Evaluation in vitro et in vivo d'un polymère biorésorbable à la Gentamycine dans le traitement expérimental d'infections ostéo-articulaires

Pierre-Sylvain Marcheix

▶ **To cite this version:**

Pierre-Sylvain Marcheix. Evaluation in vitro et in vivo d'un polymère biorésorbable à la Gentamycine dans le traitement expérimental d'infections ostéo-articulaires. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2016. Français. NNT : 2016LIMO0079 . tel-01441442

HAL Id: tel-01441442
https://theses.hal.science/tel-01441442

Submitted on 19 Jan 2017

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

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

Thèse de doctorat

ECOLE DOCTORALE Bio-Santé N°524

Equipe de recherche EA6309

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline / Spécialité : Biologie, Sciences, Santé

présentée et soutenue par

Pierre-Sylvain Marcheix

le 21 décembre 2016

Evaluation in vitro et in vivo d'un polymère biorésorbable à la Gentamycine dans le traitement expérimental d'infections ostéo-articulaires

Thèse dirigée par le Professeur Franck Sturtz

JURY :

Rapporteurs

Pr Paul Bonnevialle, PU-PH, Université de Toulouse

Pr Philippe Rosset, PU-PH, Université de Tours

Examinateurs

Pr Jean-Louis Charissoux, PU-PH, Université de Limoges

Pr Christian Mabit, PU-PH, Université de Limoges

M. Michel Vert, Directeur de Recherche du CNRS Honoraire, Institut des Biomolécules Max Mousseron

Pr Franck Sturtz, PU-PH, Université de Limoges, Directeur de Thèse

BY-NC-ND

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat : « **Paternité-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** » disponible en ligne : *http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/*

BY-NC-ND

Remerciements

À Monsieur le Professeur Franck Sturtz,

Je vous remercie de m'avoir permis d'intégrer votre laboratoire de recherche pour y réaliser mon Master II puis ma thèse de sciences. Je vous remercie pour votre confiance et vos conseils. Ces trois années ont été jalonnées d'incertitudes et de remises en question mais votre calme et votre écoute m'ont permis de conduire à son terme ce travail dont j'espère qu'il est à la hauteur de vos attentes.

À Monsieur le Professeur Paul Bonnevialle,

Je vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse de sciences et vous suis très reconnaissant de m'avoir toujours soutenu sur ce long chemin universitaire.

À Monsieur le Professeur Philippe Rosset,

Je vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse de sciences. Il me semble que nos travaux sont complémentaires et j'espére pouvoir continuer à tavailler en collaboration avec votre équipe de recherche.

À Monsieur le Professeur Jean-Louis Charissoux,

Je vous remercie d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Vous m'avez toujours soutenu et je vous en suis très reconnaissant.

À Monsieur le Professeur Christian Mabit,

Je vous remercie d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Je vous remercie de m'avoir permis d'avancer et de progresser dans cette voie universitaire.

À Monsieur le Professeur Michel Vert,

Je vous remercie d'avoir accepté d'évaluer ce travail après en avoir été l'initiateur. Compte tenu de votre grande expérience dans le domaine des polymères, je vous suis très reconnaissant d'avoir accepté de participer à cette soutenance.

Merci à toute l'équipe EA6309.
Merci au Docteur Claude Couquet et à Marie-Jeanne du laboratoire départementale d'analyses et de recherches.

BY-NC-ND

Table des matières

REMERCIEMENTS 3

TABLE DES MATIERES 4

ABREVIATIONS 7

RESUME 8

ABSTRACT 11

INTRODUCTION 14

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE: MISE EN SITUATION DU SUJET ET OBJECTIFS 17

1 Les infections ostéo-articulaires 18

1.1 Les infections osseuses bactériennes : ostéites ou ostéomyélites 18

1.2 Les infections articulaires bactériennes 22

1.3 Les infections ostéo-articulaires sur matériel 26

2 Caractéristiques et choix de l'agent anti-infectieux local 41

3 Systèmes à libération locale d'antibiotiques 41

3.1 Caractéristiques nécessaires d'un système à libération locale d'antibiotiques 41

3.2 Les systèmes non biodégradables 42

3.3 Les systèmes biodégradables 44

4 La notion de nanoparticule et son application biomédicale 47

4.1 Synthèse et caractérisation des nanoparticules 47

4.2 Caractéristiques de relargage des nanoparticules 50

4.3 Caractéristiques et production du polymère à la Gentamicine utilisé pour notre étude (69) 51

5 Objectifs de l'étude 55

PARTIE EXPERIMENTALE 57

1 Evaluation *in vitro* et *in vivo* du relargage de notre PLA et grinding 58

1.1 Évaluation du relargage de MedinGenta, matériel et méthode 58

1.2 Évaluation du relargage de $PLA_{50}GS$, Résultats 59

BY-NC-ND

2 Mise au point d'un modèle d'infection périostée chez le rat 63
2.1 Mise au point d'un modèle d'infection périostée chez le rat, Matériel et méthode 63
2.2 Mise au point d'un modèle d'infection périostée chez le rat, résultats 66
2.3 Mise au point d'un modèle d'infection périostée chez le rat, conclusion 72

3 Tentative de traitement d'une infection périostée chez le rat par $PLA_{50}GS$ 73
3.1 Matériel et méthode 73
3.2 Résultats 74
3.3 Discussion 82
3.4 Conclusion 84

4 Mise au point d'un modèle d'infection articulaire chez le lapin 85
4.1 Mise au point de la souche bactérienne 85
4.2 Mise au point du polymère sous forme injectable 89
4.3 Mise au point du modèle animal, matériel et méthode 91
4.4 Mise au point du modèle animal, Résultats 91
4.5 Mise au point du modèle animal, conclusion 93

5 Tentative de traitement d'une infection articulaire chez le lapin par le $PLA_{50}GS$ 93
5.1 Matériel et méthode 93
5.2 Résultats 97
5.3 Discussion 111
5.4 Conclusion 115

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES 116

1 Rappels des résultats obtenus (par rapport aux objectifs) 117

2 Discussion sur les modèles animaux 118
2.1 Modèle d'infection osseuse expérimentale 118
2.2 Modèle d'infection articulaire expérimentale 120
2.3 Un autre modèle animal est-il nécessaire pour étudier l'efficacité du polymère 121

3 Discussion sur les autres modes de relargage existants 121

4 Perspectives offertes par la libération locale d'autres molécules en orthopédie 125
4.1 Polymères et autres antibiotiques 125
4.2 Polymères et facteurs de croissance 126

CONCLUSION 127

BIBLIOGRAPHIE 130

BY-NC-ND

TABLE DES ILLUSTRATIONS **141**

BY-NC-ND

Abréviations

AA : Acide Arachidonique
AG ou APG : Acide Glycolique ou Polymère d'acide glycolique, GLA / PGA : Glycolic Acide ou Polyglycolic Acid
ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament
BGN : Bacille à gram négatif
BPC : Biphasic Calcium Phosphate
β-PTC : Phosphate tricalcique
CB : Compte bactérien
CE : Corps Etranger
CFU : Colony Formating Unit
C2G : Céphalosporine de deuxième génération
C3G : Céphalosporine de troisième génération
CRP : Protéine c réactive
CPC : Ciment phophocalcique
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
DCPD-ß-TCP : Phosphate dicalcique-Phosphate tricalcique ß
EMEA : European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
FDA : Foot and Drug Administration
FDG : Fluoro-2-desoxy-D-glucose
G : Gauge
HA : Hydroxyapatite
HES : Hématéine, Eosine, Safran
IM : Intramusculaire
IP : Intrapéritonéal
ISO : Infection du site opératoire
IV : Intra-veineux
IRM : Imagerie par Résonnance Magnètique
mg : Milligramme
ml : Millilitre
MSSA : Methicillin sensitive Staphylococcus aureus
nm : Nanomètre
OM : Ostéomyélite
OMA : Ostéomyélite aigue
OMC : Ostéomyélite chronique
OR : Odd Ratio
PGA : Polymère d'acide glycolique
PLA : Polymère d'acide lactique
PLGA : Copolymères poly-lactique-co-glycolique
PBS : Phosphate Buffer Saline
PMMA : polyméthacrylate de méthyle
RAISIN : Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales
rpm : Rotation par minute
SAMS : Staphylocoque Aureus Sensble à la Méthicilline
SARM : Staphylocoque Aureus Résistant à la Méthicilline
SUV : Standardized uptake value
TCP : Tricalcium Phosphate
TDM : Tomodensitométrie
TEMP-TDM : Scanner hélicoïdal couplé à une Tomographie par Émission MonoPhotonique
TV : Thrombovar

BY-NC-ND

Résumé

Le traitement d'une infection des parties molles, d'une ostéomyélite ou d'une arthrite septique aiguë ou chronique nécessite une prise en charge longue, nécessitant souvent des actes opératoires itératifs et un traitement antibiotique systémique prolongé allant de 6 semaines à 3 mois au minimum. La diffusion des antibiotiques dans l'os ou dans une articulation est faible et oblige les infectiologues à utiliser une antibiothérapie à forte dose, parentérale et prolongée. À ce jour, le polyméthacrylate de méthyle (PMMA) est le vecteur d'antibiotique le plus fréquemment utilisé chez l'homme dans le cadre du traitement d'une infection ostéo-articulaire. Cependant les PMMA sont non résorbables et obligent à multiplier les interventions chirurgicales afin d'aboutir au traitement définitif de l'infection ostéo-articulaire. De plus, ce vecteur local ne permet pas une libération complète de l'antibiotique au cours du temps. De surcroît des doses inférieures à la CMI du germe en cause pouvent faciliter l'émergence de bactéries résistantes.

L'objectif de notre travail était donc d'améliorer la prise en charge des infections ostéo-articulaires par une libération locale efficace et prolongée d'antibiotique grâce à un polymère entièrement résorbable.

Le cahier des charges établi pour l'élaboration de ce polymère était le suivant. Le traitement local et per-opératoire visant à libérer un antibiotique a été défini comme nécessitant un système matriciel offrant une libération de gentamicine à une dose de 1 à 2 mg/jour/g de mélange sur une période de plus de 10 jours. Ce système matriciel devait avoir des caractéristiques physiques appropriées et un taux de relargage suffisant pour permettre un traitement le plus sécuritaire possible tout en permettant une mise en place simple. De plus, le polymère devait être bio-résorbable, c'est-à-dire qu'il devait pouvoir être dégradé jusqu'à obtenir des fragments pouvant être éliminés naturellement par l'organisme. Afin de répondre à ces exigences, il a été créé le $PLA_{50}P$, Poly(D,L-acide lactique) de haut poids moléculaire. L'utilisation de ce polymère sous forme de particules de grosses tailles (0,5 à 1mm) permettait de limiter l'effet « burst » initial. Afin d'obtenir le mélange gentamycine-PLA, une technique de compression des poudres des deux composants a été mise en œuvre. La charge en antibiotique devait être de 20%,

BY-NC-ND

toujours dans un objectif de limitation du « burst » initial. Ce polymère pouvait être stérilisé par γ-irradiation, sans influence sur les caractéristiques de relargage du polymère.

La cinétique *in vitro* de la Gentamicine relarguée par le $PLA_{50}GS$ montrait un pic maximum de gentamicine libérée obtenu à 12 jours et une stabilisation ensuite jusqu'à 63 jours de la quantité relarguée. La quantité cumulée de Gentamicine relarguée à 3 semaines *in vitro* est de 54 % de la quantité contenue initialement dans $PLA_{50}GS$. *In vivo*, nous observions une libération *in situ* de 5,1 µg/mL de gentamicine à J3, de 1,9 µg/mL de gentamicine à J7 et de 0 µg/mL à 5 semaines avec disparition de $PLA_{50}GS$ à l'examen macroscopique. Nous avons ainsi pu mettre en évidence, *in vitro* et *in vivo*, un relargage de la gentamicine à des doses supérieures à la CMI du germe et ce pendant plus de trois semaines.

Afin de confirmer ces observations, nous avons ensuite mis au point un modèle d'infection périostée chez le rat : nous avons utilisé des rats âgés de 10 à 12 semaines avec une injection au contact de l'os et au 1/3 moyen de la patte arrière de deux fois 100 ml de SAMS d'origine animale. L'utilisation du $PLA_{50}GS$ a montré sa supériorité par rapport à une administration parentérale d'une dose équivalente de Gentamicine avec une négativation du contage bactériologique chez tous les rats traités par le polymère chargé à la Gentamicine.

Nous avons ensuite voulu traiter une infection articulaire grâce à ce polymère. Nous avons créé un modèle animal utilisant un lapin femelle de 4 kg avec une injection de 1 ml d'une solution à 10^3 CFU/ml de staphylococcus méthi-sensible d'origine léporidée. Le $PLA_{50}GS$ nous a permis de réduire très significativement la charge bactérienne intra-articulaire (baisse de 3 à 4 $\log_{10}$ soit 1000 à 10000 fois moins de bactéries) alors que le traitement antibiotique par voie générale dit de référence ne nous a pas permis de réduire l'infection intra-articulaire de façon significative par rapport au groupe non traité. Le $PLA_{50}GS$ nous a ainsi permis de réduire l'infection de 3 $\log_{10}$ par rapport aux autres groupes avec 2 lapins sur 6 guéris de leur infection.

Le $PLA_{50}GS$ présente, ainsi, les caractéristiques suivantes : (i) stabilité de la Gentamicine au sein du polymère, (ii) polymère sous forme de poudre stable, (iii)

BY-NC-ND

relargage prolongé de la Gentamicine pendant plusieurs semaines, (iv) effet « burst » présent mais limité, (v) très bonne biotolérance, et (vi) efficacité supérieure aux traitements antimicrobiens classiques.

BY-NC-ND

Abstract

The treatment of soft-tissue infections, osteomyelitis, and acute or chronic septic arthritis is a lengthy process that involves repeated surgical procedures and the systemic administration of antibiotics for at least 6 weeks to 3 months. The poor diffusion of antibiotics into bones and joints requires high doses given parenterally for long periods. At present, the antibiotic vector most widely used in humans with bone or joint infections is polymethylmethacrylate (PMMA). However, because PMMA is not bioabsorbable, multiple surgical procedures are required to eradicate the infection. Furthermore, PMMA does not release its full antibiotic load over time and may yield local antibiotic concentrations lower than the minimal inhibitory concentration (MIC) of the causative organism, thereby promoting the emergence of resistant strains. The objective of our work was to develop a fully bioabsorbable polymer capable of ensuring the prolonged and efficient release of its antibiotic load, thus improving the management of bone and joint infections.

The specifications for the polymer included the release by the matrix system of 1-2 mg of gentamicin per day and per gram of mixture over more than 10 days. Other specifications were appropriate physical characteristics, a drug release rate sufficient to ensure optimal treatment safety, and ease of implantation. The polymer was also to be bioabsorbable, i.e., subject to degradation into fragments capable of being eliminated naturally by the body. High-molecular weight $PLA_{50}P$, Poly(D,L-lactic acid) was created and found to meet these specifications. Use of this polymer as large particles (0.5 to 1 mm) limited the initial burst phenomenon. A gentamicin-$PLA_{50}P$ mixture was obtained by compression of the two components prepared in powder form. The antibiotic load

BY-NC-ND

was set at 20% to limit the initial burst. The polymer can be sterilized by gamma irradiation, which has no effect on drug release characteristics.

In vitro kinetic studies of gentamicin release by the polymer showed a peak on day 12 followed by a plateau that lasted until day 63. After 3 weeks, the cumulative amount of gentamicin released in vitro was 54% of the total amount loaded onto the polymer. *In vivo* gentamicin concentrations measured *in situ* were 5.1 µg/mL on day 3, 1.9 µg/mL on day 7, and 0 µg/mL on day 35, when the polymer was no longer visible to the naked eye. Thus, both *in vivo* and *in vitro*, gentamicin was released in concentrations greater than the MIC of the microorganism, for longer than 3 weeks.

To test the gentamicin-loaded polymer, we created a rat model of periosteal infection. Rats aged 10-12 weeks received two 100 mL injections of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* collected from animals, into the middle third of the hind leg, in contact with the bone. Treatment with gentamicin-loaded $PLA_{50}P$ proved superior over parenteral administration of an equivalent gentamicin dose, consistently reverting the bacteriological cultures to negative.

We then created a rabbit model of septic arthritis. A doe weighing 4 kg received an add intraarticular injection of 1 mL of a solution containing 10^3 cfu/mL of a methicillin-sensitive *S. aureus* strain collected from another rabbit. Gentamicin-loaded $PLA_{50}P$ treatment induced a highly significant drop in the intraarticular bacterial load (by 3-4 $\log_{10}$, i.e., by 1000 to 100 000 bacteria), whereas standard systemic gentamicin therapy failed to significantly diminish bacterial counts comparatively to the untreated controls. Thus, gentamicin-loaded $PLA_{50}P$ diminished the bacterial load by 3 $\log_{10}$ comparatively to the other groups and allowed eradication of the infection in 2 of the 6 rabbits.

BY-NC-ND

In sum, gentamicin-loaded $PLA_{50}P$ (i) ensures the stability of the antibiotic; (ii) is available as a stable powder; (iii) ensures the prolonged release of gentamicin over several weeks; (iv) produces a limited burst effect; (v) exhibits very good biotolerance; (vi) and is more effective than standard antimicrobial.

BY-NC-ND

Introduction

Le traitement d'une infection des parties molles, d'une ostéomyélite ou d'une arthrite septique aiguë ou chronique nécessite une prise en charge longue, nécessitant souvent des actes opératoires itératifs et un traitement antibiotique prolongé allant de 6 semaines à 3 mois au minimum (1, 2). Ce traitement est le plus souvent systémique mais la diffusion des antibiotiques dans l'os ou dans une articulation est faible obligeant les infectiologues à utiliser une antibiothérapie à forte dose, parentérale et prolongée (3-5). Différentes méthodes ou techniques tentent d'introduire cette antibiothérapie directement sur le site infecté (ciments, collagènes, biopolymères) afin de potentialiser le traitement systémique (6-8). À ce jour, le polyméthacrylate de méthyle (PMMA) est le vecteur d'antibiotique le plus fréquemment utilisé chez l'homme dans le cadre du traitement d'une infection ostéo-articulaire. Cependant ce traitement local présente de nombreux inconvénients (9). En effet, les PMMA sont non résorbables et obligent à multiplier les interventions chirurgicales afin d'aboutir au traitement définitif de l'infection ostéo-articulaire. De plus, ce vecteur d'antibiotique local ne permet pas une libération complète de l'antibiotique au cours du temps ; l'observation d'une libération de l'antibiotique à des doses inférieures à la CMI du germe en cause peut ainsi faciliter l'émergence de bactéries résistantes.

L'objectif de notre travail était d'améliorer la prise en charge des infections ostéo-articulaires par une libération locale efficace et prolongée d'antibiotique grâce à un polymère entièrement résorbable afin d'éviter les interventions chirurgicales itératives.

Ainsi notre travail repose-t-il sur l'étude de la délivrance *in situ* d'un antibiotique (Gentamicine) par un polymère biocompatible mis au point par le Centre de Recherche sur les Biopolymères Artificiels (CRBA-CNRS) de Montpellier, avec lequel nous collaborons. La première partie de notre travail avait pour but d'étudier la cinétique de relargage de ce biopolymère afin de vérifier la présence d'une libération prolongée de l'antibiotique sur plus de 3 semaines et à des doses supérieures à la CMI du germe en cause. Dans un second temps, après avoir mis en place un modèle animal reproductible, nous avons étudié l'efficacité de ce polymère sur une infection osseuse chez le rat puis chez le lapin. Nous avons finalement vérifié au cours des différentes manipulations chez l'animal la bonne tolérance de ce vecteur d'antibiotique.

BY-NC-ND

Cette recherche a été effectuée dans le cadre du Projet « MédingelGenta et antibiothérapie » soutenu par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR-RIB 2006) qui comprend, outre l'EA 6309 (Maintenance myélinique et neuropathies périphériques), le CRBA-CNRS de Montpellier et la société MedinCell S.A., installée à Montpellier, chargée du développement des hydrogels.

BY-NC-ND

Partie Bibliographique:

Mise en situation du sujet

et Objectifs

1 Les infections ostéo-articulaires

1.1 Les infections osseuses bactériennes : ostéites ou ostéomyélites

La première description de l'ostéomyélite remonte à 1844 par Nelaton. Elle implique le plus souvent une atteinte infectieuse de l'os et de la moelle osseuse. Ainsi les ostéites isolées sont rares et souvent associées à une atteinte médullaire, ces infections sont alors appelées ostéomyélite. Cette définition est cependant variable en fonction des auteurs. Pour certains, le terme d'ostéite est réservé aux infections osseuses post-opératoires ou post-traumatiques et le terme d'ostéomyélite est réservé aux infections osseuses hématogènes.

1.1.1 Diagnostic des infections osseuses

1.1.1.1 Données cliniques

L'ostéite secondaire à un geste chirurgical est plus fréquemment retrouvée en orthopédie-traumatologie. L'existence de signes locaux et généraux oriente le praticien vers ce diagnostic. La fièvre est présente dans la grande majorité des cas mais elle est souvent modérée. Un syndrome clinique septicémique est rarement retrouvé. Localement, plusieurs signes doivent alerter le praticien : une douleur inhabituelle, la réapparition d'un syndrome douloureux, une plaie opératoire inflammatoire, une désunion cicatricielle…

1.1.1.2 Données biologiques

En cas d'infection osseuse aiguë, il n'est pas rare d'observer une hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles, un syndrome inflammatoire biologique marqué, voire des hémocultures positives. Ces anomalies biologiques sont cependant souvent absentes dans les formes chroniques. Une ponction-biopsie du foyer infectieux permet une étude bactériologique et histologique. L'étude histologique permet de préciser le caractère aigu ou chronique de l'infection alors que l'analyse bactériologique permet de mettre en évidence le germe en cause. Cette étape est fondamentale puisqu'elle permet de tester la sensibilité du germe aux antibiotiques.

Les germes responsables de l'infection osseuse dépendent de nombreux facteurs : la porte d'entrée, les circonstances de survenue et le terrain. Les

BY-NC-ND

staphylocoques dorés et à coagulase négative représentent 50 % des germes retrouvés en cas d'infections osseuses. Staphylococcus aureus (ou staphylocoque doré) est le germe le plus souvent rencontré (10). Nous pouvons également rencontrer dans le cadre de ces infections des streptocoques, des entérocoques, des Pseudomonas (Aeruginosa ou autre), des entérobactéries (Enterobacter spp., Proteus spp., Serratia spp., Escherichia coli, etc.), des anaérobies mais ces germes ne représentent que 25% des infections osseuses (10).

1.1.1.3 Données de l'imagerie

1.1.1.3.1 Radiographies

L'apparition de signes radiologiques se fait tardivement. Une infection osseuse doit être évoquée devant une ostéolyse le long du matériel d'ostéosynthèse, l'apparition d'apposition périostée, une déminéralisation diffuse, un œdème des parties molles adjacentes, la mise en évidence de séquestres osseux. De plus, un retard de consolidation associé à un déplacement du matériel d'ostéosynthèse doit systématiquement évoquer le diagnostic d'infection osseuse même en l'absence de signes cliniques associés.

1.1.1.3.2 Scanner

Cet examen confirme les signes observés radiologiquement. Le scanner permet d'orienter vers le diagnostic d'ostéite notamment lorsqu'il est associé à une injection de produit de contraste. Il permet, précocément, de mettre en évidence une augmentation de la densité médullaire. Les zones d'os nécrotique peuvent facilement être repérées par cet examen. Le scanner permet également de rechercher des séquestres, d'éventuels corps étrangers et d'évaluer les tissus mous adjacents. Cependant la valeur de cet examen est nettement diminuée en cas de présence de corps étranger métallique. Finalement, le scanner permet de préciser les données précédentes et de planifier avec plus de précision le traitement chirurgical à venir.

1.1.1.3.3 Imagerie par Résonance Magnétique

Il s'agit d'un examen essentiel pour le diagnostic et le traitement des infections osseuses. Il permet une étude de l'os et des tissus mous adjacents. L'ostéomyélite se caractérise par un hyposignal en images pondérées T1 et un hypersignal en images

BY-NC-ND

pondérées T2. Cet examen permet également de mettre en évidence les trajets fistuleux, les abcès, les cellulites infectieuses.

1.1.1.3.4 Scintigraphie aux leucocytes marqués

Cet examen utilise des leucocytes autologues marqués *in vitro* par l'oxynate d'indium 111 (In) ou le ^{99m}Tc- hexaméthylpropylène-amine-oxyne (^{99m}Tc-HMPAO). Une fois les leucocytes prélevés et marqués, ils sont réinjectés aux patients. Puis l'imagerie est réalisée avec deux séries d'images : semi-précoces 3 heures après l'injection et tardives entre 17 et 24 heures après l'injection. Cet examen permet d'obtenir une sensibilité de 80 % et une spécificité qui dépasse 95 % en ce qui concerne l'infection osseuse. La valeur prédictive négative de cet examen dépasse les 95 %. Ainsi une scintigraphie aux leucocytes marqués négative permet d'écarter le diagnostic d'infection osseuse avec une grande probabilité. Cependant, cet examen est peu discriminant, en cas de positivité, entre processus infectieux et processus inflammatoire.

1.1.2 Traitement des infections osseuses

1.1.2.1 Traitement antibiotique des infections osseuses

Ce traitement doit répondre à deux impératifs : la sensibilité aux germes en cause et la bonne diffusion dans le tissu osseux (Tableau 1, Tableau 2).

Bonne	Fluoroquinolones, Macrolides, Synergistines, Linézolide, Acide fusidique, Rifampicine, Cyclines, Tigécycline, Lincosamides
Moyenne	C2G, C3G, Uréidopénicillines, Phénicolés, Fosfomycine, Vancomycine, Daptomycine
Faible	Pénicillines M, Aminopénicillines, C1G, Imipénem, Polypeptides, Aminisides

Tableau 1: Diffusion osseuse des principaux antibiotiques

BY-NC-ND

Germe	Première ligne	Autres propositions	Traitement au long court
Staphylocoque méti-S	Fluoroquinolone + rifampicine	Clindamycine + rifampicin Péni M ou céfazoline + gentamicine Fluoroquinolone + acide fusidique	Idem ou pristinamycine
Staphylocoque méti-R	Glycopeptide + rifampicine (ou acide fusidique ou fosfomycine) Rifampicine ± acide fusidique	Fosfomycine + céfotaxime (ou rifampicine ou acide fusidique)	pristinamycine + rifampicine ou acide fusidique
Entérocoque	Amoxicilline ± aminoside	Glycopeptide ± aminoside	Amoxicilline (ou selon résultats bactériologiques)
Cocci à Gram négatif Streptocoques	Amoxicilline	C3G	Amoxicilline ou pristinamycine
BGN (sauf P. aeruginosa)	Fluoroquinolone + C3G	Fluoroquinolone + fostomycine ou imipénem	Fluoroquinolone
P. aeruginosa	Ciprofloxacine + ceftazidime Ceftazidime + amikacine	Ceftazidime + fosfomycine	Ciprofloxacine
Anaérobies	Clindamycine	Imidazolé (sauf si Propionibacterium)	Clindamycine ou pristinamycine ou imidazolé (sauf si Propionibacterium)
Brucella sp.	Cycline + rifampicine	Cycline + streptomycine	

Tableau 2: Antibiothérapie dans le cadre des infections osseuses de l'adulte

L'infection osseuse doit être considérée comme une infection grave. Elle nécessite l'utilisation d'une association d'antibiotiques. Le traitement devra obligatoirement être adapté aux prélèvements et donc à l'antibiogramme. Le traitement, initialement IV, devra être continué IV ou per os pour une durée totale d'au moins 3 mois et pouvant aller jusqu'à 6 mois.

1.1.2.2 Traitement chirurgical des infections osseuses

Stabilisation du foyer de fracture :

BY-NC-ND

Le matériel d'ostéosynthèse de type vis, plaque ou clou ne peut classiquement pas être utilisé car il joue le rôle de corps étranger et entretient le foyer infectieux local. Le fixateur externe, quant à lui, permet un montage stable. Il offre un accès simple aux zones cicatricielles.

Couverture de l'ostéite :

Les techniques de saucérisation type Papineau permettent d'obtenir un taux de guérison avoisinant les 72% mais au prix d'un traitement long et exigeant (11, 12). La couverture, à proprement parler, vise à rétablir les différents plans de protection du tissu osseux. Elle peut recourir soit à une fermeture directe, soit à une cicatrisation dirigée, soit à l'utilisation de lambeaux locaux ou à distance.

Comblement et reconstruction du tissu osseux :

L'objectif est de combler les espaces vides afin de traiter l'infection et d'obtenir une consolidation osseuse. Le comblement peut être assuré par du tissu non ostéogénique (ciments aux antibiotiques) ou ostéogénique (greffe spongieuse ou cortico-spongieuse).

1.2 Les infections articulaires bactériennes

L'arthrite septique est la conséquence de la colonisation de la synoviale articulaire par une bactérie. L'infection est la conséquence d'une dissémination hématogène dans environ 60% des cas. Elle peut également être secondaire à une inoculation directe suite à une intervention chirurgicale ou une infiltration.

1.2.1 Facteurs de risque

Selon Kaandorp, les facteurs de risque d'une arthrite septique sont : un âge supérieur à 80 ans (OR: 3,5), un diabète (OR: 3,3), une polyarthrite rhumatoïde (OR: 4), une chirurgie articulaire récente (OR: 5,2), une prothèse de hanche ou de genou (OR: 15), une infection cutanée (OR: 27) (13).

BY-NC-ND

1.2.2 Diagnostic des infections articulaires

1.2.2.1 Données cliniques

De façon générale, toutes les articulations peuvent être touchées. Cependant l'articulation du genou est plus fréquemment atteinte (entre 40 % à 50 % des cas). Le tableau clinique est d'apparition rapide. La douleur est au premier plan, elle est aggravée par la mobilisation de l'articulation atteinte. Localement, le praticien peut observé un épanchement articulaire, une augmentation de la chaleur et une rougeur. Le tableau infectieux général est très variable. Il peut être évident : fièvre élevée avec frissons (20 % des cas). Cependant, dans la plupart des cas, il est peu marqué : la fièvre manque une fois sur deux et l'hyperleucocytose n'est observée que dans 40 % des cas.

1.2.2.2 Données biologiques

Le syndrome inflammatoire est le plus souvent marqué. La VS est en général augmentée entre 70 et 80 mm. La CRP est fréquemment supérieure à 100 mg/l. Cependant dans 10 à 15% des cas, ces marqueurs biologiques peuvent être normaux. Une ponction articulaire est indispensable afin de mettre en évidence l'agent pathogène. Cette ponction permet de trouver des polynucléaires neutrophiles typiquement altérés. Un taux de polynucléaire supérieur à 90% est fortement évocateur d'une arthrite septique.

Germes	Fréquence en fonction des séries
Staphylocoque **S. Aureus**	44-69% 79-97%
Bacille Gram -	7-21%

Tableau 3: Bactéries rencontrées en cas d'infection articulaire

Les staphylocoques représentent près des deux tiers des germes identifiés chez l'adulte. Dans ces infections à Staphylocoque, *Staphylococcus aureus* est le plus fréquemment retrouvé avec environ 10 % de résistance à la méticilline. Ces staphylocoques méticilline résistants concernent des patients âgés, atteints de multiples comorbidités et préalablement hospitalisés. Les staphylocoques à coagulase négative

BY-NC-ND

sont impliqués dans seulement 15% à 20% des infections à staphylocoque. Ils sont essentiellement retrouvés dans les infections postopératoires sur prothèses ou les arthrites iatrogènes par inoculation directe ou chez l'hémodialysé. Les streptocoques représentent 20% des germes retrouvés, puis viennent les bacilles à Gram négatifs dans 10% des cas avec essentiellement *Escherichia coli.*

1.2.2.3 Données de l'imagerie

1.2.2.3.1 Radiographies

Au début les radiographies sont normales. Des signes indirects d'épanchement articulaire peuvent être observés. Après quelques jours d'évolution, une déminéralisation sous-chondrale apparaît, suivie d'un pincement global de l'interligne articulaire. Cependant l'interprétation des clichés radiologiques peut être difficile à cause d'une dégénérescence arthrosique sous-jacente. Il est souvent nécessaire de confronter les clichés récents aux clichés antérieurs afin de rechercher une aggravation rapide pathognomonique d'un processus infectieux.

1.2.2.3.2 Échographie

Il s'agit de l'examen de choix pour rechercher un épanchement articulaire, même en cas de faible abondance. Une échographie normale permet de remettre le diagnostic d'arthrite septique en cause (14). Cependant, cet examen ne permet pas d'affirmer le diagnostic d'infection articulaire s'il est positif. Il permettra éventuellement de guider une ponction articulaire à visée diagnostique.

1.2.2.3.3 Scanner

Il permet de confirmer la présence d'un épanchement articulaire. Il permet également de rechercher des abcès juxta-articulaires et il est plus sensible dans la mise en évidence des érosions osseuses et des foyers d'ostéite. Il est l'examen de choix pour les articulations sacro-iliaques et sterno-claviculaires.

1.2.2.3.4 Imagerie par Résonance Magnétique

L'épanchement articulaire se présente sous la forme d'un hypersignal en T2 alors que la réaction inflammatoire de la synoviale est mise en évidence sous la forme

BY-NC-ND

d'un hyposignal en T1 rehaussé par le gadolinium. Elle permet également d'observer un oedème médullaire parfois difficile à différencier du foyer d'ostéite, des érosions osseuses, l'amincissement du cartilage articulaire, l'œdème des parties molles et les abcès juxta-articulaires. Cependant, cet examen ne permet pas de différencier arthrite septique et non septique. Aucun signe n'est pathognomonique(15).

1.2.3 Traitement des infections articulaires

L'arthrite septique doit bénéficier d'une prise en charge en urgence. En effet, le pronostic vital peut être mis en jeu chez les sujets âgés, chez les patients polypathologiques. De plus un retard dans la prise en charge pourra compliquer le traitement de l'infection et engendrera des séquelles. Le patient doit bénéficier d'une hospitalisation pendant laquelle un lavage articulaire sera réalisé en association à la mise en place d'un traitement antibiotique.

1.2.3.1 Traitement antibiotique des infections articulaires

Avant la mise en route du traitement antibiotique, il est fondamental de faire des prélèvements à visée bactériologique. Cependant le traitement peut être débuté avant l'identification définitive du germe. En cas de suspicion d'infection dite communautaire, le traitement visera préférentiellement un staphylocoque et associera volontiers la pénicilline M et la gentamycine. En cas de sujet âgé, fragile ou en cas de porte d'entrée urinaire, abdominale, le traitement visera un bacille à Gram négatif et associera la cefotaxime à une fluoroquinolone ou à la gentamicine ou à la fosfomycine. En cas d'hospitalisation récente ou d'infection postopératoire, le traitement visera un *Staphylococcus aureus* méticilline résistant et associera la vancomycine à la fosfomycine ou à l'acide fusidique. L'antibiothérapie sera de toute façon adaptée en fonction des résultats de l'antibiogramme.

BY-NC-ND

Germe	Première ligne	Relai oral ou alternative
Staphylocoque méti-S	Oxacilline ou cloxacilline ou céfazoline + Gentamicine	Fluoroquinolone + rifampicine ou acide fusidique Clindamycine + acide fusidique Clindamycine + rifampicine
Staphylocoque méti-R	Vancomycine ou teicoplanine + gentamicine ou acide fusidique ou fosfomycine	Deux antibiotiques selon antibiogramme
Streptocoque	Amoxicilline + gentamycine	Amoxicilline ou clindamycine
Bacille à gram négatif	C3G + gentamicine ou fosfomycine	Ofloxacine ou ciprofloxacine

La bi-antibiothérapie est de règle en France à cause de la gravité de l'infection. Elle est recommandée pour les staphylocoques, entérocoques, *Pseudomonas* et entérobactéries. Elle est cependant inutile pour le gonocoque. Les streptocoques, quant à eux, peuvent se traiter par une monothérapie, une bi-antibiothérapie initiale permettra de renforcer la bactéricidie et sera justifiée en cas de septicémie ou d'endocardite.

1.2.3.2 Traitement chirurgical des infections articulaires

Le lavage articulaire a pour objectif de diminuer la pression articulaire, source de douleurs et de dégâts articulaires, d'évacuer le matériel nécrotique et de diminuer la charge bactérienne afin de favoriser l'efficacité du traitement médical. Cependant la littérature ne montre pas de supériorité du lavage chirurgical par rapport au drainage médical(15).

1.3 Les infections ostéo-articulaires sur matériel

Plusieurs facteurs permettent de caractériser les infections ostéo-articulaires sur matériel :

- leur étiologie (mécanisme de survenue, type de matériel, micro-organisme)

- leur durée d'évolution

- leur localisation

BY-NC-ND

- leur étendue

- le terrain du patient victime de cette infection

1.3.1 Durée d'évolution et classification des infections sur matériel

Le résultat de la prise en charge de ces infections est étroitement lié à la durée d'évolution de l'infection. Ainsi plus l'infection est évoluée plus il sera difficile d'aboutir au traitement définitif de cette infection. Cependant la notion d'infection aiguë ou chronique est mal codifiée. Pour l'infectiologue, une infection aiguë est caractérisée par la présence de signes inflammatoires locaux ou généraux et/ou d'une douleur de survenue récente. Pour le biologiste, la chronicité est définie par l'apparition d'un biofilm (entité dynamique constituée d'une substance polysaccharidique secrétée par les bactéries appelée « slime » permettant l'adhérence définitive des bactéries sur le matériel) et par un polymorphisme des colonies isolées sur les prélèvements profonds. Pour le chirurgien, l'infection est aiguë si elle est susceptible d'être traitée sans ablation du matériel.

La notion d'infection aiguë ou chronique n'a aucun rapport avec le délai d'apparition de l'infection dans les suites de la mise en place du matériel. Une infection précoce survient dans le mois qui suit la pose du matériel. L'infection est dite retardée entre 2 et 6 mois après la mise en place du matériel. L'infection est dite tardive au-delà de 6 mois.

Mode de contamination	Physiopathologie	Durée des symptômes	Bactériologie
Peropératoire	Inoculation directe du germe	Précoces (<3 mois) : symptômes aigus avec fièvre et écoulement Tardifs (3-24 mois) : tableau atypique avec douleur	> ¾ Staphylocoques, autre Gram+, bacille Gram-
Par contiguïté	Contamination par un foyer proche	Tardifs (3-24 mois) : tableau subaigu avec fistule, écoulement prolongé	Germes de faible virulence (S. coagulase négatif, Proprionibacterium

BY-NC-ND

			acnes, Bacille Gram-)
Hématogène	Dissémination sanguine	>24 mois : début aigu des symptômes	Staphylococoques (S. aureus dans 50% cas), E. coli, Polymicrobien….

1.3.2 Facteurs de risque des infections sur matériel

Pour les fractures ouvertes, la localisation au tibia et la sévérité des lésions des parties molles (classification de Gustilo) sont des facteurs de risque significatifs d'infection du site opératoire.

Pour les fractures fermées des os longs, le diabète est un facteur de difficulté de cicatrisation après l'ostéosynthèse de la cheville ou du pied rendant plus important le risque d'infection du site opératoire.

Pour la chirurgie orthopédique, le risque d'infection du site opératoire est augmenté en cas d'âge supérieur à 65 ans, d'existence d'un autre foyer infectieux, d'hospitalisation pré-opératoire dépassant quatre jours dans les six semaines précédant l'intervention. Une majoration faible du risque d'infection du site opératoire est observée en cas d'obésité, de traitement par corticoïde, de tabagisme, de trouble de cicatrisation, d'escarre à proximité du site opératoire, d'apparition d'un hématome dans les suites de la chirurgie et pour les patients porteurs d'une polyarthrite rhumatoïde.

1.3.3 Epidémiologie et surveillance des infections du site opératoire (ISO)

Le taux d'infection sur matériel est faible en chirurgie orthopédique et traumatologique. Il est d'environ 0,6 à 1,6% pour la chirurgie prothétique, et de 3 à 7 % dans le cadre de la traumatologie nécessitant la mise en place de matériel (16). Ce taux d'infection a nettement chuté depuis la mise en place d'un traitement antibiotique prophylactique associé à une surveillance de ces infections (17). La surveillance des infections du site opératoire constitue ainsi une priorité nationale en termes de lutte

BY-NC-ND

contre les infections nosocomiales grâce aux données regroupant les études cliniques et les données de surveillance du système RAISIN (Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales) (18).

Ce système de surveillance est actif depuis 2009 dans notre Centre Hospitalier Universitaire. L'article ci-dessous rapporte les observations faites grâce à la mise en place de cette surveillance. Nous avons observé, entre 2009 et 2012, une décroissance des infections du site opératoire passant de 1,86% à 0,66% uniquement grâce à la mise en place de cette surveillance. Ce travail montre également la prédominance du staphylocoque dans les infections du site opératoire (58% des cas) avec 34% d'infection à *Staphylococcus aureus méti-sensibles*, 16% d'infection à *Staphylococcus à coagulase-négative* et 7% d'infection à *Staphylococcus aureus méti-résistants*. La mise en place d'un système de surveillance des ISO semble ainsi incontournable dans la lutte et la prévention des infections ostéo-articulaires.

Article 1 : Impact of a surgical site infection (SSI) surveillance program in orthopedics and traumatology. *Orthop Traumatol Surg Res* 2012; 98(6): 690-5. Mabit C, Marcheix PS, Mounier M, et al.

1.3.4 Bactériologie des infections sur matériel en chirurgie orthopédique

Les staphylocoques sont les bactéries le plus souvent rencontrées dans ce contexte. La fréquence des souches de staphylocoque à coagulase négative (particulièrement *Staphylococcus epidermidis*) est comparable à celle du staphylocoque doré. Ces infections sont dans 90% des cas mono-microbiennes.

Les infections sur matériels peuvent également être dues à des streptocoques (bêta-hémolytiques ou non hémolytiques), des entérocoques, une *Pseudomonas aeruginosa*, des entérobactéries (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis, Bacillus cereus*) et des germes anaérobies (*Propionibacterium acnes*). Cependant, en présence de matériel, presque tous les types de bactérie peuvent être retrouvés.

BY-NC-ND

Micro-organismes	% en fonction des études
Staphylococcus	75-88%
S. aureus	42-55%
S. aureus MS	27-37.7%
S. aureus MR	8-26%
S. coagulase négative	21-48%
Bacilles Gram négatifs	14-39%
Entérobactéries	7-32%
Acinetobacter spp.	0.5-3.9%
Pseudomonas aeruginosa	1.3-12%
Streptococcus	19.5%
Streptococcus spp.	3-6.5%
Enteroccus spp.	12-16%
Corynebacterium spp.	2-19.5%
Anaérobies	8%
Infections polymicrobiennes	32-46%

Tableau 4 : Principales bactéries dans les infections du site opératoire (19)

1.3.5 Diagnostic des infections osseuses sur matériel

1.3.5.1 Données cliniques

La mise en évidence d'une fistule en regard d'un matériel prothétique doit évoquer une infection sur matériel. Il s'agit ainsi d'une infection jusqu'à preuve du contraire. Par ailleurs les signes cliniques suivants sont très évocateurs d'une infection sur matériel :

- douleur d'intensité anormale ou réapparition de la douleur après un intervalle libre

- écoulement purulent le long de la cicatrice opératoire

- désunion, nécrose ou aspect inflammatoire de la cicatrice opératoire

BY-NC-ND

De plus la présence de signes généraux (fièvre, frissons) augmente la probabilité d'une infection sur matériel. Cependant l'absence de ces signes généraux ne doit pas faire éliminer le diagnostic.

1.3.5.2 Données biologiques

Dans la littérature, aucun paramètre biologique n'apparaît spécifique d'une infection sur matériel. L'augmentation des polynucléaires neutrophiles ne semble pas avoir une bonne valeur prédictive positive et négative en cas d'infection sur matériel. L'absence d'augmentation de la VS et/ou de la CRP ne permet pas d'exclure le diagnostic d'infection ostéo-articulaire sur matériel.

Ainsi, dans le mois qui suit la mise en place du matériel, il est recommandé de suivre la courbe d'évolution de la CRP (et non sa valeur absolue). Il est également recommandé de ne pas faire de surveillance de la VS qui semble ne pas avoir de valeur diagnostique.

Au-delà de 3 mois, il est recommandé de faire un dosage de la VS et de la CRP. Une infection sera suspectée lorsque la CRP sera supérieure à 10mg/l et la VS supérieure à 22mm.

1.3.5.3 Données de l'imagerie

1.3.5.3.1 Radiographie

Dans 50% des infections sur matériel, le bilan radiographique restera normal. Cependant cet examen est fortement recommandé. Les radiographies peuvent mettre en évidence:

- un séquestre

- un liseré clair et entendu autour du matériel avec une évolution de plus de 2 mm sur une période de 1 an

- une zone d'ostéolyse floue et mal définie

BY-NC-ND

- une réaction périostée

- la présence de gaz intra-articulaire

- une mobilisation ou une fracture du matériel d'ostéosynthèse.

1.3.5.3.2 Scanner

Cet examen permet de préciser les images radiographiques. Il est surtout intéressant pour planifier la prise en charge chirurgicale à venir. Cependant cet examen est souvent artéfacté par la présence de matériel.

1.3.5.3.3 Échographie

En cas de suspicion d'infection articulaire sur matériel, l'absence d'épanchement intra-articulaire a une forte valeur prédictive négative.

1.3.5.3.4 Imagerie par Résonnance Magnétique

L'IRM a un intérêt pour rechercher les atteintes des parties molles. Cette IRM doit être réalisée avec des séquences permettant de diminuer les artefacts dus au matériel (fast spin-écho). Cet examen doit également être réalisé en association à une injection intraveineuse de Gadolinium.

Il peut mettre en évidence :

- un œdème inflammatoire des tissus mous sous la forme d'un hypersignal en T2 avec un rehaussement après injection de Gadolinium

- une collection intra-osseuse ou des parties molles avec rehaussement annulaire lors de l'injection de Gadolinium

- un trajet fistuleux sous la forme d'un hypersignal en T2 se rehaussant après injection de Gadolinium

- la présence d'appositions périostées

BY-NC-ND

- une ostéolyse floue et mal limitée autour du matériel

- une collection dans les parties molles adjacentes au matériel

- un épanchement intra-articulaire ou dans une bourse séreuse sous la forme d'un hypersignal en T2 sans prise de contraste après injection de Gadolinium

- un séquestre osseux apparaissant en hyposignal sur l'ensemble des séquences.

1.3.5.3.5 Examens de médecine nucléaire

La scintigraphie osseuse marquée au Technétium 99 (avec 3 temps successifs : vasculaire, tissulaire et osseux plus tardif) est un examen précocement positif, mettant en évidence une fixation anormale aux 3 temps. Sa sensibilité est de 90 à 100 % mais sa spécificité n'est que de 30 à 40 %. Cependant, sa valeur prédictive négative est voisine des 100 %. Ainsi une scintigraphie osseuse au HDP-Tc99m ou au HMDP-Tc99m anormale n'est pas spécifique d'une infection ostéo-articulaire. Des anomalies de fixation peuvent être observées après la mise en place d'un matériel pendant une période allant de 6 à 12 mois au niveau de la hanche et pouvant aller jusqu'à 24 mois au niveau du genou.

Il est, ainsi, fortement recommandé de compléter le bilan par une scintigraphie aux polynucléaires marqués avec images tardives 24 heures après la réinjection des polynucléaires. En cas d'imagerie positive à 24 h, la localisation du foyer infectieux pourra être améliorée par la réalisation d'un scanner hélicoïdal couplé à une Tomographie par Émission MonoPhotonique (TEMP-TDM). Cette scintigraphie a une sensibilité de 81 à 97 % et une spécificité de 89 à 100 %. Cependant, un délai d'au moins 6 mois entre la pose de la prothèse et la réalisation de la scintigraphie est nécessaire pour permettre son interprétation. Si le marquage *in vitro* des leucocytes autologues n'est pas possible, une scintigraphie aux anticorps anti-granulocytes type leukoscan peut être réalisée.

1.3.6 Notion de Biofilm et infection sur matériel(19)

La physiopathologie de l'infection sur matériel bénéficie de mécanismes offrant

BY-NC-ND

la possibilité aux bactéries de survivre et de se développer dans un milieu peu favorable. Ainsi, la surface des matériaux artificiels n'est pas totalement inerte. Les oxydes de surface (acier, chrome, cobalt, titane) peuvent interagir avec des glycoprotéines tissulaires (fibronectine, fibrine, fibrinogène, collagène). Certaines bactéries possèdent une grande capacité d'interaction avec ces glycoprotéines membranaires par l'intermédiaire d'adhésines spécifiques (*fibronectin-binding protein*). Cet appariement constitue un système d'arrimage solide mais réversible de la bactérie sur le matériel. Une fois cet arrimage réalisé, le *slime* (glycocalyx - substance polysaccharidique sécrétée par les bactéries) permet une stabilisation définitive et une protection de l'agent infectieux contre l'action des polynucléaires. Il s'agit là des premières étapes de la formation du biofilm.

Le développement des bactéries au sein du biofilm se fait à croissance ralentie (colonies appelées « *small colony variants* ») et la diffusion des antibiotiques en son sein est sub-optimale. Il en résulte finalement une perte de sensibilité des bactéries aux bactéricides (antibiotiques et polynucléaires). A l'extérieur du biofilm, la sensibilité des bactéries aux antibiotiques est intacte.

Ce biofilm s'étend en quelques jours à toute la surface du matériel, ce qui explique qu'un lavage chirurgical tardif au-delà de 15 jours soit inefficace. Ces constatations physiopathologiques expliquent la nécessité, le plus souvent, de l'ablation du matériel, et ce d'autant plus si :

- l'infection est ancienne

- l'implant est descellé

- les défenses immunitaires du patient sont mauvaises

Un certain nombre de bactéries sont connues pour produire un biofilm : des staphylocoques (notamment *S. aureus, S. epidermidis, S. lugdunensis*), *Propionibacterium acnes, Pseudomonas aeruginosa.*

BY-NC-ND

1.3.7 Traitement des infections sur matériel

1.3.7.1 Traitement chirurgical des infections sur matériel

Cette prise en charge doit répondre à trois objectifs : éradiquer l'infection, sauvegarder le capital osseux et préserver la fonction.

Pour répondre à ces objectifs, le simple débridement de type synovectomie-lavage peut être proposé en cas d'infection précoce (post-opératoire jusqu'aux environs de J15, infection secondaire récente sans descellement). Le résultat de ce traitement est fonction de la précocité du geste. Dans les autres cas, l'ablation complète du matériel doit être réalisée afin d'augmenter les chances de guérison de l'infection.

1.3.7.2 Traitement antibiotique des infections sur matériel

1.3.7.2.1.1 Traitement antibiotique local

Les ciments aux antibiotiques à visée thérapeutique représentent le traitement local le plus souvent utilisé. Ils ne doivent être utilisés que de façon temporaire pour permettre le comblement d'une cavité infectée ou pour préparer un changement de prothèse en deux temps. Dans un but thérapeutique, il faut utiliser des doses élevées d'antibiotiques. Cependant ces ciments ne permettent pas de se dispenser d'un traitement antibiotique par voie générale.

La cinétique de relargage de l'antibiotique par ces ciments comporte deux phases : une phase immédiate qui dure 7 jours, à l'origine d'une forte concentration d'antibiotique, et une phase secondaire, qui dure des années au cours desquelles des doses beaucoup plus faibles d'antibiotique sont présentes (doses sub-inhibitrices). Ce relargage prolongé de faible quantité d'antibiotique n'est pas sans danger. En effet, ces faibles quantités peuvent induire des phénomènes de résistance chez des bactéries présentes à proximité. Ainsi les instances réglementaires du médicament (ANSM, EMEA, FDA) préconisent fortement d'éviter tout phénomène en « queue de comète » (20).

1.3.7.2.1.2 Traitement antibiotique général

BY-NC-ND

L'antibiothérapie au cours d'une infection ostéo-articulaire sur matériel doit répondre à un cahier des charges bien défini :

- documenter l'infection (en cas de sepsis, l'antibiothérapie sera débutée de façon probabiliste après réalisation des prélèvements microbiologiques et en attente de leurs résultats)

- antibiothérapie débutée en association

- obtention de concentrations plasmatiques enlevées au dessus de la CMI du germe en cause

- utilisation de molécules ayant une bonne diffusion osseuse

Ce traitement doit initialement être administré sous une forme intraveineuse. La durée de l'antibiothérapie parentérale n'est validée par aucune étude. Elle est habituellement de 15 jours. À ce terme, il est recommandé de proposer un relais par voie orale à condition :

- que les antibiotiques aient une bonne biodisponibilité et une bonne diffusion osseuse

- que la tolérance digestive du traitement soit bonne

- d'être certain de l'observance du traitement par le patient.

Ce traitement doit être réalisé pour une durée minimale de 6 semaines. Les durées usuelles rapportées dans la littérature sont de 6 à 12 semaines.

BY-NC-ND

Propositions d'antibiothérapie en cas d'infections à staphylocoques méticillino-sensibles à adapter selon l'antibiogramme et le terrain.

	Absence d'allergie à la pénicilline	**Allergie à la pénicilline**
Antibiothérapie initiale par voie IV (2 semaines)	(oxacilline ou cloxacilline) ou céfazoline + gentamicine ou rifampicine	Clindamycine (si souche érithromycine sensible) ou (teicoplanine ou vancomycine) + gentamicine ou rifampicine ou (teicoplanine ou vancomycine) + acide fusidique
Relai par voie orale	Rifampicine + (ofloxacine ou péfloxacine ou ciprofloxacine ou lévofloxacine) ou rifampicine + acide fusidique ou rifampicine + clindamycine (si souche érithromycine sensible) ou (ofloxacine ou péfloxacine ou ciprofloxacine ou lévofloxacine) + acide fusidique ou clindamycine (si souche érythromycine sensible) + acide fusidique ou rifampicine + cotrimoxazole (en l'absence d'autre alternative)	

BY-NC-ND

Proposition d'antibiothérapie en cas d'infections à staphylocoques résistants à la méticilline :

Antibiothérapie initiale par voie IV (2 semaines)	(vancomycine ou teicoplanine) + rifampicine ou (vancomycine ou teicoplanine) + acide fusidique ou (vancomycine ou teicoplanine) + fosfomycine ou (vancomycine ou teicoplanine) + doxycycline ou clindamycine (si souche érythromycine sensible) + gentamicine puis clindamycine + rifampicine
Relai oral si la sensibilité de la bactérie le permet	Rifampicine + acide fusidique ou rifampicine + clindamycine (si souche érythromycine sensible) ou rifampicine + cotrimoxazole ou rifampicine + (minocycline ou doxycycline) ou rifampicine + linézolide

BY-NC-ND

Propositions d'antibiothérapie en cas d'infections à streptocoques, entérocoques, anaérobies, à adapter selon l'antibiogramme et le terrain :

Streptocoques	**Absence d'allergie à la pénicilline**	**Allergie à la pénicilline**
Antibiothérapie initiale par voie IV	Amoxicilline + gentamicine	Clindamycine (si souche érythromycine sensible) + gentamicine ou céfazoline + gentamicine ou ceftriaxone + gentamicine
Relai oral	Amoxicilline ou clindamycine (si souche érythromycine sensible)	
Entérocoques		
Antibiothérapie initiale par voie IV	Amoxicilline + gentamicine puis amoxicilline +/- rifampicine	(vancomycine ou tercoplanine) + gentamicine puis (vancomycine ou teicoplanine) + rifampicine
Relai oral	Amaxicilline +/- rifampicine	Avis spécialisé
Anaérobies à gram (+) (P. acnes, Peptostreptococcus) **Anaérobies à gram (-) (Bacteroïdes spp…)**	Amoxicilline ou céfazoline ou cetriaxone ou clindamycine (si souche érythromycine sensible) Clindamycine ou métronidazole ou amoxicilline-acide clavulanique	Clindamycine Clindamycine ou métronidazole

BY-NC-ND

Propositions d'antibiothérapie en cas d'infections à bacilles à Gram négatif, à adapter selon l'antibiogramme et le terrain

Antibiothérapie initiale par voie IV **Pseudomonas aeruginosa**	(céfotaxime ou ceftriaxone) + ciprofloxacine ou ofloxacine) ou (céfotaxime ou cetriaxone) + gentamicine ou (imipénem ou métropénem ou doripénem) + gentamicine (ceftazidime ou céfépime) ou (imipénem ou méropénem ou doripénem) + (amikacine ou tobrapycine) ou ciprofloxacine ou fosfomycine
Relai par voie orale **(si souche sensible aux fluoroquinolones et en l'absence de fort inoculum bactérien)**	Ofloxacine ou ciprofloxacine si *Pseudomonas aeruginosa*

BY-NC-ND

2 Caractéristiques et choix de l'agent anti-infectieux local

Le traitement local d'un processus infectieux est incontournable d'autant plus qu'il s'agit d'infection ostéo-articulaire et qu'il existe des implants chirurgicaux (21). Cependant pour pouvoir être utilisés, ces traitements doivent permettre d'obtenir une concentration minimale inhibitrice suffisante (CMI) de l'agent bactérien, et ce pendant plusieurs jours pour pouvoir traiter l'infection ostéo-articulaire. L'antibiotique libéré doit répondre à plusieurs critères (22): spectre antibactérien large, effet bactéricide obtenu avec des basses concentrations, taux réduit de germes résistants primaires, développement réduit de résistances, potentiel allergénique faible, absence de toxicité, stabilité chimique et thermique, solubilité dans l'eau, potentiel de relargage à partir de la matrice utilisée. Ces contraintes ont fait de la Gentamicine la molécule de référence des systèmes à libération prolongée d'antibiotique (23). De plus, cet antibiotique est reconnu pour son action anti-staphylococcique, germe responsable de la plupart des infections ostéo-articulaires (24).

3 Systèmes à libération locale d'antibiotiques

Les systèmes à libération locale de substances bioactives peuvent être divisés en deux catégories en fonction de leur caractère biodégradable. Les systèmes à libération non biodégradables tels que le polyméthacrylate de méthyle (PMMA) sont couramment utilisés pour le traitement des infections osseuses. Le PMMA a prouvé son efficacité mais oblige à une deuxième intervention chirurgicale pour le retirer afin d'éviter qu'il ne se transforme en corps étranger une fois l'antibiotique libéré. Au cours des dernières années, différents systèmes biodégradables à libération locale d'antibiotique ont été développés et évalués dans le cadre du traitement des infections ostéo-articulaires.

3.1 Caractéristiques nécessaires d'un système à libération locale d'antibiotiques

- être actif contre les bactéries en cause dans l'infection ostéo-articulaire
- permettre une libération locale de l'antibiotique à des concentrations supérieures à la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'agent pathogène et de façon prolongée dans le temps.
- ne pas provoquer de libération de l'antibiotique dans la circulation systémique.

BY-NC-ND

- ne pas provoquer d'effets indésirables.
- être stable à la température corporelle et soluble dans l'eau pour assurer une bonne diffusion.
- ne pas aggraver l'état infectieux.

3.2 Les systèmes non biodégradables

3.2.1 Les billes de ciment aux antibiotiques (PMMA)

L'utilisation du polyméthylmétacrylate (PMMA) comme agent local anti-infectieux remonte aux années 70 (25). Ce n'est qu'en 1976 que Klemm utilise l'association PMMA-antibiotique pour le traitement des ostéomyélites chroniques (26). Cet auteur développe alors des gentabilles pour remplacer le PMMA sous forme de ciment liquide dans ces indications. Après une première fabrication manuelle peropératoire utilisant un mélange de poudre de PMMA et de poudre d'antibiotique, les gentabilles ont ensuite été commercialisées sous forme de billes de 6 à 7 mm de diamètre, liées entre elles par un fil d'acier inoxydable, formant des chaînettes de 30 ou 60 billes (Septopal®) (27, 28). Le Septopal® a été largement utilisé pour le traitement des infections ostéo-articulaires. En cas d'infection sur matériel, ce dernier était retiré et après curetage et parage « carcinologique » des tissus infectés, les chapelets étaient utilisés pour combler l'espace vide. L'extrémité du chapelet était laissée en dehors de la plaie pour permettre leur extraction progressive lors de la guérison supposée du processus infectieux(27, 28). Les chirurgiens ont ensuite enfoui les chapelets au niveau du foyer infectieux afin de limiter les risques de contamination secondaire (29, 30). Ces billes permettaient d'apporter localement une forte concentration d'antibiotique (5 à 10 fois supérieure à un traitement systémique) tout en évitant les effets secondaires du traitement par voie générale (29).

En 2003, Mohanty obtenait 87% de guérison dans la prise en charge d'ostéomyélites chroniques avec des billes laissées en place 3 semaines (31). Pour Walenkamp, 92% des patients étaient guéris à la suite d'un traitement d'une ostéomyélite par débridement + billes à la gentamicine (30). Cependant, ces types de matériaux offrent une faible biocompatibilité. Ils obligent à l'ablation secondaire de ces perles. De plus, la polymérisation lors de la constitution de ces billes est associée à une

BY-NC-ND

production de chaleur très importante avec un effet sur les antibiotiques mal contrôlé (d'autant plus important en cas de fabrication « artisanale »). Par ailleurs, la libération de l'antibiotique se fait avec un effet « burst » initial très important suivi d'une libération de l'antibiotique qui s'épuise très progressivement avec le temps favorisant la survenue de bactéries résistantes au contact de ces billes. Devant toutes ces imprécisions et ces contraintes, le Septopal® a été retiré du marché depuis le 24 avril 2009.

3.2.2 Les ciments et spacers aux antibiotiques

Les ciments aux antibiotiques sont commercialisés sous deux formes :

- les ciments aux antibiotiques utilisés lors de la mise en place des arthroplasties
- les spacers aux antibiotiques utilisés pour le traitement des infections après arthroplasties.

Dans un contexte de prévention des infections ostéo-articulaires, le PMMA chargé à la Gentamicine ou à la Tobramycine est actuellement le vecteur d'antibiotique local le plus utilisé. L'efficacité de ce polymère a été démontrée avec une baisse significative du risque infectieux en cas d'utilisation de ces derniers (32-34). Les auteurs expliquent l'intérêt de ces ciments par le relargage massif initial de l'antibiotique empêchant toute contamination primaire (27, 30). Dans un contexte de lutte contre une infection établie, les études *in vitro* et *in vivo* mettent en évidence une libération de l'antibiotique par le PMMA sous une forme bimodale (35). Les études d'élution *in vitro* de gentamicine à partir du PMMA ont montré un relargage limité de la quantité d'antibiotique mise initialement dans le PMMA. Ainsi seulement 5% ont été élués au bout de 8 semaines d'observation du ciment Palacos® à la gentamicine et 67% (de ces 5%) sont relargués dès les 24 premières heures (36). Cette rétention de l'antibiotique dans le ciment (effet « trapping ») est indépendante de la nature de l'antibiotique et de la nature du ciment (37, 38). Ainsi, seulement 15% de la quantité totale d'antibiotique introduite initialement dans le ciment semble pouvoir être libérés par le PMMA (39). Cet effet trapping de l'antibiotique semble être lié à la porosité du ciment et à ses caractéristiques de surface (40, 41). La libération de l'antibiotique ne s'observe que sur une période de 5 à 7 jours (42). Cependant, malgré cet effet trapping et une période de relargage très courte, nous pouvons observer une libération d'antibiotique bien supérieure à la CMI des germes visés grâce au PMMA permettant d'obtenir un effet thérapeutique. Cependant la deuxième phase de libération est caractérisée par un

BY-NC-ND

relargage lent et prolongé de l'antibiotique à des concentrations subinhibitrices pendant plusieurs années. Cette faible libération d'antibiotique associée à la formation d'un biofilm au contact du polymère peut aboutir à l'émergence de bactéries résistantes (37, 43, 44).

3.3 Les systèmes biodégradables

Les implants biodégradables peuvent fournir des concentrations locales élevées et bactéricides d'antibiotiques sur une période prolongée afin d'éliminer complètement l'infection. Le caractère biodégradable de l'implant peut être adapté en fonction de l'infection à traiter et permet d'éviter une reprise chirurgicale visant à retirer l'implant. L'implant peut également être utilisé initialement afin de combler un espace mort et guider la réparation du tissu infecté. De plus, la libération de l'antibiotique peut se produire pendant la phase de dégradation de l'implant, ce qui pourrait permettre d'augmenter l'efficacité antibactérienne par rapport à des supports non-biodégradables.

3.3.1 Les éponges de collagène

Le collagène a été rapporté comme un matériau bien toléré et totalement biodégradable. Le collagène est considéré comme un biomatériau utilisable en chirurgie depuis les travaux de Feritz en 1940 (45). L'utilisation du collagène (composante organique naturelle de l'os) confère à ces biomatériaux une très bonne biocompatibilité. Ce traitement avait pour objectif de constituer le support idéal pour une minéralisation aboutissant à une reconstruction osseuse locale. La Gentamicine incorporée dans ces éponges de collagène est libérée dans un premier temps par diffusion puis par destruction par les collagénases secrétées par les macrophages. La dégradation du collagène est alors totale et l'ablation du matériel n'est plus nécessaire. Cependant les résultats expérimentaux sont décevants avec une efficacité sur le traitement de l'infection très inférieure à l'utilisation du PMMA (46, 47). La littérature portant sur l'utilisation de ces éponges met en évidence un relargage de l'antibiotique sur une période de 3 à 4 jours avec un « burst » initial majeur (48). Le collagène semble ainsi être plus efficace dans la prévention du risque infectieux que dans le traitement d'une infection ostéo-articulaire. Plusieurs méthodes, telle que l'utilisation d'un sel d'antibiotique de solubilité réduite, l'utilisation d'éponge recouverte de polyester

BY-NC-ND

résorbable, l'incorporation d'antibiotique dans des microparticules de PLGA, visent à ralentir la libération de l'antibiotique de ces éponges.

3.3.2 Les céramiques phosphocalciques

Il s'agit de biomatériaux de synthèse, ostéoconducteurs, biocompatibles et partiellement résorbables. Ces céramiques présentent une composition chimique similaire à la phase minérale du tissu calcifié. Elles présentent des caractéristiques d'ostéoconduction et servent donc de charpente à la repousse osseuse. On peut les retrouver sous les formes suivantes :

- Hydroxyapatite (HA) : synthétique ou biologique. L'HA se rapproche le plus de la phase cristalline de l'os.

- Phosphate tricalcique β (β-PTC)

- Produits biphasés ou BPC (Biphasic Calcium Phosphate) : associant un rapport variable de HA et de β-PTC.

Devant un caractère fragile et de faible résistance, les céramiques sont utilisées dans les indications de comblement des pertes de substance osseuse, pour remplacer des os de petite taille sans contrainte mécanique, pour recouvrir des prothèses métalliques et en tant que système à libération d'antibiotique. La production de ces céramiques se fait par frittage à haute température (environ 1200°C) ce qui permet de contrôler la porosité de ces biomatériaux et donc leurs propriétés ostéoconductrices.

L'HA est très peu soluble dans les milieux biologiques et présente donc un taux très bas de dégradation *in vivo*. Des procédés d'enrobage ont été testeś expérimentalement pour fixer à la surface des implants métalliques des antibiotiques mélangés à la couche de poudre de la céramique. Cette technique permettrait d'avoir une action d'antibioprophylaxie locale (49). Cependant, pour l'utilisation comme vecteur d'antibiotique, le frittage à haute température empêche le mélange des antibiotiques avec les céramiques. Ainsi, certains auteurs ont développé des techniques alternatives (absorption sous pression après frittage, intégration secondaire par centrifugation) (50, 51). L'observation du relargage par ces céramiques pose un problème d'équilibre à

BY-NC-ND

trouver entre macroporosité nécessaire à l'ostéoconduction et contrôle de la libération de l'antibiotique. Ainsi plus les pores de la céramique sont larges plus l'antibiotique est relargué rapidement. *In vitro*, le relargage de l'antibiotique semble pouvoir varier entre 20 heures et 21 jours à des doses supérieure à 1,5 fois la CMI du germe en cause (52, 53). *In vitro*, le relargage semble être plus lent à cause de l'apparition d'un coagulum (54). Plusieurs équipes rapportent une guérison des ostéomyélites chez l'homme grâce à l'utilisation de blocs HA chargés aux antibiotiques (55, 56).

Le β-TCP est, quant à lui, beaucoup plus soluble que l'HA. Sa dégradation est donc plus importante.

Les BPC permettent, en variant les proportions des différents composants, de modifier la solubilité et la vitesse de dégradation de la céramique.

Les céramiques phosphocalciques, malgré leur biocompatibilité et leurs excellentes propriétés ostéoconductrices, posent toujours le problème non résolu d'intégration de l'antibiotique à la céramique. Cette difficulté est à l'origine du relargage rapide et non contrôlé de l'antibiotique (9).

3.3.3 Les polymères à base d'acide lactique ou d'acide polyglycolique

Ces biomatériaux ont d'abord été utilisés pour la fabrication des fils de suture résorbables (Vicryl®). Cette utilisation montre l'excellente biocompatibilité de ces polymères.

Article 2 : Absorbable suture in Orthopaedics : From the implantation to the resorption. *Rev. Chir. Orthop.* 2015; 101(7): 587-592. Plessis C, Brischoux S, Sturtz F, Marcheix PS.

Les polymères à base d'acide lactique ou d'acide polyglycolique et leur association en co-polymères, sont les plus utilisés comme vecteurs d'antibiotiques dans le cadre d'un traitement expérimental d'une infection ostéo-articulaire chez l'animal (46,

BY-NC-ND

57-60). Ces polymères ont pour avantage de pouvoir maitriser le relargage de l'antibiotique en fonction de leur poids moléculaire (58, 61, 62).

Pour traiter une ostéite expérimentale, ces polymères chargés aux antibiotiques ont permis de baisser la charge bactérienne sans éradiquer l'infection expérimentale (63, 64). Pour Mader *et al*., l'utilisation de ce vecteur d'antibiotique permet de baisser la charge bactérienne de 1,5 Log (46). D'autres auteurs retrouvent des baisses de charge bactérienne mais sans jamais aboutir à la guérison de l'infection (23, 65). Ces polymères ont pour avantage d'être complétement biodégradables (23, 46). Cependant ils ne sont ni bioactifs vis à vis du tissu osseux ni ostéoconducteurs (9). De plus certains auteurs ont décrit des réactions à corps étranger avec ostéolyse périphérique secondaire à l'implantation de ces polymères en cas d'utilisation de ces polymères comme matériel d'ostéosynthèse et non pas comme vecteur d'antibiotique(66-68).

4 La notion de nanoparticule et son application biomédicale

Les nanoparticules sont préparées à partir de polymères naturels ou synthétiques. Une multitude de médicaments peuvent être délivrés à partir de ces particules solides et sphériques. L'objectif de ces nanoparticules est de délivrer de façon ciblée l'agent actif. La nano-encapsulation permet d'augmenter l'efficacité, la spécificité et la tolérance des médicaments. Plusieurs types de nanoparticules sont disponibles : poly acide lactique (PLA), poly acide glycolique (PGA) et leurs copolymères poly-lactique-co-glycolique (PLGA). Le choix dépendra des qualités locales désirées par le professionnel. Il n'existe par de règles établies et la bonne formulation se fera progressivement. Cependant cette thérapeutique permet d'obtenir des résultats supérieurs à la médecine traditionnelle grâce à ces qualités de contrôle de la libération, d'action ciblée et d'atténuation des effets secondaires.

4.1 Synthèse et caractérisation des nanoparticules

Les nanoparticules, ainsi que l'incorporation des médicaments, peuvent se fabriquer selon différentes techniques.

- Technique d'évaporation par émulsification avec le solvant : technique la plus couramment utilisée pour la préparation des nanoparticules sous forme de polymères

BY-NC-ND

solides. Cette technique est très intéressante en cas d'utilisation de médicaments hydrophobes, mais présente des résultats décevants en cas d'utilisation d'agents bioactifs hydrophile. L'évaporation du solvant est effectuée en dissolvant le polymère et le composé bioactif dans un solvant organique. Le plus souvent, le dichlorométhane ou le chlorure de méthylène sont utilisés pour obtenir un copolymère de PLGA. L'émulsion est obtenue par addition d'eau et d'un tensioactif à la solution de copolymère. Les gouttelettes de copolymère de taille nanométrique sont induites par sonication ou homogénéisation. Le solvant organique est ensuite évaporé et les nanoparticules sont généralement recueillies par centrifugation et lyophilisation.

- Technique de la double ou multiple émulsification : il s'agit d'une modification de la technique précédente visant à encapsuler des agents bioactifs hydrophiles ou des protéines. La première étape consiste à dissoudre un médicament hydrophile et un stabilisant dans l'eau. L'émulsion primaire est préparée par dispersion de la solution précédente dans un solvant organique contenant un polymère dissous. Cette solution subit ensuite une nouvelle émulsification dans une autre phase aqueuse contenant aussi un stabilisant. L'obtention des nanoparticules se fait alors selon la technique précédemment décrite pour l'élimination du solvant.

- Technique de nanoencapsulation en inversion de phase : essentiellement utilisée pour l'encapsulation d'Insuline, le Zn-insuline est dissout dans du Tris-HCl. Une partie de cette solution est recristallisée par addition de 10% de ZnSO4. En présence de chlorure de Méthylène, le précipité est ajouté à une solution de copolymère de PLGA. Ce mélange est émulsifié et dispersé dans 1 l. d'éther de pétrole provoquant la formation spontanée de nanoparticules.

Toutes les techniques précédemment décrites utilisent un solvant chloré toxique susceptible de dégrader les agents bioactifs ou les protéines. D'autres techniques ont donc été développées afin d'augmenter la stabilité de la substance bioactive au cours de l'élaboration du biopolymère :

- Technique de diffusion par émulsification : elle vise à utiliser un solvant partiellement solubles dans l'eau tel que l'acétone ou le carbonate de propylène. Le polymère et la substance bioactive sont dissous dans le solvant puis une émulsion en

BY-NC-ND

phase aqueuse est réalisée en présence de l'agent stabilisant. L'agent stabilisateur prévient l'agrégation des gouttelettes de l'émulsion. De l'eau est ajoutée à l'émulsion, afin de permettre la diffusion du solvant dans l'eau. La solution est agitée jusqu'à obtenir une nanoprécipitation des particules. Ils peuvent ensuite être recueillies par centrifugation. Le solvant peut, aussi, être éliminé par l'intermédiaire d'une dialyse.

- Technique de nanoprécipitation : le polymère et la substance bioactive sont dissous dans de l'acétone et ajoutés à une solution aqueuse contenant du Pluronic F68. L'acétone est évaporée par diminution de pression et les nanoparticules restent dans la suspension sous forme de particules allant de 110 à 208 nm. En utilisant cette technique, une émulsion eau-huile est obtenue contenant le polymère, l'acétone, l'acétate de magnésium tétrahydraté, un stabilisant et le composé bioactif. De l'eau est ensuite ajoutée jusqu'à ce que le volume soit suffisant pour permettre la diffusion de l'acétone dans l'eau, ce qui conduit à la formation de nanoparticules. Cette suspension est ensuite purifiée. Cependant, un inconvénient de cette procédure est qu'elle utilise des sels qui sont incompatibles avec de nombreux composés bioactifs.

La production de nanoparticules tient compte de plusieurs facteurs accessoires :

- **le type de tensioactif/stabilisateur** utilisé. Une large gamme de molécules naturelles et synthétiques ayant des propriétés différentes a été proposée pour préparer ces nanoparticules.

- **la quantité de stabilisant utilisée** aura également un effet sur les propriétés des nanoparticules. Si la concentration du stabilisant est trop faible, l'agrégation des nanoparticules de polymère rendra difficile la récupération des ces dernières. Si une trop grande quantité de stabilisant est utilisée, l'incorporation de la substance bioactive pourrait être réduite en raison de l'interaction entre le médicament et le stabilisateur.

- **la lyophilisation finale** peut provoquer une agrégation des nanoparticules affectant la taille « effective » de nanoparticules et par conséquent leur capacité de libération de la substance bioactive.

- **le polymère utilisé** pour obtenir les nanoparticules aura également un effet sur la structure, les propriétés et les applications des nanoparticules. Le copolymère PLGA a été le polymère le plus couramment utilisé afin d'obtenir des nanoparticules biodégradables. Cependant, ce copolymère ne semble par être le support optimal. Le

BY-NC-ND

polymère doit être choisi en fonction de la substance bioactive et de la zone d'action souhaitée.

- **le poids moléculaire et la concentration du polymère** utilisé auront aussi un impact sur les caractéristiques des nanoparticules. Les nanoparticules de petite taille (environ 100 nm) peuvent être préparées avec un polymère de poids moléculaire inférieur mais au détriment de la capacité d'encapsulation de la substance bioactive. Une augmentation de la concentration du polymère augmente l'efficacité d'encapsulation et la taille des nanoparticules.

- **la taille des nanoparticules et la capacité d'encapsulation de la substance bioactive** sont les deux caractéristiques les plus importantes à étudier. Si l'objectif est une dissolution rapide, la taille des nanoparticules doit être d'environ 100 nm. Si une dissolution prolongée est envisagée, des particules plus grandes autour de 800 nm seront utilisées. La littérature médicale démontre que l'efficacité d'encapsulation des nanoparticules augmente avec leur diamètre.

- **le potentiel zêta** : il s'agit d'une mesure de la charge de la particule. Plus la valeur absolue du potentiel zêta est importante, plus la charge de surface de la particule est importante. Le potentiel zêta représente un indice de stabilité des particules. La charge de surface joue un rôle répulsif conduisant à la formation de particules plus stables. Cette stabilité est importante dans la prévention de l'agrégation.

4.2 Caractéristiques de relargage des nanoparticules

Cette notion de relargage de la substance bioactive est une des caractéristiques les plus importantes des nanoparticules à base de polymère. Plusieurs facteurs influent sur le taux de relargage de la substance bioactive piégée dans les nanoparticules. Les particules les plus grosses ont un effet « burst » initial peu important et une capacité de relargage dans le temps plus importante que les particules de plus petite taille. De plus, plus la charge en substance bioactive est importante plus l'effet « burst » est marqué et plus la vitesse de libération est importante. L'effet « burst » semble être causé par les substances bioactives mal piégées lors du processus de fabrication des nanoparticules ou peut-être, autre raison, par un piégeage sur la partie extérieure de la nanoparticule.

BY-NC-ND

Par ailleurs l'addition d'autres polymères pour former un copolymère à base de PLA peut également être utilisée pour contrôler la libération de la substance bioactive.

Le PLGA (Poly acide lactique-co-glycolique) est le polymère biodégradable le plus souvent utilisé dans la littérature médicale actuelle. Sa dégradation par hydrolyse conduit à la formation de deux métabolites (acide lactique et acide glycolique). Ces métabolites sont reconnus par l'organisme et sont dégradés par l'intermédiaire du cycle de Krebs. Ces polymères sont donc pourvoyeurs d'une toxicité systémique quasi nulle. La dégradation de ces polymères varie de quelques mois à plusieurs années en fonction du poids moléculaire et du ratio entre acide glycolique et acide lactique.

Le PLA (poly acide lactique) est, quant à lui, moins utilisé dans la littérature médicale en raison d'une vitesse de dégradation plus lente que le PLGA.

4.3 Caractéristiques et production du polymère à la Gentamicine utilisé pour notre étude (69)

Le cahier des charges établi pour l'élaboration de ce polymère était le suivant : « Le traitement local et per-opératoire visant à libérer un antibiotique a été défini comme nécessitant un système matriciel offrant une libération de gentamicine à une dose de 1 à 2 mg/jour/g de mélange sur une période de plus de 10 jours. Ce système matriciel devait avoir des caractéristiques physiques appropriées et un taux de relargage suffisant pour permettre un traitement le plus sécuritaire possible tout en permettant une mise en place simple. De plus, le polymère devait être bio-résorbable, c'est-à-dire qu'il devait pouvoir être dégradé jusqu'à obtenir des fragments pouvant être éliminés naturellement par l'organisme » (70).

Les systèmes à base de $PLA_{50}p$ (bas poids moléculaire) ne répondent pas aux exigences d'une libération prolongée. En effet, la cinétique de relargage est trop rapide. Le $PLA_{50}p$ est un polyester aliphatique amorphe obtenu par polycondensation de l'acide DL-lactique sur lui-même. Ces chaines macromoléculaires renferment donc en moyenne 50% d'unités L-lactique et 50% d'unités D-lactique.

Les systèmes à base de PLA_{100} de haut ou bas poids moléculaire engendrent un « burst » initial majeur. La libération de l'antibiotique n'est pas progressive ni contrôlée.

BY-NC-ND

Ceci est lié à la cristallinité et à la structure poreuse de ces polymères. Le PLA_{100} est un polyester aliphatique semi-cristallin contenant 100% d'unités L-lactique.

Les systèmes à base de $PLA_{50}P$ en association avec le sulfate de gentamycine conditionnés sous forme de particules présentent plusieurs caractéristiques intéressantes. Ils sont d'élaboration aisée contrairement aux microsphères et aux microcapsules retrouvées dans la littérature. Il est possible de contrôler la vitesse de libération du principe actif en fonction notamment de la taille des particules et de la teneur en gentamicine. La courbe de libération de ces polymères met en évidence un « burst » initial lié à la dissolution du principe actif situé à la surface des particules puis la libération se fait par un processus de diffusion de l'antibiotique à travers la matrice macromoléculaire. Cependant, il ne semble pas que la dégradation du polymère joue un rôle dans la libération de l'agent actif puisque ce polymère est relativement stable sur la période d'observation.

Fabrication du $PLA_{50}P$, Poly(D,L-acide lactique) de haut poids moléculaire :

Le travail d'élaboration de ce polymère a été effectué par Mauduit en 1991(69). Le $PLA_{50}P$ est un poly(α-hydroxy acide) obtenu par polymérisation du DL-lactide. Ses chaînes macromoléculaires renferment en moyenne 50% d'unités L-lactique et 50% D-lactique. Il s'agit d'un polymère amorphe, biodégradable, biocompatible possédant une bonne tolérance initiale et à long terme dans le corps humain. La polymérisation du PLA_{50} s'effectue par ouverture de cycles du lactique racémique D,L-lactide. Ce polymère a une masse moléculaire de 100 000 g/mol. Afin d'incorporer la gentamicine au polymère, les étapes suivantes ont été réalisées. La première étape consiste en la production du $PLA_{50}P$. Pour ce faire, 100 g de DL-lactide ont été introduits dans un ballon à fond rond en présence de 0,05 g de poudre de zinc afin d'initier la polymérisation. Le mélange a ensuite été fondu à 140°C avant le dégazage. Le flacon était ensuite scellé sous vide puis chauffé dans un bain d'huile à 140°C pendant 3 semaines. La polymérisation était ensuite arrêtée par refroidissement et la masse de polymère était dissoute dans de l'acétone et reprécipitée par addition de méthanol. Le polymère récupéré était ensuite séché sous vide à 40°C et maintenu dans un dessiccateur jusqu'à utilisation. La Gentamicine utilisée était sous forme de sulfate de gentamicine (GS) en provenance de la société Serva. Afin d'obtenir le mélange gentamycine-PLA, une

BY-NC-ND

technique de compression des poudres des deux composants a été mise en œuvre. Nous pouvions alors obtenir un mélange nommé PLA50PGSx% contenant donc x% de gentamicine.

Rôle de la taille des particules après broyage et tamisage (Figure 1**,** Figure 2**):**

Une fois le polymère élaboré, le travail suivant consiste en la formation de particules. Mauduit avait démontré, *in vitro*, le rôle majeur de la taille de ces particules dans la cinétique de relargage de l'antibiotique. Ainsi plus les particules sont de petites tailles plus l'effet « burst » initial est important. Selon Mauduit (69) 25% de la gentamicine sont relargués dans les 6 premières heures pour les particules de grosses tailles (0,5 à 1mm) contre 60% pour les particules de petites tailles (0,125 à 0,25mm). Cette différence est liée à la libération immédiate du principe actif présent à la surface des particules. La libération est ensuite « constante et linéaire ». Après 60 jours, il reste encore 20 à 25% de principe actif dans la matrice macromoléculaire.

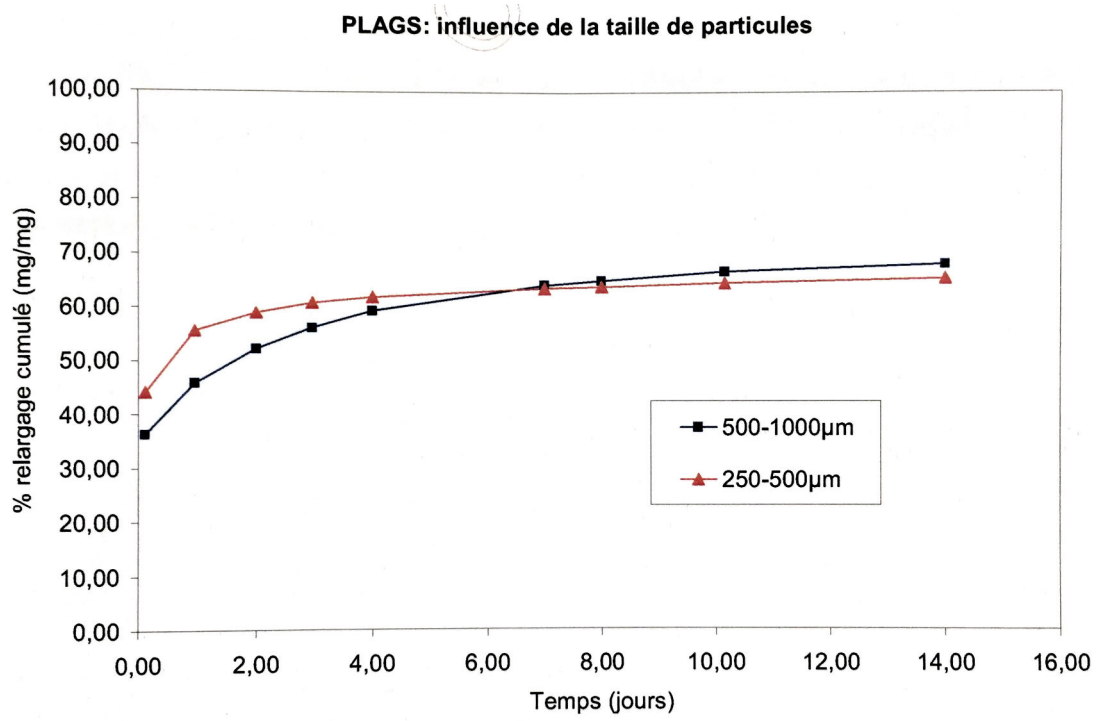


Figure 1: Influence de la taille des particules sur le taux de relargage (charge : 15% (69)

BY-NC-ND

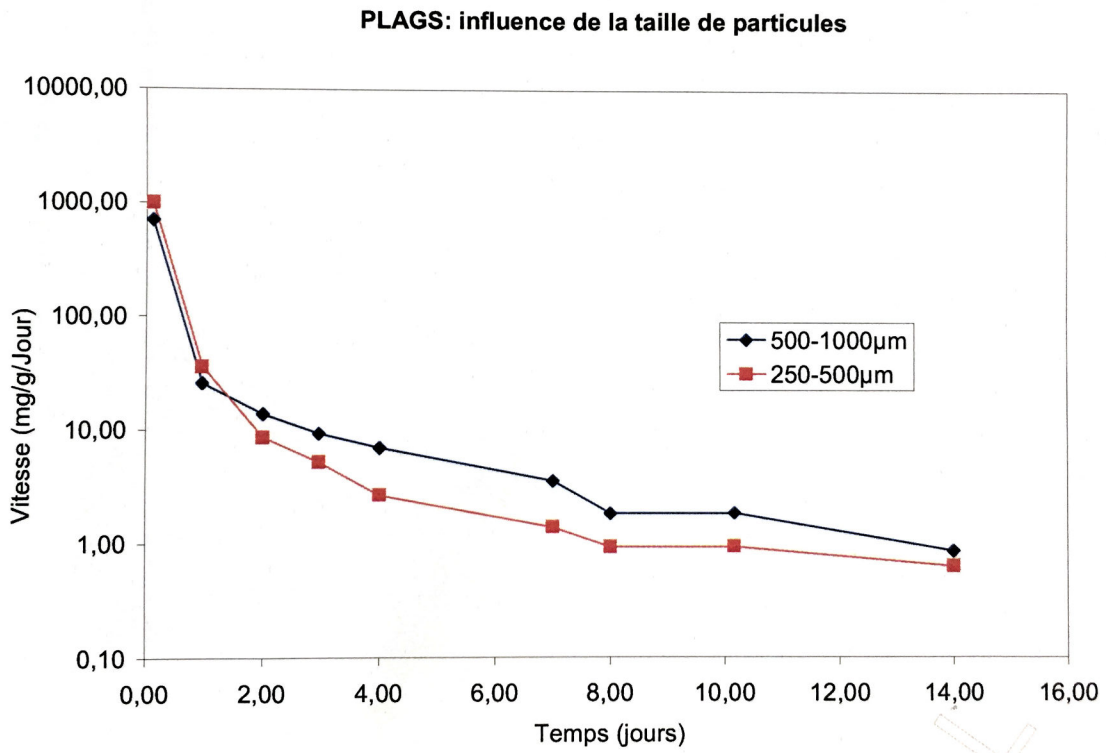


Figure 2: Influence de la taille des particules sur la vitesse de relargage (69)

Rôle de la teneur en antibiotique du polymère (taux de charge):

Par ailleurs, Mauduit (69) avait démontré le rôle important de la teneur en principe actif dans la cinétique de relargage. Pour obtenir une libération prolongée de l'antibiotique, le taux de charge doit être assez élevé pour permettre une diffusion contrôlée et continue. Cependant un taux trop important pourra s'accompagner d'un « burst » initial majeur pouvant être délétère. Ainsi, pour un polymère contenant 30% de principe actif, 75% de la gentamycine étaient libérés pendant les 6 premières heures contre 28% pour un polymère ne contenant que 10% du principe actif. Ainsi plus la teneur initial en principe actif était importante plus l'effet « burst » était majeur. Après 60 jours, il ne restait que 10% de drogue dans les particules chargées à 30% contre 30% pour celles chargées à 10%.

Un juste équilibre semble avoir été trouvé avec le $PLA_{50}PGS20\%$ (Figure 3)

BY-NC-ND

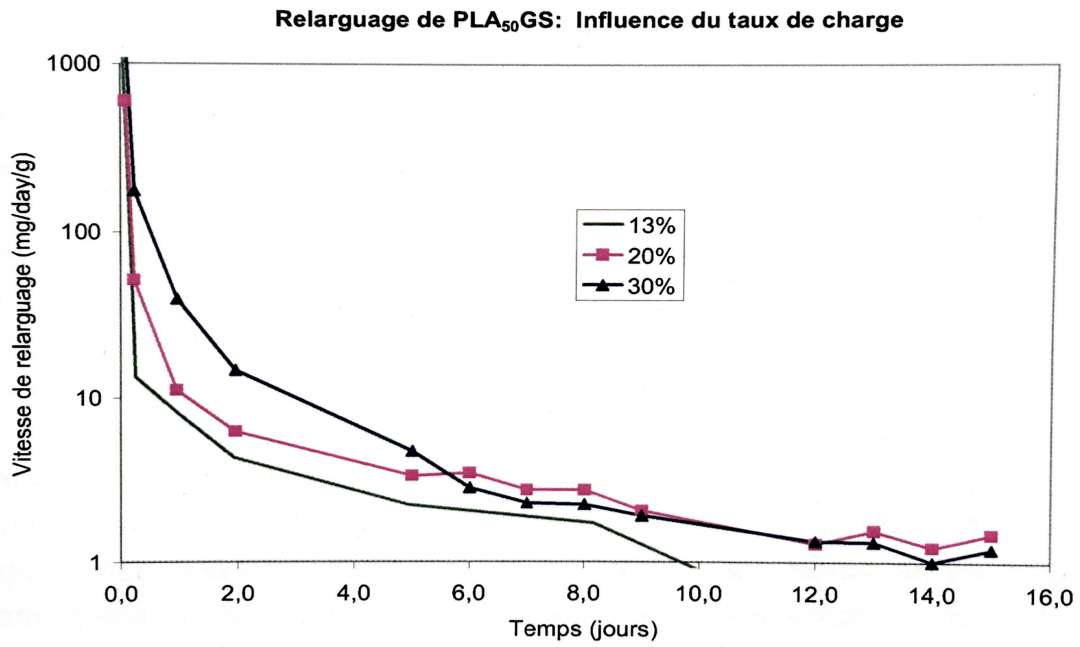


Figure 3: Rôle du taux de charge dans la cinétique de relargage du polymère

Influence de la stérilisation par γ-irradiation :

Cette irradiation provoque une diminution d'environ 45% de la masse moléculaire du polymère. Cependant, malgré une certaine scission des chaînes du polymère, le relargage de la gentamicine n'est pas modifié par rapport à celui du broyat non stérilisé.

5 Objectifs de l'étude

Ce travail avait pour but de trouver une alternative aux ciments type PMMA vecteur d'antibiotique. Ce nouveau vecteur d'antibiotique devait être biodégradable afin d'éviter les chirurgies itératives liées à l'utilisation des PMMA et devait permettre une libération prolongée de l'antibiotique en restant pendant toute la période de relargage au-dessus de la CMI du germe en cause dans l'infection ostéo-articulaire.

BY-NC-ND

L'objectif principal de notre travail était de valider l'intérêt de ce vecteur d'antibiotique dans des situations d'infections ostéo-articulaires. Nous avons ainsi dû créer deux modèles expérimentaux, l'un portant sur la mise en place d'une infection osseuse, l'autre portant sur la mise en place d'une infection articulaire. Nous avons ensuite étudié la capacité de notre vecteur d'antibiotique à traiter ces infections ostéo-articulaires en le comparant à un traitement de référence.

Les objectifs secondaires étaient multiples :

- vérifier l'absence de toxicité locale ou générale liée à l'utilisation de ce vecteur d'antibiotique
- déterminer les doses locales d'antibiotiques nécessaires à l'éradication de l'infection ostéo-articulaire
- améliorer ce vecteur d'antibiotique en fonction des observations faites expérimentalement

BY-NC-ND

Partie Expérimentale

La première partie de notre travail a eu pour objectif d'étudier les caractéristiques de relargage du polymère MedinGenta fourni par le centre de Recherche sur les Biopolymères Artificiels (CRBA- CNRS) de Montpellier.

La deuxième partie de notre travail a eu pour objectif d'évaluer les capacités de ce polymère à traiter une infection para-osseuse chez le rat. Pour ce faire, il nous a fallu dans un premier temps créer un modèle d'infection chez le rat. Une fois ce modèle animal maitrisé nous avons utilisé le polymère pour traiter cette infection.

La troisième partie de notre travail avait pour objectif d'évaluer les capacités de ce polymère à traiter une infection articulaire chez le lapin. Pour ce faire, il nous a fallu dans un premier temps créer un modèle d'infection articulaire chez le lapin. Une fois ce modèle animal maitrisé nous avons utilisé le polymère pour traiter cette infection.

1 Evaluation *in vitro* et *in vivo* du relargage de notre PLA et grinding

MedinGenta est une molécule biocompatible (polymère d'acide lactique) utilisée comme vecteur d'antibiotique, en l'occurrence de gentamicine. Elle a été mise au point par le centre de Recherche sur les Biopolymères Artificiels (CRBA-CNRS) de Montpellier. $PLA_{50}GS$ est constituée de particules chargées à 20% de gentamicine. *In vivo*, lors de chaque manipulation, une dose de 100 mg de $PLA_{50}GS$ était utilisée soit 20 mg de gentamicine.

1.1 Évaluation du relargage de MedinGenta, matériel et méthode

Afin de préciser les caractéristiques de notre polymère, nous avons étudié :

- La cinétique de relargage de la gentamicine par $PLA_{50}GS$ *in vitro.* Pour ce faire, nous avons incubé à 37°C sous agitation (150 rpm) 1,6 mg de gentamicine (soit 8 mg de $PLA_{50}GS$) dans 5 ml de PBS ou 5 ml de sérum de veau fœtal (SVF). Nous avons, ensuite, dosé la gentamicine relarguée à 1 heure puis à J1, J3, J6, J9, J12.
- Le dosage sanguin de gentamicine libérée par $PLA_{50}GS$ placé dans la patte d'un rat (20 mg). Ce dosage a été comparé au dosage sanguin de gentamicine circulante après injection de gentamicine intrapéritonéale (4 mg). Les dosages ont été faits à 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 24 h et 48 h.

BY-NC-ND

- Le dosage sanguin de gentamicine (20 mg) libérée par $PLA_{50}GS$ placé dans la patte d'un rat. Ce dosage a été comparé au dosage sanguin de gentamicine circulante après injection de gentamicine intramusculaire (4 mg) chez le rat. Les dosages ont été faits à 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 24 h et 48h.
- la cinétique de relargage de la gentamicine par $PLA_{50}GS$ *in vivo*. Nous avons introduit 100 mg de $PLA_{50}GS$ (soit 20 mg de gentamicine) en regard de la diaphyse tibiale arrière gauche d'un rat en position sous aponévrotique. Le dosage de la gentamicine libérée localement a été effectué en instillant dans la patte 200 µL de PBS récupérés 2 min après incubation à J2, 1 semaine et 5 semaines.

Le dosage sanguin de gentamicine a été fait par dosage immunologique en polarisation de fluorescence (méthode FPIA) grâce au Kit innofluo®gentamicine (Seradyn, Abott).

1.2 Évaluation du relargage de $PLA_{50}GS$, Résultats

La cinétique *in vitro* de la gentamicine relarguée par le $PLA_{50}GS$ est schématisée sur la Figure 4 montrant ainsi un pic maximum de gentamicine libérée obtenu à 12 jours et une stabilisation ensuite jusqu'à 63 jours de la quantité relarguée. La quantité cumulée de gentamicine relarguée à 3 semaines *in vitro* est de 54 % de la quantité contenue initialement dans $PLA_{50}GS$ (Figure 4).

BY-NC-ND

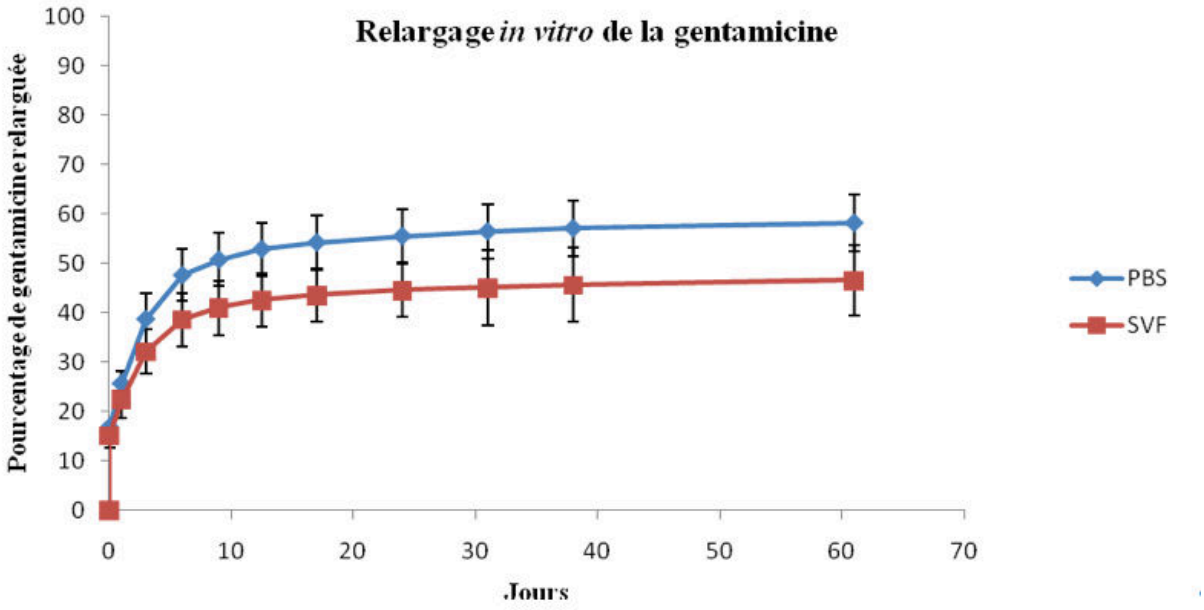


Figure 4: Relargage *in vitro* de la Gentamicine en pourcentage et en fonction du temps

La cinétique de la gentamicine relarguée par $PLA_{50}GS$ a été comparée à celle de la gentamicine injectée en intrapéritonéal (IP) (Figure 5). La gentamicine IP a une cinétique monocompartimentale (*cf.* courbe de gauche) avec une demi-vie de 26 min et un volume de distribution de 120 mL. La gentamicine issue de $PLA_{50}GS$ est relarguée selon un mode bicompartimental (*cf.* courbe de droite) avec une demi-vie de 32 min pour la première exponentielle et 24 h pour la seconde. Le volume de distribution est de 980 mL.

BY-NC-ND

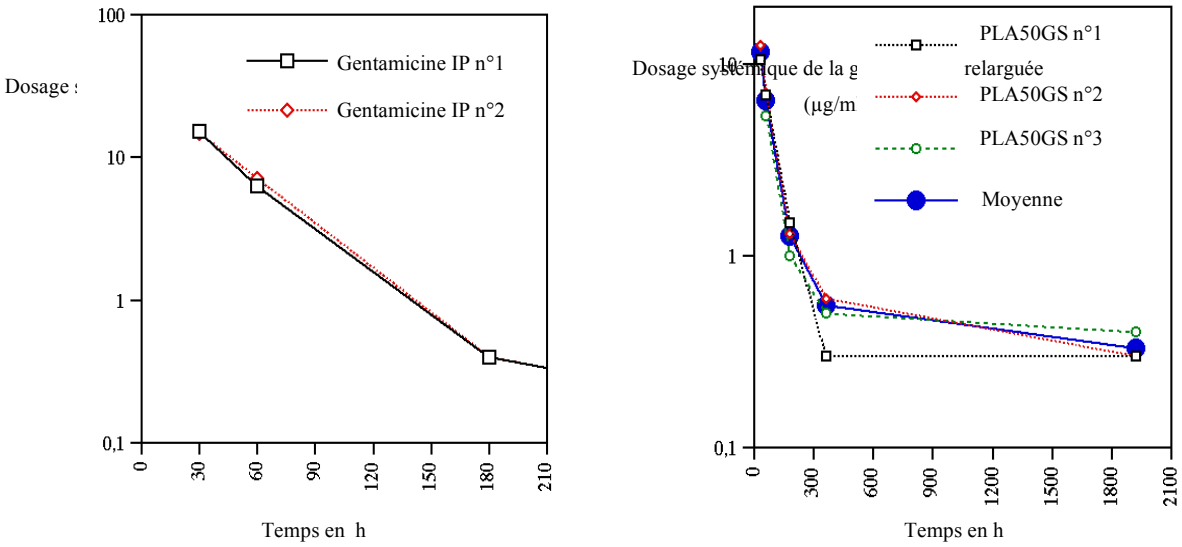


Figure 5: Dosage systémique de la Gentamicine (intrapéritonéale *vs* MedinGenta)

Lorsque l'on compare le $PLA_{50}GS$ avec une injection de Gentamicine intramusculaire, on constate l'apparition d'un pic sérique plus important obtenu avec la gentamicine intramusculaire (IM), avec une concentration presque doublée par rapport à la gentamicine relarguée par le biopolymère étudié (Figure 6).

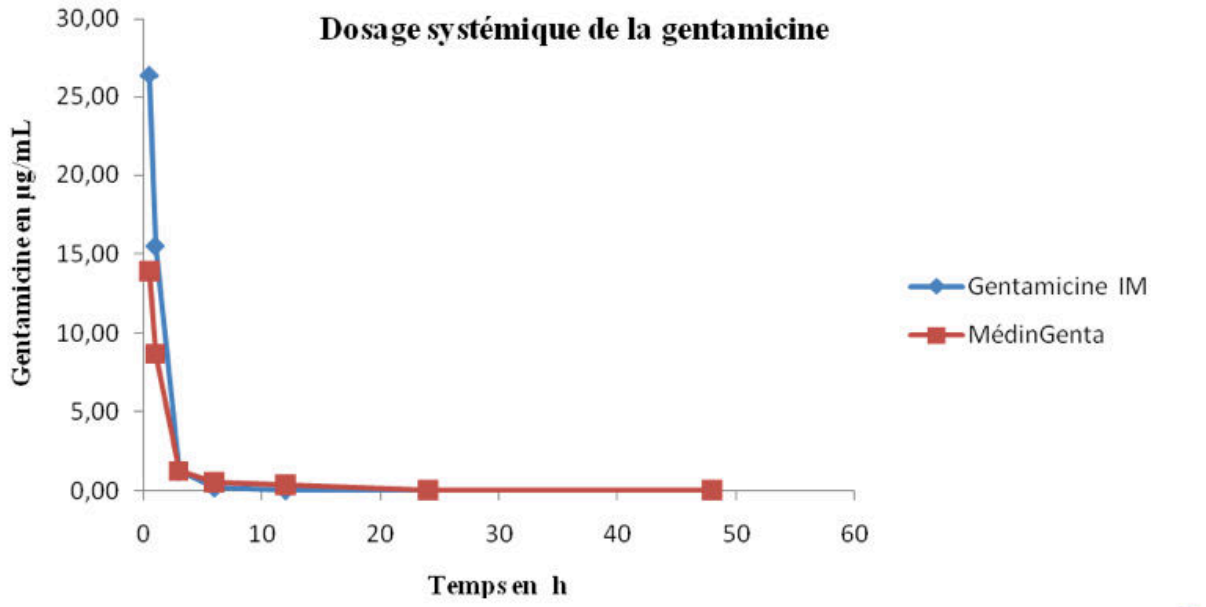


Figure 6: Comparaison des cinétiques de la gentamicine relarguée par $PLA_{50}GS$ et de la Gentamicine directement injectée en intramusculaire

BY-NC-ND

Les dosages de gentamicine locaux au niveau de la patte ont permis d'évaluer la libération *in situ* :

- 5,1 µg/mL de gentamicine à J3
- 1,9 µg/mL de gentamicine à J7
- 0 µg/mL à 5 semaines avec disparition de $PLA_{50}GS$ à l'examen macroscopique.

BY-NC-ND

2 Mise au point d'un modèle d'infection périostée chez le rat

En 1984, Rodet fut le premier à démontrer que des lésions d'ostéomyélites semblables à celle de l'homme pouvaient être induites chez le lapin par des injections intraveineuses de bactéries (71). Le modèle fut ensuite affiné par Norden *et al*. (72). Cet auteur, en associant une injection locale en regard du tibia de *Staphylocoque aureus* et d'un agent sclérosant, a obtenu 100% d'infection osseuse. Depuis, d'autres produits ont été utilisés comme inducteur favorisant le processus infectieux local tels que le thrombovar ou l'acide arachidonique (47, 73). Les modèles expérimentaux d'infection osseuse utilisent préférentiellement le rat car cet animal a l'avantage d'être peu onéreux et de résister aux effets secondaires des traitements administrés (72, 74, 75).

Ainsi, nous avons débuté notre étude expérimentale par la mise au point du modèle animalier adapté à notre objectif puis nous avons testé lors d'une étude animale l'efficacité du $PLA_{50}GS$ dans la prise en charge d'une infection périostée chez le rat.

2.1 Mise au point d'un modèle d'infection périostée chez le rat, Matériel et méthode

2.1.1 Mise au point de la souche bactérienne

Nous avons utilisé 2 souches bactériennes différentes :

- une souche de *Staphylocoque aureus* humaine (N° 9191, Bactériothèque du CHU de Limoges, Dr Christian Martin, PH) isolée à partir d'un patient souffrant d'ostéite de jambe chronique. Il s'agit d'une souche Méthicilline sensible (SAMS). La concentration minimale inhibitrice (CMI) de gentamicine déterminée par la méthode E-test sur milieu Mueller-Hinton est de 0,38 mg/L.
- une souche de *Staphylocoque aureus* animale (N°132160, Laboratoire Départemental de Médecine Vétérinaire, Dr Claude Couquet) isolée à partir d'un abcès cutané de lapin au laboratoire départemental d'analyses et de recherche. Il s'agissait d'une souche SAMS. La CMI de la gentamicine est de 0,27 mg/L.

BY-NC-ND

2.1.2 Mise au point du modèle animal, matériel et méthode

Pour cette première partie, nous avons utilisé des rats de type Sprague-Dawley (SD), de sexe masculin, âgés de 10 semaines, provenant tous du centre d'élevage Desprès, pesant environ 350 g. Cette étude a été réalisée au sein de l'animalerie de la Faculté de médecine de Limoges, dans le secteur A2L2, sous hotte aspirante. Les rats étaient anesthésiés à l'halothane à l'aide d'un appareillage dédié « petit animal » (5% pour l'induction, 2% pour l'intervention) (Tem Sega). La patte arrière était dépilée à l'aide d'une crème dépilatoire du commerce (Veet*). Puis la souche bactérienne était inoculée au moyen de 2 injections (1 face antérieure et 1 face postérieure) au 1/3 moyen de la diaphyse tibiale d'une des pattes arrière du rat. L'inoculation était faite dans les parties molles au contact de la diaphyse tibiale à la dose de 100 mL par injection. Différentes concentrations d'inoculum ont été injectées : $2x10^6$, $2x10^7$, $2x10^8$, $2x\ 10^9$, $2x10^{10}$ CFU/mL.

Différents adjuvants à la souche ont été utilisés tels que des corps étrangers métalliques, du Thrombovar (Innothera) à 3% et de l'acide arachidonique (6 mg) de foie de porc (Sigma) afin de potentialiser l'infection.

Les critères étudiés étaient :

- <u>cliniques</u> :
    - poids avant et après inoculation
    - température rectale avant et après inoculation
    - aspect macroscopique de la patte inoculée
- <u>biologiques</u> :
    - prélèvement sanguin intracardiaque
    - dosage de la numération formule sanguine NFS (leucocytose)
    - dosage de la protéine C récative (CRP) par méthode Elisa (Rat C reactiv protein Elisa Kit - BD ™)
- <u>bactériologiques</u> :
    - prélèvement local des parties molles de la patte inoculée
    - ensemencement sur gélose TS (Trypticase soja) de différentes dilutions des prélèvements broyés
    - comptage des colonies après 48 h d'incubation

BY-NC-ND

- radiologiques (Figure 7) :
    - injection intracardiaque de 18FDG ou 2-[18F] Fluoro-2-desoxy-D-glucose (500 mCi) à des rats à jeun depuis 6 heures
    - réalisation d'une imagerie de type PET Scan 1 heure après l'injection : acquisition première par scanner (biograph 6) en coupes de 0,625 mm puis reconstitutions itératives selon le mode OSEM (8 itérations / 4 subsets)
    - mesure de la SUV max (maximal standardized uptake value) correspondant à la valeur de fixation normalisée. Il s'agit de l'index le plus communément utilisé
- anatomopathologiques :
    - analyse anatomopathologique des pattes des rats infectées pour lesquelles nous avons obtenu une analyse bactériologique et radiologique. Après sacrifice du rat et amputation de la patte arrière concernée, les tissus sont fixés dans du formol 10% et des inclusions en paraffine sont réalisées
    - Coloration Gram pour la recherche de germes
    - Coloration HES (hématéine éosine safran) : les lames sont lues, en collaboration avec une anatomopathologiste, à la recherche de signes inflammatoires et /ou infectieux.

BY-NC-ND

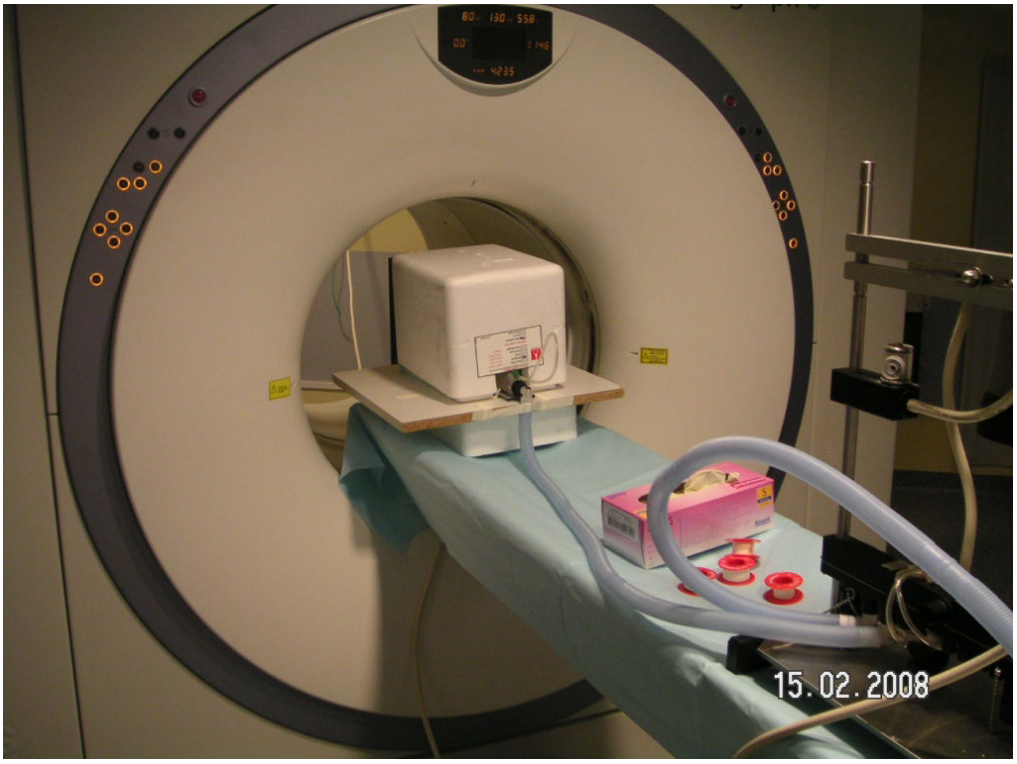


Figure 7: Réalisation de l'imagerie TEP/TDM (imagerie hybride Biograph du constructeur Siemens)

Une corrélation entre la bactériologie et l'imagerie a été établie afin de déterminer la dose optimale pour la création du modèle infectieux.

2.2 Mise au point d'un modèle d'infection périostée chez le rat, résultats

La réalisation du modèle animal a nécessité l'utilisation de 43 rats. Le travail a été mené progressivement par séries. Les résultats sont résumés dans le Tableau 5. Les trois premières séries reposaient sur l'utilisation de la souche humaine de SAMS. La première série a été un échec, d'où l'idée d'utiliser des adjuvants. Ainsi, nous avons utilisé du thrombovar (agent sclérosant), des corps étrangers métalliques et de l'acide arachidonique. Seul ce dernier a amélioré nos résultats mais étant de manipulation difficile et coûteux, nous l'avons également abandonné.

BY-NC-ND

Série	Rat N°	Souche bactérienne	Concentration CFU/mL	Adjuvant	Clinique	Bactériologie	TEP	Bilan
1	1	humaine	10^9		négative			échec
	2	humaine	10^9		négative			échec
	3	humaine	10^7		négative		négative	échec
	4				négative			échec
	5	humaine	10^7		négative			échec
	6	humaine	10^6		négative			échec
2	7	humaine	10^{10}	TV			négative	échec
	8	humaine	10^{10}		+		+	+
	9	humaine	10^{10}	TV + CE			négative	échec
	10	humaine	10^{10}	CE	+		+	+
	11	humaine	10^{10}	TV+ CE			négative	échec
	12			TV + CE			négative	échec
	13	humaine	10^{10}	TV			négative	échec
	14			TV			négative	échec
	15	humaine	10^{10}	TV + CE		+	négative	échec
	16	humaine	10^{10}	CE	+	négative	+	+
	17	humaine	10^{10}	TV			négative	échec
	18	humaine	10^{10}		+		+	échec
3	19	humaine	$2x10^9$		+	négative	+	?
	20	humaine	$2x10^9$	CE	+	négative	+	?
	21	humaine	$2x10^9$	TV	+	+	négative	?
	22	humaine	$2x10^9$	AA	+	+	+	+
	23	humaine	$2x10^9$	AA	+	+	+	+
4	24	humaine	$2x10^9$	TV		+	+	+
	25	humaine	$2x10^9$	TV				?
	26	humaine	$2x10^9$	TV				?
	27	humaine	$2x10^9$					?
	28	humaine	$2x10^9$			+	+	+
	29	animale	$2x10^9$	TV	+	+		+
	30	animale	$2x10^9$	TV	+	+	+	+
	31	animale	$2x10^9$	TV	+	+		+
	32	animale	$2x10^9$		+	+		+
	33	animale	$2x10^9$		+	+		+
5	34	animale	$2x10^{10}$		+	+	+	+
	35	animale	$2x10^{10}$		+	+	+	+
	36	animale	$2x10^9$		+	+	+	+

BY-NC-ND

	37	animale	$2x10^9$		+	+	+	+
	38	animale	$2x10^8$		+	+	+	+
	39	animale	$2x10^8$		+	+	+	+
	40	animale	$2x10^7$					échec
	41	animale	$2x10^7$					échec
	42	animale	$2x10^6$					échec
	43	animale	$2x10^6$					échec

TV : Thrombovar, AA : Acide arachidonique, CE : Corps étranger.

Tableau 5: Résultats des différentes séries d'expérimentation ayant permis la mise au point du modèle animal

Nous avons ainsi retenu des trois premières séries la nécessité de réaliser deux injections sur la patte et non une seule et le besoin d'utiliser une souche de *Staphylocoque aureus* plus virulente. Nous avons donc réalisé deux séries supplémentaires (séries 4 et 5) utilisant une souche animale de SAMS (N°132160). Nous avons ainsi obtenu systématiquement une infection à condition de maintenir une dose minimale de bactérie à $2x10^8$ CFU/mL.

D'un point de vue biologique, nous observions une augmentation des globules blancs à partir d'une injection supérieure à $2x10^7$ CFU/mL (Figure 8). Par contre, le dosage à J7 de la CRP ne semblait pas être un facteur d'orientation vers un processus infectieux local (Figure 9).

BY-NC-ND

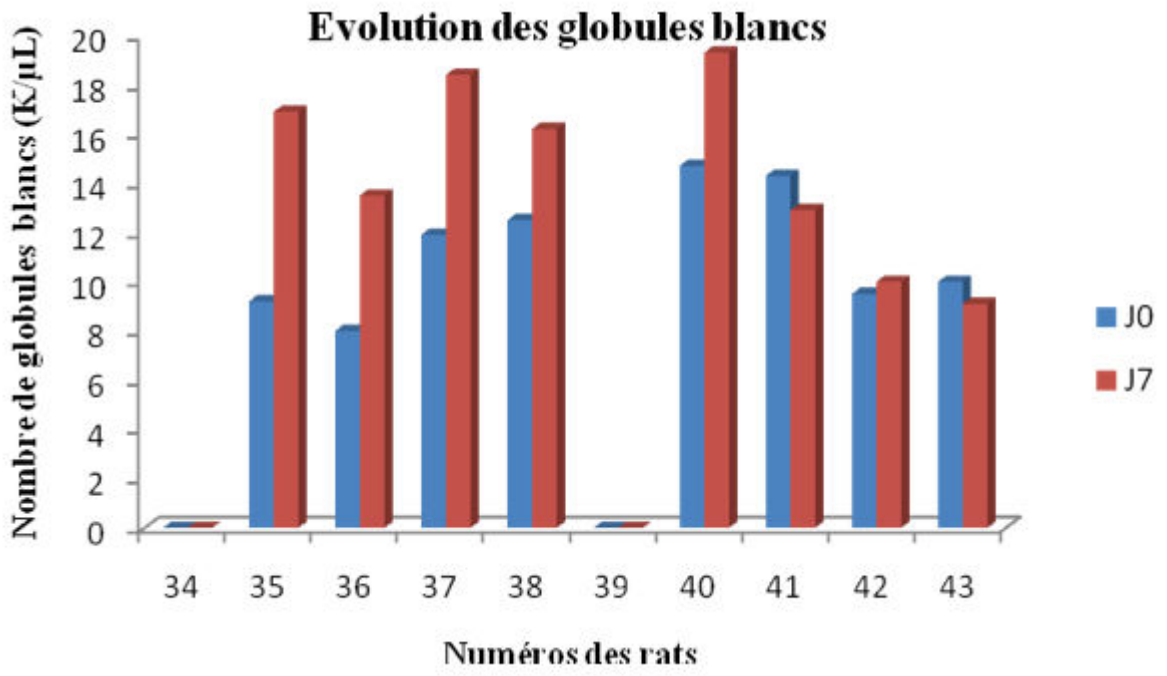


Figure 8: Évolution entre J0 et J7 du nombre de globules blancs de la série 5 (les rats 34 et 39 étaient décédés avant le 7ème jour

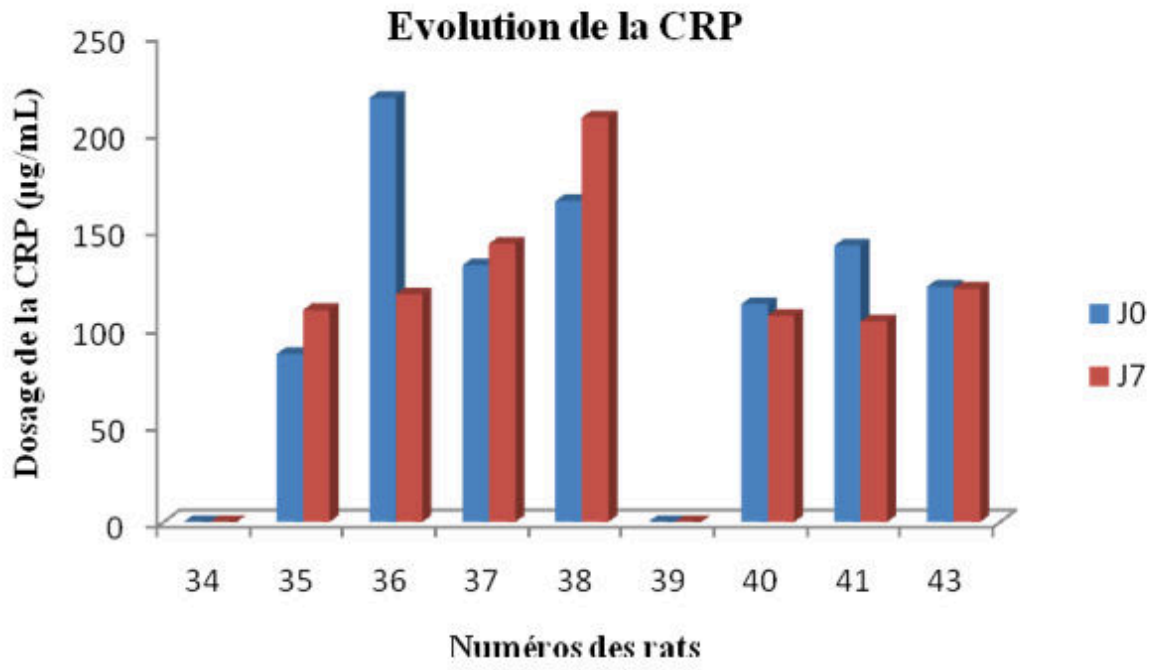


Figure 9: Évolution entre J0 et J7 de la CRP de la série 5 (Les rats 34 et 39 étaient décédés avant le 7ème jour

Le résultat du TEP était positif dans la série 5 pour des doses de bactéries injectées supérieures à $2x10^7$ CFU/mL. Cet examen montrait une zone d'hyperactivité en

BY-NC-ND

regard du site d'infection avec la présence d'une adénopathie satellite pathologique (confirmation obtenue par analyse bactériologique) (Figure 10).

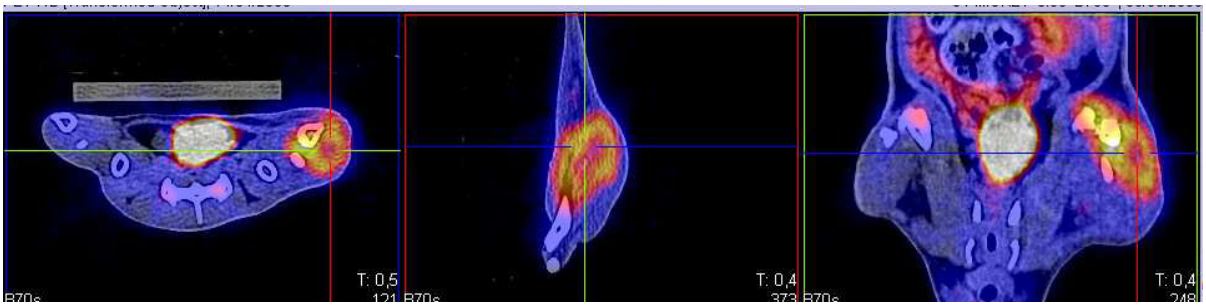


Figure 10: Image TEP du rat 37. Fixation pathologique

Lorsque l'on comparait les résultats obtenus en imagerie à ceux de la bactériologie, on retrouvait une bonne corrélation entre le rapport de la SUV max de la patte infectée sur la SUV max de la patte controlatérale (quantification de l'activité au 18 FDG) et la numération bactérienne faite à partir des cultures bactériologiques (Figure 11).

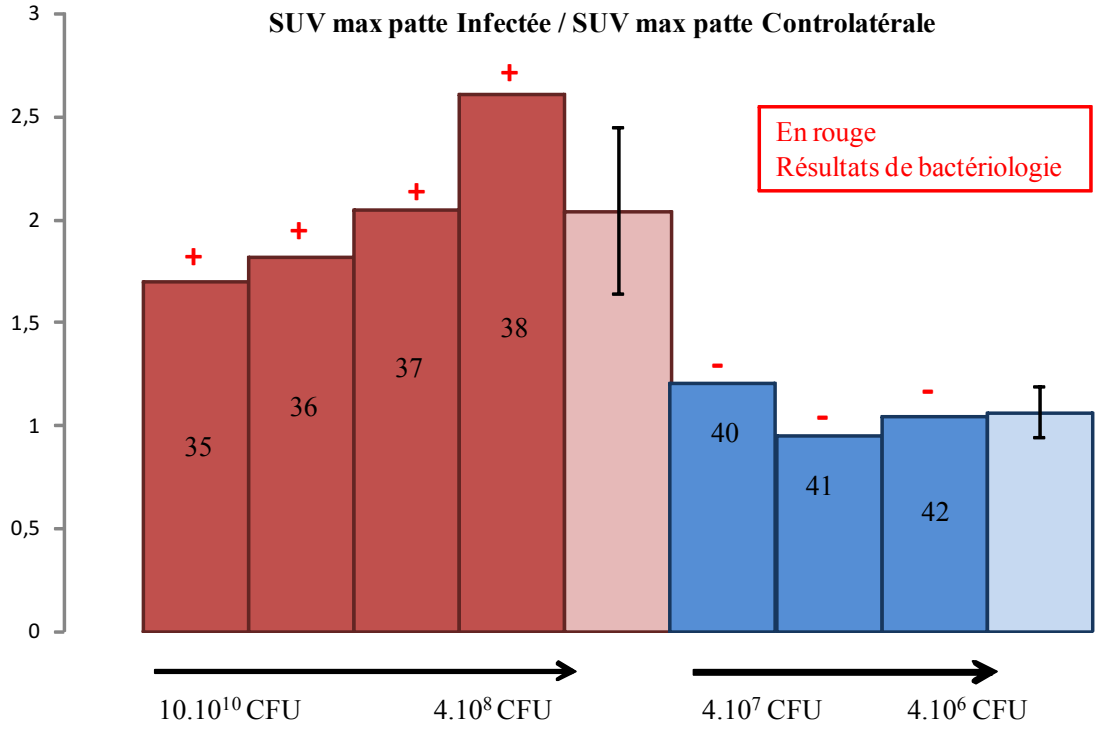


Figure 11: Corrélation entre l'analyse bactériologique et l'imagerie TEP

BY-NC-ND

Les résultats anatomopathologiques sont résumés dans le Tableau 6. Nous avons observé une corrélation satisfaisante entre les lésions tissulaires observées en anatomopathologie et les analyses bactériologiques et radiologiques.

BY-NC-ND

Rats	Bactériologie	Imagerie PET	Anatomopathologie
26	Fortement positive	Positive	Abcès, inflammation importante
27	Fortement positive	Positive	Abcès, inflammation importante
28	Faiblement positive	Positive	Pas de lésion
30	Positive	Positive	Abcès, polynucléaires
31	Faiblement positive	Négative	Fibrose
33	Faiblement positive	Négative	Faible réaction inflammatoire, fibrose

Tableau 6: Corrélation des résultats anatomopathologiques avec la bactériologie et l'imagerie

2.3 Mise au point d'un modèle d'infection périostée chez le rat, conclusion

Nous avons retenu comme modèle animalier d'infection osseuse un rat âgé de 10 à 12 semaines avec injection au 1/3 moyen de la patte arrière de deux fois 100 ml de SAMS d'origine animale (souche lapine) (Figure 12**).**

Figure 12: Abcès juxta-osseuse de la patte arrière obtenue avec la souche bactérienne d'origine animale

BY-NC-ND

3 Tentative de traitement d'une infection périostée chez le rat par $PLA_{50}GS$

L'objectif de cette partie était d'arriver à juguler une infection périostée chez l'animal par le biais de l'utilisation du $PLA_{50}GS$. Le critère de jugement principal reposait sur l'analyse bactériologique à 7 jours.

3.1 Matériel et méthode

3.1.1 Protocole de suivi des animaux pour l'étude visant à étudier le PLA dans le traitement d'une infection périostée chez le rat

Trente-huit rats SD mâles de 10 semaines ont été divisés en 6 groupes (Tableau 7).

Groupe	Nombre de rats	Infection $2x10^9$ CFU/mL	Chirurgie	Injection gentamicine intrapéritonéale 4 mg/J pdt 5J	PLA (sans gentamicine)	$PLA_{50}GS$ 20 mg
A	6	+	-	-	-	-
B	6	+	+	-	-	-
C	6	+	+	+	-	-
D	6	+	+	-	+	-
E	6	+	+	+	+	-
F	8	+	+	-	-	+

Tableau 7: Répartition des groupes de l'expérimentation. Les groupes A, B, D sont dits témoins alors que les groupes C, E, F sont dits gentamicine.

Les manipulations étaient faites sous anesthésie après épilation de la patte. Nous avons inoculé 200 mL de SAMS d'origine animale (lapin) à la concentration de $2x10^9$ CFU/mL. La chirurgie consiste à réaliser une incision, en regard de la zone injectée, des plans cutanés et aponévrotiques. Le geste était similaire quels que soient le groupe et donc la mise en place ou non de $PLA_{50}GS$.

Le protocole de suivi des rats est résumé dans le Tableau 8.

BY-NC-ND

J0	J1	J3	J6	J7
- Poids - NFS - Mesure de la patte - Température - CRP	- Poids - NFS - Mesure de la patte - Température - CRP	- Poids - NFS - Mesure de la patte - Température	Imagerie TEP Scan	- Poids - NFS - Mesure de la patte - Température - Prélèvement bactériologique

Tableau 8: Critères étudiés pour l'ensemble des groupes en fonction du temps

3.1.2 Méthode statistique

Une étude statistique a été réalisée. Les résultats des variables quantitatives sont présentés sous la forme de moyenne ± l'écart-type. Les comparaisons de distribution des variables quantitatives ont été réalisées par des tests de Student. Le seuil de significativité choisi pour l'ensemble des analyses statistiques était de 0.05. Pour cette étude, nous avons utilisé Vassar-Stats (site web de calcul statistique).

http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html

3.2 Résultats

3.2.1 Étude de l'efficacité de $PLA_{50}GS$

3.2.1.1 Résultats globaux

RATS	POIDS (g)				TEMPÉRATURE (°C)				MESURE PATTE (mm)				GLOBULES BLANCS (K/µL)			
	J0	J1	J3	J7	J0	J1	J3	J7	J0	J1	J3	J7	J0	J1	J3	J7
A1	338	322	327	356	33,5	36	35,5	35,2	12	17	16	14	11,4	7,4	14,8	12,9
A2	358	356	348	366	33,7	37,9	35,1	34,5	12	20	16	13	10,2	13,4	12,6	11,8
A3	306	296	296	314	33,9	35,7	35,5	34,7	11	19	18	13	9	9,5	13,9	14,2
A4	343	332	323	332	34,2	34,5	35,1	34,5	12	20	17	13	14,5	14	16,6	13,4
A5	338	328	329	324	34,8	36,7	34	33,9	13	23	18	15	19,6	15,4	18,7	14

BY-NC-ND

A6	312	306	281	281	34	35,3	33,9	34,1	12	16	14	12	10,3	13,2	14,1	22,9
B7	359	335	335	335	33,2	36	35,5	34,8	12	21	19	14	9,4	8	16,9	14,6
B8	316	299	300	316	33,5	35,9	35,2	35,2	12	19	16	13	13,8	15,7	17,8	13,2
B9	348	334	297	D	33,7	35,5	34,8	D	12	19	13	D	12,5	20,7	12,7	D
B10	349	317	322	351	32,7	34,7	34,6	34,6	12	19	17	13	9	5,9	13,3	11,4
B11	352	350	337	D	36,8	36,1	33,8	D	12	19	18	D	10,4	8,6	16,5	D
B12	330	322	300	329	35,6	34,4	34,9	35,5	12	21	16	13	10,1	8,6	13,6	10,7
C13	351	341	325	350	32,5	34,9	33,2	34,2	12	16	13	12,5	16	13,1	17,9	10,2
C14	338	323	312	317	34,2	34,4	34,7	34,4	12	22	14	12	9,6	12,1	15,4	11
C15	354	346	337	367	34,4	36,1	34,6	35,7	13	18	16	14	9,5	17,4	19,2	16,4
C16	352	336	340	340	33,7	34,6	35,4	34,1	12	19	15	11	10,9	14	16,5	16,2
C17	331	330	327	332	36,4	34,9	34,6	35,9	13	19	15	13	14,2	16,5	19,4	14,1
C18	302	D	D	D	34,4	D	D	D	12	21	D	D	14,7	D	D	D
D19	338	328	321	343	32,1	35,4	35,3	33,9	11	23	17	14	12,7	13	26,2	21
D20	367	354	345	355	34,3	34,8	35,3	34,7	12	21	19	16	9,6	14,9	13,5	15,5
D21	341	335	330	317	34,4	35,2	35,1	34	13	22	19	12	11	10,6	22,4	21,7
D22	362	354	352	380	34,5	34,4	34,5	34,1	12	23	16	14	10,6	14,6	13,1	12,1
D23	389	382	377	382	34,6	34,1	35	34,2	12	21	18	14	11,8	12,6	11	13,2
D24	322	313	304	315	34,1	35,5	34,4	33,4	12	22	17	13	9	7,7	11,9	14,6
E25	362	344	345	372	32,9	34,7	35,5	33,4	12	24	19	16	16,2	12,5	20,6	21,6
E26	329	317	308	323	33,2	35	34,6	34,6	12	22	17	15	11	16,4	15,6	11,5

BY-NC-ND

E27	344	334	322	328	33,7	36,2	34,7	34,4	12	21	17	16	11,7	14,4	18,6	12,1
E28	356	344	D	D	35,3	34,7	D	D	13	20	0	D	15,4	18,9	D	D
E29	343	330	335	360	35,3	35	34,7	34,1	13	20	15	13	15	14,7	17	17,2
E30	347	334	326	350	35,1	36,3	34,5	34,2	12	19	17	15	12	12,4	14,3	11,4
F31	330	321	327	346	33,1	36	34,8	33,4	12	22	15	14	11	10	14,1	12,8
F32	330	322	310	316	33,1	35,6	35,2	34,8	12	16	17	15	13,1	13,2	18,5	10,7
F33	337	329	334	348	33,8	34	35,3	34,6	12	19	13	13	9,2	12,1	13,7	11,4
F34	339	308	323	351	33,4	34,8	34,3	34,9	12	15	15	13	10,7	12,8	14,9	13
F35	346	331	335	343	33,6	35,3	35	35,7	13	17	14	15	13	21,1	12,6	11,9
F36	314	302	304	314	35,9	35,1	34,8	33,7	12	18	13	13	14,7	13,8	11	8,2
F37	326	323	321	327	34,8	35,3	35,6	34,7	12	20	14	15	8,8	12,4	12,5	12,2
F38	358	350	D	D	36	36,3	D	D	12	22	17	14	11,9	15,5	D	D

Tableau 9: Résultats de l'étude de l'efficacité de $PLA_{50}GS$ dans le traitement d'une infection périostéee chez le rat (D= décès).

3.2.1.2 Résultats de l'étude du poids, de la mesure de la patte et de la numération des globules blancs

Nous avons observé une diminution du poids durant les premiers jours suivie d'une augmentation dans tous les groupes (Figure 13). Il n'existait pas de différence significative entre les 6 groupes en ce qui concerne le poids, le nombre de globules blancs et la température.

BY-NC-ND

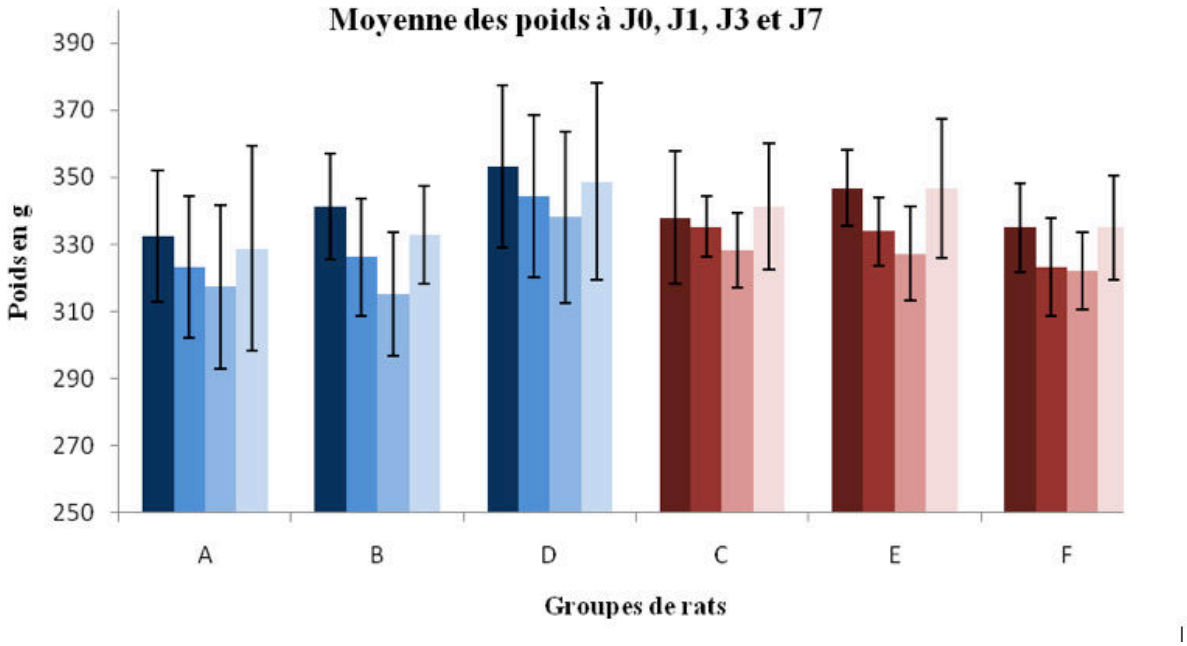


Figure 13: Résultat moyen du poids des groupes témoins (A, B, D) et Gentamicine (C, E, F)

Nous avons observé une augmentation du diamètre de la patte dans tous les groupes à J1 (+ 8,2 mm pour A, B, D contre + 7,1 mm pour C, E, F) puis une diminution. Il restait une différence statistiquement significative en ce qui concerne le diamètre de la patte entre J0 et J7 en ce qui concerne tous les groupes (p = 0,0110) (Figure 14).

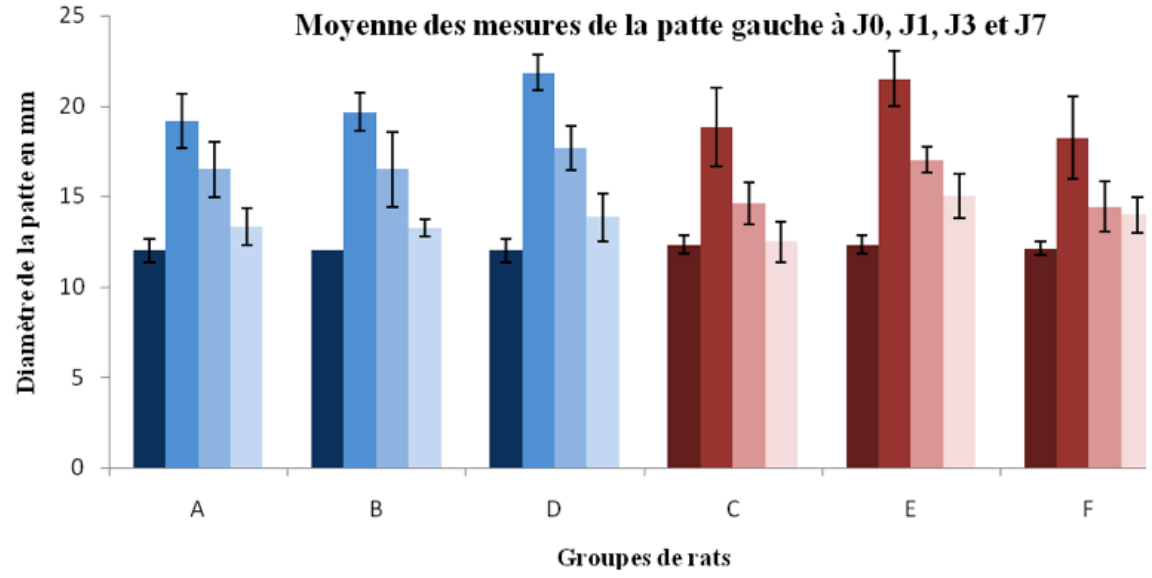


Figure 14: Résultats moyens de la mesure du diamètre de pattes des différents groupes

BY-NC-ND

Le nombre de globules blancs augmentait dans tous les groupes avec une moyenne inférieure dans les groupes gentamicine (C, E, F) (Figure 15).

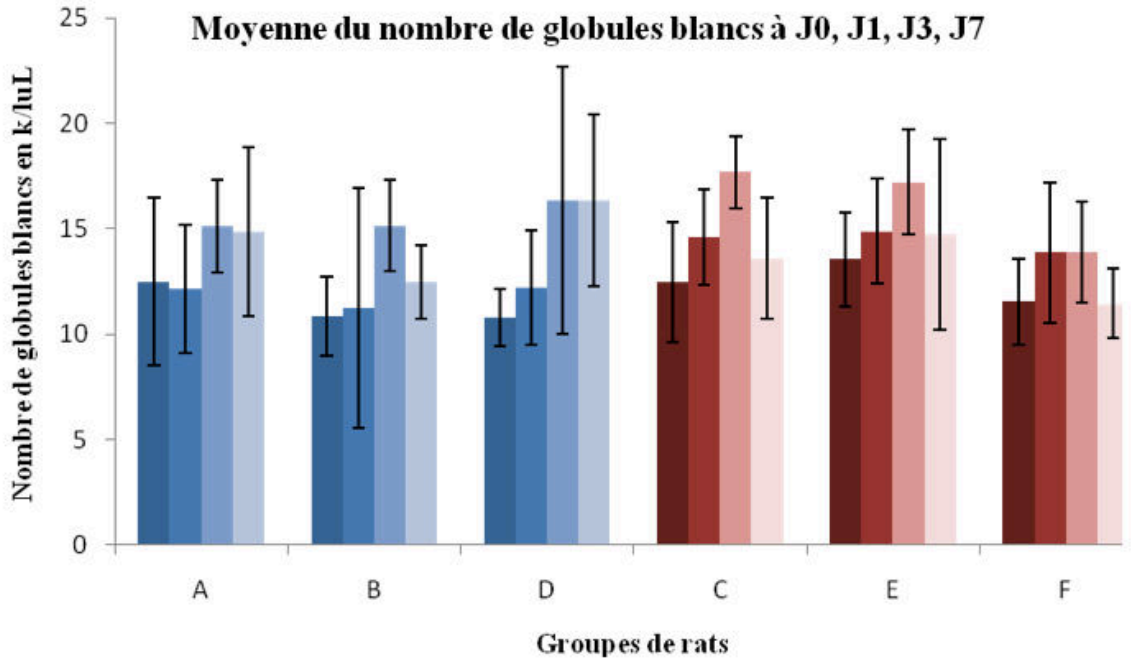


Figure 15: Résultats moyens du nombre de leucocytes des différents groupes

Il n'existait pas de différence significative entre les différents groupes en ce qui concerne le poids, le nombre de globules blancs et la température.

BY-NC-ND

3.2.1.3 Résultats de la CRP

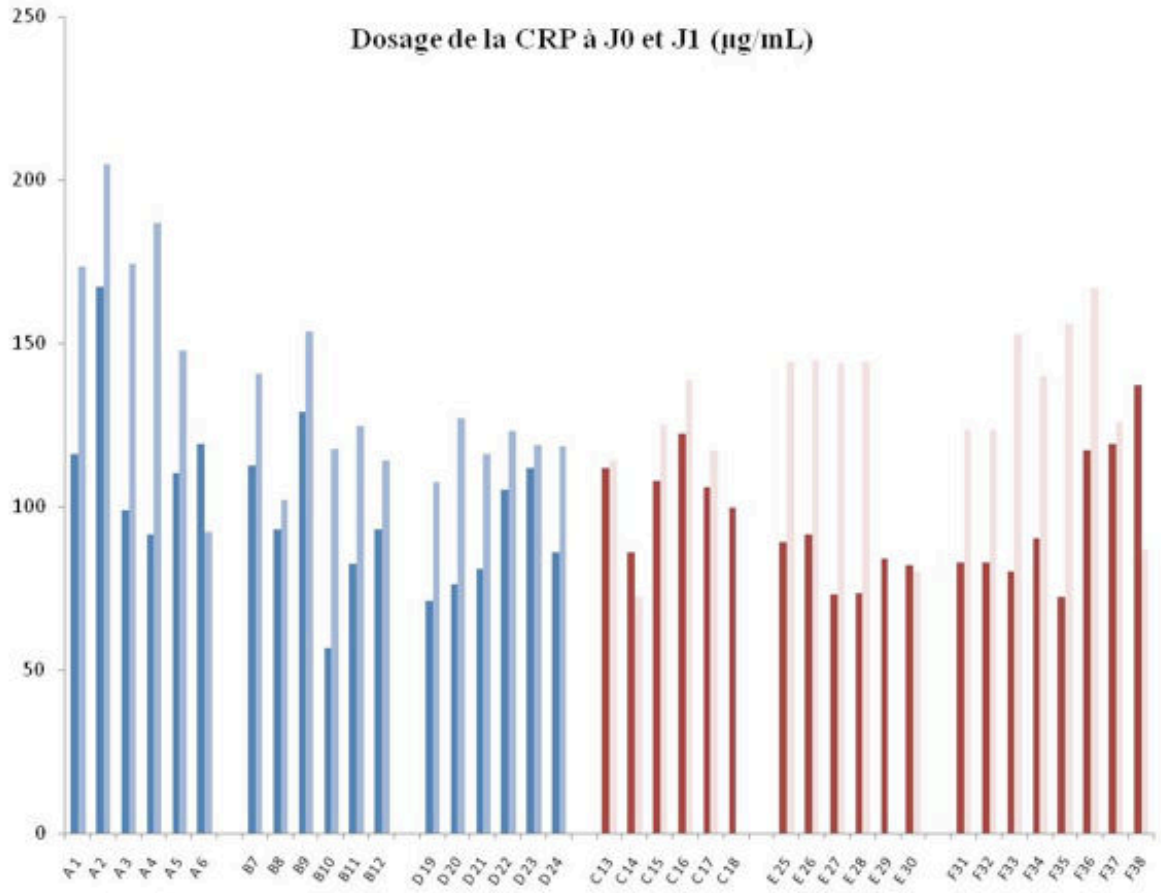


Figure 16: Résultats à J0 et J1 de la CRP des différents rats

La CRP augmentait dans tous les groupes à J1 mais il n'y avait pas de différence significative entre les groupes témoins et les groupes gentamicine (p = 0,874).

3.2.1.4 Résultats de la bactériologie

BY-NC-ND

GROUPES		Moyenne CFU/mL pour 100 mg de tissu
A	Infection	328
B	Infection+ Chirurgie	73242
D	Infection+ Chirurgie+ MédinPoudre	33422
C	Infection + Gentamicine IP	4008
E	Infection+ Chirurgie+ Gentamicine IP	393
F	Infection+ Chirurgie+ PLA50GS	2

Tableau 10: Nombre de bactéries pour 100 mg de tissu dans chaque groupe

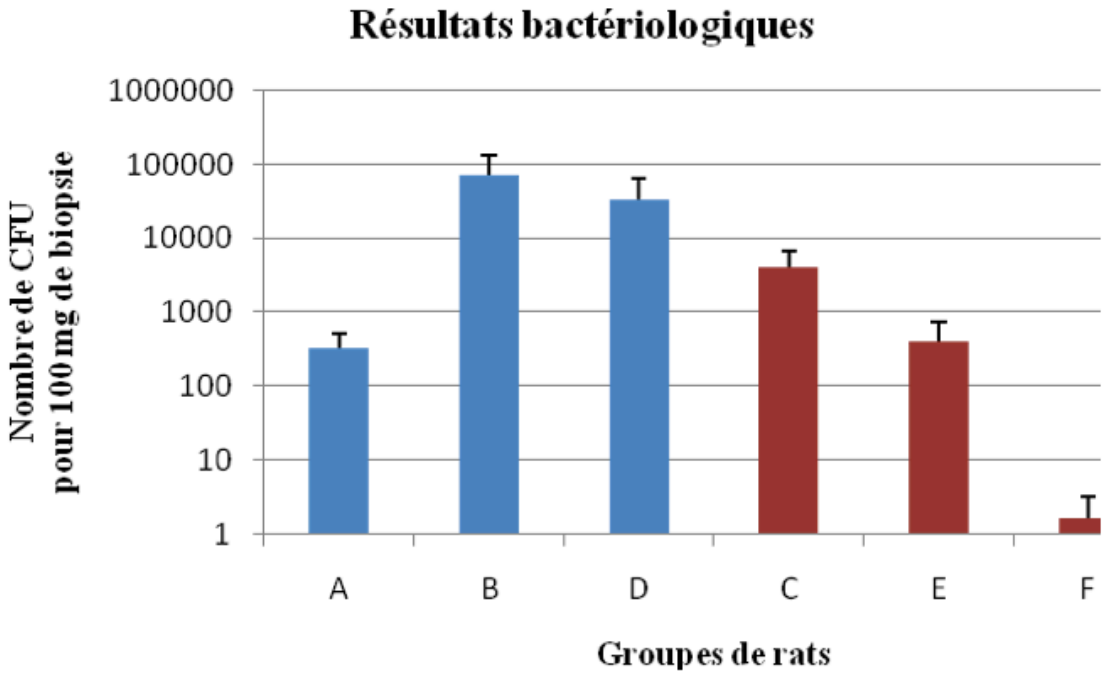


Figure 17: Moyenne du nombre de bactéries pour 100 mg de tissu pour chaque groupe

BY-NC-ND

GROUPES		A	B	D	C	E	F
A	Infection		0,045	0,229	0,201	>0,999	0,052
B	Infection + Chirurgie			0,298	0,144	0,0176	0,0019
D	Infection + Chirurgie + MédinPoudre				0,855	0,100	0,0019
C	Infection + Gentamicine IP					0,210	0,023
E	Infection + Chirurgie + Gentamicine IP						0,023
F	Infection + Chirurgie + PLA50GS						

Tableau 11: Comparaison statistique des différents groupes entre eux (test de Mann Withney)

3.2.1.5 Résultats de l'imagerie

Onze rats ont bénéficié d'une imagerie : B7, B8, C13, C14, C17, F31, F32, F33, F35, F36, F37. Les résultats sont colligés dans le tableau ci-dessous (Tableau 12).

Rats	Interprétation de l'imagerie	Bactériologie
B7	Fixation pathologique, atteinte articulaire, adénopathie homolatérale	Positive
B8	Fixation pathologique, adénopathie homolatérale	Positive
C13	Œdème de la patte, adénopathie homolatérale	Négative
C14	Fixation pathologique, adénopathie homolatérale	Positive
C17	Léger oedème de la patte	Positive
F31	Fixation pathologique, adénopathie homolatérale	Négative
F32	Fixation pathologique, adénopathie	Négative

BY-NC-ND

	homolatérale	
F33	Asymétrie de fixation, adénopathie homolatérale	Négative
F35	Œdème de la patte, adénopathie homolatérale	Négative
F36	Fixation pathologique, adénopathie homolatérale	Négative
F37	Œdème de la patte, adénopathie homolatérale	Négative

Tableau 12: Résultats de l'imagerie et comparaison avec les résultats bactériologiques

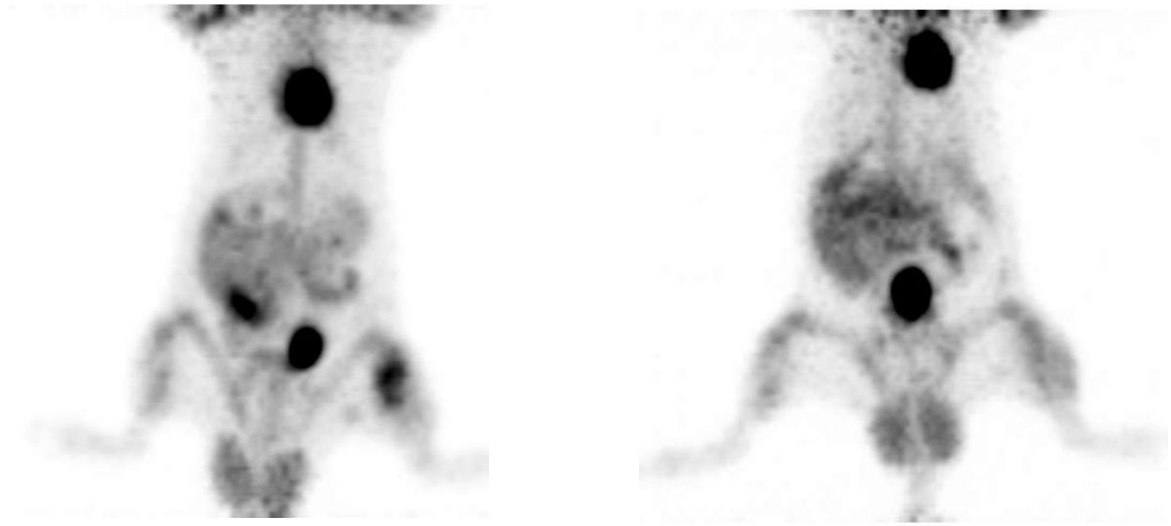


Figure 18: Exemples de résultats TEP/TDM avec une fixation pathologique pour le rat B7 (gauche) et l'absence de fixation pour le rat F35 (droit)

Bien que la bactériologie soit négative pour l'ensemble des rats traités par $PLA_{50}GS$ (groupe F), l'imagerie mettait en évidence des fixations asymétriques, probablement liées à la persistance d'une inflammation aseptique locale.

3.3 Discussion

Nous n'avons pas trouvé dans la littérature de modèle animal d'infection périostée contrairement aux modèles d'ostéomyélites qui sont fréquemment retrouvés dans la littérature (72, 74). Il nous a ainsi fallu mettre au point ce modèle.

BY-NC-ND

La gentamicine a été choisie comme antibiotique pour des raisons scientifiques. En effet, il s'agit de l'antibiotique le plus couramment utilisé dans la littérature à cause de son caractère stable, peu cytotoxique et de sa très bonne action sur les principaux germes retrouvés en cas d'infection ostéo-articulaire.

Nous avons initialement utilisé un *Staphylocoque aureus* d'origine humaine en débutant par les doses retrouvées dans la littérature pour créer une infection ostéoarticulaire (environ 10^6 CFU/mL). Cependant, devant l'absence de développement d'une infection, nous avons tenté d'associer des adjuvants tels que le thrombovar (73), l'acide arachidonique (76) sans amélioration de nos résultats. Nous avons donc changé de souche de *Staphylocoque aureus* pour une souche animale avec des doses plus élevées (10^8 à 10^{10} CFU/mL) ce qui nous a permis d'obtenir une infection reproductible.

Pour valider le modèle d'infection periostée et comme décrit dans la littérature, nous avons utilisé comme critère de jugement principal l'analyse bactériologique (75, 77). Parmi les autres critères dits de surveillance de l'infection ostéo-articulaire, la température rectale, le poids de l'animal et la numération des globules blancs nous sont apparus, comme décrit dans la littérature, non reproductibles et donc non exploitables (75).

Concernant les examens d'imagerie, l'affirmation d'un processus infectieux ostéo-articulaire est loin d'être toujours évident. Ainsi, différents auteurs ont-ils évalué l'utilisation du TEP au 18 FDG avec pour but de dépister précocement l'infection tout en faisant la différence entre une complication infectieuse réelle et une inflammation aseptique ou un remaniement inflammatoire post-chirurgical (78, 79). La SUV (Standardized Uptake Value) moyenne a été utilisée pour essayer de potentialiser les résultats de cet examen. Dans notre étude, les résultats du TEP sont d'interprétation très difficile. En effet, autant il existe une vraie corrélation bactériologie–imagerie pour les résultats du modèle animalier, autant lors de l'étude expérimentale menée sur l'animal, cette corrélation disparaît avec des résultats disparates selon les rats. Notre étude est donc comparable aux résultats obtenus dans la littérature démontrant que le TEP au 18 FDG ne permet pas d'affirmer la présence d'un processus infectieux ostéo-articulaire(19, 79).

BY-NC-ND

Le $PLA_{50}GS$ a répondu aux objectifs initiaux de notre travail. Nous avons ainsi pu mettre en évidence, *in vitro* et *in vivo*, un relargage de la gentamicine à des doses supérieures à la CMI du germe et ce pendant plus de trois semaines. Ce relargage à des doses bactéricides est confirmé par les résultats retrouvés lors de notre étude bactériologique comparative chez le rat. Dans le groupe $PLA_{50}GS$, les résultats bactériologiques se révèlent meilleurs que dans les autres groupes y compris dans le groupe dit de traitement de référence (antibiothérapie par voie générale). Nous avons observé grâce à notre étude *in vitro* que le $PLA_{50}GS$ libère la gentamicine avec un effet burst initial (pic élevé précoce) très limité (environ 15%) et libère ensuite l'antibiotique sur une période prolongée (63 jours). Cette cinétique de relargage de l'antibiotique correspond à ce qui avait été initialement décrit par les travaux préliminaires de Mauduit en 1991 portant sur l'élaboration de ce polymère (69). *In vivo,* cette libération est effectuée en 5 semaines environ.

3.4 Conclusion

Ce travail nous a permis de mettre au point un modèle animalier de rats infectés par *Staphylocoque aureus* afin d'étudier l'efficacité anti-infectieuse du $PLA_{50}GS$. Concernant la gentamicine, le $PLA_{50}GS$ permet un relargage progressif et continu de celle-ci à des doses bactéricides sur le *Staphylocoque aureus in vitro.* L'étude *in vivo* d'efficacité du $PLA_{50}GS$ sur 6 groupes de rats infectés par SAMS a montré sa supériorité par rapport à une administration parentérale d'une dose équivalente de Gentamicine. L'utilisation du TEP dans le dépistage de phénomènes infectieux ne semble pas apporter d'information suffisante pour le diagnostic et le suivi d'une infection ostéo-articulaire.

BY-NC-ND

4 Mise au point d'un modèle d'infection articulaire chez le lapin

La revue de la littérature montre 18 études principales portant sur le développement d'un modèle animal d'arthrite septique. Nous avons retrouvé 2 études portant sur une arthrite septique chez le rat (80, 81), 3 études chez la souris (82-84) et 13 études chez le lapin (48, 85-96).

La plupart des études récentes portant sur la mise en place d'un modèle animal d'arthrite septique utilisent le lapin qui présente comme avantage d'avoir une articulation de taille suffisante permettant un abord chirurgical aisé. Son volume articulaire est évalué à 5 cc (97).

Il est à noter que ces modèles animaux d'arthrite septique sont inhomogènes en ce qui concerne la quantité de bactéries injectées. Cette quantité va de 10^2 CFU (98) à 10^8 CFU (95) soit 6 unités de $\log_{10}$, ce qui montre la grande disparité des doses injectées.

4.1 Mise au point de la souche bactérienne

Afin de réaliser une infection articulaire, nous avons utilisé une souche bactérienne de Staphylococcus aureus léporidée (Figure 19). Cette souche a été isolée à partir d'un abcès cutané de lapin au laboratoire départemental d'analyses et de recherche. Il s'agissait d'une souche sensible à la méthicilline (SAMS).

Figure 19: souche 132160

Nous avons, dans un premier temps, repiqué cette souche au laboratoire de bactériologie du CHU de Limoges (Docteur C. Martin) sur une gélose Columbia additionnée à 5% de sang de mouton (Oxoïd, Thermo Fisher Scientific) (Figure 20). Le lendemain de ce repiquage, nous avons inoculé 50 ml de bouillon TS (Trypticase Soja,

BY-NC-ND

BioMérieux) (Figure 21). L'incubation a été réalisée pendant 24H à 37°C afin d'obtenir une solution en phase stationnaire de croissance. Cette solution a ensuite été inoculée dans 500 ml de bouillon TS. L'incubation était réalisée à 37°C pendant 6 h sous agitation (100 RPM) afin d'obtenir une solution en phase exponentielle de croissance.

Figure 20: repiquage de la souche

Figure 21: inoculation de la souche dans le bouillon T

Cette solution a été centrifugée 10 mn. à 10 000 RPM à 4°C puis lavée en tampon PBS (Phosphate Buffer Saline, BioMérieux). Cette étape a été réitérée une deuxième fois dans les mêmes conditions.

Une fraction de cette solution a été congelée en PBS à -80° C afin de réaliser une suspension stock estimée à plus de 10^{10} UFC/ml. Une seconde fraction a été congelée dans les mêmes conditions mais avec une estimation à 10^{9} UFC/ml. Nous avons ensuite réalisé un ajustement d'une fraction à environ 2.10^{8} UFC/ml en PBS par turbidimétrie (Figure 22), cette solution a été ensuite congelée à -80°C. Cette dernière fraction était également diluée au 1/10 et au 1/100 afin d'obtenir une solution à environ 10^{7} UFC/ml et à 10^{6} UFC/ml. Ces deux fractions ont été également congelées à –80°C (Figure 23).

BY-NC-ND

Figure 22: estimation de la charge bactérienne par turbimétrie

Figure 23: congélation des suspensions stocks

Détermination de l'inoculum des suspensions bactériennes de Staphylococcus aureus léporidées injectées :

Nous avons donc réalisé une dilution en série (10^{-1} à 10^{-6}) en tampon PBS (1 ml de suspension dans 9 ml de PBS) des suspensions 2.10^8 et 10^7 UFC/ml de Staphylococcus aureus léporidée (N°132160). 100 µL de ces dilutions à 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} ont été ensuite ensemencés sur gélose TS par la technique du « râteau ».

Nous avons ensuite réalisé un comptage des colonies (comptage sur 1 série de boîtes réalisées à partir d'une gamme de dilutions - Tableau 13).

	Suspension 2.10^8 UFC/ml		**Suspension 10^7 UFC/ml**	
Dilution	**N° UFC/100µL**	**N° UFC/ml**	**N° UFC/100µL**	**N° UFC/ml**
10^{-3}	Inc.		Inc.	
10^{-4}	Inc.		167	1670
10^{-5}	291	2910	17	170
10^{-6}	33	330		

Inc. : incomptable

BY-NC-ND

Tableau 13: Détermination de l'inoculum des suspensions bactériennes de *Staphylococcus aureus* léporidée injectées

La suspension à 2.10^8 UFC/ml était précisément à 3.10^8 UFC/ml avant congélation.

La suspension à 10^7 UFC/ml était précisément à 2.10^7 UFC/ml avant congélation.

Mesure de l'impact de la décongélation sur l'inoculum :

Pour ce faire, nous avons décongelé des suspensions 2.10^8, 10^7 et à 10^6 UFC/ml afin de mesurer l'impact de la congélation. Des dilutions en série (10^{-1} à 10^{-6}) en tampon PBS (1mL de suspension dans 9 ml de PBS) des 3 suspensions (2.10^8, 10^7 et à 10^6 UFC/ml) étaient réalisées, 100 µL des dilutions 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} ont été ensemencés sur gélose TS par la technique du « râteau ». Afin d'optimiser notre travail, nous avons réalisé 2 gammes de dilution indépendantes pour chaque groupe puis compté les colonies (moyenne des comptages sur 2 séries de boîtes réalisés à partir de 2 gammes de dilution indépendantes) (Figure 24, Figure 25).

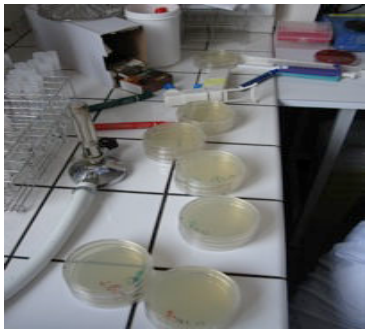


Figure 24: Comptage des colonies

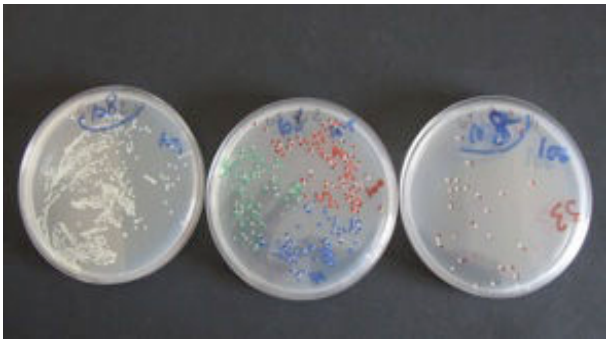


Figure 25: Exemple de comptage des bactéries

BY-NC-ND

	Suspension 2.10^8 UFC/ml		Suspension 10^7 UFC/ml		Suspension 10^6 UFC/ml	
Dilution	**N° UFC/100µL**	**N° UFC/ml**	**N° UFC/100µL**	**N° UFC/ml**	**N° UFC/100µL**	**N° UFC/ml**
10^{-2}					66 (73-59)	660
10^{-3}			105 (117-94)	1050	10 (6-13)	100
10^{-4}	53 (52-54)	530	13 (18-7)	130	2 (1-3)	20
10^{-5}	12 (13-10)	120	1-(0-1)	10		
10^{-6}	1 (1-1)	10				

Tableau 14: Mesure de l'impact de la décongélation sur l'inoculum

La suspension à 2.10^8 UFC/ml **après décongélation** était précisément à 10^7 UFC/ml.

La suspension à 10^7 UFC/ml **après décongélation** était précisément à 10^6 UFC/ml.

La suspension à 10^6 UFC/ml **après décongélation** était précisément à 2.10^5 UFC/ml.

4.2 Mise au point du polymère sous forme injectable

Les polymères d'acide lactique nous ont été fournis par le Centre de Recherche sur les Biopolymères Artificiels de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron de Montpellier (UMR CNRS 5247, Faculté de Pharmacie, Dr Michel Vert, Dr Xiaoling Leclercq).

Nous disposions de 14,5 g de polymère d'acide lactique isolé et de 6 g de polymère d'acide lactique contenant de la gentamicine sous la forme de particules de 500 à 1000 µm. Nous avons reçu ces polymères sous une forme très inhomogène les rendant inutilisables tels quels. L'objectif de notre travail était de pouvoir utiliser ces molécules sous forme injectable. Nous avons d'abord dû homogénéiser les polymères sous la forme de particules d'une taille égale à 500 µm afin d'obtenir des particules injectables tout en évitant un effet « burst » initial trop important lié à des particules de petite taille. Une étude préliminaire nous avait démontré que 1 gramme de polymère d'acide lactique dans 5 cc de sérum physiologique ne pouvait être injecté par un cathéter de 14 Gauge que si les molécules étaient d'une taille inférieure ou égale à 500 µm (Figure 26).

(cc) BY-NC-ND

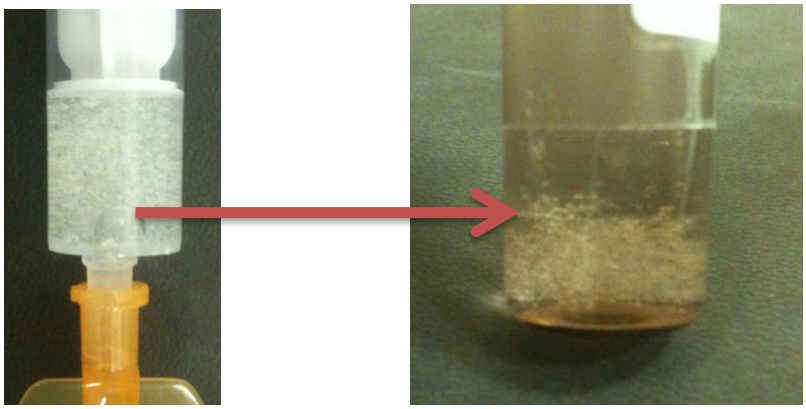


Figure 26: expérience préliminaire d'injection du PLA

Afin d'obtenir des particules de polymère d'acide lactique de taille homogène, nous avons utilisé un broyeur à boule (Figure 27). En effet, cette technique est la seule permettant de concasser ces particules très résistantes (Faculté de Pharmacie Limoges, Service du Pr Chulia).

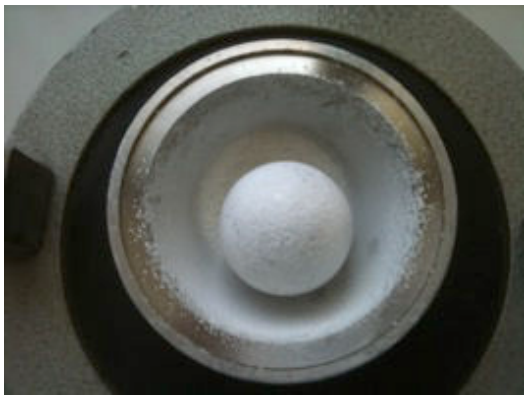


Figure 27: broyeur à boule

Après avoir passé les molécules dans le broyeur, nous avons réalisé un filtrage des molécules par un tamis de 500 µm (Figure 28). Ces deux étapes ont été réalisées jusqu'à obtenir des particules de taille inférieure ou égale à 500 µm.

BY-NC-ND

Figure 28: tamisage des polymères

4.3 Mise au point du modèle animal, matériel et méthode

Il s'agissait de lapins blancs de type New-Zeland, de sexe féminin, âgés de 3-4 mois, provenant tous du centre d'élevage Neuville, pesant environ 4 kg. Le travail a été réalisé au laboratoire vétérinaire départemental dirigé par le Docteur Claude Couquet. Chaque lapin utilisé dans cette étude était isolé dans une cage. Les lapins avaient un accès libre à leur alimentation et à l'eau, dans des conditions de température régulée. Lors des actes invasifs, les lapins étaient anesthésiés par l'injection de 2 ml d'Imalgéne en intramusculaire (soit 20 mg/kg de Kétamine). La patte arrière droite était rasée (Figure 30). Puis la souche bactérienne était inoculée par une injection intra-articulaire dans le genou droit (injection en regard de l'interligne fémoro-tibiale latérale). La dose injectée était de 1 ml de SAMS.

Tous les lapins ont bénéficié d'une analgésie post-opératoire avec une injection de 0.1 ml de Buprécare matin et soir (Buprénorphine 0.3 mg/ml).

4.4 Mise au point du modèle animal, Résultats

L'objectif de cette étape était d'arriver à obtenir une arthrite septique chez le lapin tout en arrivant à garder en vie l'animal plus de 15 jours, condition nécessaire et suffisante pour pouvoir réaliser la suite de notre travail.

(cc) BY-NC-ND

Pour mettre en place ce modèle animal, nous avons utilisé 14 lapins femelles de 3,8 kg en moyenne (3-4,5 kg). Le Tableau 15 résume les résultats obtenus pour la mise en place de ce modèle d'arthrite septique.

LAPIN N°	Couleur	Sexe	Poids	Souche bactérienne	Concentration CFU/ml (1ml)	Arthrite	Survie à J 15
1	Blanc	Femelle	4 kg 500	Animale	10^8	+	Échec
2	Blanc	Femelle	4 kg	Animale	10^8	+	Échec
3	Blanc	Femelle	4kg 200	Animale	10^7	+	Échec
4	Blanc	Femelle	4 kg	Animale	10^7	+	Échec
5	Blanc	Femelle	3 kg 500	Animale	10^6	+	Échec
6	Blanc	Femelle	4 kg 200	Animale	10^6	+	Échec
7	Blanc	Femelle	3 kg	Animale	10^5	+	Échec
8	Blanc	Femelle	3 kg 200	Animale	10^5	+	Échec
9	Blanc	Femelle	3 kg 700	Animale	10^4	+	Échec
10	Blanc	Femelle	4 kg	Animale	10^4	+	Survie
11	Blanc	Femelle	3 kg 500	Animale	10^3	+	Survie
12	Blanc	Femelle	3 kg 800	Animale	10^3	+	Survie
13	Blanc	Femelle	3 kg 500	Animale	10^3	+	Survie
14	Blanc	Femelle	4kg	Animale	10^3	+	Survie

Tableau 15: Mise au point d'un modèle d'arthrite septique chez le lapin

L'injection d'une solution de 10^3 CFU/ml nous a donc permis d'obtenir 100% de survie à 15 jours avec une infection articulaire dans 100% des cas (Figure 29).

Figure 29: Aspect de l'arthrite septique à 15 jours

BY-NC-ND

4.5 Mise au point du modèle animal, conclusion

Nous avions donc retenu comme modèle animal un lapin femelle de 4 kg avec une injection de 1 ml d'une solution à 10^3 CFU/ml de staphylococcus méthi-sensible d'origine léporidée (souche n° 132160).

5 Tentative de traitement d'une infection articulaire chez le lapin par le $PLA_{50}GS$

L'objectif de ce travail était d'arriver à juguler une arthrite septique chez l'animal par le biais de l'utilisation du $PLA_{50}GS$. Le critère de jugement principal reposait sur l'analyse bactériologique à 15 jours des prélèvements capsulaires de l'articulation infectée.

5.1 Matériel et méthode

5.1.1 Prise en charge et protocole de suivi des animaux pour l'étude visant à étudier notre PLA dans le traitement d'une infection articulaire chez le lapin

Il s'agit de lapins blancs de type New-Zeland, de sexe féminin, âgés de 3-4 mois, provenant tous du centre d'élevage Neuville, pesant environ 4 kg. Le travail a été réalisé au laboratoire vétérinaire départemental dirigé par le Docteur Claude Couquet. Chaque lapin utilisé dans cette étude était isolé dans une cage. Les lapins avaient un accès libre à leur alimentation et à l'eau, dans des conditions de température régulée. Lors des actes invasifs les lapins étaient anesthésiés par l'injection de 2 ml d'Imalgéne en intramusculaire (soit 20 mg/kg de Kétamine). La patte arrière droite était rasée (Figure 30). Puis la souche bactérienne était inoculée par une injection intra-articulaire dans le genou droit (injection en regard de l'interligne fémoro-tibiale latérale). La dose injectée était de 1 ml de SAMS.

En ce qui concerne l'injection du PLA, le geste était réalisé dans des conditions d'asepsie stricte avec une désinfection du membre puis un champage stérile. Une

(cc) BY-NC-ND

incision de 2 cm était réalisée en regard de l'articulation fémoro-tibiale latérale au bistouri froid. L'articulation était alors repérée et le PLA injecté. L'articulation était ensuite refermée avec du Vicryl 3.0 et la peau avec du Fil à peau 3.0.

Tous les lapins ont bénéficié d'une analgésie post-opératoire avec une injection de 0.1 ml de Buprécare matin et soir (Buprénorphine 0.3 mg/ml). Les lapins de l'étude ont eu les mêmes critères de surveillance résumés dans le Tableau 16. La température centrale était prise par voie rectale (Figure 31). La numération des globules blancs était réalisée à partir d'une prise de sang faite au niveau de la veine centrale de l'oreille (Figure 32). Les différents groupes de notre étude avaient été définis au préalable (Tableau 17) :

- **Le groupe A correspondait au groupe contrôle (infection articulaire isolée).**
- **Le groupe B avait pour but d'étudier l'effet d'une antibiothérapie générale sur une arthrite septique (effet de la gentamicine sous-cutanée).**
- **Le groupe C devait vérifier l'absence d'effet du PLA non chargé sur l'évolution d'une arthrite septique traitée par une antibiothérapie générale.**
- **Le groupe D étudiait l'effet du PLA chargé en Gentamicine sur le traitement d'une arthrite septique.**
- **Le groupe E avait pour but d'étudier la toxicité locale du PLA.**

La dose totale de Gentamicine sous-cutanée injectée par lapin était de 168 mg.

Dans le groupe traité par le $PLA_{50}GS$, la dose totale de poudre utilisée par lapin était de 750 mg soit 150 mg de Gentamicine.

En fin d'étude, tous les lapins ont été euthanasiés par l'injection d'une dose létale d'Imalgéne en sous-cutané, et il a été procédé aux prélèvements bactériologiques et anatomo-pathologiques nécessaires. Le protocole de notre étude avait été soumis au comité d'éthique du laboratoire vétérinaire qui l'avait accepté.

(cc) BY-NC-ND

Figure 30: rasage de la patte arrière droite

Figure 31: prise de la température rectale

BY-NC-ND

Figure 32: ponction de la veine centrale de l'oreille

J0	J1	J7	J15
- Poids - NFS - Température	- Poids - NFS - Température	- Poids - NFS - Température	- Poids - NFS - Température - Prélèvement bactériologique et anatomopathologique

Tableau 16: Critères étudiés pour l'ensemble des groupes en fonction du temps

Groupes	Nombre de lapins	SAMS $2x10^3$ CFU/ml	Genta sous cutanée 24 mg/J pdt 7J	PLA_{50} (750 mg)	$PLA_{50}GS$ (750 mg)
A	6	+	-	-	-
B	6	+	+	-	-
C	6	+	+	+	-
D	6	+	-	-	+
E	6	-	-	+	-

Tableau 17: Répartition des groupes de l'expérimentation

5.1.2 Méthode statistique

Une étude statistique a été réalisée. Les résultats des variables quantitatives sont présentés sous la forme de moyenne ± l'écart-type. Les comparaisons de distribution des

BY-NC-ND

variables quantitatives ont été réalisées par des tests de Student. Le seuil de significativité choisi pour l'ensemble des analyses statistiques était de 0.05. Pour cette étude, nous avons utilisé Vassar-Stats (site web de calcul statistique).

http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html

5.2 Résultats

5.2.1 Étude de l'efficacité de $PLA_{50}GS$

5.2.1.1 Résultats globaux par lapin

Le Tableau 18 résume les résultats cliniques de l'étude de l'efficacité du $PLA_{50}GS$ dans le traitement d'une infection articulaire du lapin. (/ = décès).

(cc) BY-NC-ND

Lapin	POIDS (kg)				TEMPÉRATURE (°C)				BOITERIE				ASPECT LOCAL			
	J0	J1	J7	J15	J0	J1	J7	J15	J0	J1	J7	J15	J0	J1	J7	J15
A1	3.6	3.4	3.1	3.2	37.1	39.1	40.5	38.6	-	+	+	+	-	-	+	+
A2	4.2	4.3	3.6	/	38.4	38.5	39.7	/	-	+	+	/	-	-	+	/
A3	4.5	4.6	3.9	3.7	39.5	40.2	40.0	41.1	-	+	+	+	-	-	+	+
A4	4.1	3.9	3.6	/	39.5	39.9	40.2	/	-	+	+	/	-	-	+	/
A5	3.5	3.6	3.3	3.0	38.8	39.4	38.8	40.1	-	+	+	+	-	-	+	+
A6	3.4	3.6	3.2	3.0	38.6	40.4	39.8	41.0	-	+	+	+	-	-	+	+
B1	4	3.9	3.3	3.6	40	40.3	40.9	40.1	-	+	+	+	-	-	+	+
B2	4	3.2	/	/	40	40.2	/	/	-	+	/	/	-	-	/	/
B3	3.2	3.2	3.1	3.1	40.0	40.1	40.9	40.2	-	+	+	+	-	-	+	+
B4	3.5	3.4	2.9	2.9	38.8	38.2	40.0	40.8	-	+	+	+	-	-	+	+
B5	5.1	5	/	/	39	39.3	/	/	-	+	/	/	-	-	/	/
B6	3.8	3.6	3.5	3.8	39.3	39.5	38.9	39.6	-	+	+	+	-	-	+	+
C1	4.0	3.9	3.3	3.2	39.1	39.6	39.6	40.2	-	+	+	+	-	-	+	+
C2	5.0	4.8	4.1	3.2	39.6	39.8	39.1	39.6	-	+	+	+	-	-	+	+
C3	3.9	3.9	3.3	/	39.4	41.1	41.6	/	-	+	+	/	-	-	+	/
C4	3.9	3.9	/	/	39.6	39.4	/	/	-	+	/	/	-	-	/	/
C5	4.5	4.2	4.0	3.8	39.4	40.5	41.0	41.0	-	+	+	+	-	-	+	+
C6	3.5	3.4	3.0	2.7	39.1	39.1	40.2	42	-	+	+	+	-	-	+	+
D1	3.6	3.2	3.0	3.2	39.3	39.6	40.6	40.0	-	+	+	+	-	-	+	+
D2	4.7	4.4	3.3	3.6	38.1	38.8	40.3	40.1	-	+	+	+	-	-	+	+
D3	3.5	3.9	2.9	3.1	39.5	39.6	40.1	39.8	-	+	+	+	-	-	+	+
D4	4.6	4.	3.	3.6	39.9	40.1	40.1	39.9	-	+	+	-	-	-	-	-

(cc) BY-NC-ND

		8	8													
D5	4.1	4.2	3.9	4.2	40.3	40	40.5	39.5	-	+	+	-	-	-	+	+
D6	4.5	4.2	4.0	4.2	39.5	42	40.0	41.0	-	+	+	-	-	-	+	+
E1	4.3	4.2	4.5	4.6	39.6	39.4	39.8	39.9	-	+	-	-	-	-	-	-
E2	3.8	3.6	3.9	4.3	39.6	39.6	39.4	40.2	-	+	-	-	-	-	-	-
E3	4.3	4.4	4.8	4.9	39.2	39.7	39.8	39.2	-	+	-	-	-	-	-	-
E4	4.3	4.2	4.5	4.6	39.6	39.9	40.2	39.8	-	+	-	-	-	-	-	-
E5	4.6	4.7	4.9	5	39.5	39.2	39	39.4	-	+	-	-	-	-	-	-
E6	4.6	4.3	4.5	4.8	38.9	39.1	39.5	39	-	+	-	-	-	-	-	-

B2 : décès par hernie diaphragmatique (pas de septicémie / arthrite septique +) à J4.

Tableau 18: Résultats cliniques par lapin

À J15, tous les lapins ont été euthanasiés. Le Tableau 19 rapporte les résultats de la numération bactérienne lapin par lapin. Devant un décès trop précoce et de cause non infectieuse (hernie diaphragmatique), nous n'avons pas prélevé le lapin B2. Les autres lapins, dont la mort était vraisemblablement liée à l'infection, ont été, quant à eux, prélevés. Le Tableau 20 rapporte les résultats de la numération des globules blancs au cours de l'étude.

(cc) BY-NC-ND

Lapin	P. essai	Dilution compte des colonies (0.1mL)							Numération bactérienne (CFU/g)	Numération bactérienne (log_{10} CFU/g)	Moyenne par groupe (log_{10} CFU/g)
		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}			
A1	0.5g/4.5 ml	Inc.	Inc.	Inc.	87	13	ND	ND	**1.1×10^8**	**8.04**	**8.1 (σ: 0.5)**
A2	0.5g/4.5 ml	Inc.	Inc.	Inc.	406	33	2	ND	**3.0×10^8**	**8.48**	
A3	0.6g/4.4 ml	Inc.	Inc.	Inc.	230	17	0	ND	**1.6×10^8**	**8.2**	
A4	1g/9 ml	Inc.	Inc.	Inc.	170	30	ND	ND	**2.4×10^8**	**8.38**	
A5	0.2g/4.5 ml	342	59	8	0	0	ND	ND	**1.6×10^7**	**7.2**	
A6	0.5g/4.5 ml	Inc.	Inc.	Inc.	360	22	2	ND	**2.9×10^8**	**8.46**	
B1	0.5g/4.5 ml	Inc.	Inc.	Inc.	199	34	ND	ND	**2.7×10^8**	**8.43**	**8.4 (σ: 0.2)**
B2									/	/	
B3	1g/9mL	Inc.	Inc.	Inc.	268	34	1	ND	**3.0×10^8**	**8.48**	
B4	0.5g/4.5 ml	Inc.	Inc.	Inc.	240	11	1	ND	**1.7×10^8**	**8.23**	
B5	0.5g/4.5 ml	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	190	20	ND	**1.9×10^9**	**8.28**	
B6	0.5g/4.5 ml	Inc.	Inc.	Inc.	340	39	3	ND	**3.6×10^8**	**8.56**	
C1	0.7g/ 1 ml	10	2	0	0	0	ND	ND	**7.1×10^4**	**4.85**	**8.3 (σ: 1.9)**
C2	0.5g/4.5 ml	Inc.	Inc.	Inc.	493	44	7	ND	**4.4×10^8**	**8.64**	
C3	0.5g/4.5 ml	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	140	19	ND	**1.6×10^9**	**9.2**	
C4	0.5g/4.5 ml	Inc.	Inc.	Inc.	176	32	ND	ND	**2.5×10^8**	**8.4**	
C5	0.5g/4.5 ml	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	**$>10^{10}$**	**10**	
C6	0.5g/4.5 ml	Inc.	Inc.	Inc.	420	35	ND	ND	**3.8×10^8**	**8.58**	
D1	0.65g/5.85 ml	Inc.	Inc.	Inc.	45	8	ND	ND	**6.2×10^7**	**7.79**	**4.8 (σ: 3.9)**
D2	0.5g/4.5 ml	Inc.	Inc.	Inc.	117	13	2	ND	**1.2×10^8**	**7.08**	
D3	0.5g/1.5 ml	8	1	0	0	0	ND	ND	**1.0×10^4**	**7**	
D4	0.4g/3.6 ml	0	0	0	0	0	ND	ND	**0**	**0**	
D5	0.5g/1.5 ml	Inc.	Inc.	132	15	1	ND	ND	**5.6×10^6**	**6.75**	
D6	0.5g/1.5 ml	0	0	0	0	0	0	ND	**0**	**0**	
E1	/	/	/	/	/	/	/	/	**0**	**0**	**0**
E2	/	/	/	/	/	/	/	/	**0**	**0**	
E3	/	/	/	/	/	/	/	/	**0**	**0**	
E4	/	/	/	/	/	/	/	/	**0**	**0**	
E5	/	/	/	/	/	/	/	/	**0**	**0**	
E6	/	/	/	/	/	/	/	/	**0**	**0**	

Tableau 19: Résultats bactériologiques par lapin

(cc) BY-NC-ND

Lapin	Globules blancs			
	J0	J1	J7	J15
A1	14100	/	/	9850
A2	6030	/	/	/
A3	9560	/	/	13800
A4	11240	/	/	/
A5	10260	/	14510	15430
A6	9650	/	/	11540
B1	7200	/	/	9640
B2	6500	/	/	/
B3	8400	/	/	12860
B4	10230	/	/	14250
B5	9730	/	/	/
B6	7250	/	/	8000
C1	10690	6650	/	8690
C2	6770	/	/	13650
C3	19440	/	/	/
C4	14020	/	/	/
C5	6545	/	/	11960
C6	7450	/	/	15770
D1	8650	/	/	27480
D2	7250	11400	/	6950
D3	6540	/	/	9750
D4	10240	/	/	10250
D5	9670	/	/	12900
D6	9430	/	/	11250
E1	8260	/	/	12220
E2	10250	/	/	13240
E3	9850	/	14500	15670
E4	8750	/	/	12220
E5	8430	/	/	12710
E6	10250	/	/	12210

Tableau 20: Résultats de la numération des globules blancs par lapin

BY-NC-ND

5.2.1.2 Résultats de l'étude du poids, de la température et de la numération des globules blancs en fonction des groupes

	Poids (kg)		Température (°C)		Globules blancs	
	J0	J15	J0	J15	J0	J15
A	**3.9 (σ: 0.5)**	**3.2 (σ: 0.7)**	**38.6 (σ: 0.6)**	**40.2 (σ: 1.9)**	**10140 (σ: 2751)**	**12655 (σ: 3908)**
B	**3.9 (σ: 0.7)**	**3.3 (σ: 0.7)**	**39.5 (σ: 0.6)**	**40.2 (σ: 0.8)**	**8218 (σ: 1527)**	**11187 (σ: 4565)**
C	**4.1 (σ: 0.6)**	**3.2 (σ: 0.7)**	**39.4 (σ: 0.8)**	**40.7 (σ: 1.6)**	**10819 (σ: 5362)**	**12517 (σ: 4754)**
D	**4.2 (σ: 0.5)**	**3.6 (σ: 0.5)**	**39.4 (σ: 0.7)**	**40 (σ: 0.5)**	**8630 (σ:1527)**	**13097 (σ: 7672)**
E	**4.3 (σ: 0.3)**	**4.7 (σ: 0.3)**	**39.4 (σ: 0.3)**	**39.6 (σ: 0.5)**	**9298 (σ: 967)**	**13045 (σ: 1415)**

Tableau 21: Donnés cliniques en fonction des groupes présentés sous la forme de moyenne (écart-type)

- A J0 : - le poids des lapins du groupe D était comparable au poids des lapins des groupes A, B, C et E avec un p égal à 0.2, 0.3, 0.5 et 0.2 respectivement.

  - la température des lapins du groupe D était comparable à la température des lapins des groupes A, B, C et E avec un p égal à 0.4, 0.5, 0.4 et 0.06 respectivement.

  - la numération des globules blancs des lapins du groupe D était comparable à la numération des lapins des groupes A, B, C et E avec un p égal à 0.3, 0.2, 0.2 et 0.1 respectivement.

Ainsi à J0, le groupe D était donc comparable aux autres groupes en ce qui concerne le poids, la température corporelle et la numération des globules blancs.

- A J15 : - le poids des lapins du groupe D était comparable au poids des lapins des groupes A, B et C avec un p égal à 0.2, 0.1 et 0.1 respectivement. Les lapins du groupe E prenaient quant à eux significativement plus de poids que les lapins du groupe D (p=0.0003).

BY-NC-ND

- la température des lapins du groupe D était comparable à la température des lapins des groupes A, B, C et E avec un p égal à 0.4, 0.6, 0.1 et 0.4 respectivement.

- la numération des globules blancs des lapins du groupe D était comparable à la numération des lapins des groupes A, B, C et E avec un p égal à 0.3, 0.5, 0.4 et 0.5 respectivement.

Ainsi à J15, le groupe E (sans infection articulaire) a pris plus de poids que les lapins des autres groupes. Il n'existait pas de différences significatives entre les groupes en ce qui concerne la température et la numération des globules blancs.

- Entre J0 et J15, les lapins des groupes A, B, C et D perdaient entre 0.2 et 1 kg alors que les lapins du groupe E prenaient quant à eux en moyenne 0.3 kg.

Ainsi entre J0 et J15, il n'existait pas de différence significative entre le groupe D et les groupes A, B et C (p respectivement égal à 0.07, 0.3, 0.4). Seuls les lapins du groupe E ont pris significativement plus de poids que les lapins du groupe D (p= 0.003).

5.2.1.3 Résultats de l'étude de la boiterie et de l'aspect local en fonction des groupes

Tous les lapins infectés présentaient une augmentation de la circonférence des genoux concernés. Cependant la mesure a été rendue très difficile par la diffusion de l'infection vers la distalité du membre. Ainsi la circonférence avait tendance à diminuer lorsque l'infection diffusait. Nous n'avons donc pas conservé cette mesure pour l'étude des résultats puisqu'elle était difficilement corrélable avec l'importance de l'infection.

En ce qui concerne la boiterie, tous les lapins du groupe A, B, C et D n'utilisaient plus leur patte dès le jour de l'infection et jusqu'à leur euthanasie. En ce qui concerne les lapins du groupe E, la boiterie commençait le jour de l'injection du PLA_{50} pour disparaître dans tous les cas dans les 7 jours qui suivirent cette injection. À 7 jours, les lapins de ce groupe retrouvaient une marche normale sans boiterie.

BY-NC-ND

5.2.1.4 Résultats de la bactériologie en fonction des groupes

Pour résumer les résultats bactériologiques de l'étude, nous avons observé une baisse significative du nombre de bactéries à J15 dans le groupe D. Ceci est résumé dans le Tableau 22. L'étude statistique a été réalisée sur le logarithme décimal des valeurs brutes des numérations bactériennes. En effet, une variation du simple au double (0,5 unité de logarithme décimal) du nombre de bactéries est considérée comme une faible variation en bactériologie.

GROUPES	Numération bactérienne (log_{10} CFU/g)
A (groupe infection)	**8.1 (σ: 0.5)**
B (groupe infection + Genta sous-cut.)	**8.4 (σ: 0.2)**
C (groupe infection + Genta sous-cut. + PLA_{50})	**8.3 (σ: 1.9)**
D (groupe infection + PLA_{50}GS)	**4.8 (σ: 3.9)**
E (groupe PLA_{50})	**0**

Tableau 22: Donnés bactériologiques à J15 en fonction des groupes présentés sous la forme de moyenne (écart-type)

En ce qui concerne le comptage bactérien à J15 :

- il n'existait pas de différence significative entre le groupe C (infection + Gentamicine SC + PLA) et le groupe B (infection + Gentamicine SC) avec un p = 0.4. Le PLA_{50} non chargé en Gentamicine n'avait donc pas d'effet local sur l'infection.

- il n'existait pas de différence significative entre le groupe A (infection) et le groupe B (infection + Gentamicine SC) et C (infection + Gentamicine SC + PLA) avec un p égal respectivement à 0.1 et 0.4. La gentamicine sous-cutanée ne permettait donc pas de diminuer l'infection articulaire par rapport au groupe non traité.

- En revanche, il existait une différence significative entre le groupe D (infection + PLA_{50}GS) et les groupes A, B et C avec un degré de significativité p égal à 0.03 (valeur de p égale pour les 3 groupes). Le PLA_{50}GS permettait donc de réduire significativement la charge bactérienne par rapport au groupe non traité et aux groupes traités par la gentamicine sous-cutanée d'environ 3 à 4 unités de logarithmes décimaux (Figure 33),

BY-NC-ND

soit une charge bactérienne de 1000 à 10 000 fois plus faible que celle observée dans les groupes non-traités avec le $PLA_{50}GS$.

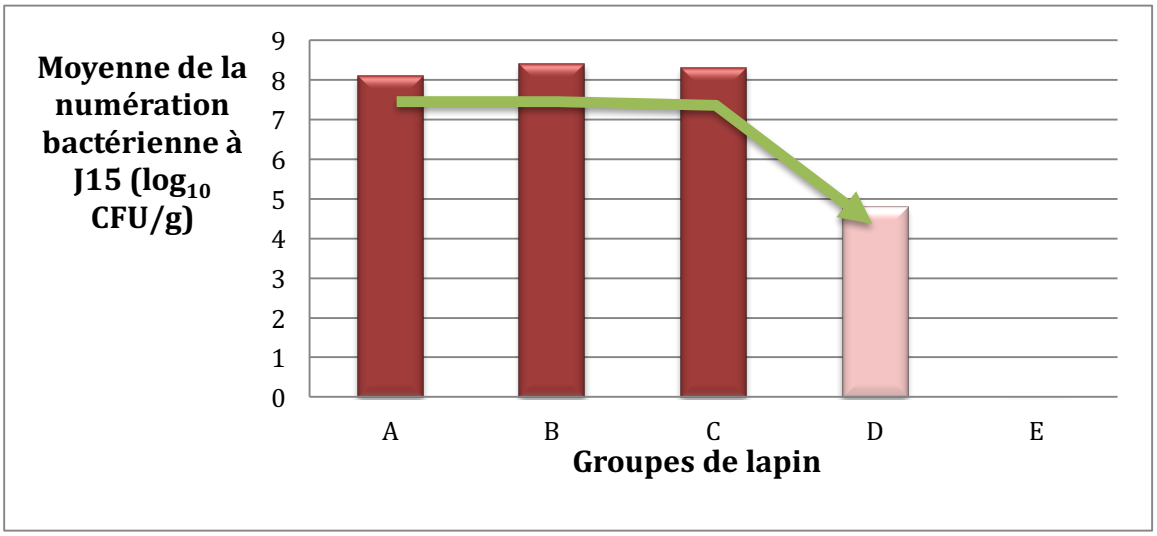


Figure 33: Résultats de la numération bactérienne en fonction des groupes

GROUPES		A	B	C	D	E
A	Infection		0.1	0.4	**0.03 ***	/
B	Infection + Genta sous-cut.			0.4	**0.03 ***	/
C	Infection + Genta sous-cut. + PLA_{50}				**0.03 ***	/
D	Infection + $PLA_{50}GS$					/
E	PLA_{50}					

Tableau 23: Analyse statistique des différents groupes entre eux

5.2.1.5 Résultats anatomo-pathologiques en fonction des groupes

- **Groupe A :**

BY-NC-ND

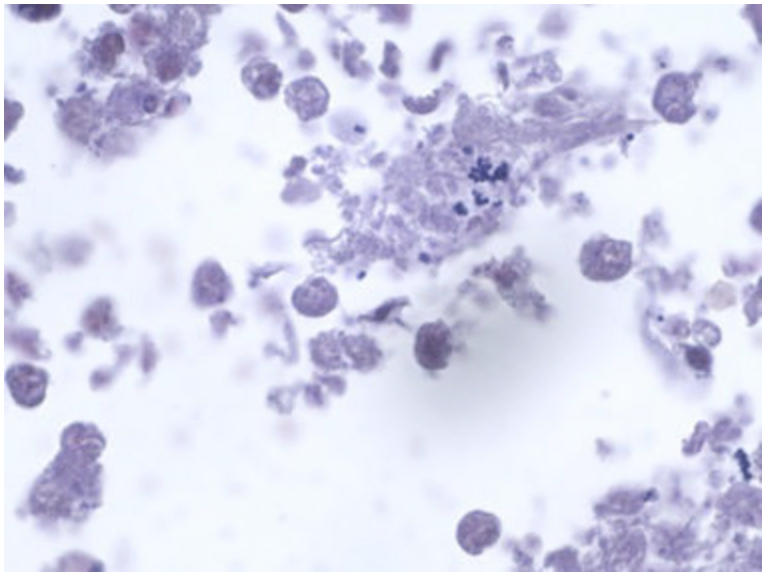


Figure 34: Groupe A, coloration GRAMx1000, présence de bactéries gram+ au sein d'une zone abcédée

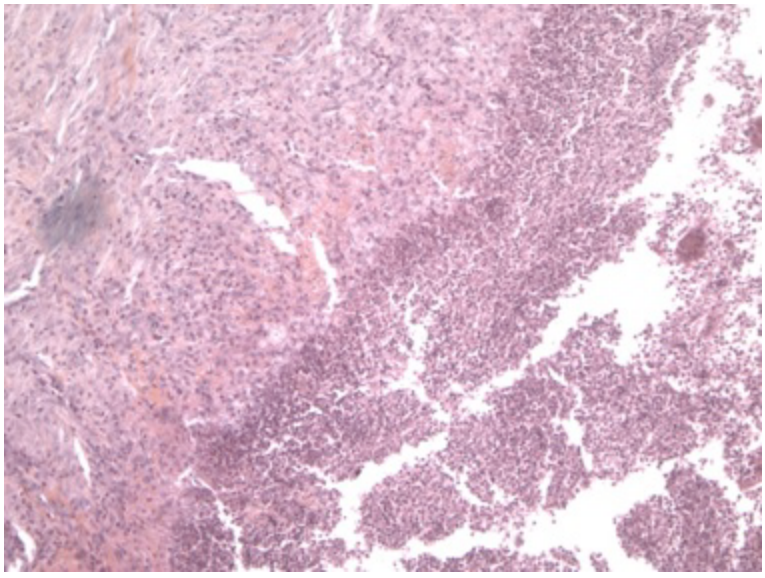


Figure 35: Groupe A, coloration HESx100, abcès avec zone de nécrose, amas de polynucléaires sains et altérés

BY-NC-ND

- **Groupe B :**

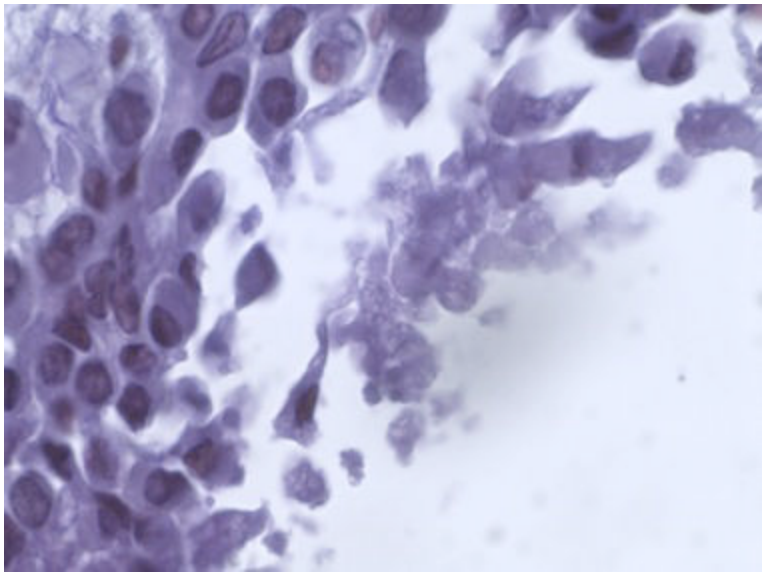


Figure 36: Groupe B, coloration GRAMx1000, présence de bactéries gram+ au sein d'une zone abcédée

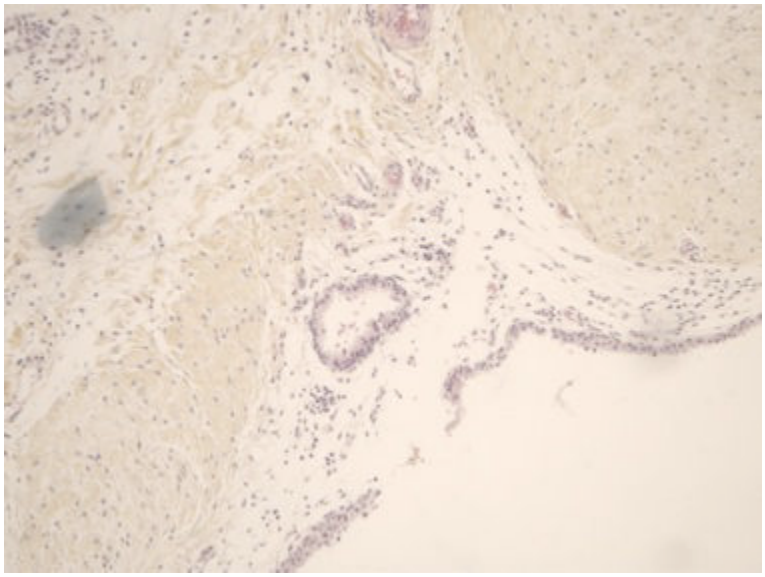


Figure 37: Groupe B, coloration HESx100, abcès avec zone de nécrose et amas de polynucléaires sains et altérés

Les lapins de ces deux groupes présentaient une diffusion progressive de l'infection, avec nécrose tissulaire. L'infection provoquait une rupture de la capsule articulaire et une diffusion de l'infection aux structures musculaires adjacentes.

BY-NC-ND

- Groupe C :

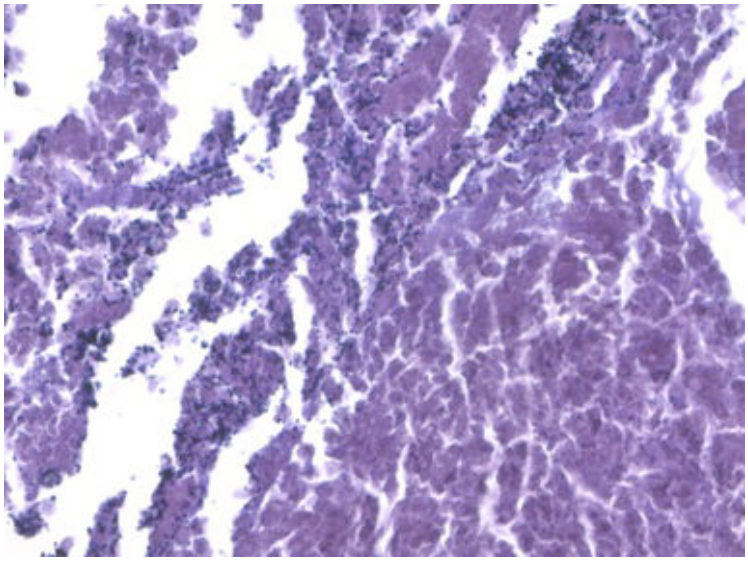


Figure 38: Groupe C, coloration GRAMx40, présence de bactéries gram+ au sein d'une zone abcédée

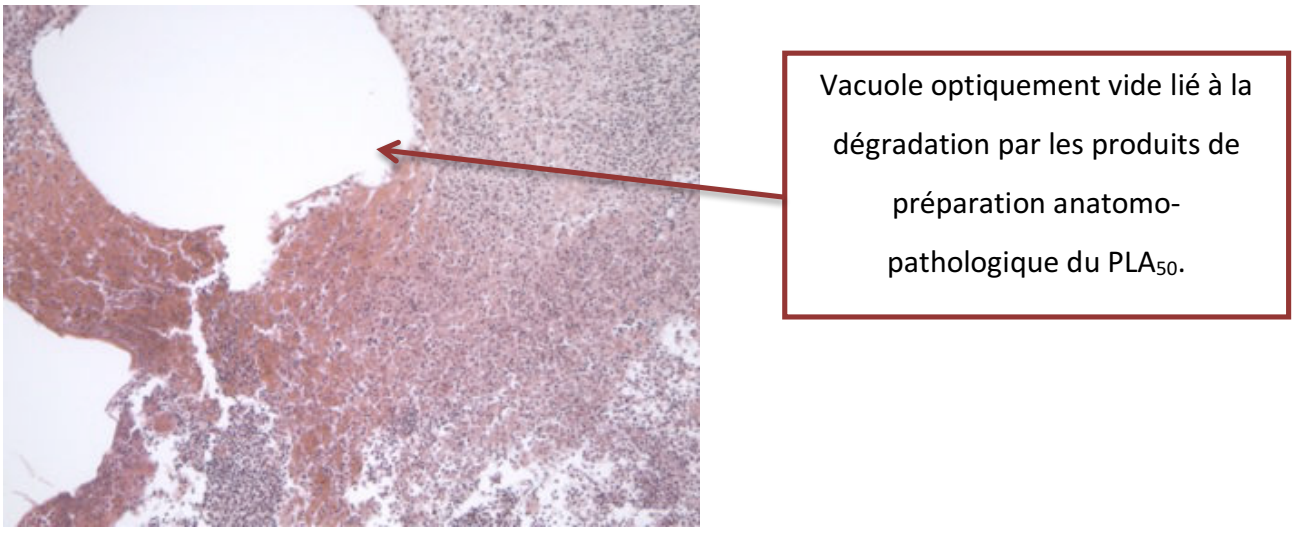


Figure 39: Groupe C, coloration HESx10, amas de polynucléaires sains et altérés

Les lapins de ce groupe présentaient une diffusion progressive de l'infection, avec nécrose tissulaire. L'infection provoquait une rupture de la capsule articulaire et une diffusion de l'infection aux structures musculaires adjacentes. Dans ce groupe, nous avons observé également une réaction modérée macrophagique à cellules géantes (réaction à corps étrangers) liée à la présence du PLA_{50}.

BY-NC-ND

- Groupe D :

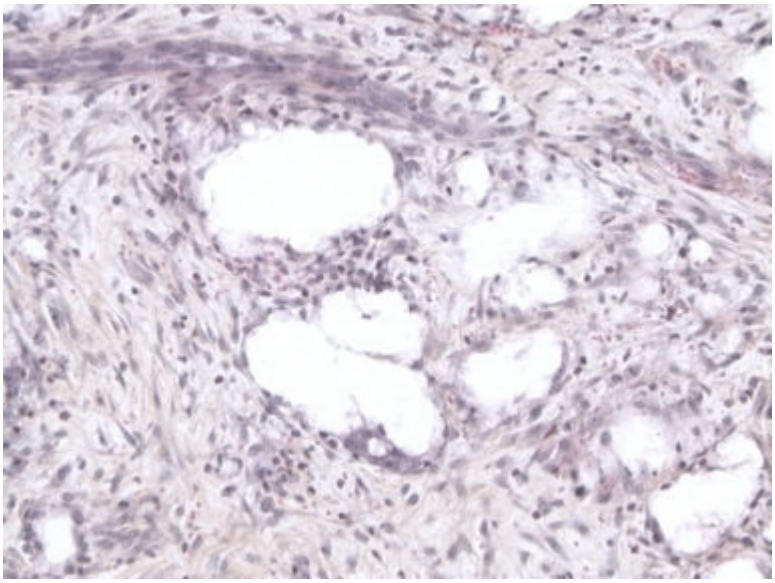


Figure 40: Groupe D, coloration HESx20

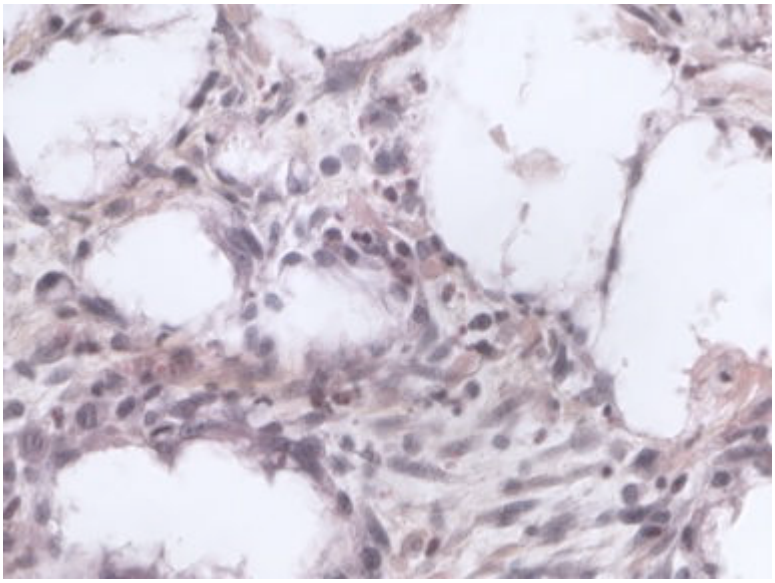


Figure 41: Groupe D, coloration HESx40

Nous avons retrouvé dans ce groupe une réaction macrophagique à cellules géantes (réaction à corps étrangers) liée à la présence du $PLA_{50}GS$.

Nous n'avons retrouvé aucune zone nécrotique dans ce groupe. Cependant nous avons retrouvé une réaction inflammatoire avec des amas de polynucléaires sains et altérés en réponse à l'infection.

BY-NC-ND

- Groupe E :

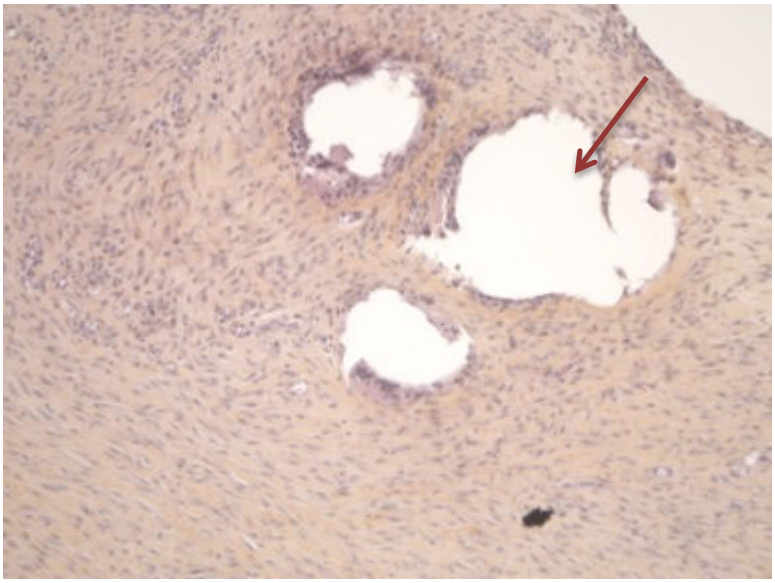


Figure 42: Groupe E, coloration HESx10

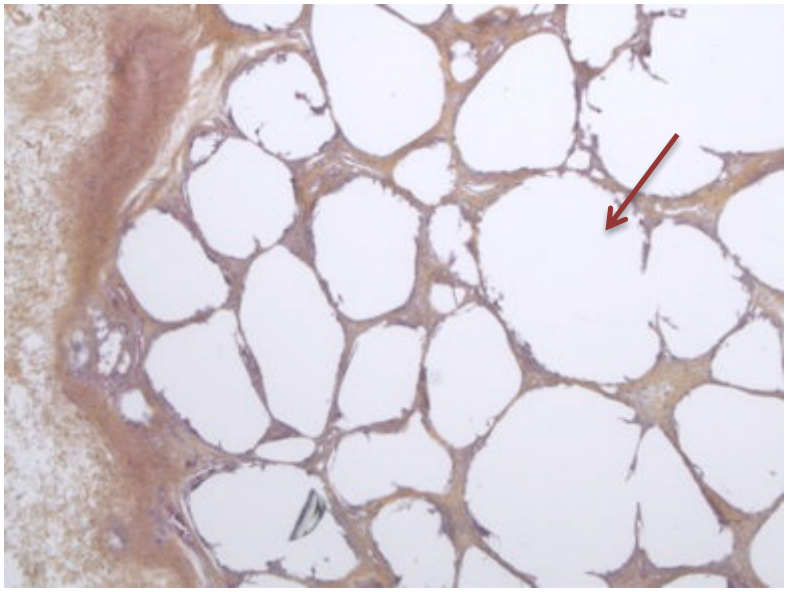


Figure 43: Groupe E, coloration HESx10

Réaction macrophagique à cellules géantes (réaction à corps étrangers).

Vacuole optiquement vide, liée à la dégradation du $PLA_{50}GS$ par les produits de préparation anatomo-pathologique.

BY-NC-ND

5.3 Discussion

5.3.1 Les problèmes de l'étude et leurs solutions

Nous avons décidé, pour mener cette étude expérimentale, d'utiliser le genou de lapin malgré la susceptibilité connue de cet animal à l'infection. Nous avons cependant continué dans cette voie pour plusieurs raisons. Tout d'abord le travail précèdent avait été réalisé sur des rats et nous avions réussi, dans cette première étude, à guérir une infection périostée à SAMS grâce au $PLA_{50}GS$. Nous avions donc comme nouvel objectif de traiter une infection articulaire. Pour ce faire, nous devions utiliser un animal plus volumineux avec une articulation facilement accessible à la chirurgie. Le lapin est l'animal le plus régulièrement utilisé dans la littérature pour réaliser un model d'arthrite septique (85-95).

Nous avons donc commencé par vérifier les modèles d'arthrites septiques retrouvés dans la littérature (85-95) . Nous avons réalisé une injection de 10^8 CFU/ml de SAMS dans le genou de deux lapins d'environ 3,5 kg (48, 95). Cependant cette expérimentation s'est soldée rapidement par un échec avec le décès des lapins au bout de 2 jours. Or, pour pouvoir réaliser notre étude, il nous fallait obtenir une arthrite septique chez un lapin sur une période d'au moins 15 jours (groupe contrôle). Nous avons donc réévalué notre modèle animal à l'aide de 12 nouveaux lapins. Pour arriver à notre objectif de modèle animal, nous avons observé la nécessité d'une période dite d'adaptation d'environ une semaine (96). Cette dernière permet l'adaptation de l'animal à son nouveau lieu de vie et aux modifications de son alimentation. Cette adaptation semble permettre une diminution de la mortalité de l'animal pendant la première semaine de l'expérimentation. Nous avons également dû diminuer de façon significative l'inoculum bactérien pour arriver à un juste équilibre entre la survie du lapin et l'obtention systématique d'une arthrite septique. Pour obtenir notre modèle animal, nous avons utilisé 10^1 bactéries de moins que le travail réalisé par Wysenbeeck en 1998 qui se rapprochait le plus de nos objectifs initiaux (99).

Modèle animal : lapin femelle de 3 à 4 kg de type New Zélande avec une injection intra-articulaire dans le genou droit de 1 ml d'une solution à 10^3 CFU/ml d'une souche de *Staphylocoque aureus léporidée* (N°132160).

BY-NC-ND

Notre travail initial devait ensuite porter sur l'intérêt d'un gel de polymère d'acide lactique associé à de la gentamicine dans le traitement d'une infection articulaire. Cependant l'évolution des travaux actuellement en cours dans notre unité de recherche, montre une grande difficulté à obtenir un gel associant une molécule hydrophile et une molécule hydrophobe (polymère d'acide lactique + gentamicine). Dans un premier temps, notre objectif a été de rendre la poudre de $PLA_{50}GS$ injectable. Nous avons dû broyer et filtrer le $PLA_{50}GS$ afin d'obtenir des particules de moins de 500 µm (pouvant passer dans des cathéters de 14 Gauge) que nous mélangions ensuite avec 4 ml de sérum physiologique pour le rendre injectable. Nous avons donc appliqué cette technique pour les deux premiers sous-groupes (sous-groupes 1 et 2). Dans ces deux sous-groupes, aucune incision chirurgicale n'était réalisée, l'infection et le traitement étaient réalisés par une simple injection. Plusieurs problèmes se sont alors posés. Tout d'abord la quantité importante de $PLA_{50}GS$ à injecter en intra-articulaire pour obtenir une dose comparable à celle administrée par voie systémique a été une première difficulté. La littérature montre qu'il est possible de réduire cette dose locale de façon significative pour obtenir un effet comparable (23), sans toutefois préciser les doses locales à utiliser. Nous avons donc diminué la dose jusqu'à obtenir un volume injectable de 5 cc, correspondant au volume articulaire du genou de lapin (97) : soit 750 mg de $PLA_{50}GS$ dans 5 ml de sérum physiologique (168 mg de Gentamicine sous-cutanée vs 150 mg de Gentamicine pour 750 mg de $PLA_{50}GS$). Cependant l'injection intra-articulaire a été pour les deux premiers groupes un échec. En effet, une fois hydraté, le $PLA_{50}GS$ gonfle, prenant ainsi un volume qui l'empêche de passer dans l'aiguille. De plus l'hyperpression intra-articulaire permettait un libre passage de sérum physiologique mais entraînait une accumulation du polymère dans la seringue. Après rediscussion du projet avec mon maître de stage, nous avons décidé de modifier notre stratégie. Nous avons décidé d'appliquer directement en intra-articulaire la poudre de $PLA_{50}GS$. Afin de rendre les sous-groupes 3 à 6 comparables, une incision chirurgicale a été réalisée chez tous les lapins : incision de 1 cm en regard de la face latérale de l'interligne articulaire fémoro-tibiale latérale.

Devant les mauvais résultats initiaux obtenus avec les deux premiers lapins traités par le $PLA_{50}GS$, nous avons également remis en question la préparation du polymère. En effet le broyage de ce dernier avait provoqué un échauffement non

BY-NC-ND

négligeable du principe actif, avec un risque de diminution de l'activité de la Gentamicine. Nous avons donc vérifié après hydratation du $PLA_{50}GS$ l'activité antibactérienne de notre polymère. Nous n'avons pas observé de dégradation du principe actif. Nous avons donc pu enchaîner sur les sous-groupes 3 à 6.

La seconde difficulté rencontrée a résidé dans le suivi biologique des différents lapins. Nous réalisions une ponction au niveau de la veine centrale de l'oreille du lapin. Cette ponction s'est révélée un geste complexe pour plusieurs raisons. D'une part, cette veine est fréquemment bifide rendant ainsi assez souvent la ponction impossible. D'autre part, la réalisation d'une ponction au niveau de cette veine provoque l'apparition d'un hématome volumineux empêchant la réalisation de nouvelles ponctions au niveau de cette même veine. Si bien que de nombreux prélèvements se sont révélés coagulés lors de l'analyse. Nous avons donc assoupli le suivi biologique avec une ponction veineuse à J0 et une ponction intracardiaque à J15.

5.3.2 Le $PLA_{50}GS$

La vascularisation articulaire est très mauvaise. Le cartilage articulaire se nourrit par l'intermédiaire du liquide synovial. La diffusion articulaire d'un antibiotique est donc limitée. Pour Frimodt-Moller, la concentration articulaire des antibiotiques est 5 fois moins importante que la dose administrée par voie systémique (100). L'infection articulaire est donc une pathologie grave et très difficile à soigner (96, 99). Elle bénéfice la plupart du temps d'un drainage chirurgical et d'une antibiothérapie par voie générale prolongée (96). De nombreux travaux tentent d'amener localement des « transporteurs » d'antibiotique afin d'avoir un relarguage in situ et ainsi d'obtenir une concentration minimale inhibitrice de la bactérie pendant plusieurs jours sur le site de l'infection (58, 59, 63).

Le $PLA_{50}GS$ nous a permis de réduire très significativement la charge bactérienne intra-articulaire (baisse de 3 à 4 $\log_{10}$ soit 1000 à 10000 fois moins de bactéries). Le traitement antibiotique par voie générale ne nous a pas permis de réduire l'infection intra-articulaire de façon significative par rapport au groupe non traité. Le $PLA_{50}GS$ permettait de réduire l'infection de 3 $\log_{10}$ par rapport aux autres groupes avec 2 lapins sur 6 guéris de leur infection. Ces observations sont comparables à celle de

BY-NC-ND

Wang qui n'arrivait pas à guérir une spondylodiscite chez le lapin mais arrivait à neutraliser cette infection en utilisation des polymères à base de Vancomycine (23). Pour certains auteurs, ces traitements locaux doivent permettre de diminuer la dose d'antibiotique utilisée par voie générale, source d'effets secondaires (57). Dans notre étude nous avons observé la mort de 3 lapins dans les groupes traités par voie générale. Ces décès étaient liés à un amaigrissement majeur des lapins. En effet, outre l'effet sur l'état général de l'infection à SAMS, un des effets secondaires de la Gentamicine chez le lapin est l'apparition d'une anorexie sévère pouvant aller jusqu'au décès du lapin (101).

Cependant étant donné que nous n'avons pas surveillé la concentration intra-articulaire de la Gentamicine lors de l'utilisation du $PLA_{50}GS$, nous ne sommes pas en mesure d'expliquer l'absence de guérison de l'infection dans les sous-groupes 3 et 5. Il nous paraît donc important à terme de prolonger nos travaux par la réalisation d'une micro-dialyse articulaire afin de préciser la dose de $PLA_{50}GS$ à utiliser pour obtenir localement et durablement une libération d'antibiotique supérieure à la CMI de l'agent bactérien en cause.

Les études de pharmacocinétique concernant la libération d'antibiotique à partir de polymères sont assez rares et difficilement comparables. Les études disponibles font état soit d'une libération très rapide (30' à 2 h), soit d'une libération très longue (quelques semaines à plusieurs mois). Dans le cas des libérations très rapides (Compresses de collagène), les doses toxiques peuvent être atteintes dans le sang car l'effet « burst » peut être important. De plus la charge en antibiotique n'est pas très importante (200 mg) et correspond à quelques injections de gentamicine. Dans le cas des libérations très prolongées (Ciments PMMA) à des doses faibles, un autre type de problème peut se poser qui est celui de l'émergence de souches bactériennes résistantes du fait de faibles concentrations d'antibiotiques qui induisent une pression de sélection chronique. Ce problème est très important car l'émergence de souches résistantes à la gentamicine est à éviter à tout prix en orthopédie. Dans notre cas, le polymère semble permettre une libération sur plusieurs jours mais le polymère est résorbé entièrement en 3 à 4 semaines.

Par ailleurs, PLA_{50} est un polymère biocompatible et entièrement biodégradable en éléments non-toxiques, permettant un relargage progressif de l'antibiotique sur

BY-NC-ND

plusieurs jours (23). La plupart des autres systèmes, quant à eux, ne libèrent l'antibiotique que sur quelques heures (20). Dans notre étude, le PLA_{50} provoquait, comme dans l'étude de Wang, une réaction macrophagique à Cellules Géantes (réaction à corps étranger) (23). Cependant cette réaction était cliniquement très bien supportée avec une reprise normale de l'utilisation de la patte traitée par le lapin dès la première semaine. De plus notre analyse anatomo-pathologique nous a permis de démontrer que cette réaction était très modérée.

5.4 Conclusion

Cette étude nous a permis de développer un modèle léporidé d'infection articulaire et d'évaluer un mode de traitement par polymère-antibiotique. Si l'infection à SAMS n'a pas pu être traitée entièrement, le $PLA_{50}GS$ a permis de diminuer de façon très significative la charge bactérienne intra-articulaire (3-4 $\log_{10}$) sans induire de toxicité propre. Des études complémentaires (étude des concentrations locales d'antibiotiques par microdialyse, étude réalisée sur une période plus longue) sont à prévoir pour confirmer ces résultats mais ce mode de délivrance d'antibiotique semble intéressant en thérapeutique humaine.

Article 3 : Intra-articular gentamicin-loaded PLGA microparticles injection for the treatment of MSSA arthritis in Rabbits

Authors: P-S Marcheix[1], MD · Ch Martin[2], MD · E Denes[2], MD · X Leclercq[3], MD · M Vert[3], PharmD, PhD ·F Sturtz[4], MD PhD.

Soumis à J***ournal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons***

BY-NC-ND

Discussion générale et Perspectives

1 Rappels des résultats obtenus (par rapport aux objectifs)

Ce travail avait pour but de créer un vecteur d'antibiothérapie locale pour le traitement des infections ostéo-articulaires. L'objectif de ce travail était de trouver une alternative aux ciments type PMMA vecteur d'antibiotique. Ce nouveau vecteur d'antibiotique devait être biodégradable afin d'éviter les chirurgies itératives liées à l'utilisation des PMMA et devait permettre une libération prolongée de l'antibiotique en restant pendant toute la période de relargage au-dessus de la CMI du germe en cause dans l'infection ostéo-articulaire. Le cahier des charges de ce vecteur d'antibiotique était le suivant : le traitement local et peropératoire visant à libérer un antibiotique nécessite un système matriciel offrant une libération de gentamicine à une dose de 1 à 2 mg/jour/g de mélange sur une période de plus de 10 jours. Ce système matriciel devait avoir des caractéristiques physiques appropriées et un taux de relargage suffisant pour permettre un traitement le plus sécuritaire possible tout en permettant une mise en place simple. De plus, le polymère devait être bio-résorbable, c'est-à-dire qu'il devait pouvoir être dégradé jusqu'à obtenir des fragments pouvant être éliminés naturellement par l'organisme. Les travaux initiaux de Mauduit (70) ont permis l'élaboration d'un polymère répondant à ces exigences. Il a ainsi été créé le PLA_{50}PGS20% correspondant à un Poly(D,L-acide lactique) de haut poids moléculaire contenant 20% de Gentamicine. Le PLA_{50}P est un poly(α-hydroxy acide) obtenu par polymérisation du DL-lactide. Ses chaînes macromoléculaires renferment en moyenne 50% d'unités L-lactique et 50% d'unités D-lactique. Il s'agit d'un polymère amorphe, biodégradable, biocompatible possédant une bonne tolérance initiale et à long terme dans le corps humain. La polymérisation du PLA_{50} s'effectue par ouverture de cycles du lactique racémique D,L-lactide. Ce polymère a une masse moléculaire de 100 000 g/mol. La Gentamicine utilisée était sous forme de sulfate de gentamicine (GS) en provenance de la société Serva. Afin d'obtenir le mélange gentamycine-PLA, une technique de compression des poudres des deux composants a été mise en œuvre. Pour permettre de réponde au cahier des charges initial, la taille des particules de PLA chargées en Gentamicine obtenues après broyage et tamisage doit être d'environ 0,5 mm afin de limiter le « burst initial » tout en permettant une libération sur une période de plus de 1 mois. Par ailleurs, lors de ce travail d'élaboration, Mauduit avait démontré l'absence

BY-NC-ND

d'effet néfaste de la γ-irradiation, destinée à rendre ce vecteur d'antibiotique stérilisable, sur le polymère et sur ces propriétés.

In vivo, nous avons observé un relargage de l'antibiotique par le polymère supérieur à la CMI du germe utilisé dans notre étude. Le relargage était de 17 mg/g/j après une heure d'implantation puis de 0,9 mg/g/j après 14 jours. Finalement le polymère disparaissait complétement à 5 semaines.

Une fois l'élaboration du $PLA_{50}GS$ considérée comme optimale pour le traitement d'une infection ostéoarticulaire, nous sommes passé à l'expérimentation sur l'animal afin d'évaluer ce polymère. Dans le cadre d'une infection périostée, l'étude *in vivo* de l'efficacité du $PLA_{50}GS$ sur 6 groupes de rats infectés par SAMS a montré sa supériorité par rapport à une administration parentérale d'une dose équivalente de Gentamicine avec une diminution statistiquement significative des colonies de staphylococcus par rapport aux traitements dits de référence. Dans le cadre d'une infection articulaire, le $PLA_{50}GS$ nous a permis de réduire très significativement la charge bactérienne intra-articulaire (baisse de 3 à 4 $\log_{10}$ soit 1000 à 10000 fois moins de bactéries). Le $PLA_{50}GS$ nous a permis de réduire l'infection de 3 $\log_{10}$ par rapport aux autres groupes avec 2 lapins sur 6 guéris de leur infection articulaire (34% de guérison).

Le $PLA_{50}GS$ présente ainsi les caractéristiques suivantes : (i) stabilité de la Gentamicine au sein du polymère, (ii) polymère sous forme de poudre stable, (iii) relargage prolongé de la Gentamicine pendant plusieurs semaines, (iv) effet « burst » présent mais limité, (v) très bonne biotolérance, et (vi) efficacité supérieure aux traitements antimicrobiens classiques.

2 Discussion sur les modèles animaux

2.1 Modèle d'infection osseuse expérimentale

En 1884, Rodet obtenait une infection osseuse en associant une injection de bactérie et une scarification de l'os chez le lapin (102). Depuis cette période, les modèles expérimentaux d'infection osseuse ont bien évolué. Le modèle le plus utilisé actuellement est le modèle lapin.

BY-NC-ND

Modèles « lapin » dit de Norden (103)

Ce modèle utilisait l'injection intramédullaire d'un agent sclérosant (morrhuate de sodium) suivie d'une injection intramédullaire de *Staphylococcus aureus* puis de sérum salé. D'autres modèles n'utilisent pas d'agent sclérosant mais la mise en place d'un corps étranger associée, ou non, à une fracture aboutissant à un modèle d'ostéomyélite chronique, alors que le modèle de Norden aboutissait plutôt à un modèle d'ostéomyélite aiguë. Ce modèle a été ensuite simplifié et a permis d'obtenir un modèle d'ostéomyélite chronique par la simple injection de *S. aureus* chez le lapin (104).

Le modèle lapin reste techniquement complexe et présente des limites (sensibilité du lapin à l'infection et aux effets secondaires des antibiotiques).

Modèle « souris » dit de Zak (105),

Utilisé par Rissing, ce modèle se rapproche de l'OM chronique. Ce modèle a pour avantage d'être plus adapté aux traitements systémiques que le lapin et permet ainsi une comparaison des traitements systémiques et locaux. Ce modèle associe un agent sclérosant à une injection de bactéries.

Modèle « rat » décrit par Spagnolo en 1993 (74).

Ce modèle utilise une colle biologique dérivée du collagène comme agent sclérosant. Afin d'affirmer l'infection osseuse cinq critères sont observés : clinique, radiologique, macroscopique, histologique et bactériologique. Cet auteur obtenait 90% d'infections sur l'analyse anatomopathologiques et 86% de comptes bactériens positifs.

Modèle « canin » décrit de Deysine (106) qui se rapproche de l'ostéomyélite hématogène et modèle de Fitzgerald (107) ostéomyélite focalisée de contiguïté sur corps étranger. Le modèle chien, par sa taille, permet l'étude de techniques chirurgicales particulières. L'animal est peu sensible aux effets toxiques des antibiotiques. La recherche en antibiothérapie locale est possible. Le modèle Fitzgerald, qui est facile à reproduire, est le plus proche de la réalité clinique. Son coût est un désavantage évident.

BY-NC-ND

Ainsi les espèces animales les plus utilisées comme modèle d'infection osseuse sont le lapin, le rat et finalement le chien (108). Selon Zayane, le modèle expérimental optimal d'infection osseuse est le suivant (9):

- lapin
- infection localisée au niveau du tibia
- injection d'un inoculum allant de 4 à 7 Log_{10} UFC
- intervalle inoculation-traitement allant 2 à 4 semaines

Cependant le lapin est un animal très sensible à l'infection avec un taux de mortalité majeur. Nous avons préféré, dans un premier temps et afin de valider l'efficacité de notre polymère aux antibiotiques, utiliser un animal de plus petite taille, moins coûteux et plus résistant à l'infection.

2.2 Modèle d'infection articulaire expérimentale

La revue de la littérature montre 18 études principales portant sur le développement d'un modèle animal d'arthrite septique. Nous avons retrouvé 2 études portant sur une arthrite septique chez le rat (80, 81), 3 études chez la souris (82-84) et 13 études chez le lapin (48, 85-96).

Ainsi la plupart des études récentes portant sur la mise en place d'un modèle animal d'arthrite septique utilisent le lapin. Le lapin présente comme avantage d'avoir une articulation de taille raisonnable permettant un abord chirurgical aisé. Son volume articulaire est évalué à 5 cc (97).

Il est à noter que ces modèles animaux d'arthrite septique sont inhomogènes en ce qui concerne la quantité de bactéries injectées. Cette quantité va de 10^2 CFU (98) à 10^8 CFU (95) soit 6 unités de log_{10}, ce qui montre la grande disparité des doses injectées.

Notre travail nous a permis de valider ce modèle d'infection articulaire et de prouver l'efficacité de notre polymère aux antibiotiques pour le traitement de cette infection. Cependant l'utilisation d'un polymère sous forme de poudre dans une cavité articulaire semble difficilement applicable en pratique courante. Ce travail nous a donc montré l'importance de développer une présentation galénique du polymère sous la forme d'un gel.

BY-NC-ND

2.3 Un autre modèle animal est-il nécessaire pour étudier l'efficacité du polymère

Pour un chirurgien orthopédiste, l'intérêt principal de ces vecteurs d'antibiotiques locaux est de permettre un traitement plus facile et si possible définitif. Il est donc nécessaire de vérifier l'efficacité de ce polymère sur un modèle animal d'ostéomyélite sur matériel. Ceci correspond à la prochaine étape de notre travail en utilisant le modèle décrit par Laty en 2006 (44). Ce modèle utilise le tibia d'un lapin avec la mise en place centro-médullaire d'une broche entourée d'un cathèter contenant une suspension bactérienne de *Staphylococcus aureus.* Ce modèle a pour avantage de permettre une infection locale suffisamment importante mimant une ostéomyélite sans aboutir au décès prématuré du lapin(44).

3 Discussion sur les autres modes de relargage existants

Notre association polymère-antibiotique semble être supérieure aux traitements de conception comparable. Ainsi, Stallman montre un relargage sur moins de 10 heures pour des associations ciments biodégradables-Gentamicine (109). Selon cet auteur, une libération locale d'antibiotique doit se faire sur une durée courte. Après cette période, la libération d'antibiotique doit cesser complétement afin d'éviter des concentrations de Gentamicine sub-inhibitrices pouvant faire émerger des bactéries résistantes. Il décrit également l'intérêt d'un « burst » initial modéré afin d'éradiquer les bactéries contaminantes du site opératoire (109). Notre polymère semble donc répondre à ces exigences. Pour Nandi (110), les polymères à l'acide lactique permettent une libération prolongée de l'antibiotique. Les capacités de relargage de l'antibiotique par ces polymères semblent, pour cet auteur, supérieures à tous les autres systèmes biodégradables. En effet, grâce aux polymères et à ces copolymères, il est possible d'obtenir un relargage contrôlé pouvant aller de quelques jours à près d'un an en fonction de ces caractéristiques chimiques. Nandi fait, dans sa revue de la littérature, une comparaison des caractéristiques de relargage *in vivo* et *in vitro* des différents systèmes biodégradables à libération de Gentamicine. Nous rapportons dans le Tableau 24 et le Tableau 25 les cinétiques de relargage de la Gentamicine *in vitro* et *in vivo* en comparaison de notre PLA.

BY-NC-ND

Systèmes	Antibiotique	Durée du relargage (Jours)	Pic de libération	Jours d'apparition du pic (jours)	Étude
PLA	Gentamicine	14	> 5000 µg/ml	1	Cook *et al* (111)
PLGA	Gentamicine	14	> 2000 µg/ml	1	
HA	Gentamicine	90	7,5 x 10^2 µg/ml	6	Shinto *et al* (112)
DCPD-β-TCP	Gentamicine	42	795 µg/ml	1	Zayane (9)
Eponge de collagéne	Gentamicine	4	613 mg/L	1	Wachol-Drewek *et al* (113)
PLA	Gentamicine	63	10 µg/ml	1	Notre étude

Tableau 24: Comparaison *in vitro* des doses locales d'antibiotiques obtenues en fonction des différents systèmes de relargage de la Gentamicine selon Nandi (110)

BY-NC-ND

Systèmes	Antibiotique	Modèle animal	Durée du relargage (Jours)	Jours du pic de libération	Concentration du sérum en antibiotique au moment du pic (mg/L)	Étude
PLGA	Gentamicine	Chien	42	NA	2,38	Garvin *et al* (114)
HA	Gentamicine	Rat	90	8	4,6	Korkusuz *et al* (115)
HA	Gentamicine	Rat	90	8	NA	Shinto *et al* (116)
Eponge de collagéne	Gentamicine	Lapin	56	7	NA	Stemberger *et al* (117)
PLA	Gentamicine	Rat	30	3	5,1	Notre étude

Tableau 25: Comparaison *in vivo* des doses locales d'antibiotiques obtenu en fonction des différents systèmes de relargage de la Gentamicine selon Nandi (110)

Inzana, dans une revue de la littérature de 2016, rapporte les éléments suivants (42). Les polymères naturels (collagène, fibrine, chitosane) permettent un relargage de l'antibiotique marqué par un effet « burst » majeur par effet de diffusion. *In vitro*, 90% de l'antibiotique sont relargués pendant les premiers jours avec une libération complète de l'antibiotique sur 4 jours. L'intérêt de ces polymères est plutôt dans un rôle prophylactique que dans un rôle de traitement d'une infection ostéo-articulaire. Les polymères synthétiques (PLA, PLGA, PCL-poly caprolactone) sont de plus en plus utilisés car ils permettent, en fonction de leurs caractéristiques biochimiques, de contrôler leur cinétique de relargage et leur durée de dégradation. Leur dégradation se fait par hydrolyse pouvant aller de quelques semaines à quelques mois. Inzana insiste sur le rôle du pH dans la dégradation de ces polymères, un pH acide pouvant accélérer la dégradation de ces polymères et diminuer leur efficacité. Les céramiques utilisées pour la libération d'antibiotique sont sous forme de ciments. La libération de l'antibiotique se fait par diffusion et ne dépend que très peu de la dégradation de ces céramiques. L'antibiotique, grâce à ces biomatériaux, peut être libéré entre quelques jours et quelques semaines en fonction de leur formulation. Cependant la cinétique de relargage de l'antibiotique par ces céramiques reste difficilement contrôlable.

BY-NC-ND

Systèmes	Antibiotique	Groupe contrôle	Résultats	Étude
PLGA (50 : 50)	Gentamicine	**PLGA** PMMA Gemtamicine systémique	Culture (-) à 4 semaines: **100% PLGA** 89% PMMA 63% systémique	Garvin (114)
PLGA	Gentamicine	**PLGA** Placebo Gentamicine systémique Non traité	Culture (-) à 4 semaines: **73% PLGA** 36% PBO 31% systémique 25% non traité	Nelson (118)
Copolymère de polyanhydride	Gentamicine	Polyanhydride PMMA Placebo Non traité	Réduction significative des CFU par le polymère à 3 semaines	Laurencin (119)
HA	Gentamicine	**HA** PMMA Gentamicine systémique Non traité	Culture (-) à 7 semaines: **100%** 100%	Solberg (120)
HA	Gentamicine	**HA** Placebo Gentamicine systémique Non traité	Culture (-) à 3 semaines : **100%** 0%	Joosten (121)
HA	Gentamicine	**HA** Placebo Non traité	Culture (-) à 5 semaines : **73%** 0% 0%	Cornell (122)

Tableau 26: Traitement *in vitro* d'une ostéomyélite par différents biomatériaux libérant de la Gentamicine selon Inzana (42).

Dans sa revue de la littérature, Inzana ne conclut pas sur la supériorité de l'efficacité des biomatériaux résorbables par rapport à l'usage des PMMA dans le cadre du traitement d'une ostéomyélite chez l'animal. Cependant plusieurs désavantages des PMMA sont soulignés par cet auteur :

BY-NC-ND

- tous les antibiotiques ne peuvent être utilisés avec le PMMA et notamment la Rifampicine qui n'est pas thermiquement stable.
- la nécessité de retirer par une chirurgie secondaire le PMMA
- le risque de colonisation du PMMA par le biofilm pouvant provoquer une récidive de l'infection

Cet auteur insiste sur l'intérêt des biomatériaux composites permettant d'associer les caractéristiques d'ostéoconduction des céramiques et de libération prolongée des antibiotiques par les polymères. Nos travaux à venir devront s'orienter vers le traitement d'une ostéomyélite chronique chez le lapin afin de pouvoir se comparer avec les autres biomatériaux. Il nous paraît cependant indispensable d'associer notre polymère à une céramique phospohocalcique afin d'allier les caractéristiques de relargage du polymère et les caractéristiques d'ostéoconduction des céramiques.

4 Perspectives offertes par la libération locale d'autres molécules en orthopédie

4.1 Polymères et autres antibiotiques

Il paraît important de multiplier les associations polymère-antibiotique afin de permettre au traitement local de s'adapter au mieux au germe responsable de l'infection ostéo-articulaire.

Ainsi, nous étudions actuellement une association polymère-Rifampicine. En effet, cet antibiotique est une molécule incontournable pour le traitement des infections ostéo-articulaires à Staphylocoques Oxacilline sensibles.

Nous travaillons également à une association polymère-acide fusidique afin de permettre un traitement local en cas d'infection à Staphylocoques multirésistants.

Mais notre recherche ne doit pas s'arrêter au traitement du Staphylocoque et doit permettre de trouver une réponse par une antibiothérapie locale à tous les germes pouvant être responsables d'une infection ostéo-articulaire.

BY-NC-ND

4.2 Polymères et facteurs de croissance

Perte de substance nerveuse : Nous avons récemment validé l'utilisation de l'EPO comme facteur de croissance nerveuse chez le rat. Nous voudrions maintenant créer un guide nerveux résorbable contenant une association polymère-EPO sous forme de gel afin de donner une réponse rapide et efficace dans la prise en charge des pertes de substance nerveuse périphérique.

Perte de substance osseuse et pseudarthrose : les pertes de substance osseuse sont un autre défi en orthopédie nécessitant souvent des prises en charge chirurgicales itératives et délabrantes pour le patient. Les Bone morphogenic protein (BNP) ont montré leurs capacités d'induction osseuse. Mais deux types de support sont nécessaires pour la reconstruction osseuse en cas d'utilisation de BMP (une matrice pour la BMP et un support pour le futur os néoformé). Selon Obert, ces deux types de support peuvent ne faire qu'un (123). Les polymères synthétiques résorbables semblent pouvoir être un support matriciel stimulant idéal pour cette application(123).

BY-NC-ND

Conclusion

Notre travail avait pour objectif de développer un vecteur d'antibiotique permettant de traiter une infection ostéo-articulaire tout en limitant les chirurgies itératives. Ainsi ce vecteur devait permettre un relargage contrôlé de l'antibiotique pour que les doses libérées soient supérieures aux CMI des germes responsables de l'infection ostéo-articulaire, et ce sur une période donnée pour limiter le risque de développement de bactéries résistantes. De plus, ce vecteur devait être complètement biorésorbable. Pour répondre à ces objectifs, nous avons utilisé le PLA_{50}PGS20%. Ce polymère correspond à un Poly(D,L-acide lactique) de haut poids moléculaire contenant 20% de Gentamicine. Utilisé *in vivo* sous la forme d'une poudre, ce polymère permet de libérer la Gentamicine à des doses supérieures à la CMI du germe responsable de l'infection ostéo-articualire sur une période de plus de 14 jours. Dans le cadre de nos expériences, nous avons pu ainsi éradiquer une infection périostée chez le rat et réduire très significativement la charge bactérienne en cas d'infection articulaire chez le lapin, sans toutefois aboutir à une guérison systématique de l'infection articulaire.

La principale limite de ce polyère tient à sa forme galénique actuelle. En effet, son utilisation sous forme de poudre limite très certainement son efficacité et sa capacité de propagation sur toutes les zones à traiter. Nous travaillons donc à présent à l'élaboration de ce polymère sous la forme d'un gel rendant son utilisation plus simple en pratique clinique.

Toujours dans un objectif d'application clinique rapide, nous travaillons à l'élaboration d'autres associations polymère-antibiotique afin de pouvoir donner une possibilité de traitement quel que soit le germe responsable de l'infection ostéo-articulaire.

Il reste cependant que ce polymère ne présente pas de capacités d'ostéconduction, contrairement aux céramiques phospo-calciques. Ainsi dans le cadre du traitement d'une infection osseuse qui nécessite souvent une excision osseuse carcinologique des tissus infectés, il serait intéressant d'associer les caractéristiques d'ostéoconduction de ces céramiques et les propriétés de contrôle du relargage de notre polymère à l'acide lactique.

BY-NC-ND

L'utilisation de ce polymère ne doit cependant pas s'arrêter au traitement des infections ostéo-articulaires. Nos futurs travaux vont s'employer à créer des associations polymère-facteurs de croissance afin de traiter les pertes de substances osseuses et les pertes de substances nerveuses.

BY-NC-ND

Bibliographie

1. Smith JW, Piercy EA. Infectious arthritis. Clin Infect Dis. 1995;20(2):225-30; quiz 31.
2. Vincent GM, Amirault JD. Septic arthritis in the elderly. Clin Orthop Relat Res. 1990(251):241-5.
3. Esterhai JL, Jr., Gelb I. Adult septic arthritis. Orthop Clin North Am. 1991;22(3):503-14.
4. Lane JG, Falahee MH, Wojtys EM, Hankin FM, Kaufer H. Pyarthrosis of the knee. Treatment considerations. Clin Orthop Relat Res. 1990(252):198-204.
5. Bussiere F, Beaufils P. [Role of arthroscopy in the treatment of pyogenic arthritis of the knee in adults. Report of 16 cases]. Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot. 1999;85(8):803-10.
6. Chaudhary S, Sen RK, Saini UC, Soni A, Gahlot N, Singh D. Use of gentamicin-loaded collagen sponge in internal fixation of open fractures. Chin J Traumatol. 2011;14(4):209-14.
7. Lewis CS, Supronowicz PR, Zhukauskas RM, Gill E, Cobb RR. Local antibiotic delivery with demineralized bone matrix. Cell Tissue Bank. 2011.
8. Soundrapandian C, Basu D, Sa B, Datta S. Local drug delivery system for the treatment of osteomyelitis: In vitro evaluation. Drug Dev Ind Pharm. 2011;37(5):538-46.
9. Zayane S. Evaluation des granules de phosphate dicalcique di-hydraté-phosphate tricalcique B-gentamicine dans le traitement local de l'ostéite expérimentale à Staphylococcus aureus: Tours; 2010.
10. Coudane H, Gérard A, George T, Claudot F, Gervaise A. Ostéites. In: Masson E, editor. EMC-Appareil locomoteur2011. p. 1-14.
11. Martini M, Daoud A, Saighi-Bouaouina A, Ziani F, Burny F, Donkerwolcke M. [Surgical treatment of chronic hematogenous osteomyelitis. A series of 42 cases]. Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot. 1994;80(7):642-50.
12. Papineau LJ. [Excision-graft with deliberately delayed closing in chronic osteomyelitis]. La Nouvelle presse medicale. 1973;2(41):2753-5.

BY-NC-ND

13. Kaandorp CJ, Van Schaardenburg D, Krijnen P, Habbema JD, van de Laar MA. Risk factors for septic arthritis in patients with joint disease. A prospective study. Arthritis Rheum. 1995;38(12):1819-25.
14. Zieger MM, Dorr U, Schulz RD. Ultrasonography of hip joint effusions. Skeletal radiology. 1987;16(8):607-11.
15. Graif M, Schweitzer ME, Deely D, Matteucci T. The septic versus nonseptic inflamed joint: MRI characteristics. Skeletal radiology. 1999;28(11):616-20.
16. Desenclos JC, Group RW. RAISIN - a national programme for early warning, investigation and surveillance of healthcare-associated infection in France. Euro Surveill. 2009;14(46).
17. Mabit C, Marcheix PS, Mounier M, Dijoux P, Pestourie N, Bonnevialle P, et al. Impact of a surgical site infection (SSI) surveillance program in orthopedics and traumatology. Orthop Traumatol Surg Res. 2012;98(6):690-5.
18. Astagneau P, L'Heriteau F, Daniel F, Parneix P, Venier AG, Malavaud S, et al. Reducing surgical site infection incidence through a network: results from the French ISO-RAISIN surveillance system. J Hosp Infect. 2009;72(2):127-34.
19. Blanc P. Evaluation multicentrique rétrospective des performances de la scintigraphie au leucocytes marqués dans les infections de prothèses articulaires. . unilim: Université de Limoges 2014.
20. Stallmann HP, Faber C, Bronckers AL, Nieuw Amerongen AV, Wuisman PI. In vitro gentamicin release from commercially available calcium-phosphate bone substitutes influence of carrier type on duration of the release profile. BMC Musculoskelet Disord. 2006;7:18.
21. Gristina AG. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. Science. 1987;237(4822):1588-95.
22. Breusch SJ, Kuhn KD. [Bone cements based on polymethylmethacrylate]. Orthopade. 2003;32(1):41-50.
23. Wang F, Ni B, Zhu Z, Liu F, Zhu YZ, Liu J. Intra-discal vancomycin-loaded PLGA microsphere injection for MRSA discitis: an experimental study. Arch Orthop Trauma Surg. 2011;131(1):111-9.
24. Kao WF, Kuo CC, Hsu TF, Chang H, Sung YY, Yen DH, et al. Acute mountain sickness in Jade Mountain climbers of Taiwan. Aviat Space Environ Med. 2002;73(4):359-62.

BY-NC-ND

25. Elson RA, Jephcott AE, McGechie DB, Verettas D. Antibiotic-loaded acrylic cement. J Bone Joint Surg Br. 1977;59(2):200-5.
26. Klemm K. [Gentamicin-PMMA-beads in treating bone and soft tissue infections (author's transl)]. Zentralbl Chir. 1979;104(14):934-42.
27. Wahlig H, Dingeldein E. Antibiotics and bone cements. Experimental and clinical long-term observations. Acta Orthop Scand. 1980;51(1):49-56.
28. Klemm KW. Gentamicin-PMMA chains (Septopal chains) for the local antibiotic treatment of chronic osteomyelitis. Reconstr Surg Traumatol. 1988;20:11-35.
29. Henry SL, Galloway KP. Local antibacterial therapy for the management of orthopaedic infections. Pharmacokinetic considerations. Clin Pharmacokinet. 1995;29(1):36-45.
30. Walenkamp GH, Kleijn LL, de Leeuw M. Osteomyelitis treated with gentamicin-PMMA beads: 100 patients followed for 1-12 years. Acta Orthop Scand. 1998;69(5):518-22.
31. Mohanty SP, Kumar MN, Murthy NS. Use of antibiotic-loaded polymethyl methacrylate beads in the management of musculoskeletal sepsis--a retrospective study. J Orthop Surg (Hong Kong). 2003;11(1):73-9.
32. Espehaug B, Engesaeter LB, Vollset SE, Havelin LI, Langeland N. Antibiotic prophylaxis in total hip arthroplasty. Review of 10,905 primary cemented total hip replacements reported to the Norwegian arthroplasty register, 1987 to 1995. J Bone Joint Surg Br. 1997;79(4):590-5.
33. Engesaeter LB, Lie SA, Espehaug B, Furnes O, Vollset SE, Havelin LI. Antibiotic prophylaxis in total hip arthroplasty: effects of antibiotic prophylaxis systemically and in bone cement on the revision rate of 22,170 primary hip replacements followed 0-14 years in the Norwegian Arthroplasty Register. Acta Orthop Scand. 2003;74(6):644-51.
34. Petty W, Spanier S, Shuster JJ. Prevention of infection after total joint replacement. Experiments with a canine model. J Bone Joint Surg Am. 1988;70(4):536-9.
35. Kuehn KD, Ege W, Gopp U. Acrylic bone cements: mechanical and physical properties. Orthop Clin North Am. 2005;36(1):29-39, v-vi.
36. Hoff SF, Fitzgerald RH, Jr., Kelly PJ. The depot administration of penicillin G and gentamicin in acrylic bone cement. J Bone Joint Surg Am. 1981;63(5):798-804.

BY-NC-ND

37. van de Belt H, Neut D, Schenk W, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ. Gentamicin release from polymethylmethacrylate bone cements and Staphylococcus aureus biofilm formation. Acta Orthop Scand. 2000;71(6):625-9.
38. Penner MJ, Masri BA, Duncan CP. Elution characteristics of vancomycin and tobramycin combined in acrylic bone-cement. J Arthroplasty. 1996;11(8):939-44.
39. Neut D, van de Belt H, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ. The effect of mixing on gentamicin release from polymethylmethacrylate bone cements. Acta Orthop Scand. 2003;74(6):670-6.
40. Baker S, Brooks SC, Walker DM. The release of residual monomeric methyl methacrylate from acrylic appliances in the human mouth: an assay for monomer in saliva. Journal of dental research. 1988;67(10):1295-9.
41. Masri BA, Duncan CP, Beauchamp CP, Paris NJ, Arntorp J. Effect of varying surface patterns on antibiotic elution from antibiotic-loaded bone cement. J Arthroplasty. 1995;10(4):453-9.
42. Inzana JA, Schwarz EM, Kates SL, Awad HA. Biomaterials approaches to treating implant-associated osteomyelitis. Biomaterials. 2016;81:58-71.
43. van de Belt H, Neut D, Schenk W, van Horn JR, van Der Mei HC, Busscher HJ. Staphylococcus aureus biofilm formation on different gentamicin-loaded polymethylmethacrylate bone cements. Biomaterials. 2001;22(12):1607-11.
44. Laty M-K. Evaluation in vitro et in vivo de l'activité bactéricide de la vancomycine incorporée dans des microparticules de poly-ε-caprolactone 2006.
45. Feriz H. Experiments with tampons and membranes made of collagen. Surgery. 1940;8(4):654-61.
46. Mader JT, Stevens CM, Stevens JH, Ruble R, Lathrop JT, Calhoun JH. Treatment of experimental osteomyelitis with a fibrin sealant antibiotic implant. Clin Orthop Relat Res. 2002(403):58-72.
47. Mendel V, Simanowski HJ, Scholz HC, Heymann H. Therapy with gentamicin-PMMA beads, gentamicin-collagen sponge, and cefazolin for experimental osteomyelitis due to Staphylococcus aureus in rats. Arch Orthop Trauma Surg. 2005;125(6):363-8.
48. Alt V, Bitschnau A, Osterling J, Sewing A, Meyer C, Kraus R, et al. The effects of combined gentamicin-hydroxyapatite coating for cementless joint prostheses on

BY-NC-ND

the reduction of infection rates in a rabbit infection prophylaxis model. Biomaterials. 2006;27(26):4627-34.

49. Radin S, Ducheyne P, Rothman B, Conti A. The effect of in vitro modeling conditions on the surface reactions of bioactive glass. J Biomed Mater Res. 1997;37(3):363-75.
50. Hasegawa M, Sudo A, Komlev VS, Barinov SM, Uchida A. High release of antibiotic from a novel hydroxyapatite with bimodal pore size distribution. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2004;70(2):332-9.
51. Itokazu M, Matsunaga T, Kumazawa S, Yang W. A novel drug delivery system for osteomyelitis using porous hydroxyapatite blocks loaded by centrifugation. Journal of applied biomaterials : an official journal of the Society for Biomaterials. 1995;6(3):167-9.
52. Brouard S, Lelan J, Lancien G, Bonnaure M, Cormier M, Langlais F. [Tricalcium phosphate, vector of antibiotics: gentamycin and vancomycin. In vitro physicochemical characterization, study of biomaterial porosity and gentamycin and vancomycin elution]. Chirurgie. 1997;122(7):397-403.
53. Thomazeau H, Langlais F. [Antibiotic release by tricalcic phosphate bone implantation. In vitro and in vivo pharmacokinetics of different galenic forms]. Chirurgie. 1997;121(9-10):663-6.
54. Silverman LD, Lukashova L, Herman OT, Lane JM, Boskey AL. Release of gentamicin from a tricalcium phosphate bone implant. J Orthop Res. 2007;25(1):23-9.
55. Itokazu M, Aoki T, Nonomura H, Nishimoto Y, Itoh Y. Antibiotic-loaded porous hydroxyapatite blocks for the treatment of osteomyelitis and postoperative infection. A preliminary report. Bulletin. 1998;57(3):125-9.
56. Yamashita Y, Uchida A, Yamakawa T, Shinto Y, Araki N, Kato K. Treatment of chronic osteomyelitis using calcium hydroxyapatite ceramic implants impregnated with antibiotic. Int Orthop. 1998;22(4):247-51.
57. Ambrose CG, Clyburn TA, Louden K, Joseph J, Wright J, Gulati P, et al. Effective treatment of osteomyelitis with biodegradable microspheres in a rabbit model. Clin Orthop Relat Res. 2004(421):293-9.
58. Ambrose CG, Gogola GR, Clyburn TA, Raymond AK, Peng AS, Mikos AG. Antibiotic microspheres: preliminary testing for potential treatment of osteomyelitis. Clin Orthop Relat Res. 2003(415):279-85.

BY-NC-ND

59. Kanellakopoulou K, Giamarellos-Bourboulis EJ. Carrier systems for the local delivery of antibiotics in bone infections. Drugs. 2000;59(6):1223-32.
60. Naraharisetti PK, Guan Lee HC, Fu YC, Lee DJ, Wang CH. In vitro and in vivo release of gentamicin from biodegradable discs. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2006;77(2):329-37.
61. Benoit MA, Mousset B, Delloye C, Bouillet R, Gillard J. Antibiotic-loaded plaster of Paris implants coated with poly lactide-co-glycolide as a controlled release delivery system for the treatment of bone infections. Int Orthop. 1997;21(6):403-8.
62. Baro M, Sanchez E, Delgado A, Perera A, Evora C. In vitro-in vivo characterization of gentamicin bone implants. J Control Release. 2002;83(3):353-64.
63. Calhoun JH, Mader JT. Treatment of osteomyelitis with a biodegradable antibiotic implant. Clin Orthop Relat Res. 1997(341):206-14.
64. Korkusuz F, Korkusuz P, Eksioglu F, Gursel I, Hasirci V. In vivo response to biodegradable controlled antibiotic release systems. J Biomed Mater Res. 2001;55(2):217-28.
65. Kanellakopoulou K, Galanakis N, Giamarellos-Bourboulis EJ, Rifiotis C, Papakostas K, Andreopoulos A, et al. Treatment of experimental osteomyelitis caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus with a biodegradable system of lactic acid polymer releasing pefloxacin. J Antimicrob Chemother. 2000;46(2):311-4.
66. Santavirta S, Konttinen YT, Saito T, Gronblad M, Partio E, Kemppinen P, et al. Immune response to polyglycolic acid implants. J Bone Joint Surg Br. 1990;72(4):597-600.
67. Bostman OM. Osteolytic changes accompanying degradation of absorbable fracture fixation implants. J Bone Joint Surg Br. 1991;73(4):679-82.
68. Bostman OM, Pihlajamaki HK. Late foreign-body reaction to an intraosseous bioabsorbable polylactic acid screw. A case report. J Bone Joint Surg Am. 1998;80(12):1791-4.
69. Mauduit J. Nouveaux systèmes antibiotiques à libération contrôlée à base de gentamycine et de polymères biorésorbables: Rouen; 1991.
70. Mauduit J, Bukh N, Vert M. Gentamycin/poly (lactic acid) blends aimed at sustained release local antibiotic therapy administered per-operatively. I. The case of gentamycin base and gentamycin sulfate in poly (dl-lactic acid) oligomers. Journal of controlled release. 1993;23(3):209-20.

BY-NC-ND

71. Rodet A. Physiologie pathologique, étude expériementale sur l'ostéomyélite infectieuse. . C R Arcad Sci. 1885;99:569-71.
72. Norden CW. Experimental osteomyelitis. I. A description of the model. J Infect Dis. 1970;122(5):410-8.
73. Tardif M, Bergeron Y, Beauchamp D, Bergeron MG. Increased renal uptake of gentamicin in endotoxemic rats receiving concomitant thromboxane A2 antagonist therapy. Antimicrob Agents Chemother. 1993;37(12):2727-32.
74. Spagnolo N, Greco F, Rossi A, Ciolli L, Teti A, Posteraro P. Chronic staphylococcal osteomyelitis: a new experimental rat model. Infect Immun. 1993;61(12):5225-30.
75. Rissing JP, Buxton TB, Weinstein RS, Shockley RK. Model of experimental chronic osteomyelitis in rats. Infect Immun. 1985;47(3):581-6.
76. Mendel V, Simanowski HJ, Scholz HC, Heymann H. Therapy with gentamicin-PMMA beads, gentamicin-collagen sponge, and cefazolin for experimental osteomyelitis due to Staphylococcus aureus in rats. Arch Orthop Trauma Surg. 2005;125(6):363-8.
77. Lucke M, Schmidmaier G, Sadoni S, Wildemann B, Schiller R, Haas NP, et al. Gentamicin coating of metallic implants reduces implant-related osteomyelitis in rats. Bone. 2003;32(5):521-31.
78. Chacko TK, Zhuang H, Nakhoda KZ, Moussavian B, Alavi A. Applications of fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the diagnosis of infection. Nucl Med Commun. 2003;24(6):615-24.
79. Guhlmann A, Brecht-Krauss D, Suger G, Glatting G, Kotzerke J, Kinzl L, et al. Fluorine-18-FDG PET and technetium-99m antigranulocyte antibody scintigraphy in chronic osteomyelitis. J Nucl Med. 1998;39(12):2145-52.
80. Inman RD, Chiu B. Heavy metal exposure reverses genetic resistance to Chlamydia-induced arthritis. Arthritis Res Ther. 2009;11(1):R19.
81. Kabak S, Halici M, Yakan B, Kutlubay R, Kula M. [Comparison of the effects of NG-monomethyl-L-arginine and indomethacin on tuberculous arthritis: an experimental study in rats]. Acta Orthop Traumatol Turc. 2002;36(2):155-61.
82. Tanaka M, Kinoshita M, Yoshihara Y, Shinomiya N, Seki S, Nemoto K, et al. Photodynamic therapy using intra-articular Photofrin for murine MRSA arthritis: biphasic light dose response for neutrophil-mediated antibacterial effect. Lasers Surg Med. 2011;43(3):221-9.

BY-NC-ND

83. Guo Y, Li J, Hagstrom E, Ny T. Protective effects of plasmin(ogen) in a mouse model of Staphylococcus aureus-induced arthritis. Arthritis Rheum. 2008;58(3):764-72.
84. Lubberts E, Joosten LA, Helsen MM, van den Berg WB. Regulatory role of interleukin 10 in joint inflammation and cartilage destruction in murine streptococcal cell wall (SCW) arthritis. More therapeutic benefit with IL-4/IL-10 combination therapy than with IL-10 treatment alone. Cytokine. 1998;10(5):361-9.
85. Schurman DJ, Mirra J, Ding A, Nagel DA. Experimental E. coli arthritis in the rabbit. A model of infectious and post-infectious inflammatory synovitis. J Rheumatol. 1977;4(2):118-28.
86. Schurman DJ, Lightholder J, Mirra J, Burton DS, Nagel DA. Synovial joint infection: I Gram-negative septic arthritis in rabbit knee joints. Surg Forum. 1975;26:503-5.
87. Johnson AH, Campbell WG, Jr., Callahan BC. Infection of rabbit knee joints after intra-articular injection of Staphylococcus aureus. Comparison with joints injected with Staphylococcus albus. Am J Pathol. 1970;60(2):165-202.
88. Lefevre S, Ruimy D, Jehl F, Neuville A, Robert P, Sordet C, et al. Septic arthritis: monitoring with USPIO-enhanced macrophage MR imaging. Radiology. 2011;258(3):722-8.
89. Eren A, Ugutmen E, Ozkan K, Turhan Y, Eceviz E, Cilli F. Chondroprotective effect of salicylate and chloroquine in pyogenic septic arthritis. Adv Ther. 2008;25(2):133-42.
90. Smith RL, Kajiyama G, Schurman DJ. Staphylococcal septic arthritis: antibiotic and nonsteroidal anti-inflammatory drug treatment in a rabbit model. J Orthop Res. 1997;15(6):919-26.
91. Riegels-Nielsen P, Frimodt-Moller N, Sorensen M, Jensen JS. Synovectomy for septic arthritis. Early versus late synovectomy studied in the rabbit knee. Acta Orthop Scand. 1991;62(4):315-8.
92. Riegels-Nielson P, Frimodt-Moller N, Jensen JS. Rabbit model of septic arthritis. Acta Orthop Scand. 1987;58(1):14-9.
93. Sartoris DJ, Guerra J, Jr., Mattrey RF, Resnick D, Haghighi P, Mitten R, et al. Perfluoroctylbromide as a contrast agent for computed tomographic imaging of septic and aseptic arthritis. Invest Radiol. 1986;21(1):49-55.

BY-NC-ND

94. Salter RB, Bell RS, Keeley FW. The protective effect of continuous passive motion in living articular cartilage in acute septic arthritis: an experimental investigation in the rabbit. Clin Orthop Relat Res. 1981(159):223-47.
95. Grossi O, Caillon J, Arvieux C, Jacqueline C, Bugnon D, Potel G, et al. In vivo efficacy of moxifloxacin compared with cloxacillin and vancomycin in a Staphylococcus aureus rabbit arthritis experimental model. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51(9):3401-3.
96. Oner M, Kafadar I, Guney A, Halici M, Deniz K, Turk Y, et al. Effect of intraarticular propolis in an experimental septic arthritis model. J Pediatr Orthop B. 2011;20(1):8-13.
97. Matsuzaka S, Sato S, Miyauchi S. Estimation of joint fluid volume in the knee joint of rabbits by measuring the endogenous calcium concentration. Clin Exp Rheumatol. 2002;20(4):531-4.
98. Frimodt V. [There should be a relationship between purpose and philosophy]. Sygeplejersken. 1987;87(6):30-1.
99. Wysenbeek AJ, Volchek J, Amit M, Robinson D, Boldur I, Nevo Z. Treatment of staphylococcal septic arthritis in rabbits by systemic antibiotics and intra-articular corticosteroids. Ann Rheum Dis. 1998;57(11):687-90.
100. Frimodt-Moller N, Riegels-Nielsen P. Antibiotic penetration into the infected knee. A rabbit experiment. Acta Orthop Scand. 1987;58(3):256-9.
101. Vial J. Les principales maladies bactériennes du lapin: revue bibliographique de l'utilisation des molécules antibactériennes, importance de leur innocuité. [Doctorat vétérinaire]. France: Creteil; 2006.
102. Rodet A. Etude experimentale sur l'osteomyelite infectieuse. Compt rend Acad sci. 1884;99:569-71.
103. Deysine M, Rosario E, Isenberg H. Acute hematogenous osteomyelitis: an experimental model. Surgery. 1976;79(1):97.
104. Norden CW, Myerowitz RL, Keleti E. Experimental osteomyelitis due to Staphylococcus aureus or Pseudomonas aeruginosa: a radiographic-pathological correlative analysis. British journal of experimental pathology. 1980;61(4):451-60.
105. Zak O, Zak F, Rich R, Tosch W, Kradolfer F, Scheld W. Experimental staphylococcal osteomyelitis in rats: therapy with rifampin and cloxacillin alone or in

BY-NC-ND

combination. Current chemotherapy and immunotherapy American Society for Microbiology, Washington, DC. 1982:973-4.

106. Deysine M, Rosario E, Isenberg HD. Acute hematogenous osteomyelitis: an experimental model. Surgery. 1976;79(1):97-9.
107. Fitzgerald R. Experimental osteomyelitis: description of a canine model and the role of depot administration of antibiotics in the prevention and treatment of sepsis. J Bone Joint Surg Am. 1983;65(3):371-80.
108. An YH, Kang QK, Arciola CR. Animal models of osteomyelitis. Int J Artif Organs. 2006;29(4):407-20.
109. Stallmann HP, Faber C, Bronckers AL, Amerongen AVN, Wuisman PI. In vitro gentamicin release from commercially available calcium-phosphate bone substitutes influence of carrier type on duration of the release profile. BMC Musculoskelet Disord. 2006;7(1):1.
110. Nandi SK, Mukherjee P, Roy S, Kundu B, De DK, Basu D. Local antibiotic delivery systems for the treatment of osteomyelitis–A review. Materials Science and Engineering: C. 2009;29(8):2478-85.
111. Cook VL, Bertone AL, Kowalski JJ, Schwendeman SP, Ruggles AJ, Weisbrode SE. Biodegradable drug delivery systems for gentamicin release and treatment of synovial membrane infection. Vet Surg. 1999;28(4):233-41.
112. Shinto Y, Uchida A, Korkusuz F, Araki N, Ono K. Calcium hydroxyapatite ceramic used as a delivery system for antibiotics. J Bone Joint Surg Br. 1992;74(4):600-4.
113. Wachol-Drewek Z, Pfeiffer M, Scholl E. Comparative investigation of drug delivery of collagen implants saturated in antibiotic solutions and a sponge containing gentamicin. Biomaterials. 1996;17(17):1733-8.
114. Garvin KL, Miyano JA, Robinson D, Giger D, Novak J, Radio S. Polylactide/polyglycolide antibiotic implants in the treatment of osteomyelitis. A canine model. J Bone Joint Surg Am. 1994;76(10):1500-6.
115. Korkusuz F, Uchida A, Shinto Y, Araki N, Inoue K, Ono K. Experimental implant-related osteomyelitis treated by antibiotic-calcium hydroxyapatite ceramic composites. Bone & Joint Journal. 1993;75(1):111-4.
116. Shinto Y, Uchida A, Korkusuz F, Araki N, Ono K. Calcium hydroxyapatite ceramic used as a delivery system for antibiotics. Bone & Joint Journal. 1992;74(4):600-4.

BY-NC-ND

117. Stemberger A, Grimm H, Bader F, Rahn H, Ascherl R. Local treatment of bone and soft tissue infections with the collagen-gentamicin sponge. The European journal of surgery Supplement:= Acta chirurgica Supplement. 1997(578):17.
118. Nelson CL, Hickmon SG, Skinner RA. Treatment of experimental osteomyelitis by surgical debridement and the implantation of bioerodable, polyanhydride‐gentamicin beads. Journal of orthopaedic research. 1997;15(2):249-55.
119. Laurencin C, Gerhart T, Witschger P, Satcher R, Domb A, Rosenberg A, et al. Bioerodible polyanhydrides for antibiotic drug delivery: in vivo osteomyelitis treatment in a rat model system. Journal of orthopaedic research. 1993;11(2):256-62.
120. Solberg BD, Gutow AP, Baumgaertner MR. Efficacy of gentamycin-impregnated resorbable hydroxyapatite cement in treating osteomyelitis in a rat model. J Orthop Trauma. 1999;13(2):102-6.
121. Joosten U, Joist A, Frebel T, Brandt B, Diederichs S, Von Eiff C. Evaluation of an in situ setting injectable calcium phosphate as a new carrier material for gentamicin in the treatment of chronic osteomyelitis: studies in vitro and in vivo. Biomaterials. 2004;25(18):4287-95.
122. Cornell C, Tyndall D, Waller S, Lane J, Brause B. Treatment of experimental osteomyelitis with antibiotic‐impregnated bone graft substitute. Journal of orthopaedic research. 1993;11(5):619-26.
123. Obert L, Couesmes A, Lepage D, Pauchot J, Garbuio P, Tropet Y. Consolidation osseuse et pseudarthrose des os longs: l'apport des BMP. e-mémoires de l'Académie Nationale de Chirurgie. 2007;6(2):24-30.

BY-NC-ND

Table des illustrations

Liste des Figures

Figure 1: Influence de la taille des particules sur le taux de relargage (charge : 15% (69) 53
Figure 2: Influence de la taille des particules sur la vitesse de relargage (69) 54
Figure 3: Rôle du taux de charge dans la cinétique de relargage du polymère 55
Figure 4: Relargage *in vitro* de la Gentamicine en pourcentage et en fonction du temps 60
Figure 5: Dosage systémique de la Gentamicine (intrapéritonéale *vs* MedinGenta)..... 61
Figure 6: Comparaison des cinétiques de la gentamicine relarguée par $PLA_{50}GS$ et de la Gentamicine directement injectée en intramusculaire 61
Figure 7: Réalisation de l'imagerie TEP/TDM (imagerie hybride Biograph du constructeur Siemens) 66
Figure 8: Évolution entre J0 et J7 du nombre de globules blancs de la série 5 (les rats 34 et 39 étaient décédés avant le 7ème jour 69
Figure 9: Évolution entre J0 et J7 de la CRP de la série 5 (Les rats 34 et 39 étaient décédés avant le 7ème jour..... 69
Figure 10: Image TEP du rat 37. Fixation pathologique 70
Figure 11: Corrélation entre l'analyse bactériologique et l'imagerie TEP 70
Figure 12: Abcès juxta-osseuse de la patte arrière obtenue avec la souche bactérienne d'origine animale..... 72
Figure 13: Résultat moyen du poids des groupes témoins (A, B, D) et Gentamicine (C, E, F) 77
Figure 14: Résultats moyens de la mesure du diamètre de pattes des différents groupes 77
Figure 15: Résultats moyens du nombre de leucocytes des différents groupes..... 78
Figure 16: Résultats à J0 et J1 de la CRP des différents rats 79
Figure 17: Moyenne du nombre de bactéries pour 100 mg de tissu pour chaque groupe 80
Figure 18: Exemples de résultats TEP/TDM avec une fixation pathologique pour le rat B7 (gauche) et l'absence de fixation pour le rat F35 (droit) 82

BY-NC-ND

Figure 19: souche 132160 85
Figure 20: repiquage de la souche 86
Figure 21: inoculation de la souche dans le bouillon T 86
Figure 22: estimation de la charge bactérienne par turbimétrie 87
Figure 23: congélation des suspensions stocks 87
Figure 24: Comptage des colonies 88
Figure 25: Exemple de comptage des bactéries 88
Figure 26: expérience préliminaire d'injection du PLA 90
Figure 27: broyeur à boule 90
Figure 28: tamisage des polymères 91
Figure 29: Aspect de l'arthrite septique à 15 jours 92
Figure 30: rasage de la patte arrière droite 95
Figure 31: prise de la température rectale 95
Figure 32: ponction de la veine centrale de l'oreille 96
Figure 33: Résultats de la numération bactérienne en fonction des groupes 105
Figure 34: Groupe A, coloration GRAMx1000, présence de bactéries gram+ au sein d'une zone abcédée 106
Figure 35: Groupe A, coloration HESx100, abcès avec zone de nécrose, amas de polynucléaires sains et altérés 106
Figure 36: Groupe B, coloration GRAMx1000, présence de bactéries gram+ au sein d'une zone abcédée 107
Figure 37: Groupe B, coloration HESx100, abcès avec zone de nécrose et amas de polynucléaires sains et altérés 107
Figure 38: Groupe C, coloration GRAMx40, présence de bactéries gram+ au sein d'une zone abcédée 108
Figure 39: Groupe C, coloration HESx10, amas de polynucléaires sains et altérés 108
Figure 40: Groupe D, coloration HESx20 109
Figure 41: Groupe D, coloration HESx40 109
Figure 42: Groupe E, coloration HESx10 110
Figure 43: Groupe E, coloration HESx10 110

BY-NC-ND

Liste des Tableaux

Tableau 1: Diffusion osseuse des principaux antibiotiques 20
Tableau 2: Antibiothérapie dans le cadre des infections osseuses de l'adulte 21
Tableau 3: Bactéries rencontrées en cas d'infection articulaire 23
Tableau 4 : Principales bactéries dans les infections du site opératoire (19) 30
Tableau 5: Résultats des différentes séries d'expérimentation ayant permis la mise au point du modèle animal 68
Tableau 6: Corrélation des résultats anatomopathologiques avec la bactériologie et l'imagerie 72
Tableau 7: Répartition des groupes de l'expérimentation. Les groupes A, B, D sont dits témoins alors que les groupes C, E, F sont dits gentamicine. 73
Tableau 8: Critères étudiés pour l'ensemble des groupes en fonction du temps 74
Tableau 9: Résultats de l'étude de l'efficacité de $PLA_{50}GS$ dans le traitement d'une infection périostéee chez le rat (D= décès). 76
Tableau 10: Nombre de bactéries pour 100 mg de tissu dans chaque groupe 80
Tableau 11: Comparaison statistique des différents groupes entre eux (test de Mann Withney) 81
Tableau 12: Résultats de l'imagerie et comparaison avec les résultats bactériologiques 82
Tableau 13: Détermination de l'inoculum des suspensions bactériennes de *Staphylococcus aureus* léporidée injectées 88
Tableau 14: Mesure de l'impact de la décongélation sur l'inoculum 89
Tableau 15: Mise au point d'un modèle d'arthrite septique chez le lapin 92
Tableau 16: Critères étudiés pour l'ensemble des groupes en fonction du temps 96
Tableau 17: Répartition des groupes de l'expérimentation 96
Tableau 18: Résultats cliniques par lapin 99
Tableau 19: Résultats bactériologiques par lapin 100
Tableau 20: Résultats de la numération des globules blancs par lapin 101
Tableau 21: Donnés cliniques en fonction des groupes présentés sous la forme de moyenne (écart-type) 102
Tableau 22: Donnés bactériologiques à J15 en fonction des groupes présentés sous la forme de moyenne (écart-type) 104
Tableau 23: Analyse statistique des différents groupes entre eux 105

BY-NC-ND

Tableau 24: Comparaison *in vitro* des doses locales d'antibiotiques obtenues en fonction des différents systèmes de relargage de la Gentamicine selon Nandi (110) 122
Tableau 25: Comparaison *in vivo* des doses locales d'antibiotiques obtenu en fonction des différents systèmes de relargage de la Gentamicine selon Nandi (110) 123
Tableau 26: Traitement *in vitro* d'une ostéomyélite par différents biomatériaux libérant de la Gentamicine selon Inzana (42)..... 124

BY-NC-ND

<u>Article 1 :</u> Impact of a surgical site infection (SSI) surveillance program in orthopedics and traumatology. *Orthop Traumatol Surg Res* 2012; 98(6): 690-5. Mabit C, Marcheix PS, Mounier M, et al.

Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research (2012) 98, 690–695

Available online at SciVerse ScienceDirect www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France EM|consulte www.em-consulte.com/en

ORIGINAL ARTICLE

Impact of a surgical site infection (SSI) surveillance program in orthopedics and traumatology☆

C. Mabit[a,*], P.S. Marcheix[a], M. Mounier[b], P. Dijoux[a], N. Pestourie[b], P. Bonnevialle[c], F. Bonnomet[d], The French Society of Orthopaedic Surgery, Traumatology (SOFCOT)[1]

[a] *Department of Orthopaedic Surgery and Traumatology, Dupuytren Teaching Hospital Center, 42, avenue Martin-Luther-King, 87042 Limoges, France*
[b] *Hospital Hygiene Unit, Dupuytren Teaching Hospital Center, 42, avenue Martin-Luther-King, 87042 Limoges, France*
[c] *Toulouse Teaching Hospital Center Musculoskeletal Institute, Purpan Traumatology Unit, place Baylac, 31052 Toulouse cedex, France*
[d] *Department of Orthopaedic Surgery and Traumatology, Strasbourg University Hospital, Hautepierre Hospital, avenue Molière, 67098 Strasbourg cedex, France*

Accepted: 22 June 2012

KEYWORDS
Surgical site infection;
Infection control;
Nosocomial infections

Summary Surveillance of surgical site infections (SSI) is a priority. One of the fundamental principles for the surveillance of SSI is based on receiving effective field feedback (retro-information). The aim of this study was to report the results of a program of SSI surveillance and validate the hypothesis that there is a correlation between creating a SSI surveillance program and a reduction in SSI.

Materials and methods: The protocol was based on the weekly collection of surveillance data obtained directly from the different information systems in different departments. A delay of 3 months was established before extraction and analysis of data and information from the surgical teams. The NNIS index (National Nosocomial Infections Surveillance System) developed by the American surveillance system and the reduction of length of hospital stay index *Journées d'hospitalisation évitées* (JHE).

Results: Since the end of 2009, 7156 surgical procedures were evaluated (rate of inclusion 97.3%), and 84 SSI were registered with a significant decrease over time from 1.86% to 0.66%. A total of 418 days of hospitalization have been saved since the beginning of the surveillance system.

☆ This study was presented at the 86th SOFCOT meeting in Paris, November 2011.

* Corresponding author.
E-mail address: ch-mabit@unilim.fr (C. Mabit).
[1] SoFCOT, 56, rue Boissonade, 75014 Paris, France.

1877-0568/$ - see front matter © 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.
doi:10.1016/j.otsr.2012.08.001

BY-NC-ND

Discussion: Our surveillance system has three strong points: follow-up is continuous, specifically adapted to orthopedic traumatology and nearly exhaustive. The extraction of data directly from hospital information systems effectively improves the collection of data on surgical procedures. The implementation of a SSI surveillance protocol reduces SSI.
Level of evidence: Level III. Prospective study.
© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Introduction

Surveillance of surgical site infections (SSI) is a national priority (section L.711-1 of France's Public Health Code) for the fight against nosocomial infections (NI). These complications can have serious consequences on morbidity and mortality while also increasing costs. Based on the studies by Condon et al. [1] and Haley et al. [2], one of the fundamental principles for the surveillance of SSI involves receiving effective feedback (retro-information) when infections develop, in particular SSI.

The aim of this study was to review the structural bases of SSI surveillance and report the experience at the Dupuytren University Hospital Center (CHU Dupuytren) which began a SSI surveillance program in 2002 managed by the Hospital Hygiene Unit, and to validate the hypothesis that there is a correlation between creating a SSI surveillance program and a reduction in SSI.

Materials and methods

A "register of nosocomial infections" was created in accordance with a ministerial decree dated 6th February, 2006. The goal was to encourage all healthcare establishments to measure their actions and results in the fight against nosocomial infections, which are now called healthcare associated infections because transmission can occur outside the hospital setting [3]. Assessment indicators had to be defined for this approach: the first was "the global indicator of activities in the fight against nosocomial infections" (French acronym: ICALIN); followed by "the indicator for the volume of hydroalcoholic products consumed" (French acronym: ICSHA), then the "indicator for SSI surveillance" (French acronym: SURVISO, Fig. 1) which is a reference to determine the implementation of activities and not results, and finally the "global index of the correct use of antibiotics" (French acronym: ICATB).

To facilitate analysis of this register based on these four indicators, a "total score" of 100 was created. The relative weight of each indicator was established as follows: ICALIN 40%; ICSHA 30%; ICATB 20%; SURVISO 10%. The healthcare facility is classified (from A to E) depending upon the result of this total score, and can be compared to other facilities in its category.

The methodology used for the surveillance of SSI at the CHU Dupuytren was based on that proposed by the Network for the Warning, Investigation and Surveillance of Nosocomial Infections (*Réseau d'alerte, d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales* [RAISIN]) which compiles data from interregional surveillance networks (CCLIN) [4]. This approach, which was initiated and managed by the Hospital Hygiene Unit (*Unité d'hygiène hospitalière* [UHH]) received the support of all the surgical teams: in 2002, it was first implemented in several "pilot" programs and it has been operational in the department of orthopedics and traumatology for more than 2 years [5].

The protocol is based on the weekly collection of surveillance data by the UHH, (age, gender, entry/release date, CCAM code, class, ASA score, duration of surgery, urgency, multiple procedure, biological samples, germ, antibiogram) obtained directly from the different information systems in our hospital (administration, operating room, bacteriological laboratory). At first, data was collected 3 weeks after surgery, because according to RAISIN data three out of four infections are identified within 15 days after surgery. However, this delay is 3 months for orthopedics-traumatology which corresponds to the mean postoperative follow-up evaluation date (in particular for planned surgery). Thus, each surgeon received the list of surgical procedures he/she had performed 3 months before for validation: this list included any existing microbiological data related to SSI for information purposes. Data were then exploited using Epilnfo® (version 6.04dfr) software. Every semester global results were sent to all surgeons and the specific results for each unit were only sent to the surgeons from that unit; a surgeon could obtain an individual report of his/her operations upon request (or they could be obtained for the purposes of the study).

The data in the surgical file could be applied to each specialization. For the SOFCOT symposium, we integrated the traumatology codes so that these SSI could be extracted from the global activity. We also integrated the National Nosocomial Infections Surveillance System (NNIS) index developed by the American surveillance system [6,7] and the reduction in hospital days index *Journées d'hospitalisation évitées* (JHE) [5].

The NNIS index is an indicator of severity based on the classification of surgical procedures by Altemeier et al. [8], the ASA score and the length of surgery. In our practice, surgical procedures were usually classified as type I and the length of the procedure was based on a simplified score (0 for less than 2 hours; 1 for more than 2 hours).

The JHE index is based on the hypothesis that without surveillance the SSI rate in year (n) will be the same as that of the year before (n-1): to obtain this figure the number of SSI that were prevented must be known [number of surgical procedures/year (n) × rate of SSI/year (n-1) − number of SSI/year (n)] and the increase in the mean length of hospital stay (DMS) [mean DMS with SSI (n) − mean DMS without SSI/year (n)]. Thus, calculations were based on the formula:

BY-NC-ND

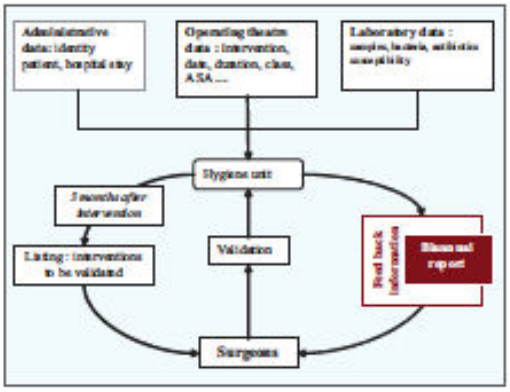


Figure 1 Organization of SSI surveillance.

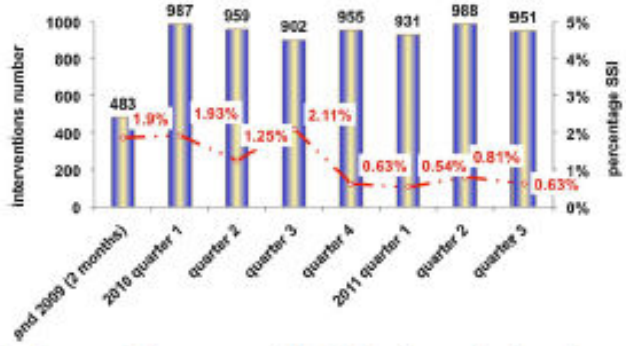


Figure 2 Progression of the percentage of SSI: global results in orthopedics and traumatology.

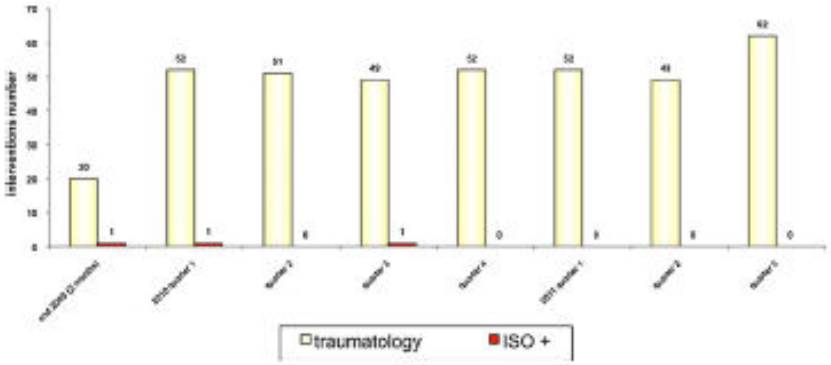


Figure 3 Progression of SSI: traumatology results (based on criteria from the 2011 Sofcot symposium).

BY-NC-ND

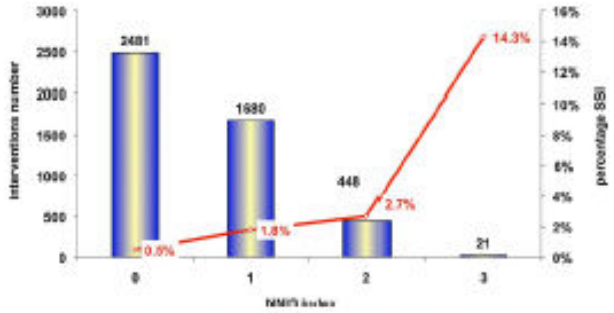


Figure 4 Correlation between NNIS index and SSI.

JHE = number of SSI prevented × increase in DMS. The extra cost created by SSI could thus be evaluated.

Results

Since surveillance of orthopedic traumatology began at the end of 2009, 7156 surgical procedures have been evaluated. The inclusion rate is 97.3%.

Patient data

Between 2009 and 2011 the mean age of patients has not changed (55.4 years old; median 56) and (55.8 years; median 56) respectively; the gender ratio was 1.13.

SSI Data

Eighty-four SSI have been registered in 2 years, with a significant decrease over time from 1.86% to 0.66% (Figs. 2–4). The mean age of infected patients was 58 years old, and they were mostly men (gender ratio 1.6). The SSI rate was strongly correlated to the NNIS severity score.

Hospital stay data

Most hospital stays were conventional hospitalizations (for the moment the study does not include day surgery; the DMS was 6.6d (median: 3d) with a significant increase in the DMS when a SSI occurred. The JHE went from 164d in 2010 to 254d

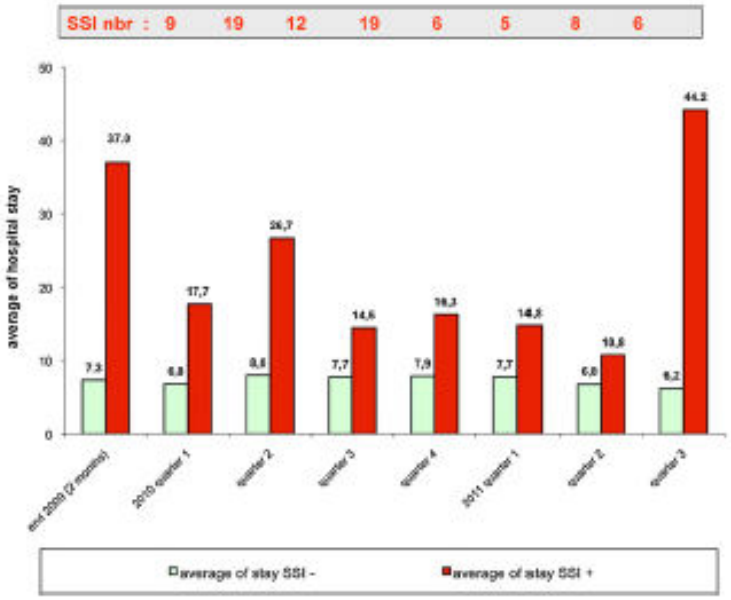


Figure 5 Correlation between hospital stay and SSI.

BY-NC-ND

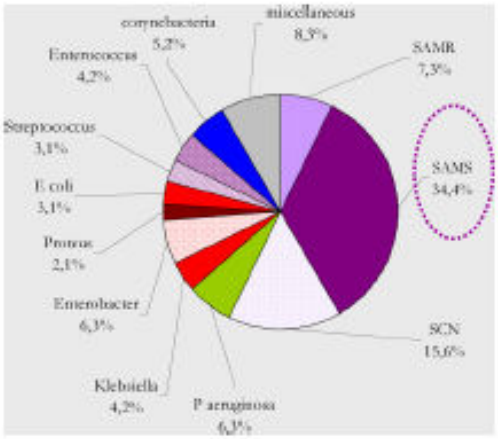


Figure 6 Microbiological data.

for the first 9 months of 2011 (Fig. 5). A total of 418 days of hospitalization were saved since the surveillance system has begun.

Bacteriological data

Staphylococcus aureus (41.7%) was the most frequent germ (Fig. 6).

Receiving retro-information

Receiving retro-information was systematically correlated to a downturn in the curve for the occurrence of SSI (Fig. 7).

Discussion

Since the princeps studies by Condon et al. [1] and Haley et al. [6], it is now accepted that creating a SSI surveillance system effectively reduces the incidence of SSI. These programs have been implemented in France [4,9] and Europe [10–13] since 1998. Very few studies have specifically evaluated orthopedics and traumatology and in France, the Hospital Cochin is the only team to have proposed a SSI surveillance protocol in 2007 based on a 2-year study [14].

Our surveillance system has three strong points: follow-up is continuous and non-sequential as suggested by RAISIN (over 3–6 months or based on at least 100 procedures) and it is nearly exhaustive as well as being specifically adapted to orthopedic traumatology. The extraction of data directly from hospital information systems effectively improves the collection of data on surgical procedures. Theoretically, a SSI could be missed due to a lost to follow-up patient or a late declaration: in this case, a secondary declaration by the surgeon can be validated and the SSI can be "recovered".

The global decrease in the rate of SSI in orthopedics-traumatology in our institution is fairly comparable to that of other surgical specializations (evaluated since 2002) and that reported by Rioux et al. who observed a decrease of 3.8% to 1.7% in 6 years [9].

The bacteriological warning was correlated to the SSI in 78.6% of cases, but in 18 cases (4.5%) the SSI was reported without a bacteriological warning.

The DMS is increased in patients with an SSI: in a statistical model, Graves et al. estimated that the DMS was multiplied by 2.5 [15]. This parameter is a key factor to determine the cost increases associated with SSI [15–17]. We included this item to evaluate the number of JHE, which we felt was better adapted to clinical reality than simply calculating costs.

Although the collection of clinical or technical data can be refined and developed (new parameters can be introduced into the study...), this list should remain simple to use so that surgical teams will continue to endorse it.

The implementation of a SSI surveillance system must now be included in the arsenal of "technical means" that are usually used to study surgical site parameters (washing hands, surgical environment...) [18–20]. The weight of the system of surveillance in the total score including all the indicators in the register of healthcare associated infections seems highly under-evaluated (10%) in relation to its efficacy and compared to the ICSHA indicator (30%).

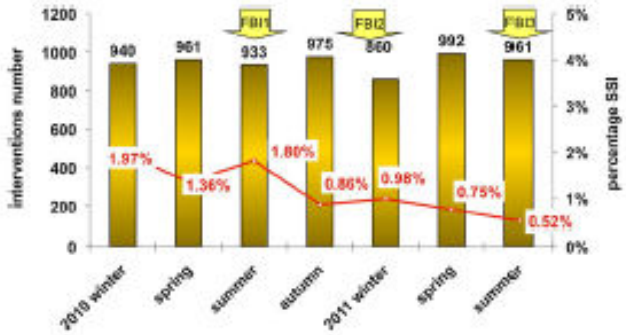


Figure 7 Progression of SSI according to seasons and feedback information (FBI).

BY-NC-ND

Conclusion

The implementation of a SSI surveillance protocol reduces SSI and is a tool that is available to hospital units: it is an essential element when organizing the follow-up of patients (RMM) with SSI in relation to the evaluation of professional practices (EPP). Organization of a SSI surveillance protocol makes it possible to participate in the national surveillance network (RAISIN) and does not require any extra work.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest concerning this article.

References

[1] Condon RE, Schulte WJ, Malangoni MA, Anderson-Teshendorf MJ. Effectiveness of a surgical wound surveillance program. Arch Surg 1983;118:303–7.

[2] Haley RW, Culver DH, White JW, Morgan WM, Emori TG, Munn VP, et al. The efficacy of infection surveillance and control programs in preventing nosocomial infections in US hospitals. Am J Epidemiol 1985;121:182–205.

[3] Leaper D, McBain AJ, Kramer A, Assadian O, Berthelot P, Sanchez LA, et al. Healthcare associated infection: novel strategies and antimicrobial implants to prevent surgical site infection. Ann R Coll Surg Engl 2010;92:1–7.

[4] Astagneau P, L'Heriteau F, Daniel F, Parneix P, Venier AG, Malavaud S, et al. Reducing surgical site infection incidence through a network: results from the French ISO-RAISIN surveillance system. J Hosp Inf 2009;72:127–34.

[5] Mounier M, Descottes B, Moreau JJ, Gueye M, Fourcade L, Gainant A, et al. Surveillance continue des infections du site opératoire (ISO) au CHU de Limoges (France) de 2002 à 2007 : méthodes et résultats. Bull Epidemiol Hebdo (BEH) 2009;6:49–53.

[6] Haley RW, Culver DH, Morgan WM, et al. Identifying patients at risk of surgical wound infection. A simple multivariate index of patient susceptibility and wound contamination. Am J Epidemiol 1985;121:206–15.

[7] Culver DH, Horan TC, Gaynes RP, et al. Surgical wound infection rates by wound class, operative procedure and patient risk index. Am J Epidemiol 1991;91(Suppl. 3B):152–7.

[8] Altemeier WA, Burke JF, Pruitt BA, Sandusky WR. Definitions and classifications of surgical infections. In: Lippincott JB, editor. Manual on control of infection in surgical patients. Lippincott JB: Philadelphia; 1984. p. 19–30.

[9] Rioux C, Grandbastien B, Astagneau P. Impact of a six-year control program on surgical site infection in France: results of the INCISO surveillance. J Hosp Infect 2007;66:217–23.

[10] Brandt C, Geffers C, Sohr D, Rüden H, Gastmeier P. Surveillance postoperativer Wundinfektionen: Aktuelle Daten des Krankenhaus-Infektions-Surveillance System (KISS). Epidemiologisches Bulletin 2003;36:290–2.

[11] Brandt C, Sohr D, Behnke M, Daschner F, Rüden H, Gastmeier P. Reduction of surgical site infection rates associated with active surveillance. Infect Control Hosp Epidemiol 2006;27:1347–51.

[12] Geubbels EL, Mintjes-de Groot AJ, van den Berg JM, de Boer AS. An operating surveillance system of surgical site infections in the Netherlands: results of the PREZIES national surveillance network. Infect Control Hosp Epidemiol 2000;21:311–8.

[13] Geubbels EL, Nagelkerke NJ, Mintjes-de Groot AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Grobbee DE, de Boer AS. Reduced risk of surgical site infections through surveillance in a network. Int J Qual Health Care 2006;18:127–33.

[14] Dumaine V, Jeanne L, Paul G, Eyrolle L, Salmon-Ceron D, Tomeno B, et al. Proposition d'un protocole de suivi des infections avérées de site opératoire en chirurgie orthopédique et traumatologique. Rev Chir Orthop 2007;93:30–6.

[15] Graves N, Halton J, Doidge S, Clements A, Lairson D, Whitby M. Who bears the cost of healthcare-acquired surgical site infection? J Hosp Infect 2008;45:173–84.

[16] Smyth ETM, Emmerson AM. Surgical site infection surveillance. J Hosp Infect 2000;45:173–84.

[17] Urban JA. Cost analysis of surgical site infections. Surg Infect 2006;7:102–7.

[18] Nichols RL. Preventing surgical site infections: a surgeon's perspective. Emerg Inf Dis 2001;7:220–4.

[19] Yoshida M, Nabeshima T, Gomi H, Lefor AT. Technology and prevention of surgical site infections. J Surg Educ 2007;64:302–10.

[20] Casey AL, Elliott TSJ. Progress in the prevention of surgical site infection. Curr Opin Infect Dis 2009;22:370–5.

BY-NC-ND

Article 2 : Absorbable suture in Orthopaedics : From the implantation to the resorption. *Rev. Chir. Orthop.* 2015; 101(7): 587-592. Plessis C, Brischoux S, Sturtz F, Marcheix PS.

Revue de chirurgie orthopédique et traumatologique 101 (2015) 587–592

Disponible en ligne sur ScienceDirect www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France EM|consulte www.em-consulte.com

Pratique professionnelle

Les fils résorbables en orthopédie : de l'implantation à la résorption☆,☆☆

Absorbable suture in orthopaedics: From the implantation to the resorption

C. Plessis[a], S. Brischoux[a], F. Sturtz[b], P.-S. Marcheix[c,*]

[a] Service de pharmacie à usage intérieur, CHRU de Limoges, 2, avenue Martin-Luther-King, 87042 Limoges, France
[b] Département de biochimie, EA 6309, université de Limoges, CHRU de Limoges, 2, avenue Martin-Luther-King, 87042 Limoges, France
[c] Service d'orthopédie-traumatologie, CHRU de Limoges, 2, avenue Martin-Luther-King, 87042 Limoges, France

INFO ARTICLE

Historique de l'article :
Reçu le 3 juin 2015
Accepté le 26 août 2015

Mots clés :
Fils de suture
Résorption
Dispositif médical
Résistance
Résorption totale

RÉSUMÉ

La plupart des procédures chirurgicales nécessitent des fils de suture, aussi appelés fils chirurgicaux, répondant à des critères particuliers, dont l'un d'eux est le caractère résorbable ou non de la suture. L'implantation d'un fil de suture a pour but d'assurer une bonne cicatrisation des tissus et n'est pas sans conséquence sur l'organisme. Le choix du fil de suture est important et doit se faire en fonction des qualités recherchées par le chirurgien. L'objectif de ce travail était de préciser les caractéristiques des différents fils chirurgicaux résorbables afin d'optimiser leurs conditions d'utilisation.

© 2015 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

1. Introduction

La plupart des procédures chirurgicales nécessitent des fils de suture, aussi appelés fils chirurgicaux, répondant à des critères particuliers, dont l'un d'eux est le caractère résorbable ou non de la suture [1].

Historiquement, les sutures étaient d'origine naturelle : crins d'animaux, soie, lin… [2,3]. Il faut remonter au XIX[e] siècle et à la naissance de la chirurgie moderne pour voir apparaître le premier fil de suture en tant que tel : le catgut (1820). D'origine naturelle (collagène), le catgut chromé (plus résistant) a été mis au point par Lister en 1881 [4]. Constitué de collagène d'origine animale (intestin grêle des herbivores) et recouvert de sels de chrome, plusieurs brins étaient torsadés pour donner une suture d'aspect monobrin [1]. Une réaction de protéolyse enzymatique permettait sa résorption de façon irrégulière [13] en 10 à 15 jours (vitesse de résorption dépendante du site d'implantation et augmentée dans les tissus infectés) mais elle s'accompagnait d'une intense réaction inflammatoire. De plus, le Catgut chromé a provoqué des cas d'encéphalopathie spongiforme bovine : son utilisation chez l'homme fut donc proscrite en 1996 [1] puis sa commercialisation interdite en France par arrêté en 2001.

Dans les années 1940–1950, les fils de sutures non résorbables synthétiques voient le jour et se développent peu à peu. Mais la sévérité des réactions tissulaires qu'ils provoquent a contribué au développement en 1970 de fils de sutures synthétiques résorbables [4]. Ces fils sont alors composés de biomatériaux qui se résorbent par hydrolyse à plus ou moins long terme [1]. L'élimination des métabolites finaux (présents physiologiquement) se fait par l'organisme, limitant ainsi la durée de présence d'un corps étranger susceptible de provoquer de graves réactions tissulaires inflammatoires voire des infections, granulomes, abcès. Aujourd'hui les fils de suture résorbables utilisés sont, pour la plupart, d'origine synthétique.

2. Données générales

Il n'existe pas de fil de suture parfait, aboutissant à une vaste gamme de fils chirurgicaux répondant à des caractéristiques déterminées devant être connues par les chirurgiens afin de les utiliser de façon optimale.

Les fils chirurgicaux sont des dispositifs médicaux de classe III. Ils sont soumis à des normes, contrôlées par des essais définis dans

DOI de l'article original : http://dx.doi.org/10.1016/j.otsr.2015.08.004.
☆ Ne pas utiliser, pour citation, la référence française de cet article, mais celle de l'article original paru dans Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research, en utilisant le DOI ci-dessus.
☆☆ Cet article est consultable sur www.sciencedirect.com et sur www.em-consulte.com/produit/rcot/.
* Auteur correspondant.
Adresse e-mail : pmarcheix@orange.fr (P.-S. Marcheix).

http://dx.doi.org/10.1016/j.rcot.2015.09.299
1877-0517/© 2015 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

BY-NC-ND

les monographies de la pharmacopée européenne. Des données sur la toxicité et la biocompatibilité sont apportées au travers d'essais in vivo.

2.1. Caractéristiques définissant les fils de suture

De façon générale, les fils de suture sont définis par leurs dimensions (diamètre et longueur du fil), par leurs compositions (naturelle ou artificielle) et par leurs caractéristiques physiques et physiologiques. D'un point de vue physique, le fil de suture est caractérisé par la notion de :

- capillarité se définissant comme la facilité d'un polyfilament à transporter et propager les molécules de liquide et/ou les microorganismes dans les interstices des fibres tressées. L'enduction d'un fil diminue ce phénomène. Une suture idéale est une suture acapillaire ;
- résistance à la traction se définissant par la force mesurée à laquelle la suture résiste avant de se rompre. C'est une propriété fondamentale car il faut que cette résistance soit au moins égale à la résistance des tissus sur lesquels elle est placée pour contribuer au bon processus de cicatrisation [4]. Ce critère dépend principalement du diamètre du fil de suture [5], de la structure du fil (les polyfilaments sont intrinsèquement plus résistants que les monofilaments) et du biomatériau constitutif. Dans le cas des fils résorbables, la perte de résistance avec le temps doit être en adéquation avec la vitesse de cicatrisation propre au tissu ;
- sécurité du nœud qui est la force de traction nécessaire à la rupture d'un fil porteur d'un nœud simple. La perte de résistance du fil au niveau du nœud est de 40 à 50 %. En pratique, la pharmacopée européenne impose des normes en utilisant ce critère pour déterminer la « charge minimale de rupture » ;
- glissance : correspondant à l'aptitude d'un fil à glisser dans les tissus lors de l'implantation. Elle est inversement corrélée au coefficient de friction (plus important avec les fils tressés qu'avec les monofils) ;
- souplesse ou flexibilité : reflet d'une bonne maniabilité, cette caractéristique facilite la réalisation de la suture. Les fils tressés sont plus souples que les monofils, qui présentent en plus un effet de mémoire. Les techniques de tressage ou de torsion permettent de jouer sur ce dernier critère [2] ;
- plasticité ou « mémoire du fil » se définissant comme l'aptitude du fil à se déformer de façon irréversible, permettant une bonne tenue du nœud.

D'un point de vue physiologique et organoleptique, le choix du fil de suture porte sur les notions de :

- biocompatibilité : qualité du fil qui définit la tolérance des tissus vis-à-vis du matériau implanté (absence de réaction de rejet et de réaction inflammatoire). Ce critère a une importance sur la résistance du fil après implantation, sur le processus de cicatrisation et sur la qualité du tissu de reconstitution (et donc sur la solidité de la cicatrisation à long terme) [2] ;
- résorption [1,2] : aptitude à disparaître progressivement de l'organisme par processus biologique naturel. La résorption peut se faire par réaction enzymatique ou par réaction d'hydrolyse. Au contact des fluides corporels, le fil de sutures doit être totalement dissout ;
- stérilité : composante indispensable et absolue de tous les fils de suture quels qu'ils soient. Deux procédés de stérilisation sont possibles : principalement par l'oxyde d'éthylène mais aussi possible par rayonnements gamma.

2.2. Polyfilament ou monofilament ?

La première structure de fil de suture résorbable synthétique développée fut le polyfilament (assemblage de fibres tressées ou torsadées) présentant une bonne souplesse et une bonne sécurité du nœud. Il est également très résistant mais son inconvénient majeur est sa forte capillarité. En effet, en raison de l'assemblage par tressage de plusieurs brins, il existe des interstices libres susceptibles de propager les liquides tissulaires le long du fil. Du fait de son imprégnation celui-ci augmente de volume. Ce phénomène amplifie la réaction tissulaire et réduit alors sa tolérance. De plus, cela représente un site privilégié de colonisation par des microorganismes qui échappant ainsi aux mécanismes de défense [6–8].

Deux solutions ont été développées :

- dans un premier temps l'enduction de l'ensemble des fils tressés par un mélange peu hydrosoluble inerte a permis de créer une surface plus régulière et de jouer un rôle de lubrifiant améliorant la glissance et minimisant le traumatisme tissulaire, d'une part, et améliorant la tolérance en diminuant l'effet de capillarité, d'autre part [6,9,10] ;
- dans un second temps l'enduction de certains fils résorbables avec un antibactérien à large spectre (le triclosan) mais sans influence sur les paramètres de résorption [2]. C'est l'exemple du Vicryl Plus® (Ethicon, San Lorenzo, Puerto Rico) apparu en 2002 dont les durées de résorption totale et de perte de résistance à la traction demeurent inchangées comparé au Vicryl® (Ethicon, San Lorenzo, Puerto Rico) [11].

À l'inverse, le monofil se compose d'un seul brin. Sa surface lisse limite le traumatisme à l'implantation dans le tissu évitant le phénomène de cisaillement (bonne glissance intratissulaire) et lui confère la propriété d'acapillarité (pas d'enduction nécessaire) [2,12]. Il a été démontré une meilleure tolérance par rapport aux fils tressés, avec des réactions inflammatoires minimes et un risque moindre d'infections bactériennes (adhésion des microorganismes moins importante en raison de la surface lisse) [2]. Bien que ces fils présentent une plus grande rigidité et une moindre tenue du nœud par rapport aux multifilaments, les monofils synthétiques résorbables représentent une avancée chirurgicale dans le domaine des sutures.

2.3. Mécanismes et paramètres de résorption

Il existe deux principaux mécanismes physiologiques de résorption parmi les fils de suture résorbables :

- une réaction de protéolyse enzymatique se produit au niveau des macrophages dans le cas des sutures d'origine naturelle (rarement utilisées de nos jours). Difficilement prévisible, ce processus phagocytaire est directement lié à la concentration en macrophage [13] et au taux d'enzymes in situ ;
- une réaction d'hydrolyse en milieu humide se produit pour les sutures d'origine synthétique. Ce type de réaction chimique est plus régulier, uniforme et prédictif que la précédente [2,13]. De plus, elle aboutit à la formation de métabolites connus de l'organisme (par exemple l'acide lactique, l'acide glycolique…) qui peuvent être naturellement éliminés sous forme de dioxyde de carbone et d'eau [1,14].

La résorption d'un fil est caractérisée par trois paramètres principaux [1] :

- la perte totale de résistance (PTR) reflète la diminution de la solidité du fil dans le temps. Un fil est dit résorbable si sa résistance

BY-NC-ND

Tableau 1
Récapitulatif des paramètres de résorption pour certaines sutures utilisées en orthopédie classées selon le profil de résistance.

Structure du fil	Profil de résistance	Biomatériau constitutif	Perte de Résistance Totale (en jours)	Résorption complète (en jours)	Exemple de sutures commercialisées
Polyfilaments tressés	Court	Acide polyglycolique	10–14	42	Optime R® (Peters, Bangkok, Thaïlande)
		Polyglactine 910	14	42	Vicryl Plus® (Ethicon, San Lorenzo, Puerto Rico)
	Intermédiaire	Acide polyglycolique	28	60–90	Optime® (Peters, Bangkok, Thaïlande)
		Lactomer 9-1	30	56–70	Polysorb® (Covidien, Norwalk, États-Unis)
		Polyglactine 910	35	70	Vicryl® (Ethicon, San Lorenzo, Puerto Rico)
Monofilaments	Court	Polyglytone 6211	10	56	Caprosyn® (Covidien, Norwalk, États-Unis))
	Intermédiaire	Polyglécaprone 25	21–28	90–120	Monocryl® (Ethicon, San Lorenzo, Puerto Rico)
		Glycomer 631	21	90–110	Biosyn® (Covidien, Norwalk, États-Unis)
	Long	Polydioxanone	98	180–210	PDS II® (Ethicon, San Lorenzo, Puerto Rico)
		Polyglyconate	42–49	120–180	Maxon® (Covidien, Norwalk, États-Unis)
		Polydioxanone et polyéthylène (non résorbable)		182–238	Orthocord® (Depuy Synthes Mitek, Raynham, États-Unis)

mécanique diminue au cours des 60 jours qui suivent son implantation [1,15]. Cependant, la distinction résorbable/non résorbable n'est pas absolue : en effet, des fils de suture synthétiques non résorbables (dont la résistance est conservée au minimum pendant 60 jours), tels que le polyamide ou la soie, se dégradent in vivo, par hydrolyse, sur le long terme [12].

Parfois évoqué, le temps de demi-vie est un paramètre qui définit le temps au bout duquel, la résistance mécanique est égale à 50 % de la résistance de traction initiale ;

- la résorption totale (RT) traduit la disparition de la masse du fil. C'est l'atout majeur des sutures résorbables. En effet, une fois la cicatrisation terminée le corps étranger devient inutile voire source de réactions tissulaires d'intolérance (inflammation et infections). La disparition complète du biomatériau évite le retrait de la suture. Le temps de résorption définit la durée nécessaire à l'élimination complète du produit dans l'organisme ; cette durée varie selon la composition et la structure du fil [2] ;
- le temps de présence utile, correspond au rapport entre le temps de résistance effective sur le temps de présence de la suture [2]. Il renvoie à la notion de rapport bénéfice/risque et s'exprime en pourcentage, ce qui en fait un élément de comparaison entre les différents fils de suture.

La dégradation se faisant plus ou moins rapidement dans le temps, on distingue des sutures à profil de résistance : court, intermédiaire et long. Au vu des paramètres de résorption précédents, les monofilaments persistent plus longtemps dans l'organisme que les fils tressés [16] (Tableau 1).

2.4. *Facteurs influençant la résorption*

Les caractéristiques de résorption varient en fonction [2,5] :

- de la structure du fil ;
- de la composition du fil (nature du polymère) ;
- du diamètre de la suture.

Ces trois facteurs sont des facteurs clés qui définissent la résistance à la traction initiale du fil avant utilisation.

Il existe, d'autre part, des facteurs physiologiques dépendants du site d'implantation comme les fluides biologiques et le pH. Ainsi, une étude in vitro a permis de démontrer que la bile et les sucs pancréatiques accélèrent la perte de résistance de la plupart des fils de sutures résorbables, et en particulier le Polysorb® (lactomer 9-1) (Covidien, Norwalk, États-Unis) et le Vicryl® (polyglactine 910) (Ethicon, San Lorenzo, Puerto Rico). Le Monocryl® (polyglécaprone) (Ethicon, San Lorenzo, Puerto Rico) reste lui insensible. Toujours d'après cette même étude, l'influence du pH, du sang et des sucs gastriques, resterait limitée sur ces sutures sauf pour le PDS II® (polydioxanone) (Ethicon, San Lorenzo, Puerto Rico) [17]. Pourtant, une étude plus ancienne avait mis en évidence de légères différences du temps de la perte de la résistance en fonction du pH (milieu acide, pH physiologique 7,44 et milieu basique) entre le Dexon® (PGA) (Covidien, Norwalk, États-Unis) et le Vicryl® (polyglactine 910) (Ethicon, San Lorenzo, Puerto Rico). Ainsi, ce dernier montrait une perte de résistance plus rapide en milieux acide et basique vis-à-vis du pH physiologique. Le PGA quant à lui, semblait plus sensible à un milieu basique [9].

L'humidité du milieu d'implantation, des facteurs inter et intra-individuels sont aussi des éléments qui conditionnent la réaction d'hydrolyse d'une suture. En effet, chez les enfants la vitesse de résorption augmente. Une élévation de la température corporelle ou une pathologie néoplasique favorisent le processus d'hydrolyse [1]. L'étude in vitro de Deng [18] a montré que la perte de résistance d'un polyfilament tressé à base de polyglactine 910, était directement liée à l'élévation de la température du milieu. Cette même étude illustre également la diminution du poids moléculaire et de la force du fil résorbable au cours du temps dans le milieu tampon : cela reflète le processus de résorption avec la perte de masse de la suture.

Enfin, le rayonnement Gamma, utilisé pour la stérilisation, accélère la vitesse de résorption en altérant la structure des polymères composant les sutures résorbables synthétiques (fractionnement des chaînes moléculaires). Cela engendre une diminution de la résistance à la traction et favorise l'hydrolyse. L'oxyde d'éthylène est donc le mode de stérilisation le plus souvent privilégié pour ce type de sutures [19].

BY-NC-ND

2.5. Réactions tissulaires

Tous les fils de suture quels qu'ils soient, sont des corps étrangers introduits dans l'organisme susceptibles de provoquer une réponse de la part du système immunitaire sous forme de réaction inflammatoire dont la sévérité et la durée dépendent des critères suivants [2,14] :

- la nature du polymère : l'hydrolyse (ou la protéolyse) du polymère résorbable produit des métabolites connus de l'organisme parfaitement assimilés, ce qui limite la réaction tissulaire [20,21] ;
- la structure du fil et l'éventuelle enduction ;
- la quantité de matériel implanté ;
- l'intensité du traumatisme tissulaire occasionné ;
- la longévité in situ de la suture.

Cependant, il faut rappeler que le processus de cicatrisation physiologique implique une phase inflammatoire ; c'est la sévérité et la prolongation de la réaction qui la rend pathologique. Une réaction tissulaire intense entraîne une altération des tissus, un retard de cicatrisation (défaut de réparation tissulaire) et augmente le risque infectieux.

L'implantation d'un fil de suture engendre différents types de réactions cellulaires qui peuvent être simultanées et confondues [22]. La première est d'origine mécanique : le fil de suture induit un traumatisme tissulaire qui est d'autant plus important que la suture présente une mauvaise glissance. En raison de leur structure, il est évident que les monofilaments induisent moins « d'effet de scie » que les polyfilaments. Dans un second temps, la réaction tissulaire dans le sens strict du terme apparaît : les fils de suture synthétiques résorbables entraînent initialement une réaction inflammatoire minime (dans les 2 à 7 jours suivant l'implantation du matériel), puis sont remplacés par une prolifération de tissu conjonctif fibreux avant de disparaître sous l'effet de l'hydrolyse [13].

Cette hydrolyse (ou protéolyse pour les fils résorbables naturels) est le 3e temps de la réaction tissulaire [22]. Toujours pour les fils de suture synthétiques résorbables : la formation de métabolites finaux connus de l'organisme car physiologiques (dérivés glucidiques tels que les acides glycolique et lactique dans la plupart des cas) [2], assurent une élimination naturelle rénale ou pulmonaire sous forme de carbonate de dioxyde et d'eau [22].

3. Classification et composition

3.1. Sutures tressées à base d'acide glycolique

Le premier biomatériau synthétique mis au point en 1970 fut l'acide polyglycolique (*polyglycolic acid* [PGA]) [14]. Par réaction d'estérification, deux molécules d'acide glycolique forment des esters cycliques, appelés glycolides. Ceux-ci, sous l'effet de la chaleur et par catalyse, s'associent pour donner une chaîne linéaire d'homopolymères d'acide glycolique. Ce composant a permis de développer une fibre extrêmement solide assurant une bonne résistance et une bonne tenue des nœuds. Il est donc présent dans de nombreux fils de suture résorbables synthétiques tressés tels que Optime® (Peters, Bangkok, Thaïlande), Vicryl® (Ethicon, San Lorenzo, Puerto Rico), Polysorb® (Covidien, Norwalk, États-Unis)… (Tableau 2). In vivo, la résorption du PGA (et plus généralement des fils résorbables synthétiques) se fait par réaction d'hydrolyse en milieu humide et aboutit aux monomères d'acide glycolique. Ces métabolites finaux dérivés des sucres sont présents physiologiquement et assimilés par l'organisme en entrant dans le cycle de Krebs afin d'être éliminés naturellement [14]. Ce processus de résorption confère à ces fils de suture une bonne tolérance.

3.1.1. Optime® (laboratoire Peters, Bangkok, Thaïlande)

Constitué uniquement par du PGA, Optime® présente une perte totale de résistance en 28 jours et disparaît de l'organisme au délai de 2 ou 3 mois. C'est un fil à « résistance intermédiaire ». Une version traitée de ce fil, permet de donner Optime R®, à profil de résistance courte (PTR de 10–14 jours) avec une résorption complète en 42 jours [1].

3.1.2. Vicryl® (Laboratoire Ethicon, San Lorenzo, Puerto Rico)

Le Vicryl® est un polyfilament à base de polyglactine 910 : constituée à 90 % d'acide glycolique et à 10 % d'acide lactique. Ce fil présente les mêmes avantages que l'acide polyglycolique mais l'addition d'acide lactique influe sur la résorption : en effet, le caractère hydrophobe de cette molécule ralentit dans un premier temps la pénétration de l'eau, puis l'encombrement spatial que l'acide lactique induit, fait apparaître des espaces favorisant une résorption plus complète et rapide. La perte totale de résistance de la polyglactine 910 se fait en 35 jours et au délai de 70 jours environ [1], la résorption est totale libérant en plus des monomères d'acide glycolique, de l'acide lactique [14].

3.1.3. Vicryl® Rapide (Laboratoire Ethicon, San Lorenzo, Puerto Rico)

Le Vicryl® Rapide est un fil de Vicryl® irradié qui utilise la propriété altérante des rayonnements gamma sur les chaînes de polymères synthétiques résorbables. Sa perte de résistance à la traction est divisée par un facteur 2,5 par rapport au Vicryl® ((14 jours versus 35 jours) et une résorption totale en 42 jours (versus 70 jours) [1]. La durée de présence dans l'organisme étant moins longue (fil tressé à perte de résistance rapide), le risque de réaction tissulaire ou d'intolérance est plus faible [23].

3.1.4. Polysorb® (Laboratoire Covidien, Norwalk, États-Unis)

Le Polysorb® est un fil tressé résorbable à base de lactomer 9-1. Troisième matériau des polyfilaments résorbables, il s'agit d'un copolymère à base d'acide glycolique (95 %) associé à de l'acide lactique (5 %). Présentant des propriétés similaires aux deux précédents biomatériaux, sa perte de résistance à la traction se fait en une trentaine de jours et la résorption, toujours par métabolisation en acides lactique et glycolique, est totale en 56 à 70 jours. De ce fait, il est comparable au Vicryl® (Ethicon, San Lorenzo, Puerto Rico) [6]. Mais il s'en distingue par sa bonne maniabilité et une bonne sécurité du nœud.

Tableau 2
Composition des biomatériaux utilisés pour la constitution des polyfilaments de suture.

Biomatériaux polyfilaments	Structure du polymère	Acide glycolique ou glycolide (%)	Acide lactique	Exemple de suture commercialisée
Acide polyglycolique	Homopolymère polyglycolique	100	–	Optime® (Peters, Bangkok, Thaïlande)
Polyglactine 910	Copolymère glycolactique	90	10 %	Vicryl® (Ethicon, San Lorenzo, Puerto Rico)
Lactomer 9-1	Copolymère glycolactique	95	5 %	Polysorb® (Covidien, Norwalk, États-Unis

BY-NC-ND

Tableau 3
Composition des biomatériaux utilisés pour la constitution de monofils.

Biomatériaux monofils	Acide glycolique ou glycolide (%)	Carbonate de triméthylène	Dioxanone	ε-caprolactone	Acide lactique	Exemple de monofil commercialisé
Glycomer 631	60	26%	14%	–	–	Biosyn® (Covidien, Norwalk, États-Unis)
Polyglyconate	72	14%	–	14%	–	Maxon® (Covidien, Norwalk, États-Unis
Polyglécaprone	75	–	–	25%	–	Monocryl® (Ethicon, San Lorenzo, Puerto Rico)
Polyglytone 6211	60	10%	–	20%	10%	Caprosyn® (Covidien, Norwalk, États-Unis

3.2. Sutures monofilaments à base de dioxanone

Le polydioxanone est le premier monofilament mis au point : cet homopolymère est formé par polymérisation en présence d'octanoate stanneux à partir de monomères para-dioxanone, issus du diéthylène glycol [1]. Aussi appelé poly-para-dioxanone, il résulte de son hydrolyse des monomères d'acide 2-hydroxyéthoxyacétique lesquels sont résorbés puis éliminés par l'organisme. En raison de sa structure à monobrin, ce type de suture est acapillaire et atraumatique, limitant considérablement le risque de réactions tissulaires. Il est très résistant [1].

3.2.1. PDS II® (Laboratoire Ethicon, San Lorenzo, Puerto Rico)

La perte de résistance est totale en 98 jours et la résorption complète de ce type de suture se fait en 180 à 210 jours [1,24]. C'est donc une résorption sur le long terme.

3.2.2. Orthocord® (Laboratoire Depuy Sythes Mitek, Raynham, États-Unis)

Orthocord® est une suture tressée unique avec une composition particulière qui associe le polydioxanone résorbable (62%) et le polyéthylène, composé non résorbable (38%). S'agissant d'un polyfilament, celui-ci est enduit par un copolymère caprolactone-glycolide (90–10%). Il est considéré partiellement résorbable. 80% de la tension initiale est conservée au délai de 6 semaines. Cette suture composite présente une faible adhérence bactérienne et donc une excellente tolérance ; elle est intéressante chez des patients prédisposés au risque d'infection ou pour une implantation dans des sites à grand risque de contamination [25].

3.2.3. Biosyn® (Laboratoire Covidien, Norwalk, États-Unis)

Son biomatériau constitutif, le glycomer 631, comprend 14% de dioxanone associé à 60% d'acide glycolique et à 26% de carbonate de triméthylène [1] (Tableau 3).

Ce dernier composant joue le rôle d'assouplissant, ce qui confère à ce fil de grandes qualités de maniabilité et de glissance ainsi qu'une excellente tolérance [24]. Comme toutes les sutures synthétiques résorbables, ces monofils s'hydrolysent en milieu humide donnant 4 métabolites (acide glycolique, acide dioxanolique, propanediol et dioxyde de carbone) éliminés par l'organisme.

C'est une suture à profil de résistance intermédiaire. Ses caractéristiques de résorption sont une perte totale de résistance en 3 semaines et une résorption totale en 90 à 110 jours [1,24].

3.3. Sutures monofilaments à base d'acide glycolique et d'ε-caprolactone

L'ε-caprolactone, comme le carbonate de triméthylène, joue un rôle d'assouplissant. Il confère donc une grande maniabilité et une bonne glissance réduisant le risque de traumatisme tissulaire au moment de l'insertion [1,24,26].

3.3.1. Monocryl® (Laboratoire Ethicon, San Lorenzo, Puerto Rico)

Le polyglécaprone 25 contient de l'acide glycolique à 75% (solidité) et de l'ε-caprolactone à 25% (souplesse et glissance). Il se présente sous forme de fil à résistance intermédiaire (résorption totale en 90 à 120 jours et perte totale de résistance 21 à 28 jours) [1,27]. Il s'agit d'une suture similaire au Biosyn® (Covidien, Norwalk, États-Unis). La dégradation du polyglécaprone par hydrolyse entraîne la libération d'acide adipique métabolisé ensuite par l'organisme. Une étude menée chez le rat comparant le polydioxanone, le glycomer 631 et le polyglécaprone 25 sur leur biocompatibilité a mis en évidence leur bonne tolérance (un peu moindre pour le polydioxanone par rapport aux deux autres) [24].

3.3.2. Maxon® (Laboratoire Covidien, Norwalk, États-Unis)

Le polyglyconate associe l'acide glycolique (72%), le carbonate de triméthylène (14%) et l'ε-caprolactone (14%) : soit une fibre solide avec deux agents assouplissants.

C'est une suture à profil de résistance longue avec une résorption totale en 120 à 180 jours ; il se rapproche du PDS II® (Ethicon, San Lorenzo, Puerto Rico) mais avec une perte de résistance plus rapide de l'ordre de 42 à 49 jours [1,26].

3.3.3. Caprosyn® (Laboratoire Covidien, Norwalk, États-Unis)

Le dernier né de la famille des monofils synthétiques résorbables (2003) est le polyglytone 6211 à profil de résorption rapide (premier monofil à perte de résistance inférieure à 20 jours) par hydrolyse (perte totale de résistance en 10 jours et résorption totale en 56 jours) [1].

Il est comparable de ce fait aux sutures tressées à profil de résistance très rapide telles que le Vicryl® Rapide (Ethicon, San Lorenzo, Puerto Rico) mais il présente les avantages du monofil.

Ces paramètres de résorption se rapprochent également de ceux du Catgut® chromé. Une étude expérimentale [28] a donc fait le comparatif entre ces deux sutures et il en résulte que le polyglytone 6211 présente une meilleure maniabilité et surtout, une bien meilleure tolérance : d'une part, par sa surface lisse (limitant l'adhérence bactérienne) et, d'autre part, en raison de sa dégradation très rapide réduisant de façon significative le risque de réactions tissulaires et de complications à type de granulome. Cependant, une autre étude [29] menée 6 ans plus tard soulève la problématique de l'efficacité de ce type de suture à résorption rapide quant au maintien des tissus au cours du processus de cicatrisation : en effet, la ligature doit présenter une résistance suffisante pendant cette phase critique. Mais il n'a pas été montré de conséquence à type de déhiscence ou de cicatrisation inesthétique.

4. Conclusion

L'implantation d'un fil de suture a pour but d'assurer une bonne cicatrisation des tissus et n'est pas sans conséquence sur l'organisme. Le choix du fil de suture est primordial pour le chirurgien et doit se faire en fonction des qualités recherchées par

BY-NC-ND

celui-ci. La suture idéale n'existant pas, certaines caractéristiques sont privilégiées par rapport à d'autres.

La résorption est l'une de ces principales caractéristiques. Différents profils de résorption sont définis par les temps de perte totale de résistance à la traction et de résorption totale, qui varient selon les paramètres physiques et biologiques des sutures mais aussi en fonction de paramètres individuels.

L'implantation d'un fil de suture engendre inévitablement une réaction tissulaire, dont l'intensité est variable. La résorption du corps étranger est déjà un élément limitant le risque d'infection, d'une part, car il y a disparition totale du fil et, d'autre part, car les métabolites résultants de l'hydrolyse sont physiologiquement connus. De plus, les recherches permettent de mettre au point des sutures de mieux en mieux tolérées.

La classification ici présentée est fondée sur la composition de sutures où des polymères, présents en proportions différentes, influent sur les paramètres de résorption.

Les fils de suture synthétiques résorbables évoqués ne sont pas exhaustifs.

Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références

[1] Gaudy J, Tilotta F, Lazarco B, Bilweis C. Incisions et sutures. Paris: Cahiers de prothèses éditions; 2007.
[2] Dubrana F, Pasquier P. Ligatures et sutures chirurgicales. Paris: Springer-Verlag; 2011.
[3] Tremblay S, Mantovani D. Les fils de suture : de fil en aiguille. Med Que 2003;38:105–8.
[4] Cherif D. Les petites histoires de la médecine. Paris: Société des Écrivains; 2012.
[5] Khiste SV, Ranganath V, Nichani AS. Evaluation of tensile strength of surgical synthetic absorbable suture materials: an in vitro study. J Periodontal Implant Sci 2013;43:130–5.
[6] Blomstedt B, Osterberg B. Fluid absorption and capillarity of suture materials. Acta Chir Scand 1977;143:67–70.
[7] Langley-Hobbs S, Demetriou J, Ladlow J. Feline soft tissue and general surgery. Saunders Elsevier; 2013. p. 105.
[8] Osterberg B, Blomstedt B. Effect of suture materials on bacterial survival in infected wounds. An experimental study. Acta Chir Scand 1979;145:431–4.
[9] Chu CC. A comparison of the effect of pH on the biodegradation of two synthetic absorbable sutures. Ann Surg 1982;195:55–9.
[10] Chu CC, Anthony von Fraunhofer J, Greisler H. Wound closure biomaterials and devices. Hard Cover; 1996. p. 52.
[11] Storch M, Scaiko H, Van Lue S, Jacinto C. Physical and functional comparison of coated VICRYL* plus antibacterial suture (coated polyglactin 910 suture with triclosan) with coated VICRYL* suture (coated polyglactin 910 suture). Surg Inf 2002;3(Suppl. 1):S65–77.
[12] Patel K, Thomas W. Sutures, ligatures and staples. Surg Oxf 2005;23:56–60.
[13] Olivieri M, Bonneau NH. Le choix d'un matériel de suture. Can Vet J 1985;26:9–12.
[14] Meurer J-N [Thèse] Évaluation de l'utilisation des sutures et des ligatures chirurgicales au CHU de Nancy. Nancy: Université de Lorraine; 2004.
[15] Kuznetsova IV, Malbordin IV, Shevele AI, et al. Local tissue reaction to implantation of biodegradable suture materials. Bull Exp Biol Med 2014;157:390–4.
[16] Bourne RB, Biter H, Andrews PR, Martin LM, Finlay JB, Marquis F. In-vivo comparison of four absorbable sutures: Vicryl, Dexon Plus, Maxon and PDS. Can J Surg 1988;31:43–5.
[17] Freudenberg S, Rework S, Kamp M, Weiss C, Dorn-Beineckte A, Post S. Biodegradation of absorbable sutures in body fluids and pH buffers. Eur Surg Res 2004;36:376–85.
[18] Deng M, Zhou J, Chen G, Burkley D, Xu Y, Jamiolkowski D, et al. Effect of load and temperature on in vitro degradation of poly(glycolide-co-L-lactide) multifilament braids. Biomaterials 2005;26:4327–36.
[19] Zhang L, Chu CC, Linh IH. Effect of a combined gamma irradiation and Parylene plasma treatment on the hydrolytic degradation of synthetic biodegradable sutures. J Biom Mat Res 1993;27:1425–41.
[20] Nary Filho H, Matsumoto MA, Batista AC, Lopes LC, de Goes FC, Consolaro A. Comparative study of tissue response to polyglecaprone 25, polyglactin 910 and polytetrafluoroethylene suture materials in rats. Braz Dent J 2002;13:86–91.
[21] Watanabe A, Kohnoe S, Sonoda H, Shirabe K, Fukuzawa K, Maekawa S, et al. Effect of intra-abdominal absorbable sutures on surgical site infection. Surg Today 2012;42:52–9.
[22] Compernolle I. Suture materials: a review. Clin Mat 1989;4:3–12.
[23] Bertrand B, Foletti JM, Bruneau S, Stroumza R, Mancini J, Guyot L, et al. Comparison between Polyglactin 910 (Vicryl(R)) versus irradiated Polyglactin 910 (rapid Vicryl(R)) for mucosal suture after wisdom teeth avulsion. Rev Stomatol Chir Maxillofac 2013;114:63–6.
[24] Moine G, Schemauer P, Bifulco G, D'Angelo D. Comparative study on biocompatibility and absorption times of three absorbable monofilament suture materials (Polydioxanone, Poliglecaprone 25, Glycomer 631). Br J Plast Surg 2000;53:137–41.
[25] Masini BD, Stinner DJ, Waterman SM, Wenke JC. Bacterial adherence to high-tensile strength sutures. Arthroscopy 2011;27:834–8.
[26] Krause M, Lumstedt B, Thiede A. Maxon and PDS--evaluation and physical and biologic properties of monofilament absorbable suture materials. Langenbecks Arch Chir 1987;371:13–28.
[27] Barwala RS, Jamiolkowski DD, Lee IY, Agarwal V, Persivale J, Trenka-Benthin S, et al. Monocryl suture, a new ultra-pliable absorbable monofilament suture. Biomaterials 1995;16:1141–8.
[28] Chung E, McPherson N, Grant A. Tensile strength of absorbable suture materials: in vitro analysis of the effects of pH and bacteria. J Surg Educ 2009;66:208–11.
[29] Naghshineh N, Ota KS, Yang L, O'Toole J, Rubin JP. A double-blind controlled trial of polydioxanone 6-211 versus poliglecaprone 25 for use in body contouring. Ann Plast Surg 2010;65:124–8.

BY-NC-ND

<u>Article 3 :</u> Intra-articular gentamicin-loaded PLGA microparticles injection for the treatment of MSSA arthritis in Rabbits

Authors: P-S Marcheix[1], MD · Ch Martin[2], MD · E Denes[2], MD · X Leclercq[3], MD · M Vert[3], PharmD, PhD ·F Sturtz[4], MD PhD.

Soumis à J***ournal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons***

Title: Intra-articular gentamicin-loaded PLGA microparticles injection for the treatment of MSSA arthritis in Rabbits

Authors: P-S Marcheix[1], MD · Ch Martin[2], MD · E Denes[2], MD · X Leclercq[3], MD · M Vert[3], PharmD, PhD ·F Sturtz[4], MD PhD.

<u>Affiliation of the Authors:</u>

1- Department of Orthopedic Surgery, Dupuytren University Hospital. 2, Avenue Martin Luther King, 87042 LIMOGES cedex.
2- Department of bacteriology, Dupuytren University Hospital. 2, Avenue Martin Luther King, 87042 LIMOGES cedex.
3- Research Center for Artificial Biopolymers, Faculty of Pharmacy; Montpellier, France
4- Department of Biochemistry, EA6309, University of Limoges, Dupuytren University Hospital. 2, Avenue Martin Luther King, 87042 LIMOGES cedex.

<u>Corresponding Author:</u>

Dr. PS Marcheix, Department of Orthopedic Surgery, Dupuytren University Hospital. 2, Avenue Martin Luther King, F-87042 LIMOGES cedex. Tel: +33 555 055 555. E-mail: psmarcheix@orange.fr

Short title: Gentamicin-loaded polymer for MSSA arthritis

Key words: Experimental model, rabbit, osteoarthritis, gentamicin, Staphylococcus Aureus.

No conflict of interest

BY-NC-ND

Abstract

Background: As local delivery of drugs induces high concentrations, it could be helpful to apply these delivery systems to the treatment of septic arthritis by antibiotics. Thus, a Gentamicin loaded-polymer was tested in a Rabbit model of *Staphylococcus Aureus* septic arthritis.

Methods: Gentamycin and PLA powder were mixed to produce micrometric injectable microparticles. Infected rabbits with Methicillin sensitive Staphylococcus aureus were split into 5 groups (A: infection only, B: infection and systemic gentamicin treatment, C: infection and unloaded polymer and systemic gentamicin treatment, D: infection and gentamicin-loaded polymer only, E: no infection and unloaded polymer).

Results: 100% rabbits survived at day 15 despite a MSSA joint infection in all cases confirmed by bacteriological analysis. Compared with control groups, an important decrease of bacteria level (5000 fold or 3.5 units of $\log_{10}$ CFU/mg decrease) was achieved with the gentamicin-containing microparticles 15 days post-infection.

Conclusion: Gentamicin-containing microparticles were more efficient in reducing bacteria load of septic arthritis in rabbits than systemic injections of gentamicin.

Key words: Experimental model, rabbit, osteoarthritis, gentamicin, Staphylococcus Aureus.

BY-NC-ND

Introduction

Septic arthritis is a challenging illness that could lead to severe impairment or to chronicity. In humans, knee is the most frequently affected joint by this type of infection [1, 2]. Current treatments rely on the reduction of the intra-articular bacterial load, on the evacuation of necrotic cells by mechanical washing and synovectomy of the joint, and on a long-term antibiotic therapy, usually up to 6 weeks [3-5]. This antibiotic therapy is usually given intravenously as antibiotic diffusion into bones and joints is rather poor thus requiring the use of high doses and prolonged parenteral treatment [3, 6]. Moreover, it is not uncommon to have to "rewash" the joint to curb the infection [7]. Different drug carriers (cement, collagen, biopolymers) were used to potentiate systemic treatments by direct administration of an antibiotic into the infected site [8-10]. The results obtained are puzzling. Cements with antibiotics have been used since the 70's. However, these do not seem to provide appropriate pharmacokinetic releases. In general, poly(methyl methacrylate) (PMMA) cements exhibited early burst followed by important reduction of the release rate for several days and residual release persisting for several years raising the problem of bacteria resistance [11]. Collagen was also widely used [12-14]. It is biocompatible, non-toxic and its chemical, physical, biological and immunological characteristics are well identified. Most of time, it is used as a sponge. The porosity of collagen-based sponges containing 200 mg of gentamicin can ensure local release of rather high doses of the antibiotic while serum concentrations remaining low and below toxic levels.

The question of animal models of septic arthritis is important. A literature survey found 18 main studies: 2 used rats [15, 16], 3 used mice [17-19] and 13 studies rabbits [13, 20-31]. Most of the recent studies involved rabbits. Indeed, rabbits offer knee sizes that allow easy

BY-NC-ND

surgery. The joint volume is estimated to be 5 mL [32]. However, in the literature, rabbit models of septic arthritis differ from each other in terms of injected bacteria load (range of 6 $\log_{10}$ from 10^2 CFU [33] to 10^8 CFU [22]. Several years ago, some of us proposed gentamycin-containing microparticles made of hydrolytically degradable poly(D,L-lactic acid), PLA, as a means to powder a surgical site prior to suturing in order to achieve local sustained release later on [34]. The microparticles composed of gentamycin sulfate (GS) and high molecular amorphous PLA were made by mixing the two components in solution, elimination of the solvent, grinding and finally sieving. This type of microparticles was selected instead of usually studied microspheres because the drug load can be easily controlled. The polymer/drug microparticles were allowed to age in pH = 7.4, 0.13 mol/L sodium phosphate buffer at 37°C. The release profiles of gentamycin were biphasic with a load-dependent initial burst followed by a phase of sustained release that lasted for more than two months. Only the 0.5-l mm, 10% w/w GS-loaded PLA microparticles provided release rates compatible with requirements for local antibiotic therapy.

The objective of the present work was to check the potential of intra-articular gentamicin-loaded PLA microparticles to cure joint infection by methicillin-sensitive Staphylococcus aureus (MSSA) in the rabbit knee. We therefore designed a study to answer the following questions: (1) how much Staphylococcus aureus is necessary to obtain septic arthritis in rabbit? (2) Is a gentamicin loaded-polymer able to treat septic arthritis in rabbit? (3) Do a gentamicin loaded-polymeric microparticles induce local toxicity?

Materials and methods

BY-NC-ND

- **Gentamicin**

This antibiotic was supplied by Sigma (G1264, Sigma, France) as a sulfate and was used as received.

- **Polymer synthesis**

The PLA polymer was prepared by ring opening polymerization of D,L-lactide in bulk at 140°C using zinc lactate as the initiator [34]. The recovered polymeric mass was purified by the solvent-precipitant method using the acetone/methanol couple. Mean average molar mass (Mm = 100,000 g/mol) and polydispersity (Mm/Mn = 2.7) were determined by Size Exclusion Chromatography as described by Mauduit et al. [34].

- **Gentamycin-PLA microparticles (GS-PLA microparticles)**

The microparticles of gentamicin-loaded PLA were prepared by compressing a homogeneous mixture of grinded PLA powder and sieved Gentamicin sulfate (< 45 µm, 20% w/w) at 120°C under a pressure of 5000 Psi for 10 min. The resulted disc was then ground and sieved. Powder fractions smaller than 500 µm were collected and vacuum-dried. GS contents were assessed by colorimetry after TNBS-derivatization.

- **In vitro release profiles of Gentamycin-PLA microparticles (GS-PLA microparticles)**

We incubated at 37 ° C with agitation (150 rpm) 1.6 mg of gentamicin (or 8 mg GS-PLA microparticles) in 5 mL of PBS or 5 mL of Fetal bovin serum (FBS). We dosed gentamicin from 1 hour to 60 days.

- ***Staphylococcus aureus* strain and induction of septic arthritis in rabbits**

The protocol of this study was submitted and authorized by the Institution ethics committee. Female New Zealand white rabbits, aged 3-4 months, weighing about 4 kg were obtained from the Neuville breeding center. Each rabbit used in this study was housed solely. Rabbits had free access to food and water and were housed under

BY-NC-ND

conditions of controlled temperature in a dedicated room. Before starting the treatment, animals were accustomed for 7 days in order to decrease the stress induced by the procedure. The strain used was a Staphylococcus aureus isolated from the skin abscess of a rabbit (N°132160, Departmental Laboratory of Veterinary Medicine). This strain was a methicillin-sensitive strain (MSSA). Bacteria suspensions were prepared immediately prior to injection and bacteria load was checked by counting. All procedures were performed under strict sterile surgical conditions. Rabbits were anesthetized using ketamine. Septic arthritis was induced in rabbits by the injection of 1 ml of bacteria suspension in the right knee joint. The bacteria concentration varied from 10^3 to 10^8 CFU per ml for establishing our model. Thereafter, a concentration of 10^3 CFU was retained for the main experiment with the different groups.

- **Surgical procedure and experimental design**

During all surgical procedures, rabbits were anesthetized by I.P. injection of Ketamine (20 mg/kg). Furthermore, since arthritis induces pain and sometimes anorexia, all rabbits received a systemic analgesia (daily injection of buprenorphine at a dose of 0.3 mg/kg/24 h). All rabbits were followed with the same monitoring of clinical criteria summarized in Table 1. Body temperature was taken rectally. White blood cell count was performed from a puncture of the ear central vein. One day after bacterial infection, the knee joints were surgically opened and microparticles were powdered within the opened synovial capsule.

For the main experiment, rabbits were split into 5 different groups, which are summarized in Table 2. Rabbits of Group A had an isolated joint infection. Rabbits of Group B were used to study the effect of general antibiotic therapy on septic arthritis and were treated with gentamicin administered subcutaneously (see below for dose). Group C was meant to verify the lack of effect of unloaded PLA on the evolution of septic

BY-NC-ND

arthritis treated with systemic gentamicin. These rabbits had an infection but received unloaded PLA with subcutaneous gentamicin. Group D studied the effect of GS-PLA microparticles in the treatment of septic arthritis. Group E was designed to assess the possible toxicity of local PLA in the absence of infection.

The total dose of gentamicin subcutaneously injected to the rabbits of Group B and Group C was 168 mg (once a day, 24 mg/day for 7 days). In the group treated with GS-PLA microparticles (Group D), the total weight of microparticles used per rabbit was 750 mg and gentamicin accounted for 150 mg. At Day 15, all rabbits were euthanized by subcutaneously injection of a lethal dose of ketamine and bacteriological and pathological examinations were performed.

- **Bacteriological study**

To assess the remaining infection in the joints, samples of the synovial capsule were taken surgically after euthanasia, crushed and seeded on Petri dish. Subsequent dilutions were made in order to obtain a precise measure of the remaining bacterial load for each rabbit. Results were expressed in colony forming units per gram of tissue (CFU/g).

- **Toxicity study**

The possible toxicity of the polymer was studied in the group E. In this group, unloaded PLA microparticles were injected in the rabbit joints without any infection and, alike the other rabbits, the joint capsules were analyzed 15 days later. Toxicity was assessed by clinical observation and pathological examination (HES staining).

- **Statistical analysis**

Results of the quantitative variables are presented as mean ± standard error of the mean. Comparisons of distribution of quantitative variables were performed using the Mann-Whitney test for independent samples. Statistical analysis was performed in

BY-NC-ND

Statview 9.0 (SAS Institute, Cary, USA). The level of significance chosen for all statistical analyzes was 0.05.

Results

- **Model of arthritis in rabbit**

To establish our animal model, 14 female rabbits with an average weight of 3.8 kg (3 to 4.5 kg) were used. The injection 1 mL of a solution containing 10^3 CFU/mL of MSSA allowed us to obtain 100% rabbit survival at 15 days with a joint infection in 100% cases, confirmed by bacteriological analysis (Table 3).

- **In vitro release profiles of Gentamycin-PLA microparticles (GS-PLA microparticles)**

Figure 1 present the release profiles of Gentamycin given by GS-PLA microparticles. A maximum peak of gentamicin was obtained at day 12 and then we observed a stabilization of the release until the second month. 54% Gentamycin was release during the first 3 weeks.

- **Antibacterial effect of Gentamicin-loaded microparticles (Figure 2)**

A significant antibacterial effect of the gentamicin-loaded polymer (Group D) was found on day 15 while the rabbits of groups receiving gentamicin systemically (B and C) were not improved. Gentamicin-loaded microparticles reduced by a factor varying from 1,000 to 10,000 the bacterial load in comparison to group A, B and C (Figure 1). This decrease in Group D was found to be statistically significant against the other infected groups (A, B and C, p = 0.02, 0.08 and 0.02 respectively) using the Mann & Whitney test. Importantly, in Group D, 2 rabbits were completely cured, meaning that they had no

BY-NC-ND

detectable remaining bacteria at day 15, when none was cured in the other infected groups (A, B or C). Comparison between groups A and B showed no positive effect of systemic gentamicin alone in this model. Comparison between groups B and C showed no therapeutic effect of unloaded PLA microparticles. All together, there was no detectable effect of systemic antibiotic treatment or unloaded PLA polymer despite the sensitivity of the bacteria strain to gentamicin.

Clinically, infected rabbits had lameness, were moving less than before infection despite antalgic treatment. Two rabbits in group A, B and C had to be euthanized 2 days prior to day 15 due to ethical considerations (important weight loss) or fistulization of the arthritis. No such situation occurred in rabbits of Group D. There was no difference with respect to weight, body temperature and white blood cell counts between the 4 groups with infection (A, B, C, D) when checked at the same day. However, rabbits with infection tended to lose weight between day 0 and day 15.

- **Tolerance of the polymer**

The safety of the unloaded microparticles was studied with group E. At day 15 post-injection, rabbits moved normally, i.e. had no lameness and showed a good clinical tolerance with a moderate weight gain (+ 0.4 kg in 15 days). On day 15, the polymer was not entirely degraded as a few remaining particles could be found in the joint. The pathological examination showed a moderate macrophages reaction with giant cells as well as optically empty vacuoles related to degradation of the polymer by histological preparation products (Figure 3).

Discussion

BY-NC-ND

Joint infection is a difficult illness to treat [7, 25], benefiting mostly of surgical débridement and prolonged antibiotic therapy [25]. However, articular vascularization is of poor quality and the joint distribution of antibiotic is limited. For Frimodt-Moller, antibiotics concentration in the joints is five times lower than the antibiotic concentration obtained in the plasma when the dose is administered systematically [35]. Many devices, including poly-methylmethacrylate cements or beads, collagen sponges, polylactide/polyglycolide or polylactate polymers have attempted to bring antibiotic locally and thus obtain concentrations higher than the minimum inhibitory concentration for several days at the site of infection [36-38]. However, these devices are not devoid of drawbacks, such as being non-biodegradable foreign bodies, having a poor pharmacokinetics or a limited load. In the current study, the therapeutic effect of gentamicin-loaded PLA microparticles has been shown on an established infection in an animal model that mimic quite well the human disease. Intentionally, we introduced the gentamicin-loaded particles only 24 hours after the injection of the MSSA in the knee joint. This period of time was sufficient for the bacteria to establish its biofilm and, therefore its virulence. Gentamicin-loaded PLA microparticles significantly reduced intra-articular bacterial load while the systemic antibiotic treatment did not significantly reduce the intra-articular infection when compared to the untreated group (A). Interestingly, 2 rabbits of Group D were totally cured by the gentamicin-loaded polymer while the 4 others had a remaining infection yet noticeably reduced. It is interesting to note that a local-only treatment was able to cure the infection in 1/3 of the cases. The remaining infections may be due to the fact that particles could not go in every single recess of the joint or that bacterial biofilm was too well established to be removed. The effect was due to the local delivery of gentamicin and not to the PLA polymer only as rabbits in Group C (infection and unloaded polymer), exhibited an increased infection, although not

BY-NC-ND

statistically significant, when compared to Group A rabbits (infection only) showing that the unloaded polymer may exert a 'foreign body' effect on which bacteria find a place to dwell. Finally, it is surprising that the rabbits of the 2 systemically treated groups (B and C) did not show any therapeutic effect of the gentamicin. This may be due to high initial load of bacteria in the joint and to the poor joint vascularization. These observations are comparable to those of Wang, who could not cure spondylitis arthritis in rabbit but could neutralize infection by the use of PLA charged with vancomycin [39]. In any case, this treatment may be useful in the future for reducing the dose of intra-venous antibiotic as proposed by other authors [40].

Literature is very inhomogeneous with respect to animal models of septic arthritis and there is no 'gold standard' regarding strain or bacteria load. Therefore, our work began by checking septic arthritis models found in literature [21-24, 26-31, 41]. MSSA was the most often used strain. After several trials, we found that 103 CFU of our strain was an adequate load to surely get infection with no rabbit death over a period of 15 days. This bacteria load was 10 times lower than the one used by Wysenbeeck in 1998, which was the closest to our initial goals [7] but we did not use the same strain. Our strain came from a rabbit skin abscess and was, most likely, quite pathogenic in this species. We found also that a period of adaptation about one week was necessary to the rabbits to decrease stress and unexpected death [25] and pain management by buprenorphine injections was also not only ethical but also useful.

Several techniques have been proposed to deliver gentamicin locally, although not always for treating arthritis. They all have some advantages but also drawbacks. PMMA beads or molded cements cannot be easily used in joints, as they are non-resorbable foreign bodies and impair functional recovery. Collagen sponges can be used but they release the antibiotic quite rapidly.

BY-NC-ND

By comparison, the main interests of the current gentamicin-loaded PLA polymer are the following: (i) it is fully resorbable in molecules (lactate mainly) which are generally regarded as safe (uptaken by the liver and recycled), (ii) the release of gentamicin from the polymer is stable over time (data not shown), (iii) the total hydrolysis of the polymer occurs in only 2 to 3 weeks, avoiding the risk of a long term release of gentamicin and the risk of antibiotic resistance.

Pharmacokinetic studies on antibiotic release from polymers are quite rare and difficult to compare. The available studies indicate either a very rapid release (30 min to 2 h), or a very long release (few weeks to few months). In the case of fast release (compress collagen for example), toxic doses can be reached in the blood because of an important burst effect. Moreover, antibiotic load is not very high (200 mg) and corresponded to a few intra-venous injections of gentamicin. In the case of very prolonged release (PMMA for example), the daily amount of antibiotic release is very low. Another problem, that may arise, is the emergence of resistant bacterial strains because of low concentrations of antibiotics. In our case, the polymeric microparticles appeared to allow a complete release over several days but the polymer is absorbed entirely in 3 to 4 weeks. Moreover, PLA is an excellent biocompatible polymer. This polymer is fully biodegradable and non-toxic, allowing a gradual release of vancomycin over several days [39]. Most other systems, for their part, release the antibiotic only for a few hours [42]. In our study, microparticles caused, as in Wang's study, a macrophage reaction with giant cells (foreign body reaction) [39]. However, this reaction was clinically well tolerated with a return to normal use of the leg treated during the first week.

Ideally, a monitoring of the intra-articular concentrations of gentamicin released by the microparticles would be necessary using a microdialysis technique. It is however difficult to maintain a microdialysis device in so many rabbits for such a long time.

BY-NC-ND

Nevertheless, we are planning to pursue our work by conducting a microdialysis of the joint to determine the required dose of microparticles so as to obtain locally a prolong release of antibiotic above the MIC of the MSSA.

Conclusion

All together, these results exhibit the potential help of local delivery of gentamicin. However, the question of the formulation has to be raised. Would it be preferable to deliver gentamicin via microparticles or via injectable pastes such as hydrogels? To our opinion, as microparticles need to be inserted surgically, it would probably be more convenient to inject a gentamicin-loaded hydrogel such as that proposed by Overstreet et al. [43]. Although its degradation and in vivo behavior remains to be defined. Hydrogels would go more easily into cavities than microparticles do, provided that the drug release profile satisfies the need of treatment.

References

1. Smith JW, Piercy EA. Infectious arthritis. Clin Infect Dis. 1995;20(2):225-30; quiz 31.
2. Vincent GM, Amirault JD. Septic arthritis in the elderly. Clin Orthop Relat Res. 1990(251):241-5.
3. Bussiere F, Beaufils P. [Role of arthroscopy in the treatment of pyogenic arthritis of the knee in adults. Report of 16 cases]. Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot. 1999;85(8):803-10.
4. Esterhai JL, Jr., Gelb I. Adult septic arthritis. Orthop Clin North Am. 1991;22(3):503-14.
5. Lane JG, Falahee MH, Wojtys EM, Hankin FM, Kaufer H. Pyarthrosis of the knee. Treatment considerations. Clin Orthop Relat Res. 1990(252):198-204.
6. El-Husseiny M, Patel S, MacFarlane RJ, Haddad FS. Biodegradable antibiotic delivery systems. J Bone Joint Surg Br. 2011;93(2):151-7.

BY-NC-ND

7. Wysenbeek AJ, Volchek J, Amit M, Robinson D, Boldur I, Nevo Z. Treatment of staphylococcal septic arthritis in rabbits by systemic antibiotics and intra-articular corticosteroids. Ann Rheum Dis. 1998;57(11):687-90.

8. Chaudhary S, Sen RK, Saini UC, Soni A, Gahlot N, Singh D. Use of gentamicin-loaded collagen sponge in internal fixation of open fractures. Chin J Traumatol. 2011;14(4):209-14.

9. Lewis CS, Supronowicz PR, Zhukauskas RM, Gill E, Cobb RR. Local antibiotic delivery with demineralized bone matrix. Cell Tissue Bank. 2011.

10. Soundrapandian C, Basu D, Sa B, Datta S. Local drug delivery system for the treatment of osteomyelitis: In vitro evaluation. Drug Dev Ind Pharm. 2011;37(5):538-46.

11. Kuhn K. Bone cements. Up to date comparson of physical and chemical properties of commercial materials.: Springer, Berlin Heidelberg New York; 2000.

12. Mendel V, Simanowski HJ, Scholz HC, Heymann H. Therapy with gentamicin-PMMA beads, gentamicin-collagen sponge, and cefazolin for experimental osteomyelitis due to Staphylococcus aureus in rats. Arch Orthop Trauma Surg. 2005;125(6):363-8.

13. Riegels-Nielsen P, Espersen F, Holmich LR, Frimodt-Moller N. Collagen with gentamicin for prophylaxis of postoperative infection. Staphylococcus aureus osteomyelitis studied in rabbits. Acta Orthop Scand. 1995;66(1):69-72.

14. Stolle L, Arpi M, P HJ, Riegels-Nielsen P, Keller J. Distribution of gentamicin from a Gentacoll sponge measured by in vivo microdialysis. Scand J Infect Dis. 2005;37(4):284-7.

15. Inman RD, Chiu B. Heavy metal exposure reverses genetic resistance to Chlamydia-induced arthritis. Arthritis Res Ther. 2009;11(1):R19.

16. Kabak S, Halici M, Yakan B, Kutlubay R, Kula M. [Comparison of the effects of NG-monomethyl-L-arginine and indomethacin on tuberculous arthritis: an experimental study in rats]. Acta Orthop Traumatol Turc. 2002;36(2):155-61.

17. Guo Y, Li J, Hagstrom E, Ny T. Protective effects of plasmin(ogen) in a mouse model of Staphylococcus aureus-induced arthritis. Arthritis Rheum. 2008;58(3):764-72.

18. Lubberts E, Joosten LA, Helsen MM, van den Berg WB. Regulatory role of interleukin 10 in joint inflammation and cartilage destruction in murine streptococcal cell wall (SCW) arthritis. More therapeutic benefit with IL-4/IL-10 combination therapy than with IL-10 treatment alone. Cytokine. 1998;10(5):361-9.

BY-NC-ND

19. Tanaka M, Kinoshita M, Yoshihara Y, Shinomiya N, Seki S, Nemoto K, et al. Photodynamic therapy using intra-articular Photofrin for murine MRSA arthritis: biphasic light dose response for neutrophil-mediated antibacterial effect. Lasers Surg Med. 2011;43(3):221-9.

20. Alt V, Bitschnau A, Osterling J, Sewing A, Meyer C, Kraus R, et al. The effects of combined gentamicin-hydroxyapatite coating for cementless joint prostheses on the reduction of infection rates in a rabbit infection prophylaxis model. Biomaterials. 2006;27(26):4627-34.

21. Eren A, Ugutmen E, Ozkan K, Turhan Y, Eceviz E, Cilli F. Chondroprotective effect of salicylate and chloroquine in pyogenic septic arthritis. Adv Ther. 2008;25(2):133-42.

22. Grossi O, Caillon J, Arvieux C, Jacqueline C, Bugnon D, Potel G, et al. In vivo efficacy of moxifloxacin compared with cloxacillin and vancomycin in a Staphylococcus aureus rabbit arthritis experimental model. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51(9):3401-3.

23. Johnson AH, Campbell WG, Jr., Callahan BC. Infection of rabbit knee joints after intra-articular injection of Staphylococcus aureus. Comparison with joints injected with Staphylococcus albus. Am J Pathol. 1970;60(2):165-202.

24. Lefevre S, Ruimy D, Jehl F, Neuville A, Robert P, Sordet C, et al. Septic arthritis: monitoring with USPIO-enhanced macrophage MR imaging. Radiology. 2011;258(3):722-8.

25. Oner M, Kafadar I, Guney A, Halici M, Deniz K, Turk Y, et al. Effect of intraarticular propolis in an experimental septic arthritis model. J Pediatr Orthop B. 2011;20(1):8-13.

26. Riegels-Nielson P, Frimodt-Moller N, Jensen JS. Rabbit model of septic arthritis. Acta Orthop Scand. 1987;58(1):14-9.

27. Salter RB, Bell RS, Keeley FW. The protective effect of continuous passive motion in living articular cartilage in acute septic arthritis: an experimental investigation in the rabbit. Clin Orthop Relat Res. 1981(159):223-47.

28. Sartoris DJ, Guerra J, Jr., Mattrey RF, Resnick D, Haghighi P, Mitten R, et al. Perfluoroctylbromide as a contrast agent for computed tomographic imaging of septic and aseptic arthritis. Invest Radiol. 1986;21(1):49-55.

29. Schurman DJ, Lightholder J, Mirra J, Burton DS, Nagel DA. Synovial joint infection: I Gram-negative septic arthritis in rabbit knee joints. Surg Forum. 1975;26:503-5.

BY-NC-ND

30. Schurman DJ, Mirra J, Ding A, Nagel DA. Experimental E. coli arthritis in the rabbit. A model of infectious and post-infectious inflammatory synovitis. J Rheumatol. 1977;4(2):118-28.

31. Smith RL, Kajiyama G, Schurman DJ. Staphylococcal septic arthritis: antibiotic and nonsteroidal anti-inflammatory drug treatment in a rabbit model. J Orthop Res. 1997;15(6):919-26.

32. Matsuzaka S, Sato S, Miyauchi S. Estimation of joint fluid volume in the knee joint of rabbits by measuring the endogenous calcium concentration. Clin Exp Rheumatol. 2002;20(4):531-4.

33. Frimodt V. [There should be a relationship between purpose and philosophy]. Sygeplejersken. 1987;87(6):30-1.

34. Mauduit J, Bukh N, Vert M. Gentamycin/poly (lactic acid) blends aimed at sustained release local antibiotic therapy administered per-operatively. I. The case of gentamycin base and gentamycin sulfate in poly (D,L-lactic acid) oligomers. J Control Rel. 1993;23(3):209-20.

35. Frimodt-Moller N, Riegels-Nielsen P. Antibiotic penetration into the infected knee. A rabbit experiment. Acta Orthop Scand. 1987;58(3):256-9.

36. Ambrose CG, Gogola GR, Clyburn TA, Raymond AK, Peng AS, Mikos AG. Antibiotic microspheres: preliminary testing for potential treatment of osteomyelitis. Clin Orthop Relat Res. 2003(415):279-85.

37. Calhoun JH, Mader JT. Treatment of osteomyelitis with a biodegradable antibiotic implant. Clin Orthop Relat Res. 1997(341):206-14.

38. Kanellakopoulou K, Giamarellos-Bourboulis EJ. Carrier systems for the local delivery of antibiotics in bone infections. Drugs. 2000;59(6):1223-32.

39. Wang F, Ni B, Zhu Z, Liu F, Zhu YZ, Liu J. Intra-discal vancomycin-loaded PLGA microsphere injection for MRSA discitis: an experimental study. Arch Orthop Trauma Surg. 2011;131(1):111-9.

40. Ambrose CG, Clyburn TA, Louden K, Joseph J, Wright J, Gulati P, et al. Effective treatment of osteomyelitis with biodegradable microspheres in a rabbit model. Clin Orthop Relat Res. 2004(421):293-9.

41. Riegels-Nielsen P, Frimodt-Moller N, Sorensen M, Jensen JS. Synovectomy for septic arthritis. Early versus late synovectomy studied in the rabbit knee. Acta Orthop Scand. 1991;62(4):315-8.

BY-NC-ND

42. Stallmann HP, Faber C, Bronckers AL, Nieuw Amerongen AV, Wuisman PI. In vitro gentamicin release from commercially available calcium-phosphate bone substitutes influence of carrier type on duration of the release profile. BMC Musculoskelet Disord. 2006;7:18.

43. Overstreet D, McLaren A, Calara F, Vernon B, McLemore R. Local gentamicin delivery from resorbable viscous hydrogels is therapeutically effective. Clin Orthop Relat Res. 2015;473(1):337-47.

BY-NC-ND

Figures and tables

Table 1: Clinical criteria monitored for all groups

Day 0	Day 1	Day 7	Day 15
Infection	Injection of polymer		
- Weight - White blood cell count - Temperature	- Weight - White blood cell count - Temperature	- Weight - White blood cell count - Temperature	- Weight - White blood cell count - Temperature - Bacteriological study

Table 2: Constitution of the different groups of the study

Methicillin sensitive Staphylococcus aureus (MSSA) were prepared immediately before injection and injected in the right knee of the rabbits. Subcutaneous injections of gentamicin (Groups B and C) were started the same day the polymer (PLA or GS-PLA) was injected in Groups C, D and E. PLA did not contain Gentamicin while GS-PLA contained Gentamicine at a dose of 200 mg/g of polymer.

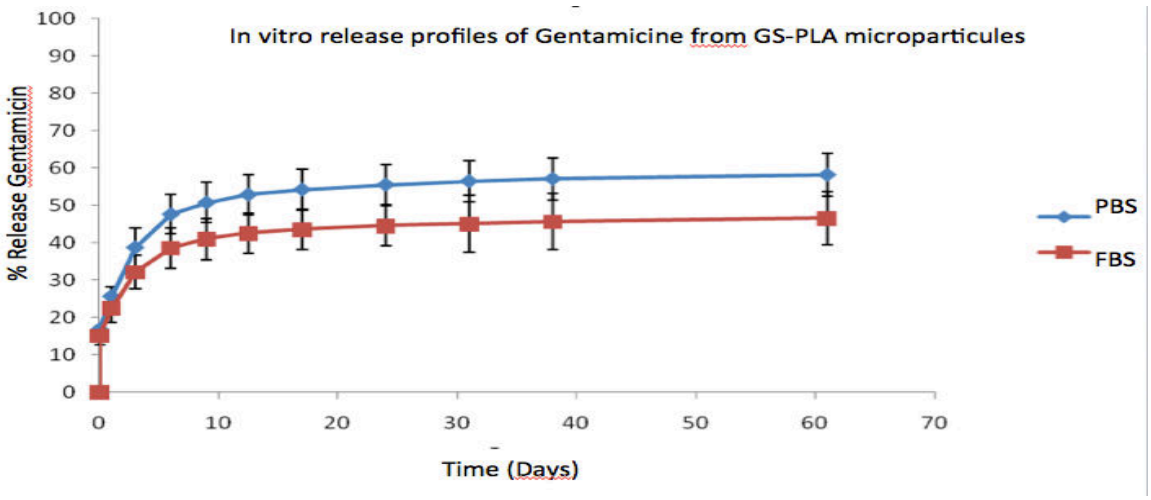
Groups	Number of Rabbits	MSSA 10^3 CFU 1 ml	Subcutaneous Gentamicine (24 mg/day for 7 days)	PLA	GS-PLA
A	6	+	-	-	-
B	6	+	+	-	-
C	6	+	+	+	-
D	6	+	-	-	+
E	6	-	-	+	-

BY-NC-ND

Table 3: Animal model of septic arthritis

LAPIN N°	Weight	Bacterial strain	Concentration CFU/ml (1ml)	Arthritis	Survival at day 15
1	4 kg 500	Animal	10^8	+	-
2	4 kg	Animal	10^8	+	-
3	4kg 200	Animal	10^7	+	-
4	4 kg	Animal	10^7	+	-
5	3 kg 500	Animal	10^6	+	-
6	4 kg 200	Animal	10^6	+	-
7	3 kg	Animal	10^5	+	-
8	3 kg 200	Animal	10^5	+	-
9	3 kg 700	Animal	10^4	+	-
10	4 kg	Animal	10^4	+	+
11	3 kg 500	Animal	10^3	+	+
12	3 kg 800	Animal	10^3	+	+
13	3 kg 500	Animal	10^3	+	+
14	4kg	Animal	10^3	+	+

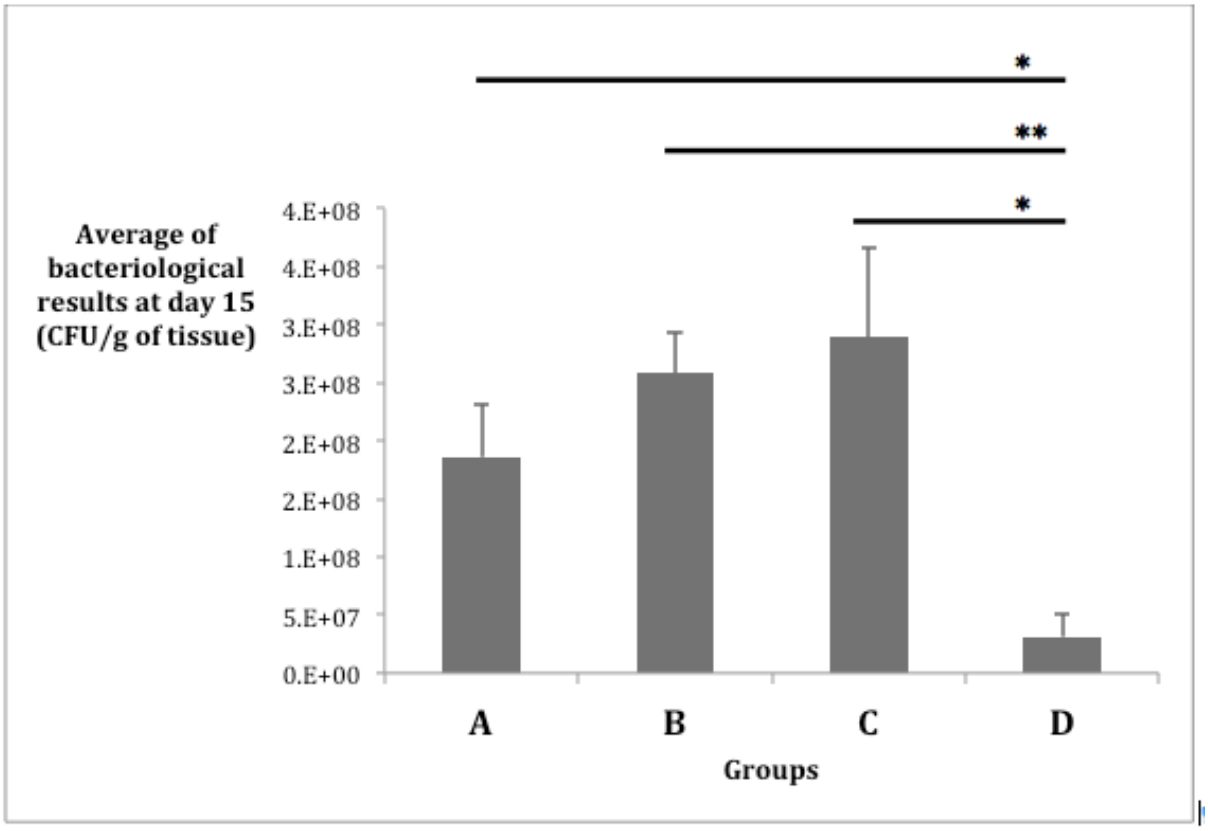
Figure 1: In vitro release profiles of GS-PLA microparticles



BY-NC-ND

Figure 2: Comparison of bacterial count between different groups. Results are expressed as mean and SD

At day 15, remaining bacteria were counted and standardized per gram of tissue. Bars represent the mean of each group : Group A (n = 6, infection only), Group B (n = 5, infection and Gentamicin i.p.), Group C (n = 6, infection and unloaded microparticles of polymer), Group D (n = 6, infection and gentamicin-loaded polymer). The groups were compared using the Mann-Whitney test. Group A, B and C were not statistically different. Group D bacterial load was lower compared to all other groups and this was statistically significant (p = 0.02, p = 0,008, p = 0,02, for A, B and C respectively). Errors bars express the standard error of the mean (SEM).

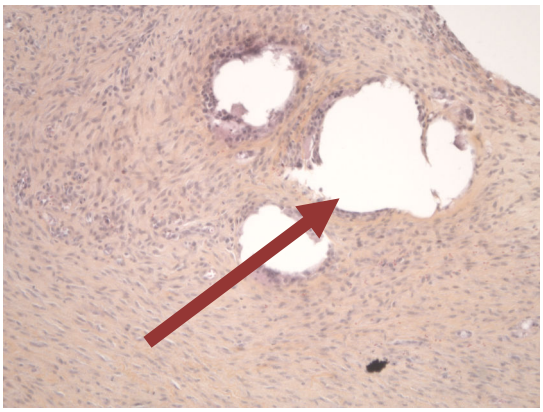


BY-NC-ND

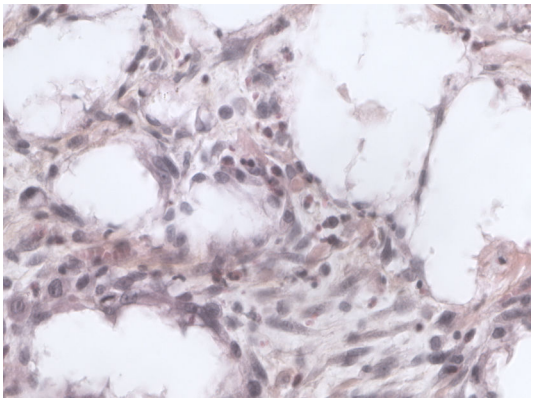
Figure 3: Histological examination of the joint capsule of rabbits in group E

Optically empty vacuoles (Arrow) related to particles of the polymer were visible with HES staining and were surrounded by a moderate macrophage reaction with Giant cells (foreign body reaction). The particles them selves had been destroyed by the pathological preparation. A: 10x magnification. B : 40x magnification.

A



B



BY-NC-ND

Résumé

Le traitement d'une infection des parties molles, d'une ostéomyélite ou d'une arthrite septique aiguë ou chronique nécessite une prise en charge longue, obligeant à des chirurgies itératives et à un traitement antibiotique systémique prolongé allant de 6 semaines à 3 mois au minimum. La diffusion des antibiotiques dans l'os ou dans une articulation est faible et oblige les infectiologues à utiliser une antibiothérapie à forte dose, parentérale et prolongée. À ce jour, le polyméthacrylate de méthyle (PMMA) est le vecteur d'antibiotique le plus fréquemment utilisé chez l'homme dans le cadre du traitement d'une infection ostéo-articulaire. Cependant les PMMA sont non résorbables et obligent à multiplier les interventions chirurgicales afin d'aboutir au traitement définitif de l'infection ostéo-articulaire. De plus, ce vecteur local ne permet pas une libération complète de l'antibiotique au cours du temps, avec de surcroît des doses inférieures à la CMI du germe en cause, pouvant faciliter l'émergence de bactéries résistantes. L'objectif de notre travail était donc d'améliorer la prise en charge des infections ostéo-articulaires par une libération locale efficace et prolongée d'antibiotique grâce à un polymère entièrement résorbable.

Le cahier des charges établi pour l'élaboration de ce polymère était le suivant. Le traitement local et per-opératoire visant à libérer un antibiotique a été défini comme nécessitant un système matriciel offrant une libération de gentamicine à une dose de 1 à 2 mg/jour/g de mélange sur une période de plus de 10 jours. Ce système matriciel devait avoir des caractéristiques physiques appropriées et un taux de relargage suffisant pour permettre un traitement le plus sécuritaire possible tout en permettant une mise en place simple. De plus, le polymère devait être bio-résorbable, c'est-à-dire qu'il devait pouvoir être dégradé jusqu'à obtenir des fragments pouvant être éliminés naturellement par l'organisme. Afin de répondre à ces exigences, il a été créé le $PLA_{50}P$, Poly(D,L-acide lactique) de haut poids moléculaire. L'utilisation de ce polymère sous forme de particules de grosses tailles (0,5 à 1mm) permettait de limiter l'effet « burst » initial. Afin d'obtenir le mélange gentamycine-PLA, une technique de compression des poudres des deux composants a été mise en œuvre. La charge en antibiotique devait être de 20%, toujours dans un objectif de limitation du « burst » initial. Ce polymère pouvait être stérilisé par γ-irradiation, sans influence sur les caractéristiques de relargage du polymère.

La cinétique *in vitro* de la gentamicine relarguée par le $PLA_{50}GS$ montrait un pic maximum de gentamicine libérée obtenu à 12 jours et une stabilisation ensuite jusqu'à 63 jours de la quantité relarguée. La quantité cumulée de gentamicine relarguée à 3 semaines *in vitro* est de 54 % de la quantité contenue initialement dans $PLA_{50}GS$. *In vivo*, nous observions une libération *in situ* de 5,1 µg/mL de gentamicine à J3, de 1,9 µg/mL de gentamicine à J7 et de 0 µg/mL à 5 semaines avec disparition de $PLA_{50}GS$ à l'examen macroscopique. Nous avons ainsi pu mettre en évidence, *in vitro* et *in vivo*, un relargage de la gentamicine à des doses supérieures à la CMI du germe et ce pendant plus de trois semaines.

Afin de confirmer ces observations, nous avons ensuite mis au point un modèle d'infection périostée chez le rat. Pour ce faire nous avons utilisé des rats âgés de 10 à 12 semaines avec une injection au contact de l'os et au 1/3 moyen de la patte arrière de deux fois 100 µl de SAMS d'origine animale. L'utilisation du $PLA_{50}GS$ a montré sa supériorité par rapport à une administration parentérale d'une dose équivalente de Gentamicine avec une négativation du contage bactériologique chez tous les rats traités par le polymère chargé à la Gentamicine.

Nous avons ensuite voulu traiter une infection articulaire grâce à notre polymère. Nous avons donc créé un modèle animal utilisant un lapin femelle de 4 kg avec une injection de 1 ml d'une solution à 10^3 CFU/ml de staphylococcus méthi-sensible d'origine léporidée. Le $PLA_{50}GS$ nous a permis de réduire très significativement la charge bactérienne intra-articulaire (baisse de 3 à 4 $\log_{10}$ soit 1000 à 10000 fois moins de bactéries) alors que le traitement antibiotique par voie générale dit de référence ne nous a pas permis de réduire l'infection intra-articulaire de façon significative par rapport au groupe non traité. Le $PLA_{50}GS$ nous a ainsi permis de réduire l'infection de 3 $\log_{10}$ par rapport aux autres groupes avec 2 lapins sur 6 guéris de leur infection.

Le $PLA_{50}GS$ présente, ainsi, les caractéristiques suivantes : (i) stabilité de la Gentamicine au sein du polymère, (ii) polymère sous forme de poudre stable, (iii) relargage prolongé de la Gentamicine pendant plusieurs semaines, (iv) effet « burst » présent mais limité, (v) très bonne biotolérance, et (vi) efficacité supérieure aux traitements antimicrobiens classiques.

BY-NC-ND

Abstract

The treatment of soft-tissue infections, osteomyelitis, and acute or chronic septic arthritis is a lengthy process that involves repeated surgical procedures and the systemic administration of antibiotics for at least 6 weeks to 3 months. The poor diffusion of antibiotics into bones and joints requires high doses given parenterally for long periods. At present, the antibiotic vector most widely used in humans with bone or joint infections is polymethylmethacrylate (PMMA). However, because PMMA is not bioabsorbable, multiple surgical procedures are required to eradicate the infection. Furthermore, PMMA does not release its full antibiotic load over time and may yield local antibiotic concentrations lower than the minimal inhibitory concentration (MIC) of the causative organism, thereby promoting the emergence of resistant strains. The objective of our work was to develop a fully bioabsorbable polymer capable of ensuring the prolonged and efficient release of its antibiotic load, thus improving the management of bone and joint infections.

The specifications for the polymer included the release by the matrix system of 1-2 mg of gentamicin per day and per gram of mixture over more than 10 days. Other specifications were appropriate physical characteristics, a drug release rate sufficient to ensure optimal treatment safety, and ease of implantation. The polymer was also to be bioabsorbable, i.e., subject to degradation into fragments capable of being eliminated naturally by the body. High-molecular weight $PLA_{50}P$, Poly(D,L-lactic acid) was created and found to meet these specifications. Use of this polymer as large particles (0.5 to 1 mm) limited the initial burst phenomenon. A gentamicin-$PLA_{50}P$ mixture was obtained by compression of the two components prepared in powder form. The antibiotic load was set at 20% to limit the initial burst. The polymer can be sterilized by gamma irradiation, which has no effect on drug release characteristics.

In vitro kinetic studies of gentamicin release by the polymer showed a peak on day 12 followed by a plateau that lasted until day 63. After 3 weeks, the cumulative amount of gentamicin released in vitro was 54% of the total amount loaded onto the polymer. *In vivo* gentamicin concentrations measured *in situ* were 5.1 µg/mL on day 3, 1.9 µg/mL on day 7, and 0 µg/mL on day 35, when the polymer was no longer visible to the naked eye. Thus, both *in vivo* and *in vitro*, gentamicin was released in concentrations greater than the MIC of the microorganism, for longer than 3 weeks.

To test the gentamicin-loaded polymer, we created a rat model of periosteal infection. Rats aged 10-12 weeks received two 100 µL injections of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* collected from animals, into the middle third of the hind leg, in contact with the bone. Treatment with gentamicin-loaded $PLA_{50}P$ proved superior over parenteral administration of an equivalent gentamicin dose, consistently reverting the bacteriological cultures to negative.

We then created a rabbit model of septic arthritis. A doe weighing 4 kg received an add intraarticular injection of 1 mL of a solution containing 10^3 cfu/mL of a methicillin-sensitive *S. aureus* strain collected from another rabbit. Gentamicin-loaded $PLA_{50}P$ treatment induced a highly significant drop in the intraarticular bacterial load (by 3-4 $\log_{10}$, i.e., by 1000 to 100 000 bacteria), whereas standard systemic gentamicin therapy failed to significantly diminish bacterial counts comparatively to the untreated controls. Thus, gentamicin-loaded $PLA_{50}P$ diminished the bacterial load by 3 $\log_{10}$ comparatively to the other groups and allowed eradication of the infection in 2 of the 6 rabbits.

In sum, gentamicin-loaded $PLA_{50}P$ (i) ensures the stability of the antibiotic; (ii) is available as a stable powder; (iii) ensures the prolonged release of gentamicin over several weeks; (iv) produces a limited burst effect; (v) exhibits very good biotolerance; (vi) and is more effective than standard antimicrobial therapy.

BY-NC-ND