé (114,120). Une fois le meilleur index PK/PD déterminé, il est nécessaire de définir la cible PD à atteindre, c'est-à-dire la valeur minimale de l'index PK/PD nécessaire pour obtenir l'effet désiré. Généralement, l'effet correspond soit à la stase (défini par des comptages bactériens stables par rapport à l'inoculum), soit à une réduction de 1-$\log_{10}$, de 2-$\log_{10}$ ou de 3-$\log_{10}$ UFC/mL par rapport à l'inoculum (114,119,121).

Dans le cas du linézolide (**Figure 25**), l'étude d'Andes *et al.* n'a pas permis de discriminer entre l'AUC/CMI (R^2 = 75 %) et le % T> CMI (R^2 = 74 %). La cible PD pour obtenir une diminution d'environ 2-$\log_{10}$ par rapport au contrôle à 24 h, serait d'atteindre un rapport d'AUC/CMI > à environ 100 ou que T > CMI soit d'environ 55 % (122).

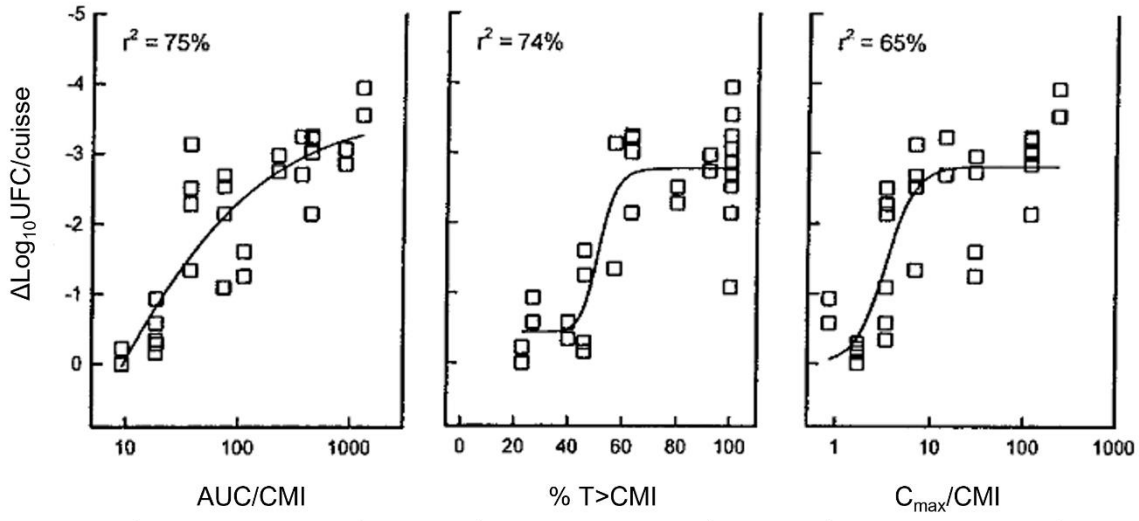


Figure 25. Relation entre la variation du nombre de *Staphylococcus aureus* observée à 24 h par rapport à l'inoculum initial dans la cuisse de souris pour les trois index PK/PD (AUC/MIC, T>MIC, C_{max}/CMI) du linézolide. Les points correspondent à la variation des comptages bactériens observée à 24 h pour un schéma posologique par rapport à l'inoculum initial pour deux souris. La ligne correspond à la courbe de corrélation après ajustement avec le modèle E_{max} sigmoïde. Adaptée à partir de (122).

Sandberg *et al*. a également réalisé une étude de fractionnement des doses sur un modèle murin de péritonite infecté par *Staphylococcus aureus* où ils ont observé une corrélation pour *f*AUC/CMI et *f*T > CMI avec une légère supériorité pour *f*AUC/CMI (R^2 = 55 %) par rapport à *f*T > CMI (R^2 = 51 %) (123). L'index PK/PD du linézolide a aussi été étudié chez l'homme dans une étude clinique menée par Rayner *et al*. sur 288 patients principalement atteints de bactériémies, d'infections cutanées et respiratoires, ainsi que, pour seulement deux patients, d'une infection du SNC. Cette étude indique que l'efficacité du linézolide serait observée pour des AUC/CMI entre 80 et 120 ou lorsque le % T> CMI est de 100 % (124).

3.3.2. La probabilité d'atteindre la cible

La probabilité d'atteindre la cible PD ou *Probability of Target Attainment* (PTA) est ensuite évaluée, afin de déterminer la proportion de patients pour lesquels le traitement, en fonction d'une posologie donnée et d'une bactérie avec une CMI donnée, sera efficace. Pour cela, des simulations de type Monte Carlo sont réalisées en utilisant un modèle de pharmacocinétique de population développé à partir de données cliniques. Ces simulations permettent de générer entre 1000 et 10 000 profils pharmacocinétique individuels pour chaque schéma posologique testé. Les index PK/PD sont ensuite calculés, à partir de chaque profil pharmacocinétique, pour chaque CMI étudiée, ce qui permet de déterminer la proportion de patients pour lesquels la valeur de l'index PK/PD dépasse la cible PD définie au préalable. Les PTA sont ensuite représentés graphiquement pour chaque schéma

posologique en fonction des valeurs de CMI étudiées, associés en général à la distribution des CMI observées en clinique (113,120,125,126).

Les données obtenues pour les 25 patients inclus dans l'étude PK-Pop-LCR ont été combinées pour construire un modèle de pharmacocinétique de population qui est présenté dans la **Figure 26**. Le modèle qui décrivait au mieux les données était un modèle avec 3 compartiments : un compartiment pour le plasma, un compartiment pour le LCS avec des échanges entre les deux symbolisés par les débits Q_{in} et Q_{out} et enfin le compartiment de la DVE qui est le reflet du compartiment LCS (105).

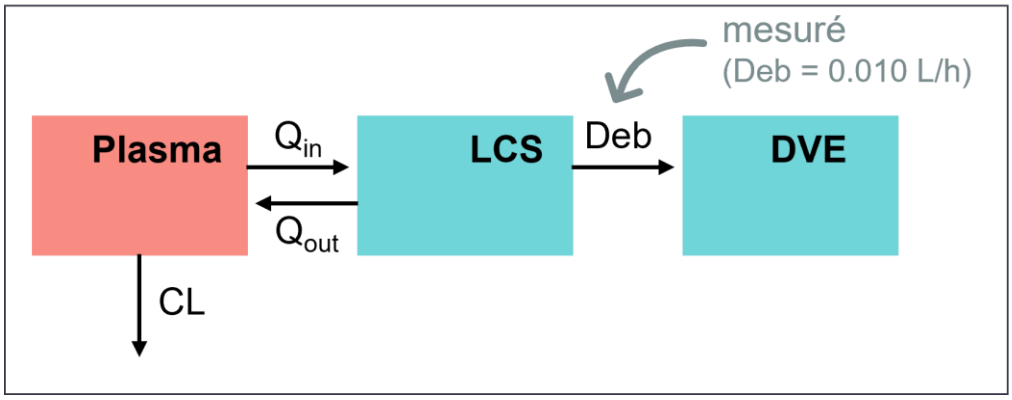


Figure 26. Structure du modèle de pharmacocinétique de population développé dans l'étude PK-POP-LCR. Q_{in} correspondant au débit d'entrée du linézolide vers le LCS et Q_{out} correspondant au débit de sortie du linézolide vers le plasma. CL correspond à la clairance du linézolide. Deb correspond au débit d'élimination du linézolide par la DVE.

Ce modèle a été utilisé pour réaliser des simulations de Monte Carlo sur 5 000 patients afin de calculer la PTA. La cible choisie pour le linézolide était d'atteindre un index PK/PD d'AUC/CMI supérieur à 100 (124), en utilisant les valeurs de CMI retrouvées pour des *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) et des *Staphylococcus epidermidis* résistant à la méticilline (SERM) dont la distribution de la fréquence est rapportée par l'EUCAST (86,105).

Ainsi, les simulations de Monte Carlo ont permis de simuler les concentrations de linézolide dans le LCS retrouvées chez 5 000 patients après des administrations répétées de 600 mg ou 900 mg de linézolide toutes les 8 h ou 12 h, pendant 30 min, ce qui donnait une dose journalière de 1200 mg, 1800 mg et 2700 mg. Ensuite, les AUC ont été calculées et rapportées à la valeur de la CMI des germes étudiés. Ce rapport devrait donc être supérieur à 100 pour que le schéma posologique soit considéré efficace contre ces bactéries. Le résultat des PTA est présenté dans la **Figure 27**.

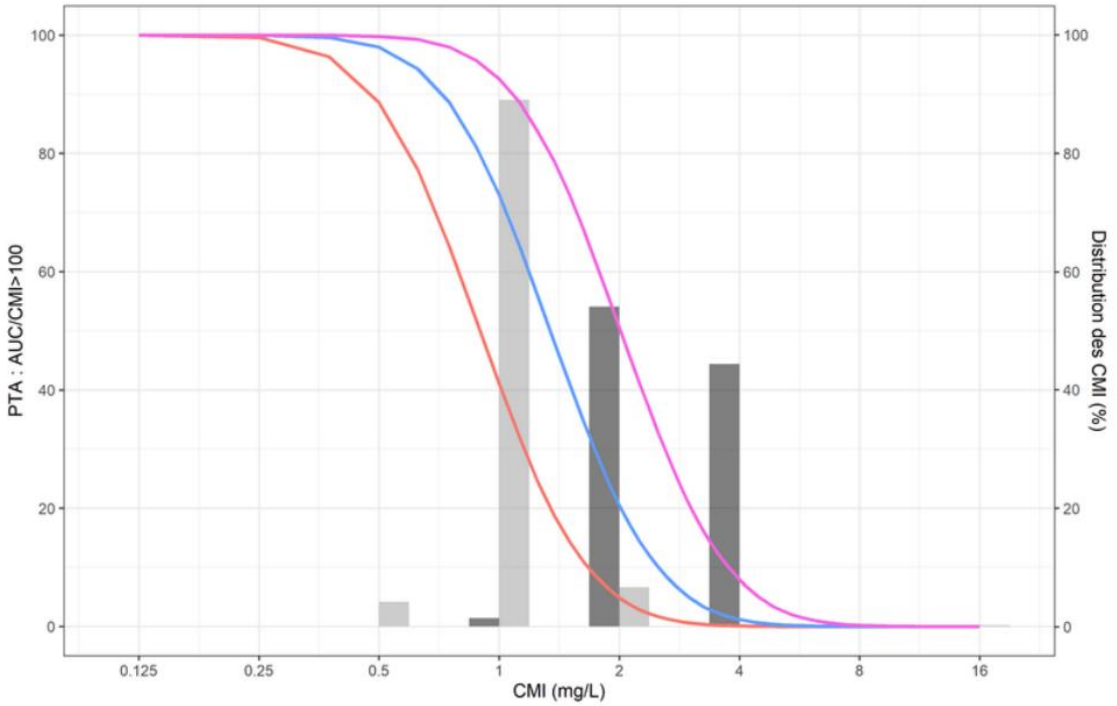


Figure 27. Représentation des PTA pour un index PK/PD du linézolide d'AUC/CMI supérieur à 100. La gamme de CMI retrouvée pour les bactéries étudiées est présentée en abscisse. La distribution des CMI, c'est-à-dire la fréquence de la CMI est présentée sur l'axe des ordonnées de droite avec les histogrammes pour les SARM (gris foncé) et les SERM (gris clair). Les PTA pour différents schémas posologiques sont représentés par les lignes avec la dose journalière de 1200 mg (rouge), 1800 mg (bleu) et 2700 mg (rose). Les PTA sont exprimés en pourcentage sur l'axe des ordonnées de gauche.

Ainsi, pour une souche avec une CMI à 2 mg/L, la posologie recommandée de 600 mg deux fois par jour (ligne rouge) permettrait d'atteindre la cible dans moins de 10 % des cas. Lorsqu'on augmente la posologie à 600 mg trois fois par jour ou 900 mg deux fois par jour (ligne bleue), la cible serait atteinte seulement dans 20 % des cas (105).

Par conséquent, la posologie de 600 mg deux fois par jour ne semble pas permettre d'atteindre des concentrations en linézolide, et donc des AUC, suffisantes dans le LCS, malgré une bonne pénétration du linézolide, par rapport aux CMI retrouvées chez les bactéries les plus souvent en cause. Une optimisation de la posologie semble nécessaire pour atteindre la cible et être efficace contre ces infections neuro-méningées associées à une DVE. Cette conclusion a également été rapportée par Luque *et al*. dans une étude portant sur 11 patients de réanimation possédant une DVE avec une infection suspectée ou prouvée. La cible AUC/CMI ≥ 80 n'était pas atteinte dans le LCS pour des bactéries ayant une CMI ≥ à 1 mg/L (104).

Cependant, les conclusions précédentes sont basées sur un index PK/PD, qui est lui-même remis en question. En effet, l'index PK/PD associé à l'efficacité du linézolide n'est pas clairement défini entre l'AUC/CMI et le pourcentage de temps au-dessus de la CMI (%T > CMI) (122,124). En effet, l'étude de

Beer *et al*. s'est basé sur l'index PK/PD T > CMI et a retrouvé une bonne efficacité du linézolide à la posologie de 600 mg q12h avec un T > CMI de 99,8 % pour des bactéries dont la CMI est égale à 2 mg/L (103).

Bien que des discordances existent, les index PK/PD ont été déterminés de manière empirique à partir des concentrations de linézolide mesurées dans le plasma (122–124). Or, comme mentionné précédemment, les concentrations d'antibiotiques dans le LCS sont souvent inférieures à celles observées dans le plasma. Ainsi, les concentrations plasmatiques ne semblent pas être un bon reflet des concentrations au site infectieux pour prédire l'efficacité des antibiotiques dans le traitement des infections neuro-méningées, d'où la nécessité de définir un index PK/PD spécifique de ces infections neuro-méningées.

Toutefois, les index PK/PD sont établis à partir de la CMI, dont les limites influencent leur détermination. Bien que cette méthode soit simple et rapide à réaliser, la CMI reste une valeur discrète, déterminée visuellement à partir de dilutions géométriques de raison 2, ce qui la rend relativement imprécise. De plus, elle ne prend pas en compte l'évolution de l'effet en fonction du temps avec l'apparition éventuelle de résistances survenant généralement à long terme. En effet, une bactérie peut être classée comme sensible sur la base de sa CMI. Cependant, au cours des 20 h d'incubation, sa croissance bactérienne pourrait initialement diminuer, puis augmenter. Ce phénomène, appelé repousse, révèle un mécanisme de résistance à l'antibiotique qui n'est pas détectable lors de la détermination de la CMI (114,127,128).

Ainsi, pour pallier ces limites, il est nécessaire de mieux caractériser la relation PK/PD du linézolide en utilisant des modèles *in vitro* permettant l'étude de l'effet des concentrations de linézolide dans le LCS au cours du temps, afin d'optimiser le traitement des infections neuro-méningées.

4. Modèles *in vitro* pour l'évaluation PK/PD

L'évaluation de l'efficacité des antibiotiques peut être réalisée à l'aide de différents modèles *in vitro*. Parmi eux, les courbes de bactéricidie permettent de suivre l'évolution de la population bactérienne en fonction du temps sous l'effet d'un antibiotique. Elles peuvent être réalisées en condition statique, où les concentrations d'antibiotique restent constantes tout au long de l'expérience, ou en condition dynamique, où elles fluctuent au cours du temps. Contrairement à la détermination de la CMI, qui fournit une valeur unique à un instant donné, les courbes de bactéricidie permettent une analyse longitudinale de la cinétique d'action des antibiotiques.

4.1. Les courbes de bactéricidies en condition statique

Les courbes de bactéricidie en condition statique *Time-Kill Curves* (TKC) peuvent être réalisées dans des plaques à 24 puits ou dans des tubes. Un volume défini de milieu de culture est déposé dans chaque puits ou tube, suivi de l'ajout de l'antibiotique, qui est dilué de manière à obtenir différentes concentrations d'antibiotique correspondant à des multiples de la CMI. Ensuite, une suspension bactérienne est ajoutée de manière à obtenir un inoculum final à 1 x 10^6 UFC/mL. Des prélèvements à différents temps sont réalisés, dilués dans du chlorure de sodium 0.9 % et chaque dilution est étalée sur des géloses afin de suivre l'évolution des comptages bactériens en fonction du temps. Un schéma présentant les principales étapes pour réaliser les TKC est présenté dans la **Figure 28**.

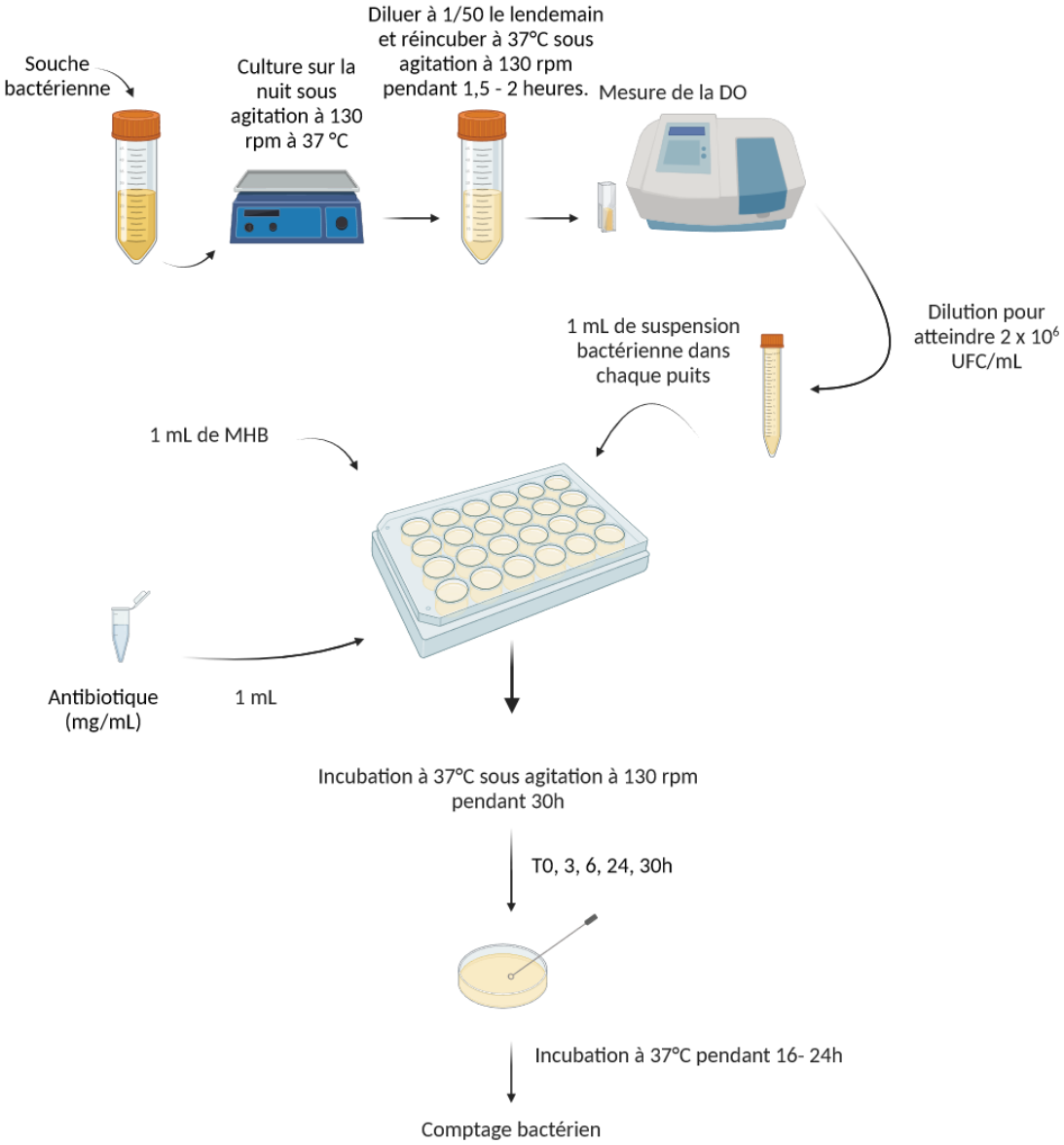


Figure 28. Protocole de réalisation d'une TKC. Créée avec BioRender.com.

Les courbes de bactéricidie en condition statique, contrairement à la CMI, permettent d'obtenir l'évolution des comptages bactériens au cours du temps. Il est ainsi possible de caractériser la croissance bactérienne, l'efficacité de l'antibiotique utilisé et d'observer des repousses bactériennes, suggérant l'apparition d'un mécanisme de résistance. Cependant, les concentrations restent constantes durant toute la durée de l'expérience, ce qui n'est pas le cas *in vivo* puisque celles-ci fluctuent au cours du temps (129).

4.2. Les courbes de bactéricidie en condition dynamique

L'efficacité d'un antibiotique contre une bactérie donnée peut être évaluée dans des conditions dynamiques, c'est-à-dire que les concentrations reproduites varient au cours du temps. Les modèles utilisés en condition dynamique permettent de se rapprocher des conditions *in vivo* puisque ce sont des profils pharmacocinétiques observés dans l'organisme qui sont reproduits. Deux principaux modèles sont distingués : des modèles de dilution et des modèles de dialyse, aussi appelés, respectivement, modèle à un compartiment ou deux compartiments (129–131).

4.2.1. Modèle à un compartiment

Le modèle à un compartiment a été décrit par Grasso *et al*. en 1978 (132). Il comporte un réservoir central contenant un volume défini de culture bactérienne dans lequel est administré l'antibiotique via un bolus ou une perfusion à l'aide d'une pompe. L'élimination de l'antibiotique est ensuite mimée par dilution en ajoutant du milieu de culture sans antibiotique dans le réservoir central à l'aide d'une pompe péristaltique réglée à un débit continu. Le volume du réservoir central est maintenu constant puisque l'excédent de volume dans le réservoir central est éliminé à la même vitesse dans une poubelle. Un compartiment dépôt dans lequel l'antibiotique est administré peut être ajouté afin de reproduire la phase d'absorption d'un profil pharmacocinétique (131). Une représentation schématique est présentée dans la **Figure 29**.

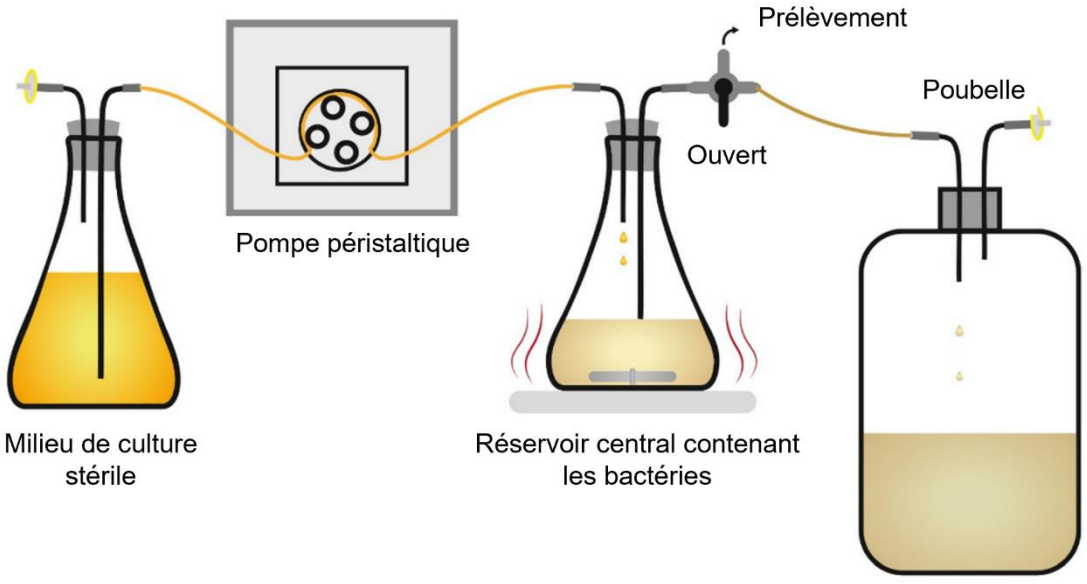


Figure 29. Représentation schématique d'un modèle *in vitro* d'infection à un compartiment. D'après (131).

Le principal inconvénient de ce modèle réside dans le fait que des bactéries sont éliminées lorsque le milieu de culture du réservoir central est évacué vers la poubelle. L'évacuation du milieu de

culture excédentaire dans le réservoir central dépend de la demi-vie d'élimination de la molécule étudiée. Ainsi, plus la demi-vie reproduite sera courte, plus l'élimination des bactéries sera importante (131).

Par ailleurs, étant donné que ce sont les comptages bactériens qui sont suivis pour étudier l'effet de l'antibiotique, cette perte de bactéries peut conduire à une sous-estimation des concentrations nécessaires pour obtenir un effet antibactérien, en particulier lorsque la bactérie étudiée se réplique lentement (131).

4.2.2. Modèle à deux compartiments

Des modèles à deux compartiments ont été rapidement développés afin d'empêcher l'élimination des bactéries, celles-ci étant placées dans un compartiment périphérique. Dès 1981, Zinner *et al*. ont utilisé une cartouche constituée de capillaires semi-perméables comme compartiment périphérique (133). Ce modèle a ensuite évolué et est aujourd'hui connu sous le nom de modèle d'infection *in vitro* d'*hollow-fiber* (HFIM), comme illustré dans la **Figure 30**.

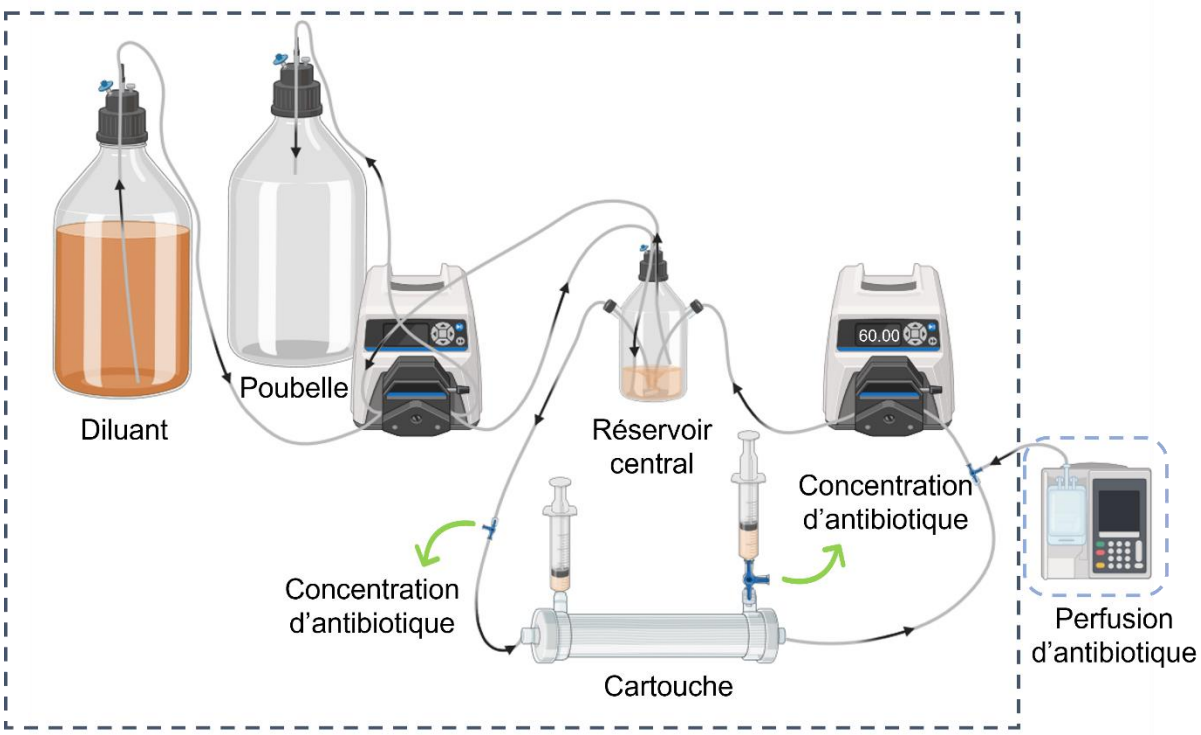


Figure 30. Représentation schématique du modèle d'*hollow-fiber*. Les flèches noires correspondent à la direction du flux. Les flèches vertes indiquent les sites de prélèvements. La ligne en pointillés gris représente l'incubateur à 37°C ± 2°C. La ligne en pointillés bleus correspond à la boîte réfrigérée (2-10°C). Créée avec BioRender.com.

Il comprend une cartouche, contenant des centaines de fibres creuses, agissant comme site d'infection, ainsi qu'un ensemble de bouteilles et de pompes permettant de simuler les profils

pharmacocinétiques d'un antibiotique. L'ensemble est placé dans un incubateur généralement réglé à 37°C ± 2°C. Plus précisément, une solution d'antibiotique est préparée, puis placée, dans une pompe de perfusion ambulatoire ou dans un pousse seringue, maintenue à 2-10°C durant toute l'expérience, afin de limiter la dégradation de l'antibiotique. L'antibiotique est ensuite perfusé dans une boucle de circulation qui relie le réservoir central à une cartouche de dialyse pédiatrique. Cette circulation est assurée par une pompe péristaltique, réglée à un débit rapide généralement compris entre 80 et 120 mL/min, afin de maintenir un équilibre des concentrations d'antibiotique entre le réservoir central et la cartouche. Pour reproduire l'élimination de l'antibiotique, une deuxième pompe péristaltique ajoute du milieu de culture sans antibiotique (Diluant) dans le réservoir central et retire l'excédent de milieu de culture (Poubelle) de façon à maintenir un volume constant dans le réservoir central (134).

La cartouche est composée d'un espace extra-capillaire (ECS) et d'un espace intra-capillaire (ICS) (**Figure 31**). L'ECS est rempli par du milieux de culture, puis inoculé par les bactéries étudiées. Les fibres creuses ou capillaires de la cartouche sont des membranes semi-perméables en polysulfone ou en cellulose dont la taille des pores permet la diffusion de l'antibiotique depuis l'ICS vers l'ECS et ainsi d'agir sur les bactéries retenues dans l'ECS (134).

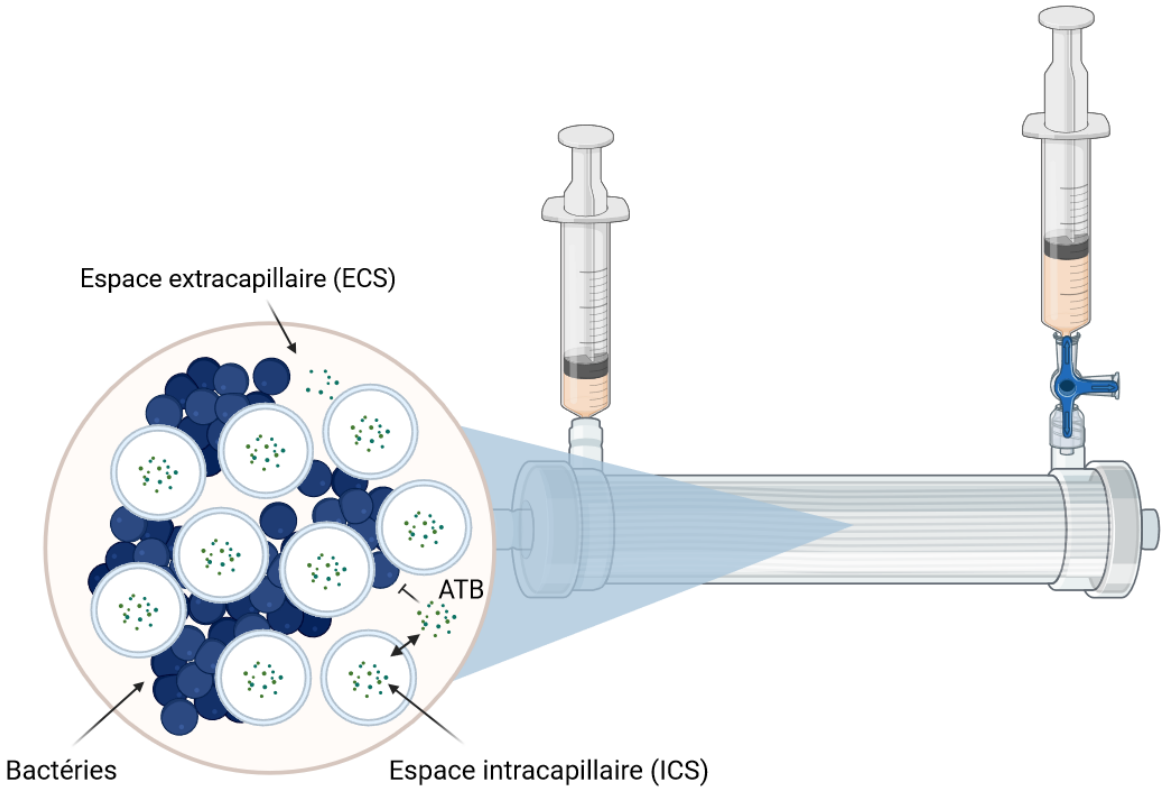


Figure 31. Coupe transversale de la cartouche de dialyse utilisée dans l'HFIM. Créée avec BioRender.com.

Pour s'assurer de la bonne reproduction des concentrations, des prélèvements à différents temps sont réalisés au niveau du réservoir central et de la cartouche. L'évolution des comptages bactériens au cours du temps est déterminée en étalant les prélèvements de la cartouche sur gélose.

Traditionnellement, les concentrations reproduites dans l'HFIM correspondent à des profils pharmacocinétiques plasmatiques (135–140). Cependant, dans le cas des infections cérébrales, où la diffusion des antibiotiques est limitée par les barrières cérébrales, il est plus pertinent de reproduire les concentrations observées au site de l'infection. En effet, dans le cas du linézolide, les profils pharmacocinétiques des concentrations libres observés dans l'étude PK-Pop-LCR étaient différents entre le plasma et le LCS puisque la concentration maximale dans le LCS était diminuée (environ 5 mg/L contre 15 mg/L) par rapport au plasma et le temps pour atteindre la concentration maximale était plus tardif que dans le plasma (environ 4 h contre 0.5 h) (**Figure 22**). Ce type de profils a également été retrouvé pour les infections pulmonaires, où des concentrations moyennes de ceftolozane et de tazobactam dans le liquide de revêtement épithélial ou *epithelial lining fluid* (ELF) étaient inférieures à celles observées dans le plasma (**Figure 32**) (141).

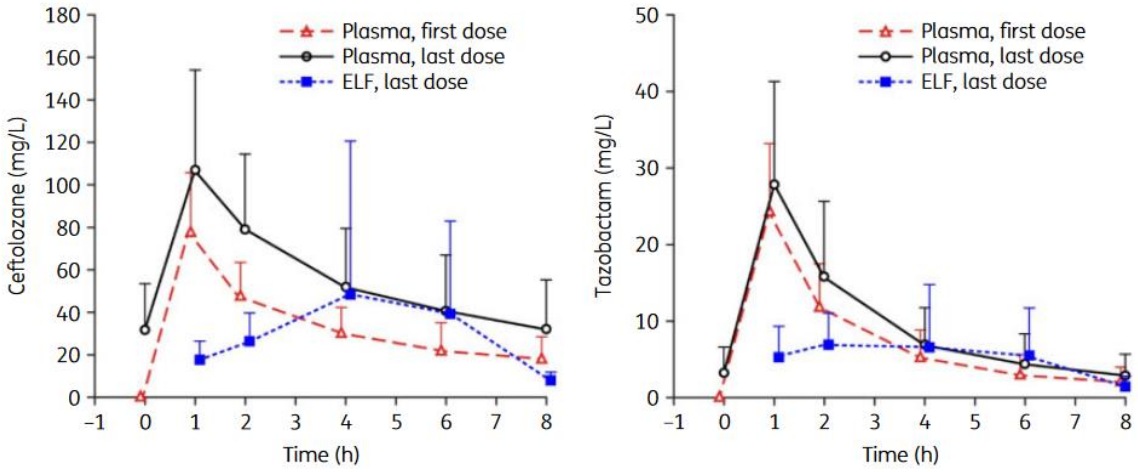


Figure 32. Profils pharmacocinétiques moyens du ceftolozane et du tazobactam dans le plasma et le liquide de revêtement épithélial (ELF). Les concentrations de ceftolozane sont présentées sur le graphique de gauche tandis que celui de droite présente les concentrations de tazobactam. Les concentrations plasmatiques obtenues pour la première dose sont indiquées en rouge, celles de la dernière dose en noir, et les concentrations dans l'ELF pour la dernière dose en bleu. Issue de (141).

Contrairement à d'autres études, Carr *et al*. ont cherché à reproduire dans l'HFIM les concentrations de ceftolozane et de tazobactam observées dans l'ELF, telles que décrites dans une autre étude et présentées dans la **Figure 32**. Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 33**.

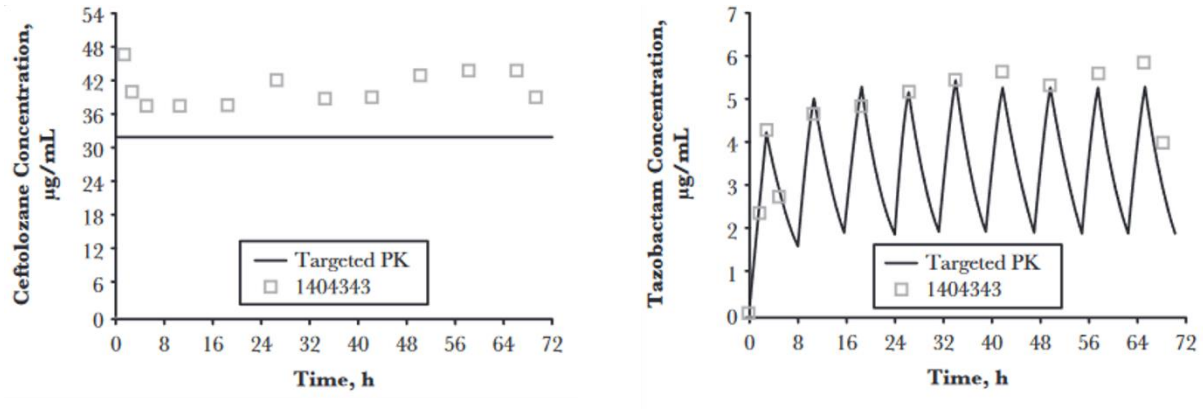


Figure 33. Concentrations de ceftolozane et de tazobactam reproduites dans l'HFIM. Les concentrations de ceftolozane sont présentées sur le graphique de gauche tandis que celui de droite présente les concentrations de tazobactam. La ligne pleine correspond à ce qu'ils cherchaient à reproduire et les points correspondent aux concentrations réellement observées. Issue de (142).

Pour le ceftolozane, une perfusion continue a été utilisée afin d'obtenir la concentration moyenne observée, négligeant ainsi la phase d'absorption pourtant présente dans l'ELF (**Figure 32**). Concernant le tazobactam, des perfusions répétées toutes les 8 heures ont été administrées pour simuler la concentration à l'état d'équilibre dans l'ELF (142). Toutefois, ce mode d'administration a conduit à de grandes variations de concentrations, qui ne semblaient pas présentes dans l'ELF (**Figure 32**). Une autre étude a cherché à reproduire les concentrations pulmonaires d'amikacine, mais a rapporté que les concentrations observées dans l'HFIM était dix fois supérieures à celles attendues (143). Ainsi, il existe une tendance à vouloir reproduire les concentrations observées au site de l'infection. Toutefois, les méthodes utilisées n'ont pas permis de reproduire la cinétique observée au site de l'infection, mettant en évidence la nécessité de développer de nouvelles approches.

En outre, le modèle d'HFIM est privilégié pour déterminer des index PK/PD (144) et pour optimiser les schémas posologiques (135). Il a l'avantage de pouvoir être réalisé sur des durées plus longues que celles pratiquées lors des études *in vivo* chez la souris qui sont généralement limitées à 24 h pour la détermination des index PK/PD (131). De plus, la pharmacocinétique dans les modèles animaux diffère de celle observée chez l'homme, avec une demi-vie d'élimination généralement plus rapide (145). En effet, dans le cas du linézolide, la demi-vie d'élimination est d'environ 1 h chez la souris, contre 5 à 7 h chez l'homme (122,146). Bien qu'il soit possible de reproduire les profils pharmacocinétiques observés chez l'homme dans un modèle de rat humanisé en ajustant les débits de perfusion pour compenser l'élimination rapide, comme l'ont décrit Hoover *et al.* (147), l'HFIM est privilégié, non seulement en raison de sa simplicité d'utilisation, mais aussi parce qu'il limite l'utilisation de modèles animaux, ce qui s'inscrit dans la tendance actuelle visant à réduire l'expérimentation animale.

Cependant, ces modèles *in vitro* sont généralement réalisés dans des milieux de culture riches, tel que le MHB (144,148–150), recommandé par l'EUCAST ou le CLSI (76,151) pour la détermination des CMI. Pourtant, la composition du MHB est éloignée des milieux physiologiques comme le LCS, puisqu'il contient de l'acide caséique, de l'extrait de bœuf et de l'amidon tandis que le LCS est essentiellement composé d'ions (1). L'utilisation de ces milieux de culture riches pourrait conduire à des difficultés d'extrapolation vers l'*in vivo*. En effet, Mouton *et al.* a montré un ralentissement de la croissance bactérienne d'une souche de référence de *Pseudomonas aeruginosa* dans du MHB dilué de 100 à 1 % (152). La même observation a été faite sur des souches de référence d'*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* et *Candida albicans*, dans des liquides de dialyse péritonéale et a été attribuée à la pauvreté du milieu de culture (153,154). De plus, un impact a été également démontré sur l'effet de l'antibiotique puisque l'étude de Mouton *et al.* a montré que la CMI du méropénème diminuait avec la dilution du MHB (152).

Par conséquent, il semble pertinent d'évaluer l'effet des antibiotiques sur les bactéries dans des milieux se rapprochant le plus possible des conditions physiologiques. Dans le contexte des infections neuro-méningées associées aux soins, l'efficacité des antibiotiques utilisés pourrait être évaluée dans des HFIM réalisés avec du LCS. Cependant, le système d'HFIM requiert plusieurs litres de milieu de culture, ce qui rend l'utilisation de LCS impossible, sachant que le volume physiologique chez l'adulte est d'environ 0,15 L (1,2,19,25). Plusieurs formulations de LCS artificiel (LCSa) existent, ce qui pourrait constituer un bon substitut au LCS physiologique (30,33,155–159). Toutefois, leur composition varie, notamment en glucose, dont la concentration peut atteindre 13 mM, soit bien au-delà du maximum physiologique de 4,4 mM (30–33). De plus, certaines formulations ne contiennent pas de bicarbonates, cette absence étant justifiée par la nécessité d'éviter la formation de gaz dans les tubulures lors de l'utilisation de pompes, ce qui pourrait fausser le débit de perfusion (155,156). Toutefois, les bicarbonates jouent un rôle essentiel en contribuant au maintien du pH du LCS à des valeurs physiologiques (33). De plus, toutes les formulations étaient dépourvues d'acide-aminés, pourtant présents dans le LCS physiologique et constituant une source essentielle pour le métabolisme et la synthèse de la paroi des bactéries, ce qui souligne la nécessité de développer un LCSa plus proche de la composition physiologique (1,26,160).

5. Analyse des données par modélisation mathématique

Les données observées lors des TKC et des HFIM peuvent être utilisées pour construire des modèles PK/PD. Ces modèles sont composés de sous-modèles (modèle PK, modèle bactérien, modèle d'effet et, éventuellement, modèle de résistance) qui sont interconnectés. Chaque sous-modèle repose sur des compartiments définis et régis par des équations mathématiques, permettant de décrire l'évolution des données observées au cours du temps. L'utilisation de la modélisation PK/PD constitue une approche permettant de caractériser la PK d'un antibiotique, la croissance bactérienne, l'effet de l'antibiotique et l'éventuelle émergence de résistances.

5.1. Modèle pharmacocinétique

Le modèle PK décrit l'évolution des concentrations au cours du temps. Pour les expériences d'HFIM, l'évolution de la concentration (C) au cours du temps est décrite classiquement par un modèle mono-compartimental, associé à une constante de vitesse d'élimination de l'antibiotique (ke) selon l'**Équation 2**, mais aussi par des modèles bi-compartimentaux (161).

$$\frac{dC}{dt} = -ke \times C \qquad \textbf{(Équation 2)}$$

En revanche, lors des expériences de TKC, la concentration en antibiotique est normalement stable tout au long de l'expérience, ce qui ne nécessite pas de modèle PK. Toutefois, si l'antibiotique est instable à la chaleur, le même modèle peut être utilisé mais la constante d'élimination correspondra alors à une constante de vitesse de dégradation (k_{deg}), comme illustré dans la **Figure 34** (120,162).

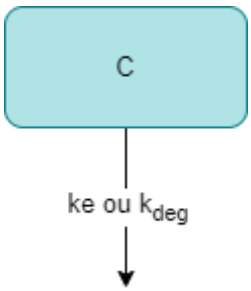


Figure 34. Représentation schématique d'un modèle PK mono-compartimental. C correspond à la concentration d'antibiotique. ke correspond à la constante de vitesse d'élimination de l'antibiotique. k_{deg} correspond à la constante de vitesse de dégradation de l'antibiotique. Créée avec draw.io (163).

5.2. Modèle bactérien

Le modèle bactérien décrit la croissance et la mort naturelle des bactéries au cours du temps. Le plus simple consiste à décrire une population bactérienne homogène (B) par un compartiment, associé à des constantes de vitesse k_{growth} et k_{death} décrivant, respectivement, la croissance et la mort naturelle bactérienne (**Figure 35**).

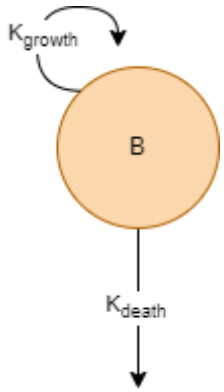


Figure 35. Représentation schématique d'un modèle bactérien pour une population bactérienne homogène. B correspond à une population bactérienne homogène. k_{growth} correspond à la constante de vitesse de croissance bactérienne tandis que k_{death} correspond à la constante de vitesse de mort bactérienne. Créée avec draw.io (163).

Toutefois, les expériences de TKC et d'HFIM ne sont pas suffisantes pour distinguer k_{growth} et k_{death}, seule la résultante $(k_{net} = k_{growth} - k_{death})$ est observée. En absence d'antibiotique, les bactéries se multiplient de manière exponentielle jusqu'à atteindre une phase stationnaire et un plateau. Ce phénomène est décrit selon l'**Équation 3**, où B_{max} représente la concentration maximale de bactéries atteinte au plateau (164).

$$\frac{dB}{dt} = k_{net} \times \left(1 - \frac{B}{B_{max}}\right) \times B \qquad \textbf{(Équation 3)}$$

5.3. Modèle d'effet

Le modèle d'effet relie la concentration d'antibiotique (C) et l'effet (E), généralement par un modèle de type $E_{max,}$ qui peut être sigmoïde ou non $(\gamma = 1)$, tel que décrit dans l'**Équation 4**, où E_{max} correspond à l'effet maximal, EC_{50} correspond à la concentration permettant d'obtenir 50 % de l'effet maximal et γ est le coefficient caractérisant la sigmoïdicité de la courbe (113).

$$E = \frac{E_{max} \times C^{\gamma}}{EC_{50}^{\gamma} + C^{\gamma}} \qquad \textbf{(Équation 4)}$$

Le mécanisme d'action de l'antibiotique peut orienter le choix où appliquer l'effet. L'antibiotique peut soit inhiber la croissance bactérienne s'il est bactériostatique, auquel cas l'effet sera appliqué à k_{growth}, comme dans l'**Équation 5**, soit favoriser la mort bactérienne s'il est plutôt bactéricide, auquel cas l'effet sera appliqué à k_{death}, comme dans l'**Équation 6** (165)**.**

$$\frac{dB}{dt} = k_{growth} \times (1 - E) \times B - k_{death} \times B \qquad \textbf{(Équation 5)}$$

$$\frac{dB}{dt} = k_{growth} \times B - k_{death} \times (1 + E) \times B \qquad \textbf{(Équation 6)}$$

5.4. Modèle de résistance

Dans certains cas, la bactérie développe des mécanismes de résistance face à l'antibiotique. Cela se traduit, le plus souvent, par des profils présentant une décroissance bactérienne initiale suivi d'une repousse, lors de la réalisation *in vitro* des courbes de bactéricidie. Les repousses surviennent lorsque la sensibilité des bactéries à l'antibiotique diminue et sont décrites par deux principaux types de modèles : les modèles d'adaptation et les modèles de sous-population.

5.4.1. Modèle d'adaptation

Le modèle d'adaptation suppose que la population bactérienne initiale est entièrement sensible à l'antibiotique, mais qu'une résistance apparaît progressivement au cours de l'exposition à celui-ci. Cette adaptation est modélisée à l'aide de deux compartiments supplémentaires, AR_{off} et AR_{on}, représentant respectivement la proportion de bactéries non adaptées et adaptées. La transition d'un état non adapté à un état adapté est caractérisée par une constante de vitesse (k_{on}), qui peut dépendre ou non de la concentration en antibiotique. Ainsi, plus les bactéries sont exposées à l'antibiotique, plus elles évoluent vers un état adapté, avec une sensibilité réduite au traitement, entraînant l'apparition d'un phénomène de repousse. Toutefois, un retour à un état non adapté est également possible et est décrit par la constante de vitesse (k_{off}) (166). Une représentation schématique est présentée dans la **Figure 36**.

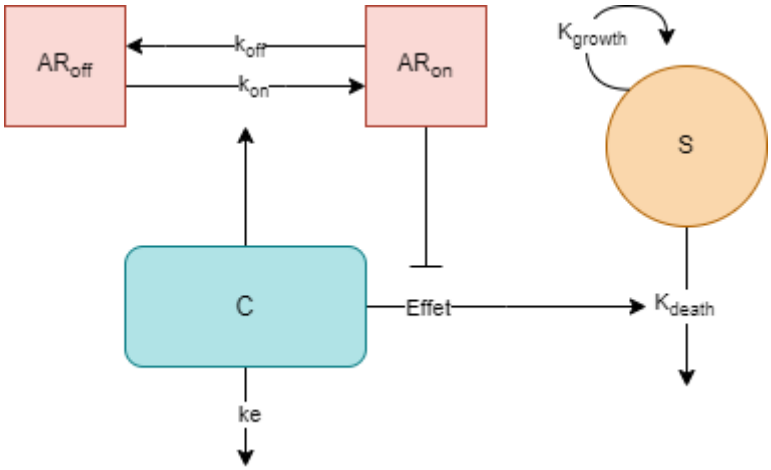


Figure 36. Représentation schématique d'un modèle d'adaptation. S correspond à une population bactérienne homogène. k_{growth}, correspond à la constante de vitesse de croissance bactérienne tandis que k_{death} correspond à la constante de vitesse de mort bactérienne. C correspond à la concentration en antibiotique. ke correspond à la constante de vitesse d'élimination de l'antibiotique. AR_{off} et AR_{on} représentent respectivement la proportion de bactéries non adaptées et adaptées. k_{on} correspond à la constante de vitesse de passage d'un état non adapté à adapté. k_{off} correspond à la constante de vitesse de passage d'un état adapté à non adapté. Créée avec draw.io (163).

5.4.2. Modèle de sous-population

Le modèle de sous-population suppose que la population bactérienne n'est pas homogène dès le départ, mais composée de plusieurs sous-populations dont la sensibilité à l'antibiotique diffère. Classiquement, on retrouve un modèle à deux sous-populations distinctes, dont une sensible et une résistante à l'antibiotique, comme illustré dans la **Figure 37**. Les paramètres tels que l'E_{max} et/ou l'EC_{50} seront, respectivement, plus faible et plus élevé pour la sous-population résistante comparé à celle sensible. Ainsi, la sous-population sensible est éliminée par l'antibiotique, tandis que la sous-population résistante survit, ce qui conduit à ces profils de repousse bactérienne (167).

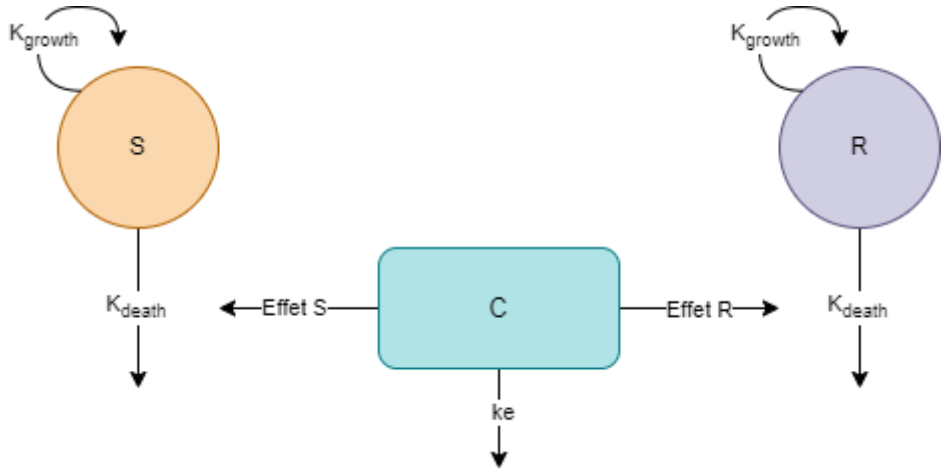


Figure 37. Représentation schématique d'un modèle avec deux sous-populations bactérienne. S et R correspondent aux sous-populations bactérienne, respectivement, sensible et résistante. k_{growth},

correspond à la constante de vitesse de croissance bactérienne tandis que k_{death} correspond à la constante de vitesse de mort bactérienne. C correspond à la concentration en antibiotique. ke correspond à la constante de vitesse d'élimination de l'antibiotique. Un effet sur la population S (Effet_S) est distingué de celui sur la population R (Effet_R). Créée avec draw.io (163).

Toutefois, la résistance bactérienne n'est pas toujours associée à la présence de repousse, mais plutôt à la présence de bactéries persistantes protégées de l'action de l'antibiotique (120). Ce phénomène a été rapporté pour la première fois lors d'infections à staphylocoques traitées par la pénicilline (168). La persistance se manifeste *in vitro* par une courbe biphasique, caractérisée par une décroissance initiale rapide des comptages bactériens suivi d'un état globalement stationnaire, où la décroissance bactérienne est ralentie (169,170). Ce phénomène est modélisé en considérant deux sous-populations, une croissante, sensible à l'antibiotique et une non-croissante et persistante. Une représentation schématique est présentée dans la **Figure 38**.

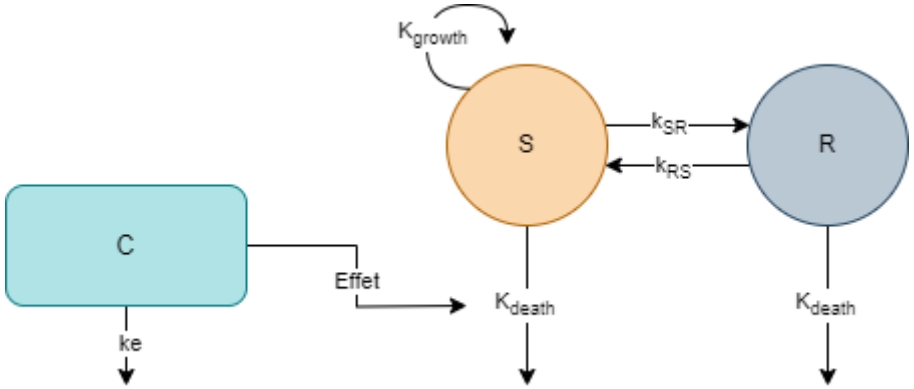


Figure 38. Représentation schématique d'un modèle de persistance. S correspond à la sous-population sensible et R correspond à la sous-population persistante. Le transfert de la population S vers la population R est caractérisé par la constante de vitesse k_{SR} et inversement par k_{RS}. k_{growth} correspond à la constante de vitesse de croissance bactérienne tandis que k_{death} correspond à la constante de vitesse de mort bactérienne. C correspond à la concentration en antibiotique. ke correspond à la constante de vitesse d'élimination de l'antibiotique. Créé avec draw.io (163).

Contrairement au modèle précédent, la population sensible change d'état pour devenir une population persistante à de forte densité bactérienne, selon une constante de vitesse k_{SR}, tel que décrit dans l'**Équation 7**. Cet état est réversible selon la constante de vitesse k_{RS} (169).

$$k_{SR} = \frac{(k_{growth} - k_{death}) \times (S+R)}{B_{max}} \quad \textbf{(Équation 7)}$$

Ce modèle s'applique à *Staphylococcus aureus* (162,171–174), ainsi qu'à certaines bactéries Gram-négatives (175). Cependant, il est utilisé moins fréquemment que ceux précédemment cités (175).

Les sous-modèles décrits précédemment à partir de données cliniques et/ou *in vitro* peuvent être combinés pour construire des modèles PK/PD. Ces modèles PK/PD peuvent ensuite être utilisés pour réaliser des simulations PK/PD afin de prédire l'effet attendu dans des conditions non testées *in vitro*. Par exemple, il est possible de simuler la PK obtenue pour différents schémas posologiques et d'évaluer l'effet PD associé. Cette approche permet d'explorer un grand nombre de scénarios, réduisant ainsi le nombre d'expériences *in vitro* et *in vivo* nécessaires.

Objectifs de la thèse

Les infections neuro-méningées associées aux DVE sont majoritairement causées par des bactéries du genre *Staphylococcus.* En raison de sa faible diffusion dans le LCS, la vancomycine n'est recommandée en première intention que si la CMI est inférieure à 1 mg/L (40). Or, la majorité des bactéries responsables de ces infections présentent une CMI à 2 mg/L, rendant la vancomycine inadaptée et justifiant le recours au linézolide. Toutefois, plusieurs études suggèrent que la posologie recommandée de 600 mg en perfusion de 30 min deux fois par jour serait insuffisante et qu'une adaptation posologique serait nécessaire (104,105). Cependant, ces conclusions reposent sur des simulations utilisant un index PK/PD discuté et défini à partir des concentrations plasmatiques, qui ne reflètent pas nécessairement les concentrations cérébrales. Ainsi, l'objectif de cette thèse a été d'optimiser le schéma posologique du linézolide pour le traitement de ces infections, en adoptant une approche transversale, combinant expérimentation *in vitro* et modélisation PK/PD, à travers trois études :

1. **Définition de l'index PK/PD du linézolide pour les infections cérébrales :** dans cette première étude, nous avons défini l'index PK/PD du linézolide dans les infections cérébrales à l'aide de simulations. Ces dernières s'appuient sur un modèle PK élaboré à partir des concentrations de linézolide dans le LCS obtenues en clinique, couplé à un modèle PD basé sur des courbes de bactéricidie en concentrations statiques de linézolide sur neuf souches de *Staphylococcus* spp.

2. **Développement d'une approche expérimentale et computationnelle pour reproduire les profils PK tissulaires dans un modèle *in vitro* d'infection.** Les HFIM sont utilisés pour évaluer l'efficacité des antibiotiques en reproduisant les concentrations plasmatiques observées chez les patients. Toutefois, dans le contexte des infections cérébrales, les profils PK plasmatiques diffèrent significativement des profils PK LCS. Cette deuxième étude a permis de développer une approche combinant modélisation et expérimentation afin de reproduire dans un HFIM des profils PK tissulaires présentant une phase d'absorption de premier ordre.

3. **Étude PK/PD du linézolide vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* dans un modèle HFIM simulant les concentrations cérébrales.** Cette dernière étude s'est attachée à caractériser la relation PK/PD du linézolide contre *Staphylococcus aureus* dans un modèle HFIM innovant, où les concentrations simulées correspondaient à celles mesurées dans le LCS, et non dans le plasma. Pour se rapprocher des conditions cliniques, l'impact du milieu a été évalué en développant un LCS artificiel reproduisant la composition physiologique du LCS humain.

Travail expérimental

Partie 1 : Définition de l'index PK/PD du linézolide pour les infections cérébrales

Cette première partie a permis la rédaction d'un premier article, qui est toujours en cours d'écriture, intitulé : **« Simulation-based prediction of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) index for linezolid to treat cerebral infections in critically ill patients »** par Noémie Prébonnaud, Michael Burtin, Sandrine Marchand, Nicolas Grégoire, Claire Dahyot-Fizelier, Vincent Aranzana-Climent et Alexia Chauzy. Un résumé est présenté ci-dessous.

Résumé :

Le linézolide est utilisé pour traiter les infections cérébrales associées aux soins causées par les *Staphylococcus* spp. chez les patients de réanimation. Cependant, son index PK/PD n'est pas clairement défini pour ce type d'infection. Cette étude avait donc pour objectif de définir l'index PK/PD du linézolide dans les infections cérébrales, en utilisant la modélisation PK/PD basée sur des courbes de bactéricidie *in vitro* (Time Kill Curves, TKC).

Des modèles PK/PD ont été développés en associant un modèle PK décrivant les concentrations de linézolide observées dans le plasma et le liquide cérébrospinal (LCS) de patients de réanimation porteurs de dérivation ventriculaire externe, à des modèles PD développés à partir de TKC réalisées sur neuf souches de *Staphylococcus* spp. L'effet du linézolide sur *Staphylococcus* spp. a été évalué en utilisant les concentrations observées dans le LCS. Ce modèle PK/PD a permis de simuler une étude de fractionnement des doses, en utilisant les mêmes paramètres PK pour toutes les souches, tandis que les paramètres PD étaient spécifiques à chaque souche. Les index PK/PD (fC$_{max}$/CMI, fAUC/CMI et fT$_{>CMI}$) ont ensuite été calculés en utilisant les concentrations prédites dans le plasma ou le LCS, en fonction de la CMI des différentes souches. La corrélation entre l'efficacité et chaque index a été évaluée par régression non linéaire. Enfin, les valeurs cibles des index PK/PD dérivés des concentrations plasmatiques et dans le LCS ont été déterminées pour atteindre un effet bactériostatique ainsi qu'un effet bactéricide, défini comme une réduction de 99 % de l'inoculum initial (soit une diminution de 2 log$_{10}$).

L'efficacité du linézolide était le mieux corrélée aux index fAUC/CMI et fT>CMI, avec toutefois une légère supériorité de fAUC/CMI lorsque les index étaient calculés à partir des concentrations

plasmatiques. En se basant sur les concentrations dans le LCS, les valeurs de *f*AUC/CMI requises pour atteindre un effet bactériostatique et bactéricide (-2 $\log_{10}$ UFC/mL), ont été estimées respectivement à 30 et 73. En se basant sur les concentrations plasmatiques, ces valeurs ont été estimées à 38 et 91, respectivement. Avec le schéma posologique recommandé du linézolide de 600 mg toutes les 12 h, la proportion de patients atteignant les cibles associées à un effet bactériostatique correspondait à celle des patients simulés ne montrant aucune variation du comptage bactérien à 24 h, ce qui n'a pas été le cas pour l'effet bactéricide.

L'index *f*AUC/CMI dérivé du plasma était aussi bien corrélé à l'efficacité du linézolide contre *Staphylococcus* spp. que celui dérivé du LCS, facilitant ainsi le suivi thérapeutique pharmacologique des infections cérébrales. Une cible de *f*AUC/CMI plasmatique comprise entre 80 et 120 est généralement associée à une guérison clinique chez les patients de réanimation présentant des infections extra-cérébrales, et serait également associée à un effet bactéricide dans le contexte des infections cérébrales.

Simulation-based prediction of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) index for linezolid to treat cerebral infections in critically ill patients

N. Prébonnaud[1,2,#], M. Burtin[1,#], S. Marchand[1,2], N. Grégoire[1,2], C. Dahyot-Fizelier[1,3], V. Aranzana-Climent[1], A. Chauzy[1,*]

[1] Université de Poitiers, Inserm U1070, Poitiers, France

[2] CHU de Poitiers, Laboratoire de Toxicologie-Pharmacocinétique, Poitiers, France

[3] CHU de Poitiers, Service d'Anesthésie Réanimation Médecine Péri-opératoire, Poitiers, France

# These authors contributed equally.

*** Corresponding author**:

Alexia CHAUZY

alexia.chauzy@univ-poitiers.fr

INSERM U1070 - Université de Poitiers

Pôle Biologie Santé - Bâtiment B36

1 rue Georges Bonnet

86022 POITIERS Cedex, France

Article en écriture.

Abstract

Linezolid is used to treat device-associated cerebral infections caused by *Staphylococcus* spp. in intensive care unit (ICU) patients. However, its PK/PD index is not clearly established for cerebral infections. Thus, this study aims to define the PK/PD index of linezolid for cerebral infections using PK/PD models based on *in vitro* time-kill curves (TKC).

PD models developed from TKC with nine strains of *Staphylococcus* spp. were linked to a PK model previously developed from linezolid plasma and CSF concentrations observed in ICU patients with external ventricular drain. The concentration-time profiles in the CSF compartment were used to drive the bacterial killing in the PK/PD models. Dose fractionation studies were simulated for each strain using final PK/PD models. The same PK parameters were used for all strains, while PD parameters were strain-specific. PK/PD indices (fC_{max}/MIC, *f*AUC/MIC and $fT_{>MIC}$) were determined by combining the predicted unbound plasma or CSF concentrations with the MIC of the different strains. The correlation between efficacy and each index was assessed using nonlinear least-squares regression. The magnitude of the selected PK/PD index, derived from plasma and CSF concentrations, required for bacteriostatic and bactericidal effects (chosen as 99% killing from the initial inoculum, *i.e*. 2 $\log_{10}$ kill) were determined from the fitted parameter values.

The effect of linezolid concentrations in CSF and plasma was best predicted by *f*AUC/MIC and $fT_{>MIC}$ with a slight superiority of *f*AUC/MIC for plasma concentrations. Based on CSF concentrations, the *f*AUC/MIC required for bacteriostatic and bactericidal effects (-2 $\log_{10}$ CFU/mL) was estimated to be 30 and 73, respectively, while when based on plasma concentrations, it was estimated to be 38 and 91, respectively. However, for the recommended linezolid dosing regimen (600 mg q12 h), the proportion of patients achieving the required targets associated with a bacteriostatic effect was consistent with the proportion of simulated patients showing no change in bacterial counts at 24 h, which was not the case when targeting a bactericidal effect.

Plasma-derived *f*AUC/MIC was as good a predictor as CSF-derived *f*AUC/MIC of linezolid efficacy in the treatment of cerebral infections caused by *Staphylococcus* spp. facilitating its therapeutic monitoring in practice. Achieving a plasma *f*AUC/MIC of 80-120, commonly associated with high clinical success rates in ICU patients for extra-cerebral infections, would result in a bactericidal effect in the context of cerebral infection.

Keywords

Linezolid**,** CSF, PK/PD Index, PK/PD simulations

Introduction

The optimization of antibiotic dosing regimens is essentially based on empirical pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) indices related to the minimum inhibitory concentration (MIC), such as fC_{max}/MIC (the ratio of the maximum unbound drug concentration to the MIC), *f*AUC/MIC (the ratio of the area under the unbound concentration time curve to the MIC), and $fT_{>MIC}$ (the fraction of the dosing interval during which the unbound drug concentration exceeds the MIC) (1–3). These PK/PD indices are required by the European Medicines Agency and the US Food and Drug Administration to evaluate the efficacy of new antibacterial in drug development programs and to establish the optimal dosing regimen (4–6).

It is commonly assumed that the PK/PD index and its magnitude, which relate to antibiotic efficacy, remain consistent within a drug class across pathogens, patient subpopulations, and infection sites (7). However, previous studies have demonstrated that the selection and magnitude of the PK/PD index depend on factors such as study design, drug half-life (8,9), and tissue distribution (10). Thus, establishing a PK/PD index through dose fractionation studies in mouse thigh and lung infection models, as is typically done, may be difficult to extrapolate to humans, given that a faster elimination half-life is observed in animal models (11). Moreover, in the case of cerebral infections, antibiotic distribution in the lung or thigh is unlikely to reflect distribution in cerebrospinal fluid (CSF) due to the presence of the blood-brain barrier (BBB) and the blood-CSF barrier (BCSFB) (12). Therefore, using the same PK/PD index for all infections could lead to ineffective antibiotic treatment.

Linezolid is used to treat device-associated cerebral infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* or coagulase-negative staphylococci in intensive care unit (ICU) patients (13). However, its PK/PD index is not clearly established in preclinical models, as both *f*AUC/MIC and $fT_{>MIC}$ were reported to be predictive of its efficacy against *Staphylococcus aureus* (14,15). The limitations of mice infection models were avoided in the study by Rayner *et al.*, where PK/PD indices of linezolid were determined in humans. Indeed, linezolid effect, characterized by clinical cure and bacterial eradication, was correlated to both *f*AUC/MIC and $fT_{>CMI}$ to treat bacteriaemia, lower respiratory tract and skin infections (16). However, among the 288 patients in this study, only two had a cerebral infection (16), which is insufficient to establish a specific PK/PD index for this type of infection.

One approach defining a specific PK/PD index for the linezolid in cerebral infections is to use simulations based on PK/PD models derived from human PK and *in vitro* Time-Kill Curves (TKC), which provide a more cost-effective and flexible alternative to animal models. Compared to *in vivo* experiments, these simulations allow to explore a wider range of dosing regimens, to assess effects on a wider variety of strains with different susceptibilities, and to take into account PK variability in order

to more accurately identify the most predictive PK/PD index. Furthermore, this approach is also in line with regulatory requirements for a reduction in the use of animals in research. This *in silico* approach has successfully demonstrated its ability to reproduce *in vivo* outcomes of dose fractionation studies conducted in mice for several antibiotics and pathogens (8,17). Therefore, this study aims to define specific PK/PD targets for linezolid in the treatment of cerebral infections using PK/PD simulations based on CSF concentrations observed in ICU patients and *in vitro* TKC.

Materials and methods

1. Antimicrobial agents and chemicals

Linezolid (purity > 99% in powder form) was purchased from Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Saint-Quentin-Fallavier, France). Stock solutions at a concentration of 10 240 mg/L were prepared by dissolving linezolid in dimethylsulfoxide (DMSO, Merck KGaA, Saint-Quentin-Fallavier, France) and stored at -80°C for up to one month.

2. Bacterial strains

Nine strains of *Staphylococcus* spp. were used, including three reference strains from ATCC (*American Type Culture Collection)* and seven clinical strains isolated from CSF of infected patients. Linezolid MIC was determined for all strains in duplicate using the microdilution method in accordance with EUCAST recommendations (18,19) and are provided in **Table 1**.

Table 1. Linezolid MIC of the nine strains of *Staphylococcus* spp. Including *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus capitis* strains.

Species	Strain	Type	Linezolid MIC (mg/L)
S.aureus	SA079-82	Clinical	1
S.aureus	SA29213	Reference	4
S.aureus	SA019-43	Clinical	2
S.aureus	SA33591	Reference	1
S.epidermidis	SE170-36	Clinical	2
S.epidermidis	SE184-36	Clinical	2
S.epidermidis	SE14990	Reference	2
S.capitis	SC149-82	Clinical	2
S.capitis	SC196-68	Clinical	2

All the strains tested were susceptible to linezolid as the MIC was lower than the breakpoint defined at 8 mg/L (20).

3. Time-Kill curves (TKC)

TKC were performed on the nine strains of *Staphylococcus* spp. at least in triplicate in a final volume of 2 mL of cation-adjusted Mueller-Hinton broth II (MHB) (Merck KGaA, Saint-Quentin-Fallavier, France) in a 24-well plate (Cellstar®, Greiner, Dutscher, Bernolsheim, France).

Bacterial strains were cultured overnight at 35 ± 2 °C in 10 mL of MHB under shaking at 130 rpm. The next day, the overnight culture was diluted to 1:50 in 10 mL of fresh MHB and incubated at 35 ± 2 °C under shaking at 130 rpm for 1.5 h to 2 h to obtain bacteria in the exponential growth phase. A bacterial suspension of 2 x 10^6 CFU/mL was then prepared by diluting bacteria in the exponential growth phase in fresh MHB according to the optical density measured at 600 nm, using an UltrospecTM 10 Cell Density Meter (Biochrom, USA). A volume of 1 mL of this suspension was added to wells previously filled by 1 mL of linezolid at concentrations of 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 or 16 x MIC. The final percentage of DMSO in the wells was less than 2% to avoid any antimicrobial effect related to DMSO (21), and the final inoculum was 1 x 10^6 CFU/mL. The plate was then incubated for 30 h at 35 ± 2 °C under shaking at 130 rpm.

Bacterial counts over time were obtained by sampling a volume of 20 µL from each well at 0, 3, 6, 24 and 30 h, which was then serially diluted in 0.9% sodium chloride (Merck KGaA, Saint-Quentin-Fallavier, France) and plated onto Mueller-Hinton agar (MHA) (Oxoid, ThermoFisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France) plate. Undiluted samples were plated onto MHA plate supplemented with 1% activated charcoal (Merck KGaA, Saint-Quentin-Fallavier, France) to avoid linezolid carry-over effect (22). The MHA plates were incubated at 35 ± 2 °C for 18 to 24 h, then CFU were counted with a Scan 300 (Interscience, Saint-Nom-la-Bretèche, France). Based on the CLSI recommendations (23), the limit of quantification (LOQ) was fixed to 2.3 $\log_{10}$ CFU/mL.

4. PD model

For each strain, bacterial counts ($\log_{10}$CFU/mL) observed during TKC were analyzed using a semi-mechanistic PK/PD model previously developed by Nielsen *et al*. (24) with slight adjustments. Briefly, the PD model consisted of two bacterial subpopulations: one proliferating and susceptible to the antibiotic (S in CFU/mL), and the other resting and non-susceptible (R in CFU/mL) (**Figure 1**). In the starting inoculum, all the bacteria were assumed to be in the growing stage (S), with a first-order rate constant for bacterial growth (k_{growth} in h^{-1}). A first-order rate constant for bacterial death (k_{death} in h^{-1}) was found to be negligible and was therefore fixed to zero. The transformation of the S subpopulation into the R subpopulation, induced by a high total bacterial level in the system (S + R), was described by a transfer rate constant (k_{SR} in h^{-1}) using a linear function (**Eq. 1**), where B_{max} corresponds to bacterial counts at stationary phase in CFU/mL. However, a reverse transfer from the R subpopulation to the S subpopulation was not considered in the model.

$$k_{SR} = \frac{(k_{growth} - k_{death}) \times (S+R)}{B_{max}} \quad \textbf{(Eq. 1)}$$

Linezolid was assumed to have an effect (E_{LNZ}) only on susceptible bacteria and was characterized using an E_{max} function, with ($\gamma \neq 1$) or without a sigmoidicity factor ($\gamma = 1$) (**Eq. 2**).

$$E_{LNZ} = \frac{E_{max} \times C^{\gamma}}{C^{\gamma} + EC_{50}^{\gamma}} \quad \textbf{(Eq. 2)}$$

Where E_{max} corresponds to the maximal killing rate due to linezolid in h^{-1}, C corresponds to the linezolid concentration in mg/L and EC_{50} corresponds to the linezolid concentration needed to reach 50% of E_{max} in mg/L.

In accordance with preliminary experiments assessing the stability of linezolid at 37°C in MHB (not shown), drug concentrations were assumed to remain constant during TKC experiments.

A function representing adaptation of the bacteria to linezolid was tested, as previously described (25), using two states between which bacteria oscillate depending on whether they are adapted (AR_{on}) or not (AR_{off}). At the beginning of the experiment, all bacteria were assumed to be non-adapted (AR_{on} = 0 and AR_{off} = 1). However, in the presence of linezolid, adaptation developed over time, according to the rate constant k_{on} in h^{-1}, leading to a reduction in E_{max} function (**Eq. 3**). As linezolid concentrations were constant over time, the reverse transfer from the adapted to the non-adapted bacteria was not considered in the model.

$$E_{LNZ} = \frac{E_{max} \times (1 - AR_{on}) \times C^{\gamma}}{C^{\gamma} + EC_{50}^{\gamma}} \quad \textbf{(Eq. 3)}$$

Thus, the development of adaptive and non-adaptive resistance as well as susceptible and non-susceptible bacteria over time were described respectively by **Eq. 4** to **Eq. 7**.

$$\frac{dAR_{on}}{dt} = k_{on} \times AR_{off} \quad \textbf{(Eq. 4)}$$

$$\frac{dAR_{off}}{dt} = -k_{on} \times AR_{off} \quad \textbf{(Eq. 5)}$$

$$\frac{dS}{dt} = k_{growth} \times S - E_{LNZ} \times S - k_{SR} \times S \quad \textbf{(Eq. 6)}$$

$$\frac{dR}{dt} = k_{SR} \times S \quad \textbf{(Eq. 7)}$$

The model was developed using Monolix (Monolix 2023R1, Lixoft SAS, a Simulations Plus company). Bacterial counts data were transformed into natural logarithms before parameter estimation, and an additive residual error on the logarithmic scale was used. Bacterial counts below the LOQ were handled in Monolix based on the M3 method (26).

Model selection was based on goodness of fit plots, objective function value, and relative standard errors of the parameter estimates. Model fit to data was evaluated by performing visual predictive checks (VPCs) based on 1000 simulations from the final model.

5. PK/PD indices simulations

PK/PD model

For each strain, the corresponding PD model was linked to a PK model previously developed from linezolid plasma and CSF concentrations observed in ICU patients with external ventricular drain (EVD) (27). The linezolid PK was described by one compartment with linear elimination for plasma and one compartment for ventricular CSF with distribution between these two compartments, characterized by similar CSF input and output clearances. The concentration-time profiles in the CSF compartment were used to drive the bacterial killing in the PK/PD model. The structure of the PK/PD model is presented in **Figure 1** and the parameter values used to simulate plasma and CSF PK profiles in ICU patients are reported in **Table 2**.

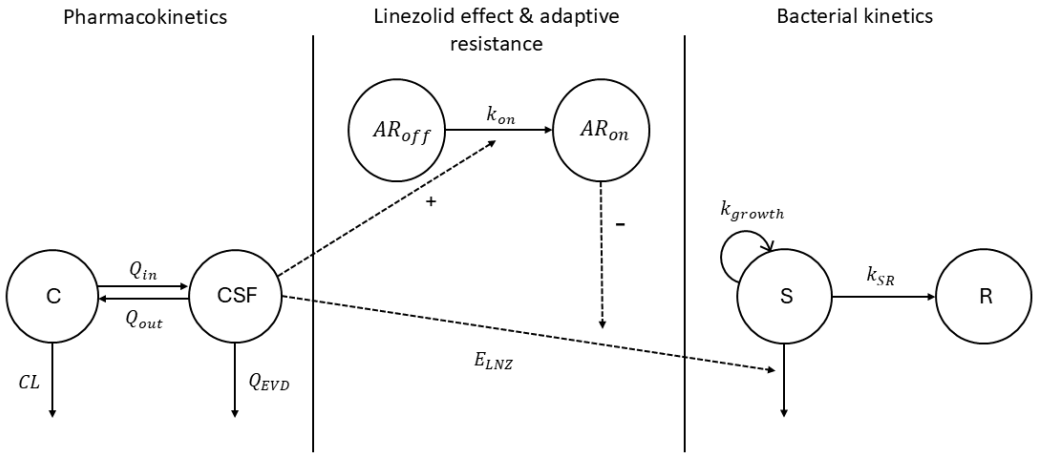


Figure 1. Structure of the PK/PD model. C, central compartment corresponding to linezolid plasma concentrations; CSF, cerebrospinal fluid compartment corresponding to linezolid CSF concentrations; CL, elimination clearance; Q_{EVD}, linezolid elimination flow rate from CSF through the external ventricular drain (EVD); Q_{in}, clearance into the CSF; Q_{out}, clearance out of the CSF; AR_{off} and AR_{on}, adaptive resistance compartments; k_{on}, rate constant for development of adaptive resistance; S, proliferating and susceptible bacterial population; R, resting and non-susceptible bacterial population; k_{growth}, rate constant for bacterial growth; k_{SR}, transfer rate from the proliferating and susceptible bacterial population to the resting and non-susceptible one; E_{LNZ}, linezolid effect described by an E_{max} function.

Table 2. Parameters of the linezolid PK model used to simulate concentration-time profiles in intensive care unit patients with an external ventricular drain (EVD). From Dahyot-Fizelier *et al.* (27).

Parameters	Definition	Estimate value	Inter-individual variability
V_1 (L)	Volume of central compartment	36.4	0.0534
V_2 (L)	Volume of CSF compartment	0.15	
CL (L/h)	Clearance	8.38	0.206
Q_{in} (L/h)	CSF input clearance	0.04	0.0225
Q_{out} (L/h)	CSF output clearance	0.0369	
Q_{EVD} (L/h)	EVD flow rate	0.00764	
Fu	Unbound fraction in plasma	0.69	

Simulated dosing regimens

To establish the PK/PD index-effect relationship of linezolid, dose fractionation studies were simulated for each strain using the final PK/PD models. PK parameters were the same for all strains including inter-individual variability (on V_1, CL, and Q_{in}) whereas PD parameters were specific to each strain. A total of 20 daily doses, ranging from 10 to 10 000 mg, each administered as a 30-minute infusion, with dosing intervals of 4, 8, 12, and 24 h, was simulated. Additionally, continuous infusions over 24 h, following a loading dose yielding concentrations equal to the average concentration obtained from previous intermittent dosing regimens, were included in the simulation settings. A control condition, without linezolid, was also included, bringing the number of simulated dosing regimen for each strain to 101. For each dosing regimen, 500 simulations were performed using MrgSolve package, version 1.5.2 (28) with R software, version 4.4.1 (29).

Determination of PK/PD indices

For each dosing regimen and each simulated patient, the three common PK/PD indices (fC_{max}/MIC, fAUC/MIC and $fT_{>MIC}$) were determined by combining the predicted unbound plasma or CSF concentrations with the MIC of the different strains (**Table 1**). The bacterial count after 24 h of linezolid exposure was also predicted, and the difference between the bacterial density at 24 h and the initial inoculum ($\Delta\log_{10}$ CFU/mL) was used as final PD endpoint for each strain.

The relationship between the PD endpoint and each PK/PD index derived from plasma or CSF concentrations was modelled with an E_{max} function (**Eq. 8**) using the minpack.lm package, version 1.2-4 (30).

$$E = E_0 - \frac{\mathrm{PD}_{max} \times X^{Hill}}{X^{Hill} + EX_{50}^{Hill}} \qquad \textbf{(Eq. 8)}$$

Where E is the PD endpoint (variation in the bacterial count after 24 h of treatment compared with the initial inoculum, as $\Delta\log_{10}$ CFU/mL), E_0 corresponds to the variation in the bacterial count after 24 h without treatment, PD_{max} the maximum effect (*i.e*. maximum drop in $\Delta\log_{10}$ CFU/mL from E_0 at 24 h), X is the value of the PK/PD index, EX_{50} is the value of X required to reach 50% of PD_{max} and $Hill$ is the sigmoidicity factor. For each PK/PD index, all data from the different dosing regimens and the different bacterial strains were fitted simultaneously. The PK/PD index that best predicted the antibacterial effect of linezolid in CSF was selected based on the coefficients of determination (R^2) and VPCs.

To perform VPCs, 500 predictions of $\Delta\log_{10}$ CFU/mL were computed for each PK/PD index value by using the appropriate E_{max} function. For fC_{max}/MIC and fAUC/MIC, data were grouped into 20 bins containing an equal number of predictions from the TKC-based PK/PD models, while for $fT_{>MIC}$ data were grouped into 20 bins of equal width (*i.e*. every 5% $fT_{>MIC}$), due to non-homogeneous distribution of the values of this index. The 5th, 50th and 95th empirical (simulated from the PK/PD model based on TKC data) and predicted (simulated from the E_{max} function) percentiles were performed based on $\Delta\log_{10}$ CFU/mL. The non-linear extrapolation between the bins was done with the loess smoothing method available in geom_smooth of ggplot2 package on R.

The magnitude of the selected PK/PD index, derived from plasma and CSF concentrations, required for bacteriostatic and bactericidal effects (chosen as 99% killing from the initial inoculum, *i.e*. 2 $\log_{10}$ kill) were determined from the fitted parameter values. Finally, we evaluated the percentage of patients achieving the PK/PD targets previously established for the standard dosing regimen of 600 mg q12 h.

Results

1. Time-Kill curves

TKC for the nine *Staphylococcus* spp. strains are presented in **Figure 2**. Overall, similar profiles were observed regardless of the strain. For the control (0 x MIC), an initial exponential growth was observed until 6 h, followed by a plateau reaching around 10^9–10^{10} CFU/mL. Linezolid concentrations below the MIC (0.25 and 0.5 x MIC) resulted in slower bacterial growth compared to the control, while those above the MIC (2, 4, 8, 16 x MIC) led to a decrease in bacterial counts without regrowth, but with saturation of the effect when the concentration was increased. For the MIC, bacterial counts remained globally stable at the inoculum value throughout the experiment although a slight increase (SA019-43, SA079-82, SA33591, SE14990) or decrease (SC149-82, SC196-68) was observed depending on the strain. Globally, no regrowth was observed whatever the linezolid concentration.

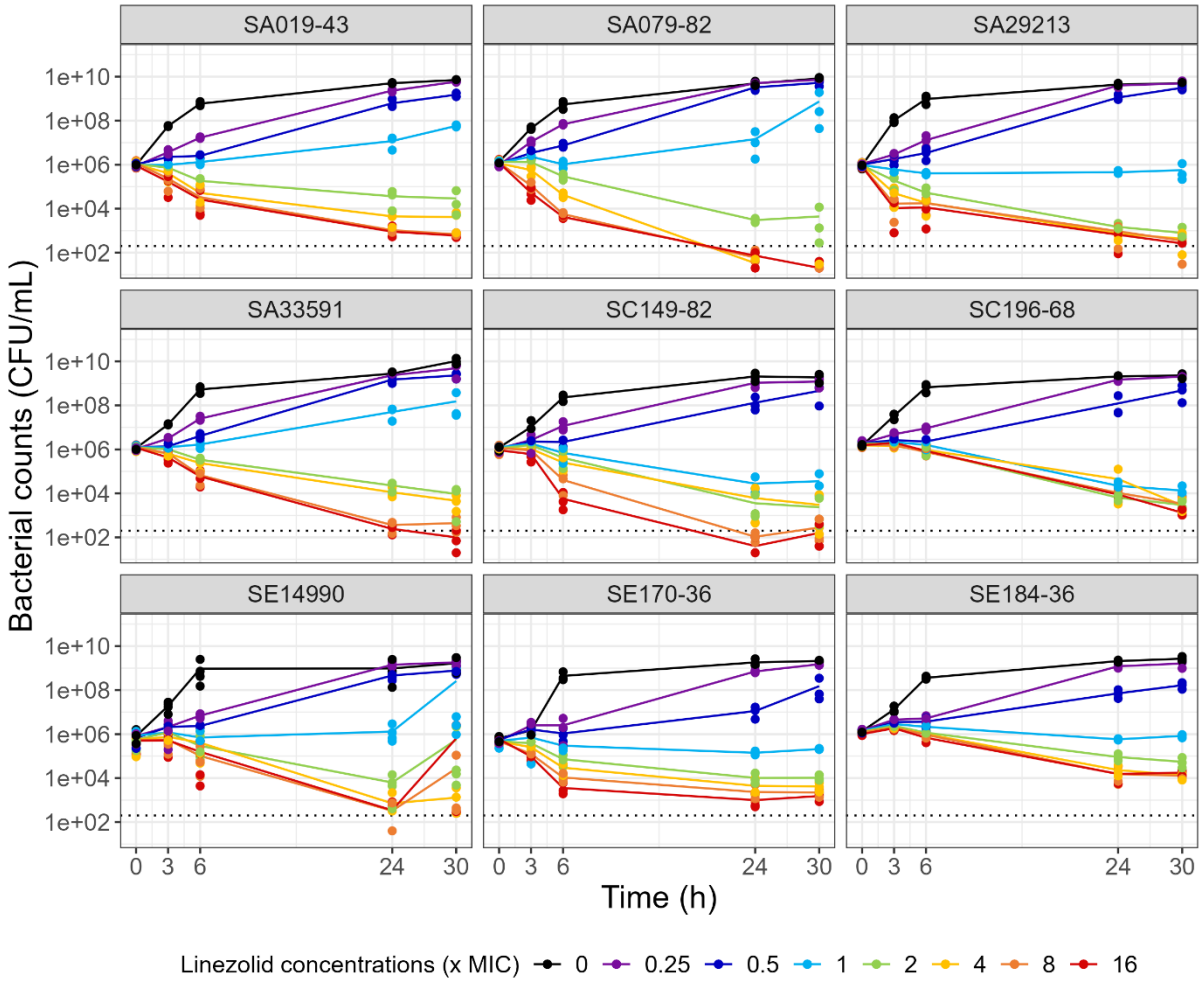


Figure 2. Time-kill curves for the nine *Staphylococcus* spp. strains exposed to linezolid concentrations ranging from 0 to 16 x MIC (n = 3 - 4). Points correspond to the bacterial count observed for each replicate. Lines correspond to the mean bacterial counts of all replicates. Dashed line corresponds to the limit of quantification.

2. PD model

The final PD model well described the TKC data as indicated by the VPCs in **Figure 3**. Adaptive resistance was included only for SA29213, SA019-43 and SE170-36 strains. The linezolid effect was best described by an E_{max} model without a sigmoidicity factor ($\gamma = 1$) regardless of the strain. Estimates and relative standard errors are presented in **Table 3**.

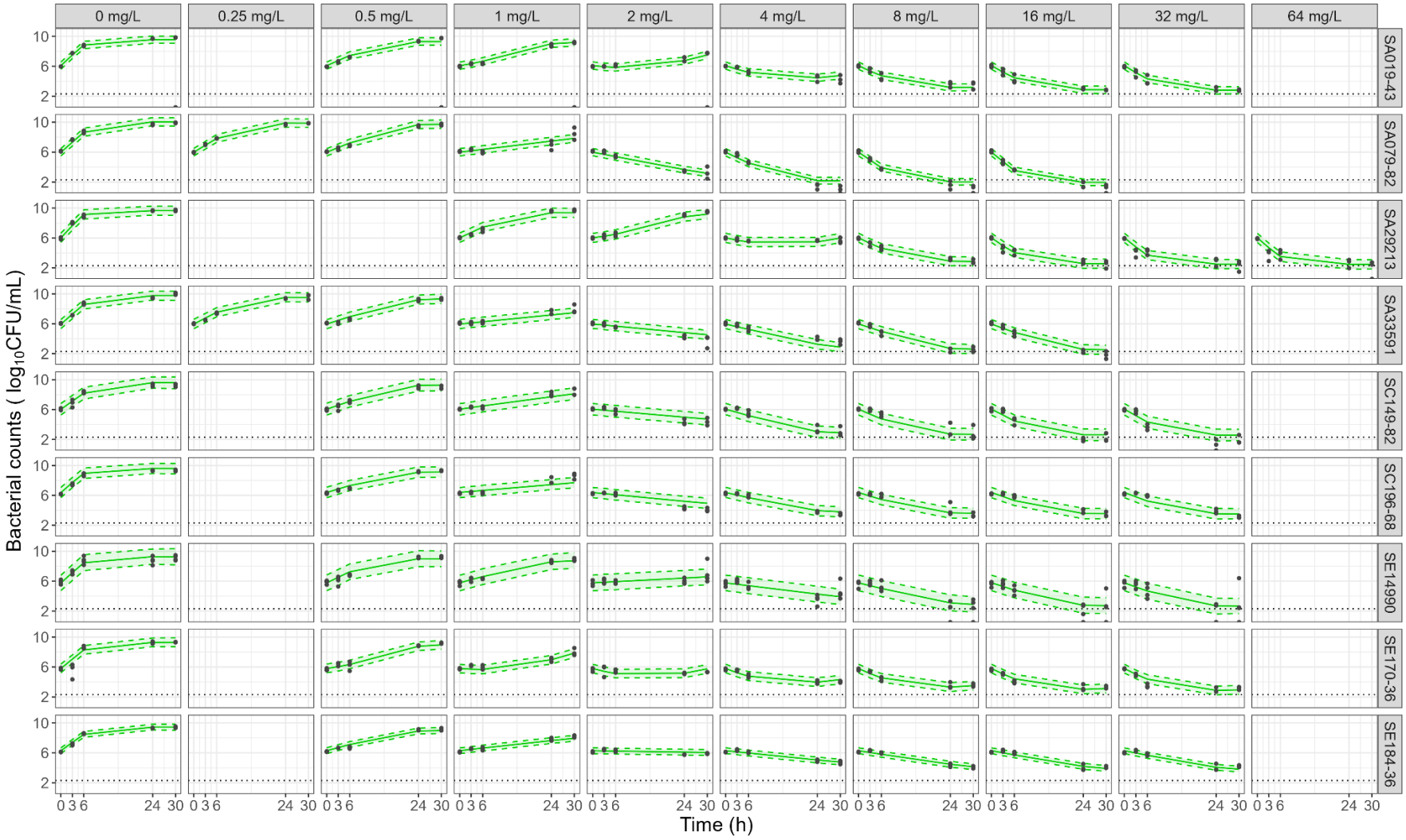


Figure 3. Visual predictive checks for the final model with observed bacterial counts from TKC. The grey points represent observed bacterial counts (log_{10}CFU/mL). The straight green line corresponds to the median of simulations (50th percentile). The dashed green lines correspond to 5th and 95th percentiles. The green shaded area corresponds to the 90% prediction interval. Dotted black line corresponds to the limit of quantification.

Table 3. **Estimated parameters and relative standard error.** B_0: Bacterial counts in the starting inoculum; B_{max}: Bacterial counts at stationary phase, k_{growth}: First-order rate constant for bacterial growth; E_{max}: Maximal kill rate constant by linezolid; EC_{50}: Linezolid concentration needed to reach 50% of E_{max}, k_{on}: Rate constant for the development of adaptive resistance; a: Additive residual error on log_{10} scale for total bacteria count. Values in parentheses correspond to the relative standard error.

Parameter	SA29213	SA019-43	SE170-36	SA079-82	SA33591	SE184-36	SE14990	SC149-82	SC196-68
B_0 (log_{10} CFU/mL)	6.02 (0.856)	6.09 (0.764)	5.81 (1.01)	5.98 (0.674)	5.96 (0.86)	6.28 (0.531)	5.77 (1.3)	6.05 (0.955)	6.38 (0.898)
B_{max} (log_{10} CFU/mL)	9.35 (0.982)	9.26 (0.749)	9 (1.21)	9.76 (0.836)	9.46 (0.846)	9.13 (0.815)	8.98 (1.48)	9.3 (1.28)	9.3 (1.01)
k_{growth} (h^{-1})	1.26 (2.94)	1.09 (6.5)	0.97 (0.555)	1.04 (1.94)	1.02 (7.79)	0.86 (3.53)	1.07 (12)	0.83 (2.22)	1.03 (10.2)
E_{max} (h^{-1})	2.41 (2.57)	1.93 (3.71)	1.65 (3.37)	2.16 (1.83)	1.52 (4.69)	1.11 (2.56)	1.54 (7.7)	1.56 (4.79)	1.5 (6.54)
EC_{50} (mg/L)	2.28 (11.7)	1.1 (10.3)	0.51 (5.95)	1.42 (6.04)	0.68 (13.2)	0.54 (5.91)	1.06 (20.5)	1.34 (6.84)	0.62 (16.5)
k_{on} (h^{-1})	0.014 (18.3)	0.016 (14.3)	0.021 (11.3)						
a (log_{10} CFU/mL)	0.38 (6.46)	0.3 (21.5)	0.35 (22.4)	0.25 (36.4)	0.37 (16.4)	0.24 (29.5)	0.64 (13.6)	0.47 (14.2)	0.42 (24.3)

3. PK/PD indices determination

For CSF-derived PK/PD indices, identifying the best predictor of linezolid efficacy based solely on R^2 values was difficult, as all three indices showed similar correlation with antibacterial effect (R^2= 0.85 with fC_{max}/MIC, 0.89 with fAUC/MIC, 0.88 with $fT_{>MIC}$). VPCs results, presented in **Figure 4**, showed that models with fAUC/MIC and $fT_{>MIC}$ as predictors best captured both the central trend and variability of the antibacterial effect.

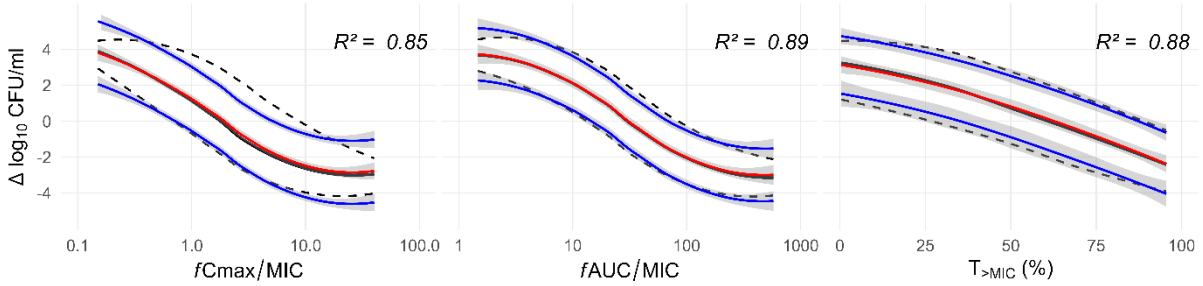


Figure 4. VPCs of E_{max} function characterizing the relationship between CSF PK/PD indices and linezolid efficacy against *Staphylococcus* spp. in CSF. The straight black line corresponds to the median of the empirical percentiles (50th, simulated from the PK/PD model based on TKC data). The dashed black lines correspond to 5th and 95th of the empirical percentiles (simulated from the PK/PD model based on TKC data). The straight red line corresponds to the median of the predicted percentiles (50th, simulated from the E_{max} function). The straight blue lines correspond to 5th and 95th of the predicted percentiles (simulated from the E_{max} function). Grey areas correspond to the 95% confidence intervals around the predicted percentiles.

For plasma-derived PK/PD indices, the fAUC/MIC was selected as the best predictor of linezolid efficacy in CSF infection, based on both R^2 values and VPCs in **Figure 5**.

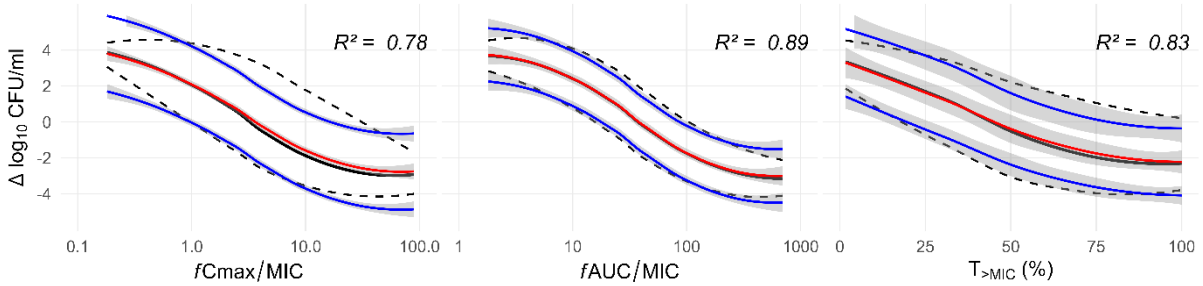


Figure 5. VPCs of E_{max} function characterizing the relationship between plasma PK/PD indices and linezolid efficacy against *Staphylococcus* spp. in CSF. The straight black line corresponds to the median of the empirical percentiles (50th, simulated from the PK/PD model based on TKC data). The dashed black lines correspond to 5th and 95th of the empirical percentiles (simulated from the PK/PD model based on TKC data). The straight red line corresponds to the median of the predicted percentiles (50th, simulated from the E_{max} function). The straight blue lines correspond to 5th and 95th of the predicted percentiles (simulated from the E_{max} function). Grey areas correspond to the 95% confidence intervals around the predicted percentiles.

4. PK/PD targets estimation

Based on CSF concentrations, the *f*AUC/MIC required for bacteriostatic and bactericidal effects (-2 $\log_{10}$ CFU/mL) was estimated to be 30 and 73, respectively, while when based on plasma concentrations, it was estimated to be 38 and 91, respectively. For CSF $fT_{>MIC}$, the targets for bacteriostatic and bactericidal effects were 63% and 91%, respectively.

After administration of the standard dosing regimen of 600 mg q12 h, 72% of simulated patients would achieve a *f*AUC/MIC ≥ 30 and 76% a *f*T>MIC ≥ 63%, associated with a bacteriostatic effect (**Figure 6**, blue dots), which is consistent with the proportion of simulated patients showing no change in bacterial counts at 24 h compared with the initial inoculum (77%) (**Figure 6**, orange dots).

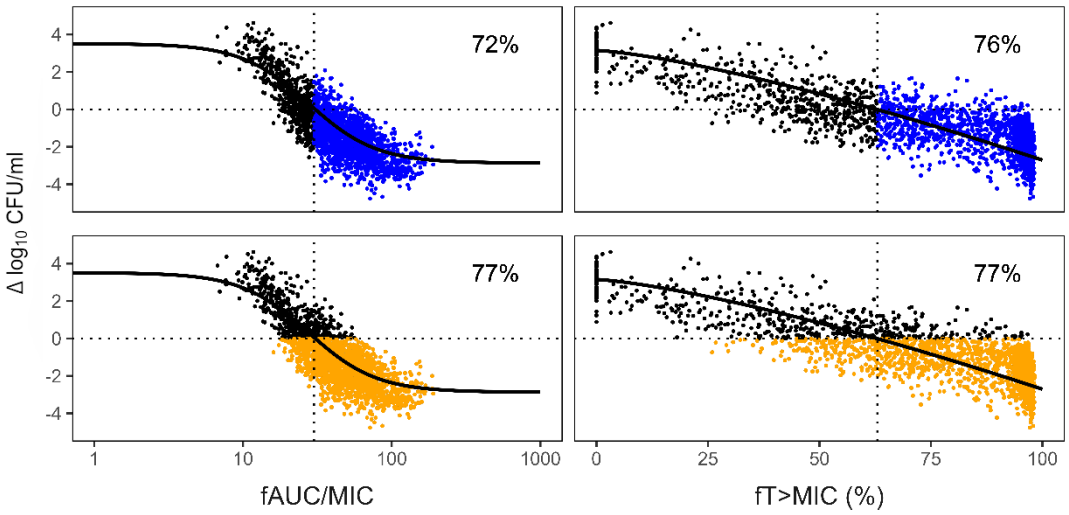


Figure 6. Comparison between the proportion of simulated patients reaching CSF PK/PD targets associated with a bacteriostatic effect (blue dots) and that showing stable or reduced bacterial counts at 24 h from the PK/PD model based on TKC data (orange dots) after administration of 600 mg q12 h. Dashed vertical line corresponds to the PK/PD target required for a bacteriostatic effect, *i.e.* either *f*AUC/CMI ≥ 30 (left) or $fT_{>MIC}$ ≥ 63% (right). Dashed horizontal line represents no change in bacterial density between 24 h and the initial inoculum ($\Delta\log_{10}$ CFU/mL = 0). Black dots correspond to simulated patients who did not reach the CSF PK/PD targets (upper panels) or for whom an increase in bacterial count was predicted at 24 h compared with the initial inoculum (lower panels). Percentages correspond to the proportion of colored dots.

However, when targeting a bactericidal effect, the proportion of patients reaching the required thresholds varies significantly depending on the selected index. Specifically, it would be predicted that three times fewer patients would achieve a bactericidal effect if the *f*AUC/MIC target of ≥ 73 was considered (16%) rather than the $fT_{>MIC}$ target of ≥ 91% (47%) (**Figure 7**, blue dots), whereas a 2 $\log_{10}$ decrease in bacterial counts at 24 h was predicted in 26% of simulated patients (**Figure 7**, orange dots).

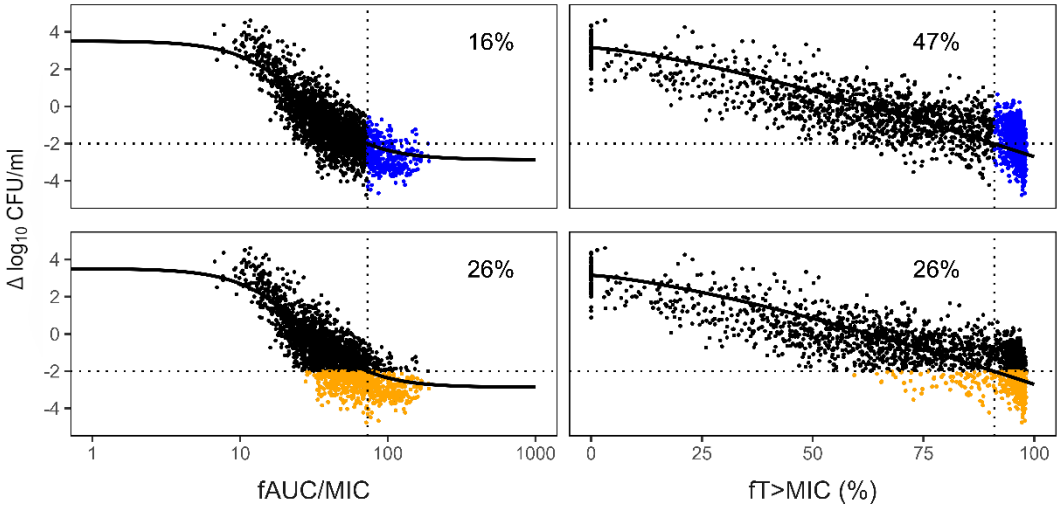


Figure 7. Comparison between the proportion of simulated patients reaching CSF PK/PD targets associated with a bactericidal effect (blue dots) and that showing a 2 log_{10} reduction in bacterial counts at 24 h from the PK/PD model based on TKC data (orange dots) after administration of 600 mg q12 h. Dashed vertical line corresponds to the PK/PD target required for a bactericidal effect, *i.e.* either *f*AUC/CMI ≥ 73 (left) or *f*T>MIC ≥ 91% (right). Dashed horizontal line represents 2 log_{10} decrease from the initial bacterial density at 24 h (Δlog_{10} CFU/mL = -2). Black dots correspond to simulated patients who did not reach the plasma PK/PD targets (upper panels) or for whom a reduction of less than 2 log_{10} in bacterial count was predicted at 24 h compared with the initial inoculum (lower panels). Percentages correspond to the proportion of colored dots.

Discussion

In this work, the combination of a population PK model describing the linezolid distribution in the CSF of ICU patients with a PK/PD model developed from TKC conducted on nine strains of *Staphylococcus* spp. enabled the identification of the PK/PD index and the targets required for the effective treatment of cerebro-meningeal infections caused by these strains. Given that previous studies have demonstrated that PK differences between subpopulations can impact the selection of the best PK/PD index (8,9), we carefully selected a PK model from the literature that was based on data from the population of interest. Additionally, PK variability was included in the simulations to capture the expected response variations within this population, which could also affect both the type and magnitude of the PK/PD index. Finally, linezolid efficacy was directly related to concentrations in the CSF, *i.e*. at the site of infection, rather than to plasma concentrations as in previous *in silico* studies with antibiotics from different classes (8,17). This approach allows for a more accurate prediction of the antimicrobial effect and thus the correlation with the PK/PD indices. This is particularly crucial in the case of cerebral infections, where the presence of the BBB and BCSFB can restrict antibiotic diffusion. As a result, plasma concentrations do not necessarily provide an accurate representation of drug levels in the CSF.

According to the simulations, *f*AUC/MIC and $fT_{>MIC}$ in the CSF were the indices that best correlated with the efficacy of linezolid in the treatment of cerebro-meningeal infections caused by *Staphylococcus* spp. Moreover, this study demonstrated that plasma-derived *f*AUC/MIC was as good a predictor of linezolid efficacy as CSF-derived *f*AUC/MIC (**Figure 4 et 5**), indicating that there was a strong correlation between plasma-derived *f*AUC/MIC and the antimicrobial effect at the infection site. This observation is in accordance with previous studies showing a correlation between plasma-derived *f*AUC/MIC and antimicrobial effect for other type of infection both in mice for thigh infection (14), and in humans for bacteremia, lower respiratory tract infections, skin and skin structure infections (16). This finding could be attributed to the good diffusion of linezolid into the CSF, with a CSF-to-unbound plasma AUC ratio of approximately 80% (27). However, this result cannot be generalized to other antibiotics with more limited cerebral diffusion such as meropenem (31,32) or vancomycin (33–35). In contrast, the correlation between $fT_{>MIC}$ and antibacterial effect was slightly weaker when this index was calculated using plasma concentrations rather than CSF concentrations (**Figure 5**). This is likely due to differences in PK profiles with the concentration time profile of linezolid in the CSF being flatter than in plasma, characterized by a lower and delayed peak (27,36,37). Thus, despite the high cerebral diffusion of this antibiotic, this difference highlights the importance of considering tissue distribution in PK/PD analysis.

Identifying a plasma PK/PD index (*f*AUC/MIC) that reliably predicts the effect of linezolid in the CSF is a significant advantage, as it could greatly simplify its therapeutic monitoring and optimization. However, the target to be reached for a certain effect depends on concentrations used to drive the PK/PD index. To achieve a 2-log reduction from the initial inoculum, a *f*AUC/MIC ratio of 91 in plasma would be required, which is 1.25 times higher than the ratio of 73 needed in the CSF. Therefore, calculating probability of target attainment (PTA) based on CSF exposure while using the plasma-derived PK/PD target could underestimate the number of patients receiving effective treatment, potentially leading to unnecessary dose increases.

Plasma *f*AUC/MIC of 80-120 has been associated with higher probabilities of bacterial eradication in ICU patients with bacteremia, lower respiratory tract infection, skin and skin structure infection (16). Achieving this PK/PD target in a context of cerebro-meningeal infection would result in a bactericidal effect (*f*AUC/MIC of 91 associated with 2-log kill) according to the simulations. Thus, the magnitude of the linezolid target required for bacteriological cure would be relatively similar for various sites of infection, once again reflecting the extensive tissue distribution of this antibiotic. Similarly, the *f*AUC/MIC thresholds for bacteriostatic and bactericidal effects remained consistent across all strains tested in this study, likely due to their very similar MIC values (from 1 to 4 mg/L), which minimized variability in their PD responses. Although the MICs of the tested strains were consistent with linezolid MIC frequency distributions from EUCAST (38), it would be interesting to explore how large MIC differences between strains influence the magnitude of the PK/PD target. A previous study has already investigated this aspect and demonstrated that such variations could influence dosing adjustment recommendations (8).

In this study, we assessed the ability of the CSF PK/PD targets to predict the efficacy of the currently recommended dosing regimen of 600 mg q12 h. Overall, there was a strong concordance between the percentage of simulated patients reaching the *f*AUC/MIC (72%) and $fT_{>MIC}$ (76%) targets associated with a bacteriostatic effect and the percentage for whom a $\Delta\log_{10}$ CFU/mL ≤ 0 was predicted (77%) (**Figure 6**). However, some discrepancies were observed: certain patients reached the PK/PD targets despite a predicted $\Delta\log_{10}$ CFU/mL > 0 (false positives), while others did not reach the PK/PD targets but still had a predicted $\Delta\log_{10}$ CFU/mL ≤ 0 (false negatives). For bacterial stasis, the similar proportions between false positives (5.3% for *f*AUC/MIC and 5.2% for $fT_{>MIC}$) and false negatives (8.5% for *f*AUC/MIC and 6.9% for $fT_{>MIC}$) explained the observed agreement. In contrast, when assessing bactericidal targets, *f*AUC/MIC tended to underestimate the proportion of patients with a predicted $\Delta\log_{10}$ CFU/mL ≤ -2 (16% versus 26%), whereas $fT_{>MIC}$ led to an overestimation of this proportion (47% versus 26%) (**Figure 7**). In particular, with *f*AUC/MIC, 15.5% of simulated patients were false negatives compared to only 3.6% false positives, whereas with $fT_{>MIC}$, 24.0% were false positives versus 3.7% false negatives, which

suggests that PTA outcomes and subsequent dosage adjustment recommendations may vary depending on the selected PK/PD index. These results might provide an initial explanation for the previously reported contradictions in terms of dosage adjustments based on PTA, where higher-than-standard doses were suggested when targeting *f*AUC/MIC > 80 for pathogens with an MIC of 2 mg/L (36), while the standard regimen seemed adequate when targeting 100% $fT_{>MIC}$ (37).

However, all these findings relied on PK/PD modelling based on *in vitro* studies, which have several limitations that could impact the extrapolation of results to *in vivo* conditions. In fact, one of the main limitations of the *in vitro* TKC experiments conducted in this study is the use of MHB, a rich culture media that is favorable to bacterial growth but does not accurately mimic the physiological conditions encountered by bacteria at the site of infection. Several studies have shown that bacterial growth was slower *in vivo* than *in vitro* and that the activity of antibiotics may be affected, potentially leading to either an overestimation or underestimation of their true efficacy (39–41). Similarly, *in vitro* TKC performed in depleted culture media, including various human body fluids such as human CSF (42) peritoneal dialysis fluid (43,44), demonstrated that bacterial growth was slower than in MHB and that antimicrobial activity varied. Additionally, *in vitro* experiments did not take into account the impact of the immune system on bacterial elimination, which could bias the interpretation of results. However, in the case of cerebro-meningeal infections, where the immune response is minimal (45), this limitation may be less significant. Another limitation is that TKC experiments were conducted under static concentrations, preventing the assessment of an antibiotic efficacy under dynamic conditions, where drug concentrations fluctuate over time. To address this, hollow-fiber experiments mimicking real-life CSF PK profiles should be performed to validate the predictions of the PK/PD model developed from static TKC data. Therefore, while *in vitro* models remain valuable tools for characterizing antibiotic activity, results should be interpreted with caution and are not a substitute for *in vivo* approaches. A promising strategy would be to assess linezolid efficacy in a rat model of ventriculitis, after recreating human exposure profiles for a more accurate prediction of clinical efficacy. This approach has recently been applied to evaluate different human dosing regimens of amoxicillin-clavulanate (46) and gepotidacin (47) in relevant infection models, providing essential insights for dosing regimen optimization. However, such experiments are complex and costly, making them more suitable for validating the findings obtained from simulations rather than as a primary investigative method.

In conclusion this simulation study showed that *f*AUC/MIC, whether derived from plasma or CSF concentrations, was the best predictor of linezolid efficacy in the treatment of cerebro-meningeal

infections caused by *Staphylococcus* spp. Additionally, the magnitude of this index appeared to be consistent between different infection sites and bacterial strains. However, the discrepancy between the PK/PD target required for a bactericidal effect and the efficacy predicted by the PK/PD model based on TKC for the currently recommended dosing regimen of linezolid raised concerns about the predictive performance of these indices. These findings relied on PK/PD modelling based on *in vitro* studies and therefore need to be confirmed through clinical outcomes.

Acknowledgment

The authors thank the bacteriology laboratory of the university hospital of Poitiers for provided clinical bacterial strains.

References

1. Mouton JW, Dudley MN, Cars O, Derendorf H, Drusano GL. Standardization of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti-infective drugs: an update. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1 mai 2005;55(5):601-7.

2. Vogelman B, Gudmundsson S, Leggett J, Turnidge J, Ebert S, Craig WA. Correlation of antimicrobial pharmacokinetic parameters with therapeutic efficacy in an animal model. J Infect Dis. 1 oct 1988;158(4):831-47.

3. Craig WA. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Parameters: Rationale for Antibacterial Dosing of Mice and Men. 1998;

4. European Medicines Agency. Guideline on the use of pharmacokinetics and pharmacodynamics in the development of antimicrobial medicinal products. 2016; Disponible sur: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-use-pharmacokinetics-and-pharmacodynamics-development-antimicrobial-medicinal-products_en.pdf

5. Food and Drug Administration. Antibacterial Therapies for Patients With an Unmet Medical Need for the Treatment of Serious Bacterial Diseases Guidance for Industry. août 2017; Disponible sur: https://www.fda.gov/files/drugs/published/Antibacterial-Therapies-for-Patients-With-an-Unmet-Medical-Need-for-the-Treatment-of-Serious-Bacterial-Diseases.pdf

6. Food and Drug Administration. Antibacterial Therapies for Patients With an Unmet Medical Need for the Treatment of Serious Bacterial Diseases – Questions and Answers (Revision 1). mai 2022;

7. Andes D, Craig WA. Animal model pharmacokinetics and pharmacodynamics: a critical review. International Journal of Antimicrobial Agents. 1 avr 2002;19(4):261-8.

8. Kristoffersson AN, David-Pierson P, Parrott NJ, Kuhlmann O, Lave T, Friberg LE, et al. Simulation-Based Evaluation of PK/PD Indices for Meropenem Across Patient Groups and Experimental Designs. Pharm Res. mai 2016;33(5):1115-25.

9. Nielsen EI, Cars O, Friberg LE. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic (PK/PD) Indices of Antibiotics Predicted by a Semimechanistic PKPD Model: a Step toward Model-Based Dose Optimization. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 15 sept 2011;55(10):4619-30.

10. Barbour A, Scaglione F, Derendorf H. Class-dependent relevance of tissue distribution in the interpretation of anti-infective pharmacokinetic/pharmacodynamic indices. International Journal of Antimicrobial Agents. 1 mai 2010;35(5):431-8.

11. Velkov T, Bergen P, Lora-Tamayo J, Landersdorfer CB, Li J. PK/PD models in antibacterial development.

12. Levison ME, Levison JH. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Antibacterial Agents. Infectious Disease Clinics of North America. déc 2009;23(4):791-815.

13. Tunkel AR, Hasbun R, Bhimraj A, Byers K, Kaplan SL, Scheld WM, et al. 2017 Infectious Diseases Society of America's Clinical Practice Guidelines for Healthcare-Associated Ventriculitis and Meningitis*. Clinical Infectious Diseases. 15 mars 2017;64(6):e34-65.

14. Andes D, Van Ogtrop ML, Peng J, Craig WA. In Vivo Pharmacodynamics of a New Oxazolidinone (Linezolid). Antimicrob Agents Chemother. nov 2002;46(11):3484-9.

15. Sandberg A, Jensen KS, Baudoux P, Van Bambeke F, Tulkens PM, Frimodt-Møller N. Intra- and extracellular activity of linezolid against Staphylococcus aureus in vivo and in vitro. J Antimicrob Chemother. mai 2010;65(5):962-73.

16. Rayner CR, Forrest A, Meagher AK, Birmingham MC, Schentag JJ. Clinical Pharmacodynamics of Linezolid in Seriously Ill Patients Treated in a Compassionate Use Programme: Clinical Pharmacokinetics. 2003;42(15):1411-23.

17. Khan DD, Friberg LE, Nielsen EI. A pharmacokinetic–pharmacodynamic (PKPD) model based on *in vitro* time–kill data predicts the *in vivo* PK/PD index of colistin. J Antimicrob Chemother. juill 2016;71(7):1881-4.

18. Société Française de Microbiologie. CA-SFM / EUCAST : Société Française de Microbiologie. 2022.

19. Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nat Protoc. févr 2008;3(2):163-75.

20. Société Française de Microbiologie. CA-SFM / EUCAST : Société Française de Microbiologie. 2024.

21. Wadhwani T, Desai K, Patel D, Lawani D, Bahaley P, Joshi P, et al. Effect of various solvents on bacterial growth in context of determining MIC of various antimicrobials. :6.

22. Broussou DC, Toutain PL, Woehrlé F, El Garch F, Bousquet-Melou A, Ferran AA. Comparison of in vitro static and dynamic assays to evaluate the efficacy of an antimicrobial drug combination against Staphylococcus aureus. Becker K, éditeur. PLoS ONE. 23 janv 2019;14(1):e0211214.

23. NCCLS. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline. NCCLS document M26-A. 1999.

24. Nielsen EI, Viberg A, Löwdin E, Cars O, Karlsson MO, Sandström M. Semimechanistic Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Model for Assessment of Activity of Antibacterial Agents from Time-Kill Curve Experiments. Antimicrob Agents Chemother. janv 2007;51(1):128-36.

25. Mohamed AF, Nielsen EI, Cars O, Friberg LE. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Model for Gentamicin and Its Adaptive Resistance with Predictions of Dosing Schedules in Newborn Infants. Antimicrob Agents Chemother. janv 2012;56(1):179-88.

26. Beal SL. Ways to fit a PK model with some data below the quantification limit. J Pharmacokinet Pharmacodyn. oct 2001;28(5):481-504.

27. Dahyot-Fizelier C, Chauzy A, Chalard K, Bernard F, De Courson H, Leblanc PE, et al. CSF pharmacokinetics-pharmacodynamics of linezolid in critically brain injured patients, with or without central nervous system healthcare-associated infection. The PK-Pop-LCR Study: A Multicenter Pharmacokinetics and Pharmacodynamics Population Study. [Internet]. 2024 [cité 16 déc 2024]. Disponible sur: http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2024.12.13.24318990

28. Baron KT. Mrgsolve: Simulate from ODE-based Models [Internet]. 2024. Disponible sur: https://mrgsolve.org/docs/

29. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2024.

30. Elzhov TV, Mullen KM, Spiess A, Bolker B. minpack.lm [Internet]. 2023. Disponible sur: https://cran.r-project.org/web/packages/minpack.lm/index.html

31. König C, Grensemann J, Czorlich P, Schlemm E, Kluge S, Wicha SG. A dosing nomograph for cerebrospinal fluid penetration of meropenem applied by continuous infusion in patients with nosocomial ventriculitis. Clinical Microbiology and Infection. juill 2022;28(7):1022.e9-1022.e16.

32. Blassmann U, Roehr AC, Frey OR, Vetter-Kerkhoff C, Thon N, Hope W, et al. Cerebrospinal fluid penetration of meropenem in neurocritical care patients with proven or suspected ventriculitis: a prospective observational study. Crit Care. 24 oct 2016;20:343.

33. Mader MMD, Czorlich P, König C, Fuhrmann V, Kluge S, Westphal M, et al. Intrathecal penetration of meropenem and vancomycin administered by continuous infusion in patients suffering from ventriculitis-a retrospective analysis. Acta Neurochir (Wien). nov 2018;160(11):2099-105.

34. Blassmann U, Hope W, Roehr AC, Frey OR, Vetter-Kerkhoff C, Thon N, et al. CSF penetration of vancomycin in critical care patients with proven or suspected ventriculitis: a prospective observational study. J Antimicrob Chemother. 1 avr 2019;74(4):991-6.

35. Chen Z, Taubert M, Chen C, Dokos C, Fuhr U, Weig T, et al. Plasma and Cerebrospinal Fluid Population Pharmacokinetics of Vancomycin in Patients with External Ventricular Drain. Antimicrob Agents Chemother. 15 juin 2023;67(6):e0024123.

36. Luque S, Grau S, Alvarez-Lerma F, Ferrández O, Campillo N, Horcajada JP, et al. Plasma and cerebrospinal fluid concentrations of linezolid in neurosurgical critically ill patients with proven or suspected central nervous system infections. International Journal of Antimicrobial Agents. nov 2014;44(5):409-15.

37. Beer R, Engelhardt KW, Pfausler B, Broessner G, Helbok R, Lackner P, et al. Pharmacokinetics of Intravenous Linezolid in Cerebrospinal Fluid and Plasma in Neurointensive Care Patients with Staphylococcal Ventriculitis Associated with External Ventricular Drains. Antimicrob Agents Chemother. janv 2007;51(1):379-82.

38. MIC EUCAST [Internet]. [cité 6 oct 2024]. Disponible sur: https://mic.eucast.org/search/?search%5Bmethod%5D=mic&search%5Bantibiotic%5D=-1&search%5Bspecies%5D=452&search%5Bdisk_content%5D=-1&search%5Blimit%5D=50

39. Chauzy A, Akrong G, Aranzana-Climent V, Moreau J, Prouvensier L, Mirfendereski H, et al. PKPD Modeling of the Inoculum Effect of Acinetobacter baumannii on Polymyxin B in vivo. Front Pharmacol. 16 mars 2022;13:842921.

40. de Araujo BV, Diniz A, Palma EC, Buffé C, Dalla Costa T. PK-PD modeling of β-lactam antibiotics: in vitro or in vivo models? J Antibiot (Tokyo). juin 2011;64(6):439-46.

41. Aranzana-Climent V, Hughes D, Cao S, Tomczak M, Urbas M, Zabicka D, et al. Translational *in vitro* and *in vivo* PKPD modelling for apramycin against Gram-negative lung pathogens to facilitate prediction of human efficacious dose in pneumonia. Clinical Microbiology and Infection. 1 oct 2022;28(10):1367-74.

42. Schwameis R, Fille M, Manafi M, Zeitlinger M, Sauermann R. Enhanced activity of linezolid against Staphylococcus aureus in cerebrospinal fluid. Research in Microbiology. avr 2012;163(3):157-60.

43. Kussmann M, Hauer S, Pichler P, Reznicek G, Burgmann H, Poeppl W, et al. Influence of different peritoneal dialysis fluids on the in vitro activity of fosfomycin against Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, and Pseudomonas aeruginosa. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. juin 2018;37(6):1091-8.

44. Kussmann M, Schuster L, Wrenger S, Pichler P, Reznicek G, Burgmann H, et al. Influence of Different Peritoneal Dialysis Fluids on the In Vitro Activity of Cefepime, Ciprofloxacin, Ertapenem, Meropenem and Tobramycin Against Escherichia Coli. Perit Dial Int. 12 2016;36(6):662-8.

45. Karvouniaris M, Brotis A, Tsiakos K, Palli E, Koulenti D. Current Perspectives on the Diagnosis and Management of Healthcare-Associated Ventriculitis and Meningitis. Infect Drug Resist. 2022;15:697-721.

46. Berry V, Hoover J, Singley C, Woodnutt G. Comparative Bacteriological Efficacy of Pharmacokinetically Enhanced Amoxicillin-Clavulanate against Streptococcus pneumoniae with Elevated Amoxicillin MICs and Haemophilus influenzae. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. mars 2005;49(3):908.

47. Hoover JL, Singley CM, Elefante P, Rittenhouse S. Efficacy of Human Exposures of Gepotidacin (GSK2140944) against Escherichia coli in a Rat Pyelonephritis Model. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 24 juin 2019;63(7):10.1128/aac.00086-19.

Partie 2 : Développement d'une approche expérimentale et computationnelle pour reproduire les profils PK tissulaires dans un modèle *in vitro* d'infection

La seconde partie de ce travail de thèse a permis l'écriture d'un deuxième article accepté dans le journal Microbiology Spectrum, intitulé **« A freely accessible, adaptable hollow-fiber setup to reproduce first-order absorption: illustration with linezolid cerebrospinal fluid pharmacokinetic data »**, par Noémie Prébonnaud, Alexia Chauzy, Nicolas Grégoire, Claire Dahyot-Fizelier, Christophe Adier, Sandrine Marchand et Vincent Aranzana-Climent. Un résumé de cet article est présenté ci-dessous.

Résumé :

L'objectif principal de cette étude était de valider un algorithme et un protocole expérimental permettant de simuler des profils pharmacocinétiques d'absorption de premier ordre, sans modifier de manière significative le modèle expérimental standard d'infection à fibres creuses *in vitro* (Hollow-Fiber Infection Model, HFIM). Pour cela, l'exemple qui a été choisi, a eu pour but de reproduire dans le HFIM pendant 4 jours, les concentrations de linézolide dans le liquide cérébrospinal (LCS) après des perfusions de 30 minutes, aux schémas posologiques de 600 mg toutes les 12 heures, 900 mg toutes les 12 heures et 900 mg toutes les 8 heures observées chez des patients de réanimation.

Pour approximer l'absorption apparente de premier ordre observée sur les profils pharmacocinétiques dans le LCS, l'intervalle de dose a été subdivisé en une série de sous-intervalles au cours desquels des perfusions continues ont été réalisées dans l'HFIM. Pour chaque sous-intervalle, la dose de linézolide administrée était identique mais la durée et le débit de la perfusion variaient selon les résultats obtenus à l'aide de l'algorithme nouvellement développé.

De plus, nous avons reproduit indépendamment les concentrations plasmatiques afin de valider notre HFIM.

Des échantillons ont été prélevés dans le réservoir central et dans l'espace extracapillaire (ECS) de la cartouche du HFIM, puis analysés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem afin de mesurer les concentrations dans chacun de ces compartiments. Les paramètres pharmacocinétiques observés ainsi que les concentrations dans l'ECS ont ensuite été comparés aux paramètres pharmacocinétiques cliniques cibles et aux concentrations attendues.

Pour tous les schémas posologiques, les paramètres pharmacocinétiques observés ont été reproduits avec un biais inférieur à 20 % par rapport aux paramètres cibles, validant ainsi la capacité de notre algorithme et de notre dispositif expérimental à reproduire les profils pharmacocinétiques du linézolide dans le plasma et le LCS dans un HFIM.

L'algorithme développé est disponible dans l'application web open-source à l'adresse suivante : https://varacli.shinyapps.io/hollow_fiber_app/, permettant de concevoir facilement d'autres expériences de HFIM.

A freely accessible, adaptable hollow-fiber setup to reproduce first-order absorption: illustration with linezolid cerebrospinal fluid pharmacokinetic data

N. Prébonnaud[1,2], A. Chauzy[1,*], N. Grégoire[1,2], C. Dahyot-Fizelier[1,3], C. Adier[1], S. Marchand[1,2], V. Aranzana-Climent[1]

[1] Université de Poitiers, Inserm U1070, PHAR2, Poitiers, France

[2] Laboratoire de Toxicologie-Pharmacocinétique, CHU de Poitiers, Poitiers, France

[3] Service d'anesthésie-réanimation médecine périopératoire, CHU de Poitiers, Poitiers, France

*** Corresponding author**:

Alexia CHAUZY

alexia.chauzy@univ-poitiers.fr

INSERM U1070 - Université de Poitiers

Pôle Biologie Santé - Bâtiment B36

1 rue Georges Bonnet

86022 POITIERS Cedex, France

Accepted in Microbiology Spectrum

Abstract

The main objective of this study was to validate an algorithm and experimental setup to simulate first-order absorption pharmacokinetic profiles without altering the standard *in vitro* hollow fiber infection model (HFIM). For that, clinical cerebrospinal fluid (CSF) linezolid concentrations after 30-minute infusions at dosing regimens 600 mg q12 h, 900 mg q12 h, and 900 mg q8 h were reproduced in the HFIM over 4 days.

To approximate the apparent first-order absorption observed on CSF pharmacokinetic profiles, we split the dosing interval into a series of sub-intervals during which continuous infusions were delivered to the system. During each sub-interval, the same amount of linezolid was delivered but the sub-intervals had different durations and flow rates which were computed by a newly developed algorithm.

In addition, we independently reproduced plasma concentrations to validate our system.

Samples were collected from the central reservoir and the extracapillary space (ECS) of the cartridge of the HFIM and assayed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Observed pharmacokinetic parameters and concentrations in the ECS were compared with the target clinical pharmacokinetic parameters and concentrations.

Observed pharmacokinetic parameters were within 20% of target pharmacokinetic parameters for all experiments, thus validating the ability of our experimental setup to reproduce plasma and CSF linezolid pharmacokinetic profiles.

The algorithm and setup are available in the open-source web application https://varacli.shinyapps.io/hollow_fiber_app/ to easily design other HFIM experiments.

Importance

We developed and validated a novel hollow-fibers setup that enables *in vitro* simulation of mono-compartmental pharmacokinetics with an absorption phase. This novel experimental setup was easily implemented on top of the traditional one since it only requires addition of a programmable infusion pump. Using this streamlined approach, we successfully replicated pharmacokinetic at the infection site, specifically cerebrospinal fluid concentrations of linezolid, consistent with those observed in ICU patients. Thus, this study addresses the challenge of accurately reproducing target site concentrations, rather than relying solely on plasma levels, offering a valuable tool for optimizing dosing regimens in antibiotic therapy. Importantly, this setup also allows for the reproduction of plasma pharmacokinetic

following oral (or any other extravascular) administration, broadening its applicability. The algorithm and setup developed in this study were incorporated into an open-source web application designed to facilitate the design of hollow-fibers experimental protocols (https://varacli.shinyapps.io/hollow_fiber_app/).

Keywords

Hollow-fiber, first-order absorption, pharmacokinetics, antimicrobial agents

Introduction

The hollow-fiber infection model (HFIM) is a preferential model of *in vitro* pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) study to predict bacterial killing induced by various PK profiles in order to optimize dosing regimen (1). Traditionally, PK/PD indices are determined by performing dose-fractionation studies in mouse (2). However, PK observed in animals can be different compared to that in human. For instance, drug half-life is usually faster in mouse than in human (3). Thus, HFIM is interesting because it can reproduce the PK observed in humans and over a longer duration than in *in vivo* studies which are generally limited to 24 h (1).

Most HFIM studies reproduced unbound plasma PK profiles observed after intravenous administration, and most often characterized by one or two-compartment models with first-order elimination and no absorption (4–9). Unbound plasma concentrations are considered of the best surrogate of the concentrations observed at infection sites (10). However, the antibiotic concentration at the infection site may be lower than the unbound plasma concentrations depending on the physicochemical properties of the antibiotic and to the presence of anatomical barriers (11).

This is particularly true in the context of treating cerebral infections. The brain is protected by the blood-brain barrier and the blood-cerebrospinal fluid barrier, which limit the distribution of antibiotics in the cerebrospinal fluid (CSF) (12). Although meningeal inflammation can increase the permeability of these barriers, antibiotic concentrations in CSF often remain lower and delayed when compared with those in plasma (12,13). Thus, using plasma concentrations to optimize dosing regimen can overestimate the effect at the infection site (e.g CSF) making it more relevant to reproduce concentrations observed at the infection sites in the HFIM to optimize dosing regimen.

Studies reproducing concentrations observed at infection sites (e.g CSF concentrations, lung tissue concentrations) are rare in the literature (14–16). In the studies conducted by Hope *et al*. and Kloprogge *et al.*, the concentration profiles at infection sites reproduced in the HFIM were similar to those observed in plasma, which allowed them to set the programmable syringe to deliver a short infusion, as it is typically done to reproduce plasma concentrations (15,16).

However, PK profiles observed at infection sites can differ from those observed in plasma due to the presence of an ascending phase that is often slower and delayed when compared with the one observed in plasma, which cannot be mimicked by a short infusion. A way to reproduce PK profiles with absorption is to add a bottle in the HFIM to mimic a depot compartment (17). However, it consumes materials and additional medium increasing the cost of the experiment.

Moreover, the reproduction of clinical concentrations in the HFIM is not always clearly demonstrated in certain studies (14,15,18–21).

In this context, the main objective of this study was to validate an experimental setup to simulate first-order absorption PK profiles without additional compartment in an *in vitro* HFIM. Secondarily, we also wanted to validate the ability of our system to reproduce intravenous PK profiles. For this purpose, CSF and plasma concentrations of linezolid from a previous study on intensive care unit patients (ICU) (13) after three dosing regimens were reproduced in a HFIM.

Materials and methods

A graphical summary of the methods used in this study is presented in **Figure 1**.

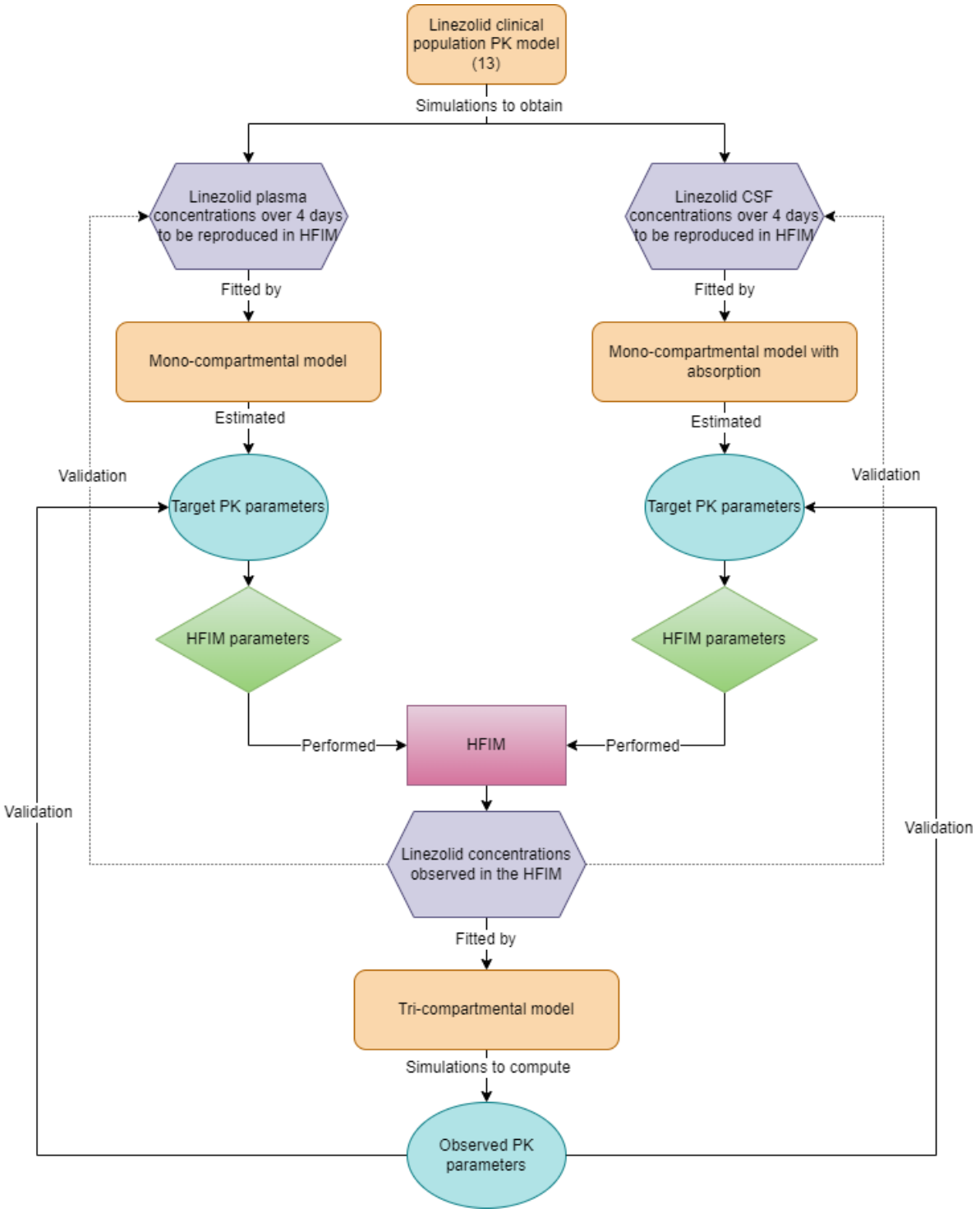


Figure 1. Diagram of the methods used in this study to reproduce either plasma or either CSF concentrations in a HFIM. (13) Linezolid clinical population PK model from Dahyot-Fizelier et al. Orange boxes correspond to models used, grey boxes represent linezolid concentrations, blue ovals correspond to PK parameters (*e.g.* ke, C_{max}), green lozenges correspond to parameters obtained from the R-shiny application HF-App (*i.e.* pump flow rates, infusion solution concentration and volume of diluent), and the pink box represents the *in vitro* HFIM. Created in drawio (22).

1. Linezolid PK simulations

To generate unbound linezolid concentrations in plasma and CSF from ICU patients, we used the typical profile obtained from the linezolid clinical population PK model developed in a previous study (13), which aimed to evaluate the distribution of this antibiotic in the CSF of ICU patients with external ventricular drainage. The linezolid clinical population PK model consisted of a bi-compartmental model, with one compartment representing plasma concentrations, one compartment representing CSF concentrations, and exchange between these two compartments. Linezolid unbound plasma and CSF concentrations to be reproduced in the HFIM were simulated over 4 days for two standard dosing regimens: 30 min infusion of 600 mg every 12 h, 30 min infusion of 900 mg every 12 h, and one high dosing regimen 30 min infusion of 900 mg every 8 h. Simulations were performed using mrgsolve R package (23) with R software, version 4.2.2 (24).

2. Estimation of target PK parameters to reproduce plasma concentrations in HFIM

Typical profiles of linezolid unbound plasma concentrations, following an infusion ($t_{infusion}$) of 0.5 h at the three dosing regimens were approximated with a mono-compartmental model to compute the target elimination rate constant (k_e), maximal concentration after the first dose ($C_{max,1}$), and concentration at steady state ($C_{max,ss}$) using R software, version 4.2.2 (24). This approximation, using a mono-compartmental model while simulated plasma concentrations were obtained with a bi-compartmental model, did not induce significant difference between the parameters obtained by the two methods and enabled plasma concentrations to be easily reproduced in HFIM. From the target ke value, terminal half-life ($t_{1/2}$) was computed as well as the number of doses needed to reach steady state (N_{dose}) considering 3.3 half-lives to reach 90% of the steady state. The accumulation factor (Rac) was computed from the target $C_{max,ss}$ divided by target $C_{max,1}$ values. Parameters are given in **Table 1.**

Table 1. Target PK parameters for unbound plasma concentrations.

	Dosing regimen		
Parameter	600 mg q12 h	900 mg q12 h	900 mg q8 h
$C_{max,1}$ (mg/L)	10.7	16.1	16.1
$C_{max,ss}$ (mg/L)	11.5	17.2	19.2
Rac	1.07	1.07	1.19
k_e (h^{-1})	0.230		
$t_{1/2}$ (h)	3.01		
N_{dose}	1		2
$t_{infusion}$ (h)	0.500		

3. Estimation of target PK parameters to reproduce CSF concentrations in HFIM

Typical profiles of linezolid CSF concentrations were approximated by a mono-compartmental model with first-order absorption to compute the absorption rate constant (k_a), elimination rate constant (k_e), maximal concentration after the first dose ($C_{max,1}$) and concentration at steady state ($C_{max,ss}$), time to reach C_{max} after the first dose ($T_{max,1}$) and at steady-state ($T_{max,ss}$) using R software, version 4.2.2 (24). As we made an approximation using a mono-compartmental model while the simulated CSF concentrations were obtained with a bi-compartmental model, the rate constants were empirically adjusted to yield a visually better match between concentrations predicted by the mono-compartmental model and concentrations from linezolid clinical population PK model (13). From the target ke value, terminal half-life ($t_{1/2}$) was computed as well as the number of doses needed to reach steady state (N_{dose}) considering 3.3 half-lives to reach 90% of the steady state. The accumulation factor (Rac) was computed from the target $C_{max,ss}$ divided by target $C_{max,1}$ values. Parameters are given in **Table 2**.

Table 2. Target PK parameters for CSF concentrations.

	Dosing regimen		
Parameter	600 mg q12 h	900 mg q12 h	900 mg q8 h
$C_{max,1}$ (mg/L)	4.25	6.38	6.38
$T_{max,1}$ (h)	4.10		
$C_{max,ss}$ (mg/L)	5.16	7.73	9.83
$T_{max,ss}$ (h)	27.6		27.0
Rac	1.21	1.21	1.54
k_a (h^{-1})	0.300	0.300	0.300*
k_e (h^{-1})	0.230	0.230	0.190*
$t_{1/2}$ (h)	3.01	3.01	3.65
N_{dose}	1	1	2

4. HFIM

General overview of the HFIM

Linezolid unbound plasma and CSF concentrations after 30 min infusion of 600 mg every 12 h, 30 min infusion of 900 mg every 12 h and 30 min infusion of 900 mg every 8 h were reproduced in the HFIM at 37°C ± 2°C for 4 days at least in duplicate on separate occasions for each dosing regimen. A diagram of the HFIM is presented in **Figure 2**.

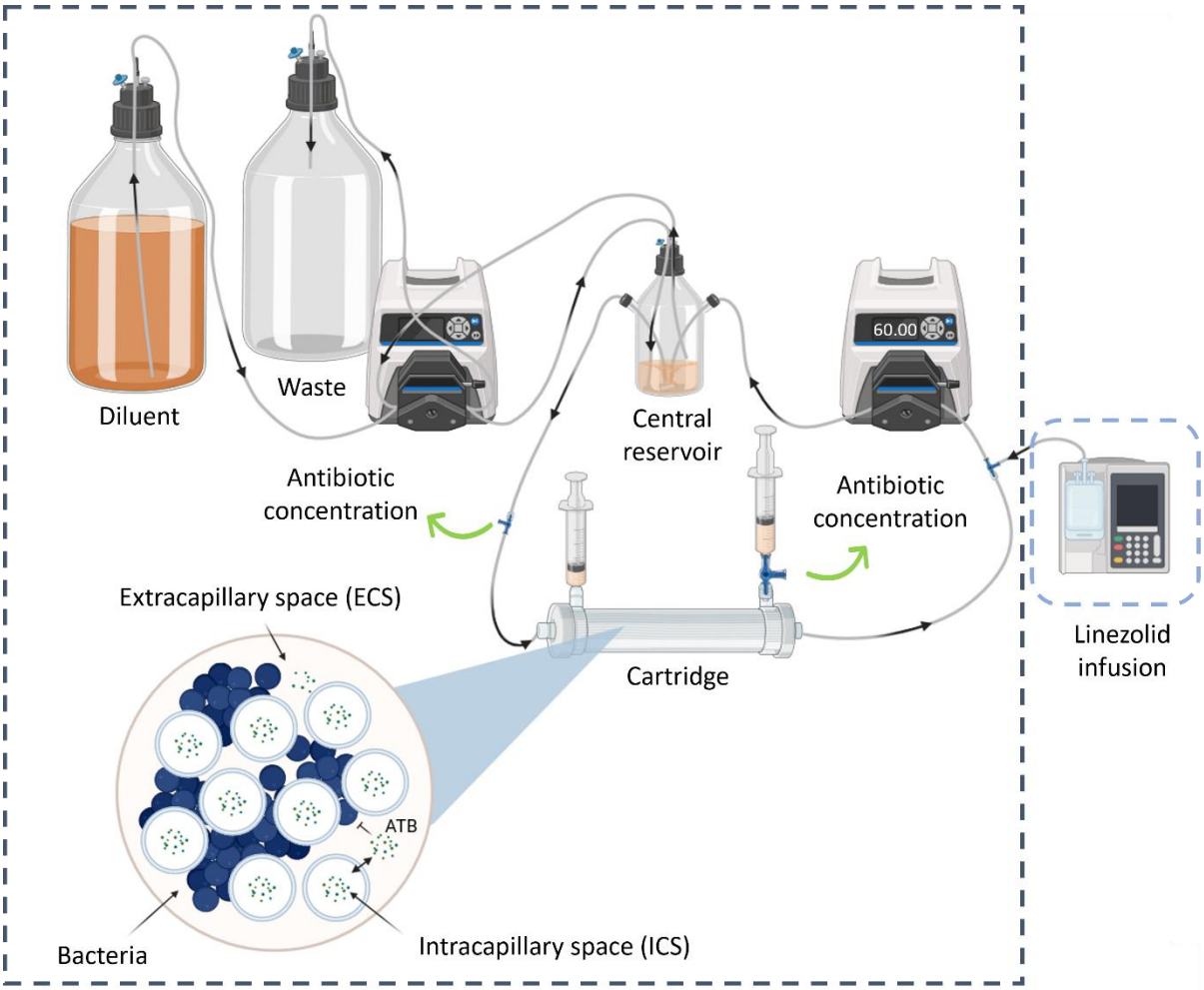


Figure 2. Diagram of hollow-fiber infection model. Black arrows correspond to the direction of flow. Green arrows correspond to sampling sites. Gray dashed line corresponds to the incubator at 37°C ± 2°C. Blue dashed line corresponds to the refrigerated box (2-10°C). Created in BioRender.com.

At the beginning of each experiment, stock solution of linezolid (purity > 99% in powder form, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Saint-Quentin-Fallavier, France) at 10 000 µg/mL in dimethyl sulfoxide (DMSO, Merck KGaA, Saint-Quentin-Fallavier, France) was thawed from the freezer at -80°C. Then, a linezolid infusion bag was freshly prepared by diluting stock solution to the desired concentration in 0.9% sodium chloride (Merck KGaA, Saint-Quentin-Fallavier, France). The concentration of the infusion solution as well as the DMSO percentage (< 13%) depended on the dosing regimen (**Tables S1 and S2**). Then, the infusion bag was placed into an ambulatory infusion pump (Mini RythmicTM Perf+, Micrel Medical Devices S.A., Koropi, Athens, Greece) which was kept in a refrigerated box (2-10°C) throughout the experiment (**Figure 2**). The ambulatory infusion pump delivered the linezolid into a fast-flowing circulation loop connecting the central reservoir (corresponding to a final DMSO concentration lower than 0.2%) to the intracapillary space (ICS) of a dialysis cartridge (FX paed helixone dialyzer, Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Germany) via a peristaltic pump (Masterflex L/S, Cole Parmer, Roissy, France). The flow rate in the circulation loop was set to 60 mL/min in order to obtain a rapid

equilibration of linezolid concentrations between the central reservoir and the ICS of the cartridge. Extracapillary space (ECS) of the cartridge was filled with 60 mL of cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB, Merck KGaA, Saint-Quentin-Fallavier, France) and inoculated by *Staphylococcus aureus* ATCC (American Type Culture Collection) 29213 (**Figure 2**).

The hollow-fibers were semi-permeable polysulfone membranes with pore size varying between 1.8 nm and 3.3 nm, which allowed diffusion of linezolid between the ICS and the ECS whereas bacteria were retained in the ECS (**Figure 2**).

To mimic the elimination of linezolid, a second peristaltic pump added antibiotic free CAMHB (Diluent) to the central reservoir and removed excess CAMHB (Waste), thus diluting linezolid while maintaining a constant volume of 300 mL of CAMHB in the central reservoir (**Figure 2**)

Setup to reproduce linezolid plasma concentrations in HFIM

To reproduce linezolid unbound plasma concentrations in the HFIM, the ambulatory pump was set to deliver an infusion of 5 mL over 30 min every 12 h, or 8 h in the case of 900 mg q8 h. The central reservoir volume, flow rate from the central reservoir to the cartridge, cartridge volume, infusion duration and volume to be infused for one dose, dosing interval, total number of doses, experiment duration, target maximal concentration after the first dose ($C_{max,1}$) and terminal half-life ($t_{1/2}$) defined in **Table 1** were entered into the R-shiny application HF-App (25) to obtain the experimental parameters (flow rate from the central reservoir to the waste, diluent volume, infusion solution concentration) given in the **Table S1**.

Setup to reproduce linezolid CSF concentrations in HFIM

To reproduce linezolid CSF concentrations in the HFIM, we approximated the apparent first-order absorption by a series of continuous infusions. To do so, we divided each dosing interval into 12 sub-intervals (or 8 sub-intervals in the case of 900 mg q8 h). Over all sub-intervals the same amount of linezolid was administered, only the duration and rate of administration differed between each sub-interval.

For a given target PK profile, the duration and infusion flow rates for each sub-interval was computed using the following algorithm (details about the algorithm construction are provided in **Text S1**):

1. The target maximal concentration after the first dose ($C_{max,1}$ in mg/L), absorption rate constant (k_a in h^{-1}), the elimination rate constant (k_e in h^{-1}), terminal half-life ($t_{1/2}$ in h) and the end time of the last sub-interval (t_n in h) were chosen based on the target PK profile to be simulated (**Table 2 and S2**)

2. The central reservoir + hollow-fiber cartridge volume (V_{total} in L) were chosen based on what was most practical in our experimental system. The number of sub-intervals (n) was chosen based on the capabilities of our programmable ambulatory infusion pump (**Table S2**).

3. The time to reach $C_{max,1}$ was computed using equation (Eq.1).

$$t_{max,1} = \frac{1}{k_a - k_e} ln\left(\frac{k_a}{k_e}\right) \quad \text{(Eq. 1)}$$

4. The dose administered at the end of the last sub-interval (Dose) with bioavailability (F) fixed to 1 and the fraction of target dose administered at the end of the last sub-interval (f_{dose}) were computed using the equations (Eq. 2 and Eq. 3) below.

$$Dose = C_{max,1} \times \left[\frac{F \times k_a}{V_{total} \times (k_a - k_e)} (e^{-k_e \times t_{max,1}} - e^{-k_a \times t_{max,1}})\right]^{-1} \quad \text{(Eq. 2)}$$

$$f_{dose} = 1 - e^{-k_a \times t_n} \quad \text{(Eq. 3)}$$

For each sub-interval i, t_i (h) the end time of sub-interval, A_i (mg) the amount of drug remaining to be administered for each t_i and S_i (mg/h) the infusion rate were computed using the equations (Eq. 4 to Eq. 6) below.

$$t_i = -\frac{ln\left(1 - f_{dose}\frac{i}{n}\right)}{k_a} \quad \text{(Eq. 4)}$$

$$A_i = Dose \times e^{-k_a \times t_i} \quad \text{(Eq. 5)}$$

$$S_i = \frac{A_{i-1} - A_i}{t_i - t_{i-1}} \quad \text{(Eq. 6)}$$

5. The linezolid concentration of the infused solution ($C_{infusion}$) was chosen so that the volume administered during each sub-interval was as close as possible to 2 mL (lowest possible injectable volume with good precision with our ambulatory infusion pump) (**Table S2**).
6. For each sub-interval the infusion pump flow rate ($Flow_{infusion,i}$) was computed using equation (Eq. 7) below:

$$Flow_{infusion,i} = \frac{S_i}{C_{infusion}} \quad \text{(Eq. 7)}$$

7. Infusion pump flow rates were then manually adjusted to the closest value programmable in the ambulatory infusion pump.

The flow of the pump adding diluent to the central reservoir (CL_{elim}) was computed with equation (Eq. 8) (**Table S2**).

$$CL_{elim} = k_e \times V_{total} \qquad \text{(Eq. 8)}$$

Diluent volume ($V_{diluent}$) was then computed with equation (Eq. 9) for an experiment duration ($Exp_{duration}$) of 96 h (**Table S2**).

$$V_{diluent} = CL_{elim} \times Exp_{duration} \qquad \text{(Eq. 9)}$$

This algorithm is implemented in the freely accessible R-shiny application HF-App (25) and all experimental parameters used are summarized in the **Table S2**.

To evaluate the ability of the algorithm to approximate mono-compartmental kinetics with first order absorption, simulations of the target PK profiles using a mono-compartmental model with first order absorption (with parameters from **Table 2**) and simulations of expected concentrations with the infusions computed with the algorithm (settings found in **Table 4** and **Table S3**) were performed. Simulations were performed using mrgsolve R package (23) with R software, version 4.2.2 (24). These were compared by computation of mean percentage error (MPE) to evaluate bias and root mean squared error (RMSE) to evaluate imprecision.

To ensure that linezolid unbound plasma and CSF concentrations were well reproduced in the HFIM, serial samples were collected from the central reservoir and the ECS of the cartridge at various time points. Samples from the ECS of the cartridge were centrifuged at 13 000 rpm and only the supernatant without bacteria were kept. Samples were stored at −80°C until assayed by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

5. LC-MS/MS assay

Analysis of linezolid concentrations in CAMHB was performed by an LC-MS/MS method previously developed for assay of linezolid plasma concentrations (13). Calibration curves were established over 0.2 to 80 µg/mL. Samples were precipitated with 300 µL of acetonitrile containing the internal standard (Linezolid D8, purity of 100% in powder form, Alsachim, Illkirch Graffenstaden, France) at 300 ng/mL and vortexed for 10 s. Then, samples were centrifuged at 14 000 rpm for 20 min at 4 °C and 100 µL of supernatant was transferred into a glass vial containing 100 µL of 10 mM ammonium formate. A volume of 2 µL was injected.

The system included a Shimadzu high-performance liquid chromatography system module (Nexera XR; Shimadzu, Marne la Vallée, France) coupled with a TQ3500 mass spectrometer (Sciex, Les Ulis, France). The compound was analyzed on an XBridge Peptide BEH300 C18 column (5 µm, 2.1 x 150 mm, Waters,

Saint-Quentin-en-Yvelines, France). The mobile phase consisted of a mixture (50/50, v/v) of 10 mM ammonium formate and acetonitrile delivered isocratically at 0.20 mL/min. Electrospray ionization in positive mode was used for detection. Ions were analyzed in the multiple reaction monitoring, and the following transitions were inspected: m/z 338→296 and 346→304 for linezolid and internal standard, respectively.

The intraday variability was characterized at three concentrations levels (0.6, 15 and 60 µg/mL) with a precision < 3% and bias < 9%. The interday variability was characterized at three concentrations levels (0.6, 15 and 60 µg/mL) with a precision < 5% and bias < 2% (n = 19).

6. Modeling of observed concentrations in the HFIM reproducing plasma and CSF linezolid PK

Model structure

Linezolid concentrations observed in the central reservoir and ECS of the cartridge of the HFIM were analyzed simultaneously. A tri-compartmental model (**Figure 3**), based on the structure of the experimental hollow-fiber, was used to fit the data to account for a possible delay in linezolid concentrations in the ECS due to the diffusion between the ICS and ECS of the cartridge. Although it is assumed that the concentrations between the central reservoir and the cartridge equilibrate rapidly due to the high flow rate of the pump between the central reservoir and the cartridge, this has not been demonstrated (26,27).

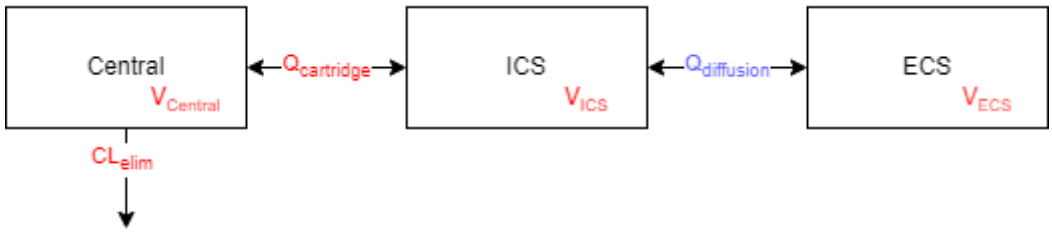


Figure 3. Structure of tri-compartmental model of HFIM. Central corresponds to the central reservoir of the HFIM, ICS to the intracapillary space of the cartridge, ECS to the extracapillary space of the cartridge, CL_{elim} to the pump flow rate from the central reservoir to the waste, $Q_{cartridge}$ to the pump flow rate from the central reservoir to the cartridge and $Q_{diffusion}$ to the diffusion flow rate between ICS and ECS of the cartridge. Red parameters were fixed, and blue parameter was estimated.

Estimation of constant diffusion flow rate between ICS and ECS

The tri-compartmental model allowed to estimate the constant diffusion flow rate between ICS and ECS of the cartridge ($Q_{diffusion}$ in L/h) using Monolix (Monolix 2024R1, Lixoft SAS, a Simulations Plus company). To do so, the values of the central reservoir volume ($V_{Central}$ in L), pump flow rate from the central reservoir to the waste (CL_{elim} in L/h), pump flow rate from the central reservoir to the cartridge

($Q_{cartridge}$ in L/h) and the cartridge volume ($V_{cartridge}$ in L) were fixed to experimental values (**Tables S1 and S2**). Volume of ICS (V_{ICS} in L) was computed by equation (Eq. 9) using the fraction of cartridge volume taken by fibers (F_{ICS}, determined from the cartridge technical information given in **Text S2**) and the cartridge volume ($V_{cartridge}$ in L). Volume of ECS ($V_{ECS,}$ in L) was computed using equation (Eq. 10).

$$V_{ICS} = F_{ICS} \times V_{cartridge} \quad \text{(Eq. 9)}$$

$$V_{ECS} = V_{cartridge} - V_{ICS} \quad \text{(Eq. 10)}$$

Validation of the tri-compartmental model

Model fit to data was evaluated by performing 1000 simulations with residual unexplained variability from the final model and plotting observed data against 90% prediction interval. The model was considered valid when 90% of observed data was within the 90% prediction interval.

Validation of the HFIM setup

For each dosing regimen, the observed PK parameters in the ECS of the cartridge of the HFIM were computed by simulation under the final tri-compartmental model using the mrgsolve R package (23) with R software, version 4.2.2 (24). Computed observed PK parameters include:

- Maximal concentration after the first dose ($C_{max,1}$) and at steady-state ($C_{max,ss}$)
- Time to reach C_{max} after the first dose ($T_{max,1}$) and at steady-state ($T_{max,ss}$),
- Area under the curve for a dosing interval after the first dose ($AUC_{\tau,1}$) and at steady state ($AUC_{\tau,ss}$)
- Elimination half-life ($t_{1/2}$)

Our setup to reproduce plasma or CSF concentrations was considered valid when the computed observed PK parameters in the ECS of the cartridge were within 20% of the target PK parameters.

Results

1. Tri-compartmental model fits well the observed concentrations in the HFIM reproducing plasma and CSF linezolid PK

The tri-compartmental model fitted linezolid concentrations well, for the setup mimicking plasma (**Figure 4**) and CSF PK (**Figure 5**) for both the central reservoir and the ECS of the hollow-fiber cartridge.

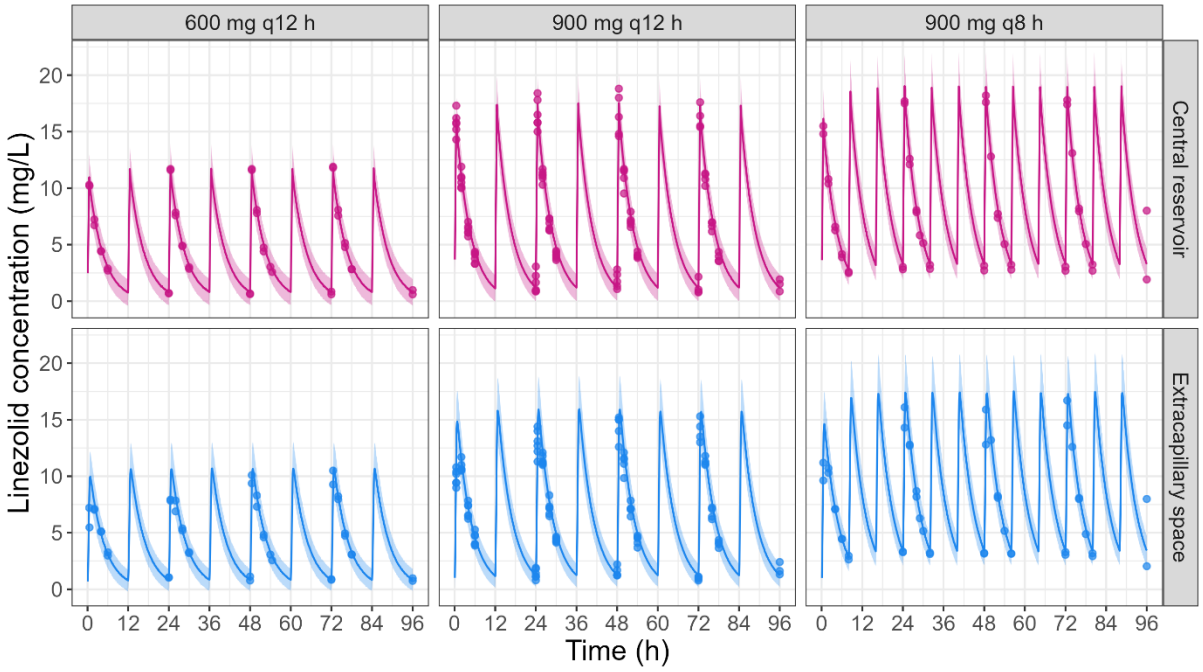


Figure 4. Observations versus simulations under the final model of linezolid concentrations observed in the central reservoir and in the cartridge ECS of the HFIM reproducing plasma PK for the three tested dosing regimens (replicate number = 2 - 3). Points correspond to the observed linezolid concentrations in HFIM. The line corresponds to the median of the simulations. The colored area corresponds to the 90% prediction interval (*i.e.* constructed from simulations with residual unexplained variability).

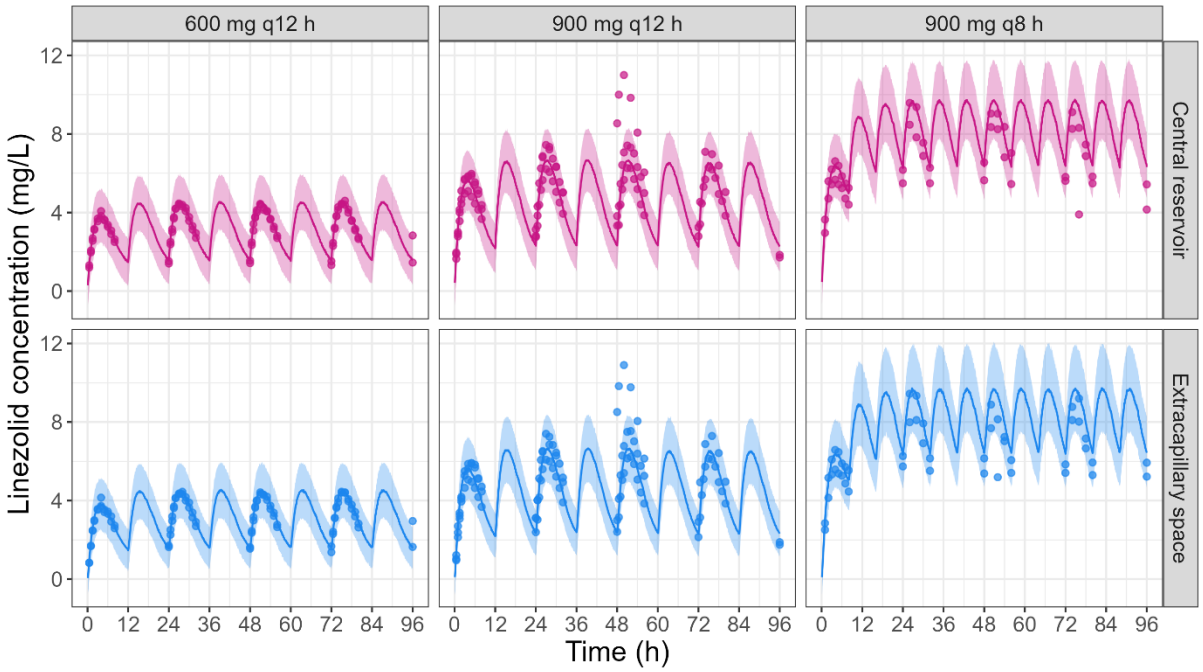


Figure 5. Observations versus simulations under the final model of linezolid concentrations observed in the central reservoir and in the cartridge ECS of the HFIM reproducing CSF PK for the three tested dosing regimens (replicate number = 2 - 3). Points correspond to the observed linezolid concentrations in HFIM. The line corresponds to the median of the simulations. The colored area corresponds to the 90% prediction interval (*i.e.* constructed from simulations with residual unexplained variability).

2. Diffusion across hollow-fiber membrane shows an apparent lag time

The tri-compartmental model estimated a diffusion flow rate ($Q_{diffusion}$) at 6.45 mL/min (0.387 L/h). Diffusion from the ICS to the ECS was not instantaneous, resulting in T_{max} in the cartridge ECS being delayed by 0.250 h when compared with the central reservoir concentrations when reproducing linezolid plasma concentrations whereas no difference was found when reproducing CSF concentrations (**Figure 6B**).

When reproducing plasma concentrations, this delay prevented complete diffusion of linezolid to the cartridge ECS resulting in a ~10% lower observed C_{max} in the cartridge ECS when compared with the central reservoir concentrations, whereas no difference was found when reproducing CSF concentrations. (**Figure 6A**).

However, there was no impact on antibiotic exposure since the AUC_{τ} was the same between central reservoir and cartridge ECS for all simulated concentrations (**Figure 6C**).

Comparable results were observed for 900 mg q12 h and 900 mg q8 h dosing regimens (**Figure S1 and S2**).

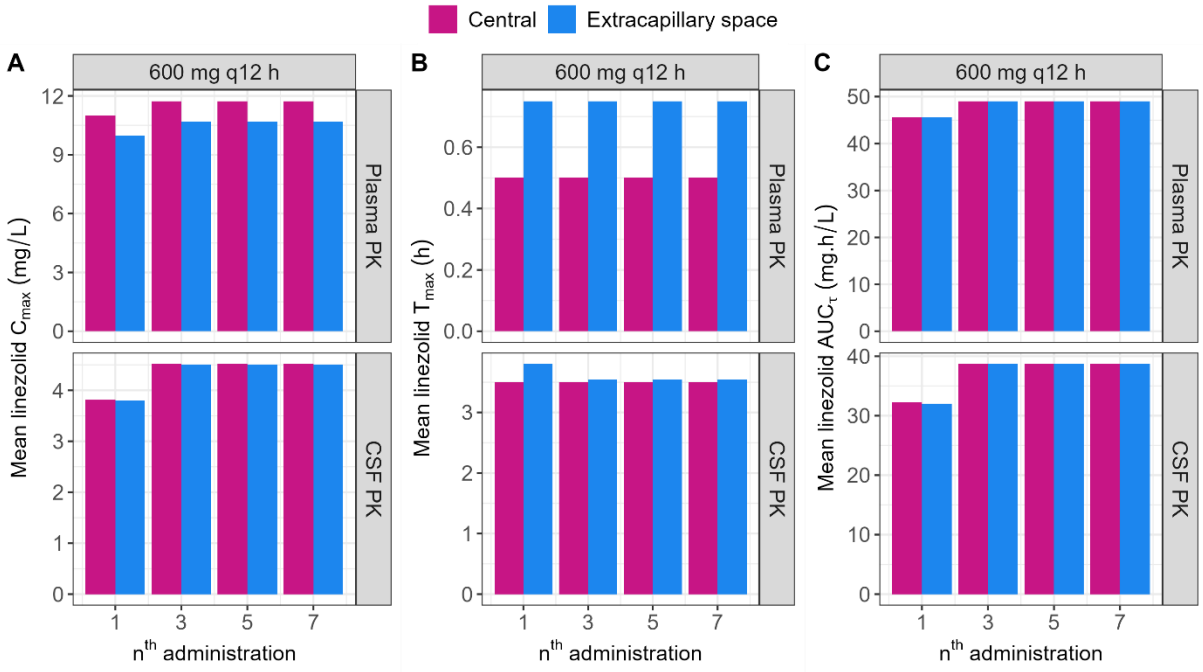


Figure 6. Linezolid PK parameters computed from observations in the central reservoir and in the cartridge ECS from HFIM experiments reproducing plasma PK (top panels) and CSF PK (bottom panels) after administration of 600 mg q12 h (replicate number = 2). (A) Mean observed maximal concentrations (C_{max}) of linezolid in the central reservoir (pink) and cartridge ECS (blue) after the 1st, 3rd, 5th and 7th administration. (B) Mean observed time to reach C_{max} (T_{max}) of linezolid in the central reservoir (pink) and cartridge ECS (blue) after the 1st, 3rd, 5th and 7th administration. (C) Mean observed area under the curve over the dosing interval (AUC_{τ}) of linezolid in the central reservoir (pink) and cartridge ECS (blue) after the 1st, 3rd, 5th and 7th administration.

3. Hollow-Fiber setup can be used to reproduce linezolid plasma PK

Target linezolid plasma concentrations from linezolid clinical population PK model (13) and observed linezolid concentrations in the cartridge ECS after an administration of 600 mg q12 h, 900 mg q12 h and 900 mg q8 h are shown in **Figure 7.** The overall bias of the observed versus predicted concentrations was -3.1 ± 14.6% for 600 mg q12 h, -7.8 ± 20.8% for 900 mg q12 h and -6.9 ± 23.7% for 900 mg q8 h.

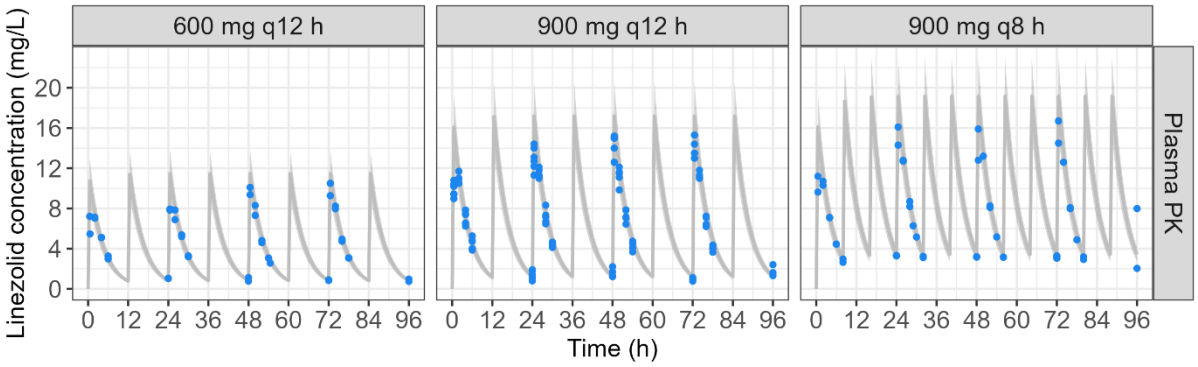


Figure 7. Target linezolid plasma concentrations from linezolid clinical population PK model (13) and observed linezolid concentrations in the cartridge ECS after infusion of 600 mg q12 h, 900 mg q12 h and 900 mg q8 h (replicate number = 2 - 6). The gray line corresponds to target linezolid concentrations. The gray area corresponds to a 20% bias from target linezolid concentrations. Points correspond to linezolid concentrations observed in the cartridge ECS of the HFIM.

Target and observed linezolid plasma PK parameters are compared in **Table 3**. $C_{max,1}$, $C_{max,ss}$, $t_{1/2}$, $AUC_{\tau,1}$ and $AUC_{\tau,ss}$ showed a bias lower than 10%. $T_{max,1}$ and $T_{max,ss}$ absolute bias was 0.25 h (0.5 h versus 0.75 h) which we deemed acceptable.

Table 3. Target linezolid plasma PK parameters versus mean observed cartridge ECS linezolid PK parameters. *For T_{max}, absolute bias (in h) was reported.

	Plasma								
	600 mg q12 h			900 mg q12 h			900 mg q8 h		
	Target	ECS	Bias (%)	Target	ECS	Bias (%)	Target	ECS	Bias (%)
$C_{max,1}$ (mg/L)	10.7	9.97	-7.08	16.1	14.8	-7.82	16.1	14.6	-9.60
$T_{max,1}$ (h)	0.500	0.750	0.250*	0.500	0.750	0.250*	0.500	0.750	0.250*
$AUC_{\tau,1}$ (mgxh/L)	46.1	45.6	-1.24	69.2	67.8	-2.02	61.6	58.9	-4.29
$C_{max,ss}$ (mg/L)	11.5	10.7	-6.89	17.2	15.9	-7.63	19.2	17.4	-9.11
$T_{max,ss}$ (h)	24.5	24.8	0.250*	24.5	24.8	0.250*	24.5	24.8	0.250*
$AUC_{\tau,ss}$ (mgxh/L)	49.5	49.0	-1.06	74.3	72.9	-1.84	74.3	71.5	-3.74
$C_{min,ss}$ (mg/L)	0.821	0.834	1.66	1.23	1.24	0.856	3.42	3.39	-0.97
$t_{1/2}$ (h)	3.01	3.03	0.511	3.01	3.03	0.511	3.01	3.03	0.511

4. Hollow-Fiber setup can be used to reproduce linezolid CSF PK

The ambulatory infusion pump program to reproduce CSF concentrations after administration of 600 mg q12 h of linezolid is presented in **Table 4**. The corresponding expected PK profile after the first dose in the cartridge ECS is presented in **Figure 8.**

Overall, the computed infusion pump program provided a good approximation of the target CSF concentrations. Comparable results were observed for the 900 mg q12 h and 900 mg q8 h dosing regimens (**Table S3 and Figure S3**).

Table 4. Ambulatory infusion pump program to reproduce CSF concentrations after administration of 600 mg q12 h of linezolid.

Sub-interval number	Sub-interval duration (min)	Infusion pump flow rate ($Flow_{infusion,i}$) (mL/h)	Amount infused (mg)
1	17	7.1	0.297
2	19	6.5	0.297
3	20	5.9	0.297
4	23	5.3	0.297
5	26	4.7	0.297
6	29	4.1	0.297
7	34	3.5	0.297
8	42	2.9	0.297
9	52	2.3	0.297
10	71	1.7	0.297
11	112	1.1	0.297
12	276	0.4	0.297

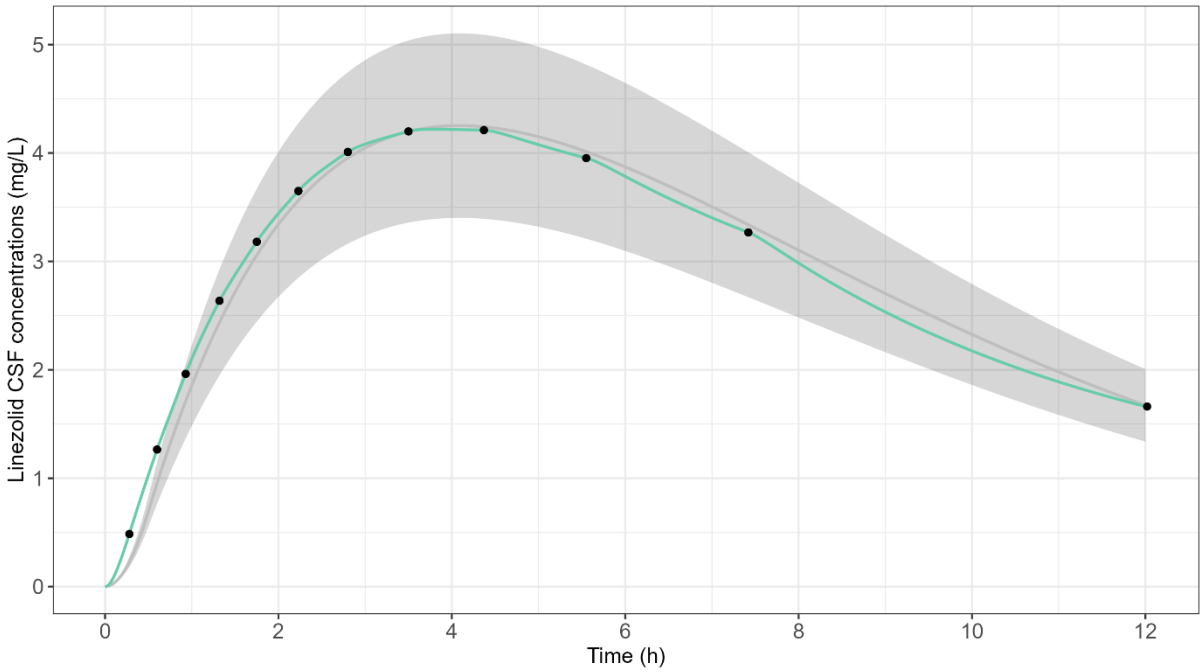


Figure 8. Target linezolid CSF concentrations from linezolid clinical population PK model (13) versus expected linezolid concentrations in the cartridge ECS for the first dose of 600 mg q12 h dosing regimen. The grey line corresponds to target linezolid concentrations. The grey area corresponds to a bias of 20% from the target linezolid concentrations. The green line corresponds to expected linezolid concentrations in the cartridge ECS with the infusion pump program shown in **Table.** Black points correspond to expected concentrations at the end of each infusion sub-interval.

The bias and imprecision of the expected concentration profiles with the infusion program computed with the algorithm are presented in **Table S4**.

Target linezolid CSF concentrations from linezolid clinical population PK model (13) and observed linezolid concentrations in the cartridge ECS after an administration of 600 mg q12 h, 900 mg q12 h and 900 mg q8 h are shown in **Figure 9**. Despite being lower than expected, these concentrations were within the 20% bias range and the overall bias of the observed versus predicted concentrations was -11.3 ± 10.8% for 600 mg q12 h, -5.0 ± 31.3% for 900 mg q12 h and -7.5 ± 9.7% for 900 mg q8 h.

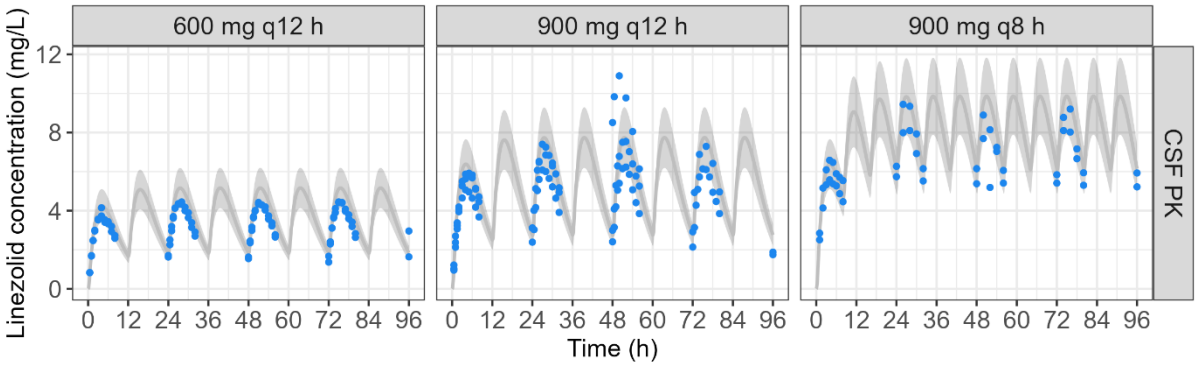


Figure 9. Target linezolid CSF concentrations from linezolid clinical population PK model (13) and observed linezolid concentrations in the cartridge ECS after infusion of 600 mg q12 h, 900 mg q12 h and 900 mg q8 h (replicate number = 2 – 3). The gray line corresponds to target linezolid concentrations. The gray area corresponds to a 20% bias from target linezolid concentrations. Points correspond to linezolid concentrations observed in the cartridge ECS of the HFIM.

Target and observed linezolid CSF PK parameters are compared in **Table 5**. $C_{max,1}$, $C_{max,ss}$, $t_{1/2}$, $AUC_{\tau,1}$ and $AUC_{\tau,ss}$ showed a bias lower than 20%. $T_{max,1}$ absolute bias was 0.3 h or less which we deemed acceptable. $T_{max,ss}$ were unbiased.

Table 5. Target linezolid CSF PK parameters versus observed cartridge ECS linezolid PK parameters. *For T_{max}, absolute bias (in h) was reported.

	CSF								
	600 mg q12 h			900 mg q12 h			900 mg q8 h		
	Target	ECS	Bias (%)	Target	ECS	Bias (%)	Target	ECS	Bias (%)
$C_{max,1}$ (mg/L)	4.25	3.80	-10.6	6.38	5.60	-12.1	6.38	6.36	-0.276
$T_{max,1}$ (h)	4.10	3.80	-0.300*	4.10	3.80	-0.300*	4.10	4.00	-0.100*
$AUC_{\tau,1}$ (mgxh/L)	35.9	32.0	-10.9	53.9	47.2	-12.3	39.7	40.3	-1.55
$C_{max,ss}$ (mg/L)	5.16	4.50	-12.6	7.73	6.64	-14.1	9.83	9.67	-1.68
$T_{max,ss}$ (h)	27.6	27.6	0.000*	27.6	27.6	0.000*	27.0	26.9	-0.0500*
$AUC_{\tau,ss}$ (mgxh/L)	44.7	38.7	-13.4	67.0	57.1	-14.8	66.9	67.1	0.403
$C_{min,ss}$ (mg/L)	1.82	1.59	-12.7	2.73	2.35	-14.0	6.05	5.97	-1.41
$t_{1/2}$ (h)	3.01	3.03	0.511	3.01	3.03	0.511	3.65	3.66	0.268

Discussion

Most HFIM studies found in the literature assay drug concentrations in the central reservoir rather than in the ECS (4,5,7–9,28–32). However, since bacteria are trapped within the ECS, it represents the true site of action, thus concentrations in the ECS are the most relevant to PK/PD studies. The reason why most studies do not assay drugs in the ECS is that it is usually assumed that concentrations in the ECS are in very rapid equilibrium with the central reservoir concentrations.

Some studies, challenged this assumption by measuring concentrations in both the central reservoir and ECS and reported that a delay of 15 min (6) and 20 min (18) was necessary to reach equilibrium between central reservoir and the ECS of the cartridge after short infusions of 30 min or 1 h. However, in those studies, they did not evaluate the impact of dosing regimen and half-life on the observed delay, which we were able to do here by comparing the reproduction of plasma and CSF concentrations in hollow-fiber.

In line with those previous reports, we also observed a delay of 15 min (0.25 h) in reaching equilibrium between the central reservoir and ECS when we reproduced 30 min short infusions of linezolid (**Figure 6B**). However, when reproducing CSF PK profiles, no such delay was observed (**Figure 6B**). Our hypothesis is that this delay is proportional to the rate of change in central reservoir concentrations, the higher the infusion rate and the lower the half-life, the longer the time to equilibrium will be. This delay not only has an impact on the time necessary to reach maximal concentration (T_{max}) in the ECS but also on the maximal concentration itself (C_{max}). Indeed, while the drug concentrations equilibrate between the central reservoir and the ECS, the drug is also eliminated from the central reservoir, reducing the overall amount of drug that reaches the ECS. In our study, the impact on C_{max} was limited (< 10% **Table 3**). However, if the delay is truly proportional to infusion rate and half-life, there will be future cases where the impact of C_{max} will be significant. In such cases, the parameterization of the HFIM could be adjusted in order to take into account this equilibration delay. In order to do so, one would have to first estimate the rate of diffusion from the ICS to the ECS ($Q_{diffusion}$) and then perform numerical optimization to find the best HFIM parameters to reproduce the desired concentration time-curve. Our results further reinforce the need to measure ECS concentrations when performing HFIM experiments when one wants to study the PK/PD of an anti-infective drug. Furthermore, it is especially important for antibiotics whose physicochemical properties render susceptible to sticking to hollow-fibers (26) or to bacteria-mediated degradation (e.g., β-lactamase-producing strains) (33).

CSF concentrations reproduced in the HFIM were systematically lower than expected (**Figure 9**). This can be explained by the algorithm used, which allows only a fraction of the target dose to be administered at the end of the last sub-interval (f_{dose}), systematically leading to lower than expected

concentrations. This fraction was lower for the 900 mg q8h regimen (f_{dose} ≈ 90%) compared to the q12h regimens (f_{dose} ≈ 97%), related to the technical limitations of our ambulatory pump, which restricted us to using 8 sub-intervals instead of 12 for other dosing regimens (**Table S2**). Despite this limitation, we were able to reproduce the targeted CSF concentrations with a bias of less than 20%. Another limitation of our validation is that when we computed the target PK parameters to reproduce linezolid CSF concentrations in the HFIM, we empirically adjusted the fitted ke and ka values to yield a better match between the expected concentrations and the target concentrations. However, even though we made empirically adjustments, bias of the observed PK parameters remained lower than 20% for all tested dosing regimens (n = 3), target PK (n = 2, plasma and CSF per dosing regimen), and all replicates (n ≥ 2 for each setup) (**Table 3 and Table 5**).

We developed and validated a new HFIM setup that enables *in vitro* reproduction of mono-compartmental PK with an absorption phase. This setup was applied to successfully reproduce site of action PK of linezolid, but could also be used to reproduce plasma PK after oral administration. An important strength of our setup is that it does not come with an overly complex modification to the material setup of the experiment, adding only a programmable infusion pump to the system (as opposed to adding a whole compartment and peristaltic pump).

This was made possible by the development of an algorithm that computes infusion rates and durations that enable an approximation of the first-order absorption kinetics by a series of continuous infusions. Since manual application of the algorithm would be tedious, we included it in an open-source web application designed to help design experimental protocols for HFIM (25). Thus, our setup and algorithm are easy to translate to any other HFIM experiment. This is not the first application that aims to help researchers to perform hollow-fiber experiments (16). Compared to the work by Klopprogge *et al.*, our app, proposes several improvements including: the ability to apply the currently proposed algorithm for first-order absorption kinetics, the ability to download all plots, tables and simulations and the openness of the code, which is distributed under an open license and available at: https://github.com/INSERM-U1070-PHAR2/HF-App. It should be noted that the app from Klopprogge *et al.* proposes two functionalities that ours does not: they propose the option to simplify the two-compartment system by using a zero-order infusion into the central reservoir for the drug with the longer half-life and have an option to start the experiment from steady state. We acknowledge the pertinence of these options and will include them in an updated version of the app.

Acknowledgment

The Shimadzu high-performance liquid chromatography system module (Nexera XR; Shimadzu, Marne la Vallée, France) coupled with a TQ3500 mass spectrometer (Sciex, Les Ulis, France) was obtained through the support of the Nouvelle Aquitaine CPER programs.

Data availability statement

A tutorial for use of the shiny app is provided in Text S3. The data used in this study are available at the following address https://doi.org/10.57745/NRXPOP. R code for the shiny application can be found on GitHub: https://github.com/INSERM-U1070-PHAR2/HF-App. It has also been archived on the Software Heritage website: https://archive.softwareheritage.org/swh:1:dir:f8177c3793324b996d14d7a1bf0490a4b2a69554

References

1. Bulitta JB, Hope WW, Eakin AE, Guina T, Tam VH, Louie A, et al. Generating Robust and Informative Nonclinical *In Vitro* and *In Vivo* Bacterial Infection Model Efficacy Data To Support Translation to Humans. Antimicrob Agents Chemother. mai 2019;63(5):e02307-18.

2. Velkov T, Bergen P, Lora-Tamayo J, Landersdorfer CB, Li J. PK/PD models in antibacterial development.

3. Ritschel WA, Vachharajani NN, Johnson RD, Hussain AS. The allometric approach for interspecies scaling of pharmacokinetic parameters. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology. 1 oct 1992;103(2):249-53.

4. Pichereau S, Pantrangi M, Couet W, Badiou C, Lina G, Shukla SK, et al. Simulated Antibiotic Exposures in an *In Vitro* Hollow-Fiber Infection Model Influence Toxin Gene Expression and Production in Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Strain MW2. Antimicrob Agents Chemother. janv 2012;56(1):140-7.

5. Shukla SK, Carter TC, Ye Z, Pantrangi M, Rose WE. Modeling of Effective Antimicrobials to Reduce Staphylococcus aureus Virulence Gene Expression Using a Two-Compartment Hollow Fiber Infection Model. Toxins. 22 janv 2020;12(2):69.

6. Broussou DC, Lacroix MZ, Toutain PL, Woehrlé F, El Garch F, Bousquet-Melou A, et al. Differential Activity of the Combination of Vancomycin and Amikacin on Planktonic vs. Biofilm-Growing Staphylococcus aureus Bacteria in a Hollow Fiber Infection Model. Front Microbiol. 27 mars 2018;9:572.

7. Docobo-Pérez F, Drusano GL, Johnson A, Goodwin J, Whalley S, Ramos-Martín V, et al. Pharmacodynamics of Fosfomycin: Insights into Clinical Use for Antimicrobial Resistance. Antimicrob Agents Chemother. sept 2015;59(9):5602-10.

8. Bergen PJ, Bulitta JB, Kirkpatrick CMJ, Rogers KE, McGregor MJ, Wallis SC, et al. Effect of different renal function on antibacterial effects of piperacillin against *Pseudomonas aeruginosa* evaluated via the hollow-fibre infection model and mechanism-based modelling. J Antimicrob Chemother. sept 2016;71(9):2509-20.

9. Yadav R, Rogers KE, Bergen PJ, Bulitta JB, Kirkpatrick CMJ, Wallis SC, et al. Optimization and Evaluation of Piperacillin-Tobramycin Combination Dosage Regimens against Pseudomonas aeruginosa for Patients with Altered Pharmacokinetics via the Hollow-Fiber Infection Model and Mechanism-Based Modeling. Antimicrob Agents Chemother. mai 2018;62(5):e00078-18.

10. Chauzy A, Lamarche I, Adier C, Couet W, Marchand S. Microdialysis Study of Aztreonam-Avibactam Distribution in Peritoneal Fluid and Muscle of Rats with or without Experimental Peritonitis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 24 sept 2018;62(10):10.1128/aac.01228-18.

11. Levison ME, Levison JH. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Antibacterial Agents. Infectious Disease Clinics of North America. déc 2009;23(4):791-815.

12. Nau R, Sörgel F, Eiffert H. Penetration of Drugs through the Blood-Cerebrospinal Fluid/Blood-Brain Barrier for Treatment of Central Nervous System Infections. Clin Microbiol Rev. oct 2010;23(4):858-83.

13. Dahyot-Fizelier C, Chauzy A, Chalard K, Bernard F, De Courson H, Leblanc PE, et al. CSF pharmacokinetics-pharmacodynamics of linezolid in critically brain injured patients, with or without central nervous system healthcare-associated infection. The PK-Pop-LCR Study: A Multicenter Pharmacokinetics and Pharmacodynamics Population Study. [Internet]. 2024 [cité 16 déc 2024]. Disponible sur: http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2024.12.13.24318990

14. Farrington N, McEntee L, Johnson A, Unsworth J, Darlow C, Jimenez-Valverde A, et al. Pharmacodynamics of Meropenem and Tobramycin for Neonatal Meningoencephalitis: Novel Approaches to Facilitate the Development of New Agents to Address the Challenge of Antimicrobial Resistance. Antimicrob Agents Chemother. 19 avr 2022;66(4):e02181-21.

15. Hope W, Stone NRH, Johnson A, McEntee L, Farrington N, Santoro-Castelazo A, et al. Fluconazole Monotherapy Is a Suboptimal Option for Initial Treatment of Cryptococcal Meningitis Because of Emergence of Resistance. Chiller T, éditeur. mBio. 24 déc 2019;10(6):e02575-19.

16. Kloprogge F, Hammond R, Kipper K, Gillespie SH, Della Pasqua O. Mimicking in-vivo exposures to drug combinations in-vitro: anti-tuberculosis drugs in lung lesions and the hollow fiber model of infection. Sci Rep. 13 sept 2019;9(1):13228.

17. Tam VH, Kabbara S, Vo G, Schilling AN, Coyle EA. Comparative Pharmacodynamics of Gentamicin against Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother. août 2006;50(8):2626-31.

18. Tam VH, Louie A, Deziel MR, Liu W, Leary R, Drusano GL. Bacterial-Population Responses to Drug-Selective Pressure: Examination of Garenoxacin's Effect on *Pseudomonas aeruginosa*. J INFECT DIS. août 2005;192(3):420-8.

19. Bilello JA, Bauer G, Dudley MN, Cole GA, Drusano GL. Effect of 2',3'-didehydro-3'-deoxythymidine in an in vitro hollow-fiber pharmacodynamic model system correlates with results of dose-ranging clinical studies [Internet]. [cité 2 mai 2024]. Disponible sur: https://journals.asm.org/doi/epdf/10.1128/aac.38.6.1386

20. Gumbo T, Louie A, Deziel MR, Parsons LM, Salfinger M, Drusano GL. Selection of a Moxifloxacin Dose That Suppresses Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis,* by Use of an In Vitro Pharmacodynamic Infection Model and Mathematical Modeling. J INFECT DIS. nov 2004;190(9):1642-51.

21. Bergen PJ, Bulitta JB, Kirkpatrick CMJ, Rogers KE, McGregor MJ, Wallis SC, et al. Substantial Impact of Altered Pharmacokinetics in Critically Ill Patients on the Antibacterial Effects of Meropenem Evaluated via the Dynamic Hollow-Fiber Infection Model. Antimicrob Agents Chemother. mai 2017;61(5):e02642-16.

22. JGraph. diagrams.net, draw.io [Internet]. 2021. Disponible sur: https://www.diagrams.net/

23. Baron KT. mrgsolve: Simulate from ODE-Based models [Internet]. 2023. Disponible sur: https://CRAN.R-project.org/package=mrgsolve

24. R Core Team. R: a language and environment for statistical computing [Internet]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2024. Disponible sur: https://www.R-project.org/

25. Aranzana-Climent V, Chauzy A, Grégoire N. HF-App: A R-Shiny application to streamline hollow-fibre experiments. [Internet]. Poitiers, France; 2024. Disponible sur: https://varacli.shinyapps.io/hollow_fiber_app/

26. J.S. Cadwell J. The Hollow Fiber Infection Model for Antimicrobial Pharmacodynamics and Pharmacokinetics. Adv Pharmacoepidem Drug Safety [Internet]. 2012 [cité 23 juin 2023];01(S1). Disponible sur: https://www.omicsonline.org/open-access/the-hollow-fiber-infection-model-for-antimicrobial-pharmacodynamics-and-pharmacokinetics-2167-1052-S1-007.php?aid=10878

27. Zhang X, Wang Y, Li S, Xie F, Yi H. Simulated drug disposition in critically ill patients to evaluate effective PK/PD targets for combating *Pseudomonas aeruginosa* resistance to meropenem. Leggett JE, éditeur. Antimicrob Agents Chemother. 6 mars 2024;68(3):e01541-23.

28. Louie A, Maynard M, Duncanson B, Nole J, Vicchiarelli M, Drusano GL. Determination of the Dynamically Linked Indices of Fosfomycin for Pseudomonas aeruginosa in the Hollow Fiber Infection Model. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 25 mai 2018;62(6):10.1128/aac.02627-17.

29. Nicasio AM, Bulitta JB, Lodise TP, D'Hondt RE, Kulawy R, Louie A, et al. Evaluation of Once-Daily Vancomycin against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in a Hollow-Fiber Infection Model. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 20 janv 2012;56(2):682-6.

30. Tait JR, Harper M, Cortés-Lara S, Rogers KE, López-Causapé C, Smallman TR, et al. Ceftolozane-Tazobactam against Pseudomonas aeruginosa Cystic Fibrosis Clinical Isolates in the Hollow-Fiber Infection Model: Challenges Imposed by Hypermutability and Heteroresistance. Antimicrob Agents Chemother. 17 août 2023;67(8):e00414-23.

31. Sadouki Z, McHugh TD, Aarnoutse R, Ortiz Canseco J, Darlow C, Hope W, et al. Application of the hollow fibre infection model (HFIM) in antimicrobial development: a systematic review and recommendations of reporting. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 12 août 2021;76(9):2252-9.

32. Kroemer N, Amann LF, Farooq A, Pfaffendorf C, Martens M, Decousser JW, et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis of ceftazidime/avibactam and fosfomycin combinations in an *in vitro* hollow fiber infection model against multidrug-resistant *Escherichia coli*. Asempa TE, éditeur. Microbiol Spectr. 11 janv 2024;12(1):e03318-23.

33. Drusano GL, Bonomo RA, Bahniuk N, Bulitta JB, VanScoy B, DeFiglio H, et al. Resistance Emergence Mechanism and Mechanism of Resistance Suppression by Tobramycin for Cefepime for Pseudomonas aeruginosa. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 26 déc 2012;56(1):231-42.

Supplementary data

1. Table S1: Experimental parameters used in HFIM to simulate plasma concentrations

	Parameter	Parameter description	600 mg q12 h	900 mg q12 h	900 mg q8 h
Set in the application	$V_{Central}$ (L)	Volume in the central reservoir	0.300	0.300	0.300
	$Q_{Cartridge}$ (L/h)	Pump flow rate from the central reservoir to the cartridge	3.60	3.60	3.60
	$V_{Cartridge}$ (L)	Volume of the cartridge	0.0600	0.0600	0.0600
	$t_{infusion}$ (h)	Infusion duration	0.500	0.500	0.500
	$V_{infusion}$ (mL)	Volume of infusion	5.00	5.00	5.00
	τ (h)	Dosing interval	12	12	8
	n_{doses}	Total number of doses	8	8	12
	$Exp_{duration}$ (h)	Experiment duration	96	96	96
	$C_{max,1}$ (mg/L)	Maximal concentration after the first dose	10.7	16.1	16.1
	$t_{1/2}$ (h)	Terminal half-life	3.01	3.01	3.01
Computed by the application	CL_{elim} (L/h)	Pump flow rate from the central reservoir to the waste	0.0828	0.0828	0.0828
	$V_{diluent}$ (L)	Volume of diluent	7.95	7.95	7.95
	$C_{infusion}$ (mg/L)	Infusion solution concentration	838	1220	1230
Performed	Replicates	Number of replicates	2	6	2

2. Table S2: Experimental parameters used in HFIM to simulate CSF concentrations

	Parameter	Parameter description	600 mg q12 h	900 mg q12 h	900 mg q8 h
Set in the application	$V_{Central}$ (L)	Volume in the central reservoir	0.300	0.300	0.300
	$Q_{Cartridge}$ (L/h)	Pump flow rate from the central reservoir to the cartridge	3.60	3.60	3.60
	$V_{Cartridge}$ (L)	Volume of the cartridge	0.0600	0.0600	0.0600
	$t_{1/2}$ (h)	Terminal half-life	3.01	3.01	3.65
	F	Bioavailability	1	1	1
	k_a (h^{-1})	Absorption rate constant	0.300	0.300	0.300*
	$C_{max,\,1}$ (mg/L)	Maximal concentration after the first dose	4.25	6.38	6.38
	$Exp_{duration}$ (h)	Experiment duration	96	96	96
	n	Number of sub-intervals	12	12	8
	t_n (h)	The end time of the last sub-interval	12	12	8
	n_{doses}	Total number of doses	8	8	12
	$V_{infusion}$ (mL)	Volume of infusion	2.00	2.00	2.00
Computed by the application	$t_{max,1}$ (h)	Time to reach $C_{max,1}$	3.80	3.80	4.15
	Dose (mg)	Dose administered at the end of the last sub-interval	3.66	5.50	5.06
	f_{dose}	Fraction of target dose administered at the end of the last sub-interval	0.973	0.973	0.909
	CL_{elim} (L/h)	Pump flow rate from the central reservoir to the waste	0.0828	0.0828	0.0684
	$V_{diluent}$ (L)	Volume of diluent	7.95	7.95	6.57
	$C_{infusion}$ (mg/L)	Infusion solution concentration	148	222	288
Performed	Replicates	Number of replicates	2	3	2

3. Table S3: Ambulatory infusion pump program to reproduce CSF concentrations after administration of 900 mg q12 h and 900 mg q 8 h of linezolid

900 mg q12 h				**900 mg q8 h**			
Sub-interval number	Sub-interval duration (min)	Infusion pump flow rate ($Flow_{infusion,i}$) (mL/h)	Amount infused (mg)	Sub-interval number	Sub-interval duration (min)	Infusion pump flow rate ($Flow_{infusion,i}$) (mL/h)	Amount infused (mg)
1	17	7.1	0.446	1	24	5.0	0.575
2	19	6.5	0.446	2	27	4.4	0.575
3	20	5.9	0.446	3	32	3.8	0.575
4	23	5.3	0.446	4	38	3.2	0.575
5	26	4.7	0.446	5	47	2.6	0.575
6	29	4.1	0.446	6	61	2.0	0.575
7	34	3.5	0.446	7	88	1.4	0.575
8	42	2.9	0.446	8	162	0.7	0.575
9	52	2.3	0.446				
10	71	1.7	0.446				
11	112	1.1	0.446				
12	276	0.4	0.446				

4. Text S1: Detailed explanation of our mathematical algorithm

Objective

Find an experimental setup to be able to simulate first-order absorption and elimination within a hollow-fiber experiment.

Setup

Use the standard two-compartment hollow-fiber system (central reservoir + hollow fiber cartridge) with a variable flow infusion to simulate the drug absorption

Challenges

The challenge with the aforementioned setup is to find a procedure to compute the infusion parameters (*i.e.* concentration, volume and flow) with a focus on how often and how to change the infusion flow over time.

Theoretical solution

An analytical formula giving the infusion flow rate ($I(t)$) necessary to maintain a constant absorption rate parameter ($k_a(t)$) exists. It can be derived as follows:

$$
\begin{aligned}
k_a(t) &= \frac{I(t)}{V(t)} \\
k_a(t) &= \frac{I(t)}{V_0 - I(t) \times t} \\
k_a(t) &= \frac{1}{\frac{V_0}{I(t)} - t} \\
\frac{1}{k_a(t)} &= \frac{V_0}{I(t)} - t \\
\frac{1}{k_a(t)} + t &= \frac{V_0}{I(t)} \\
I(t) &= \frac{V_0}{\frac{1}{k_a(t)} + t} \quad (\mathbf{1})
\end{aligned}
$$

Where: t is the time post beginning of the infusion. $V(t)$ is the volume of drug solution remaining in the infusion bag at time t. V_0 is the initial volume in the infusion bag.

This equation is solvable for a known constant $k_a(t)$ and V_0.

However, this solution is not applicable in our case because, we do not have access to a pump that allows for programming of a continuously varying infusion rate thus cannot apply this formula directly and instead need to approximate it by multiple discrete infusion rates changing at discrete times.

Practical solution

Let n be the number of discrete infusions rates that we will use in the experiment. Let t_i be the end time of sub-interval i where $t \in [t_{i-1}, t_i[$ and $t_0 = 0$ and A_i be the amount of drug remaining to be administered for each t_i.

We need to define the duration of the dosing sub-intervals. We can define them by splitting the total dosing duration into n sub-intervals in such a way that the amount of drug infused to the central reservoir during each sub-interval is equal. Mathematically:

$$
\begin{aligned}
A_i &= Dose - i \times \frac{Dose}{n} \quad (\mathbf{3}) \\
Dose \times e^{-ka \times t_i} &= Dose - i \times \frac{Dose}{n} \\
Dose \times e^{-ka \times t_i} &= Dose \times \left(1 - \frac{i}{n}\right) \\
e^{-ka \times t_i} &= 1 - \frac{i}{n} \\
-ka \times t_i &= ln\left(1 - \frac{i}{n}\right) \\
t_i &= -\frac{ln\left(1 - \frac{i}{n}\right)}{k_a} \quad (\mathbf{4})
\end{aligned}
$$

However, in this setup when $i = n$, $t_i = +\infty$ which is longer than any sane experimentalist is willing to wait.

There are two ways to solve this issue. We ask the experimentalist to either define a fraction of the total dose that they want to be administered at the end of the last sub-interval, or specify the time at which the last sub-interval should end, in which case we will return the % of total dose administered by then. In this paper, since we are dealing with repeated doses with a predefined dosing interval, we chose the latter.

Let f_{dose} be the fraction of total dose administered at the end of the last sub-interval (t_n). We can transform equation (**3**) to have f_{dose} and t_n

$$\begin{aligned} A_n &= Dose - n \times f_{dose} \frac{Dose}{n} \\ A_n &= Dose - f_{dose} \times Dose \\ Dose \times e^{-ka \times t_n} &= Dose - f_{dose} \times Dose \\ Dose \times e^{-ka \times t_n} &= Dose \times (1 - f_{dose}) \\ e^{-ka \times t_n} &= 1 - f_{dose} \\ f_{dose} &= 1 - e^{-ka \times t_n} \quad (\mathbf{5}) \end{aligned}$$

And in this case equation (**4**) has to be modified to take into account this forced end of last sub-interval while maintaining even sub-intervals with regards to amount transferred to central reservoir.

$$t_i = -\frac{ln\left(1 - f_{dose}\frac{i}{n}\right)}{k_a} \qquad (\mathbf{6})$$

To put our solution into practice, we start by defining the time at which our last sub-interval will end (t_n), then we can use it in equation (**5**) to compute f_{dose}. Afterwards, we can use equation (**6**) to compute all t_i.

Then we can use the standard pharmacokinetic equation for first-order absorption to compute A_i defined as:

$$A_i = Dose \times e^{-k_a \times t_i} \qquad (\mathbf{7})$$

We can then simply compute the slope of the *A(t)* curve for each sub-interval and use this as our infusion rate, we will call it S_i:

$$S_i = \frac{A_{i-1} - A_i}{t_i - t_{i-1}} \qquad (\mathbf{8})$$

This will allow A_i to be equal to what it would have been with a first-order absorption process at the end of each sub-interval.

Bringing it all together we can write our algorithm in pseudocode as follows:

Input: number of sub-intervals n, desired maximal concentration after the first dose $C_{max,1}$, absorption rate constant k_a, terminal elimination half-life $t_{1/2}$, bioavailability F, end time of the last sub-interval t_n, central reservoir + hollow-fiber cartridge volume V_{total}.

Output: Table with n rows with t_i, A_i, S_i, *Amount infused*, *Dose* and f_{dose}

1. $k_e = \frac{ln(2)}{t_{1/2}}$
2. $t_{max,1} = \frac{1}{k_a - k_e} ln\left(\frac{ka}{ke}\right)$
3. $Dose = C_{max,1} \times \left[\frac{F \times k_a}{V_{total} \times (k_a - k_e)} \left(e^{-k_e \times t_{max,1}} - e^{-k_a \times t_{max,1}}\right)\right]^{-1}$
4. $f_{dose} = 1 - e^{-ka \times t_n}$

for i in {1,2,…,n}

5. $t_i = -\frac{ln\left(1 - f_{dose}\frac{i}{n}\right)}{k_a}$
6. $A_i = Dose \times e^{-k_a \times t_i}$
7. $S_i = \frac{A_{i-1} - A_i}{t_i - t_{i-1}}$

endfor

Example case

$n = 12$, $C_{max} = 4.25 mg/L$, $k_a = 0.36 h^{-1}$, $t_{1/2} = 3.15 h$, $V_{total} = 0.360 L$, $C = 1000 mg/L$, $F = 1$, $t_n = 12 h$

t_i (h)	A_i (mg)	S_i (mg/h)	*Amount infused* (mg)
0.00	3.32	NA	NA
0.24	3.04	1.14	0.27
0.50	2.77	1.05	0.27
0.79	2.50	0.95	0.27
1.11	2.23	0.85	0.27
1.47	1.95	0.75	0.27
1.89	1.68	0.65	0.27
2.38	1.41	0.55	0.27
2.98	1.14	0.46	0.27
3.74	0.86	0.36	0.27
4.80	0.59	0.26	0.27
6.52	0.32	0.16	0.27
12.00	0.04	0.05	0.27

$Dose$ = 3.3 mg f_{dose} = 98.7%

5. Text S2: Determination of fraction of fibers in the cartridge

Our goal is to compute the fraction of the total cartridge volume (F_{ICS}) that is occupied by hollow-fibers (FX paed helixone dialyzer, Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Germany).

From the cartridge documentation, we have:

Fiber lumen diameter (cm)	Fiber wall thickness (cm)	Effective surface area (cm^2)
0.0220	0.00350	2000

From direct measurements of the cartridge, we have:

Cartridge length (cm)	Cartridge perimeter (cm)
25.0	6.00

We will assume that the cartridge and the fibers are straight cylinders.

We can compute the volume of an individual fiber (V_{fiber}):

$$V_{fiber} = \pi \times \frac{(lumen\ diameter + 2 \times wall\ thickness)^2}{4} \times cartridge\ length$$

$$V_{fiber} = 0.017\ cm^3$$

We can also compute the surface area of 1 fiber (SA_{fiber}):

$$SA_{fiber} = 2\ \times \pi \times \frac{(lumen\ diameter + 2 \times wall\ thickness)}{2} \times cartridge\ length$$

Note that we omit the surface area of the horizontal cross section of the cylinder since it is unavailable for drug diffusion.

$$SA_{fiber} = 2.28\ cm^2$$

In the cartridge documentation, we are provided with the effective surface area of the hollow fibers which is the sum of the surface area of all the hollow fibers. We can thus deduce the number of fibers in the cartridge n_{fibers}:

$$n_{fibers} = \frac{Effective\ surface\ area}{SA_{fiber}}$$

$$n_{fibers} = 878$$

We can then compute the total volume occupied by the fibers ($V_{fibers,total}$) by multiplying V_{fiber} by n_{fibers}:

$$V_{fibers,total} = V_{fiber} \times n_{fibers}$$

$V_{fibers,total}$ = 14.5 cm^3

From the perimeter of the cartridge, we can compute the diameter of the cartridge ($d_{cartridge}$):

$$d_{cartridge} = \frac{Cartridge\ perimeter}{\pi}$$

$d_{cartridge}$ = 1.91 cm

We can then compute the theoretical volume of the cartridge:

$$V_{cartridge_theoretical} = \pi \times \frac{d_{cartridge}^2}{4} \times cartridge\ length$$

$V_{cartridge_theoretical}$ = 71.6 cm^3

Finally, we can compute the fraction of cartridge volume occupied by the fibers:

$$F_{ICS} = \frac{V_{fibers,total}}{V_{cartridge_theoretical}}$$

F_{ICS} = 0.202

6. Text S3: Tutorial on how to use the HF-App to setup Linezolid 600q12 CSF concentrations

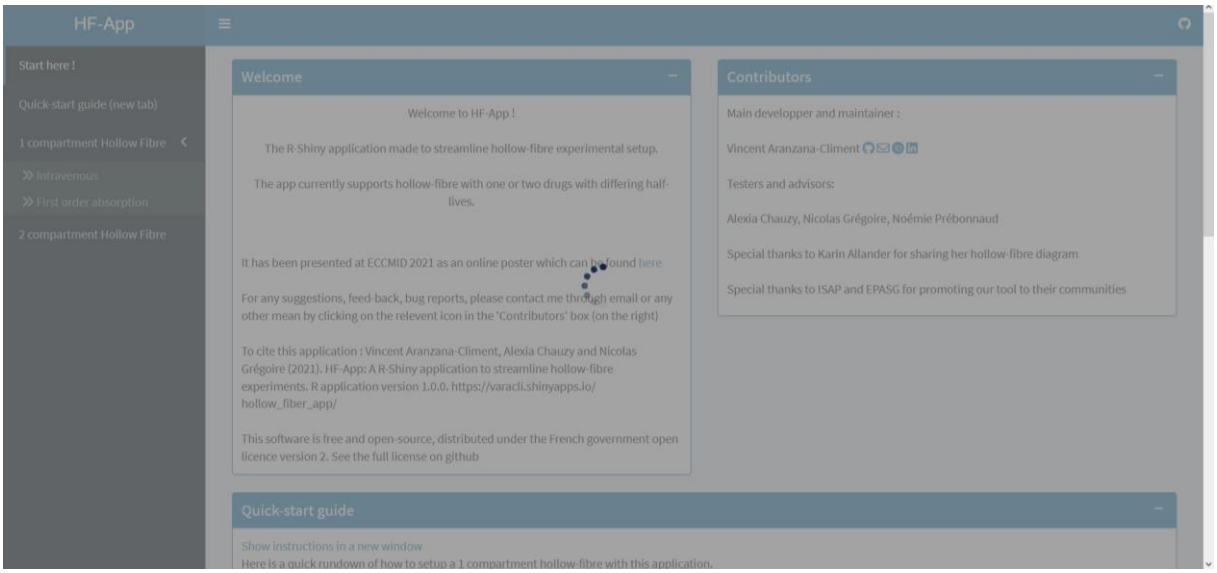
Experimental setup: Linezolid 600q12 in CSF

Parameters:

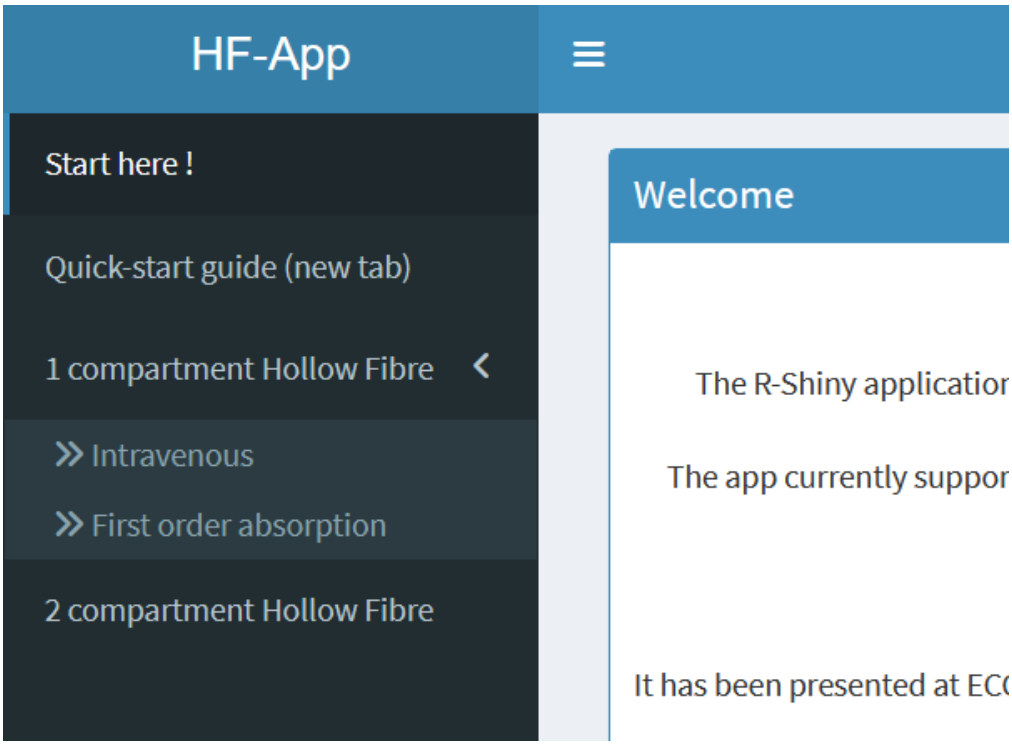
	Parameter	Parameter description	600 mg q12 h
Set in the application	$V_{Central}$ (L)	Volume in the central reservoir	0.300
	$Q_{Cartridge}$ (L/h)	Pump flow rate from the central reservoir to the cartridge	3.60
	$V_{Cartridge}$ (L)	Volume of the cartridge	0.0600
	$t_{1/2}$ (h)	Terminal half-life	3.01
	F	Bioavailability	1
	k_a (h^{-1})	Absorption rate constant	0.300
	$C_{max,\,1}$ (mg/L)	Maximal concentration after the first dose	4.25
	$Exp_{duration}$ (h)	Experiment duration	96
	n	Number of sub-intervals	12
	t_n (h)	The end time of the last sub-interval	12
	n_{doses}	Total number of doses	8
	$V_{infusion}$ (mL)	Volume of infusion	2.00
Computed by the application	$t_{max,1}$ (h)	Time to reach $C_{max,1}$	3.80
	Dose (mg)	Dose administered at the end of the last sub-interval	3.66
	f_{dose}	Fraction of target dose administered at the end of the last sub-interval	0.973
	CL_{elim} (L/h)	Pump flow rate from the central reservoir to the waste	0.0828
	$V_{diluent}$ (L)	Volume of diluent	7.95
	$C_{infusion}$ (mg/L)	Infusion solution concentration	148

Step by step procedure

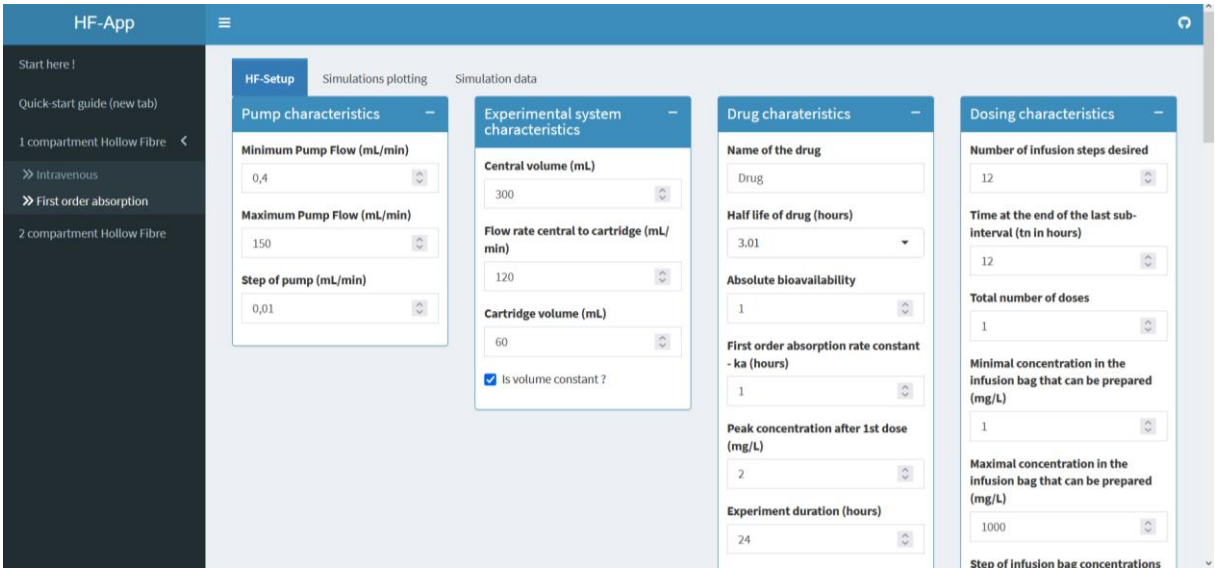
1. Go to : https://varacli.shinyapps.io/hollow_fiber_app/ and wait for the app to load :



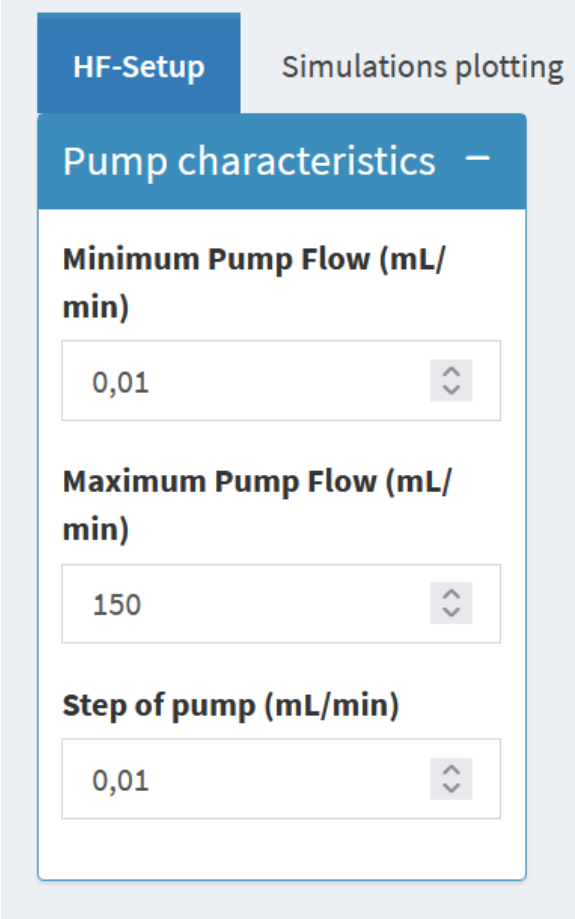
2. Click on « 1 compartment hollow fibre » → “First order absorption” on the sidebar



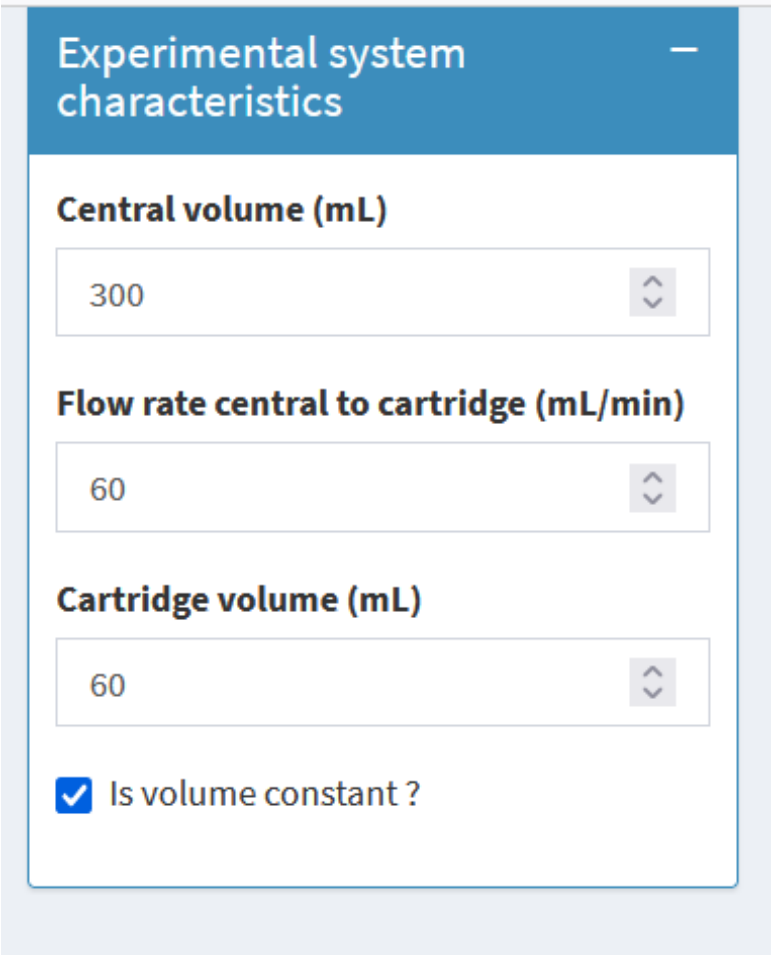
3. You are now on the “HF-Setup” tab



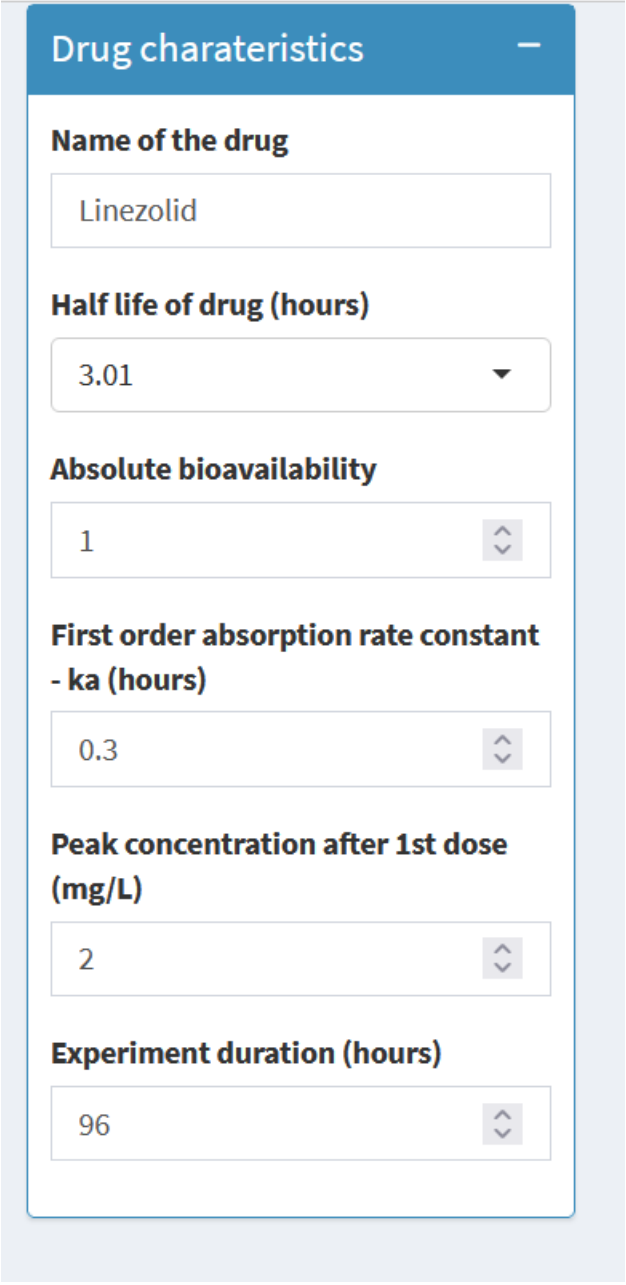
4. Input the technical specifications of your pump in order to limit which pump flows are available.



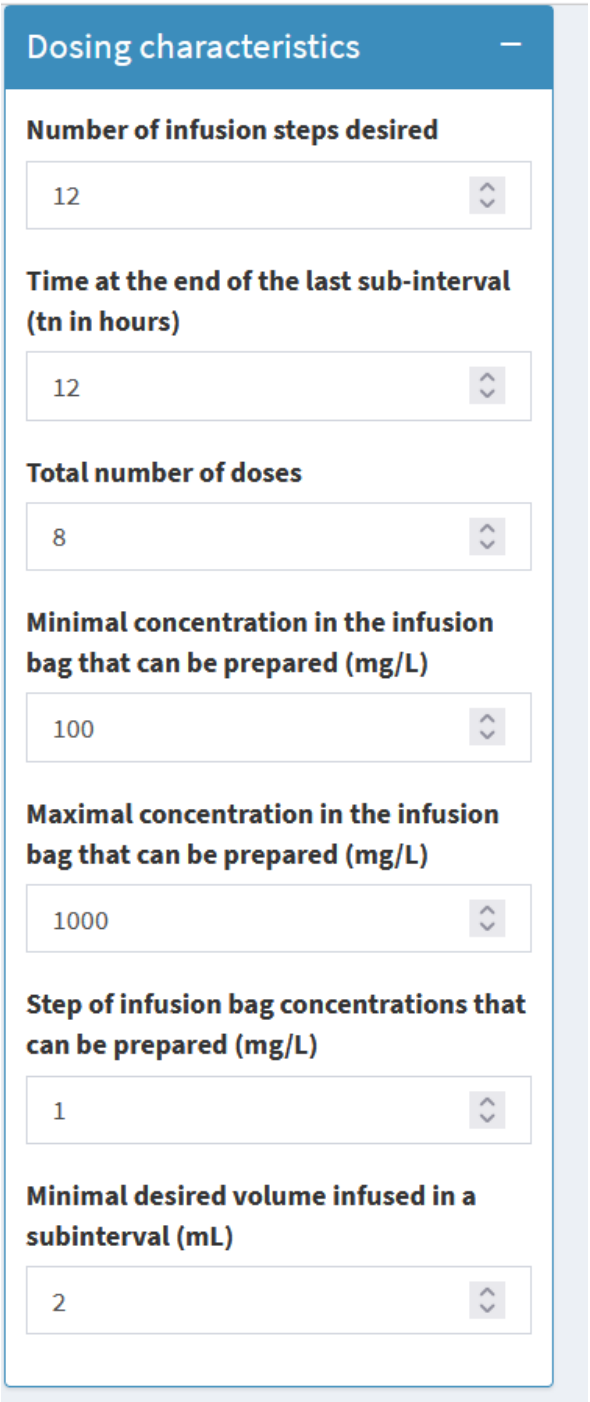
5. Input the Experimental system characteristics of your choice, in conjunction with pump characteristics it will be used to compute the half-lives that are available to you.



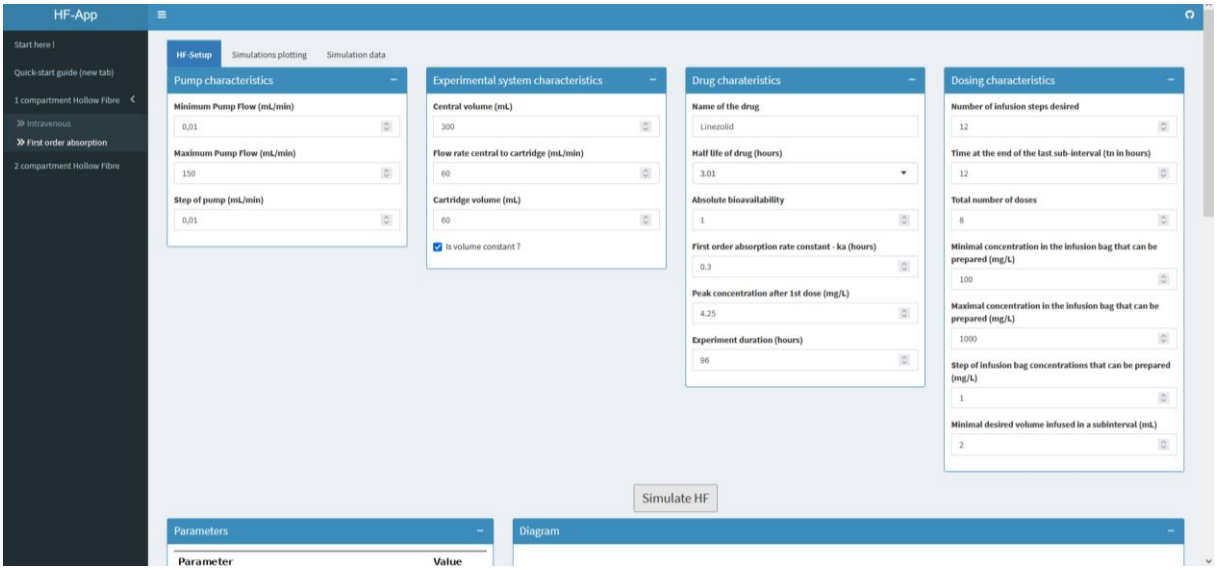
6. Input drug characteristics; please note that the half-life of the drug cannot be input manually, it has to be selected from the list since it depends on the pump characteristics and experimental volumes.



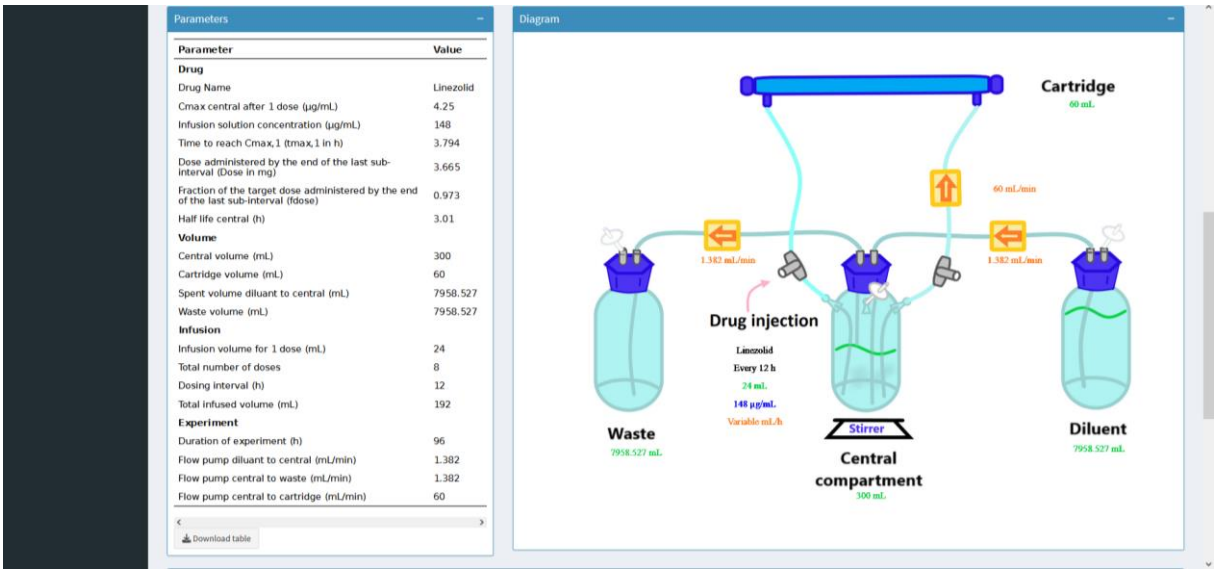
7. Input the desired dosing characteristics



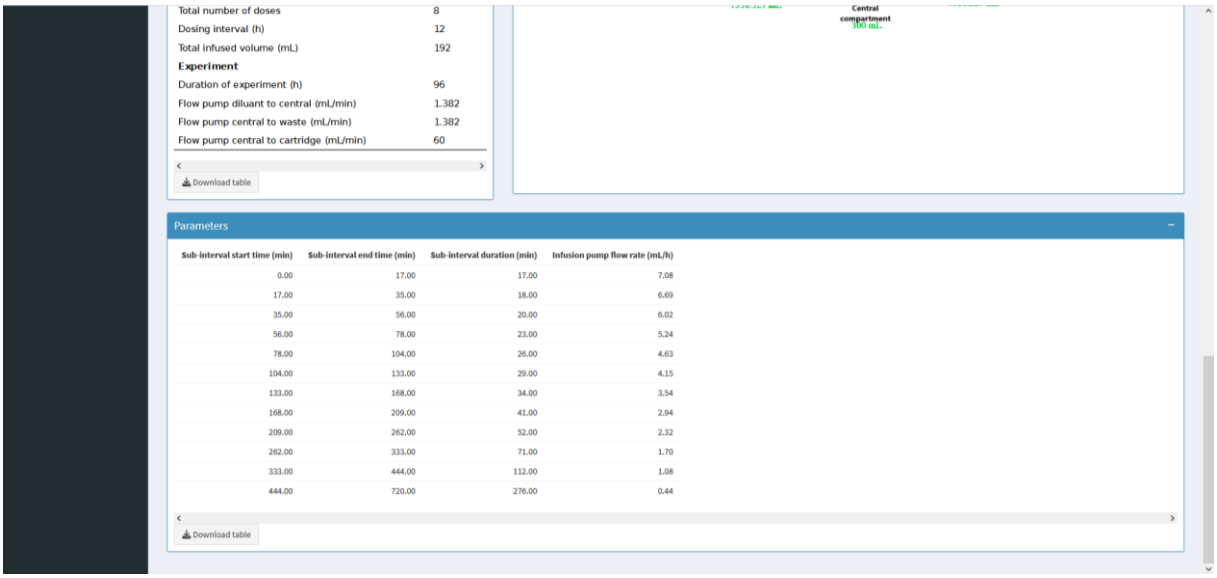
8. Click on the simulate HF button and wait for results.



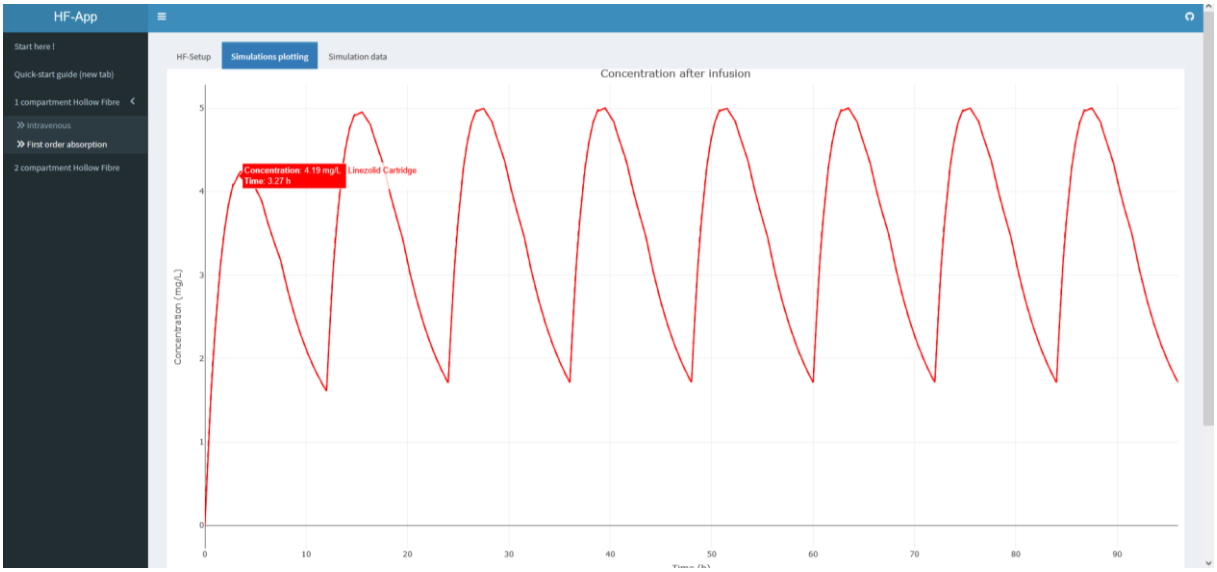
9. A table recapitulating all the experimental parameters and a diagram of the experiment are now available below the simulate button. You can download the table using the button at the bottom left, the diagram can be downloaded using the controls at the top right.



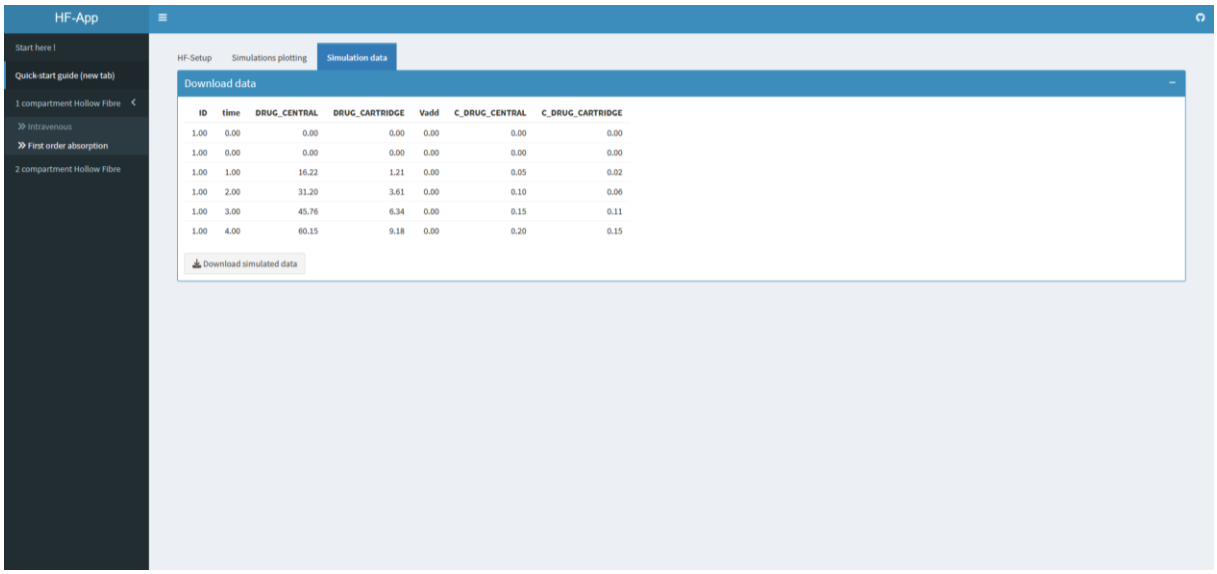
10. A table recapitulating the infusion program is shown at the bottom of the page with the option to download it at the bottom left.



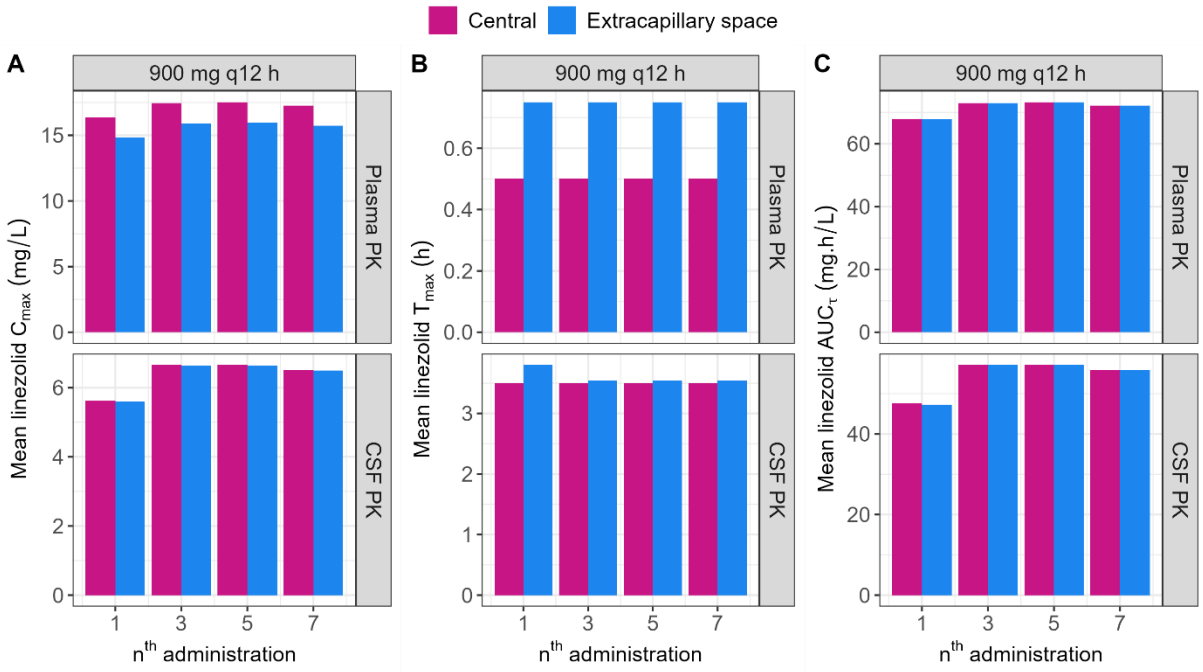
11. If you switch to the « simulation plotting » tab you will see a simulation of expected concentrations of linezolid. By hovering on the graph you will get more info.



12. Lastly if you switch to the « Simulation data" tab you will get an excerpt of the simulated data points with an option to download the simulated data spreadsheet.

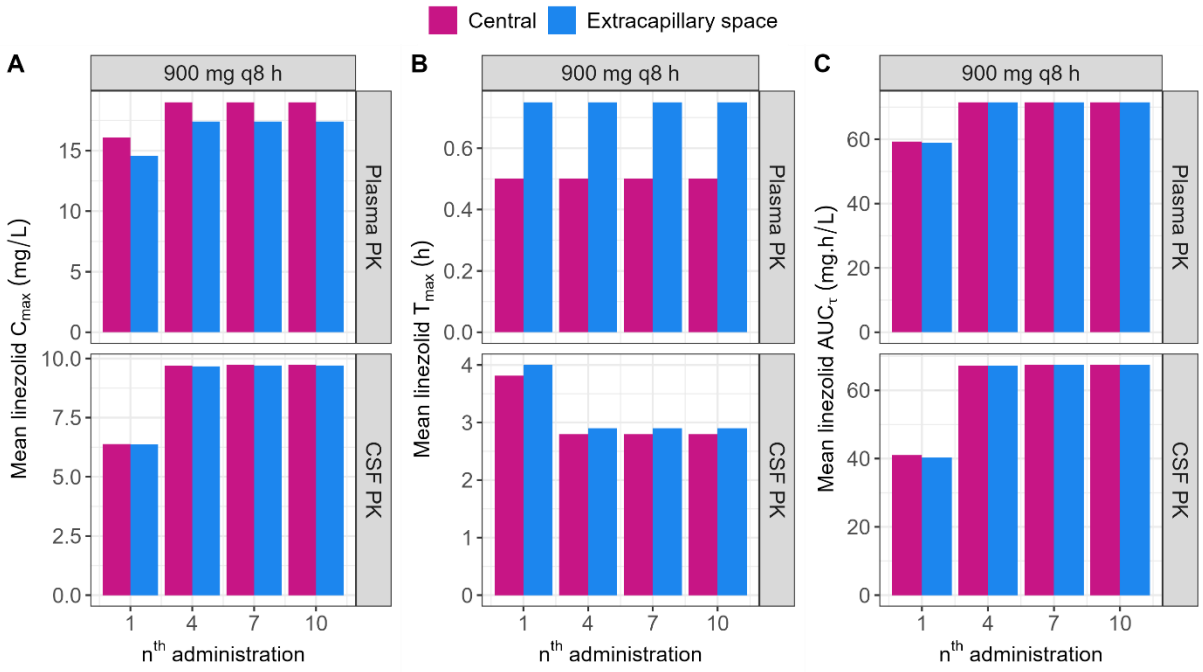


7. Figure S1: Linezolid PK parameters computed from observations in the central reservoir and in the cartridge ECS from HFIM experiments reproducing plasma PK (top panels) and CSF PK (bottom panels) after administration of 900 mg q12 h (replicate number = 2-6).



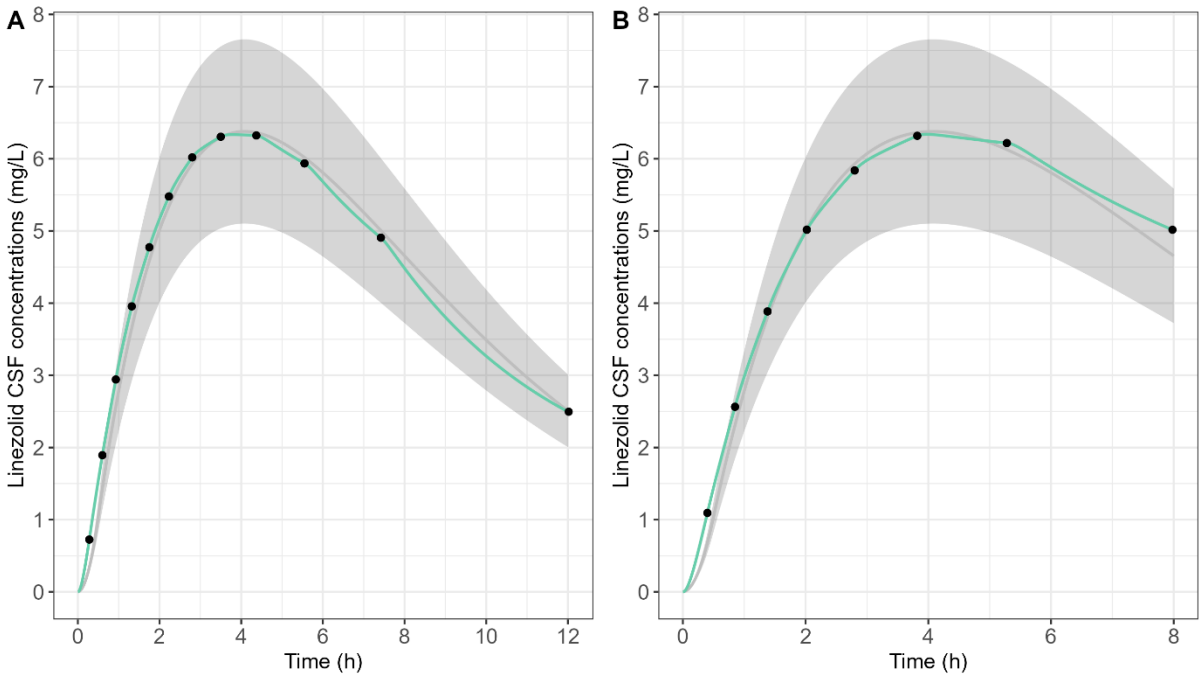
(A) Mean observed maximal concentrations (C_{max}) of linezolid in the central reservoir (pink) and cartridge ECS (blue) after the 1st, 3rd, 5th and 7th administration. (B) Mean observed time to reach C_{max} (T_{max}) of linezolid in the central reservoir (pink) and cartridge ECS (blue) after the 1st, 3rd, 5th and 7th administration. (C) Mean observed area under the curve over the dosing interval (AUC_{τ}) of linezolid in the central reservoir (pink) and cartridge ECS (blue) after the 1st, 3rd, 5th and 7th administration.

8. Figure S2: Linezolid PK parameters computed from observations in the central reservoir and in the cartridge ECS from HFIM experiments reproducing plasma PK (top panels) and CSF PK (bottom panels) after administration of 900 mg q8 h (replicate number = 2).



(A) Mean observed maximal concentrations (C_{max}) of linezolid in the central reservoir (pink) and cartridge ECS (blue) after the 1st, 4th, 7th and 10th administration. (B) Mean observed time to reach C_{max} (T_{max}) of linezolid in the central reservoir (pink) and cartridge ECS (blue) after the 1st, 4th, 7th and 10th administration. (C) Mean observed area under the curve over the dosing interval (AUC_{τ}) of linezolid in the central reservoir (pink) and cartridge ECS (blue) after the 1st, 4th, 7th and 10th administration.

9. Figure S3: Target linezolid CSF concentrations from linezolid clinical population PK model (13) versus expected linezolid concentrations in the cartridge ECS for the first dose of 900 mg q12 h and 900 mg q8 h dosing regimen.



(A) First dose of 900 mg q12 h. (B) First dose of 900 mg q8 h.

The grey line corresponds to target linezolid concentrations. The grey area corresponds to a bias of 20% from the target linezolid concentrations. The green line corresponds to expected linezolid concentrations in the cartridge ECS with the infusion pump program shown in **Table S3**. Black points correspond to the expected concentrations at the end of each infusion sub-interval.

10. Table S4: Bias and imprecision of the algorithm

Dosing regimen	MPE* (%)	RMSE** (mg/L)
600 mg q 12 h	-0.461	0.0408
900 mg q 12 h	-3.90	0.181
900 mg q 8 h	-10.2	0.774

*Mean Percentage Error

**Root Mean Squared Error

The downward bias was low enough for us to justify using the simpler experimental setup rather than adding an extra reservoir. Bias and imprecision are higher for 900 mg q8 h dosing regimen which was expected since we were limited to using 8 sub-intervals (instead of 12 for the other dosing regimens).

Partie 3 : Étude PK/PD du linézolide vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* dans un modèle HFIM simulant les concentrations cérébrales

Enfin, la troisième partie de ce travail de thèse a conduit à un troisième article, qui est en cours d'écriture, intitulé « **Cerebrospinal fluid versus Mueller-Hinton broth for in vitro PK/PD studies of antibiotics targeting cerebromeningeal infections: impact on the growth of *Staphylococcus aureus* and the effect of linezolid** » par Noémie Prébonnaud, Alexia Chauzy, Isabelle Martin, Christophe Adier, Jérémy Moreau, Claire Dahyot-Fizelier et Sandrine Marchand. Un résumé est présenté ci-dessous.

Résumé :

Le linézolide est une alternative thérapeutique pour le traitement des infections neuro-méningées associées aux soins. Cependant, une adaptation des schémas posologiques doit être envisagée. Les modèles d'infection à fibre creuse (Hollow-Fiber Infection Model, HFIM) sont utilisés pour évaluer les schémas posologiques, mais ils sont généralement réalisés dans des milieux riches tels que le bouillon de Mueller-Hinton (MHB), ce qui peut rendre les extrapolations *in vivo* difficiles. L'objectif de cette étude était, de comparer la croissance bactérienne de neuf souches de *Staphylococcu*s spp. dans le MHB, le liquide cérébrospinal artificiel (LCSa) et le liquide cérébrospinal humain (LCSh), puis de comparer l'effet de concentrations statiques et dynamiques de linézolide sur une souche de *Staphylococcus aureus* dans ces trois milieux.

Le LCSa a été préparé en se basant sur la composition physiologique du LCS d'individus sains. Des courbes de croissance, sans antibiotique, (*n=2*) ont été réalisées sur neuf souches *de Staphylococcus* spp. dans le MHB, le LCSa et le LCSh. L'effet du linézolide a été évalué à des concentrations statiques (courbes de bactéricides, TKC) et dynamiques (HFIM) sur *Staphylococcus aureus* (ATCC29213). Les TKC (*n=2*) ont été réalisées pendant 30 heures dans le MHB, le LCSa et le LCSh à des concentrations de linézolide correspondant à 0, 0.25, 1, 4 x la CMI. Les HFIM (*n=2*) ont permis de reproduire *in vitro* les concentrations observées dans le LCSh à trois schémas posologiques : 600 mg q12 h, 900 mg q12 h, 900 mg q8 h sur 96 h à la fois dans le MHB et le LCSa.

La croissance bactérienne était différente entre les milieux, avec une croissance plus lente dans le LCSh et le LCSa par rapport au MHB. Malgré quelques différences, la croissance bactérienne dans le LCSh était plus proche de celle observée dans le LCSa que dans le MHB. Dans les expériences de TKC, un effet bactéricide a été observé dans le MHB, alors que seul un effet bactériostatique a été observé dans le LCSh. Dans le LCSa, aucune diminution du nombre de bactéries n'a été observée, quelle que soit la concentration de linézolide. Dans les HFIM, les concentrations de linézolide dans le LCS ont été

reproduites avec un biais inférieur à 20 %. Dans le MHB, après une phase stationnaire, une croissance bactérienne a été observée pour 600 mg q12 h et 900 mg q12 h, tandis que la concentration bactérienne est restée constante, à une valeur proche de celle de l'inoculum, pendant 96 h pour 900 mg q8 h. Dans le LCSa, aucun impact du traitement n'a été observé quel que soit le schéma posologique du linézolide.

La croissance bactérienne et l'effet du linézolide dans le MHB ont été surestimés par rapport au LCSh, ce qui soulève des questions sur la pertinence de l'utilisation du MHB dans des expériences *in vitro*, notamment dans le contexte des infections cérébrales. L'utilisation du LCSa semble être une bonne alternative, bien que la composition devrait être améliorée afin de mieux mimer la croissance et l'effet du linézolide observés dans le LCSh.

Cerebrospinal fluid versus Mueller-Hinton broth for *in vitro* PK/PD studies of antibiotics targeting cerebromeningeal infections: impact on the growth of *Staphylococcus aureus* and the effect of linezolid

N. Prébonnaud[1,2], A. Chauzy[1], I. Martin[1,2], C. Adier[1], J. Moreau[1], C. Dahyot-Fizelier[1,3], S. Marchand[1,2]

[1] Université de Poitiers, Inserm U1070, Poitiers, France

[2] CHU de Poitiers, Laboratoire de Toxicologie-Pharmacocinétique, Poitiers, France

[3] CHU de Poitiers, Service d'Anesthésie Réanimation Médecine Péri-opératoire, Poitiers, France

Article en écriture.

Abstract

Linezolid is an alternative treatment for healthcare-associated ventriculitis and meningitis. However, adaptation of dosing regimens should be considered. *In vitro* Hollow-Fiber Infection Model (HFIM) are used to evaluate dosing regimens but are generally performed in rich medium such as Mueller-Hinton broth (MHB) which can lead to difficult *in vivo* extrapolations. The aim of this study was to compare the bacterial growth of nine strains of *Staphylococcus* spp. in MHB, artificial cerebrospinal fluid (aCSF) and human cerebrospinal fluid (hCSF), and then compare the effect of static and dynamic linezolid cerebrospinal fluid (CSF) concentrations on a *Staphylococcus aureus* strain in these three media.

Based on the physiological composition of CSF from healthy individuals, an aCSF was prepared. Growth control experiments (*n=2*) were performed on nine *Staphylococcus* spp. strains in MHB, aCSF and hCSF. The effect of linezolid was assessed using static concentrations (Time-Kill curves, TKC) and dynamic concentrations (HFIM) on *Staphylococcus aureus* (ATCC29213). TKC (*n=2*) were performed over 30 h in MHB, aCSF and hCSF at linezolid concentrations corresponding to 0, 0.25, 1, 4 x MIC. HFIM (*n=2*) reproduced CSF concentrations after three dosing regimens: 600 mg q12h, 900 mg q12h, 900 mg q8h over 96 h both in MHB and aCSF.

Bacterial growth differed between media, with slower growth in both hCSF and aCSF compared to MHB. Despite slight differences, bacterial growth in hCSF was closer to that in aCSF than in MHB. In TKC experiments, a bactericidal effect was observed in MHB, while only a bacteriostatic effect was seen in hCSF. In aCSF, no decrease in bacterial counts was observed at any linezolid concentration. In the HFIM, linezolid CSF concentrations were reproduced with a bias of less than 20%. In MHB, after a stationary phase, bacterial growth was observed for 600 mg q12h and 900 mg q12h, while stasis at the inoculum value was maintained for 96 h for 900 mg q8h. In aCSF, no impact of treatment was observed whatever linezolid dosing regimen.

Bacterial growth and linezolid effect in MHB were overestimated compared to hCSF, raising questions about the relevance of using MHB in *in vitro* experiments in the context of cerebral infections. Using aCSF seemed to be a good alternative, although further improvements in composition are needed to better mimic the growth and the linezolid effect observed in hCSF.

Keywords

Hollow-Fiber, artificial CSF, *S.aureus*, linezolid

Introduction

Staphylococcus spp., particularly *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus,* are the most frequent bacteria responsible for healthcare-associated ventriculitis and meningitis (1–3). Vancomycin is recommended as the first-line treatment for these infections, despite low concentrations reached in the cerebrospinal fluid (CSF) due to its limited ability to penetrate brains barriers (blood-brain barrier and blood-CSF barrier) even in case of inflammation (4,5).

Although linezolid was approved by the Food and Drug Administration for the treatment of Gram-positive bacteria such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospital-acquired pneumonia and complicated skin infections, *Streptococcus pneumoniae* in community-acquired pneumonia and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in bacteriaemia (6), it is also recommended as an alternative of vancomycin in healthcare-associated ventriculitis and meningitis when its minimal inhibitory concentration (MIC) is higher than 1 mg/L (4).

Indeed, linezolid crosses brains barriers well with a CSF penetration of around 80% (7,8) making it an interesting antibiotic in the treatment of cerebral infections. However, the recommended dosing regimen of 30-minute infusion of 600 mg twice daily seemed to be insufficient to treat healthcare-associated ventriculitis and meningitis, hence the need to optimize the dosing regimen (8–10).

Optimization of dosing regimen can be achieved through *in vitro* PK/PD studies using the Hollow-Fiber infection model (HFIM) (11). Traditionally, human plasma concentrations are reproduced in HFIM (11–16). However, in the context of cerebral infections, where antibiotic diffusion is governed by brain barriers, the pharmacokinetic (PK) profiles of antibiotics in the brain can differ significantly from systemic plasma profiles. This highlights the need to reproduce PK profiles at the site of infection in these *in vitro* models.

Additionally, most of HFIM are performed in rich medium such as Mueller-Hinton Broth (MHB) (17–20). Indeed, MHB is recommended by EUCAST and CLSI for Minimal inhibitory concentration determination to improve bacterial growth (21,22). However, this medium, composed of casein acid, beef extract and starch, is far removed from physiological media such as CSF, which is mostly composed by ions such as sodium and a low concentration of proteins, and therefore does not reflect the environment of the bacteria at the infection site (23).

As human CSF (hCSF) is difficult to obtain and large volumes are needed to perform HFIM, the use of artificial CSF (aCSF) could be an alternative. A previous study tried to prepare aCSF to replace

hCSF as an *in vitro* medium, but the pH was unstable and unphysiological resulting in insignificant results (24).

In this context, we aimed to prepare an aCSF which is close to human physiological CSF composition. Then, we compared bacterial growth of nine *Staphylococcus* spp. strains and the effect of static and dynamic linezolid CSF concentrations on a *Staphylococcus aureus* strain in MHB, aCSF and hCSF.

Materials and methods

1. Bacterial strains

Nine strains of *Staphylococcus* spp., including three reference strains from ATCC (*American Type Culture Collection)* and seven clinical strains isolated from CSF of infected patients, were studied. The characteristics of the strains are presented in **Table 1**. Linezolid MIC was determined for all strains in duplicate using the microdilution method in accordance with EUCAST recommendations (25,26) and antibiograms were obtained by using a VITEK® 2 (Biomérieux, Craponne, France). All the strains tested were susceptible to linezolid as the MIC was lower than the breakpoint defined at 8 mg/L (21).

Table 1. Characteristics of the nine strains of *Staphylococcus* spp. Including *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus capitis* strains. OXA: Oxacillin, KAN: Kanamycin, TOB: Tobramycin, GEN: Gentamicin, ERY: Erythromycin, L: Lincomycin, PRI: Pristinamycin, OFL: Ofloxacin, TRS: Trimethoprim-sulfamethoxazole, NIT: Nitrofurantoin, RIF: Rifampicin, FOS: Fosfomycin, FUS: Fusidic acid, LIN: Linezolid, TET: Tetracycline, TEI: Teicoplanin, VAN: Vancomycin, DAP: Daptomycin. S: Susceptible, standard dosing regimen, I: Susceptible, increased exposure, R: Resistant (27), ND : not done.

Species	Strain	Type	LIN MIC (mg/L)	OXA	KAN	TOB	GEN	ERY	L	PRI	OFL	TRS	NIT	RIF	FOS	FUS	LIN	TET	TEI	VAN	DAP
S.aureus	SA079-82	Clinical	1	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	ND
S.aureus	SA29213	Reference	4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	ND
S.aureus	SA019-43	Clinical	2	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	ND
S.aureus	SA33591	Reference	1	R	R	ND	S	R	ND	ND	ND	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
S.epidermidis	SE170-36	Clinical	2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	ND	S	ND
S.epidermidis	SE184-36	Clinical	2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	ND	S	ND
S.epidermidis	SE14990	Reference	2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	ND	S	ND
S.capitis	SC149-82	Clinical	2	R	R	R	R	S	S	I	S	S	S	S	R	S	S	ND	S	S	ND
S.capitis	SC196-68	Clinical	2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	ND

2. Media

Cation-adjusted Mueller-Hinton broth II (MHB) (Merck KGaA, Saint-Quentin-Fallavier, France) was used. Human CSF (hCSF) was collected from intensive care unit patients with external ventricular drain included in the clinical trial PK-Pop-LCR (PHRCN 16-0501) (8). The compounds used to prepare aCSF were purchased from VWR (Rosny-sous-Bois, France) for $CaCl_2.2H_2O$, KCl, D(+)-Glucose anhydrous, NaH_2PO_4, $NaHCO_3$; from Carl Roth (Lauterbourg, France) for $MgCl_2$ and from Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Saint-Quentin-Fallavier, France) for NaCl, Bovine Serum Albumin (BSA) and Minimum Essential Media (MEM) Amino-Acids 100X. Mueller-Hinton Agar (MHA) (Oxoid, ThermoFisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France) with or without 1% of activated charcoal (Merck KGaA, Saint-Quentin-Fallavier, France) was used for bacterial counts.

Preparation of aCSF

Artificial CSF was prepared based on the physiological composition of CSF from healthy individuals (23,28–32). Two solutions were prepared for a better stability: solution A was an acidic solution that stabilizes glucose and solution B was a basic solution that stabilizes bicarbonates (33–35). Solution A was prepared at 20X consisting of 1.62 g of $CaCl_2.2H_2O$, 1.05 g of $MgCl_2$, 80.44 g of NaCl, 2.16 g of KCl, 5.40 g of D(+)-Glucose anhydrous and of 98.180 mL of amino-acids. Osmosis water was added QS 500 mL. Solution B was prepared at 50X consisting of 1.72 g of NaH_2PO_4, 6.93 g of $NaHCO_3$ and 3 g of BSA. Osmosis water was added QS 200 mL. Then, solution A and B were sterilized by filtration with 0.2 µm filter and stored at 4°C for up to 4 weeks (33). Artificial CSF (aCSF) was reconstituted in 465 mL of autoclaved water by adding 25 mL of Solution A and 10 mL of Solution B and stored at 4°C for up to 4 weeks (33).

Assessment of aCSF

Concentration of Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Cl^-, HCO_3^-, P, glucose and proteins of aCSF was assessed on 3 different batches of reconstituted aCSF by Cobas Pro C 503 analytical unit (University hospital of Poitiers, Poitiers, France). The pH of aCSF was assayed by pH strips (Dosatest pH test strips, pH 6.0 - 10.0, 85414.601, VWR, Rosny-sous-Bois, France).

3. Growth control experiments

Bacterial growth curves were performed for all strains in duplicate in a final volume of 2 mL of MHB, hCSF and aCSF in a 24-well plate (Cellstar®, Greiner, Dutscher, Bernolsheim, France).

MHB

Bacterial strains were cultured overnight at 35 ± 2 °C in 10 mL of MHB under shaking at 130 rpm. The day after, a preculture was performed to achieve exponential growth phase by diluting the overnight

culture to 1:50 in a final volume of 10 mL of fresh MHB and incubated at 35 ± 2 °C under shaking at 130 rpm during 1.5 h to 2 h. Optical density was measured at 600 nm with an UltrospecTM 10 Cell Density Meter (Biochrom, USA). Then, the preculture was diluted in fresh MHB to obtain a bacterial suspension at 2 x 10^6 CFU/mL, of which a volume of 1 mL was added to the wells previously filled with 1 mL of MHB, resulting in a final inoculum of 1 x 10^6 CFU/mL. The plate was incubated at 35 ± 2 °C under shaking at 130 rpm during 30 h.

hCSF and aCSF

Bacterial strains were cultured overnight under shaking at 300 rpm in 5 mL of hCSF or aCSF at 35 ± 2 °C with 5% CO_2. The overnight cultures were diluted in the plate to obtain an inoculum of 1 x 10^6 CFU/mL in a final volume of 2 mL of aCSF and hCSF. The plate was incubated under shaking at 300 rpm during 30 h at 35 ± 2 °C with 5% CO_2 to maintain the pH at 7.3 (36).

For all matrices, 20 µL was taken from each well at 0, 3, 6, 24 and 30 h, serially diluted in 0.9% sodium chloride and plated onto MHA plate to obtain bacterial counts over time. The MHA plates were incubated at 35 ± 2 °C during 16 to 20 h, then CFU were counted with a Scan 300 (Interscience, Saint-Nom-la-Bretèche, France). The limit of quantification was fixed to 2.3 $\log_{10}$ CFU/mL.

4. Antimicrobial agents and chemicals

Linezolid standard (purity > 99% in powder form) was purchased from Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Saint-Quentin-Fallavier, France). Linezolid D8 (purity of 100% in powder form) was obtained from Alsachim (Illkirch Graffenstaden, France). Linezolid was reconstituted in dimethyl sulfoxide (DMSO, Merck KGaA, Saint-Quentin-Fallavier, France) to obtain stock solutions either at 10 240 mg/L for Time Kill Curves (TKC), or at 10 000 mg/L for HFIM. Stock solutions were prepared at high concentrations to achieve a final DMSO percentage of less than 2% during *in vitro* experiments in order to avoid an antimicrobial effect related to DMSO (37). Stock solutions were stored at -80°C for a maximal duration of 1 month. The day of the experiment, stock solutions were thawed, diluted to the desired concentration either in MHB, hCSF or aCSF for TKC or in 0.9% sodium chloride (Merck KGaA, Saint-Quentin-Fallavier, France) and then transferred in an infusion bag for HFIM.

5. Time-Kill curves

TKC were performed on SA29213 strain in triplicate in a final volume of 2 mL of MHB, hCSF and aCSF in a 24-well plate (Cellstar®, Greiner, Dutscher, Bernolsheim, France). Linezolid was added to the wells of the plate to obtain concentrations corresponding to 0, 0.25, 1, 4 x MIC. Bacteria were cultured and added to the plate as previously described for bacterial growth curves. Plates were incubated under

constant shaking at 130 rpm during 30 h at 35 ± 2 °C for MHB and at 300 rpm at 35 ± 2 °C with 5% CO_2 for hCSF and aCSF.

To obtain bacterial counts over time, a sample of 20 µL was taken from each well at 0, 3, 6, 24 and 30 h, then serially diluted in 0.9% sodium chloride and plated onto MHA plate. Undiluted samples were plated onto MHA plate supplemented with 1% activated charcoal to avoid linezolid carry-over effect (38–41). The MHA plates were incubated at 35 ± 2 °C during 18 to 24 h, then CFU were counted with a Scan 300. The limit of quantification was fixed to 2.3 $\log_{10}$ CFU/mL.

6. Hollow-fiber infection model

Typical CSF linezolid concentrations in ICU patients were generated using the population pharmacokinetics (PK) model previously described (8). Target CSF concentrations were simulated for three dosing regimens (30 min infusion of 600 mg every 12 h, 30 min infusion of 900 mg every 12 h and 30 min infusion of 900 mg every 8 h) using mrgsolve R package (42) with R software, version 4.2.2 (43). CSF concentrations at these three dosing regimens were reproduced for 96 h in the HFIM in duplicate, on separate occasions, in MHB and aCSF.

The general diagram of an HFIM and the experimental protocol for reproducing human linezolid concentrations in CSF were previously described (44). All experimental parameters (pump flows, volume of diluent, infusion solution concentrations) were calculated using the R-shiny application HF-App as previously described (45) and are given in **Table S1**.

Briefly, antibiotic infusion bag was placed into an ambulatory infusion pump (Mini RythmicTM Perf+, Micrel Medical Devices S.A., Koropi, Athens, Greece) which was kept in a refrigerated box (2-10°C) throughout the experiment and delivered the antibiotic in a central reservoir. A circulation loop at a high flow rate connected the central reservoir to the intracapillary space (ICS) of a dialysis cartridge (FX paed helixone dialyzer, Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Germany) *via* a peristaltic pump (Masterflex L/S, Cole Parmer, Roissy, France) to obtain a rapid equilibrium between central reservoir and cartridge. The extracapillary space (ECS) of the cartridge was inoculated with SA29213 to obtain 1 x 10^6 CFU/mL. The bacteria remained in the ECS, while the antibiotic diffused from the ICS into the ECS. To mimic the elimination of the antibiotic, a second peristaltic pump added fresh medium thus diluting the antibiotic concentration while maintaining a constant volume in the central reservoir. The HFIM was incubated at 35 ± 2 °C, added with 5% CO_2 to maintain the pH at 7.3 for aCSF experiments (36).

Serial samples were taken at various time points from the central reservoir to assess antibiotic concentrations and aCSF pH, and from the ECS of the cartridge to assess both antibiotic concentrations,

bacterial counts over time, and aCSF pH. Antibiotic samples were stored at -80°C until assayed by LC-MS/MS.

7. LC-MS/MS assay

LC-MS/MS method to assess linezolid concentrations in MHB is described in (**Text S1**). For aCSF samples, the method used to assess CSF concentrations was adapted from the method used previously (8). After ensuring that no matrix effect existed between NaCl and CSF matrices, calibration curves were established in NaCl over 0.1 to 50 µg/mL and quality controls (QC) were prepared in aCSF. Samples were precipitated with 200 µL of H_2O/MeOH (50/50, v/v) containing the internal standard (Linezolid D8) at 500 ng/mL and vortexed for 5 s. Then, samples were centrifuged at 14 000 rpm for 20 min at 4 °C and 100 µL of supernatant was transferred into a glass vial containing 100 µL of acetonitrile/formate d'ammonium 10 mM (50/50, v/v). A volume of 1 µL was injected.

The system included a Shimadzu high-performance liquid chromatography system module (Nexera XR; Shimadzu, Marne la Vallée, France) coupled with a TQ3500 mass spectrometer (Sciex, Les Ulis, France). The compound was analyzed on an XBridge Peptide BEH300 C18 column (5µm, 2.1 x 150 mm, Waters). The mobile phase consisted of a mixture (50/50, v/v) of 10 mM ammonium formate and acetonitrile delivered isocratically at 0.20 mL/min. Electrospray ionization in positive mode was used for detection. Ions were analyzed in the multiple reaction monitoring, and the following transitions were inspected: m/z 338→296 and 346→304 for linezolid and internal standard, respectively.

The intraday variability was characterized at three concentrations levels (0.3, 5 and 35 µg/mL) with a precision < 4% and bias < 9% (n = 3). The interday variability was characterized at three concentration levels (0.3, 5 and 35 µg/mL) with a precision < 4% and bias < 3% (n = 9).

Results

1. Artificial CSF composition is close to physiological CSF composition

Compositions of human physiological CSF and reconstituted aCSF are presented in **Table 2**. Overall, compounds concentrations showed a bias of less than or equal to 9%, except for bicarbonates and chlorides. The absolute bias of bicarbonates exceeded 70%. This was intentionally caused by reducing bicarbonate concentration to maintain a stable pH of around 7.3 for the duration of the experiments. Additionally, the absolute bias of chlorides was over 30%, which can be attributed to the presence of chloride ions from other components in the aCSF, making it challenging to lower their concentration without affecting other compounds.

Table 2. Mean concentrations and bias obtained for aCSF compounds (*n = 3*) compared to physiological CSF composition. (23) Boron et Boulpaep, 2012, (29) Uchida *et al*., 2004, (30) Shiobara *et al*., 2013, (31) Matzneller *et al*., 2016. N.A, when the assay could not be performed.

		Reconstituted aCSF (n=3)		
Solute	**Physiological CSF**	**Mean Concentration**	**Standard deviation**	**Mean Bias (%)**
Ca^{2+} (mM) (23)	1.10	1.16	0.06	5%
Mg^{2+} (mM) (23)	1.10	1.10	0.01	-1%
HCO_3^- (mM) (23)	22.00	5.49	0.50	-75%
P (mM) (29,30)	1.10	1.04	0.06	-6%
Na^+ (mM) (23)	147.0	151.10	1.65	3%
K^+ (mM) (23)	2.90	2.95	0.05	2%
Cl^- (mM) (23)	113.0	148.50	2.29	31%
Glucose (mM) (29,30)	3.39	3.10	0.04	-9%
Amino-acids (mM) (23)	0.7	N.A	N.A	N.A
Proteins (g/L) (23,31)	0.30	0.31	0.03	4%
pH (23)	7.33	7.45	0.00	2%

2. Slower growth of *Staphylococcus* spp. in CSF compared to MHB

Bacterial growth of the nine *Staphylococcus* spp. strains observed in MHB, hCSF and aCSF are presented in **Figure 1**. In MHB (yellow curves), all strains exhibited exponential growth until 6 h, followed by a plateau reaching, depending on the strain, around 10^9-10^{10} CFU/mL. In hCSF (red curves) and aCSF (blue curves), all strains exhibited slower growth compared to that observed in MHB, or even no growth at all depending on the strain (*e.g.* SC196-68 strain). Despite some differences between aCSF and hCSF, growth curves in aCSF were closer to those observed in hCSF than in MHB.

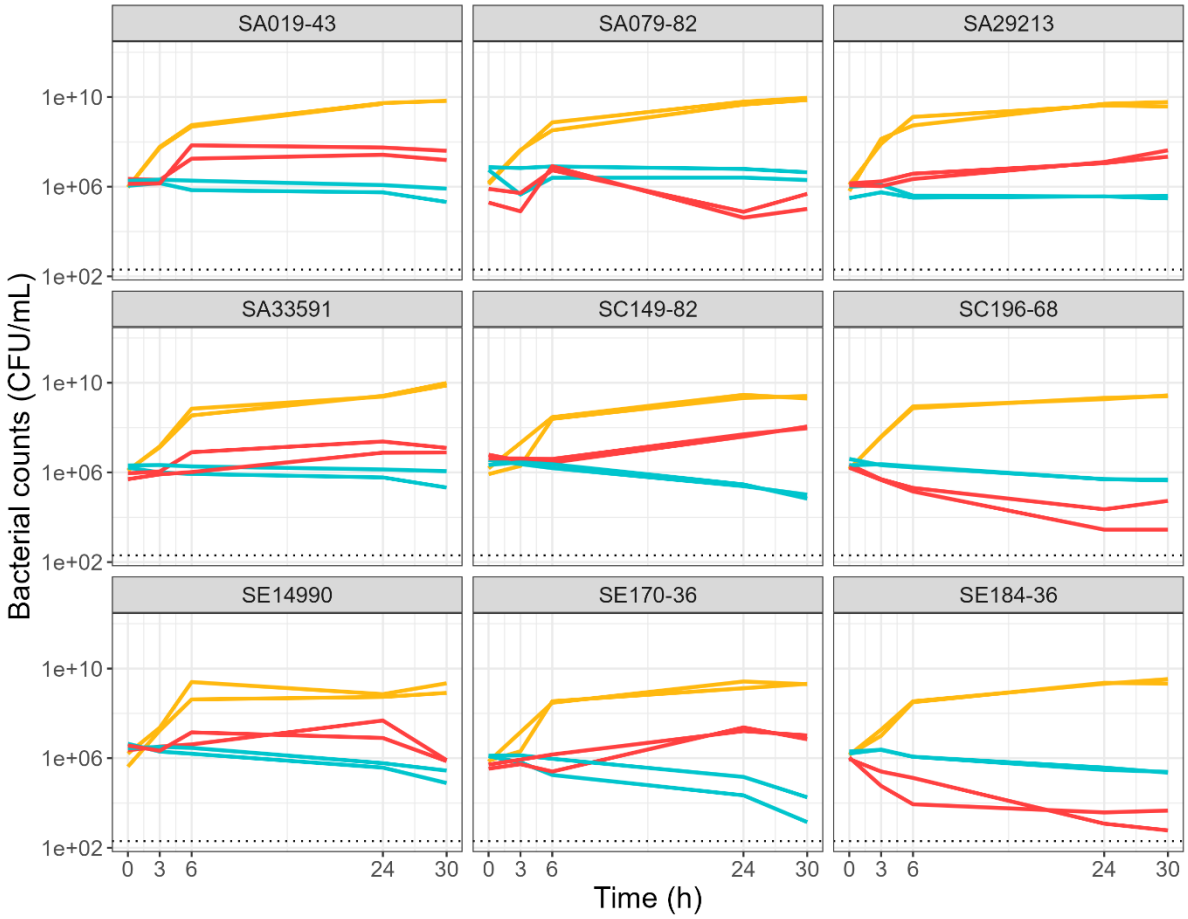


Figure 1. Growth curves in MHB, aCSF and hCSF (*n = 2*) of nine *Staphylococcus* spp. strains. Lines correspond to bacterial counts in MHB (yellow), hCSF (red) and aCSF (blue). Four *Staphylococcus aureus* strains: SA29213 (reference), SA33591 (reference), SA019-43 (clinical), SA079-82 (clinical), three *Staphylococcus epidermidis* strains: SE14990 (reference), SE170-36 (clinical), SE184-36 (clinical), two *Staphylococcus capitis* strains: SC149-82 (clinical), SC196-68 (clinical). Dashed line corresponds to the limit of quantification.

3. Reduced effect of linezolid in CSF compared to a concentration-dependent effect in MHB

Static concentrations

Bacterial counts of SA29313 observed during TKC experiments in MHB, hCSF and aCSF are presented in **Figure 2.** Bacterial counts observed in the absence of antibiotic were consistent with those observed during growth control experiments, *i.e.*, exponential growth in MHB, slower growth in hCSF and no growth in aCSF. Addition of static linezolid concentrations in MHB showed a concentration-dependent effect, resulting in a decrease of about 4-$\log_{10}$ CFU/mL at 30 h at the highest linezolid concentration tested (16 mg/L). In contrast, in hCSF, the maximum effect was less pronounced than in MHB with a decrease of about 1-$\log_{10}$ CFU/mL at 30 h for 4 and 16 mg/L of linezolid. In aCSF, no decrease in

bacterial counts was observed regardless of the linezolid concentrations added. However, during the first 6 hours, no decrease in bacterial counts was observed whatever linezolid concentrations both in hCSF and aCSF.

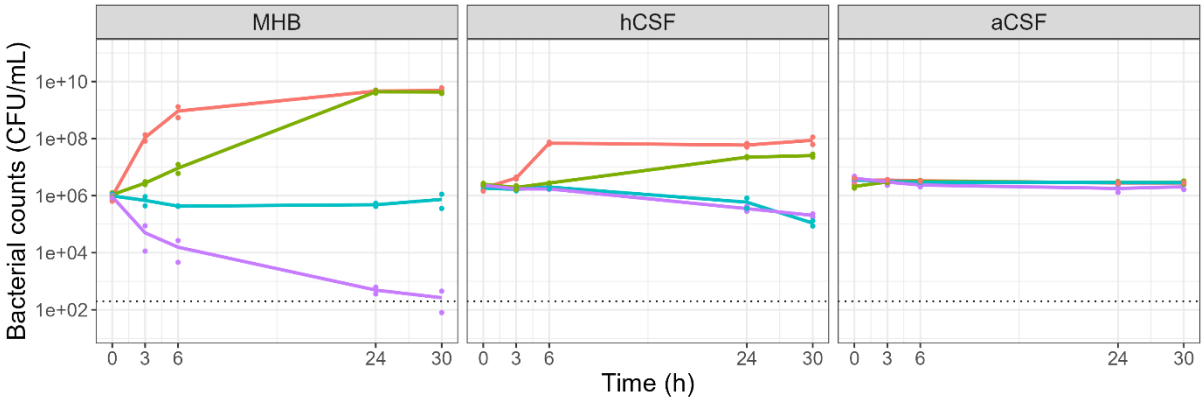


Figure 2. Bacterial counts of SA29213 observed during TKC (*n = 2*) performed in MHB, hCSF and aCSF. Points correspond to observed bacterial counts for each replicate. Lines correspond to median bacterial counts of the two replicates for linezolid concentration of 0 mg/L (red), 1 mg/L (green), 4 mg/L (blue) and 16 mg/L (purple). Dashed line corresponds to the limit of quantification.

Dynamic concentrations

Pharmacokinetics results

Targeted linezolid CSF concentrations from linezolid population PK model (8) and observed linezolid concentrations in the central reservoir and the ECS of the cartridge of HFIM performed in MHB and aCSF after an infusion of 600 mg q12 h, 900 mg q12 h and 900 mg q8 h are presented in the **Figure 3.**

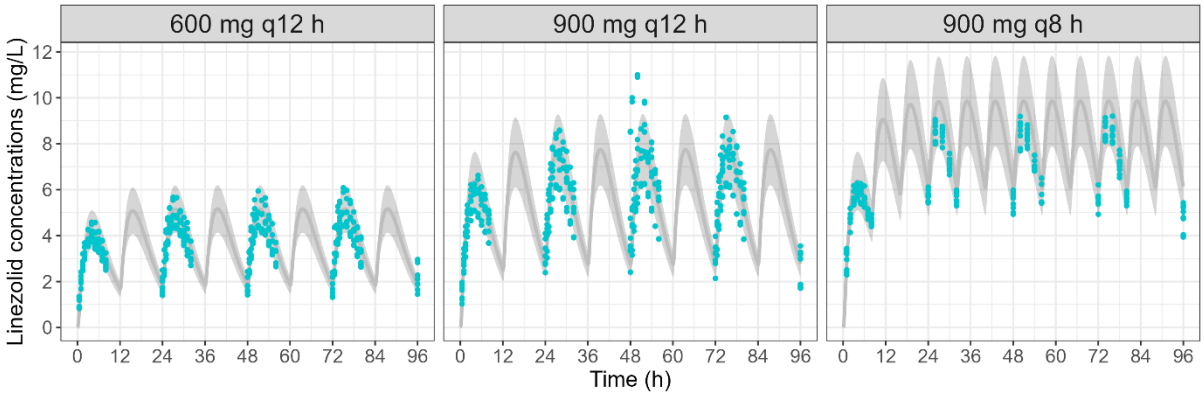


Figure 3. Targeted linezolid CSF concentrations from linezolid population PK model (8) and observed linezolid concentrations in the central reservoir and the ECS of the cartridge of HFIM performed in MHB and aCSF after infusion of 600 mg q12 h, 900 mg q12 h and 900 mg q8 h *(n = 4)*. The grey line corresponds to targeted linezolid concentrations from linezolid population PK model (8). The grey area corresponds to a 20% bias from targeted linezolid concentrations from linezolid population PK model (8). Points correspond to linezolid concentrations observed in the central reservoir and the ECS of the cartridge of the HFIM.

CSF linezolid concentrations were well reproduced in the HFIM for all dosing regimens tested with a bias of less than 20% for most concentrations.

Pharmacodynamics results

Bacterial counts of SA29213 observed in MHB compared to those observed in aCSF in the HFIM are presented in **Figure 4**. In MHB, in absence of linezolid, bacteria exhibited an exponential growth reaching ≈ 10^{10} CFU/mL from 24 h, as observed in bacterial growth curves. The control experiment performed in MHB was repeated 4 times and stopped at 30 h due to the presence of the studied bacteria in the central reservoir (and consequently in the waste) of the HFIM. After confirming that it was not a contamination, it appeared that the bacteria could cross the pores of the capillaries in the cartridge only with a high bacterial inoculum and in the absence of linezolid, as this was not observed under other tested conditions. In MHB, for the recommended dosing regimen of a 30-min infusion of 600 mg every 12 h, no bacterial killing was observed but bacterial growth was slower than in control experiments. Consequently, a stationary phase of 8 h and a bacterial growth plateau of around 10^{10} CFU/mL between 72 and 96 h were observed. After a 30-min infusion of 900 mg every 12 h of linezolid in MHB, bacterial counts remained stable up to 72 h, but then increased to approximately 10^{8} CFU/mL at 96 h. After a 30-min infusion of 900 mg every 8 h, bacterial growth was totally inhibited, with bacterial counts remaining stable at approximately the inoculum level (10^{6} CFU/mL) throughout the entire experiment.

In aCSF, bacterial counts in the absence of antibiotic were significantly lower than in MHB. Despite the renewal of aCSF in the HFIM, no bacterial growth was observed at 30h, as previously described in the growth control experiments. Furthermore, a slight bacterial decrease was observed at 96h. Addition of linezolid, whichever dosing regimen, resulted in the same profile as the control.

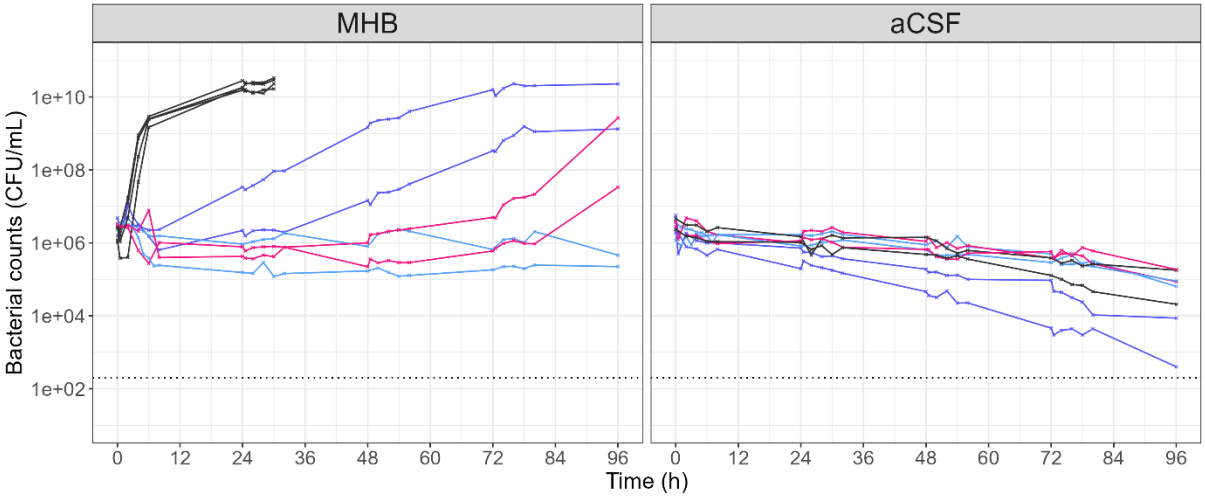


Figure 4. Bacterial counts of SA29213 observed in HFIM (*n = 2*) performed in MHB and in aCSF for three dosing regimens of linezolid. After a 30 min infusion of 600 mg every 12 h (purple), a 30 min infusion of 900 mg every 12 h (pink), a 30 min infusion of 900 mg every 8 h (blue) of linezolid and in the absence of linezolid (black). In MHB, in the absence of linezolid, bacterial counts were stopped at 30 h due to the presence of the bacteria studied in the central reservoir after 30 h.

Discussion

To our knowledge, this is the first study evaluating the *Staphylococcus* spp. growth and linezolid effect both in aCSF and MHB in static and dynamic conditions.

Although CSF composition remains relatively constant in healthy individuals, it can change during an infection, depending on the microorganisms involved and the degree of inflammation. For example, bacterial meningitis lead to decreased glycorrhachia and increased proteinorachia, while viral infections typically show normal or mildly elevated proteinorachia and normal or slightly decreased glycorrhachia (46). CSF composition can also vary according to the bacterial species responsible for the meningitis, with coagulase-negative *Staphylococcus* being associated with lower proteinorachia and higher glycorrhachia than *Staphylococcus aureus**,*** *Enterobacteriaceae*, and *Pseudomonas aeruginosa* (47)**.** Additionally, even though coagulase-negative staphylococci, the main cause of healthcare-associated ventriculitis and meningitis, cause minimal inflammation, the surgical procedure responsible for these infections may itself induce inflammation, leading to increased proteinorachia (4,48). Moreover, CSF composition can vary significantly from one patient to another, influenced by comorbidities such as diabetes (49). In these conditions, we chose in the present study to reproduce the physiological composition of CSF in healthy adults (**Table 2**) to avoid this variability. However, to maintain a pH of 7.3 throughout experiments, the bicarbonate concentration in aCSF was reduced compared to that of healthy CSF (**Table 2**), as the physiological concentration led to a pH of around 8, which was deemed unacceptable. In fact, previous studies have shown that pH, whether acidic or basic, has a strain-specific effect on bacterial growth (50). For example, the growth of *Staphylococcus aureus* was reduced when the pH decreased from 7 to 5, whereas the growth of *Staphylococcus epidermidis* was not affected by this change (51).

In the present study, the main observation is that growth profiles differed between media, with bacterial growth being slower in both hCSF and aCSF than in MHB (**Figure 1**). This slowdown in growth was also observed during growth control experiments in diluted MHB, from 100% to 1%, on a reference strain of *Pseudomonas aeruginosa* (52), as well as in peritoneal dialysis fluids on reference strains of *Escherichia coli, Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans,* and was attributed to the less-nutrients composition of these media compared to MHB (53,54). Furthermore, in our study, renewing the aCSF in the HFIM did not promote bacterial growth. Overall, the bacterial growth was more similar between hCSF and aCSF than between hCSF and MHB (**Figure 1**), despite some slight differences, likely due to variations in the composition between the two media. For instance, the glucose concentration measured in hCSF was around twice that of aCSF (approximately 1.08 g/L versus 0.54 g/L), which might

explain why bacterial growth was slightly better in hCSF compared to aCSF (**Figure 1**). However, additional growth control experiments on SA29213 in aCSF supplemented with glucose to obtain a concentration equivalent to that observed in hCSF resulted in the same growth profiles (data not shown). This last observation is consistent with previous results reported in the literature showing that increasing glucose concentrations in peritoneal dialysis fluids did not improve bacterial growth, suggesting that the non-growing state observed in our study was not due to a lack of glucose (53,54). Moreover, in a previous study, bacterial growth was slightly better with the use of peritoneal fluids containing a mix of 15 amino acids than in the absence (53,54). Unlike other aCSF formulations, our aCSF contains amino acids (24,30,33–35,55–57), but only a blend of 7 have been added. Among them, 4 amino acids (glutamic acid, aspartic acid, proline and alanine) have been reported as key amino acids during the mid-exponential growth of both clinical and reference strains of *Staphylococcus aureus* (58). However, in this study, they detected 22 amino acids in the cytoplasm of these bacteria during mid-exponential growth, with variations depending on the reference and clinical strains (58), suggesting that additional supplementation with other amino acids may be an option to improve bacterial growth in aCSF.

In the present study, growth profiles differed not only between media but also between species (*Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus*) (**Figure 1**). Indeed, in MHB and aCSF (**Figure 1**), although the growth profiles are totally different, *Staphylococcus aureus* seems to behave slightly differently from coagulase-negative staphylococci without any distinction between reference and clinical strains. In MHB, *Staphylococcus aureus* appeared to grow slightly faster than coagulase-negative staphylococci (4-$\log_{10}$ CFU/mL vs 3-$\log_{10}$ CFU/mL over 30 h). In aCSF, a slight difference was observed between *Staphylococcus aureus* which shows constant bacterial counts around the initial inoculum value, and coagulase-negative staphylococci, for which a decrease of 1 or 2-$\log_{10}$ CFU/mL is visible. In contrast, in hCSF, three growth profiles were identified without a clear trend related to species. These profiles including slow bacterial growth with an increase of about 2-$\log_{10}$ CFU/mL over 30 h, a state of stasis around the initial inoculum value over 30 h and a decrease in bacterial counts of about 2 to 3-$\log_{10}$ CFU/mL over 30 h. Agbayani *et al*. also observed different growth profiles in hCSF (59). Although the growth curves were performed in this previous study under aerobic conditions, raising concerns about potential pH changes and their impact on bacterial growth, a slow growth with bacterial counts remaining at the initial inoculum value was observed for a reference strain of *Staphylococcus aureus* and a continuously decrease until becoming undetectable for a reference strain of *Staphylococcus epidermidis* over 48 h (59).

In addition to the differences in growth profiles, the effect of linezolid also varied according to the medium. In the present study, linezolid exhibited a bactericidal effect in MHB, while it was only

bacteriostatic in hCSF (**Figure 2**). Our results partially align with those reported by Schwameis *et al*. (24). Indeed, although linezolid caused less bacterial decrease in MHB (*i.e*. bacteriostatic effect at 4 times the MIC), their profiles in hCSF remained consistent with ours, showing a bacteriostatic effect whatever the linezolid concentration. A similar observation was made with *Staphylococcus epidermidis* (24). However, in aCSF, as the bacteria appear to be in a non-growing state, no impact of linezolid was observed (**Figure 2**). This poor artificial medium seems to activate a stress response that inhibits division and could be responsible for a tolerance phenomenon in the *Staphylococcus aureus* strain (60). In this state, bacterial protein synthesis may be inactive, rendering linezolid ineffective, as its mechanism of action (blocking the initiation of translation) targets a process that may already dormant. To confirm this hypothesis, additional experiments, including quantitative RT-PCR or flow cytometry (60), could be performed.

One limitation of this study is that the efficacy of linezolid in different media was only evaluated on a reference strain of *Staphylococcus aureus*. The efficacy of linezolid should be investigated in other *Staphylococcus* spp. strains, both reference and clinical strains, for greater clinical relevance. Another limitation is that growth control experiments were only conducted on Gram-positive bacteria, limiting the applicability of these findings to Gram-negative bacteria. This is particularly noteworthy, as previous studies on *Acinetobacter baumannii* and *Escherichia coli* in diluted MHB and hCSF, respectively, showed that their growth was less affected by nutrient-depleted media (59,61). Moreover, a higher antimicrobial effect was observed in diluted MHB for polymyxin B and meropenem on *Acinetobacter baumanii* and *Pseudomonas aeruginosa*, respectively, and for fosfomycin on *Pseudomonas aeruginosa* in peritoneal dialysis fluid (52,53,61). This work should be complemented by further experiments on Gram-negative bacteria.

Dynamic HFIM is a powerful *in vitro* tool for studying antibiotic efficacy and optimizing new dosing strategies. While such studies are traditionally conducted in rich culture media, our results suggest that dose adjustments may vary depending on the type of medium used. In fact, dynamic HFIM experiments conducted in MHB (**Figure 3**) suggest that a higher dose than currently recommended (600 mg q12h) would be required, as bacterial growth was only prevented for 900 mg q8 h. Although our HFIM results in aCSF do not allow us to draw a formal conclusion at this stage and the composition of aCSF should be improved, we can assume from the TKC results that the antimicrobial effect in hCSF for the three dosing regimens could be similar. This supports the idea of investigating the *in vitro* PK/PD of antibiotics in appropriate medium, particularly in the case of CNS infections.

To conclude, bacterial growth and linezolid effect in MHB were overestimated compared to hCSF, raising questions about the relevance of using MHB in *in vitro* experiments in the context of

cerebral infections. Using MHB could lead to increasing the dose to be more effective but that might not be necessary. Therefore, the use of aCSF seemed to be a good alternative, although further improvements in composition are needed to better mimic the growth and the linezolid effect observed in hCSF. Additionally, these experiments should be replicated on other strains, as linezolid effect was studied on only one reference strain of *Staphylococcus aureus*.

Acknowledgements

The authors thank Agnès Audurier and Laure Prouvensier for their technical assistance and Frederic Tewes and Jonathan Clarhault for their advice concerning the preparation of the artificial cerebrospinal fluid. We thank the patients and their relatives and caregivers, local site clinical and research staff, regional coordinating center staff of the university hospital of Poitiers, and all the members of the PK-Pop-LCR Study for their active participation. The authors also thank the bacteriology laboratory of the university hospital of Poitiers for provided clinical bacterial strains.

References

1. Ramanan M, Lipman J, Shorr A, Shankar A. A meta-analysis of ventriculostomy-associated cerebrospinal fluid infections. BMC Infect Dis. déc 2015;15(1):3.

2. Lozier AP, Sciacca RR, Romagnoli MF, Connolly ES. Ventriculostomy-related Infections: A Critical Review of the Literature. Neurosurgery. 1 juill 2002;51(1):170-82.

3. Beer R, Lackner P, Pfausler B, Schmutzhard E. Nosocomial ventriculitis and meningitis in neurocritical care patients. J Neurol. 1 nov 2008;255(11):1617-24.

4. Tunkel AR, Hasbun R, Bhimraj A, Byers K, Kaplan SL, Scheld WM, et al. 2017 Infectious Diseases Society of America's Clinical Practice Guidelines for Healthcare-Associated Ventriculitis and Meningitis*. Clinical Infectious Diseases. 15 mars 2017;64(6):e34-65.

5. Pfausler B, Spiss H, Beer R, Kampl A, Engelhardt K, Schober M, et al. Treatment of staphylococcal ventriculitis associated with external cerebrospinal fluid drains: a prospective randomized trial of intravenous compared with intraventricular vancomycin therapy. J Neurosurg. mai 2003;98(5):1040-4.

6. Senior K. FDA approves first drug in new class of antibiotics. The Lancet. 29 avr 2000;355(9214):1523.

7. Beer R, Engelhardt KW, Pfausler B, Broessner G, Helbok R, Lackner P, et al. Pharmacokinetics of Intravenous Linezolid in Cerebrospinal Fluid and Plasma in Neurointensive Care Patients with Staphylococcal Ventriculitis Associated with External Ventricular Drains. Antimicrob Agents Chemother. janv 2007;51(1):379-82.

8. Dahyot-Fizelier C, Chauzy A, Chalard K, Bernard F, De Courson H, Leblanc PE, et al. CSF pharmacokinetics-pharmacodynamics of linezolid in critically brain injured patients, with or without central nervous system healthcare-associated infection. The PK-Pop-LCR Study: A Multicenter Pharmacokinetics and Pharmacodynamics Population Study. [Internet]. 2024 [cité 16 déc 2024]. Disponible sur: http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2024.12.13.24318990

9. Luque S, Grau S, Alvarez-Lerma F, Ferrández O, Campillo N, Horcajada JP, et al. Plasma and cerebrospinal fluid concentrations of linezolid in neurosurgical critically ill patients with proven or suspected central nervous system infections. International Journal of Antimicrobial Agents. nov 2014;44(5):409-15.

10. Wu X, Tang Y, Zhang X, Wu C, Kong L. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of linezolid in plasma/cerebrospinal fluid in patients with cerebral hemorrhage after lateral ventricular drainage by Monte Carlo simulation. DDDT. juin 2018;Volume 12:1679-84.

11. Yadav R, Rogers KE, Bergen PJ, Bulitta JB, Kirkpatrick CMJ, Wallis SC, et al. Optimization and Evaluation of Piperacillin-Tobramycin Combination Dosage Regimens against Pseudomonas aeruginosa for Patients with Altered Pharmacokinetics via the Hollow-Fiber Infection Model and Mechanism-Based Modeling. Antimicrob Agents Chemother. mai 2018;62(5):e00078-18.

12. Broussou DC, Lacroix MZ, Toutain PL, Woehrlé F, El Garch F, Bousquet-Melou A, et al. Differential Activity of the Combination of Vancomycin and Amikacin on Planktonic vs. Biofilm-Growing Staphylococcus aureus Bacteria in a Hollow Fiber Infection Model. Front Microbiol. 27 mars 2018;9:572.

13. Bilello JA, Bauer G, Dudley MN, Cole GA, Drusano GL. Effect of 2',3'-didehydro-3'-deoxythymidine in an in vitro hollow-fiber pharmacodynamic model system correlates with results of dose-ranging clinical studies [Internet]. [cité 2 mai 2024]. Disponible sur: https://journals.asm.org/doi/epdf/10.1128/aac.38.6.1386

14. Bergen PJ, Bulitta JB, Kirkpatrick CMJ, Rogers KE, McGregor MJ, Wallis SC, et al. Effect of different renal function on antibacterial effects of piperacillin against *Pseudomonas aeruginosa* evaluated via the hollow-fibre infection model and mechanism-based modelling. J Antimicrob Chemother. sept 2016;71(9):2509-20.

15. Docobo-Pérez F, Drusano GL, Johnson A, Goodwin J, Whalley S, Ramos-Martín V, et al. Pharmacodynamics of Fosfomycin: Insights into Clinical Use for Antimicrobial Resistance. Antimicrob Agents Chemother. sept 2015;59(9):5602-10.

16. Bergen PJ, Bulitta JB, Kirkpatrick CMJ, Rogers KE, McGregor MJ, Wallis SC, et al. Substantial Impact of Altered Pharmacokinetics in Critically Ill Patients on the Antibacterial Effects of Meropenem Evaluated via the Dynamic Hollow-Fiber Infection Model. Antimicrob Agents Chemother. mai 2017;61(5):e02642-16.

17. Tait JR, Harper M, Cortés-Lara S, Rogers KE, López-Causapé C, Smallman TR, et al. Ceftolozane-Tazobactam against Pseudomonas aeruginosa Cystic Fibrosis Clinical Isolates in the Hollow-Fiber Infection Model: Challenges Imposed by Hypermutability and Heteroresistance. Antimicrob Agents Chemother. 17 août 2023;67(8):e00414-23.

18. Tam VH, Kabbara S, Vo G, Schilling AN, Coyle EA. Comparative Pharmacodynamics of Gentamicin against Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother. août 2006;50(8):2626-31.

19. Louie A, Maynard M, Duncanson B, Nole J, Vicchiarelli M, Drusano GL. Determination of the Dynamically Linked Indices of Fosfomycin for Pseudomonas aeruginosa in the Hollow Fiber Infection Model. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 25 mai 2018;62(6):10.1128/aac.02627-17.

20. Strukova EN, Smirnova MV, Vostrov SN, Lubenko IY, Firsov AA, Zinner SH, et al. Linezolid pharmacodynamics with *Staphylococcus aureus* in an in vitro dynamic model. International Journal of Antimicrobial Agents. 1 mars 2009;33(3):251-4.

21. Société Française de Microbiologie. CA-SFM / EUCAST : Société Française de Microbiologie. 2024.

22. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-third informational supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. janv 2013;

23. Boron WalterF, Boulpaep EmileL. Medical Physiology: a Cellular and Molecular Approach. Elsevier Saunders. 2012.

24. Schwameis R, Fille M, Manafi M, Zeitlinger M, Sauermann R. Enhanced activity of linezolid against Staphylococcus aureus in cerebrospinal fluid. Research in Microbiology. avr 2012;163(3):157-60.

25. Société Française de Microbiologie. CA-SFM / EUCAST : Société Française de Microbiologie. 2022.

26. Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nat Protoc. févr 2008;3(2):163-75.

27. eucast: S, I and R definitions [Internet]. [cité 25 sept 2024]. Disponible sur: https://www.eucast.org/newsiandr

28. Bothwell SW, Janigro D, Patabendige A. Cerebrospinal fluid dynamics and intracranial pressure elevation in neurological diseases. Fluids Barriers CNS. déc 2019;16(1):9.

29. Uchida K, Yamada M, Hayaschi T, Mine Y, Kawase T. Possible Harmful Effects on Central Nervous System Cells in the Use of Physiological Saline as an Irrigant During Neurosurgical Procedures. Surg Neurol. août 2004;62:96-105.

30. Shiobara R, Ohira T, Doi K, Nishimura M, Kawase T. Development of Artificial Cerebrospinal Fluid: Basic Experiments, and Phase II and III Clinical Trials. J Neurol Neurophysiol [Internet]. 2013 [cité 11 févr 2022];04(05). Disponible sur: https://www.omicsonline.org/development-of-artificial-cerebrospinal-fluid-basic-experiments-and-phase-ii-and-iii-clinical-trials-2155-9562-4-173.php?aid=21111

31. Matzneller P, Burian A, Zeitlinger M, Sauermann R. Understanding the Activity of Antibiotics in Cerebrospinal Fluid in vitro. Pharmacology. 17 févr 2016;97(5-6):233-44.

32. Shapey J, Toma A, Saeed SR. Physiology of cerebrospinal fluid circulation. oct 2019;27(5).

33. ALZET® Osmotic Pumps. Preparation of Artificial CSF [Internet]. ALZET® Osmotic Pumps. [cité 17 janv 2022]. Disponible sur: https://www.alzet.com/guide-to-use/preparation-of-artificial-csf/

34. Ecocyteshop [Internet]. [cité 6 avr 2023]. ACSF - Artificial Cerebrospinal Fluid (1000 ml) - Ready to use. Disponible sur: https://ecocyteshop.com/products/artificial-cerebrospinal-fluid-acsf-1000ml

35. Zheng WH, Yan C, Chen T, Kang DZ. New scheme for the preparation and use of artificial cerebrospinal fluid. Journal of Physiology and Pharmacology. 2020;71(6):919-25.

36. Cunniffe JG, Whitby-Strevens S, Wilcox MH. Effect of pH changes in cerebrospinal fluid specimens on bacterial survival and antigen test results. Journal of Clinical Pathology. 1 mars 1996;49(3):249-53.

37. Wadhwani T, Desai K, Patel D, Lawani D, Bahaley P, Joshi P, et al. Effect of various solvents on bacterial growth in context of determining MIC of various antimicrobials. :6.

38. Broussou DC, Toutain PL, Woehrlé F, El Garch F, Bousquet-Melou A, Ferran AA. Comparison of in vitro static and dynamic assays to evaluate the efficacy of an antimicrobial drug combination against Staphylococcus aureus. Becker K, éditeur. PLoS ONE. 23 janv 2019;14(1):e0211214.

39. LaPlante KL, Leonard SN, Andes DR, Craig WA, Rybak MJ. Activities of Clindamycin, Daptomycin, Doxycycline, Linezolid, Trimethoprim-Sulfamethoxazole, and Vancomycin against Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* with Inducible Clindamycin Resistance in Murine Thigh Infection and In Vitro Pharmacodynamic Models. Antimicrob Agents Chemother. juin 2008;52(6):2156-62.

40. Tsuji BT, Brown T, Parasrampuria R, Brazeau DA, Forrest A, Kelchlin PA, et al. Front-Loaded Linezolid Regimens Result in Increased Killing and Suppression of the Accessory Gene Regulator System of Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother. juill 2012;56(7):3712-9.

41. Mroue N, Arya A, Brown Gandt A, Russell C, Han A, Gavrish E, et al. Pharmacodynamics of ClpP-Activating Antibiotic Combinations against Gram-Positive Pathogens. Antimicrob Agents Chemother. 20 déc 2019;64(1):e01554-19.

42. Baron KT. Mrgsolve: Simulate from ODE-based Models [Internet]. 2024. Disponible sur: https://mrgsolve.org/docs/

43. R Core Team. R: a language and environment for statistical computing [Internet]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2024. Disponible sur: https://www.R-project.org/

44. Prébonnaud N, Chauzy A, Grégoire N, Dahyot-Fizelier C, Adier C, Marchand S, et al. A freely accessible, adaptable hollow-fiber setup to reproduce first-order absorption: illustration with linezolid cerebrospinal fluid pharmacokinetic data [Internet]. bioRxiv; 2024 [cité 8 janv 2025]. p. 2024.12.19.629487. Disponible sur: https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2024.12.19.629487v1

45. Aranzana-Climent V, Chauzy A, Grégoire N. HF-App: A R-Shiny application to streamline hollow-fibre experiments. [Internet]. [cité 19 juill 2024]. Disponible sur: https://varacli.shinyapps.io/hollow_fiber_app/

46. Hrishi AP, Sethuraman M. Cerebrospinal Fluid (CSF) Analysis and Interpretation in Neurocritical Care for Acute Neurological Conditions. Indian Journal of Critical Care Medicine. 1 juin 2019;23(S2):115-9.

47. Couffin S, Lobo D, Cook F, Jost PH, Bitot V, Birnbaum R, et al. Coagulase-negative staphylococci are associated to the mild inflammatory pattern of healthcare-associated meningitis: a retrospective study. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1 avr 2018;37(4):755-63.

48. Srihawan C, Castelblanco RL, Salazar L, Wootton SH, Aguilera E, Ostrosky-Zeichner L, et al. Clinical Characteristics and Predictors of Adverse Outcome in Adult and Pediatric Patients With Healthcare-Associated Ventriculitis and Meningitis. Open Forum Infect Dis. avr 2016;3(2):ofw077.

49. Tigchelaar C, Van Zuylen ML, Hulst AH, Preckel B, Van Beek AP, Kema IP, et al. Elevated cerebrospinal fluid glucose levels and diabetes mellitus are associated with activation of the neurotoxic polyol pathway. Diabetologia. juill 2022;65(7):1098-107.

50. Tsuji A, Kaneko Y, Takahashi K, Ogawa M, Goto S. The Effects of Temperature and pH on the Growth of Eight Enteric and Nine Glucose Non-Fermenting Species of Gram-Negative Rods. Microbiology and Immunology. 1982;26(1):15-24.

51. Iyer V, Raut J, Dasgupta A. Impact of pH on growth of Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus in vitro. Journal of Medical Microbiology [Internet]. 23 sept 2021 [cité 2 oct 2024];70(9). Disponible sur: https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.001421

52. Mouton JW. Soup with or without meatballs: Impact of nutritional factors on the MIC, kill-rates and growth-rates. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 1 déc 2018;125:23-7.

53. Kussmann M, Hauer S, Pichler P, Reznicek G, Burgmann H, Poeppl W, et al. Influence of different peritoneal dialysis fluids on the in vitro activity of fosfomycin against Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, and Pseudomonas aeruginosa. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. juin 2018;37(6):1091-8.

54. Tobudic S, Kratzer C, Poeppl W, Vychytil A, Burgmann H. Impact of Various Peritoneal Dialysis Solutions on the Growth of Common Bacterial and Yeast Pathogens. Perit Dial Int. nov 2011;31(6):688-92.

55. CSH Protocols. Artificial cerebrospinal fluid (ACSF). Cold Spring Harb Protoc. 9 janv 2011;2011(9):pdb.rec065730.

56. Living Systems Instrumentation. Standard Artificial Cerebrospinal Fluid (ACSF) Solution [Internet]. Living Systems Instrumentation. [cité 27 févr 2023]. Disponible sur: https://livingsys.com/learning-resources/solutions-and-reagents/standard-acsf-solution/

57. Nectagen [Internet]. 2018 [cité 6 avr 2023]. Mouse ACSF. Disponible sur: https://www.nectagen.com/reference-data/solutions/mouse-acsf

58. Alreshidi M, Dunstan H, Roberts T, Alreshidi F, Hossain A, Bardakci F, et al. Cytoplasmic amino acid profiles of clinical and ATCC 29213 strains of Staphylococcus aureus harvested at different growth phases. Biomol Biomed [Internet]. 4 juin 2023 [cité 11 oct 2024]; Disponible sur: https://www.bjbms.org/ojs/index.php/bjbms/article/view/9246

59. Agbayani MM, Braun J, Chang CT, Glass L, Evans HE. Effect of CSF on Bacterial Growth. Archives of Neurology. 1 janv 1981;38(1):43-5.

60. Peyrusson F, Varet H, Nguyen TK, Legendre R, Sismeiro O, Coppée JY, et al. Intracellular Staphylococcus aureus persisters upon antibiotic exposure. Nat Commun. déc 2020;11(1):2200.

61. Lacroix M, Moreau J, Zampaloni C, Bissantz C, Shirvani H, Marchand S, et al. Impact of nutritional factors on *in vitro* PK/PD modelling of polymyxin B against various strains of *Acinetobacter baumannii*. International Journal of Antimicrobial Agents. 1 juill 2024;64(1):107189.

Supplementary data

1. Table S1: Experimental parameters used in HFIM to simulate CSF concentrations

	Parameter	Parameter description	600 mg q12 h	900 mg q12 h	900 mg q8 h
Set in the application	$V_{Central}$ (L)	Volume in the central reservoir	0.300	0.300	0.300
	$Q_{Cartridge}$ (L/h)	Pump flow rate from the central reservoir to the cartridge	3.60	3.60	3.60
	$V_{Cartridge}$ (L)	Volume of the cartridge	0.0600	0.0600	0.0600
	$t_{1/2}$ (h)	Terminal half-life	3.01	3.01	3.65
	F	Bioavailability	1	1	1
	k_a (h^{-1})	Absorption rate constant	0.300	0.300	0.300
	$C_{max,\,1}$ (mg/L)	Maximal concentration after the first dose	4.25	6.38	6.38
	$Exp_{duration}$ (h)	Experiment duration	96	96	96
	n	Number of sub-intervals	12	12	8
	t_n (h)	The end time of the last sub-interval	12	12	8
	n_{doses}	Total number of doses	8	8	12
	$V_{infusion}$ (mL)	Volume of infusion	2.00	2.00	2.00
Computed by the application	$t_{max,1}$ (h)	Time to reach $C_{max,1}$	3.80	3.80	4.15
	Dose (mg)	Dose administered at the end of the last sub-interval	3.66	5.50	5.06
	f_{dose}	Fraction of target dose administered at the end of the last sub-interval	0.973	0.973	0.909
	CL_{elim} (L/h)	Pump flow rate from the central reservoir to the waste	0.0828	0.0828	0.0684
	$V_{diluent}$ (L)	Volume of diluent	7.95	7.95	6.57
	$C_{infusion}$ (mg/L)	Infusion solution concentration	148	222	288

2. Text S1: LC-MS/MS assay of MHB samples

Analysis of linezolid concentrations in CAMHB was performed by an LC-MS/MS method previously developed for assay of linezolid plasma concentrations (8). Calibration curves were established over 0.2 to 80 µg/mL. Samples were precipitated with 300 µL of acetonitrile containing the internal standard (Linezolid D8, purity of 100% in powder form, Alsachim, Illkirch Graffenstaden, France) at 300 ng/mL and vortexed for 10 s. Then, samples were centrifuged at 14 000 rpm for 20 min at 4 °C and 100 µL of supernatant was transferred into a glass vial containing 100 µL of 10 mM ammonium formate. A volume of 2 µL was injected.

The system included a Shimadzu high-performance liquid chromatography system module (Nexera XR; Shimadzu, Marne la Vallée, France) coupled with a TQ3500 mass spectrometer (Sciex, Les Ulis, France). The compound was analyzed on an XBridge Peptide BEH300 C18 column (5 µm, 2.1 x 150 mm, Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). The mobile phase consisted of a mixture (50/50, v/v) of 10 mM ammonium formate and acetonitrile delivered isocratically at 0.20 mL/min. Electrospray ionization in positive mode was used for the detection. Ions were analyzed in the multiple reaction monitoring, and the following transitions were inspected: m/z 338→296 and 346→304 for linezolid and internal standard, respectively.

The intraday variability was characterized at three concentrations levels (0.6, 15 and 60 µg/mL) with a precision < 3% and bias < 9% (n = 4). The interday variability was characterized at three concentrations levels (0.6, 15 and 60 µg/mL) with a precision < 5% and bias < 2% (n = 19).

Discussion et perspectives

Les études PK/PD peuvent être réalisées dans le but d'optimiser la posologie de médicaments via plusieurs modèles *in vitro* et *in vivo,* supportés par la modélisation PK/PD. Ce travail de thèse a permis d'évaluer la relation PK/PD du linézolide dans le contexte des infections neuro-méningées associées aux DVE chez des patients de réanimation à travers l'utilisation de modèles *in vitro* et de la modélisation PK/PD.

Dans la première étude, nous avons souhaité définir un index PK/PD du linézolide spécifique des infections cérébrales. En effet, l'index PK/PD du linézolide étant discuté entre l'*f*AUC/CMI et le *f*T>CMI, les conclusions varient selon les études, avec soit une bonne efficacité du schéma posologique recommandé de 600 mg deux fois par jour, soit une recommandation d'optimisation posologique avec une augmentation des doses (103–105). Toutefois, ces index n'ont pas été définis dans le contexte des infections neuro-méningées, où les concentrations dans le LCS peuvent différer significativement des concentrations plasmatiques en raison des barrières (BHE et BHL) qui limitent la diffusion des antibiotiques. Pour pallier cette limite, nous avons utilisé une approche de simulations basée sur la modélisation PK/PD. Nous avons combiné le modèle PK de population développé dans l'étude PK-Pop-LCR avec les modèles PD développés à partir de TKC réalisés sur neuf souches de *Staphylococcus* spp. Cette démarche a permis d'évaluer l'effet des concentrations du linézolide retrouvées au site de l'infection puisque les concentrations observées dans le LCS des patients de réanimation porteurs d'une DVE infectée étaient responsables de l'effet sur les différentes souches bactériennes de *Staphylococcus* spp. étudiées. Ainsi, cette première étude a mis en évidence que l'effet des concentrations de linézolide dans le LCS et le plasma était corrélé à l'*f*AUC/CMI et au *f*T>CMI avec une légère supériorité de l'index *f*AUC/CMI pour les données plasmatiques. Ces résultats correspondent aux index retrouvés dans la littérature, bien que ces derniers aient été déterminés dans des infections autres que cérébrales, aussi bien dans des modèles précliniques, qu'à partir de données cliniques (122–124). Le peu de divergence entre les résultats obtenus à partir des données LCS et plasmatiques peut s'expliquer par le fait que le linézolide est un antibiotique qui traverse bien les barrières cérébrales avec une distribution dans le LCS de l'ordre de 80 % (70,103,104). Cette bonne diffusion du linézolide suggère que l'exposition dans le plasma reflète bien l'exposition dans le LCS. Cela permet d'effectuer le suivi thérapeutique pharmacologique, comme il est traditionnellement réalisé en routine hospitalière, à partir des prélèvements plasmatiques, qui sont plus accessibles que le LCS. L'adaptation posologique nécessiterait alors plusieurs prélèvements plasmatiques à différents temps afin d'estimer correctement l'AUC, ce qui en pratique est faisable mais contraignant pour les services cliniques. Toutefois, plusieurs études ont montré une corrélation satisfaisante entre l'AUC et la concentration retrouvée à la résiduelle (c'est-à-dire avant la nouvelle administration de l'antibiotique) ainsi l'AUC (et à priori la *f*AUC) pourrait être prédite à partir d'un seul prélèvement plasmatique résiduel, ce qui

faciliterait le suivi thérapeutique pharmacologique (176,177). En revanche, pour un antibiotique avec une diffusion plus limitée dans le LCS, comme le méropénème, dont la pénétration varie de 6 à 15 % selon les études (178–180), l'index PK/PD corrélé à l'effet pourrait différer entre le plasma et le LCS. De plus, pour un même index PK/PD, la cible à atteindre, définie à partir des concentrations plasmatiques, serait probablement différente de celle dans le LCS. Ainsi, il est nécessaire d'utiliser l'index et la cible adaptés en fonction des prélèvements effectués pour réaliser le suivi thérapeutique pharmacologique. Pour renforcer la fiabilité de nos résultats de simulations, une des perspectives de ce travail serait de les valider en reproduisant *in silico* l'étude de fractionnement des doses du linézolide réalisée chez la souris infectée par *Staphylococcus aureus* (122). Bien que la méthode des simulations ait déjà été utilisée pour déterminer les index PK/PD pour d'autres molécules (127,181), sa validation par la reproduction des études chez la souris n'a été effectuée, à notre connaissance que dans deux études, celle de Kristoffersson *et al*. avec le méropénème et celle de Khan *et al*. avec la colistine pour traiter des infections causées par *Pseudomonas aeruginosa* (181,182), ce qui n'est pas forcément extrapolable à tous les antibiotiques et à toutes les souches, notamment au linézolide et aux *Staphylococcus* spp.

Bien que les concentrations retrouvées au site de l'infection aient été utilisées dans cette première étude, l'effet du linézolide a été évalué en utilisant un modèle *in vitro* de TKC, où les concentrations restent constantes durant toute l'expérience, ce qui n'est pas le cas *in vivo* où elles fluctuent au cours du temps. L'HFIM est un autre modèle *in vitro* qui permet d'évaluer l'effet de la variation des concentrations au cours du temps sur la pousse bactérienne puisque des profils pharmacocinétiques cliniques sont reproduits. La plupart des études utilisant des HFIM reproduisent des concentrations plasmatiques (135,139,161,183–186). Toutefois, certaines études ont cherché à reproduire les concentrations retrouvées au niveau du site d'action (**Figure 33**) mais ont négligé la phase d'absorption pourtant présente (**Figure 32**). Un moyen de reproduire cette phase d'absorption est d'ajouter une bouteille au système d'HFIM afin de mimer un compartiment dépôt. L'antibiotique est administré dans cette bouteille puis une pompe transfère le contenu à un débit, correspondant à la constante d'absorption observée, dans le réservoir central (130). Cependant, l'ajout d'une bouteille entraîne non seulement une augmentation de la taille du système, pouvant rendre son intégration impossible selon la taille des incubateurs utilisés, mais aussi une consommation supplémentaire de milieu de culture, augmentant ainsi le coût de l'expérience. En effet, certaines bactéries nécessitent un milieu de culture spécifique, bien plus cher que le milieu MHB classiquement utilisé. C'est le cas par exemple des mycobactéries, pour lesquelles l'ajout de 10 % de Middlebrook OADC au milieu Middlebrook 7H9 augmente le coût à plus de 500 euros le litre, contre moins de 10 euros pour le MHB (76,187–189), rendant l'expérimentation d'HFIM difficilement reproductible d'un point de vue

économique. Par conséquent, nous avons développé dans la seconde étude, un algorithme permettant de reproduire des profils pharmacocinétiques avec une phase d'absorption d'ordre 1, en utilisant uniquement une pompe de perfusion programmable. Cet algorithme a permis de diviser un intervalle de dose en plusieurs sous-intervalles durant lesquels une dose constante est administrée mais les débits varient. Ainsi, les concentrations de linézolide observées dans le LCS des patients de réanimation porteur d'une DVE infectée ont pu être reproduites dans l'HFIM sans modifier la structure de base du système et sans coût supplémentaire. De plus, cette méthode est applicable à tout profil pharmacocinétique présentant une phase d'absorption d'ordre 1, que ce soit des concentrations au site d'infection, comme dans l'exemple proposé, ou à des concentrations observées après une voie orale ou toute autre voie extravasculaire. Elle est également potentiellement transposable à des antibiotiques présentant des PK plus complexes de type bi-compartimentale ou à des combinaisons d'antibiotiques dont les demi-vies sont différentes.

Cependant, même si l'évaluation de l'effet du linézolide est plus pertinente par HFIM que par TKC, le modèle PD développé à partir des TKC réalisés pendant 30 h sur la souche de référence de *Staphylococcus aureus* SA29213 (article 1 de la thèse), a globalement bien prédit les comptages bactériens ainsi que l'effet du linézolide dans le MHB, observés dans l'HFIM sur les 30 premières heures (article 3 de la thèse), comme illustré dans la **Figure 39**.

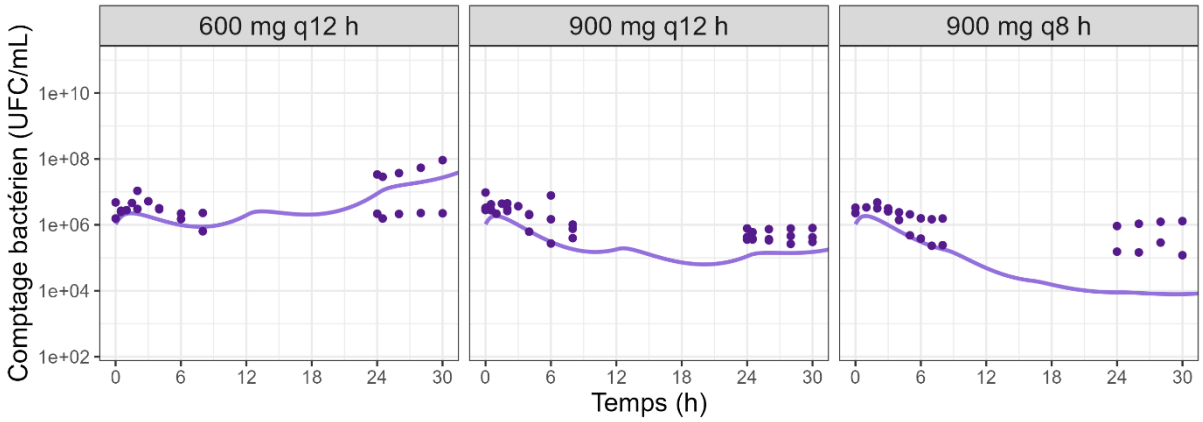


Figure 39. Comparaison des comptages bactériens de SA29213 obtenus après simulations avec le modèle PD développé à partir des TKC et ceux observés en HFIM sur 30 h. La ligne violette correspond aux comptages bactériens simulés par le modèle PD développé à partir des TKC réalisées sur la souche SA29213 de l'article 1 de la thèse. Les points correspondent aux comptages bactériens observés lors de la réalisation des HFIM reproduisant les concentrations de linézolide observées dans le LCS des patients de réanimation pour trois schémas posologiques. Les HFIM ont été réalisés dans du MHB (article 3 de la thèse).

Cette observation est en accord avec celle de Nielsen *et al.,* où le modèle PD développé à partir de TKC réalisées sur une souche de *Streptococcus pyogenes* pour cinq antibiotiques a prédit de manière satisfaisante les comptages bactériens observés dans l'HFIM sur 24 h (190). Toutefois, si l'on regarde

sur un temps plus long, à savoir sur les 96 h d'HFIM, la dynamique de repousse prédite par le modèle PD obtenu à partir des TKC ne correspond pas à celle observée en HFIM, notamment pour la dernière posologie de 900 mg q8 h où aucune repousse n'a été observée (**Figure 40**).

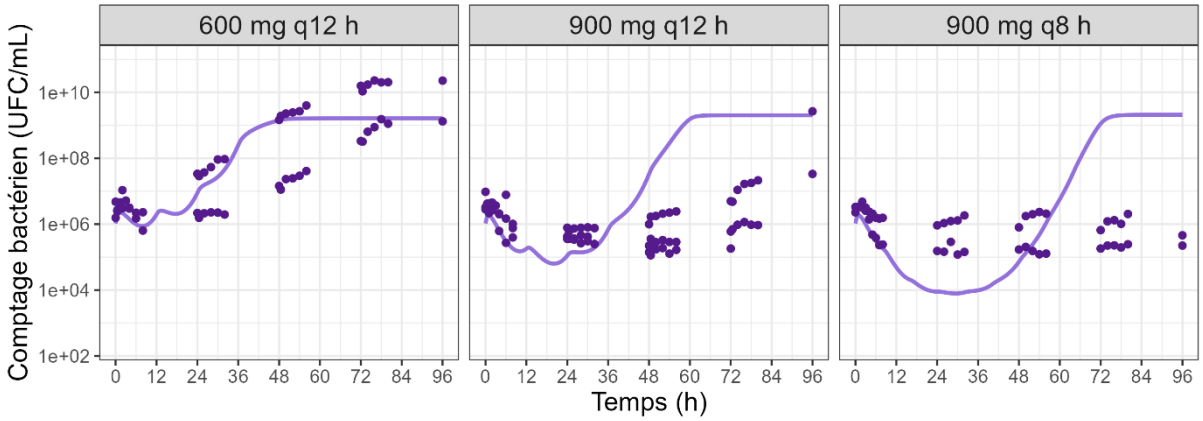


Figure 40. Comparaison des comptages bactériens de SA29213 obtenus après simulations avec le modèle PD développé à partir des TKC et ceux observés en HFIM sur 96 h. La ligne violette correspond aux comptages bactériens simulés par le modèle PD développé à partir des TKC réalisées sur la souche SA29213 (article 1 de la thèse). Les points correspondent aux comptages bactériens observés lors de la réalisation des HFIM reproduisant les concentrations de linézolide observées dans le LCS des patients de réanimation pour trois schémas posologiques. Les HFIM ont été réalisés dans du MHB (article 3 de la thèse).

Ainsi, les paramètres du modèle PD, notamment ceux concernant l'effet du linézolide (E_{max}, EC_{50}) et l'adaptation (k_{on}), seraient probablement différents s'il avait été développé à partir des données obtenues en HFIM. De plus, le renouvellement du milieu de culture dans l'HFIM favorise une croissance bactérienne plus rapide avec un nombre maximal de bactéries généralement supérieur d'environ 1-$\log_{10}$ comparé aux TKC, ce qui implique des valeurs potentiellement différentes de B_{max} et K_{growth} (131). Néanmoins, la détermination des index PK/PD du linézolide à partir des TKC a été effectuée grâce à des simulations réalisées uniquement sur 24 h (article 1), à la fois pour mimer ce qui est fait traditionnellement dans les modèles souris où les comptages bactériens sont réalisés à 24 h (115,116,122), et parce que les comptages bactériens prédits par le modèle PD, développé à partir des TKC, étaient en concordance avec ceux observés en HFIM. Toutefois, la détermination des index PK/PD des antibiotiques peut être aussi réalisée à partir de données obtenues en HFIM (144,184). Cependant, dans notre cas, les HFIM ont été réalisés sur une seule souche de *Staphylococcus* spp. parmi les neuf testées lors des TKC. Or, pour une meilleure robustesse des index, il aurait été nécessaire de reproduire les expériences d'HFIM sur un plus grand nombre de souches bactérienne avec, idéalement, un minimum de trois (191), et de tester un grand nombre de schémas posologiques (114), ce qui n'a pas été fait, en raison des contraintes de temps et des coûts associés à la durée des expériences. Pour répondre à ces contraintes, nous avons commencé à développer des HFIM en série avec quatre

cartouches perfusées simultanément, ce qui permettra d'évaluer l'effet d'un même profil pharmacocinétiques sur quatre souches bactériennes différentes, et donc d'augmenter significativement le rendement d'expérimentation.

Les TKC utilisées pour développer le modèle PD et les HFIM évoqués précédemment ont été réalisées dans du MHB. Ce milieu de culture est recommandé par l'EUCAST et le CLSI pour la détermination de la CMI et est donc traditionnellement utilisé dans les expérimentations PK/PD retrouvées dans la littérature (148,161,183,192). Or, le MHB est un milieu de culture riche qui diffère significativement des conditions *in vivo*. L'utilisation de LCS humain (LCSh) est limitée, voire impossible, dans le cas de l'HFIM car plusieurs litres de milieu de culture sont nécessaires, alors que seulement 0,15 L de LCSh est retrouvé chez l'adulte (1,2,19,25). Ainsi, pour reproduire au plus près les conditions du site infectieux, un LCSa a été développé dans la troisième étude, en se basant sur la composition physiologique du LCSh. L'effet des concentrations de linézolide observées dans le LCS sur une souche de *Staphylococcus aureus* SA29213 a été comparé dans des HFIM réalisés dans du MHB et du LCSa. En parallèle, des courbes de croissance ont été réalisées sur les neuf souches de *Staphylococcus* spp. dans du MHB, du LCSh et du LCSa. De plus, en raison du volume limité de LCSh, des TKC ont été effectuées uniquement sur la souche *Staphylococcus aureus* SA29213, utilisée dans les expériences d'HFIM pour comparer l'effet du linézolide dans les trois milieux. Cette dernière étude a mis en évidence que l'utilisation traditionnelle du MHB comme milieu de culture dans les études PK/PD *in vitro* surestimait non seulement la croissance bactérienne de *Staphylococcus* spp., mais aussi l'effet du linézolide sur *Staphylococcus aureus* par rapport au LCSh. En effet, bien que la croissance bactérienne et l'effet du linézolide étaient plus proches entre le LCSa et le LCSh qu'entre le LCSh et le MHB dans les TKC (article 3), de légères différences ont tout de même été observées, en lien probablement avec des variations de composition. Dans notre étude, nous avons diminué les ions bicarbonates par rapport à la concentration physiologique retrouvée chez des individus sains pour des raisons de stabilité du pH. Nous avons vu qu'une augmentation de la concentration en glucose ne semblait pas améliorer la croissance bactérienne. Bien que nous sommes, à notre connaissance, les seuls à avoir proposé une recette de LCSa incorporant des acides aminés, le mélange ajouté n'en comptait que 7. Une diversification des acides aminés présents dans le LCSa est une piste d'amélioration pour obtenir une croissance bactérienne plus proche de celle observée en LCSh. De plus, il a été rapporté la présence de vitamines, notamment de vitamine C, et de lipides dans le LCS, dont notre LCSa était dépourvu (1,19,193–195). Ainsi, des expériences de courbes de croissance et de bactéricidie sont en cours sur des souches de *Staphylococcus* spp. dans différents LCSa : une première où la concentration en bicarbonates est augmentée jusqu'à sa valeur physiologique, une seconde où les acides aminés sont diversifiés par l'ajout d'un mélange contenant 11 acides aminés (196), une troisième en utilisant la

caséine hydrolysée comme source d'acide aminés (197), une quatrième où le LCSa a été enrichi avec différentes concentrations de lipides (198), et enfin une dernière avec du LCSa supplémenté à différentes concentrations de sérum de veau fœtal, afin d'apporter des vitamines et des facteurs de croissance (199). Si l'une de ces modifications permet de mieux reproduire la croissance bactérienne et l'effet du linézolide observés dans le LCSh, alors ce LCSa modifié pourrait servir à réévaluer l'effet du linézolide sur *Staphylococcus* spp. dans un HFIM.

Afin d'essayer d'expliquer les différences de comportement observés sur *Staphylococcus aureus* SA29213 dans les différents milieux, nous avons réalisé des expériences préliminaires de cytométrie en flux. La cytométrie en flux est une technique qui permet d'analyser une large population de bactéries. Chaque bactérie est analysée individuellement sur des critères de taille, de granularité, de vie et de mort. Pour déterminer ces caractéristiques, la technique s'appuie sur la mesure de la fluorescence par l'intermédiaire de lasers (200,201). Lors de ces expériences préliminaires, nous avons pu observer un gradient de la taille des bactéries selon le milieu avec, de la plus grande à la plus petite : MHB, LCSh et LCSa (**Figure 41**). Ces résultats montrent que la taille des bactéries varie selon le milieu de culture dans lequel elles se trouvent.

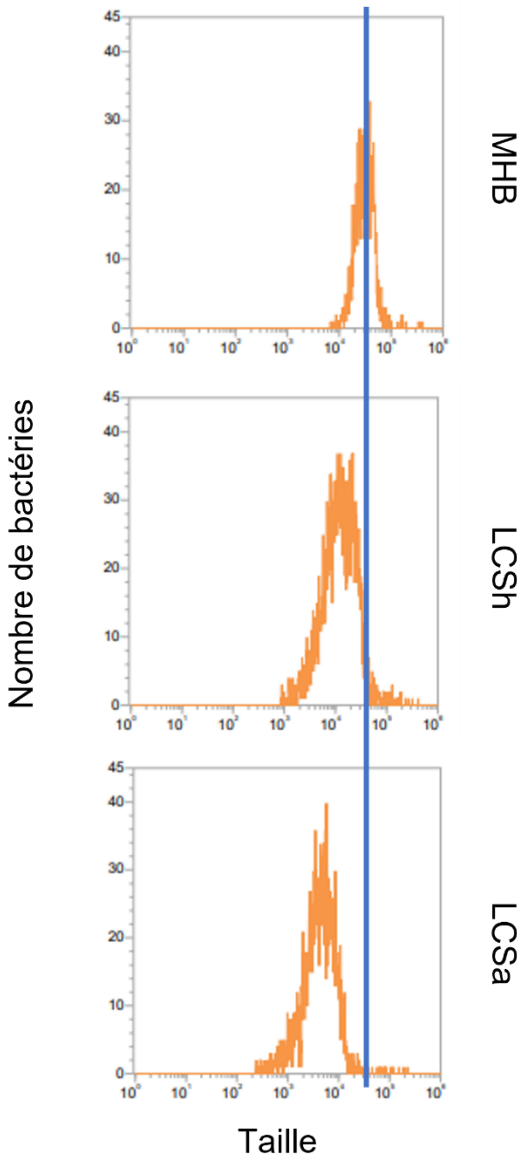


Figure 41. Evolution du nombre de bactéries en fonction de la taille des cellules pour le LCSa, LCSh et MHB (n=1). Analyse de 100 µL d'une population à 10^6 UFC/mL à T0. La ligne bleue correspond à la médiane du pic obtenu dans le MHB.

Pour aller plus loin, nous avons incubé *Staphylococcus aureus* SA29213 dans les 3 milieux avec de la D-Alanine marquée en supposant que cette dernière serait intégrée par les bactéries si elles étaient actives et capables de se diviser puisque la D-Alanine est intégrée lors de la synthèse du peptidoglycane (202). Les résultats sont présentés dans la **Figure 42**.

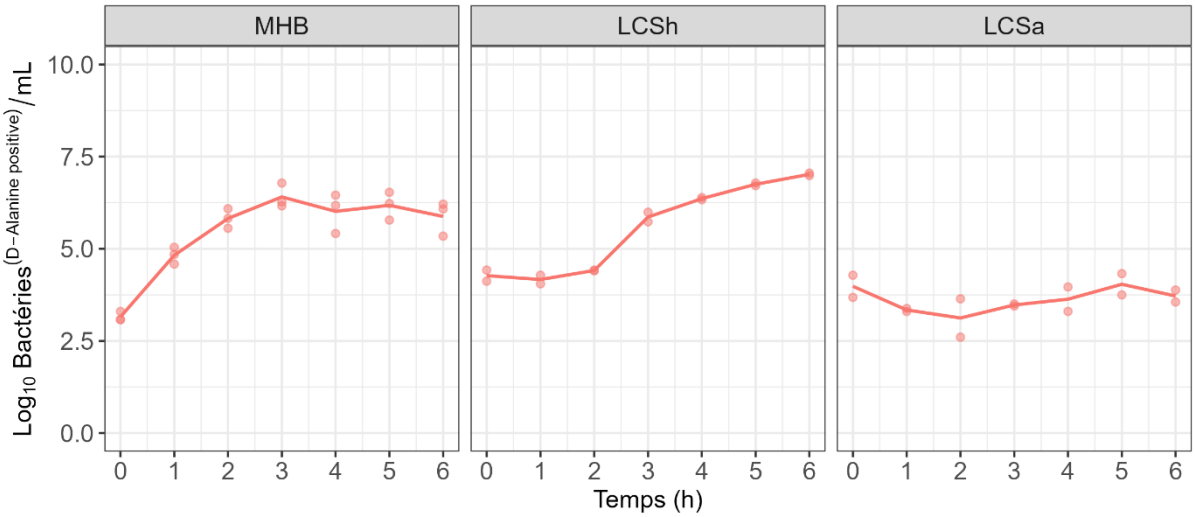


Figure 42. Evolution de la population de SA29213 ayant intégré la D-Alanine marquée dans le MHB, LCSa et LCSh en absence d'antibiotique (n=3 dans le MHB, n=2 pour LCSh et LCSa). Les points correspondent aux valeurs obtenues pour chaque réplicat. La ligne correspond à la moyenne.

Nous avons pu observer une augmentation du nombre de bactéries qui ont intégré la D-Alanine dans le MHB et le LCSh. En revanche, dans le LCSa, il n'y a pas eu d'augmentation du nombre de bactéries intégrant la D-Alanine. Cette observation suggère un état de non-croissance des bactéries, puisqu'il a été montré par Kuru *et al.* que seules les bactéries, dont *Staphylococcus aureus,* avec une synthèse active de peptidoglycane intégraient l'acide aminé fluorescent, sans que cela n'affecte leur croissance bactérienne (203). Pour confirmer ces résultats, il serait intéressant de suivre la division cellulaire de la bactérie utilisée au cytomètre, en la rendant fluorescente à l'aide d'un inducteur, comme décrit par Peyrusson *et al.* Cette étude a mis en évidence un état de non-croissance des *Staphylococcus aureus* intracellulaire lorsqu'ils sont exposés à des concentrations élevées d'oxacilline, de moxifloxacine, et de clarithromycine (50 x CMI). Ainsi, une diminution de la fluorescence au cours du temps serait observée si la bactérie est dans un état réplicatif, tandis qu'elle resterait stable si la bactérie est dans un état de non-croissance (204).

Une des limites de ce travail de thèse est qu'il a porté uniquement sur les bactéries à Gram positif. En effet, les infections neuro-méningées associées aux DVE peuvent également être causées par des bactéries à Gram négatif (**Figure 14**) et il serait donc intéressant de réaliser des études PK/PD sur ce type de bactéries dans les différents milieux. Dans cette perspective, des courbes de croissance sans antibiotique ont été réalisées sur 9 souches de *Pseudomonas aeruginosa* dont des souches cliniques et de référence dans les trois milieux (MHB, LCSh, LCSa) (**Figure 43**).

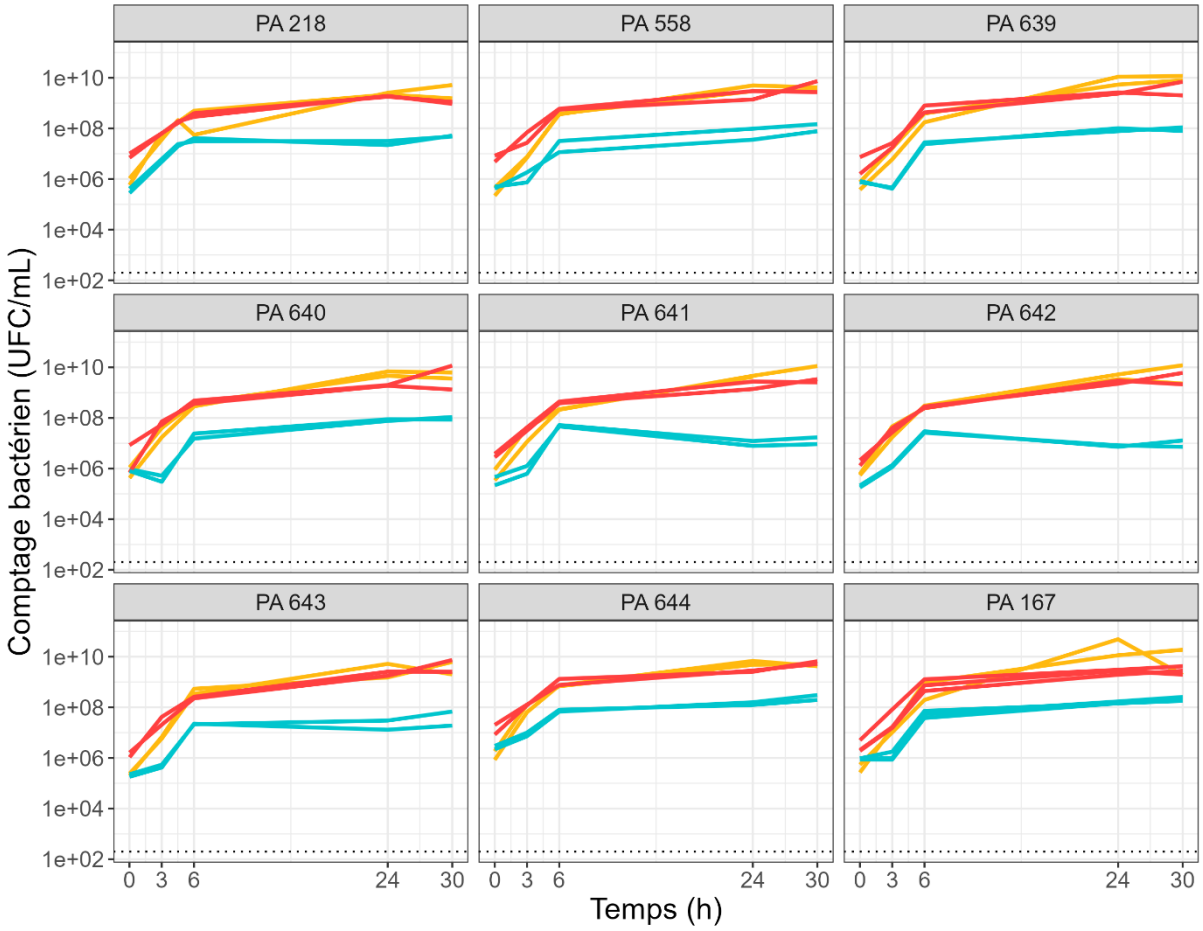


Figure 43. Courbes de croissance dans le MHB, le LCSh et le LCSa (n = 2, sauf PA 167, n = 3) de neuf souches de *Pseudomonas aeruginosa*. Sept souches cliniques et deux souches de référence : PA 218 qui correspond à *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et PA 167 qui correspond à *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692 ont été testées. Les lignes correspondent aux dénombrements bactériens dans le MHB (jaune), le LCSh (rouge) et le LCSa (bleu). La ligne en pointillés correspond à la limite de quantification.

Contrairement à *Staphylococcus* spp., les souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont présenté une croissance exponentielle, quel que soit le milieu utilisé, bien que légèrement ralentie dans le LCSa. Ces résultats sont cohérents avec des études précédentes où la croissance de certaines espèces bactériennes à Gram négatif, comme *Acinetobacter baumannii* et *Escherichia coli*, semblaient peu impactées par un milieu plus pauvre (205,206), ce qui souligne l'exigence des *Staphylococcus* spp. pour leur croissance. Des courbes de bactéricidie avec des concentrations statiques de méropénème sur une souche de référence et une souche clinique de *Pseudomonas aeruginosa* ont également été réalisées dans les 3 milieux (**Figure 44**).

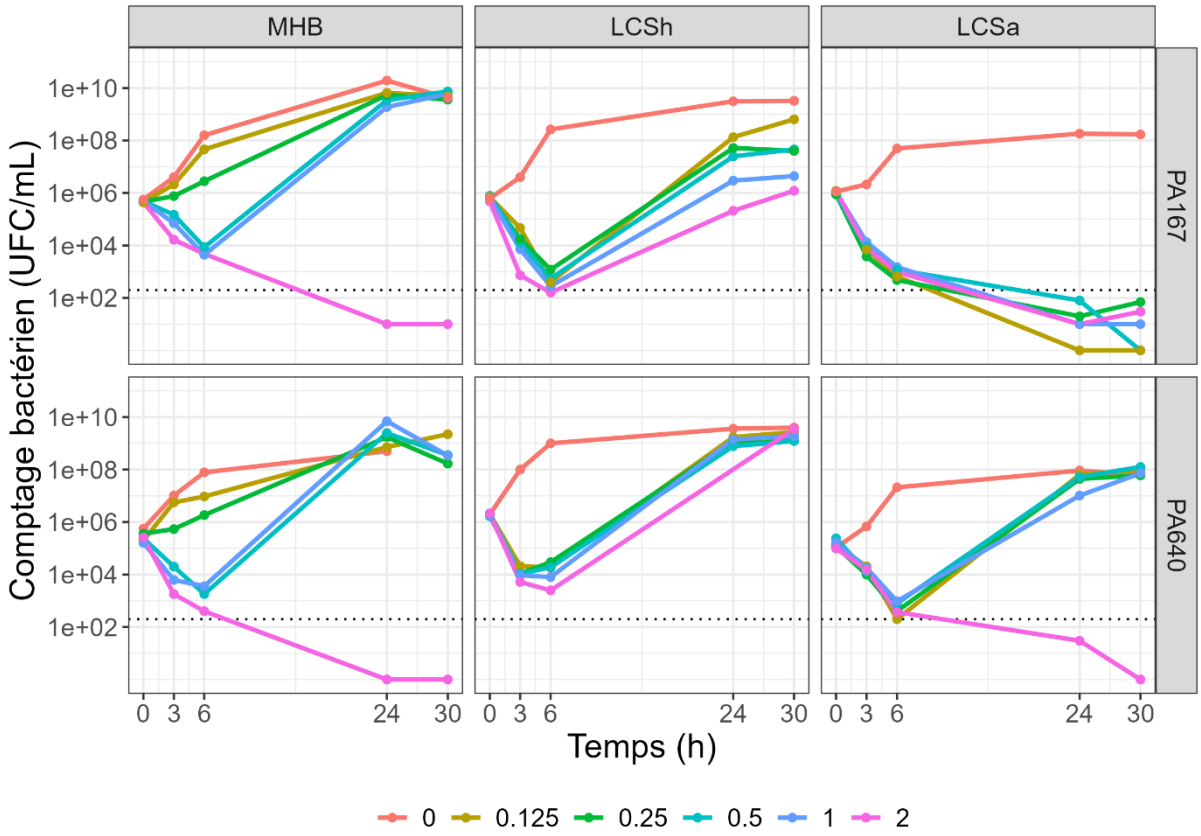


Figure 44. Dénombrements bactériens d'une souche de référence de *Pseudomonas aeruginosa* (PA167) et d'une souche clinique (PA640) observés pendant les TKC (n = 1) effectuées dans le MHB, le LCSh et le LCSa. Les lignes correspondent aux dénombrements bactériens et chaque couleur correspond à une concentration de méropénème en mg/L.

Comme pour le linézolide, l'effet observé variait selon le milieu pour une même souche. Un effet concentration dépendant du méropénème a été observé dans le MHB alors que l'effet était globalement identique quelle que soit la concentration utilisée dans les milieux LCS avec toutefois un effet plus important dans le LCSa comparé au LCSh. De plus, pour un même milieu, on retrouve de la variabilité selon la souche. En effet, si l'effet observé dans le MHB et le LCSh était similaire quelle que soit la souche utilisée, il était en revanche différent entre les deux souches dans le LCSa puisqu'une décroissance des comptages bactériens suivie de repousses a été observé pour la souche clinique (PA640) à toutes les concentrations testées (sauf 2 mg/L) alors qu'un effet bactéricide a été observé pour la souche de référence (PA167) dès la plus faible concentration testée (0.125 mg/L). Ainsi, l'effet observé dans le LCSa était similaire à celui du LCSh pour la souche clinique (PA640) alors qu'il était similaire uniquement sur les six premières heures pour la souche de référence (PA167), où une absence de repousse bactérienne a été observée dans le LCSa contrairement au LCSh. Ces résultats indiquent que, dans le cas de la souche clinique, le LCSa semble être un bon milieu de substitution au LCSh pour reproduire l'effet du méropénème, ce qui n'est pas le cas pour la souche de référence. Par conséquent, étant donné qu'une seule souche de *Staphylococcus aureus*, qui plus est de référence, a été utilisée

dans la troisième étude de ce travail de thèse, des expériences sur d'autres souches de *Staphylococcus* spp., dont des souches cliniques, sont en cours dans les différentes formulations de LCSa.

Ainsi, cette dernière étude a mis en évidence la difficulté de reproduire, les conditions *in vivo* dans les modèles *in vitro* d'HFIM. L'utilisation de LCSh apparaitrait comme l'option la plus appropriée bien que les volumes utilisés en HFIM soient impossibles à atteindre avec du LCSh. Dans cette perspective, notre équipe explore le développement d'un HFIM miniaturisé intégrant une chambre microfluidique à deux compartiments (supérieur et inférieur), séparés par une membrane semi-perméable d'une porosité de 0,2 µm (**Figure 45**). Ce dispositif permettrait ainsi de réduire le volume total du système de 98,5 % par rapport à un HFIM classique.

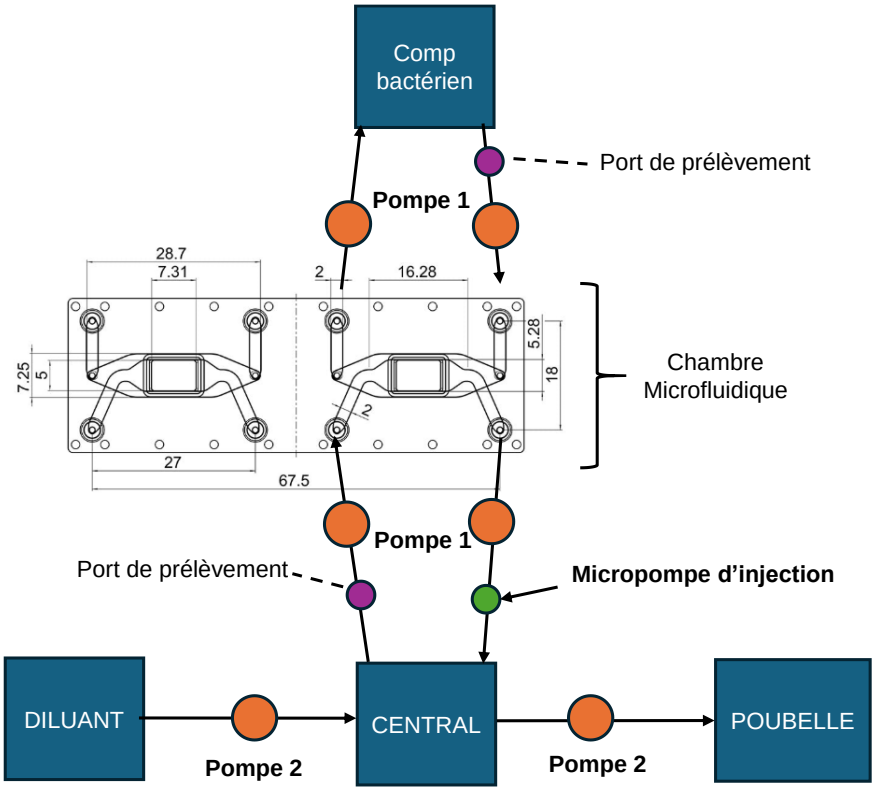


Figure 45. Schéma représentatif d'un HFIM miniaturisé.

Pour pallier ces contraintes *in vitro*, une autre alternative consisterait à utiliser des modèles précliniques animaux, tels que le modèle de rat humanisés (207). Dans ce modèle, un rat atteint d'une infection cérébrale bactérienne serait traité avec des concentrations d'antibiotiques correspondant à celles observées chez l'humain. Cela serait rendu possible grâce à une perfusion continue d'antibiotique à débits variables, permettant de compenser l'élimination plus rapide des médicaments chez les rongeurs. Bien qu'innovant et très intéressant, l'utilisation de ce modèle demeure limitée en raison des restrictions croissantes sur l'emploi des animaux en recherche.

Conclusion

Dans le cadre des infections cérébrales, ce travail de thèse a permis de déterminer un index PK/PD spécifique du linézolide pour les infections causées par *Staphylococcus* spp*.,* mettant en évidence une légère supériorité de l'index *f*AUC/CMI. De plus, l'index PK/PD basé sur les concentrations plasmatiques s'est révélé aussi prédictif de l'effet du linézolide que celui basé sur les concentrations dans le LCS, en raison de la bonne diffusion du linézolide au niveau cérébral. Ce travail s'est appuyé sur des expériences *in vitro* couplées à de la modélisation PK/PD. En effet, des simulations utilisant un modèle PK développé à partir de concentrations de linézolide observées dans le LCS chez des patients de réanimation porteurs d'une DVE, combiné à un modèle PD développé à partir de données de TKC ont été utilisées. Cette approche, bien qu'elle nécessite encore d'être validée, souligne l'intérêt de la modélisation PK/PD, puisqu'elle a permis d'éviter l'utilisation de modèle animaux, dans un contexte où l'expérimentation animale devient de plus en plus complexe et réglementée. Cependant, la discordance observée dans la détermination des cibles à atteindre soulève des questions sur la pertinence de ces index PK/PD. De plus, bien que ce travail de thèse n'ait pas permis de conclure formellement sur l'optimisation posologique du linézolide, il a permis de développer des méthodes innovantes, transposables à d'autres études PK/PD voulant se rapprocher des conditions *in vivo*. Le développement de l'algorithme a permis de reproduire les profils pharmacocinétiques observés au niveau tissulaire, puisque nous avons reproduit les concentrations de linézolide observées dans le LCS des patients de réanimation. Cet algorithme pourra être utilisé dans d'autres études, tant au niveau local que par la communauté scientifique, puisqu'il a été intégré dans une application web open source. Il permet de reproduire tout profil pharmacocinétique présentant une phase d'absorption d'ordre 1, mais pourrait également être utilisé pour simplifier les HFIM lors de l'étude PK/PD des combinaisons d'antibiotiques présentant des demi-vies d'élimination différentes. Enfin, nous avons constaté que les milieux de culture traditionnellement utilisés, comme le MHB, pouvaient surestimer à la fois la croissance bactérienne et l'effet des antibiotiques, comparé à ce qui est observé dans le LCSh, ce qui suggère d'utiliser des milieux de culture plus proches des conditions *in vivo*, tel que le LCSa, pour améliorer l'extrapolation des études PK/PD vers l'*in vivo.*

Références

1. Boron WalterF, Boulpaep EmileL. Medical Physiology: a Cellular and Molecular Approach. Elsevier Saunders. 2012.

2. Marieb EN. Biologie humaine Principes d'anatomie et de physiologie. 8 ème. 2008.

3. Servier Medical Art [Internet]. [cité 24 janv 2025]. SMART. Disponible sur: https://smart.servier.com/

4. Kadry H, Noorani B, Cucullo L. A blood–brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. Fluids and Barriers of the CNS. 18 nov 2020;17(1):69.

5. Dasgupta K, Jeong J. Developmental biology of the meninges. Genesis. mai 2019;57(5):e23288.

6. Kekere V, Alsayouri K. Anatomy, Head and Neck, Dura Mater. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [cité 11 déc 2024]. Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545301/

7. Shafique S, Rayi A. Anatomy, Head and Neck, Subarachnoid Space. In: StatPearls [Internet] [Internet]. StatPearls Publishing; 2023 [cité 15 janv 2025]. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557521/

8. Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. Nature. 16 juill 2015;523(7560):337-41.

9. Tumani H, HUSS A, BACHHUBER F. The cerebrospinal fluid and barriers - anatomic and physiologic considerations. 2017;

10. Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood–brain barrier. Neurobiology of Disease. 1 janv 2010;37(1):13-25.

11. Engelhardt B, Sorokin L. The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. Semin Immunopathol. nov 2009;31(4):497-511.

12. Pandya JD, Musyaju S, Modi HR, Okada-Rising SL, Bailey ZS, Scultetus AH, et al. Intranasal delivery of mitochondria targeted neuroprotective compounds for traumatic brain injury: screening based on pharmacological and physiological properties. J Transl Med. 16 févr 2024;22(1):167.

13. Wu D, Chen Q, Chen X, Han F, Chen Z, Wang Y. The blood–brain barrier: Structure, regulation and drug delivery. Sig Transduct Target Ther. 25 mai 2023;8(1):1-27.

14. Dotiwala AK, McCausland C, Samra NS. Anatomy, Head and Neck: Blood Brain Barrier. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 [cité 21 janv 2025]. Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519556/

15. Lechevallier C, Lemarchand E, Roussel BD, Vivien D. La barrière hémato-encéphalique : implication dans la physiopathologie des accidents vasculaires cérébraux. Pratique Neurologique - FMC. 1 mars 2024;15(1):60-6.

16. Daneman R, Prat A. The blood-brain barrier. Cold Spring Harb Perspect Biol. 5 janv 2015;7(1):a020412.

17. Delrose N. Solute Transfer Across Blood-Brain Barrier [Internet]. [cité 6 févr 2025]. Disponible sur: https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/all/t-66467868b24a9a70bf5366c2-solute-transfer-across-blood-brain-barrier

18. Pardridge WM. Drug delivery to the brain. J Cereb Blood Flow Metab. juill 1997;17(7):713-31.

19. Damkier HH, Brown PD, Praetorius J. Cerebrospinal Fluid Secretion by the Choroid Plexus. Physiol Rev. 2013;93:46.

20. Laterra J, Keep R, Betz LA, Goldstein GW. Blood—Cerebrospinal Fluid Barrier. In: Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects 6th edition [Internet]. Lippincott-Raven; 1999 [cité 7 févr 2025]. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27998/

21. Solár P, Zamani A, Kubíčková L, Dubový P, Joukal M. Choroid plexus and the blood-cerebrospinal fluid barrier in disease. Fluids Barriers CNS. 6 mai 2020;17(1):35.

22. Redzic Z. Molecular biology of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: similarities and differences. Fluids and Barriers of the CNS. 18 janv 2011;8(1):3.

23. Brinker T, Stopa E, Morrison J, Klinge P. A new look at cerebrospinal fluid circulation. Fluids and Barriers of the CNS. 1 mai 2014;11(1):10.

24. Telano LN, Baker S. Physiology, Cerebral Spinal Fluid. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 [cité 30 janv 2025]. Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519007/

25. Adigun OO, Al-Dhahir MA. Anatomy, Head and Neck: Cerebrospinal Fluid. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [cité 18 déc 2024]. Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459286/

26. Bothwell SW, Janigro D, Patabendige A. Cerebrospinal fluid dynamics and intracranial pressure elevation in neurological diseases. Fluids Barriers CNS. déc 2019;16(1):9.

27. Sakka L, Coll G, Chazal J. Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis. déc 2011;128(6):309-16.

28. CHU P. Normes biochimique.

29. May R, Reddy U. Cerebrospinal fluid and its physiology. Anaesthesia & Intensive Care Medicine. 1 janv 2020;21(1):60-1.

30. Zheng WH, Yan C, Chen T, Kang DZ. New scheme for the preparation and use of artificial cerebrospinal fluid. Journal of Physiology and Pharmacology. 2020;71(6):919-25.

31. Matzneller P, Burian A, Zeitlinger M, Sauermann R. Understanding the Activity of Antibiotics in Cerebrospinal Fluid in vitro. Pharmacology. 17 févr 2016;97(5-6):233-44.

32. Uchida K, Yamada M, Hayaschi T, Mine Y, Kawase T. Possible Harmful Effects on Central Nervous System Cells in the Use of Physiological Saline as an Irrigant During Neurosurgical Procedures. Surg Neurol. août 2004;62:96-105.

33. Shiobara R, Ohira T, Doi K, Nishimura M, Kawase T. Development of Artificial Cerebrospinal Fluid: Basic Experiments, and Phase II and III Clinical Trials. J Neurol Neurophysiol [Internet]. 2013 [cité

11 févr 2022];04(05). Disponible sur: https://www.omicsonline.org/development-of-artificial-cerebrospinal-fluid-basic-experiments-and-phase-ii-and-iii-clinical-trials-2155-9562-4-173.php?aid=21111

34. Verbeek MM, Leen WG, Willemsen MA, Slats D, Claassen JA. Hourly analysis of cerebrospinal fluid glucose shows large diurnal fluctuations. J Cereb Blood Flow Metab. 1 mai 2016;36(5):899-902.

35. CEMIR C des enseignants de médecine intensive réanimation. Infections neuroméningées [Internet]. Disponible sur: https://www.ce-mir.fr/files/medias/documents/46.%20Infections%20neurom%C3%A9ning%C3%A9es.pdf

36. Hoen B, Varon E, Debroucker T, Fantin B, Grimprel E, Wolff M, et al. Management of acute community-acquired bacterial meningitis (excluding newborns). Short text. Médecine et Maladies Infectieuses. 1 sept 2019;49(6):367-98.

37. Tamura R, Yoshida K, Toda M. Current understanding of lymphatic vessels in the central nervous system. Neurosurg Rev. 1 août 2020;43(4):1055-64.

38. Comité technique des infections nosocomiales et des infections liées aux soins. DEFINITION DES INFECTIONS ASSOCIEES AUX SOINS. 2007.

39. van de Beek D, Tunkel AR. Nosocomial Bacterial Meningitis. n engl j med. 2010;9.

40. Tunkel AR, Hasbun R, Bhimraj A, Byers K, Kaplan SL, Scheld WM, et al. 2017 Infectious Diseases Society of America's Clinical Practice Guidelines for Healthcare-Associated Ventriculitis and Meningitis*. Clinical Infectious Diseases. 15 mars 2017;64(6):e34-65.

41. Allos H, Hasbun R. Current understanding of infection of the ventricles and its complications. Expert Rev Anti Infect Ther. déc 2024;22(12):1023-42.

42. Martin RM, Zimmermann LL, Huynh M, Polage CR. Diagnostic Approach to Health Care- and Device-Associated Central Nervous System Infections. J Clin Microbiol. nov 2018;56(11):e00861-18.

43. Ramanan M, Lipman J, Shorr A, Shankar A. A meta-analysis of ventriculostomy-associated cerebrospinal fluid infections. BMC Infect Dis. déc 2015;15(1):3.

44. Baltas I, Tsoulfa S, Sakellariou P, Vogas V, Fylaktakis M, Kondodimou A. Posttraumatic meningitis: bacteriology, hydrocephalus, and outcome. Neurosurgery. sept 1994;35(3):422-6; discussion 426-427.

45. Korinek AM, Baugnon T, Golmard JL, van Effenterre R, Coriat P, Puybasset L. Risk factors for adult nosocomial meningitis after craniotomy: role of antibiotic prophylaxis. Neurosurgery. févr 2008;62 Suppl 2:532-9.

46. Lozier AP, Sciacca RR, Romagnoli MF, Connolly ES. Ventriculostomy-related Infections: A Critical Review of the Literature. Neurosurgery. 1 juill 2002;51(1):170-82.

47. Vinchon M, Dhellemmes P. Cerebrospinal fluid shunt infection: risk factors and long-term follow-up. Childs Nerv Syst. juill 2006;22(7):692-7.

48. Governale LS, Fein N, Logsdon J, Black PM. Techniques and complications of external lumbar drainage for normal pressure hydrocephalus. Neurosurgery. oct 2008;63(4 Suppl 2):379-84; discussion 384.

49. Alamri A. External Ventricular Drain | Brainbook [Internet]. 2020 [cité 31 janv 2025]. Disponible sur: https://brainbookcharity.org/external-ventricular-drain/

50. Beer R, Lackner P, Pfausler B, Schmutzhard E. Nosocomial ventriculitis and meningitis in neurocritical care patients. J Neurol. 1 nov 2008;255(11):1617-24.

51. Hoefnagel D, Dammers R, Ter Laak-Poort MP, Avezaat CJJ. Risk factors for infections related to external ventricular drainage. Acta Neurochir (Wien). mars 2008;150(3):209-14; discussion 214.

52. Hasbun R. Healthcare-associated ventriculitis: current and emerging diagnostic and treatment strategies. Expert Review of Anti-infective Therapy. 3 août 2021;19(8):993-9.

53. Srihawan C, Castelblanco RL, Salazar L, Wootton SH, Aguilera E, Ostrosky-Zeichner L, et al. Clinical Characteristics and Predictors of Adverse Outcome in Adult and Pediatric Patients With Healthcare-Associated Ventriculitis and Meningitis. Open Forum Infect Dis. avr 2016;3(2):ofw077.

54. Luque-Paz D, Revest M, Eugène F, Boukthir S, Dejoies L, Tattevin P, et al. Ventriculitis: A Severe Complication of Central Nervous System Infections. Open Forum Infect Dis. juin 2021;8(6):ofab216.

55. Karvouniaris M, Brotis A, Tsiakos K, Palli E, Koulenti D. Current Perspectives on the Diagnosis and Management of Healthcare-Associated Ventriculitis and Meningitis. Infect Drug Resist. 2022;15:697-721.

56. Mounier R, Lobo D, Cook F, Martin M, Attias A, Aït-Mamar B, et al. From the Skin to the Brain: Pathophysiology of Colonization and Infection of External Ventricular Drain, a Prospective Observational Study. PLOS ONE. 10 nov 2015;10(11):e0142320.

57. Sohn SY, Russell CD, Jamjoom AAB, Poon MT, Lawson McLean A, Ahmed AI, et al. Comparison of Suspected and Confirmed Internal External Ventricular Drain-Related Infections: A Prospective Multicenter United Kingdom Observational Study. Open Forum Infectious Diseases. 1 oct 2022;9(10):ofac480.

58. Zhang Z, Song Y, Kang J, Duan S, Li Q, Feng F, et al. Epidemiology of patients with central nervous system infections, mainly neurosurgical patients: a retrospective study from 2012 to 2019 in a teaching hospital in China. BMC Infect Dis. déc 2021;21(1):826.

59. Giovane RA, Lavender PD. Central Nervous System Infections. Primary Care: Clinics in Office Practice. 1 sept 2018;45(3):505-18.

60. Tunkel AR, Hartman BJ, Kaplan SL, Kaufman BA, Roos KL, Scheld WM, et al. Practice Guidelines for the Management of Bacterial Meningitis. Clinical Infectious Diseases. 1 nov 2004;39(9):1267-84.

61. Hrishi AP, Sethuraman M. Cerebrospinal Fluid (CSF) Analysis and Interpretation in Neurocritical Care for Acute Neurological Conditions. Indian Journal of Critical Care Medicine. 1 juin 2019;23(S2):115-9.

62. Schade RP, Schinkel J, Roelandse FWC, Geskus RB, Visser LG, van Dijk JMC, et al. Lack of value of routine analysis of cerebrospinal fluid for prediction and diagnosis of external drainage-related bacterial meningitis. J Neurosurg. janv 2006;104(1):101-8.

63. Zarrouk V, Vassor I, Bert F, Bouccara D, Kalamarides M, Bendersky N, et al. Evaluation of the management of postoperative aseptic meningitis. Clin Infect Dis. 15 juin 2007;44(12):1555-9.

64. Li Y, Zhang G, Ma R, Du Y, Zhang L, Li F, et al. The diagnostic value of cerebrospinal fluids procalcitonin and lactate for the differential diagnosis of post-neurosurgical bacterial meningitis and aseptic meningitis. Clin Biochem. janv 2015;48(1-2):50-4.

65. Xiao X, Zhang Y, Zhang L, Kang P, Ji N. The diagnostic value of cerebrospinal fluid lactate for post-neurosurgical bacterial meningitis: a meta-analysis. BMC Infectious Diseases. 13 sept 2016;16(1):483.

66. Maskin LP, Capparelli F, Mora A, Hlavnicka A, Orellana N, Díaz MF, et al. Cerebrospinal fluid lactate in post-neurosurgical bacterial meningitis diagnosis. Clin Neurol Neurosurg. sept 2013;115(9):1820-5.

67. Rogers T, Sok K, Erickson T, Aguilera E, Wootton SH, Murray KO, et al. Impact of Antibiotic Therapy in the Microbiological Yield of Healthcare-Associated Ventriculitis and Meningitis. Open Forum Infect Dis. mars 2019;6(3):ofz050.

68. Banks JT, Bharara S, Tubbs RS, Wolff CL, Gillespie GY, Markert JM, et al. Polymerase chain reaction for the rapid detection of cerebrospinal fluid shunt or ventriculostomy infections. Neurosurgery. déc 2005;57(6):1237-43; discussion 1237-1243.

69. Nau R, Sörgel F, Eiffert H. Penetration of Drugs through the Blood-Cerebrospinal Fluid/Blood-Brain Barrier for Treatment of Central Nervous System Infections. Clin Microbiol Rev. oct 2010;23(4):858-83.

70. Van Bambeke F, Tulkens PM. Pharmacodynamie des antibiotiques dans le LCR : principes et conséquences (facteurs prédictifs d'efficacité). Médecine et Maladies Infectieuses. juill 2009;39(7-8):483-92.

71. Tattevin P, Solomon T, Brouwer MC. Understanding central nervous system efficacy of antimicrobials. Intensive Care Med. 1 janv 2019;45(1):93-6.

72. Pardridge WM. Drug transport across the blood–brain barrier. J Cereb Blood Flow Metab. nov 2012;32(11):1959-72.

73. Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nat Protoc. févr 2008;3(2):163-75.

74. eucast: MIC determination [Internet]. [cité 9 août 2024]. Disponible sur: https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/mic_determination

75. Clinical & Laboratory Standards Institute [Internet]. [cité 9 août 2024]. Clinical & Laboratory Standards Institute: CLSI Guidelines. Disponible sur: https://clsi.org/

76. Société Française de Microbiologie. CA-SFM / EUCAST : Société Française de Microbiologie. 2024.

77. eucast: S, I and R definitions [Internet]. [cité 25 sept 2024]. Disponible sur: https://www.eucast.org/newsiandr

78. bioMérieux. Les cliniciens obtiennent plus de résultats avec les nouvelles cartes Antibiogrammes VITEK® 2 OPUS de bioMérieux [Internet]. BIOMÉRIEUX iNEWS. 2018 [cité 21 févr 2025]. Disponible sur: https://www.biomerieux-microbio.com/fr-ca/les-cliniciens-obtiennent-plus-de-resultats-avec-les-nouvelles-cartes-antibiogrammes-vitek-2-opus-de-biomerieux/

79. Cavalieri SJ, Kwon S, Vivekanandan R, Ased S, Carroll C, Anthone J, et al. Effect of antimicrobial stewardship with rapid MALDI-TOF identification and Vitek 2 antimicrobial susceptibility testing on hospitalization outcome. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 1 oct 2019;95(2):208-11.

80. Michalik S. Comment VITEK® 2 génère-t-il des valeurs de CMI ? [Internet]. BIOMÉRIEUX iNEWS. 2017 [cité 21 févr 2025]. Disponible sur: https://www.biomerieux-microbio.com/fr/comment-vitek-2-genere-t-il-des-valeurs-de-cmi/

81. La gélose Mueller-Hinton [Internet]. [cité 5 sept 2024]. Disponible sur: https://microbiologiemedicale.fr/gelose-mueller-hinton/

82. PubChem. Vancomycin [Internet]. [cité 21 févr 2025]. Disponible sur: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/14969

83. Dorresteijn KRIS, Brouwer MC, Jellema K, van de Beek D. Bacterial external ventricular catheter-associated infection. Expert Review of Anti-infective Therapy. 3 mars 2020;18(3):219-29.

84. Ahmed A, Jafri H, Lutsar I, McCoig CC, Trujillo M, Wubbel L, et al. Pharmacodynamics of Vancomycin for the Treatment of Experimental Penicillin- and Cephalosporin-Resistant Pneumococcal Meningitis. Antimicrob Agents Chemother. avr 1999;43(4):876-81.

85. Pfausler B, Spiss H, Beer R, Kampl A, Engelhardt K, Schober M, et al. Treatment of staphylococcal ventriculitis associated with external cerebrospinal fluid drains: a prospective randomized trial of intravenous compared with intraventricular vancomycin therapy. J Neurosurg. mai 2003;98(5):1040-4.

86. MIC EUCAST [Internet]. [cité 6 oct 2024]. Disponible sur: https://mic.eucast.org/search/?search%5Bmethod%5D=mic&search%5Bantibiotic%5D=-1&search%5Bspecies%5D=452&search%5Bdisk_content%5D=-1&search%5Blimit%5D=50

87. Résumé des caractéristiques du produit - VANCOMYCINE SANDOZ 1 g, poudre pour solution à diluer pour perfusion - Base de données publique des médicaments [Internet]. [cité 6 oct 2024]. Disponible sur: https://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/affichageDoc.php?specid=66193112&typedoc=R

88. Mounier R, Lobo D, Hulin A, Nebbad B, Cook F, Dhonneur G. Is First-Line Vancomycin Still the Best Option to Treat *Staphylococcus* Health Care–Associated Meningitis? World Neurosurgery. 1 mars 2017;99:812.e1-812.e5.

89. Hashemian SM, Farhadi T, Ganjparvar M. Linezolid: a review of its properties, function, and use in critical care. DDDT. juin 2018;Volume 12:1759-67.

90. Watkins R, Lemonovich, File T. An evidence-based review of linezolid for the treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): place in therapy. CE. déc 2012;131.

91. Leach KL, Brickner SJ, Noe MC, Miller PF. Linezolid, the first oxazolidinone antibacterial agent. Annals of the New York Academy of Sciences. 2011;1222(1):49-54.

92. Slee AM, Wuonola MA, McRipley RJ, Zajac I, Zawada MJ, Bartholomew PT, et al. Oxazolidinones, a new class of synthetic antibacterial agents: in vitro and in vivo activities of DuP 105 and DuP 721. Antimicrob Agents Chemother. nov 1987;31(11):1791-7.

93. Ford CW, Zurenko GE, Barbachyn MR. The discovery of linezolid, the first oxazolidinone antibacterial agent. Curr Drug Targets Infect Disord. août 2001;1(2):181-99.

94. Senior K. FDA approves first drug in new class of antibiotics. The Lancet. 29 avr 2000;355(9214):1523.

95. Pacanowski J. Linézolide : mécanisme d'action, propriétés et indications thérapeutiques. :8.

96. Ippolito JA, Kanyo ZF, Wang D, Franceschi FJ, Moore PB, Steitz TA, et al. Crystal Structure of the Oxazolidinone Antibiotic Linezolid Bound to the 50S Ribosomal Subunit‖. ACS Publications [Internet]. 22 mai 2008 [cité 5 sept 2023]; Disponible sur: https://pubs.acs.org/doi/epdf/10.1021/jm800379d

97. Jang S. AcrAB–TolC, a major efflux pump in Gram negative bacteria: toward understanding its operation mechanism. BMB Rep. 30 juin 2023;56(6):326-34.

98. PubChem. Linezolid [Internet]. [cité 15 févr 2025]. Disponible sur: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/441401

99. Zhanel GG, Shroeder C, Vercaigne L, S Gin A, Embil J, J Hoban D. A critical review of oxazolidinones: An alternative or replacement for glycopeptides and streptogramins? Can J Infect Dis. 2001;12(6):379-90.

100. Foti C, Piperno A, Scala A, Giuffrè O. Oxazolidinone Antibiotics: Chemical, Biological and Analytical Aspects. Molecules. 14 juill 2021;26(14):4280.

101. Center for drug evaluation and research. Clinical pharmacology and biopharmaceutics review(s) [Internet]. Disponible sur: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2000/21130_Zyvox_biopharmr.pdf

102. MacGowan AP. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of linezolid in healthy volunteers and patients with Gram-positive infections. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1 mai 2003;51(90002):17ii-25.

103. Beer R, Engelhardt KW, Pfausler B, Broessner G, Helbok R, Lackner P, et al. Pharmacokinetics of Intravenous Linezolid in Cerebrospinal Fluid and Plasma in Neurointensive Care Patients with Staphylococcal Ventriculitis Associated with External Ventricular Drains. Antimicrob Agents Chemother. janv 2007;51(1):379-82.

104. Luque S, Grau S, Alvarez-Lerma F. Plasma and cerebrospinal fluid concentrations of linezolid in neurosurgical critically ill patients with proven or suspected central nervous system infections. Int J Antimicrob Agents. 2014;44(5):409-15.

105. Dahyot-Fizelier C, Chauzy A, Chalard K, Bernard F, De Courson H, Leblanc PE, et al. CSF pharmacokinetics-pharmacodynamics of linezolid in critically brain injured patients, with or without central nervous system healthcare-associated infection. The PK-Pop-LCR Study: A

Multicenter Pharmacokinetics and Pharmacodynamics Population Study. [Internet]. 2024 [cité 16 déc 2024]. Disponible sur: http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2024.12.13.24318990

106. Derendorf H, Meibohm B. Modeling of Pharmacokinetic/Pharmacodynamic (PK/PD) Relationships: Concepts and Perspectives. Pharmaceutical research. 1 mars 1999;16:176-85.

107. Food and Drug Administration. Antibacterial Therapies for Patients With an Unmet Medical Need for the Treatment of Serious Bacterial Diseases Guidance for Industry. août 2017; Disponible sur: https://www.fda.gov/files/drugs/published/Antibacterial-Therapies-for-Patients-With-an-Unmet-Medical-Need-for-the-Treatment-of-Serious-Bacterial-Diseases.pdf

108. European Medicines Agency. Guideline on the use of pharmacokinetics and pharmacodynamics in the development of antimicrobial medicinal products. 2016; Disponible sur: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-use-pharmacokinetics-and-pharmacodynamics-development-antimicrobial-medicinal-products_en.pdf

109. Huttner A, Harbarth S, Hope WW, Lipman J, Roberts JA. Therapeutic drug monitoring of the β-lactam antibiotics: what is the evidence and which patients should we be using it for. J Antimicrob Chemother. 1 déc 2015;70(12):3178-83.

110. Wicha SG, Märtson AG, Nielsen EI, Koch BCP, Friberg LE, Alffenaar JW, et al. From Therapeutic Drug Monitoring to Model-Informed Precision Dosing for Antibiotics. Clinical Pharmacology & Therapeutics. 2021;109(4):928-41.

111. Eagle H, Fleischman R, Musselman AD. Effect of schedule of administration on the therapeutic efficacy of penicillin: Importance of the aggregate time penicillin remains at effectively bactericidal levels. The American Journal of Medicine. 1 sept 1950;9(3):280-99.

112. Eagle H, Fleischman R, Levy M. Continuous vs. Discontinuous Therapy with Penicillin. New England Journal of Medicine. 19 mars 1953;248(12):481-8.

113. Mouton JW, Dudley MN, Cars O, Derendorf H, Drusano GL. Standardization of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti-infective drugs: an update. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1 mai 2005;55(5):601-7.

114. Landersdorfer CB, Nation RL. Limitations of Antibiotic MIC-Based PK-PD Metrics: Looking Back to Move Forward. Front Pharmacol. 29 oct 2021;12:770518.

115. Vogelman B, Gudmundsson S, Leggett J, Turnidge J, Ebert S, Craig WA. Correlation of antimicrobial pharmacokinetic parameters with therapeutic efficacy in an animal model. J Infect Dis. 1 oct 1988;158(4):831-47.

116. Craig WA. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Parameters: Rationale for Antibacterial Dosing of Mice and Men. 1998;

117. Roberts JA, Norris R, Paterson DL, Martin JH. Therapeutic drug monitoring of antimicrobials: Therapeutic drug monitoring of antimicrobials. British Journal of Clinical Pharmacology. janv 2012;73(1):27-36.

118. Craig WA. Basic pharmacodynamics of antibacterials with clinical applications to the use of β-lactams, glycopeptides, and linezolid. Infectious Disease Clinics of North America. 1 sept 2003;17(3):479-501.

119. Cheah SE, Wang J, Nguyen VTT, Turnidge JD, Li J, Nation RL. New pharmacokinetic/pharmacodynamic studies of systemically administered colistin against Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii in mouse thigh and lung infection models: smaller response in lung infection. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1 déc 2015;70(12):3291-7.

120. Nielsen EI, Friberg LE. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling of Antibacterial Drugs. Andersson D, éditeur. Pharmacol Rev. juill 2013;65(3):1053-90.

121. Dudhani RV, Turnidge JD, Coulthard K, Milne RW, Rayner CR, Li J, et al. Elucidation of the Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Determinant of Colistin Activity against Pseudomonas aeruginosa in Murine Thigh and Lung Infection Models. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. mars 2010;54(3):1117-24.

122. Andes D, Van Ogtrop ML, Peng J, Craig WA. In Vivo Pharmacodynamics of a New Oxazolidinone (Linezolid). Antimicrob Agents Chemother. nov 2002;46(11):3484-9.

123. Sandberg A, Jensen KS, Baudoux P, Van Bambeke F, Tulkens PM, Frimodt-Møller N. Intra- and extracellular activity of linezolid against Staphylococcus aureus in vivo and in vitro. J Antimicrob Chemother. mai 2010;65(5):962-73.

124. Rayner CR, Forrest A, Meagher AK, Birmingham MC, Schentag JJ. Clinical Pharmacodynamics of Linezolid in Seriously Ill Patients Treated in a Compassionate Use Programme: Clinical Pharmacokinetics. 2003;42(15):1411-23.

125. Drusano GL, Preston SL, Hardalo C, Hare R, Banfield C, Andes D, et al. Use of Preclinical Data for Selection of a Phase II/III Dose for Evernimicin and Identification of a Preclinical MIC Breakpoint. Antimicrob Agents Chemother. janv 2001;45(1):13-22.

126. Mouton JW, Brown DFJ, Apfalter P, Cantón R, Giske CG, Ivanova M, et al. The role of pharmacokinetics/pharmacodynamics in setting clinical MIC breakpoints: the EUCAST approach. Clinical Microbiology and Infection. mars 2012;18(3):E37-45.

127. Nielsen EI, Cars O, Friberg LE. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic (PK/PD) Indices of Antibiotics Predicted by a Semimechanistic PKPD Model: a Step toward Model-Based Dose Optimization. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 15 sept 2011;55(10):4619-30.

128. Mouton JW, Muller AE, Canton R, Giske CG, Kahlmeter G, Turnidge J. MIC-based dose adjustment: facts and fables. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1 mars 2018;73(3):564-8.

129. J.S. Cadwell J. The Hollow Fiber Infection Model for Antimicrobial Pharmacodynamics and Pharmacokinetics. Adv Pharmacoepidem Drug Safety [Internet]. 2012 [cité 23 juin 2023];01(S1). Disponible sur: https://www.omicsonline.org/open-access/the-hollow-fiber-infection-model-for-antimicrobial-pharmacodynamics-and-pharmacokinetics-2167-1052-S1-007.php?aid=10878

130. Gloede J, Scheerans C, Derendorf H, Kloft C. In vitro pharmacodynamic models to determine the effect of antibacterial drugs. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1 févr 2010;65(2):186-201.

131. Bulitta JB, Hope WW, Eakin AE, Guina T, Tam VH, Louie A, et al. Generating Robust and Informative Nonclinical *In Vitro* and *In Vivo* Bacterial Infection Model Efficacy Data To Support Translation to Humans. Antimicrob Agents Chemother. mai 2019;63(5):e02307-18.

132. Grasso S, Meinardi G, De Carneri I, Tamassia V. New In Vitro Model to Study the Effect of Antibiotic Concentration and Rate of Elimination on Antibacterial Activity. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. avr 1978;13(4):570-6.

133. Zinner S, Husson M, Klastersky J. An artificial capillary in vitro kinetic model of antibiotic bactericidal activity. The Journal of infectious diseases. 1981;144 6:583-7.

134. Cadwell JJ. The Hollow Fiber Infection Model: Principles and Practice. 2015;1(1).

135. Yadav R, Rogers KE, Bergen PJ, Bulitta JB, Kirkpatrick CMJ, Wallis SC, et al. Optimization and Evaluation of Piperacillin-Tobramycin Combination Dosage Regimens against Pseudomonas aeruginosa for Patients with Altered Pharmacokinetics via the Hollow-Fiber Infection Model and Mechanism-Based Modeling. Antimicrob Agents Chemother. mai 2018;62(5):e00078-18.

136. Broussou DC, Lacroix MZ, Toutain PL, Woehrlé F, El Garch F, Bousquet-Melou A, et al. Differential Activity of the Combination of Vancomycin and Amikacin on Planktonic vs. Biofilm-Growing Staphylococcus aureus Bacteria in a Hollow Fiber Infection Model. Front Microbiol. 27 mars 2018;9:572.

137. Bilello JA, Bauer G, Dudley MN, Cole GA, Drusano GL. Effect of 2',3'-didehydro-3'-deoxythymidine in an in vitro hollow-fiber pharmacodynamic model system correlates with results of dose-ranging clinical studies [Internet]. [cité 2 mai 2024]. Disponible sur: https://journals.asm.org/doi/epdf/10.1128/aac.38.6.1386

138. Bergen PJ, Bulitta JB, Kirkpatrick CMJ, Rogers KE, McGregor MJ, Wallis SC, et al. Effect of different renal function on antibacterial effects of piperacillin against *Pseudomonas aeruginosa* evaluated via the hollow-fibre infection model and mechanism-based modelling. J Antimicrob Chemother. sept 2016;71(9):2509-20.

139. Docobo-Pérez F, Drusano GL, Johnson A, Goodwin J, Whalley S, Ramos-Martín V, et al. Pharmacodynamics of Fosfomycin: Insights into Clinical Use for Antimicrobial Resistance. Antimicrob Agents Chemother. sept 2015;59(9):5602-10.

140. Bergen PJ, Bulitta JB, Kirkpatrick CMJ, Rogers KE, McGregor MJ, Wallis SC, et al. Substantial Impact of Altered Pharmacokinetics in Critically Ill Patients on the Antibacterial Effects of Meropenem Evaluated via the Dynamic Hollow-Fiber Infection Model. Antimicrob Agents Chemother. mai 2017;61(5):e02642-16.

141. Caro L, Nicolau DP, De Waele JJ, Kuti JL, Larson KB, Gadzicki E, et al. Lung penetration, bronchopulmonary pharmacokinetic/pharmacodynamic profile and safety of 3 g of ceftolozane/tazobactam administered to ventilated, critically ill patients with pneumonia. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1 juin 2020;75(6):1546-53.

142. Carr D, Zhang Z, Si Q, Racine F, Xiao JC, Katwaru R, et al. In Vitro Hollow-Fiber Studies Assessing Antibacterial Activity of Ceftolozane/Tazobactam Against Multidrug-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa*. Open Forum Infectious Diseases. 1 nov 2020;7(11):ofaa469.

143. Vignaud E, Goutelle S, Genestet C, Guitton J, Cohen S, Bourg C, et al. Poor efficacy of the combination of clarithromycin, amikacin, and cefoxitin against Mycobacterium abscessus in the hollow fiber infection model. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 30 janv 2025;24(1):10.

144. Louie A, Maynard M, Duncanson B, Nole J, Vicchiarelli M, Drusano GL. Determination of the Dynamically Linked Indices of Fosfomycin for Pseudomonas aeruginosa in the Hollow Fiber Infection Model. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 25 mai 2018;62(6):10.1128/aac.02627-17.

145. Velkov T, Bergen P, Lora-Tamayo J, Landersdorfer CB, Li J. PK/PD models in antibacterial development.

146. Résumé des caractéristiques du produit - LINEZOLIDE ARROW 2 mg/mL, solution pour perfusion - Base de données publique des médicaments [Internet]. [cité 15 oct 2024]. Disponible sur: https://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/affichageDoc.php?specid=68316916&typedoc=R

147. Hoover JL, Singley CM, Elefante P, DeMarsh P, Zalacain M, Rittenhouse S. Reducing Antibacterial Development Risk for GSK1322322 by Exploring Potential Human Dose Regimens in Nonclinical Efficacy Studies Using Immunocompetent Rats. Antimicrob Agents Chemother. nov 2017;61(11):e00959-17.

148. Tait JR, Harper M, Cortés-Lara S, Rogers KE, López-Causapé C, Smallman TR, et al. Ceftolozane-Tazobactam against Pseudomonas aeruginosa Cystic Fibrosis Clinical Isolates in the Hollow-Fiber Infection Model: Challenges Imposed by Hypermutability and Heteroresistance. Antimicrob Agents Chemother. 17 août 2023;67(8):e00414-23.

149. Strukova EN, Smirnova MV, Vostrov SN, Lubenko IY, Firsov AA, Zinner SH, et al. Linezolid pharmacodynamics with *Staphylococcus aureus* in an in vitro dynamic model. International Journal of Antimicrobial Agents. 1 mars 2009;33(3):251-4.

150. Tam VH, Kabbara S, Vo G, Schilling AN, Coyle EA. Comparative Pharmacodynamics of Gentamicin against Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother. août 2006;50(8):2626-31.

151. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-third informational supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. janv 2013;

152. Mouton JW. Soup with or without meatballs: Impact of nutritional factors on the MIC, kill-rates and growth-rates. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 1 déc 2018;125:23-7.

153. Kussmann M, Hauer S, Pichler P, Reznicek G, Burgmann H, Poeppl W, et al. Influence of different peritoneal dialysis fluids on the in vitro activity of fosfomycin against Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, and Pseudomonas aeruginosa. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. juin 2018;37(6):1091-8.

154. Tobudic S, Kratzer C, Poeppl W, Vychytil A, Burgmann H. Impact of Various Peritoneal Dialysis Solutions on the Growth of Common Bacterial and Yeast Pathogens. Perit Dial Int. nov 2011;31(6):688-92.

155. ALZET® Osmotic Pumps. Preparation of Artificial CSF [Internet]. ALZET® Osmotic Pumps. [cité 17 janv 2022]. Disponible sur: https://www.alzet.com/guide-to-use/preparation-of-artificial-csf/

156. Nectagen [Internet]. 2018 [cité 6 avr 2023]. Mouse ACSF. Disponible sur: https://www.nectagen.com/reference-data/solutions/mouse-acsf

157. CSH Protocols. Artificial cerebrospinal fluid (ACSF). Cold Spring Harb Protoc. 9 janv 2011;2011(9):pdb.rec065730.

158. Living Systems Instrumentation. Standard Artificial Cerebrospinal Fluid (ACSF) Solution [Internet]. Living Systems Instrumentation. [cité 27 févr 2023]. Disponible sur: https://livingsys.com/learning-resources/solutions-and-reagents/standard-acsf-solution/

159. Ecocyteshop [Internet]. [cité 6 avr 2023]. ACSF - Artificial Cerebrospinal Fluid (1000 ml) - Ready to use. Disponible sur: https://ecocyteshop.com/products/artificial-cerebrospinal-fluid-acsf-1000ml

160. Alreshidi M, Dunstan H, Roberts T, Alreshidi F, Hossain A, Bardakci F, et al. Cytoplasmic amino acid profiles of clinical and ATCC 29213 strains of Staphylococcus aureus harvested at different growth phases. Biomol Biomed [Internet]. 4 juin 2023 [cité 11 oct 2024]; Disponible sur: https://www.bjbms.org/ojs/index.php/bjbms/article/view/9246

161. Amann LF, Broeker A, Riedner M, Rohde H, Huang J, Nordmann P, et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation of tigecycline dosing in a hollow fiber infection model against clinical *bla*-KPC producing *Klebsiella Pneumoniae* isolates. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 1 févr 2024;108(2):116153.

162. Schmidt S, Sabarinath SN, Barbour A, Abbanat D, Manitpisitkul P, Sha S, et al. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling of the In Vitro Activities of Oxazolidinone Antimicrobial Agents against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. déc 2009;53(12):5039-45.

163. JGraph. diagrams.net, draw.io [Internet]. 2021. Disponible sur: https://www.diagrams.net/

164. Campion JJ, McNamara PJ, Evans ME. Pharmacodynamic Modeling of Ciprofloxacin Resistance in Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother. janv 2005;49(1):209-19.

165. Harigaya Y, Bulitta JB, Forrest A, Sakoulas G, Lesse AJ, Mylotte JM, et al. Pharmacodynamics of Vancomycin at Simulated Epithelial Lining Fluid Concentrations against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA): Implications for Dosing in MRSA Pneumonia. Antimicrob Agents Chemother. sept 2009;53(9):3894-901.

166. Mohamed AF, Nielsen EI, Cars O, Friberg LE. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Model for Gentamicin and Its Adaptive Resistance with Predictions of Dosing Schedules in Newborn Infants. Antimicrob Agents Chemother. janv 2012;56(1):179-88.

167. Mouton JW, Vinks AA, Punt NC. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of activity of ceftazidime during continuous and intermittent infusion. Antimicrob Agents Chemother. avr 1997;41(4):733-8.

168. Bigger JosephW. TREATMENT OF STAPHYLOCOCCAL INFECTIONS WITH PENICILLIN BY INTERMITTENT STERILISATION. The Lancet. 14 oct 1944;244(6320):497-500.

169. Nielsen EI, Viberg A, Löwdin E, Cars O, Karlsson MO, Sandström M. Semimechanistic Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Model for Assessment of Activity of Antibacterial Agents from Time-Kill Curve Experiments. Antimicrob Agents Chemother. janv 2007;51(1):128-36.

170. Balaban NQ, Merrin J, Chait R, Kowalik L, Leibler S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. Science. 10 sept 2004;305(5690):1622-5.

171. Barbour AM, Schmidt S, Zhuang L, Rand K, Derendorf H. Application of pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling and simulation for the prediction of target attainment of ceftobiprole against meticillin-resistant Staphylococcus aureus using minimum inhibitory concentration and time-kill curve based approaches. Int J Antimicrob Agents. janv 2014;43(1):60-7.

172. Zhuang L, He Y, Xia H, Liu Y, Sy SKB, Derendorf H. Gentamicin dosing strategy in patients with end-stage renal disease receiving haemodialysis: evaluation using a semi-mechanistic pharmacokinetic/pharmacodynamic model. J Antimicrob Chemother. avr 2016;71(4):1012-21.

173. Zhuang L, Sy SKB, Xia H, Singh RP, Mulder MB, Liu C, et al. Evaluation of in vitro synergy between vertilmicin and ceftazidime against Pseudomonas aeruginosa using a semi-mechanistic pharmacokinetic/pharmacodynamic model. Int J Antimicrob Agents. févr 2015;45(2):151-60.

174. Katsube T, Wajima T, Yamano Y, Yano Y. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling for concentration-dependent bactericidal activity of a bicyclolide, modithromycin. J Pharm Sci. avr 2014;103(4):1288-97.

175. Minichmayr IK, Aranzana-Climent V, Friberg LE. Pharmacokinetic/pharmacodynamic models for time courses of antibiotic effects | Elsevier Enhanced Reader [Internet]. [cité 6 janv 2023]. Disponible sur: https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0924857922001285?token=A17B8A2235AB8972AA75411778F5C4E4778114BB9C5C0B8B82080763CE868AFE4B66956C5B517F52F0F09AC6339C32F9&originRegion=eu-west-1&originCreation=20230106081938

176. Alffenaar JWC, Kosterink JGW, Altena R van, van der Werf TS, Uges DRA, Proost JH. Limited Sampling Strategies for Therapeutic Drug Monitoring of Linezolid in Patients With Multidrug-Resistant Tuberculosis. Therapeutic Drug Monitoring. févr 2010;32(1):97.

177. Srinivas NR, Syed M. Applicability of a Single Time Point Strategy for the Prediction of Area Under the Concentration Curve of Linezolid in Patients: Superiority of Ctrough- over Cmax-Derived Linear Regression Models. Drugs R D. mars 2016;16(1):69-79.

178. Lodise TP, Nau R, Kinzig M, Drusano GL, Jones RN, Sorgel F. Pharmacodynamics of ceftazidime and meropenem in cerebrospinal fluid: results of population pharmacokinetic modelling and Monte Carlo simulation. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 17 sept 2007;60(5):1038-44.

179. Blassmann U, Roehr AC, Frey OR, Vetter-Kerkhoff C, Thon N, Hope W, et al. Cerebrospinal fluid penetration of meropenem in neurocritical care patients with proven or suspected ventriculitis: a prospective observational study. Crit Care. 24 oct 2016;20:343.

180. König C, Grensemann J, Czorlich P, Schlemm E, Kluge S, Wicha SG. A dosing nomograph for cerebrospinal fluid penetration of meropenem applied by continuous infusion in patients with nosocomial ventriculitis. Clinical Microbiology and Infection. juill 2022;28(7):1022.e9-1022.e16.

181. Khan DD, Friberg LE, Nielsen EI. A pharmacokinetic–pharmacodynamic (PKPD) model based on *in vitro* time–kill data predicts the *in vivo* PK/PD index of colistin. J Antimicrob Chemother. juill 2016;71(7):1881-4.

182. Kristoffersson AN, David-Pierson P, Parrott NJ, Kuhlmann O, Lave T, Friberg LE, et al. Simulation-Based Evaluation of PK/PD Indices for Meropenem Across Patient Groups and Experimental Designs. Pharm Res. mai 2016;33(5):1115-25.

183. Kroemer N, Amann LF, Farooq A, Pfaffendorf C, Martens M, Decousser JW, et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis of ceftazidime/avibactam and fosfomycin combinations in an *in vitro* hollow fiber infection model against multidrug-resistant *Escherichia coli*. Asempa TE, éditeur. Microbiol Spectr. 11 janv 2024;12(1):e03318-23.

184. O'Donnell J, Tanudra A, Chen A, Miller AA, McLeod SM, Tommasi R. In vitro pharmacokinetics/pharmacodynamics of the β-lactamase inhibitor, durlobactam, in combination with sulbactam against Acinetobacter baumannii-calcoaceticus complex. Antimicrob Agents Chemother. 2024;68(1):e00312-23.

185. Pichereau S, Pantrangi M, Couet W, Badiou C, Lina G, Shukla SK, et al. Simulated Antibiotic Exposures in an *In Vitro* Hollow-Fiber Infection Model Influence Toxin Gene Expression and Production in Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Strain MW2. Antimicrob Agents Chemother. janv 2012;56(1):140-7.

186. Mroue N, Arya A, Brown Gandt A, Russell C, Han A, Gavrish E, et al. Pharmacodynamics of ClpP-Activating Antibiotic Combinations against Gram-Positive Pathogens. Antimicrob Agents Chemother. 20 déc 2019;64(1):e01554-19.

187. Middlebrook 7H9 Broth Base suitable for microbiology, NutriSelect® Plus, Recommended for use in isolation and cultivation of Mycobacterium species [Internet]. [cité 17 mars 2025]. Disponible sur: https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/product/sial/m0178

188. Middlebrook OADC Growth Supplement Enrichment supplement recommended for isolation and cultivation of Mycobacteria, suitable for microbiology [Internet]. [cité 17 mars 2025]. Disponible sur: https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/product/sial/m0678

189. Mueller Hinton Broth suitable for microbiology, NutriSelect® Plus [Internet]. [cité 17 mars 2025]. Disponible sur: https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/product/sial/70192

190. Nielsen EI, Cars O, Friberg LE. Predicting *In Vitro* Antibacterial Efficacy across Experimental Designs with a Semimechanistic Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Model. Antimicrob Agents Chemother. avr 2011;55(4):1571-9.

191. Zhao M, Lepak AJ, Andes DR. Animal models in the pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation of antimicrobial agents. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 15 déc 2016;24(24):6390-400.

192. Jacqueline C. In vitro activity of linezolid alone and in combination with gentamicin, vancomycin or rifampicin against methicillin-resistant Staphylococcus aureus by time-kill curve methods. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1 avr 2003;51(4):857-64.

193. Spector R. Vitamin Homeostasis in the Central Nervous System. New England Journal of Medicine. 16 juin 1977;296(24):1393-8.

194. Saito K, Hattori K, Hidese S, Sasayama D, Miyakawa T, Matsumura R, et al. Profiling of Cerebrospinal Fluid Lipids and Their Relationship with Plasma Lipids in Healthy Humans. Metabolites. 24 avr 2021;11(5):268.

195. Hooshmand K, Xu J, Simonsen AH, Wretlind A, de Zawadzki A, Sulek K, et al. Human Cerebrospinal Fluid Sample Preparation and Annotation for Integrated Lipidomics and Metabolomics Profiling Studies. Mol Neurobiol. 1 avr 2024;61(4):2021-32.

196. MEM Amino Acids (50x) solution Without L-glutamine, liquid, sterile-filtered, BioReagent, suitable for cell culture [Internet]. [cité 22 mars 2025]. Disponible sur: https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/product/sigma/m5550

197. Wang J, Su Y, Jia F, Jin H. Characterization of casein hydrolysates derived from enzymatic hydrolysis. Chemistry Central Journal. déc 2013;7(1):62.

198. 11905 - Chemically Defined Lipid Concentrate - FR [Internet]. [cité 22 mars 2025]. Disponible sur: https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/technical-resources/media-formulation.249.html

199. The Basics of Fetal Bovine Serum Use - FR [Internet]. [cité 22 mars 2025]. Disponible sur: https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-environment/culture-media/fbs-basics.html

200. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. Crit Rev Biotechnol. mars 2017;37(2):163-76.

201. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. CP in Immunology [Internet]. janv 2018 [cité 18 mars 2025];120(1). Disponible sur: https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cpim.40

202. Miyamoto T, Homma H. D-Amino acid metabolism in bacteria. The Journal of Biochemistry. 22 sept 2021;170(1):5-13.

203. Kuru E, Hughes HV, Brown PJ, Hall E, Tekkam S, Cava F, et al. In Situ Probing of Newly Synthesized Peptidoglycan in Live Bacteria with Fluorescent D -Amino Acids. Angew Chem Int Ed. 7 déc 2012;51(50):12519-23.

204. Peyrusson F, Varet H, Nguyen TK, Legendre R, Sismeiro O, Coppée JY, et al. Intracellular Staphylococcus aureus persisters upon antibiotic exposure. Nat Commun. déc 2020;11(1):2200.

205. Lacroix M, Moreau J, Zampaloni C, Bissantz C, Shirvani H, Marchand S, et al. Impact of nutritional factors on *in vitro* PK/PD modelling of polymyxin B against various strains of *Acinetobacter baumannii*. International Journal of Antimicrobial Agents. 1 juill 2024;64(1):107189.

206. Agbayani MM, Braun J, Chang CT, Glass L, Evans HE. Effect of CSF on Bacterial Growth. Archives of Neurology. 1 janv 1981;38(1):43-5.

207. Hoover JL, Singley CM, Elefante P, Rittenhouse S. Efficacy of Human Exposures of Gepotidacin (GSK2140944) against Escherichia coli in a Rat Pyelonephritis Model. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 24 juin 2019;63(7):10.1128/aac.00086-19.

Etude pharmacocinétique/pharmacodynamique du linézolide utilisé dans le traitement des infections neuroméningées associées aux soins

Le schéma posologique recommandé du linézolide (600 mg toutes les 12 h) ne permettrait pas d'atteindre les critères PK/PD requis pour une efficacité optimale dans les infections neuro-méningées associées aux soins causées par *Staphylococcus* spp. Ainsi, cette thèse s'est attachée à optimiser le schéma posologique du linézolide dans le traitement de ces infections par des approches PK/PD à travers trois études complémentaires :

1. **Définition de l'index PK/PD du linézolide pour les infections cérébrales.**

L'index PK/PD du linézolide a été défini dans les infections cérébrales à l'aide de simulations. Ces dernières s'appuient sur un modèle PK élaboré à partir des concentrations de linézolide dans le LCS obtenues en clinique, couplé à un modèle PD basé sur des courbes de bactéricidie en concentrations statiques de linézolide sur neuf souches de *Staphylococcus* spp. Cette étude a montré que l'efficacité du linézolide dans les infections cérébrales est corrélée au ratio *f*AUC/CMI.

2. **Développement d'une approche expérimentale et computationnelle pour reproduire les profils PK tissulaires dans un modèle *in vitro* d'infection.**

Les modèles d'infection *in vitro* de type *hollow-fiber* (HFIM) reproduisent traditionnellement les concentrations plasmatiques observées chez les patients. Toutefois, dans le contexte des infections cérébrales, les profils PK plasmatiques diffèrent significativement des profils PK LCS. Cette deuxième étude a permis de développer une approche combinant modélisation et expérimentation afin de reproduire dans un HFIM des profils PK tissulaires présentant une phase d'absorption de premier ordre. Cette méthodologie a été appliquée avec succès à la reproduction des profils PK du linézolide observés dans le LCS des patients de réanimation.

3. **Étude PK/PD du linézolide vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* dans un modèle HFIM simulant les concentrations cérébrales.**

Cette dernière étude s'est attachée à caractériser la relation PK/PD du linézolide contre *Staphylococcus aureus* dans un modèle HFIM innovant, où les concentrations simulées correspondaient à celles mesurées dans le LCS, et non dans le plasma. Pour se rapprocher des conditions cliniques, l'impact du milieu a été évalué en développant un LCS artificiel reproduisant la composition physiologique du LCS humain. Bien que la composition du LCS artificiel nécessite une optimisation, la croissance bactérienne et l'effet du linézolide y sont réduits par rapport aux milieux de culture conventionnels.

Ces travaux apportent des méthodes transversales, combinant expérimentations et modélisation PK/PD, utiles et transposables pour l'optimisation posologique des anti-infectieux utilisés dans le traitement des infections cérébrales.

Mots-clés : hollow-fiber, linézolide, *Staphylococcus* spp., liquide cérébrospinal, modélisation PK/PD, infections neuroméningées