



# Méthodes d'évaluation de l'efficacité des antibiotiques en biofilm

Françoise Van Bambeke, PharmD, PhD

Pharmacologie cellulaire et moléculaire  
Louvain Drug Research Institute  
Université catholique de Louvain,  
Brussels, Belgium

<[www.facm.ucl.ac.be](http://www.facm.ucl.ac.be)>

# Antibiotiques et biofilms en pratique clinique

Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg. 2013 Nov 22. [Epub ahead of print]

## When and how should we treat biofilms in chronic sinusitis?

Jain R, Douglas R.



March 2013 Volume 57 Number 3

## Reduced Vancomycin Susceptibility in an *In Vitro* Catheter-Related Biofilm Model Correlates with Poor Therapeutic Outcomes in Experimental Endocarditis Due to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

Wessam Abdelhady,<sup>a</sup> Arnold S. Bayer,<sup>a,b</sup> Kati Seidl,<sup>c</sup> Cynthia C. Nast,<sup>b,d</sup> Megan R. Kiedrowski,<sup>e</sup> Alexander R. Horswill,<sup>e</sup> Michael R. Yeaman,<sup>a,b</sup> Yan Q. Xiong<sup>a,b</sup>

Antimicrobial Agents and Chemotherapy p. 1447-1454



Contents lists available at ScienceDirect

Microbial Pathogenesis

Microbial Pathogenesis 51 (2011) 58-68

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/micpath](http://www.elsevier.com/locate/micpath)

## Biofilm formation or internalization into epithelial cells enable *Streptococcus pyogenes* to evade antibiotic eradication in patients with pharyngitis

Taiji Ogawa<sup>a,e</sup>, Yutaka Terao<sup>a</sup>, Hisashi Okuni<sup>b</sup>, Keiko Ninomiya<sup>c</sup>, Hiroshi Sakata<sup>e</sup>, Yoshinobu Maeda<sup>e</sup>, Shigetada Kawabata<sup>a,\*</sup>

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Sept. 2003, p. 4043-4048  
0095-1137/03/\$08.00+0 DOI: 10.1128/JCM.41.9.4043-4048.2003  
Copyright © 2003, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

## Biofilm Formation by Group A Streptococci: Is There a Relationship with Treatment Failure?

Joslyn Conley,<sup>1</sup> Merle E. Olson,<sup>2</sup> Linda S. Cook,<sup>1</sup> Howard Ceri,<sup>3</sup> Van Phan,<sup>3</sup> and H. Dele Davies<sup>1,2,4\*</sup>

Pathog Dis. 2013 Nov;69(2):142-8. doi: 10.1111/2049-632X.12100. Epub 2013 Oct 7.

## The presence of antibiotic-resistant nosocomial pathogens in endotracheal tube biofilms and corresponding surveillance cultures.

Vandecandelaere I, Matthijs N, Nelis HJ, Depuydt P, Coenye T.



Journal of Endodontics

Volume 39, Issue 5, May 2013, Pages 712-718



Case Report/Clinical Techniques

## Exuberant Biofilm Infection in a Lateral Canal as the Cause of Short-term Endodontic Treatment Failure: Report of a Case

Domenico Ricucci, MD, DDS\*, Simona Loghin, DDS\*, José F. Siqueira Jr., DDS, MSc, PhD†

Int J Artif Organs 2011; 34(9): 737-751

REVIEW

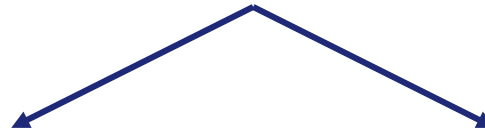
## Antibiotic-induced biofilm formation

Jeffrey B. Kaplan

Vol. 41, No. 9

→ échecs thérapeutiques pas rares ...

# Modèles statiques in vitro



pegs



plaques multi-puits

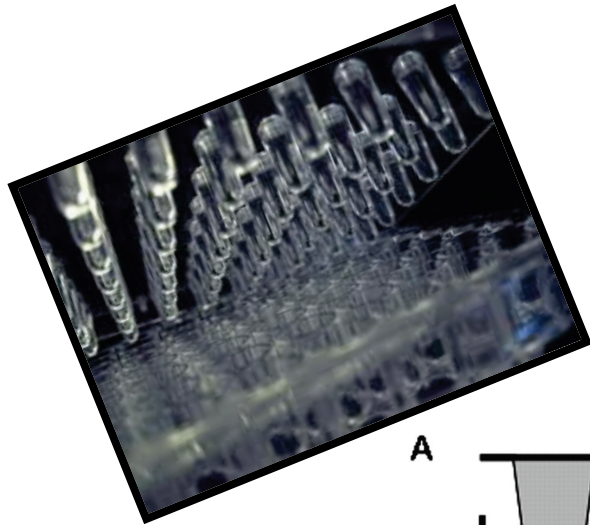


# Activité antibiotique: cultures planctoniques vs. biofilms

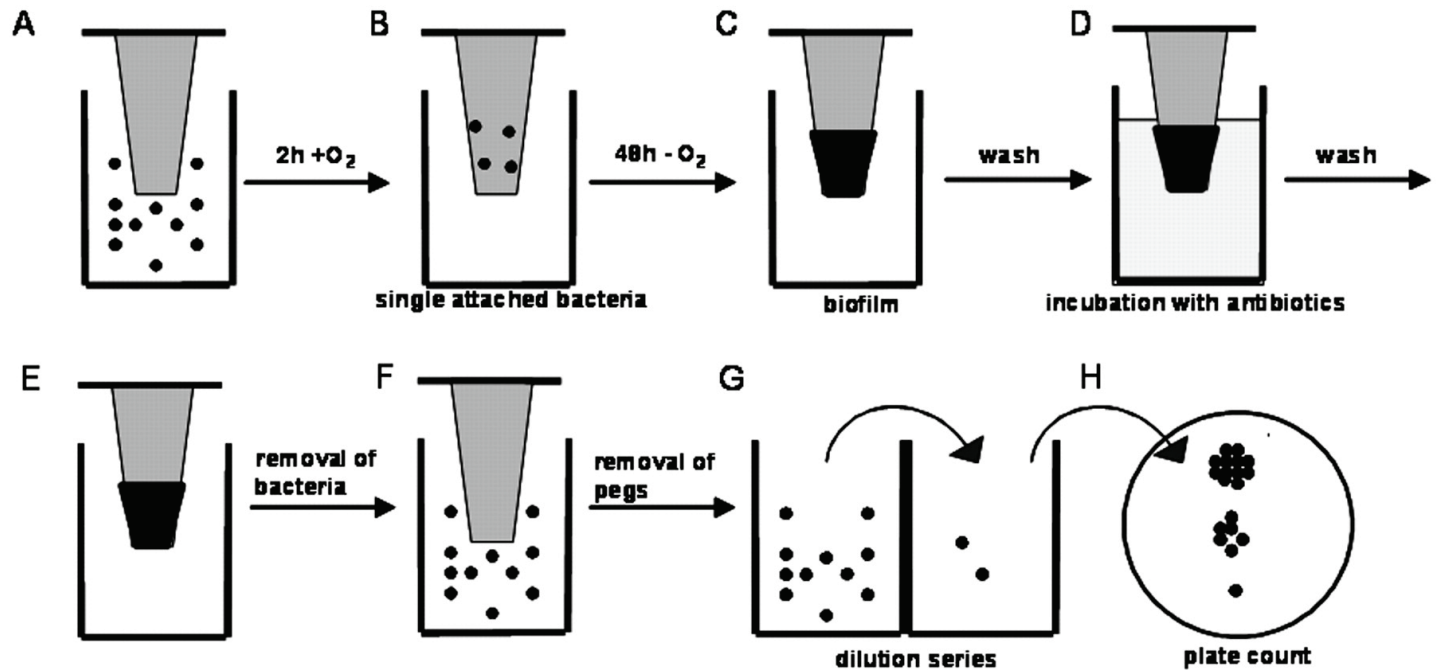
Parameter	Abbreviation	Definition
Minimal inhibitory concentration	MIC	The lowest concentration of an antibiotic that inhibits the visible growth of a planktonic culture after overnight incubation
Minimal biofilm inhibitory concentration	MBIC	The lowest concentrations of an antibiotic that resulted in an OD650 difference at or below 10% (1 Log difference in growth after 6 h of incubation) of the mean of two positive control well readings.
Minimal bactericidal concentration	MBC	The lowest concentration of an antibiotic producing a 99.9% CFUs reduction of the initial inoculum of a planktonic culture.
Biofilm bactericidal concentration	BBC	The lowest concentration of an antibiotic producing a 99.9% reduction of the CFUs recovered from a biofilm culture compared to growth control.
Minimal biofilm eradication concentration	MBEC	The lowest concentration of an antibiotic that prevents visible growth in the recovery medium used to collect biofilm cells.
Biofilm prevention concentration	BPC	Same as MBIC but bacterial inoculation and antibiotic exposure occur simultaneously.

Macià et al, *Clin Microbiol Infect.* 2014 Apr 26

# Modèles statiques: "Calgary Biofilm Device"



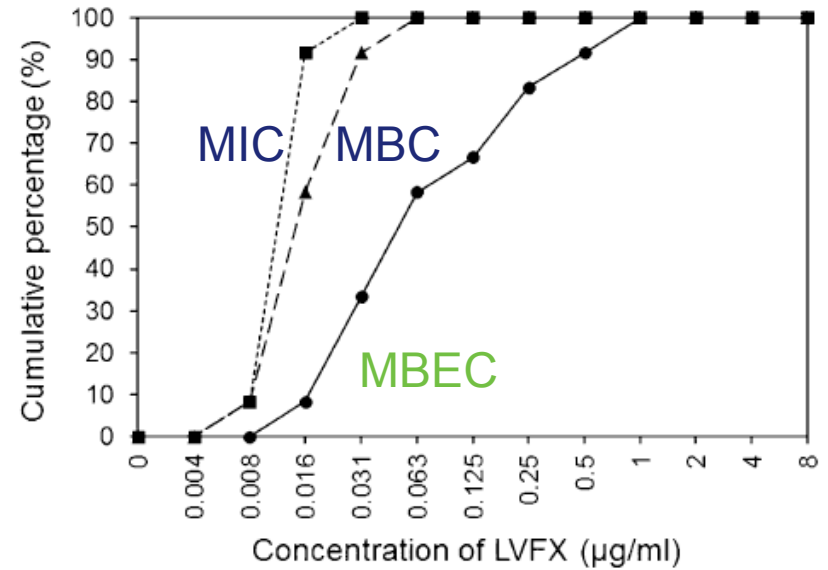
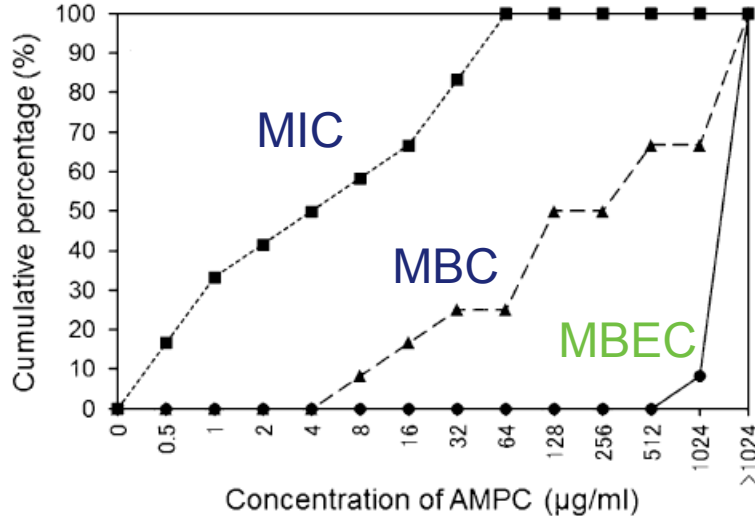
## Détermination de la "Minimal Biofilm Eradication Concentration" (MBEC)



Ceri et al, *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37:1771-6; Herrmann et al, *J Infect Dis.* 2010;202:1585-92

# Activité antibiotique: cultures planctoniques vs. biofilms

ampicilline et lévofloxacine vs. *H. influenzae* (< liquide de l'oreille moyenne)

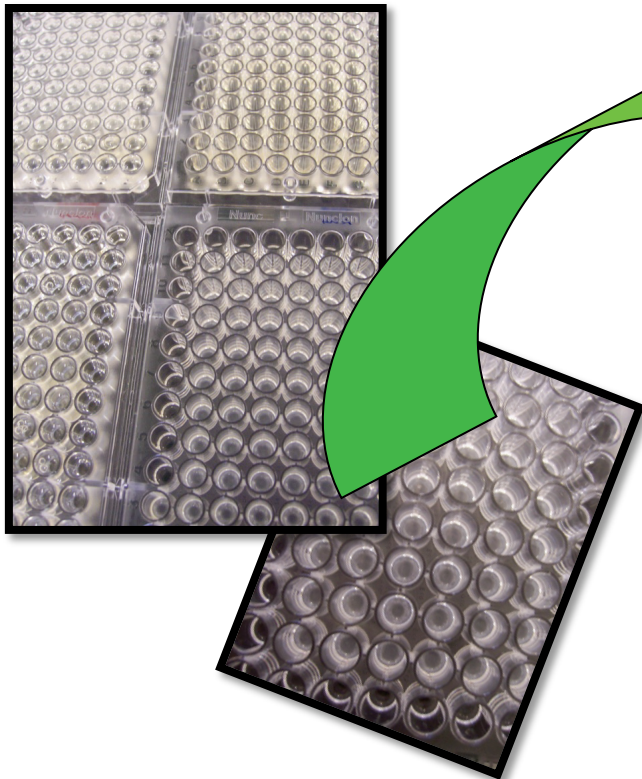


Takei et al, *J Infect Chemother* (2013) 19:504–9



# Modèles statiques: plaques à 96 puits en polystyrène

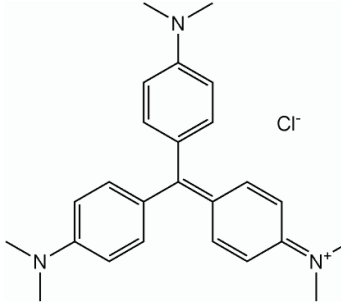


colorants  
appropriés pour évaluer  
la biomasse  
ou la charge bactérienne



# Mesure de la biomasse / viabilité dans le biofilm

**biomasse**

crystal violet



*Christensen et al, Infect. Immun. 1982; 37:318–26*

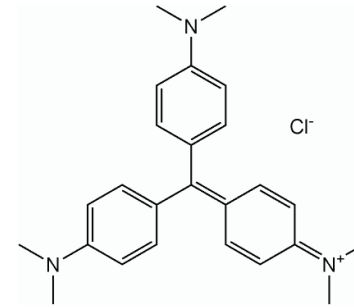
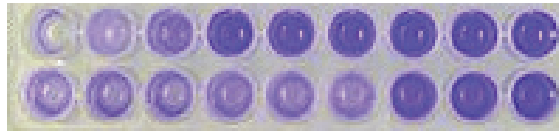


# Mesure de la biomasse / viabilité dans le biofilm

**biomasse**



**crystal violet**

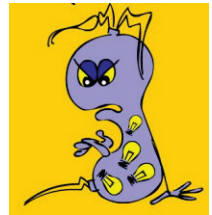


*Christensen et al, Infect. Immun. 1982; 37:318–26*

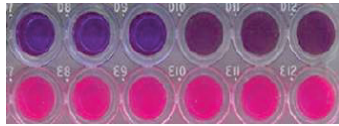
Gram(+)

**activité métabolique**

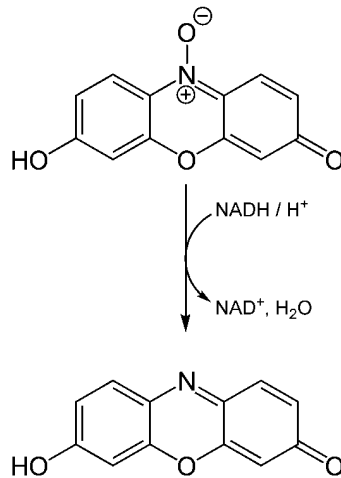
Gram(-)



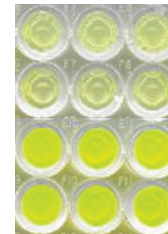
**resazurin**



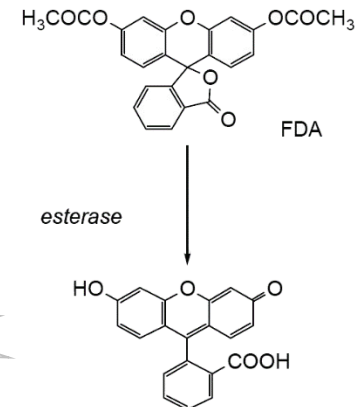
**resorufine**



**fluoresceine diacetate**



**fluoresceine**

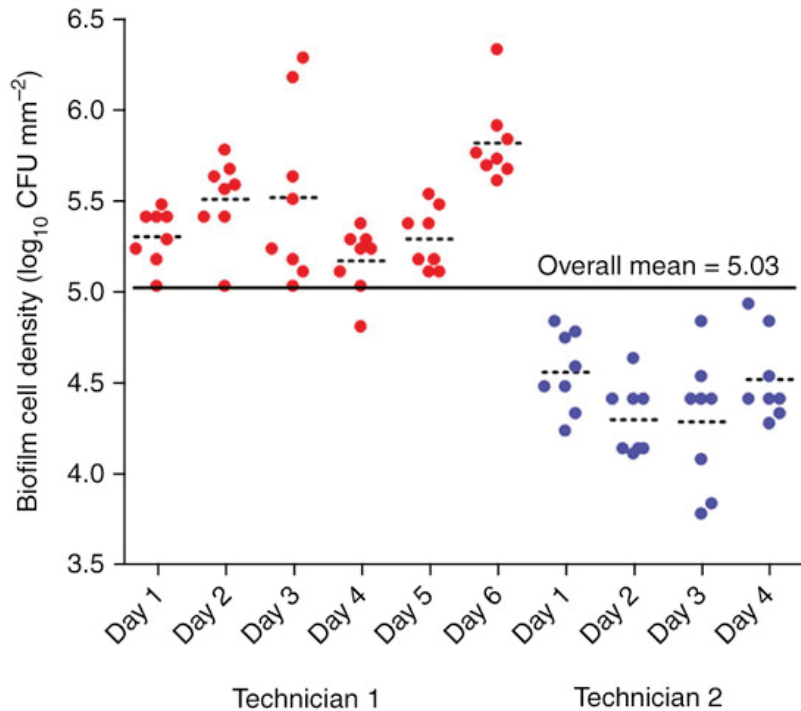


*Tote et al, 2008; Lett. Appl. Microbiol. 46:249–254*

*Wanandy et al, J Microbiol Methods 2005;60:21-30*

# Distinction entre effets statique et tidal

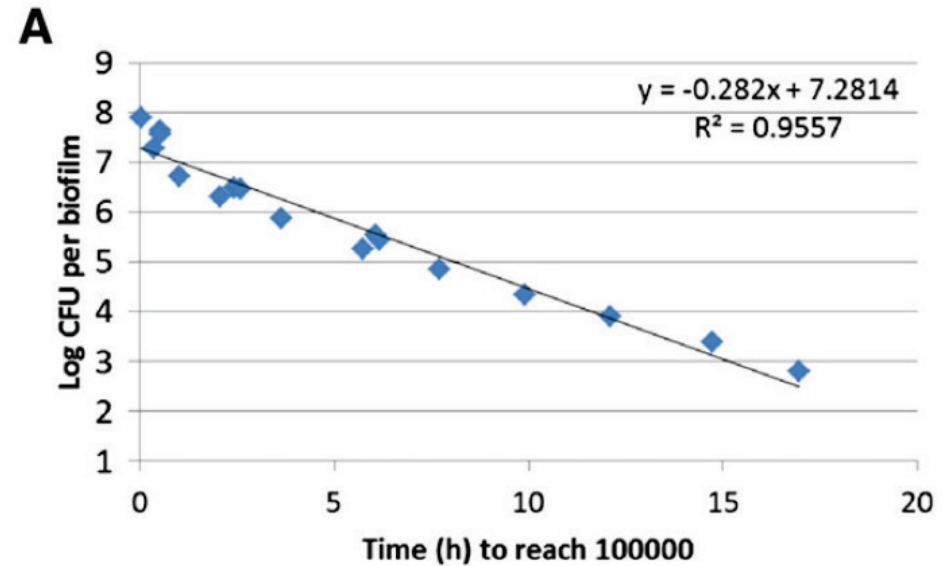
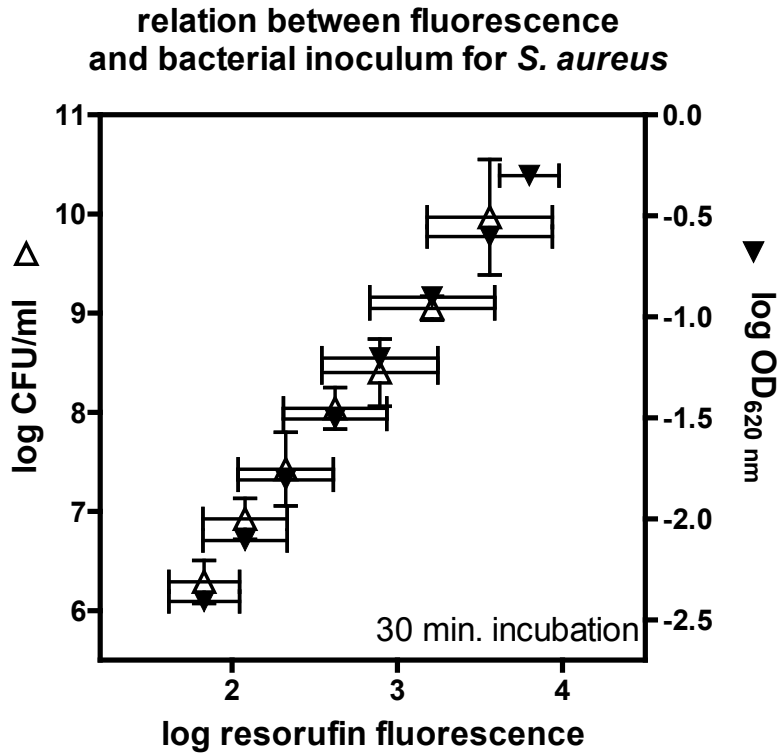
## Comptage des UFC





# Comptage des UFC vs. fluorescence de RF

an exemple pour *S. aureus*



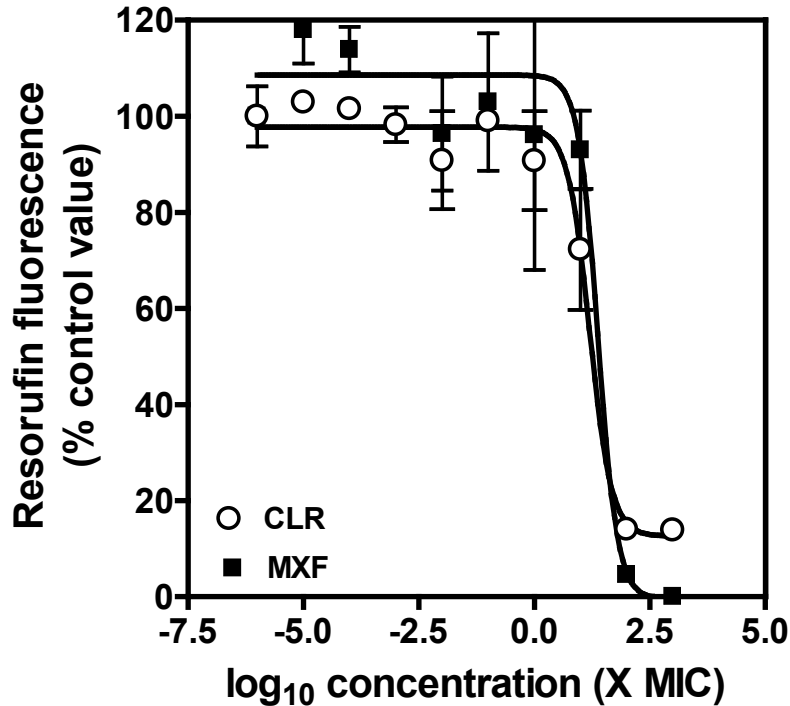
UFC & signal RF proportionnels

Sensibilité ~ temps d'incubation

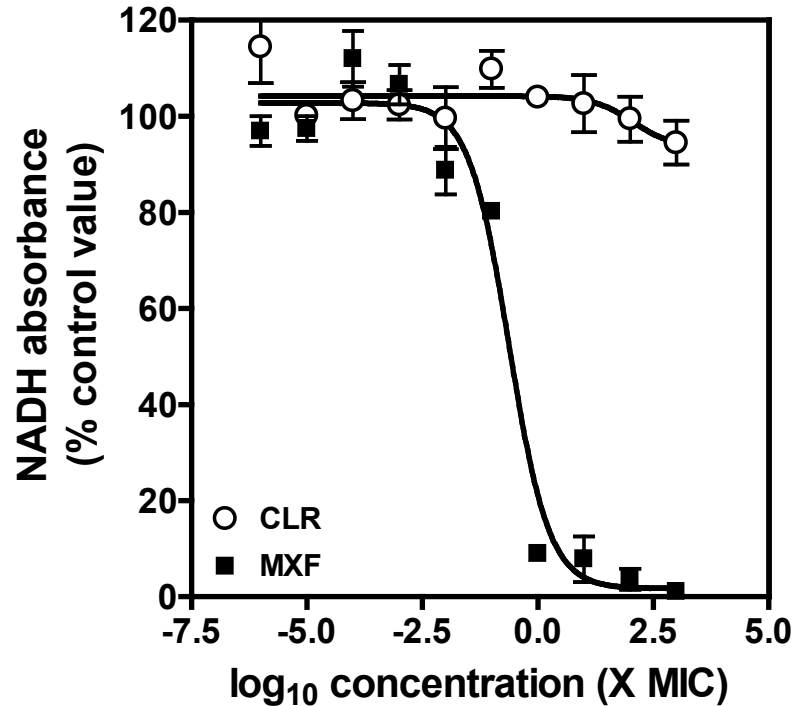
# NADH oxidase vs. fluorescence de RF

un exemple pour *S. pneumoniae*

○ clarithromycin (bacteristatic) vs ■ moxifloxacin (bactericidal)



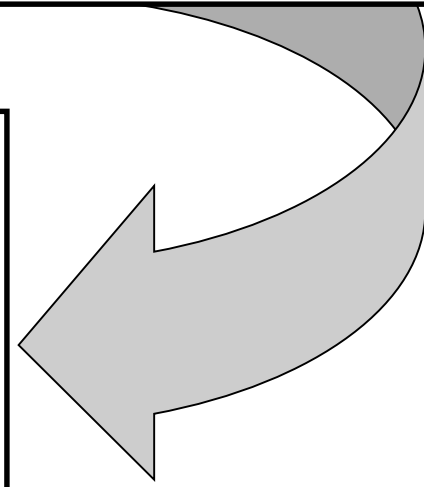
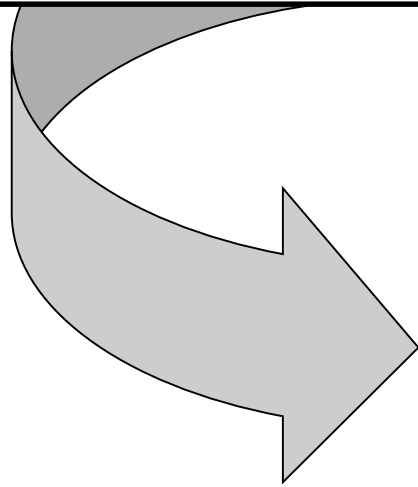
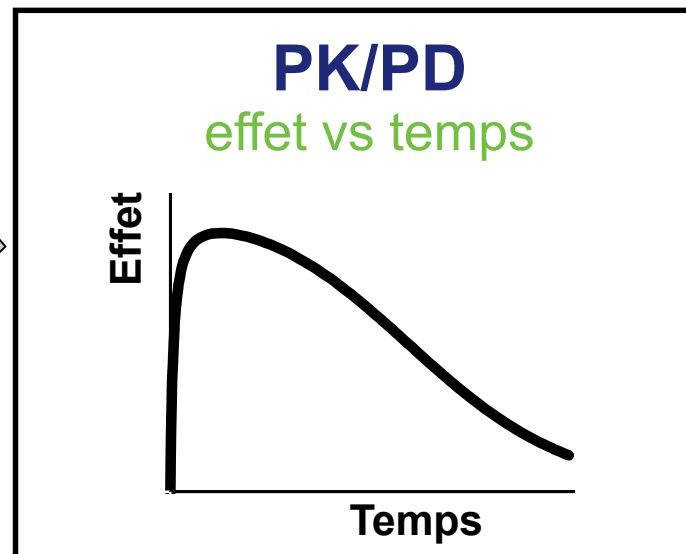
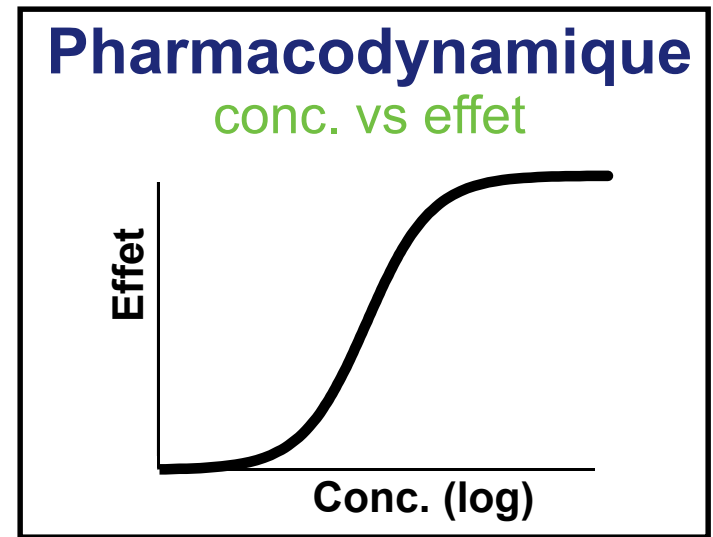
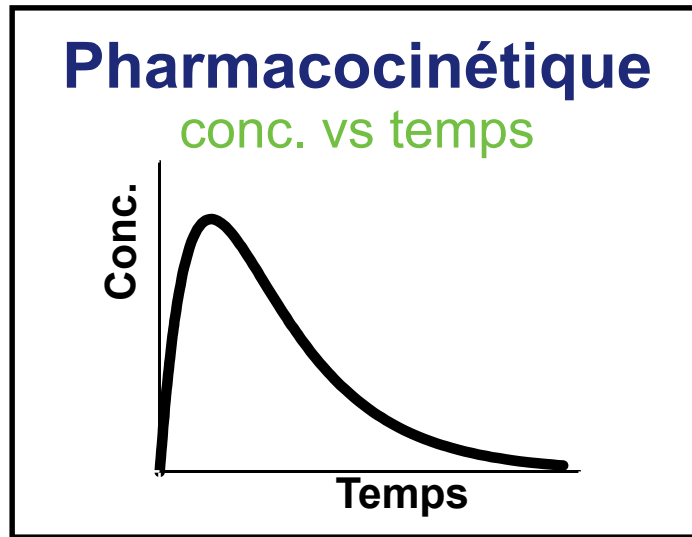
bactéries vivantes restantes



bactéries mortes

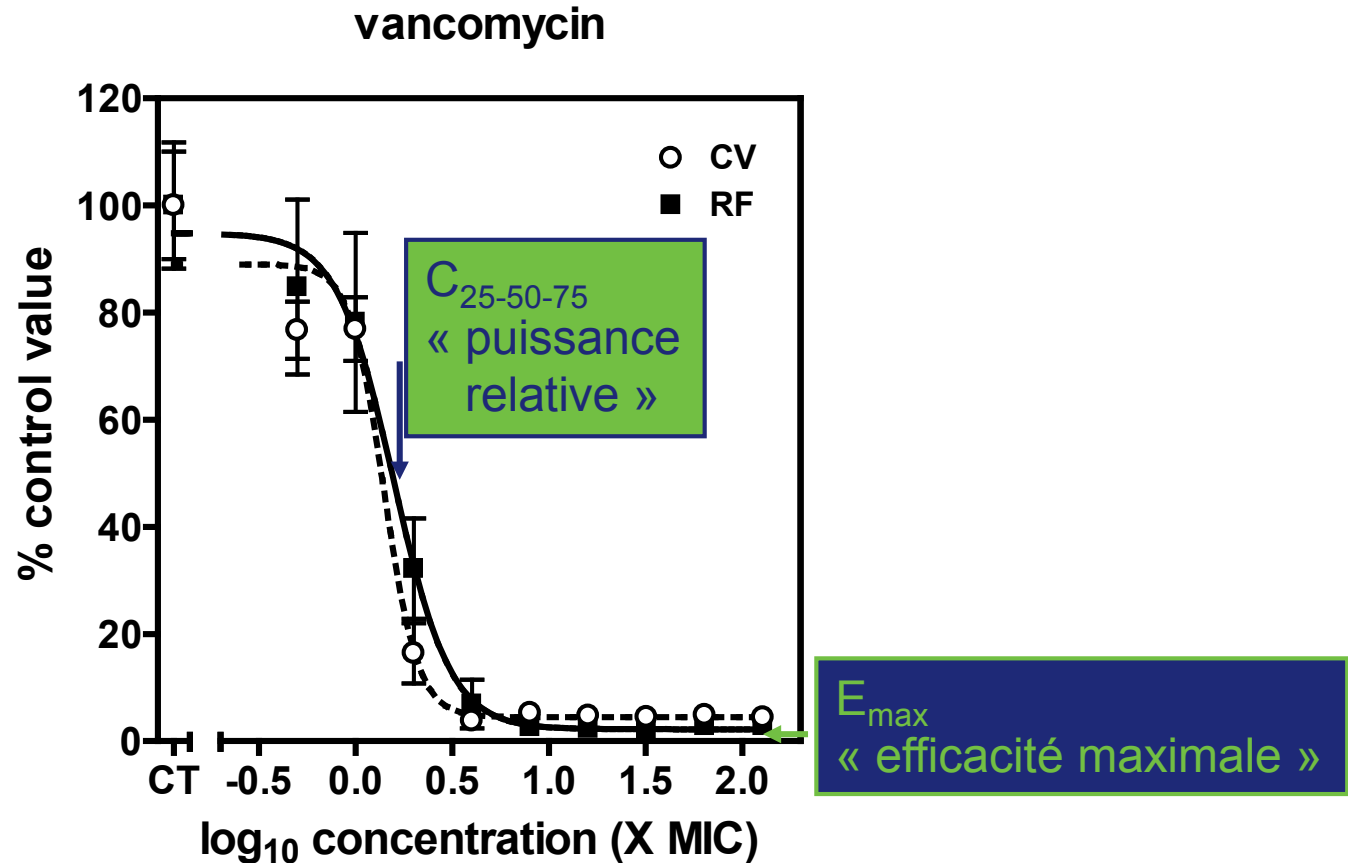


# Etudes PK/PD : quelques exemples



# Modèle pharmacodynamique en bref

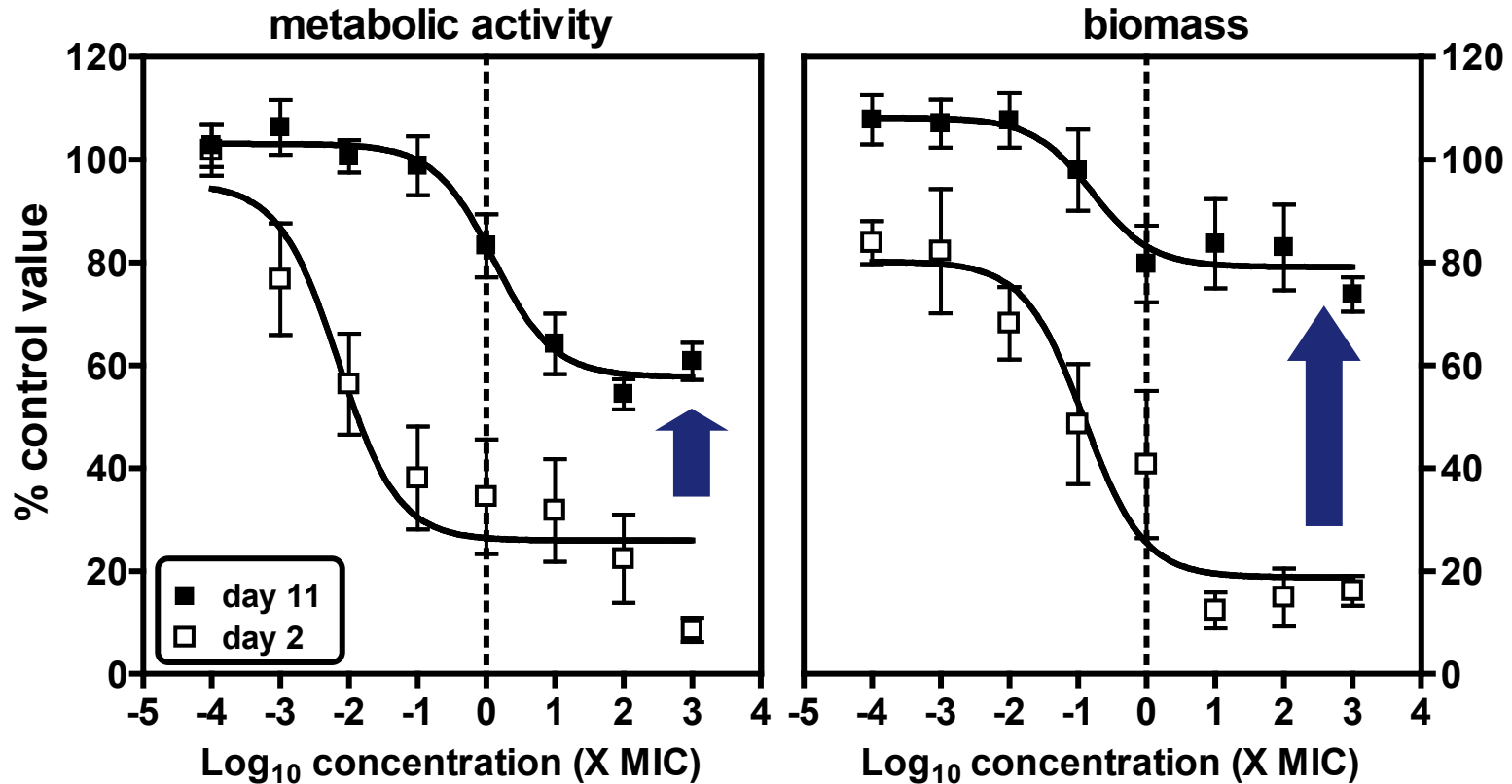
an exemple avec un biofilm jeune de *S. aureus*



# Biofilms de *S. pneumoniae*: influence de la maturité



moxifloxacin

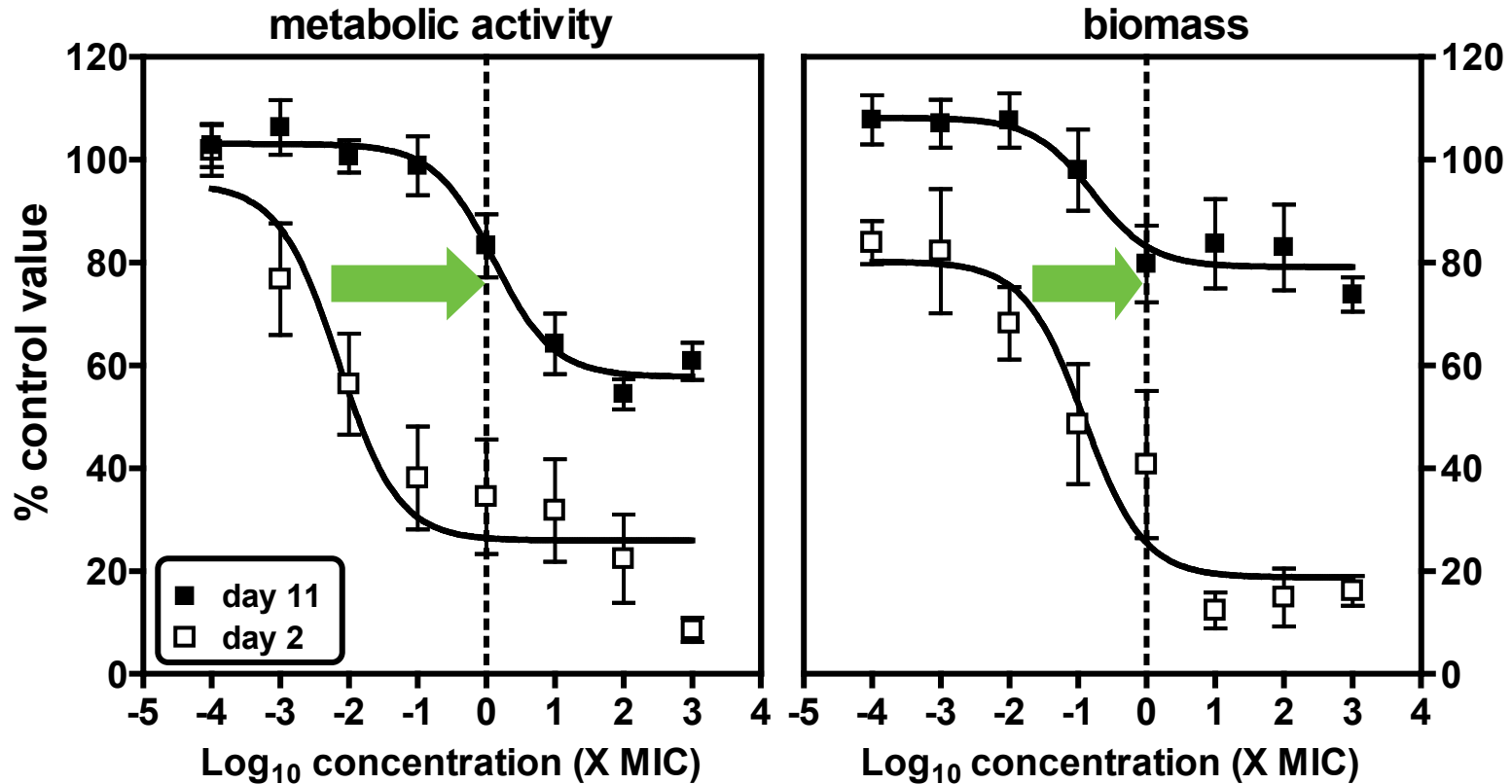


Emax ↘ avec la maturité

# Biofilms de *S. pneumoniae*: influence de la maturité



moxifloxacin



Puissance relative ↘ avec maturité

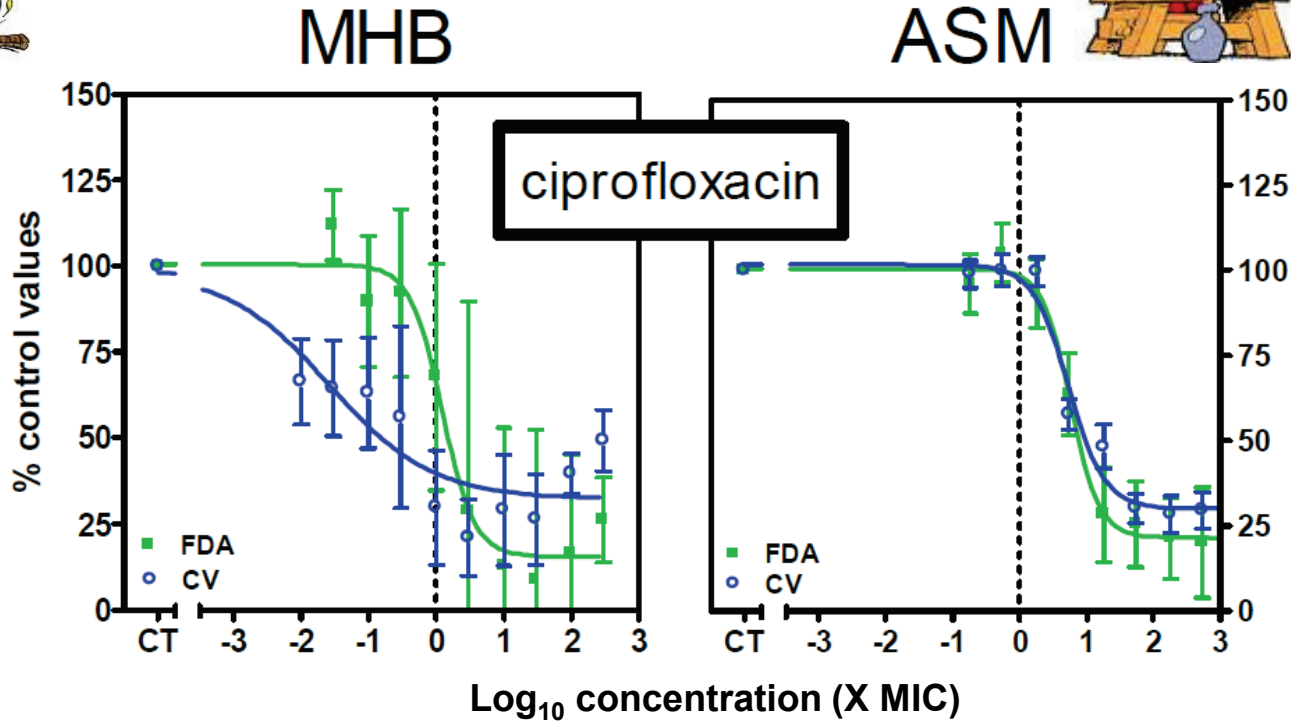
# Biofilms de *P. aeruginosa*: influence du milieu



beef infusion solids,  
casein hydrolysate,  
starch



mucin, DNA,  
DTPA,  
casaminoacids,  
NaCl, KCl, tris  
base, egg yolk  
emulsion



Puissance relative réduite dans ASM



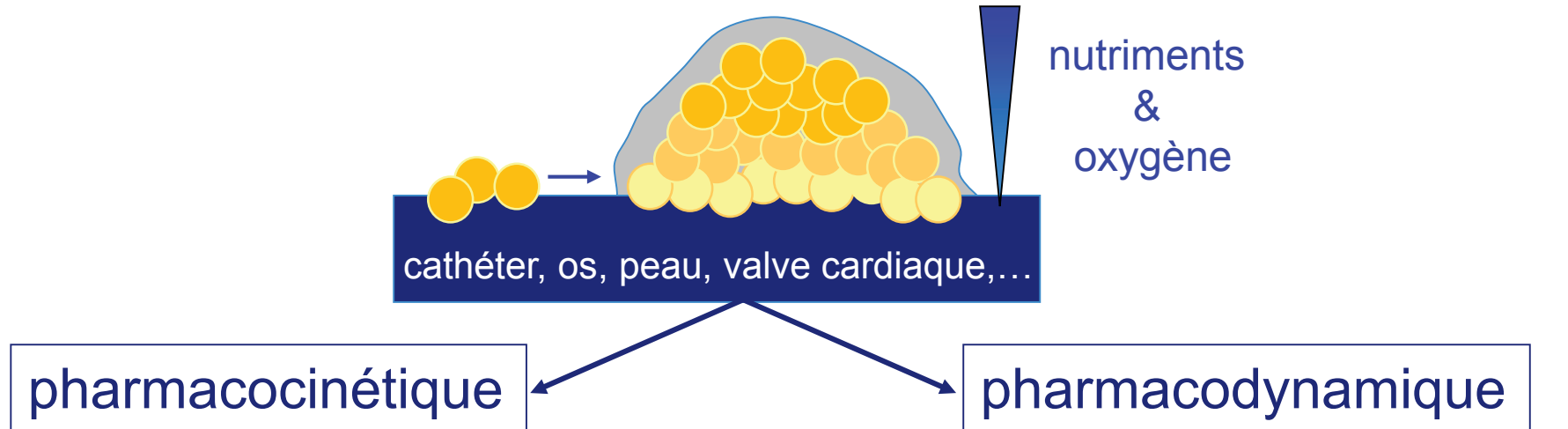
# Biofilms de *P. aeruginosa*: influence du milieu



antibiotique	CMI (mg/L)			
	contrôle	+ mucine	+ ADN	+ jaune d'oeuf
CIP	0.06	0.06	<b>0.5</b>	<b>4</b>
CST	1	<b>16</b>	1	1
AMK	1	1	<b>64</b>	<b>64</b>
CAZ	1	<b>64</b>	1	4
MEM	0.5	0.5	0.5	<b>&gt; 64</b>

Interaction avec les constituants du milieu

# Paramètres PK/PD dans les biofilms



- diffusibilité ~ matrice
- biodisponibilité dans le biofilm
- accès aux bactéries
- efflux hors des bactéries

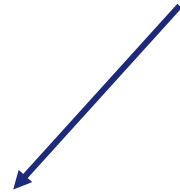
- réponse bactérienne (activité métabolique)
- expression d'activité antibiotique (environnement local [ $O_2$ , pH, ..])



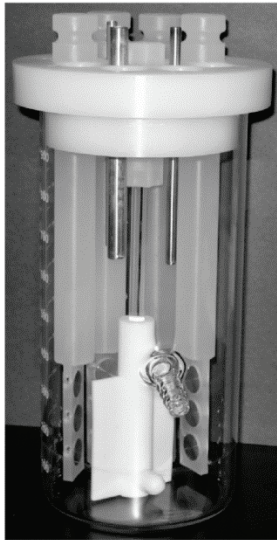
Janssen, Nature 2009



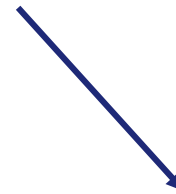
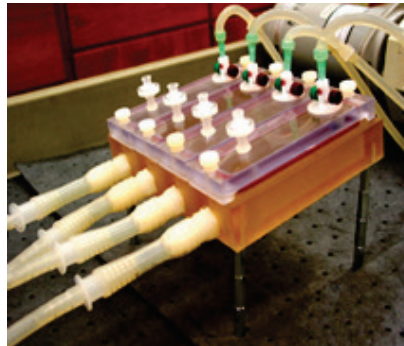
# Modèles dynamiques *in vitro*



apport  
permanent  
de fluide



remplacement  
unidirectionnel  
de fluide



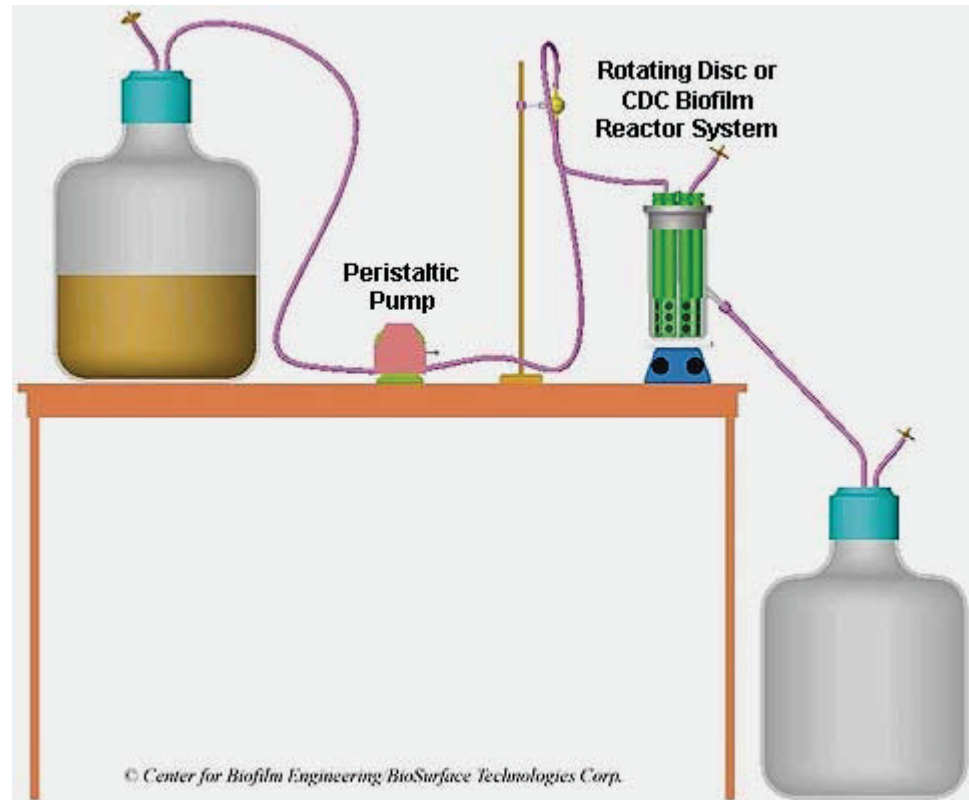
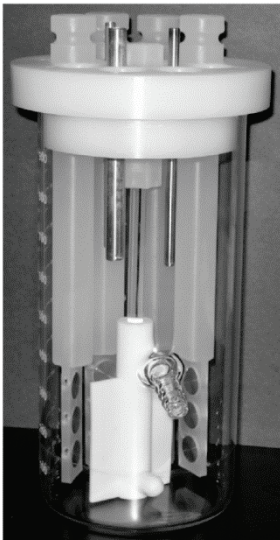
conditions  
constantes



# Modèles dynamiques: bioréacteurs

## Réacteur du CDC:

- mélange constant  
→ expériences de cinétique avec changement de la composition du milieu
- forces de cisaillement élevées

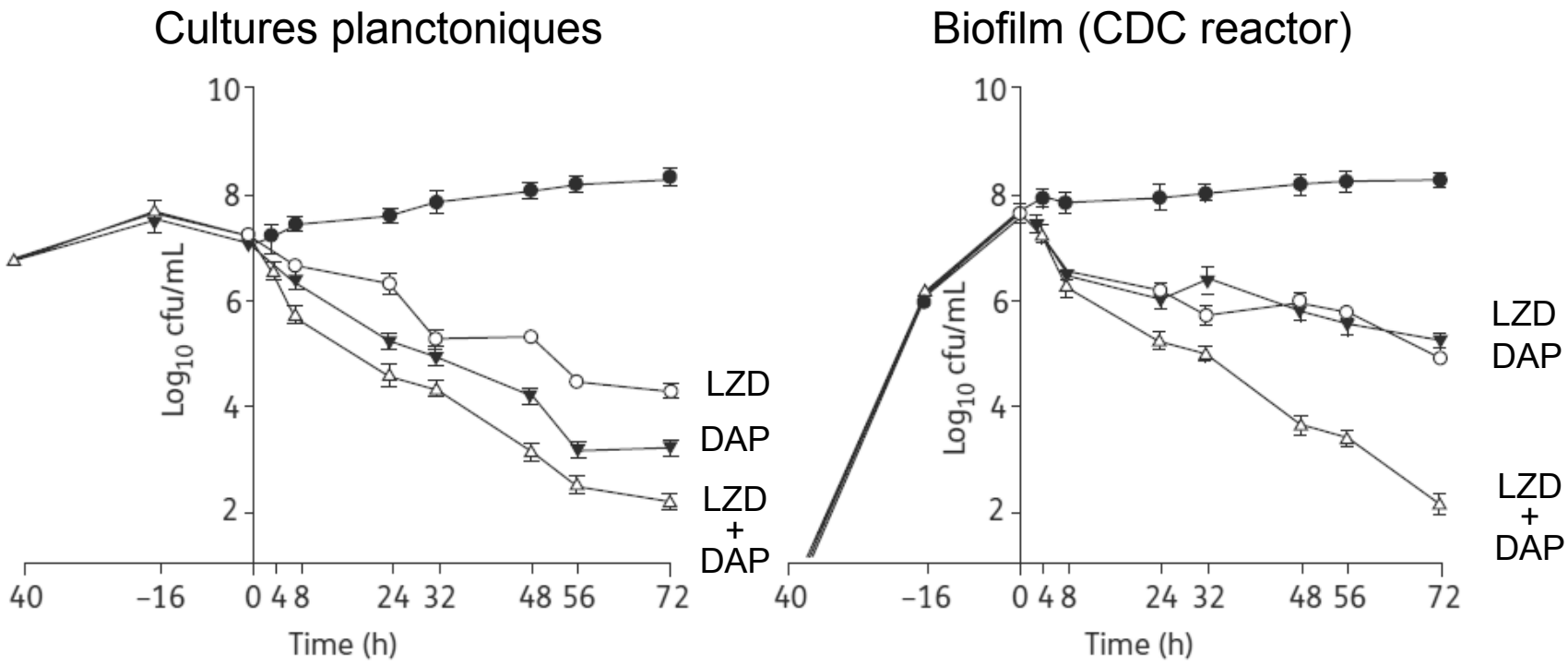


# Activité antibiotique en mimant l'exposition chez l'homme

## Réacteur du CDC

*S. aureus*

Dosages simulés:  
DAP (10 mg/kg 1x/jour) / LZD (600 mg 2X/jour)



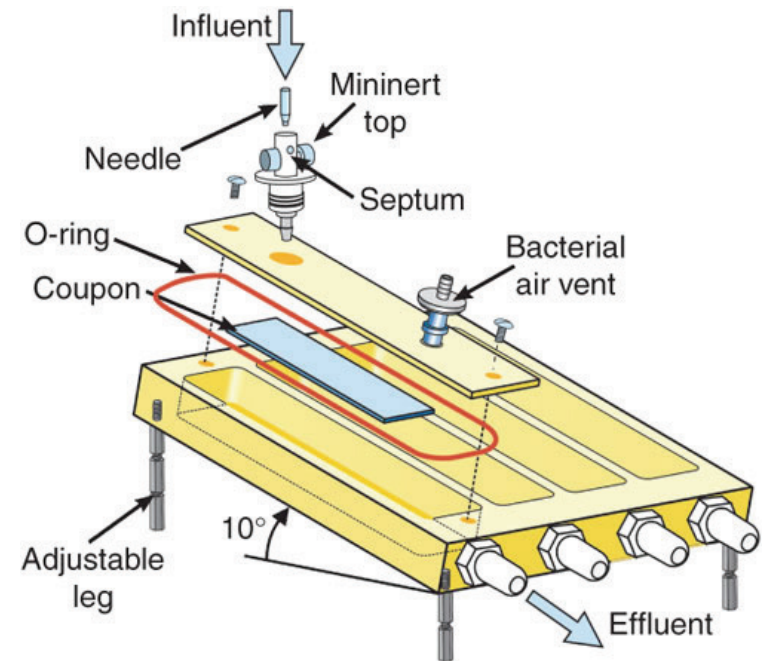
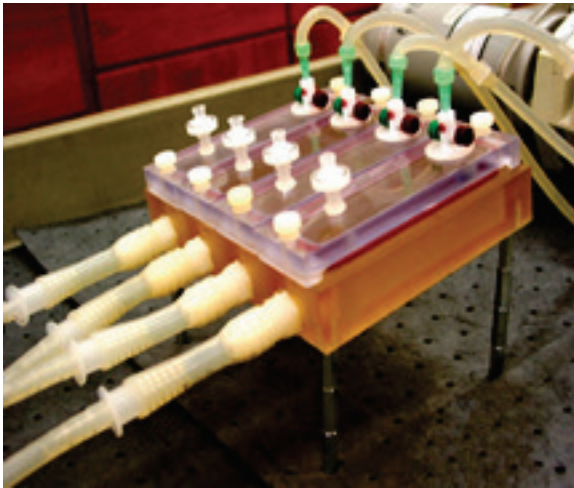
Combinaison plus utile sur les biofilms que les cultures planctoniques



# Modèles dynamiques: bioréacteurs

## Réacteur à perfusion (drip flow reactor) :

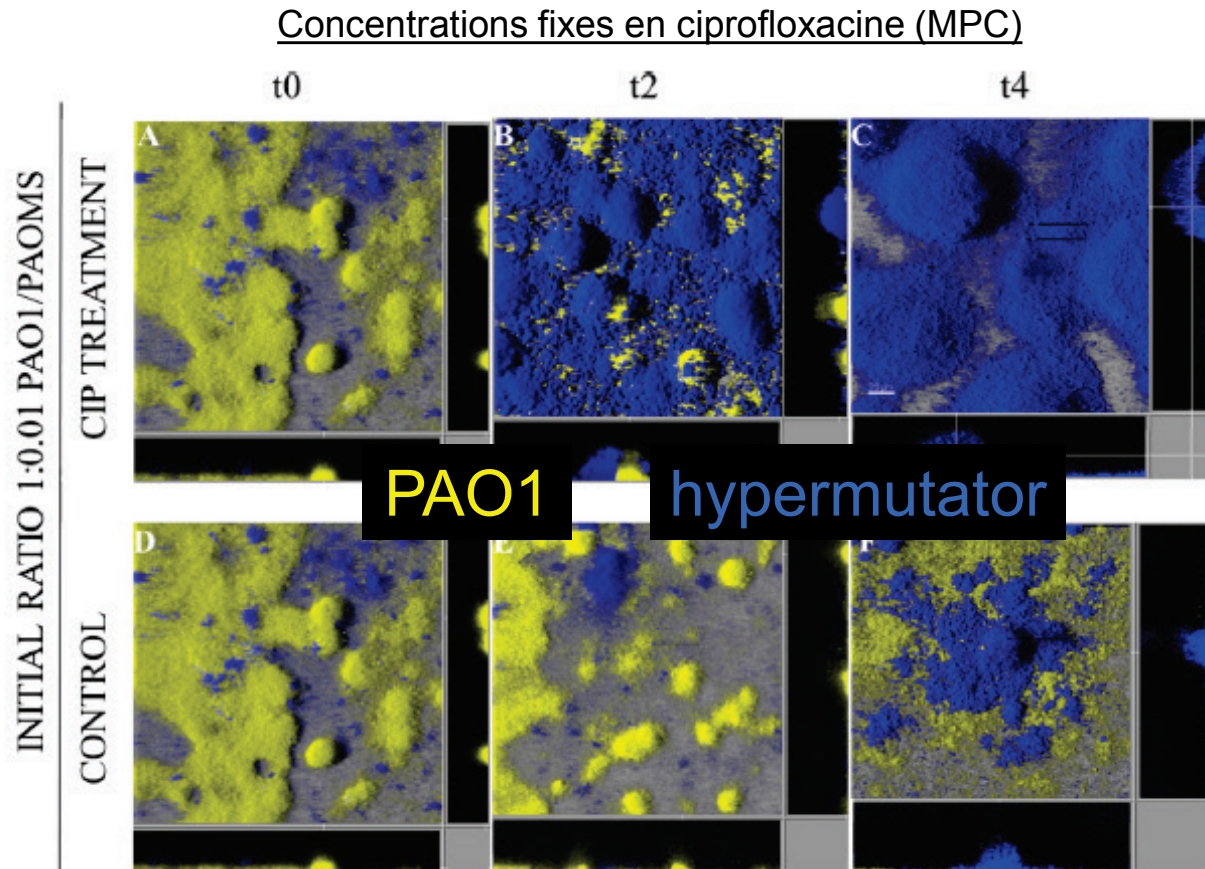
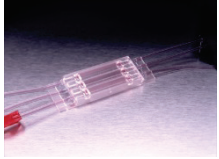
- changement progressif et unidirectionnel du milieu
- faibles forces de cisaillement



# Sélection de populations résistantes

## Réacteur à perfusion

*P. aeruginosa*



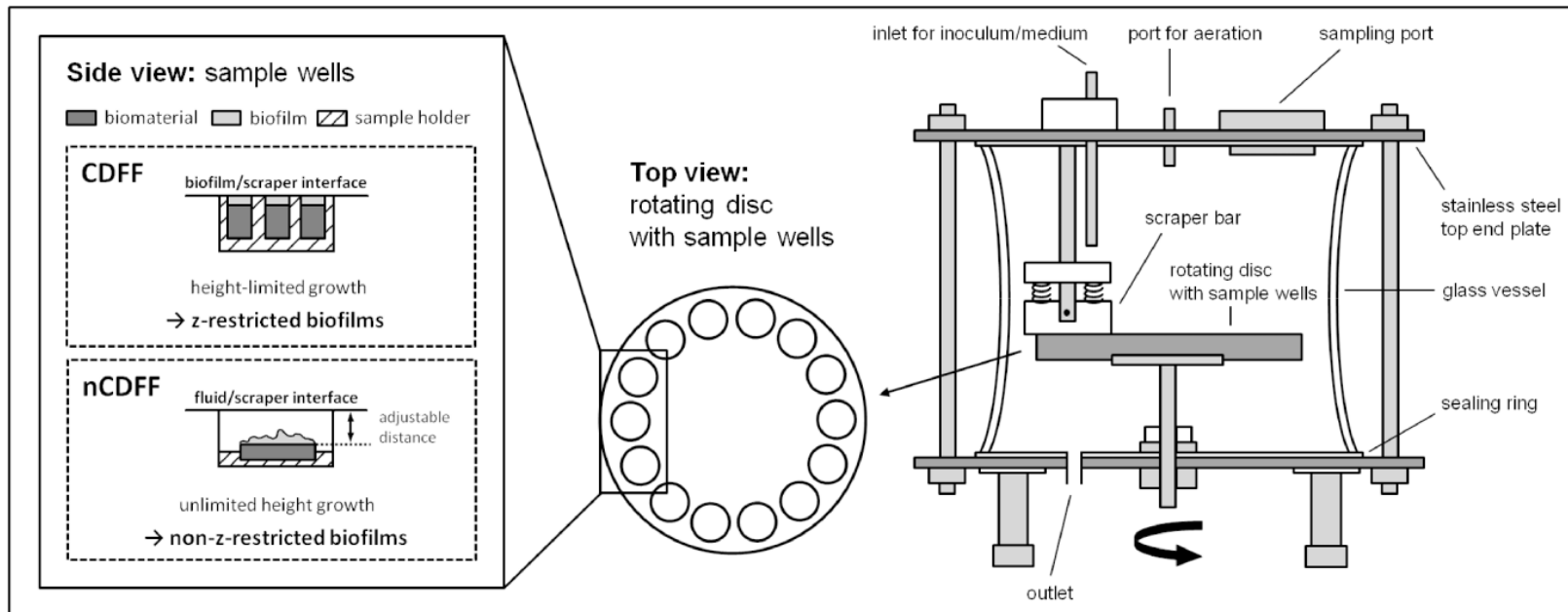
Amplification des mutants pendant le traitement antibiotique  
et accumulation de mécanismes de résistance

Macià et al, *Antimicrob. Ag. Chemother.* 2013; 55:5230–7

# Modèles dynamiques: bioréacteurs

## Fermenteur à profondeur (non)-constante:

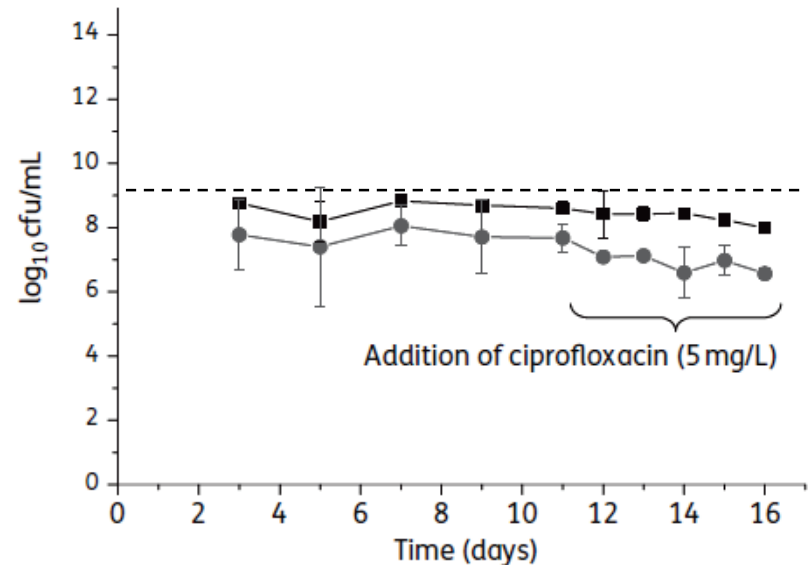
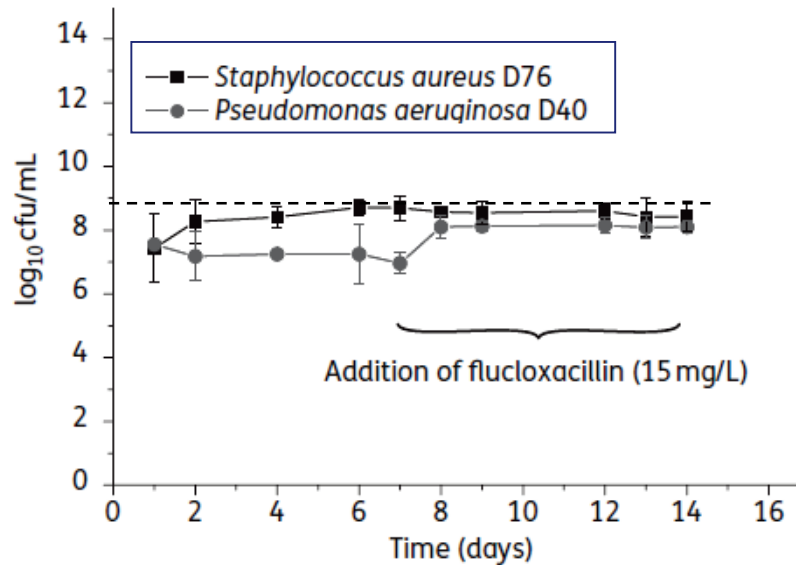
- conditions constantes
- faibles forces de cisaillement
- ~ biofilms sur implants



# Selection of resistant populations

## Fermenteur à profondeur (non)-constante

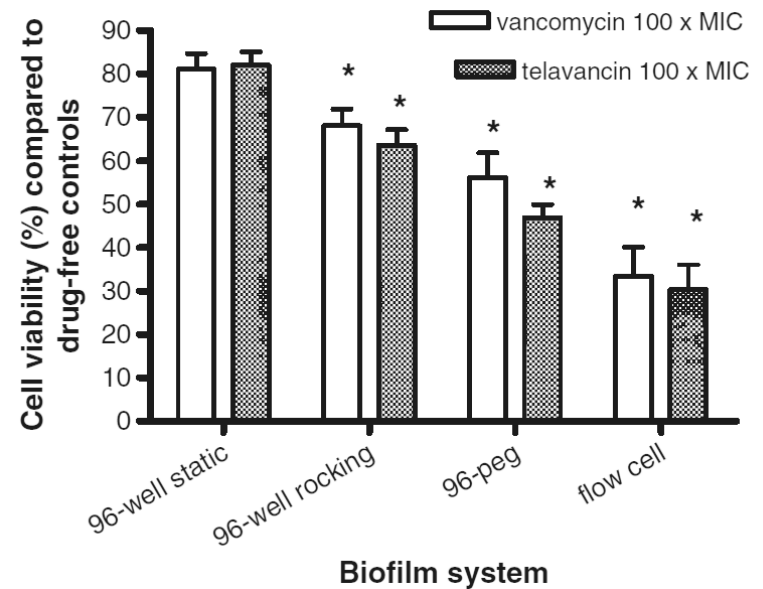
Concentrations fixes en fonction du temps;  
biofilm multi-espèces (souches isolées de blessures humaine)



Activité faible à des concentrations cliniques

# Conclusions

- nombreuses méthodes pour évaluer la biomasse / la survie bactérienne
  - ➔ pas de consensus réel sur les meilleures options
- nombreux modèles de biofilms *in vitro*
  - ➔ comparaison entre études difficile
  - ➔ modèle le plus pertinent ?



# Conclusions

- nombreuses méthodes pour évaluer la biomasse / la survie bactérienne
  - ➔ pas de consensus réel sur les meilleures options
- nombreux modèles de biofilms *in vitro*
  - ➔ comparaison entre études difficile
  - ➔ modèle le plus pertinent ?
- activité antibiotique sur biofilms <<< bactéries planctoniques
  - ➔ peu ou pas d'effet sur la matrice
  - ➔ détermination des paramètres PK: diffusion / biodisponibilité
  - ➔ détermination des paramètres PD: expression d'activité / réponse bactérienne

# Conclusions

- nombreuses méthodes pour évaluer la biomasse / la survie bactérienne
  - ➔ pas de consensus réel sur les meilleures options
- nombreux modèles de biofilms *in vitro*
  - ➔ comparaison entre études difficile
  - ➔ modèle le plus pertinent ?
- activité antibiotique sur biofilms <<< bactéries planctoniques

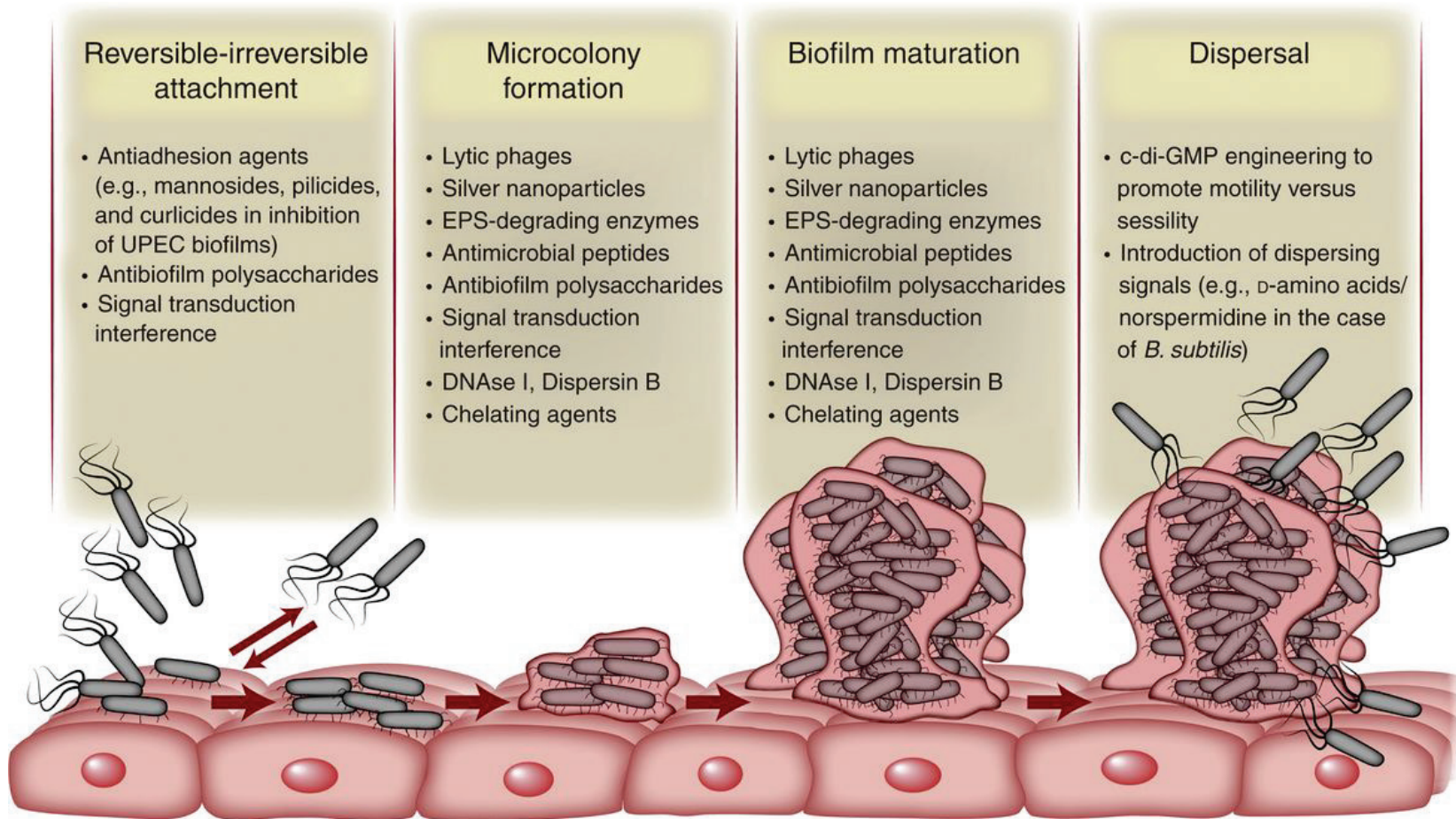
- ➔ peu ou pas d'effet sur la matrice
- ➔ détermination des paramètres PK: diffusion / biodisponibilité
- ➔ détermination des paramètres PD: expression d'activité / réponse bactérienne



combinaison avec des agents modifiant la matrice / l'état métabolique des bactéries ?



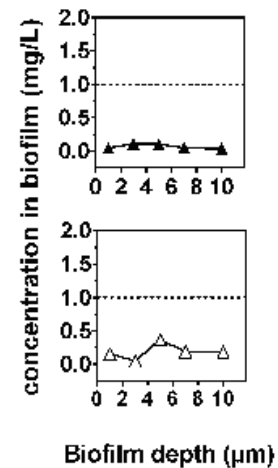
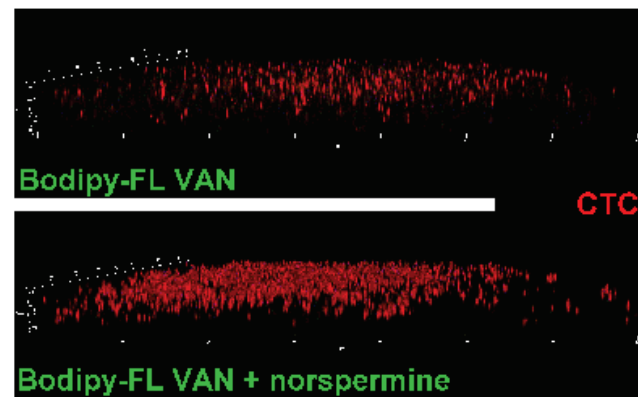
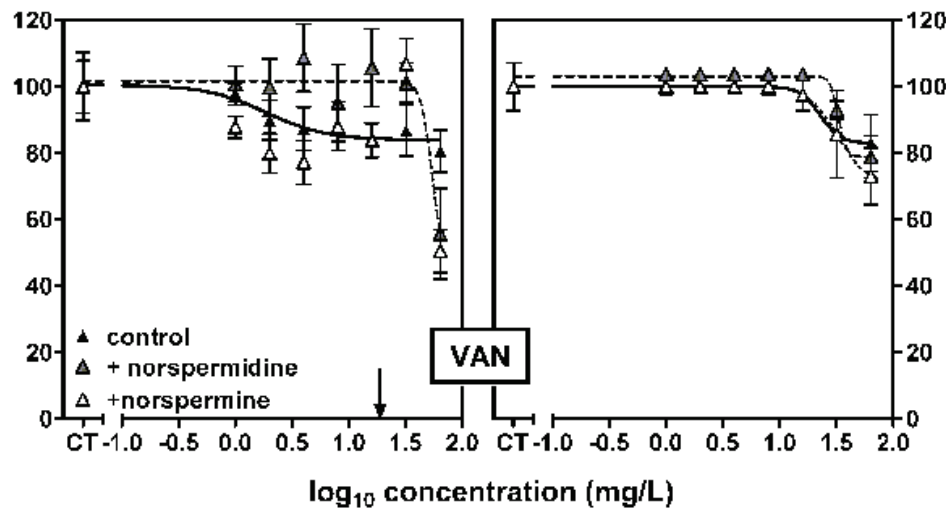
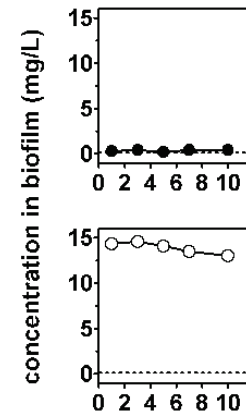
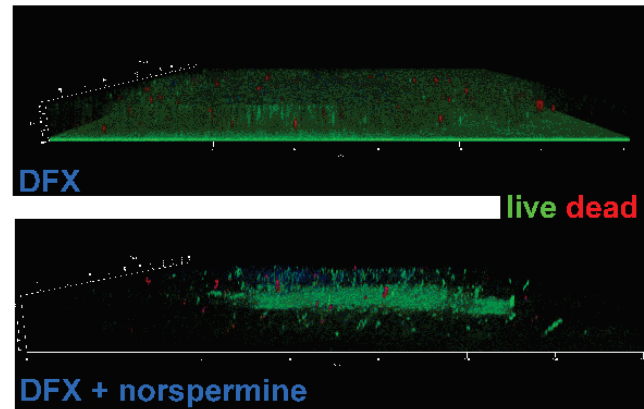
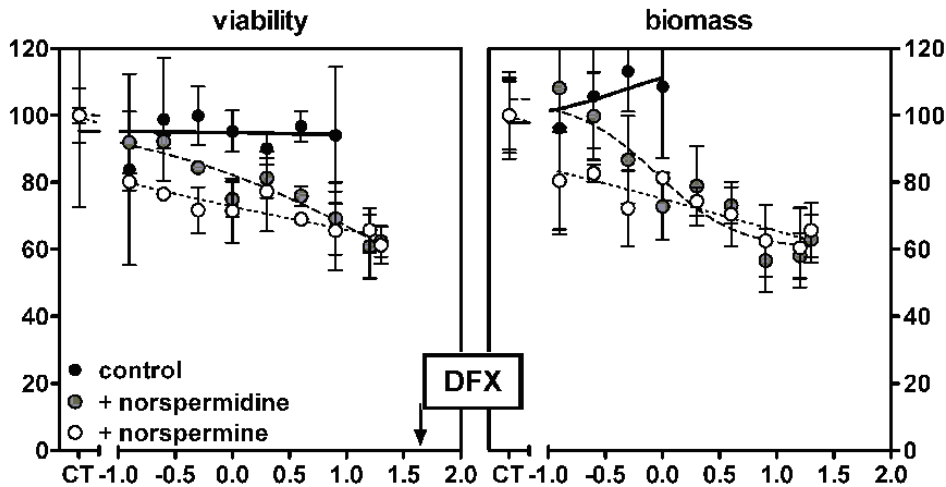
# Nouvelles stratégies ...



Kostakioti et al. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3:a010306



# Combination avec des polycations



# Remerciements



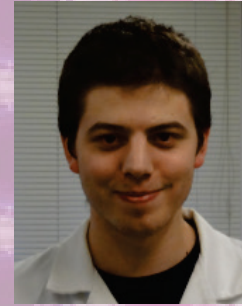
Julia Bauer



Wafi Siala



Nathalie Vandevelde



Yvan Diaz Iglesias



Eugénie Basseres

