

**THESE**  
**pour le**  
**DIPLÔME D'ETAT**  
**DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**par**

**Marie-Katel LATY**

*Présentée et soutenue publiquement le 23 Juin 2006*

**Evaluation *in vitro* et *in vivo* de l'activité bactéricide  
de la vancomycine incorporée  
dans des microparticules de poly- $\epsilon$ -caprolactone**

**Président :** Mme Françoise BALLEREAU,  
Professeur de Santé Publique et Pharmacie Clinique  
Praticien Hospitalier

**Membres du Jury :** Mme Jocelyne CAILLON,  
Maître de Conférences de Bactériologie- Praticien Hospitalier  
Mme Hélène GAUTIER,  
Maître de Conférences de Pharmacie Galénique  
Mme Anne-Marie LE RAY,  
Maître de Conférences des Universités

## TABLE DES MATIERES

1	INTRODUCTION .....	3
2	REVUE DE LA LITTÉRATURE .....	5
2.1	HISTORIQUE .....	5
2.2	SYSTÈMES NON BIODÉGRADABLES .....	9
2.2.1	Pompe .....	9
2.2.2	Ciments acryliques .....	11
2.3	SYSTÈMES BIODÉGRADABLES .....	17
2.3.1	Eponge de collagène .....	17
2.3.2	Céramiques .....	19
2.3.3	Sulfate de calcium .....	22
2.3.4	Polymères .....	23
3	PARTIE EXPÉRIMENTALE .....	26
3.1	MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	27
3.1.1	Formulation des microparticules .....	27
3.1.1.1	Matériel .....	27
3.1.1.2	Méthode .....	28
3.1.1.3	Analyse et expression des résultats .....	30
3.1.2	Evaluation de la quantité de vancomycine libérée .....	33
3.1.2.1	Principe .....	33
3.1.2.2	Méthodes de dosage .....	34
3.1.3	Etude <i>in vitro</i> de l'activité bactéricide de la vancomycine seule et incorporée dans des microparticules .....	39
3.1.4	Etude <i>in vivo</i> .....	41
3.1.4.1	Choix du modèle .....	41
3.1.4.2	Ostéomyélite sans matériel .....	41
3.1.4.3	Ostéomyélite sur matériel – matériel en place .....	47
3.2	RÉSULTATS ET ANALYSE .....	56
3.2.1	Formulation des microparticules .....	56
3.2.1.1	Test de reproductibilité – analyse granulométrique .....	56
3.2.1.2	Lot de production de microparticules .....	57
3.2.1.3	Analyse morphologique .....	58
3.2.2	Evaluation de la quantité de vancomycine libérée .....	59
3.2.3	Etude <i>in vitro</i> de l'activité bactéricide de la vancomycine seule et incorporée dans des microparticules .....	61
3.2.4	Etude <i>in vivo</i> .....	63
3.2.4.1	Ostéomyélite sans matériel .....	63
3.2.4.2	Ostéomyélite sur matériel – matériel en place .....	65
3.3	DISCUSSION .....	70
3.4	CONCLUSION .....	76

# 1 INTRODUCTION

Les infections osseuses sont difficiles à traiter et leurs conséquences sont lourdes pour le patient. La prise en charge habituelle consiste en un débridement chirurgical de la plaie, accompagnée d'un traitement antibiotique par voie parentérale pouvant durer plusieurs mois. L'incidence croissante de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) dans ces infections justifie l'utilisation de vancomycine. Cependant la faible vascularisation de l'os cortical ainsi que la faible pénétration osseuse de cet antibiotique ne permettent pas d'obtenir de fortes concentrations locales d'antibiotique. De plus ce produit présente une ototoxicité, une néphrotoxicité ainsi qu'une faible tolérance veineuse, ce qui rend nécessaire l'utilisation d'un cathéter central.

L'utilisation de matériaux relargeurs d'antibiotiques, placés *in situ*, dans la prise en charge des infections osseuses, a donc été étudiée. Ceux-ci présentent double avantage de fournir de hautes concentrations tissulaires d'antibiotique avec des taux sériques relativement faibles ; évitant les toxicités associées aux antibiotiques administrés par voie systémique, tout en aidant à combler l'espace mort laissé par le traitement chirurgical, empêchant ainsi la formation d'un hématome, excellent milieu de culture.

Nous allons donc tout d'abord décrire les différents systèmes de délivrance des antibiotiques qui permettent un relargage prolongé et *in situ* d'antibiotique. Certains antibiotiques comme la tobramycine, la gentamycine et la vancomycine ont été incorporés dans divers matériaux, mais rarement dans de la poly- $\epsilon$ -caprolactone. Ce biomatériau biodégradable, présentant une bonne tolérance osseuse et permettant un relargage prolongé a été choisi comme système de délivrance. Le but de notre étude a tout d'abord été de vérifier la stabilité de la vancomycine incorporée dans les microparticules de poly- $\epsilon$ -caprolactone, et de

quantifier la quantité de vancomycine libérée au cours du temps. Secondairement nous avons voulu évaluer l'activité bactéricide *in vitro* de ces microparticules contenant de la vancomycine. Troisièmement, nous avons voulu valider ces microparticules sur un modèle d'ostéomyélite chez le lapin mis au point au laboratoire d'antibiologie en comparant l'activité *in vivo* de la vancomycine incorporée dans des microparticules de poly- $\epsilon$ -caprolactone à celle de la vancomycine administrée par voie intramusculaire.

## 2 REVUE DE LA LITTÉRATURE

### 2.1 HISTORIQUE

La chirurgie a plus évolué au cours du 19<sup>ème</sup> siècle qu'au cours des deux précédents millénaires. Les 19 et 20<sup>ème</sup> siècles ont été l'âge des révolutions, la technologie a affecté la vie de tous les jours. Après la révolution industrielle, la science et la technologie se sont rencontrées, ce qui a conduit à des avancées majeures. L'introduction du stéthoscope en 1816 par René Laënnec a permis l'examen du cœur et des poumons ; de bonnes lentilles achromatiques mises au point par Joseph Lister ont permis à des histologistes allemands de montrer que tous les êtres vivants étaient constitués de petites cellules invisibles à l'œil nu, avant que le microscope ne permette à Louis Pasteur et à Robert Koch d'établir les fondements de la bactériologie.

Nous allons évoquer la chirurgie orthopédique au cours des âges et les progrès qui ont marqué son évolution, de l'anesthésie jusqu'à l'antibiothérapie locale.

#### *La naissance de la chirurgie orthopédique*

Il est traditionnel d'attribuer à Hippocrate (460-355 av. J.-C.) les premiers écrits sur les troubles de l'appareil locomoteur. Il faudra ensuite attendre la Renaissance pour voir de nouvelles avancées en chirurgie avec le traité d'anatomie de Versalius en 1543, puis les travaux d'Ambrose Paré (1517 – 1590). Mais à cette époque, les chirurgiens, en particulier orthopédistes, sont encore considérés comme des « mécaniciens ».

Au 18<sup>ème</sup> siècle, de grandes découvertes et des noms mémorables font avancer l'orthopédie. Nicolas ANDRY (1658 – 1742), le fondateur de l'orthopédie, crée en 1741 le terme d'ORTHOPEIDIE ou "l'art de prévenir et de corriger dans les enfants les difformités du corps" à partir des mots grecs Orthos qui veut dire

droit, et Paidion qui signifie enfant. Percival Pott dans son traité de 1768 *Fractures and Dislocations* insiste sur la nécessité de la réduction immédiate de la fracture ainsi que le relâchement des muscles pour permettre le bon alignement des os. John Hunter (1728 – 1793) un des plus grands chirurgiens et anatomistes, a contribué à l'avancée de la chirurgie orthopédique notamment par ses travaux sur le processus inflammatoire et la croissance osseuse.

Deux avancées majeures permettront ensuite à la chirurgie de devenir plus sûre et moins dangereuse, le contrôle de la douleur et l'antiseptie.

### *Le contrôle de la douleur*

En 1846, Morton, un dentiste, a utilisé pour la première fois l'éther pour soulager la douleur d'un patient lors d'une opération réalisée par Warren, un chirurgien. L'anesthésie est probablement la découverte médicale qui a le plus rapidement été appliquée à la pratique clinique à travers le monde. Le terme d'anesthésie a été créé 5 semaines après la première démonstration par Morton. L'éther puis le chloroforme vont ensuite être largement utilisés, mais les opérations s'accompagnent souvent de coups de poing et de pieds. L'anesthésie locorégionale a alors fait son apparition avec la cocaïne, utilisée en ophtalmologie, en odontologie et en chirurgie générale, mais elle est loin d'être le produit idéal du fait de son effet secondaire d'addiction. Des dérivés ont alors été synthétisés, sans être vraiment satisfaisants, jusqu'à la procaïne en 1904.

### *L'antiseptie*

Sir Joseph Lister, inspiré par les travaux de Louis Pasteur, imposa les règles de l'antiseptie dans la chirurgie dès 1865, avec tout d'abord l'utilisation d'un spray phénique et des règles strictes pour éviter l'accès à la plaie des microorganismes

portés par les particules en suspension dans l'air. L'emploi de gants en caoutchouc (1889) puis de masques en gaze (1897) viendra renforcer ces mesures. Pasteur en 1874 suggère que les instruments soient immergés dans l'eau bouillante, passés à la flamme et rapidement refroidis avant l'opération. Rapidement la chaleur remplaça les méthodes chimiques pour la préparation des instruments et des champs opératoires et en 1883 l'autoclave fournissant de la chaleur humide sous pression était disponible dans de nombreux laboratoires bactériologiques. Robert Koch (1843 – 1910) conçut les bases expérimentales de la théorie des germes dans les infections des blessures en montrant la valeur de la culture et de l'identification des bactéries.

De grandes avancées dans le domaine de l'orthopédie eurent alors lieu, avec Macewen (1848 – 1924), inventeur de l'ostéotome, qui réalisa en 1881 la première allogreffe osseuse chez l'homme et Lane (1856 – 1953) qui mis au point la fixation interne par plaques et par vis.

L'un des plus grand progrès de la fin du 19<sup>ème</sup> siècle sera la découverte des rayons X par Röntgen en 1895, et leur rapide application dans le domaine clinique. Sir Robert Jones (1855 – 1933) publia en 1896 le premier rapport sur l'utilisation des rayons X pour localiser une grosseur dans un poignet. Un lien existait désormais entre la radiologie et la chirurgie orthopédique.

La Première Guerre Mondiale (Debue-Barazer C., 2003) a permis de grandes avancées dans le domaine de la chirurgie orthopédique par la nécessité de sauver le plus grand nombre de blessés afin d'avoir la main d'œuvre nécessaire sur les champs de batailles et dans les usines. Les progrès réalisés dans les domaines des amputations, du parage des plaies par débridement et esquillectomie, des systèmes de fixation et de contention, de la chirurgie maxillo-faciale, des greffes osseuses, de la transfusion sanguine, de la réanimation, de la radiologie, de l'anesthésie générale par voie IV et les anesthésies locorégionales ont profité de manière évidente à la chirurgie orthopédique. Le domaine de l'orthopédie prend

peu à peu de l'ampleur et finit par être reconnue comme spécialité à part entière à la fin de la Première Guerre Mondiale.

Les apprentissages de la Première Guerre Mondiale ont servi à traiter les accidents rencontrés lors de la seconde Guerre Mondiale. Il a été constaté moins d'amputations, moins de gangrènes et de meilleures mesures de prise en charge des fractures. Il faut également noté l'importance de la pénicilline découverte en 1928. La nécessité de remettre rapidement sur pied ses pilotes pousse l'Allemagne à développer de nombreuses procédures de fixation des fractures. Ces méthodes de fixation par clous et fils métalliques continueront à être développées après la guerre et s'étayeront grâce à l'arrivée de nouveaux alliages.

Le début du 20<sup>ème</sup> siècle voit également des développements majeurs qui ont eu un effet important sur la chirurgie orthopédique, la découverte de la vitamine D et la disparition du rachitisme alimentaire, la découverte des groupes sanguins en 1930 par Landsteiner (1883 – 1943) et la création de banques du sang peu après la seconde Guerre mondiale, et le développement des médicaments antibactériens comme le vaccin de Salk et Sabin contre la polyomyélite et les antibiotiques.

Les antibiotiques représentent l'une des avancées majeures pour le traitement des infections orthopédiques. Les premiers antibiotiques disponibles ont été les sulfonamides introduits dans les années 30 par Gerhard Domagk. Dès 1939 l'instillation de cristaux de sulfanilamide sur plaie débridée, refermée et immobilisée contribue à la réduction du taux d'infection des fractures ouvertes. C'est en 1929 que la découverte de la pénicilline par Fleming et surtout sa concentration biochimique par Florey et Chain en 1941 ont révolutionné le pronostic des infections osseuses. Par la suite l'arrivée de nombreux antibiotiques a continué à améliorer le traitement.

Cependant un des problèmes majeurs dans le traitement des infections osseuses est la difficulté à obtenir des taux élevés d'antibiotiques au site de l'infection sans atteindre le seuil de toxicité. L'antibiothérapie locale est alors apparue comme une solution pour pallier à ces problèmes de toxicité des antibiotiques. Buchholz et Engelbrecht (Buchholz, 1970) furent les premiers dès 1970 à proposer l'emploi de ciment imprégné d'antibiotiques dans la chirurgie des prothèses articulaires. Depuis de nombreux modes de vectorisation ont fait leur apparition et nous allons les présenter ici. Ces systèmes de délivrance d'antibiotique peuvent être classés en deux catégories :

- les systèmes non biodégradables, qui peuvent être soit portés à l'extérieur du corps, soit implantés, mais nécessitent une seconde opération chirurgicale pour leur retrait,
- les systèmes biodégradables qui peuvent être laissés *in situ* après délivrance de l'antibiotique.

## **2.2 SYSTÈMES NON BIODÉGRADABLES**

### **2.2.1 Pompe**

Un cas un peu particulier de système de délivrance locale d'antibiotique non biodégradable est la pompe portable. Il existe deux types de pompes utilisées pour le traitement des infections osseuses, les pompes implantables et les pompes externes reliées à un cathéter implanté au site infectieux.

C. Perry a proposé une méthode par pompe implantable dans le tissu sous cutané abdominal (Perry, 1991). Ce système est utilisé dans trois situations cliniques : ostéomyélite résistante (caractérisée par l'échec d'au moins un traitement précédent), arthroplasties infectées de façon aiguë (symptomatique depuis moins

de six semaines), et arthroplasties infectées chroniquement (patients infectés depuis plus de six semaines).

Cette pompe est constituée de deux chambres, l'une contenant l'antibiotique et l'autre du fréon, séparées par un soufflet en métal pliant. Lorsque le fréon passe de l'état liquide à l'état gazeux, il comprime la chambre contenant l'antibiotique et celui-ci est envoyé dans les cathéters conduisant au site de l'infection ; quand la chambre contenant l'antibiotique est remplie, le fréon repasse en phase liquide et la pompe est rechargée.

La pompe est implantée en sous cutané dans l'abdomen, les cathéters sont également amenés de façon sous cutanée au niveau du site de l'infection, puis implantés dans le foyer infectieux.

Cette technique permet d'obtenir des taux d'antibiotique *in situ* constants et élevés, d'arrêter le traitement en cas d'intolérance à l'antibiotique et de permettre un traitement en ambulatoire. Mais l'utilisation de cette pompe est coûteuse, à usage unique et nécessite une ablation sous anesthésie générale ; de plus une infection au site d'implantation de la pompe peut se produire.

E. Meani a décrit un système utilisant une micro pompe électronique externe portable et programmable (Meani, 1994) reliée à un cathéter implanté au site de l'infection.

Cette technique, tout comme celle de Perry, permet de maintenir un niveau élevé et constant d'antibiotique au site de l'infection, sur une longue période de temps, sans effets systémiques, de stopper le traitement en cas d'intolérance, et offre une bonne qualité de vie aux patients qui ne reviennent en consultation externe que pour le suivi et le remplissage des réservoirs d'antibiotique.

Cette technique a l'avantage d'être moins invasive et donc d'éviter d'éventuelles infections au site d'implantation de la pompe, de permettre un plus grand choix d'antibiotiques car ils restent à l'extérieur, donc à température ambiante, au lieu d'être à près de 30°C quand la pompe est implantée, ce qui permet une meilleure

stabilité des antibiotiques. Aucune complication liée à l'implantation ou au retrait des cathéters n'a été observée, aucune infection des tissus sous cutanés dans lesquels le cathéter a été implanté n'a été observée ; de plus cette pompe permet un traitement beaucoup moins coûteux et est réutilisable.

### 2.2.2 Ciments acryliques

L'idée d'utiliser le polyméthylmétacrylate (PMMA) comme agent pour les traitements antibiotiques locaux a été introduite dans la littérature en 1970 par Buchholz et Engelbrecht (Buchholtz, 1970) avec l'incorporation d'un antibiotique dans le ciment osseux (bone cement), puis Klemm (Klemm, 1979) a plus tard étendu ce concept au traitement des ostéomyélites chroniques.

Le PMMA existe sous deux formes : le ciment non polymérisé sous forme de poudre à laquelle l'antibiotique est ajouté, utilisé pour le scellement des arthroplasties, et les chaînes de billes de PMMA imprégné d'antibiotique, utilisées dans les infections osseuses après débridement chirurgical. Ces billes imprégnées de gentamicine sont commercialisées en Europe depuis 1977.

Les billes imprégnées de gentamicine sont utilisées pour le traitement des infections osseuses lorsque la cavité à combler est importante. Après débridement du foyer, la cavité à combler est remplie d'un nombre suffisant de billes pour obtenir un remplissage mécanique de la cavité. Les billes de 1 cm de diamètre peuvent être mises en place de deux façons (Lortat-Jacob, 1992). Soit elles sont complètement enchâssées et la cavité refermée, soit au contraire le chapelet de billes dépasse de la peau par une extrémité de la cicatrice ou par une contre incision pour être retiré au lit du malade. Le premier cas, qui s'accompagne nécessairement d'une seconde intervention pour retirer les billes, est utilisé quand plus de trois chapelets de billes sont mis en place ou quand une

greffe osseuse ou une réimplantation de prothèse est prévue et les billes sont alors utilisées comme « spacer ». Dans le cas où les billes dépassent, le trajet de la chaîne doit être parfaitement rectiligne pour éviter de bloquer les billes dans la plaie. Les billes doivent être mobilisées précocement et retirées régulièrement en tirant progressivement sur la chaîne. Mais dans cette technique le blocage des billes est fréquent, et l'extraction des billes, douloureuse et entraînant un saignement non négligeable, est souvent mal supportée par les patients.

Une étude rétrospective de 1995 à 1999 (Mohanty, 2003) portant sur 45 cas d'ostéomyélites chroniques d'étiologies variées (ostéogénèse infectée, infection suite à une fracture ouverte et ostéomyélite hématogène) ayant déjà subi au moins une opération pour tenter d'éradiquer l'infection montre l'intérêt de l'utilisation de billes de PMMA imprégnées d'antibiotiques pour le traitement de ces infections. Après débridement de la plaie, les billes ont été implantées, leur nombre dépendant de la taille de la cavité. Des antibiotiques ont été administrés par voie systémique pendant 4 jours et les billes sont restées en place pendant 3 semaines. Tous les patients ont été suivis pendant au moins 2 ans (moyenne 3.7 ans) avec 87% de succès. Aucun effet secondaire systémique comme ototoxicité et néphrotoxicité n'a été reporté.

Une autre étude (Walenkamp, 1998) portant sur 100 patients atteints d'ostéomyélite et traités par débridement et implantation de billes imprégnées de gentamicine montre un taux de guérison de 92% à 5 ans.

Le ciment osseux imprégné d'antibiotique rend de grands services aux chirurgiens orthopédiques, aussi bien pour le traitement des arthroplasties infectées qu'en prophylaxie. Cette utilisation en prophylaxie est répandue en France et dans les pays scandinaves (Havelin, 2000) dans lesquels elle atteint en 1998 93% dans les primo opérations et 99% dans les révisions (changement de l'un ou des deux composants de la prothèse, ou retrait de la prothèse) mais n'est

pas admise dans d'autres pays d'Europe et est même interdite en Amérique du Nord. Indépendamment des risques de descellements aseptiques qui représentent plus de 70% des causes de révision, l'infection profonde est la deuxième complication des arthroplasties. Le traitement d'une arthroplastie infectée est coûteux et long et se déroule normalement en trois étapes, avec retrait de la prothèse et débridement chirurgical des tissus mous, mise au repos de l'articulation administration parentérale d'antibiotiques pendant 6 semaines puis réimplantation de la prothèse articulaire avec toujours une longue période de mise au repos de l'articulation pouvant aller jusqu'à deux mois. L'utilisation de ciment osseux imprégné d'antibiotique pour sceller la prothèse permet de réduire cette procédure à une étape ; l'intérêt de la prévention de l'infection est donc très importante, tant sur le plan médical que sur le plan économique.

C'est dans les pays scandinaves où existent des registres de toutes les prothèses implantées que les meilleures études sur l'efficacité d'une prophylaxie par ciment imprégné d'antibiotique ont pu être réalisées. Le Registre Suédois des prothèses totales de hanche qui a débuté en 1979 et recensait en 1998 plus de 160000 prothèses, montre que les prothèses cimentées représentent plus de 93% des cas (Herberts, 2000), et le registre Norvégien des arthroplasties, débuté en 1987 pour les prothèses de hanche et étendu en janvier 1994 à toutes les prothèses articulaires, qui recense plus de 95% des opérations effectuées, montre les résultats sur 73000 arthroplasties après 11 ans d'existence (Havelin, 2000). Ces deux registres montrent que le taux de révisions dues à une infection est moins élevé lors de l'utilisation de ciment additionné d'antibiotique que lors d'une antibioprofylaxie systématique seule.

Des résultats similaires ont été montrés en 1997 (Espehaug, 1997) dans une étude rétrospective portant sur 10905 patients porteurs d'une prothèse totale de hanche montre un taux de révisions dues à une infection à 5 ans plus faible (0.2%) lors de l'utilisation d'une antibiothérapie à la fois systémique et locale

par ciment additionné de gentamicine qu'avec une antibiothérapie systémique seule (0.8%). Cette étude montre également une durée de vie de l'arthroplastie plus prolongée dans le cas d'une antibiothérapie combinée avec un taux de descellement aseptique de 1% à 5 ans que dans le cas d'une antibiothérapie systémique seule avec un taux de descellement aseptique de 1.9%. Cette différence tend à montrer qu'un certain nombre de descellements supposés aseptiques sont en fait des descellements septiques à bas bruits, et que l'antibiothérapie locale diminue ces sepsis à bas bruit.

Engesaeter et son équipe (Engesaeter, 2003) ont montré dans une étude récente portant sur 22170 patients porteurs de prothèse totale de hanche que le risque de révision d'une prothèse est moins important lorsque l'antibioprophylaxie est donnée à la fois par voie systématique et dans le ciment, 0.7 fois moins élevé que si les antibiotiques sont donnés uniquement par voie systémique.

L'association ciment – antibiotique présente le double intérêt de combler la cavité d'une part et de produire une antibiothérapie locale à très forte dose d'autre part.

Le succès du PMMA comme vecteur d'antibiotique est du au fait que ce matériau ne déclenche pas de réponse immunitaire chez l'hôte, et que la forme des billes permet un relargage rapide de l'antibiotique.

La sélection de antibiotiques utilisés dans les billes est basée sur leur stabilité à haute température (jusqu'à 100°C) à laquelle a lieu la polymérisation. Les aminoglycosides sont thermostables et sont donc largement utilisés dans ces préparations.

L'utilisation de ciment acrylique imprégné d'antibiotique fournit des concentrations locales d'antibiotiques élevées nécessaires à l'éradication du

foyer infectieux, mais la diffusion sérique reste très faible, ce qui explique l'absence de toxicité générale. Aucun incident allergique lié à l'utilisation de PMMA additionné de gentamicine n'a été décrit (Walenkamp, 1997). Aucun inconvénient d'ordre mécanique n'a été relevé, l'adjonction d'antibiotique n'entraînant pas d'altérations des propriétés mécaniques du ciment et le taux de descellements aseptiques restant le même, que le ciment soit additionné ou non d'antibiotique (Josefsson, 1990). Les implants de PMMA produisent un compromis dans la réponse immunitaire locale en diminuant l'activité des lymphocytes « natural killer » et des cellules phagocytaires. Ils ont également été liés à la diminution de la quantité de superoxyde (moyen de tuer les bactéries qui se trouvent dans le phagosome des cellules phagocytaires) et à la réduction de la quantité de blastogénèse de lymphocytes. Une fois que l'implant ne fournit plus un taux bactéricide local d'antibiotique, apparaît un risque de croissance de bactéries résistantes à l'antibiotique qui n'ont pas été tuées par les hautes concentrations d'antibiotiques atteintes en début de traitement. Le seul risque lié à cette utilisation est le risque de sélection de souches résistantes à l'antibiotique utilisé.

De nombreuses bactéries pathogènes impliquées dans les ostéomyélites chroniques, particulièrement *S. epidermidis*, produisent un biofilm qui limite l'activité des antibiotiques. Ce biofilm, appelé slime ou glycocalix, est produit par des souches de *S. epidermidis* et *S. aureus* et il permet à ces souches d'adhérer à des corps étrangers, comme les billes de PMMA. Malgré l'effet bactéricide de l'antibiotique sur ces microorganismes à proximité des billes, ces mêmes microorganismes survivent à leur surface. Cette adhérence peut entraîner une récurrence de l'infection et un développement de résistance, et de petites colonies de *S. aureus* résistant à la gentamicine ont déjà été isolées chez des patients présentant des infections osseuses traitées par des billes de ciment imprégnées de gentamicine. Les antibiotiques diffusent de la partie extérieure

des implants, laissant un noyau central d'antibiotiques inutilisés. Une fois que les antibiotiques ont diffusé hors du cortex, le PMMA fournit un substrat parfait pour une colonisation bactérienne. Cette couche empêche la diffusion vers l'intérieur de nombreux agents antimicrobiens, permettant aux bactéries d'échapper aux effets bactéricides et bactériostatiques des antibiothérapies. De plus le glycocalix montre des propriétés antigéniques de l'hôte, permettant ainsi aux bactéries d'échapper au système immunitaire de l'hôte.

La réussite de l'implantation de PMMA sous forme de ciment osseux dans les arthroplasties est liée aux propriétés thermiques et mécaniques de ce matériau, ainsi qu'à l'adhésion du ciment sur l'os, qui dépend de la biocompatibilité du matériau. Une étude récente acceptée pour publication (Serbetci, 2004) montre l'intérêt de l'ajout d'hydroxyapatite à du ciment acrylique de très faible viscosité pour améliorer ces propriétés. Dans cette étude, le nouveau ciment présente une température de polymérisation diminuée, une résistance à la compression (contrainte la plus importante dans les arthroplasties de hanche) accrue, de meilleures propriétés mécaniques que le ciment de référence, et les tests *in vivo* montrent une biocompatibilité au moins égale à celle du ciment commercialisé. Ce ciment osseux pourrait bien trouver une place pour le traitement des infections osseuses. Cependant le majeur problème du PMMA reste la nécessité d'une seconde intervention chirurgicale pour le retrait de l'implant, d'où l'émergence de nombreux systèmes biodégradables transporteurs d'antibiotiques.

## 2.3 SYSTÈMES BIODÉGRADABLES

### 2.3.1 Eponge de collagène

Le collagène est considéré comme un biomatériau utilisable en chirurgie depuis les travaux de Feriz en 1940 (Feriz, 1940) et ses applications sont à présent multiples. Il existe sous forme d'éponge hémostatique depuis plus de 50 ans et est commercialisé sous forme d'éponge imprégnée de gentamicine depuis plus de 10 ans.

Le collagène est un matériau biocompatible particulièrement adapté car il est présent à l'état naturel chez l'homme. C'est la protéine de structure majeure du corps des vertébrés, elle est une composante majeure du tissu conjonctif, elle se retrouve dans les vaisseaux sanguins, les tendons, les cartilages et les os.

Le collagène utilisé dans la préparation des éponges est du collagène de type I (retrouvé chez l'homme dans la peau, les os et les tendons), provenant le plus souvent de tendons d'Achille bovins ou équins, hautement purifié dans lequel est suspendue la gentamicine. Ces éponges, une fois associées à l'antibiotique, sont stérilisables selon deux procédés, par l'oxyde d'éthylène et par  $\gamma$ -irradiation (Stemberger, 1997 ; Friess, 1998). La stérilisation par oxyde d'éthylène permet d'obtenir de plus grandes concentrations locales d'antibiotique ; la  $\gamma$ -irradiation est la méthode de stérilisation la plus sûre, elle est hautement efficace et la dose administrée précisément contrôlée. C'est la méthode de choix pour stériliser le collagène, elle permet de diminuer la résistance mécanique du collagène qui devient ainsi plus sensible à l'attaque des collagénases.

Les intérêts du collagène sont multiples, et son intérêt comme biomatériau repose sur sa faible immunogénicité et le fait qu'il soit reconnu par le corps comme un constituant normal et non comme un corps étranger. De plus, au

même titre que le collagène endogène, il participe aux processus de l'hémostase et de la cicatrisation, ainsi qu'à la régénération osseuse. Ce matériau flexible peut également être facilement coupé en morceaux pour s'adapter aux sites à traiter. Après une opération chirurgicale ou une blessure, l'exposition aux fibrilles de collagène déclenche l'adhésion plaquettaire et l'activation des facteurs plasmatiques de coagulation. Une fois l'éponge en place au niveau de la plaie, des fragments de collagène sont libérés par les macrophages inflammatoires. Ces fragments exercent un effet chimiotactique qui attirent des fibroblastes. Les enzymes libérées localement par les macrophages, telles les collagénases, digèrent la matière de l'éponge, ce qui attire encore d'avantage de fibroblastes et les stimule à proliférer, favorisant les processus de granulation et d'épithélialisation.

Il favorise la cicatrisation en exerçant un chimiotactisme sur les monocytes et sert de trame à la prolifération des fibroblastes.

Dans l'os, les ostéoblastes sont attirés au site de la plaie et leur prolifération stimulée. La formation des ostéoblastes stimule la minéralisation et la production de tissus à base de collagène pour former l'os nouveau.

La gentamicine est d'abord libérée de l'éponge par diffusion, puis quand la matrice de collagène est détruite par les collagénases sécrétées par les macrophages. La dégradation du collagène est alors totale, la totalité de la gentamicine biodisponible au niveau du site infectieux et aucune intervention chirurgicale pour retrait du matériel n'est alors nécessaire. Une étude récente *in vivo* chez le lapin sain (Mehta, 1996) a montré que du collagène chargé en gentamycine injecté en intra musculaire fournissait des concentrations locales d'antibiotique supérieures à la CMI pendant 28 jours tout en maintenant des concentrations sériques inférieures au seuil toxique. Plusieurs méthodes peuvent aussi être utilisées pour prolonger la libération de la gentamicine, comme utiliser un sel de l'antibiotique de solubilité réduite, utiliser une éponge recouverte de

polyester résorbable qui va jouer un rôle de barrière, incorporer l'antibiotique dans des microparticules de PLGA, ou encore additionner des polymères anioniques.

### 2.3.2 Céramiques

Sachant que l'os est constitué à environ 65% de calcium et de phosphate, il est logique que les céramiques de phosphate de calcium aient été très étudiées en tant que biomatériau dans les 20 dernières années et aient ouvert des perspectives nouvelles aux cliniciens, en tant que substituts du tissu osseux en chirurgie maxillo-faciale, ORL, odontologie et de plus en plus en orthopédie.

Leurs principales caractéristiques résident dans leur composition chimique similaire à la phase minérale du tissu calcifié, en particulier de l'os. Les céramiques les plus employées sont :

- l'hydroxyapatite (HA) :  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , synthétique ou biologique, qui se rapproche le plus de la phase cristalline de l'os
- le phosphate tricalcique  $\beta$  ( $\beta$ -PTC) :  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
- les produits biphasés ou BPC (Biphasic Calcium Phosphate) associent dans un rapport variable de l'HA et du  $\beta$ -PTC.

En raison de son rapport calcium/phosphate de 1,67 inférieur à celui de l'os (1,71), l'hydroxyapatite est très peu soluble dans les milieux biologiques et présente donc un taux très bas de dégradation *in vivo*. Le  $\beta$ -TCP, avec un rapport Ca/P de 1,5, est beaucoup plus soluble et sa dégradation plus importante. En modifiant les proportions de HA et  $\beta$ -TCP dans les mélanges, on peut obtenir des produits ayant des propriétés données quant à sa solubilité et sa vitesse de dégradation.

Ces céramiques sont biocompatibles, elles ne donnent lieu à aucune réaction toxique locale ou systémique, à aucune réaction inflammatoire ni à corps étranger. Elles ne sont pas ostéo-inductrices mais ostéoconductrices, elles servent de charpente à la repousse osseuse en permettant la croissance des vaisseaux et de cellules ostéoprogénitrices à partir de l'os hôte, aussi bien à la périphérie qu'à l'intérieur du biomatériau, avec absence de formation de tissu fibreux entre l'os et l'implant. Un contact étroit entre l'os et la céramique est cependant indispensable.

Cependant leur utilisation est limitée par leurs propriétés mécaniques ; elles sont en effet fragiles et de faible résistance. Elles sont donc utilisées pour combler les défauts osseux, pour la reconstruction osseuse (en particulier en chirurgie maxillo-faciale), pour le remplacement d'os (petits os de l'oreille), pour recouvrir des prothèses métalliques et en tant que système de délivrance des antibiotiques.

De nombreuses études chez l'animal ont permis de mettre en évidence l'efficacité des implants de céramique de phosphate de calcium imprégnés de divers antibiotiques pour le traitement des ostéomyélites. Shirtliff et coll. (Shirtliff, 2002) ainsi que Joosten (Joosten, 2005) ont montré l'efficacité de blocs d'HA imprégnés de vancomycine dans le traitement d'ostéomyélite à SARM ou à *S. aureus* « Small Colony Variants » chez le lapin, avec dans le premier cas une disparition de l'infection dans 81.8% des cas, et dans le second plus aucun signe d'infections chez les lapins après 6 semaines de traitement, sans aucun effet secondaire local ou systémique.

Itokazu et son équipe (Itokazu, 1997) ont mis en évidence l'efficacité de blocs d'HA chargés en aberkacine dans le traitement d'ostéomyélite à *S. aureus* chez le rat, ainsi qu'en tant que matériau de comblement osseux.

L'équipe de Lazarettos (Lazarettos, 2004) a quant à elle montré que le phosphate de calcium chargé de téïcoplanine semble être un système de délivrance prometteur pour le traitement des ostéomyélites chez le lapin et permet le comblement des défauts osseux par de l'os néoformé.

Des équipes japonaises sont les plus avancées dans le développement de ces techniques, avec déjà plusieurs études cliniques. L'équipe de Yamashita recommande l'utilisation de blocs d'HA imprégnés d'antibiotique pour le traitement des ostéomyélites chroniques (Yamashita, 1998). En effet une étude clinique portant sur 18 personnes présentant une ostéomyélite et traités par implantation de blocs d'HA imprégnés d'antibiotiques a montré une guérison des foyers d'infection dans un délais de 3 mois sans récïdive de l'infection durant la période de suivi (de 24 à 75 mois), avec incorporation de l'HA dans l'os. Le choix de l'antibiotique (gentamicine, vancomycine, piperacilline...) a été déterminé par la sensibilité du germe isolé et mis en culture.

Une étude d'Itokazu et coll. portant sur 15 patients présentant une ostéomyélite, dont un avec tuberculose et 4 avec une infection suite à un remplacement de prothèse, ont été traités avec des blocs d'HA chargés en antibiotique tout en recevant en parallèle une injection intraveineuse (Itokazu, 1998). Dans tous les cas sauf un, les foyers ont complètement guéris sur la période de suivi (de 13 à 71 mois) Les auteurs recommandent donc l'utilisation de blocs d'HA contenant un antibiotique pour le traitement en une seule fois d'ostéomyélite et d'infection post opératoires après remplacement de prothèse articulaire.

### 2.3.3 Sulfate de calcium

Au 18<sup>ème</sup> siècle, Paris était déjà la « capitale du plâtre », tous les murs des maisons en bois étant en effet recouverts de plâtre. Le roi avait instauré cette règle afin que la catastrophe du Grand Incendie de Londres en 1666 qui avait entièrement détruit cette ville ne se produise pas à Paris. De grandes carrières de gypse avaient alors été exploitées pour fabriquer... le plâtre de Paris.

Ce plâtre de Paris est du sulfate de calcium  $\text{Ca}(\text{SO}_4)_2\text{O}$  obtenu par calcination du gypse et purification. Son utilisation en clinique humaine a été régulièrement rapportée depuis plus d'un siècle. Il a été utilisé pour la première fois en 1862 par Dreesman pour combler des pertes de substance osseuse dues à la tuberculose (Dressman, 1892). Plusieurs travaux expérimentaux et cliniques ont confirmé l'intérêt du sulfate de calcium comme substitut osseux. Ainsi Edberg (Edberg 1930) dès 1930 l'a employé dans le traitement des ostéites et ostéomyélites. Peltier (Peltier, 1957) l'a ensuite utilisé pour combler des pertes osseuses de diverses origines (fractures, kystes, enchondromes, tumeurs à cellules géantes...) et a observé que la régénération osseuse avait lieu ainsi que la complète absorption de l'implant.

Certains auteurs ont étudié l'intérêt de l'association plâtre de Paris/antibiotique. N'importe quel antibiotique soluble peut être incorporé dans la structure cristalline, les aminoglycosides et la vancomycine ont ainsi été utilisés. Gitelis et son équipe (Gitelis, 2002) ont réalisé une étude prometteuse sur l'emploi de l'association de sulfate de calcium commercialisé sous le nom d'Osteoset<sup>®</sup> combiné avec de la vancomycine ou de la tobramycine sous forme d'implants sphériques pour traiter des ostéomyélites chroniques chez 6 patients, en parallèle avec un traitement antibiotique par voie IV pendant 6 semaines. Il a observé chez tous les patients une dégradation complète des implants, une régénération osseuse et aucune reprise de l'infection ni réaction secondaire liée à l'implant.

#### 2.3.4 Polymères

Les polymères biodégradables ont un nombre croissant d'applications dans les secteurs alimentaire, cosmétique et pharmaceutique, mais aussi dans d'autres applications industrielles. L'acide lactique est par exemple un composant de base pour la fabrication de produits phytosanitaires ; les esters de l'acide lactique sont une alternative moins polluante aux solvants dérivés du pétrole. Les polymères utilisés en tant qu'implants médicaux et systèmes de délivrance de médicaments sont habituellement des polymères à base d'acide lactique tels que l'acide polylactique et l'acide polylactique co-glycolique.

L'oligomère d'acide lactique contenant divers antibiotiques a été étudié. Son efficacité avec de la pefloxacinine a été montrée sur un modèle d'ostéomyélite expérimentale à SARM chez le lapin (Kanellakopoulou, 2000). Une diminution de 99.9% de la population bactérienne a été mise en évidence à J12 et une éradication totale des bactéries avec disparition de l'implant a été trouvée à J33. Ce polymère chargé en didésoxykanamycine B a été étudié chez le lapin (Wei, 1991) chez qui il a permis de retrouver une concentration osseuse supérieure à la CMI pendant 6 semaines, sans effets secondaires systémiques. Au bout de 9 semaines, l'implant s'était dégradé et la régénération osseuse était bonne.

L'acide lactique sous forme de polymère contenant de la gentamycine a quant à lui été utilisé pour recouvrir des implants dans le but de prévenir une infection osseuse lors d'une chirurgie orthopédique (Lucke, 2003). Ce système de délivrance a fourni chez le rat de hauts niveaux de protection durant la phase péri opératoire, réduisant le taux d'implants colonisés, sans qu'aucun effet secondaire n'ait été retrouvé au niveau histologique.

Les copolymères d'acide lactique et d'acide glycolique ont également été étudiés. *In vitro*, des études des caractéristiques d'élution ont montré un effet « burst » suivi d'une libération prolongée, sur 60 jours pour les polymères imprégnés d'ofloxacin (Nie, 1995) et pendant 4 mois pour la ciprofloxacine (Mäkinen, 2005)

Des études *in vivo* chez le lapin, ont montré l'efficacité de ces copolymères imprégnés d'antibiotiques dans le traitement d'ostéomyélites. Une étude avec mise en place de ces implants imprégnés de ciprofloxacine puis injection IV de *S. aureus* a mis en évidence sur 28 jours leur efficacité dans la prévention du développement d'ostéomyélite aiguë, avec seulement 25% d'infection contre 82% dans le groupe témoin (Nicoleau, 1998). Une autre étude dans laquelle ce copolymère est associé à de la vancomycine a également montré son efficacité réduisant significativement l'infection par rapport au traitement par vancomycine par voie systémique (Cahloun, 1997). De même, ce copolymère contenant de la tobramycine en parallèle à un traitement par cefazoline par voie systémique s'est révélé plus efficace que les billes de PMMA imprégnées de tobramycine avec cefazoline par voie systémique ou que la cefazoline seule (Ambrose, 2004).

L'ajout d'une couche de copolymère d'acide lactique et glycolique sur du plâtre de Paris contenant de la vancomycine permet de réguler la diffusion de l'antibiotique (Benoit, 1997). L'enrobage permet de réduire la libération initiale massive d'antibiotique à partir de l'implant et prolonge la libération au-delà de 5 semaines. *In vivo*, chez le lapin, des concentrations thérapeutiques ont été mesurées pendant 4 semaines sans induire de concentrations sériques toxiques.

D'autres matériaux ont été ajoutés à ces polymères. Le polyéthylène glycol permet d'augmenter le taux de dégradation, de diminuer l'acidité du produit dégradé et d'augmenter l'hydrophilie du polymère (Zhu, 1990).

La poly- $\epsilon$ -caprolactone est également un polymère biodégradable, et c'est elle qui fait l'objet de notre étude. Nous verrons ses diverses applications ultérieurement.

### 3 PARTIE EXPÉRIMENTALE

Cette partie décrit tout d'abord la formulation des microparticules, les analyses effectuées sur les lots obtenus afin de les caractériser (rendement de préparation, analyses granulométrique et morphologique).

Puis nous évaluerons le relargage de vancomycine à l'aide d'un test de diffusion. La cinétique de libération est réalisée à partir d'un test de diffusion en chambre de culture (Guicheux, 1997 ; Gautier, 1998), bonne alternative à la méthode officielle dite de la palette tournante décrite à la Pharmacopée Européenne.

L'activité de la vancomycine seule ou incorporée dans les microparticules sera étudiée par les cinétiques de bactéricidie qui reflètent l'activité d'un antibiotique en fonction de la concentration d'antibiotique utilisé et du temps d'incubation de la bactérie en présence de l'antibiotique.

Enfin nous évaluerons *in vivo* l'activité de la vancomycine incorporée dans des microparticules sur un modèle d'ostéomyélite aigue expérimentale chez le lapin.

## **3.1 MATÉRIEL ET MÉTHODES**

### **3.1.1 Formulation des microparticules**

#### **3.1.1.1 Matériel**

##### *Le polymère*

Le polymère utilisé est la poly-ε-caprolactone ou PCL (Tone® P787, Union Carbide SA, France) appartenant à la famille des polyesters aliphatiques. La masse molaire de cette PCL est de 150 000. Elle se présente sous la forme de granulés extrudés blancs.

##### *Les solvants*

Deux types de solvants ont été utilisés pour la formulation des microparticules :

- l'eau distillée qui constitue la phase dispersante de l'émulsion de type lipophile dans hydrophile (L/H),
- le dichlorométhane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) [Rectapur (degré de pureté = 99%), Prolabo, France] qui constitue la phase dispersée de l'émulsion. Il permet de dissoudre le polymère constitutif de la membrane des microparticules. Sa solubilité dans l'eau est de 2/100 (P/P) ; il sert également de milieu de suspension au chlorhydrate de vancomycine.

##### *L'agent suspensif*

Le composé employé est la méthylcellulose existant sous le nom commercial de Méthocel® (A15 LV Premium EP, Colorcon, France). Il est soluble dans l'eau et est utilisé en solution aqueuse à faible concentration (0,175%). Son rôle est de

stabiliser l'émulsion et de maintenir en suspension sous forme individualisées les microparticules qui se forment.

*Le principe actif : le chlorhydrate de vancomycine*

La vancomycine est un glycopeptide actif sur les bactéries à Gram positif agissant par inhibition de la synthèse du peptidoglycane. Il est utilisé par voie veineuse le plus souvent car il n'est pas absorbé par voie entérale et son administration par voie intra musculaire provoque des nécroses tissulaires.

La vancomycine est commercialisée sous forme de chlorhydrate sous le nom de Vancocine<sup>®</sup> (laboratoires Lilly, France). Elle se présente sous forme d'une poudre pour suspension buvable, blanche, sans odeur, dosée à 500 mg /6 mL. Elle est chromatographiquement purifiée.

### 3.1.1.2 Méthode

Une émulsion de type lipophile dans hydrophile est réalisée en mélangeant les deux phases suivantes :

- une solution organique de dichlorométhane dans laquelle est dissoute le polymère d'enrobage (la poly- $\epsilon$ -caprolactone) et dans laquelle est dispersé l'antibiotique (vancomycine micronisée),
- une solution aqueuse d'un agent suspensif cellulosique (le Méthocel<sup>®</sup> A15 LV Premium EP à 0,175%) filtré sur un système de filtration Millipore<sup>®</sup> (Millipore, France) sur un filtre de porosité 0,22 $\mu$ m.

1 gramme de poly- $\epsilon$ -caprolactone est dissous dans 13 mL de dichlorométhane dans une fiole en verre, fermée hermétiquement. La solution est placée 20 minutes à +4°C.

250 mL de solution aqueuse de Méthocel<sup>®</sup> sont placés dans un bécher à bords épais de 400 mL placé dans un bain-marie thermostaté à +20°C.

250 mg de poudre de vancomycine sont broyés pendant 90 secondes à l'aide d'un pilon dans un mortier de diamètre intérieur de 7,7 cm et de hauteur intérieure de 5,5 cm. Cette poudre est mélangée à la solution organique du polymère. Cette suspension est soumise aux ultra-sons pendant 2 minutes et 30 secondes afin d'obtenir une bonne dispersion de la vancomycine.

Cette solution organique est émulsionnée immédiatement en la versant en filet continu dans la solution aqueuse de Méthocel<sup>®</sup>, à l'aide d'un agitateur Heidolph muni d'une pâle en U inversé. L'agitation est maintenue pendant 1 heure à +20°C à la vitesse de 370 tours/minute. Ce temps permet la diffusion du dichlorométhane dans la solution aqueuse puis son évaporation à l'interface eau/air.

L'extraction complète du dichlorométhane est réalisée en versant l'émulsion formée dans 1 litre d'eau distillée contenue dans un bécher en plastique d'une contenance de 2 litres. Cette étape permet la solidification des gouttelettes formées au cours de l'étape d'émulsion.

Une filtration est effectuée sur un système de filtration Millipore<sup>®</sup> (Millipore, France). Les microparticules sont retenues sur un préfiltre (GF/C Whatman, Polylabo, France) et lavées avec 1 litre d'eau distillée. Les microparticules sont ensuite récupérées et mises à sécher à l'abri de la lumière dans un placard. Au bout de 24 heures, elles sont pesées et stockées dans un flacon fermé en verre brun.

Les eaux d'extraction et de lavage sont conservées en 2 lots séparés pour l'évaluation indirecte du taux d'encapsulation.

### 3.1.1.3 Analyse et expression des résultats

Différentes analyses sont effectuées, soit directement sur les microparticules obtenues pour les analyses granulométriques et morphologique, soit indirectement sur la phase externe des préparations (eaux de lavage).

- Le rendement de préparation se calcule de la façon suivante :

$$R = \frac{\text{masse des microparticules}}{\text{masses ( polymère + PA) introduites}} * 100$$

Le taux d'encapsulation est calculé à partir de la quantité de vancomycine détectée dans les eaux de lavage, sur trois échantillons, par spectrophotométrie UV (ShimadzuUV – 1605, Roucaire, France). La longueur d'onde d'absorption de la vancomycine en spectrophotométrie UV est de 282 nm. La gamme étalon de la vancomycine a été précédemment réalisée au laboratoire ( $y=4.4716x$  ;  $R^2=1$ ).

- Le rendement d'encapsulation réel se calcule de la façon suivante :

$$\text{rendement réel} = \frac{\text{masse de PA microencapsulé}}{\text{masses (polymère + PA) introduites}} * 100$$

- Le rendement réel rapporté à 100% se calcule de la façon suivante :

$$\text{rendement réel rapporté à 100\%} = \frac{\text{masse de chlorhydrate de vancomycine microencapsulée}}{\text{masse de chlorhydrate de vancomycine introduite}} * 100$$

- Une analyse granulométrique des microparticules a été effectuée à l'aide d'un granulomètre laser (Coulter LS 230, Coultronic, France) sur trois échantillons après remise en suspension dans 50 mL de solution aqueuse de Méthocel<sup>®</sup> à 0,175% contenant une goutte de Tween<sup>®</sup> 80 (Cooper, France). Les microparticules sont ensuite introduites dans la cuve du granulomètre contenant de l'eau distillée.

Les résultats sont exprimés en volume en fonction de la taille des microparticules et en pourcentage dans chaque classe granulométrique (0-80, 80-200, 200-500  $\mu\text{m}$ ).

La granulométrie a pour objet la détermination de la taille des particules élémentaires qui constituent les ensembles de grains de substances diverses et la fréquence statistique des différentes tailles de grains dans l'ensemble étudié. La technique de la granulométrie laser utilise le principe de la diffraction et de la diffusion d'un faisceau laser (Thomas 1994). La théorie générale décrivant les phénomènes de diffusion par une particule sphérique a été étudiée par Mie en 1908. Un cas particulier du phénomène de diffusion est la diffraction de la lumière (théorie de Fraunhofer) qui s'applique si la taille des particules est nettement supérieure à la longueur d'onde utilisée

- Une analyse morphologique est réalisée par microscopie électronique à balayage (MEB). Le principe du balayage consiste à explorer la surface de l'échantillon par lignes successives et à transmettre le signal du détecteur à un écran cathodique dont le balayage est exactement synchronisé avec celui du faisceau incident. La microscopie à balayage électronique repose sur l'envoi d'un faisceau d'électrons sur l'échantillon ; l'interaction entre les électrons incidents et l'échantillon produit l'émission d'électrons d'énergies différentes, électrons rétrodiffusés et électrons secondaires. Les électrons rétrodiffusés sont réémis avec une énergie identique ou légèrement inférieure à l'énergie initiale et

avec un grand angle ; les électrons secondaires ont quant à eux une faible énergie cinétique et, pour qu'ils ressortent du solide, doivent être émis près de la surface de l'échantillon. De ce fait, ils sont très sensibles à la topographie de l'échantillon et leur capture permet d'obtenir une image tridimensionnelle.

L'observation par microscopie à balayage est effectuée après inclusion de l'échantillon dans une résine puis métallisation, opération qui permet de rendre la surface de l'échantillon conductrice par dépôt d'une fine couche d'or palladium pour l'observation en mode électrons secondaires.

Les microparticules sont placées dans un tube Eppendorf et subissent trois lavages successifs de 10 minutes en tampon P.B.S. (phosphate buffered saline), pH 7.2 de bio-Mérieux. Ces lavages sont suivis d'une phase de fixation de 1 heure en glutaraldéhyde à 0.25%. Trois lavages de 10 minutes en tampon P.B.S. sont ensuite réalisés pour éliminer l'excès de fixateur. La déshydratation est alors réalisée en plaçant les microparticules pendant 10 minutes dans des bains d'alcool de degré croissant: 30-50-70-80-80-95-100-100% V/V. La phase de substitution alcool-fréon s'effectue en plaçant pendant 10 minutes les particules dans des bains alcool/fréon 3V/1V, 2V/2V, 1V/3V puis en fréon pur (1-1-1-trichloro-1-2-2-trifluoro-éthane). Cette préparation est fixée sur un cylindre en laiton à l'aide d'un scotch double face et est métallisée avec un mélange or/palladium.

L'observation est effectuée au microscope électronique à balayage à effet de champ JEOL 6400F (JEOL, Japon).

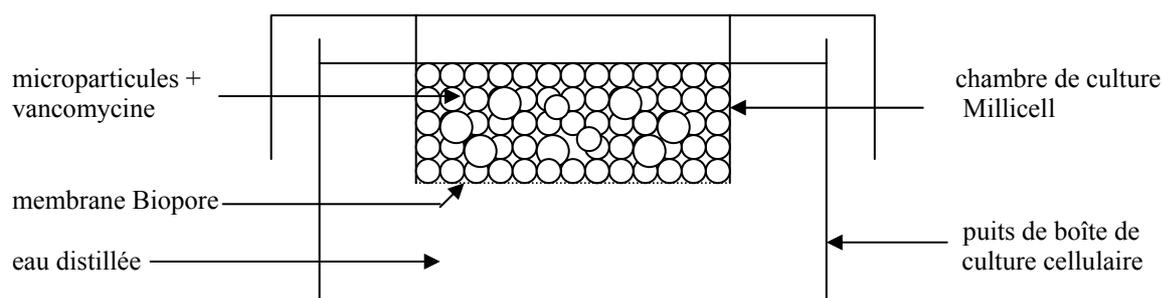
### **3.1.2 Evaluation de la quantité de vancomycine libérée**

#### **3.1.2.1 Principe**

Cette étude de diffusion est réalisée sur trois échantillons prélevés dans le lot définitif des microparticules. L'étude de la cinétique de relargage de la vancomycine s'est faite par éluions successives dans de l'eau distillée à 37°C. Pour cela, pour chaque échantillon, 200 mg de microparticules contenant de la vancomycine sont déposés dans une chambre de type chambre de culture Millicell PICM 1250 de 12 mm de diamètre (Millipore, Saint-Quentin-Fallavier, France) de façon à recouvrir la membrane inférieure Biopore (pores de diamètre 4 µm). Cette chambre est collée à la face inférieure du couvercle d'une boîte de culture six puits (AES, Combourg, France) et immergée dans l'un des puits de cette boîte contenant 13 mL d'eau distillée. L'ensemble est placé à l'étuve à 37°C sur une plate-forme oscillante (3D rocking platform, Stuart Scientific, STR 9, UK) effectuant 5 révolutions par minute.

A intervalles réguliers, le couvercle sur lequel sont collées les chambres de culture est placé sur une nouvelle boîte dont les puits sont remplis de 13 mL d'eau distillée. A chacun de ces intervalles (1h, 2h, 3h, 6h, 1, 2, 3, 7, 14 et 21 jours), des prélèvements sont effectués. Les dosages de la vancomycine libérée ont été réalisés par HPLC et par dosage microbiologique de façon à établir la cinétique de libération.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de vancomycine libérée en fonction du temps  $\pm$  écart-type. Les courbes de pourcentages cumulés relargués ont ensuite été analysés de façon conventionnelle.



**Figure 1: Dispositif de libération de la vancomycine utilisant le test de diffusion en chambre de culture**

### 3.1.2.2 Méthodes de dosage

#### **Dosage par HPLC**

##### *Appareillage HPLC*

Colonne : SHERISORB 80 Δ, ODS 5μm

Longueur de la colonne: 250 mm, diamètre: 4,6 mm (Thermoquest, Les Ulis, France)

Vanne d'injection : réf.7125 (Cotati, Californie, Etats Unis)

Boucle : Inox, 10 μl

Pompe : LDC/Milton Roy (Laboratoire DATA CONTROL, Paris, France)

Détecteur : SpectraSERIES UV 150 (Thermoquest, Les Ulis,France)

Intégrateur : Spectra-Physics SP4290 (Thermoquest, Les Ulis,France)

Phase stationnaire : le type de colonne employé est une ODS (OctaDiSilane), soit une silice greffée en C<sub>18</sub>

Phase mobile : solution de phosphate d'ammonium à 0,05M et d'acétonitrile à 10% dans de l'eau distillée. Le pH de la phase mobile doit être acide car le temps de rétention de la vancomycine augmente avec une élévation du pH ; en

effet, plus le pH de la phase mobile est basique, plus la vancomycine perd de protons, devient moins polaire et est entraînée moins facilement.

*Paramètres de mesure employés pour la détection de la vancomycine en HPLC*

Débit : 1 mL/min

Détection UV : 210 nm

Température : température ambiante, si possible 25°C

Range : 0,2

Atténuation : 1024

Pour les mesures des échantillons, les droites étalons déjà réalisées au laboratoire ont été utilisées (Figure 2 et Figure 3).

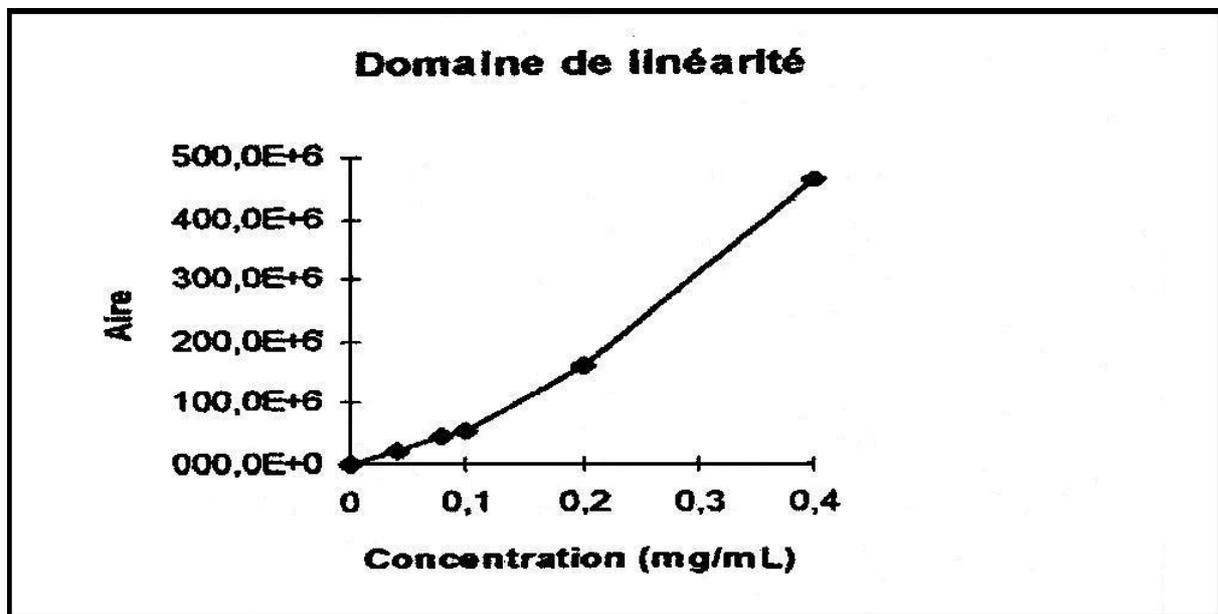


Figure 2 : Domaine de linéarité de l'aire des pics en fonction de la concentration

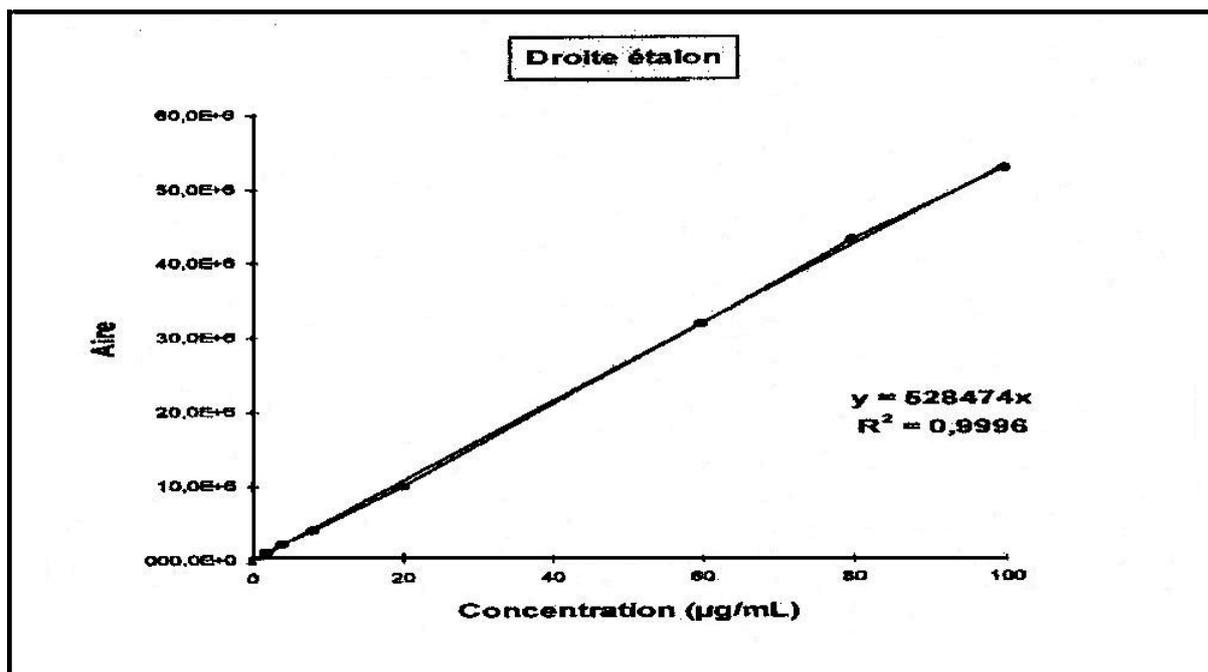


Figure 3 : Droite étalon de l'aire des pics en fonction de la concentration ( $y=528474x$ ,  $R^2=0.9996$ ).

## Dosage microbiologique

L'objectif de cette étude est d'étudier l'influence de la mise en forme galénique sur l'activité de la vancomycine.

La méthode microbiologique permet non seulement de doser la concentration de vancomycine dans les différents échantillons, mais également de tester l'activité réelle de la vancomycine et sa biodisponibilité.

### Principe

Il s'agit d'une méthode de dosage par diffusion qui consiste à comparer le diamètre d'inhibition obtenu avec l'échantillon à doser, disposé à la surface d'une géloseensemencée avec une bactérie sensible, aux diamètres d'inhibition obtenus avec des concentrations connues de l'antibiotique à doser. A côté de cette gamme étalon, réalisée dans des conditions de milieu et de pH appropriées, les échantillons à doser sont disposés de manière aléatoire sur toute la surface de

la plaque. Après 24 heures, les diamètres d'inhibition des échantillons sont mesurés et leurs valeurs sont converties en concentrations par rapport aux valeurs des solutions de la gamme étalon (5).

#### *Préparation des plaques*

180 mL de gélose de type AM2 (antibiotique medium de pH 6,6) sont fondus au bain-marie puis ramenés à une température de 50°C environ et ensemencés avec 4.5 mL de suspension de la bactérie test *Micrococcus luteus* pour obtenir un inoculum de  $10^6$ - $10^7$  UFC/mL. La gélose est homogénéisée par des mouvements de rotation en évitant l'incorporation de bulles, puis coulée sur une surface plane dans des plaques de verre permettant le dosage simultané d'un grand nombre d'échantillons. L'épaisseur de la gélose doit être de 3 mm.

Après 15 minutes, la gélose solidifiée est placée au réfrigérateur pendant 2 heures.

#### *Préparation de la gamme étalon*

A partir d'une poudre de vancomycine pure, titrée, une solution mère à 2000 µg/mL est préparée (10 mg de vancomycine dans 5 mL d'eau distillée stérile). Cette solution mère permet la réalisation de la gamme étalon de concentrations allant de 2 à 128 µg/mL.

#### *Répartition des échantillons*

20 puits sont creusés de façon régulière dans la gélose à l'aide d'un emporte-pièce de 9 mm de diamètre. Les échantillons à doser et les diverses concentrations de la gamme étalon doivent être répartis en double selon un schéma déterminé au hasard sous un volume de 120 µl. Ce schéma de répartition est noté ainsi que l'orientation de la plaque.

### *Prédifffusion et incubation*

Les plaques, munies d'un couvercle en aluminium, sont incubées à 37°C pendant 18 heures après 2 heures de prédifffusion à la température du laboratoire sur un plan horizontal.

### *Lecture et calcul*

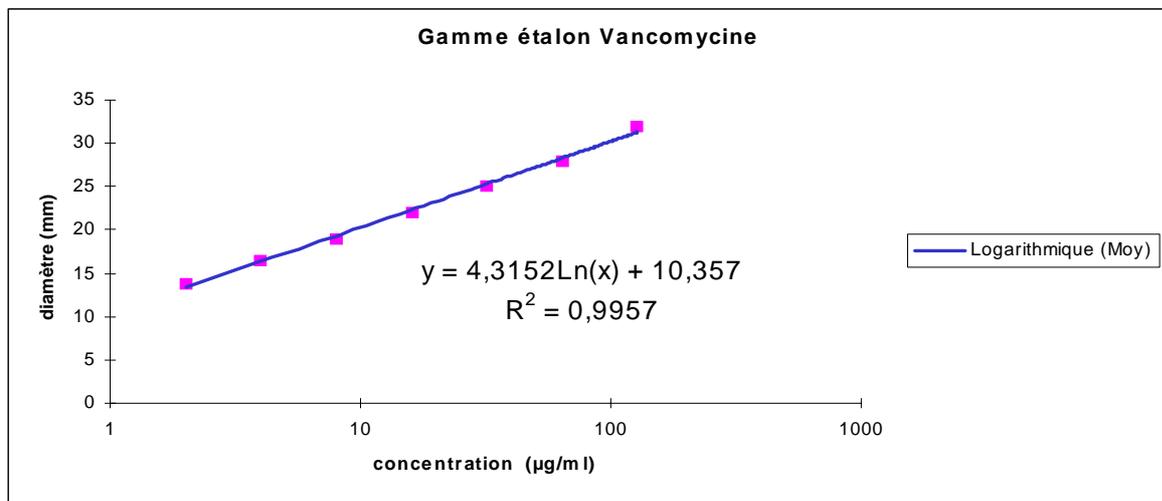


Figure 4 : Gamme étalon de la vancomycine

Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse. La courbe étalon est tracée sur du papier semi-logarithmique en portant en abscisse (échelle logarithmique) les concentrations (µg/mL) et en ordonnées les diamètres (mm). Le diamètre obtenu avec l'échantillon à doser est reporté sur cette courbe et la concentration de l'antibiotique correspondante est déduite. La gamme étalon obtenue est représentée ci-dessous (Figure 4).

La précision et l'exactitude de la droite sont données par la valeur du coefficient de corrélation R.

### **3.1.3 Etude *in vitro* de l'activité bactéricide de la vancomycine seule et incorporée dans des microparticules**

Les courbes de bactéricidie reflètent l'activité bactéricide d'un antibiotique en fonction de la concentration d'antibiotique utilisée et du temps d'incubation de la bactérie en présence de cet antibiotique.

#### *Souches*

Trois souches de *Staphylococcus aureus* ont été étudiées :

- 1 souche de référence, *S. aureus* ATCC 25922, sensible à la méticilline (SASM) et à la vancomycine
- 2 souches cliniques : *S.aureus* BCB8 et P9 résistantes à la méticilline (SARM) et sensibles à la vancomycine

#### *Matériel*

- bouillon MH
- microparticules (MP) contenant la vancomycine
- microparticules inertes, composées uniquement de poly- $\epsilon$ -caprolactone

#### *Antibiotique*

La concentration minimale inhibitrice (CMI) de la vancomycine est de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pour les trois souches.

Pour cette étude, la concentration utilisée est de 20 fois la CMI, soit 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Pour la vancomycine microencapsulée, il a été tenu compte du taux d'encapsulation ainsi que du pourcentage de libération de l'antibiotique à partir des microparticules. Le taux d'encapsulation étant de 11,11% et le pourcentage de libération de 70%, le pourcentage global de libération de vancomycine à partir des microparticules est de 7,7%. Pour obtenir 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de vancomycine

libérable à partir des microparticules, soit 2000 µg d'antibiotique dans les 100 mL de milieu, 26 mg de microparticules ont donc été nécessaires.

### *Méthode*

A J0, les souches sont repiquées en bouillon BCC et incubée à 37°C pendant 24h.

A J1, la solution mère de vancomycine à 2000 µg/mL est préparée ainsi que les inoculum, à partir du bouillon BCC ajusté à  $2.10^8$  bactéries/mL.

Différent tubes sont préparés contenant les bactéries, l'antibiotique libre ou non, les microparticules et le bouillon MH.

Tube	Bouillon MH (mL)	Vancomycine à 2000µg/mL (mL)	MP (mg)	MP inertes (mg)	Bactéries (mL)
Témoin	95				5
Témoin + MP inertes	95			26	5
MP	95		26		5
Vancomycine	94	1			5
Vancomycine + MP inertes	94	1		26	5

**Tableau I: Composition des différents milieux**

Les différentes préparations sont placées au bain-marie à 37°C, sous agitation à 157 rotations par minute.

Des prélèvements ont été effectués aux temps 0, 6, 24, 48 et 72 h, et après homogénéisation du milieu, un dénombrement bactérien a été effectué par repiquage de 50 µL de ces milieux sur des géloses nutritives de type Müller-Hinton (MH) à l'aide d'un enseigneur Spirale système® (Interscience, Saint-Nom-La-Breteche, France).

Après 24 h d'incubation à 37°C, les colonies sont comptées et exprimées en  $\log_{10}$  bactéries/mL.

### 3.1.4 Etude *in vivo*

Le but de cette étude a été d'évaluer l'activité de la vancomycine incorporée dans des microparticules *in vivo* sur un modèle d'ostéomyélite aiguë expérimentale chez le lapin.

#### 3.1.4.1 Choix du modèle

Le modèle choisi pour cette étude a été le modèle d'ostéomyélite aiguë chez le lapin, avec et sans matériel, mis en place au laboratoire. Plusieurs modalités d'infection ont été réalisées.

L'étude a porté sur des lapins femelles White New Zealand de 2.25 à 2.50 kg.

Une souche de *Staphylococcus aureus* P9 résistant à la méticilline (SARM) a été choisie pour les différentes expérimentations *in vivo*.

#### 3.1.4.2 Ostéomyélite sans matériel

L'ostéomyélite est obtenue en plaçant une compresse hémostatique imprégnée de l'inoculum bactérien dans une cavité creusée dans le tibia du lapin.

La randomisation a réparti les lapins en deux groupes de 5 lapins:

- un groupe recevant un implant de microparticules et aucun autre traitement
- un groupe traité par de la vancomycine en intramusculaire à la dose de 100 mg/kg/jour en deux injections

La technique expérimentale se déroule en trois temps :

### **1<sup>er</sup> temps : induction du foyer d'ostéomyélite**

A J1, les lapins ont été anesthésiés par une injection intramusculaire de kétamine à la dose de 10 mg/kg (Photographie 1).

Les faces latérales et frontales du genou droit ont été rasées et leur désinfection a été réalisée à la Bétadine<sup>®</sup>.

Le genou étant maintenu fléchi, l'abord de la métaphyse supérieure droite a été réalisé ainsi que la trépanation du tibia (Photographie 2 et Photographie 3). Une fois la corticale externe retirée, une éponge de Langen (compresse hémostatique) imprégnée d'une suspension de *S. aureus* P9 ajusté à 3 Mc Farland, soit  $5.10^8$  bactéries/mL, a été placée dans la cavité. Celle-ci a été refermée avec de la cire et les tissus refermés par simple surjet (Photographie 4).

### **2<sup>ème</sup> temps : curetage du foyer d'ostéomyélite et mise en place éventuelle des microparticules contenant de la vancomycine.**

A J4, les lapins ont été anesthésiés comme précédemment, les faces latérales et frontales du genou ont été rasées et leur désinfection a été réalisée à la Bétadine<sup>®</sup>.

L'incision de la patte a été frontale, longitudinale et centrée sur la zone métaphysaire. La perforation de la corticale et le curetage du foyer ont été réalisés à la curette (Photographie 5). La lésion a ensuite été largement lavée avec de la Bétadine<sup>®</sup>. Chez un groupe de 5 lapins, un implant de 40 mg de microparticules agglomérées par une goutte de Bétadine<sup>®</sup> a été mis en place au sein du volume cureté (Photographie 6).

Les prélèvements ont été pesés, placés de façon stérile dans 200  $\mu$ L d'eau physiologique, broyés etensemencés sur gélose MH à différentes dilutions afin d'effectuer la numération bactérienne en nombre de UFC par unité de masse de

prélèvement. Ces prélèvements ont permis de quantifier l'infection avant traitement, chaque lapin étant son propre témoin.

Le groupe de lapins n'ayant pas reçu de microparticules a été traité pendant 15 jours par de la vancomycine par voie intramusculaire à la dose de 100 mg/kg/jour en deux injections.

Le groupe ayant reçu des microparticules n'a pas reçu d'autre traitement pendant ce laps de temps.

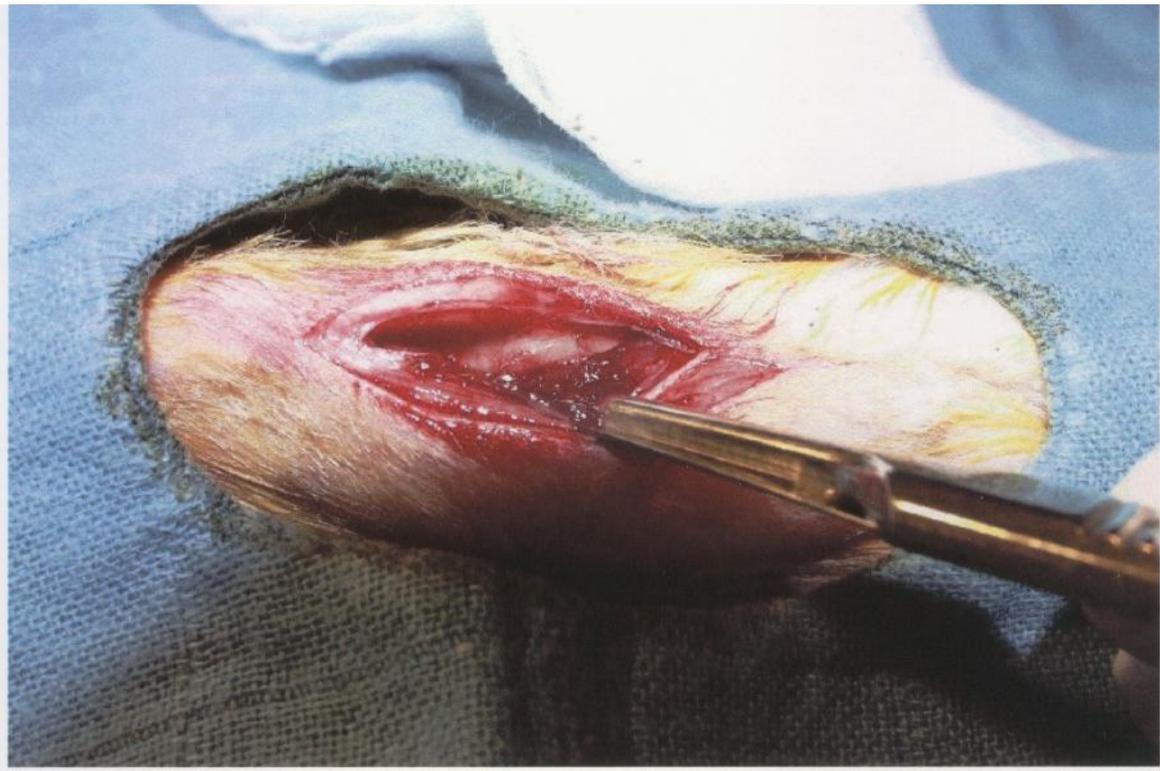
Une surveillance de l'état général des lapins a été réalisée tout au long de l'expérimentation.

### **3<sup>ème</sup> temps : sacrifice des animaux et dénombrement bactérien**

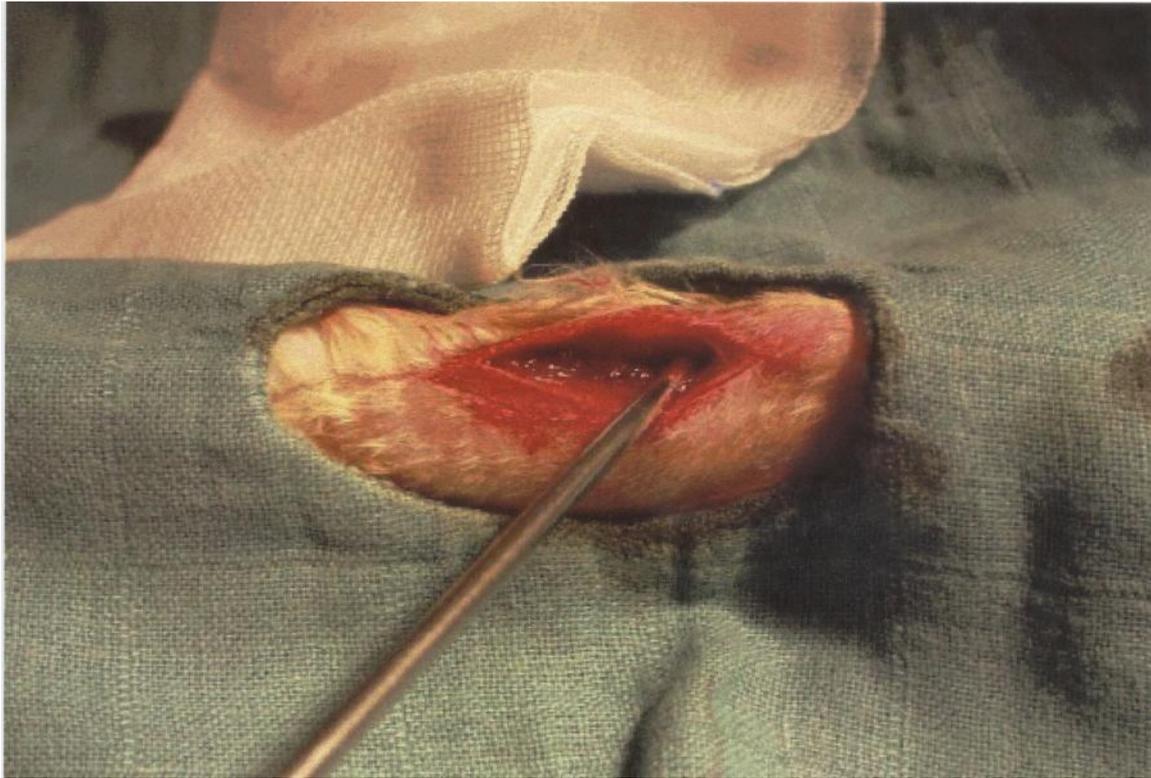
A J15, les animaux ont été euthanasiés par une injection intraveineuse de penthotal dans la veine marginale de l'oreille. La moitié proximale du tibia a été disséquée dans des conditions stériles. Des prélèvements de moelle osseuse ont été effectués et traités de la même façon qu'à J4.



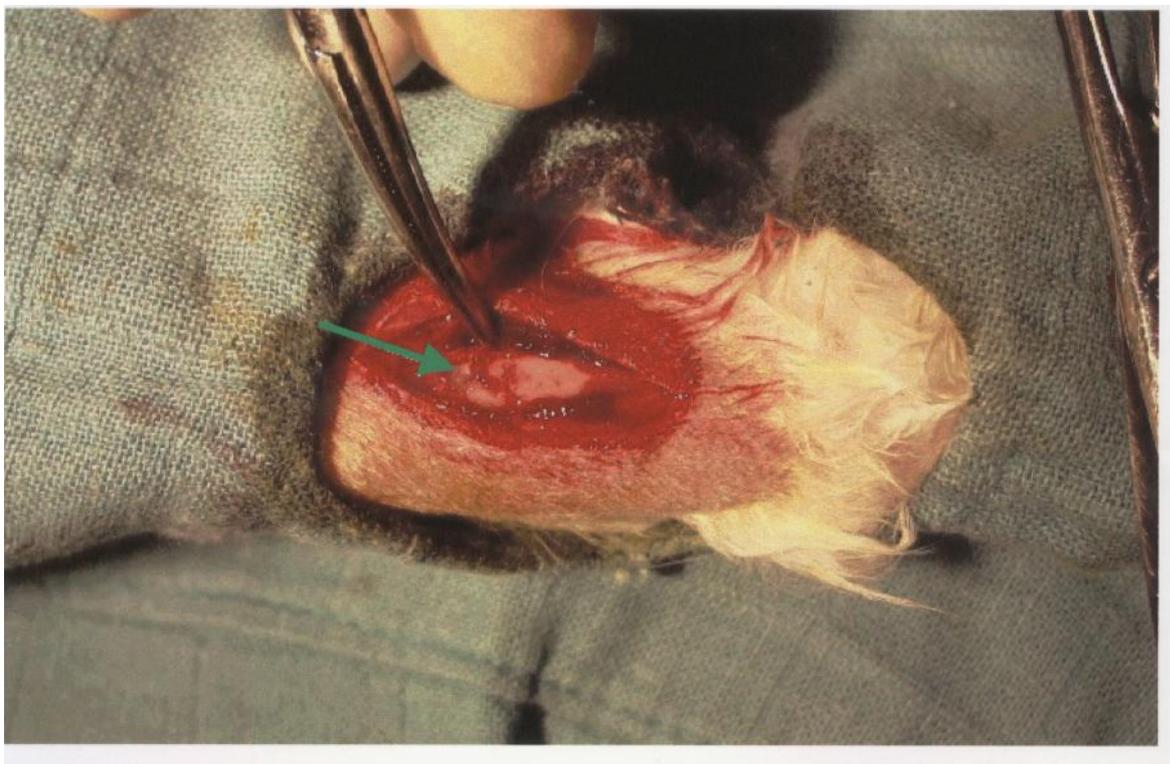
**Photographie 1 : Champ opératoire – vue d'ensemble**



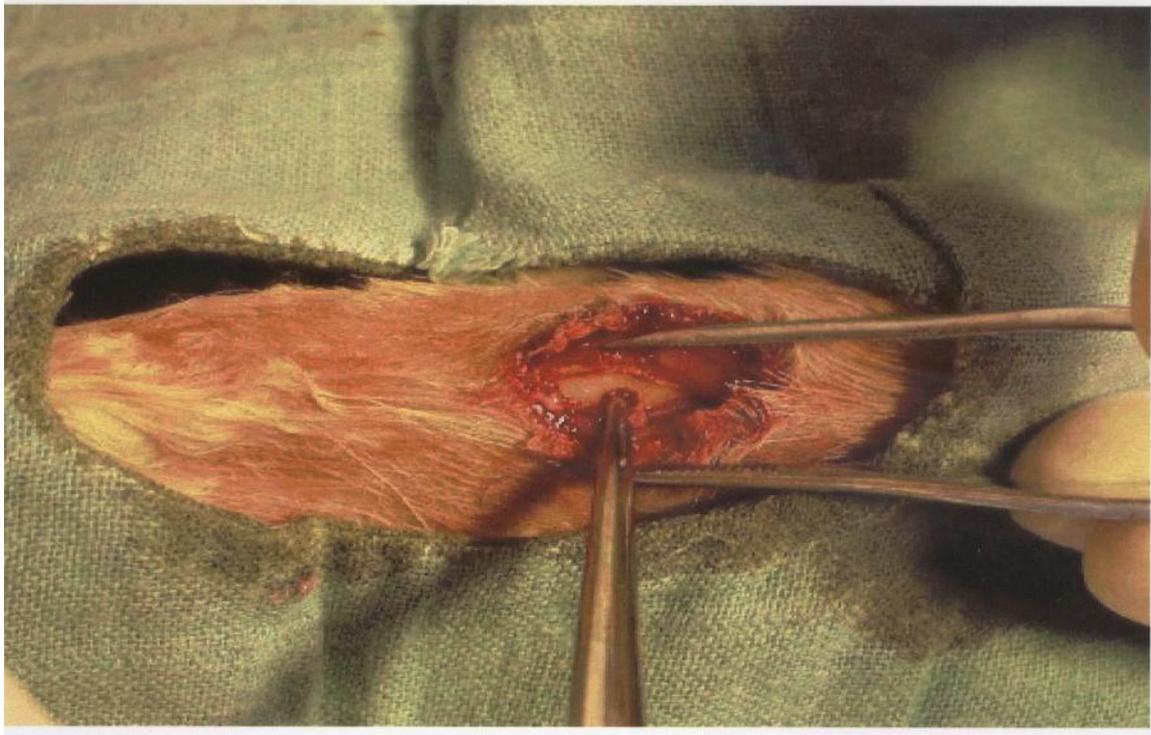
**Photographie 2 : Voie d'abord**



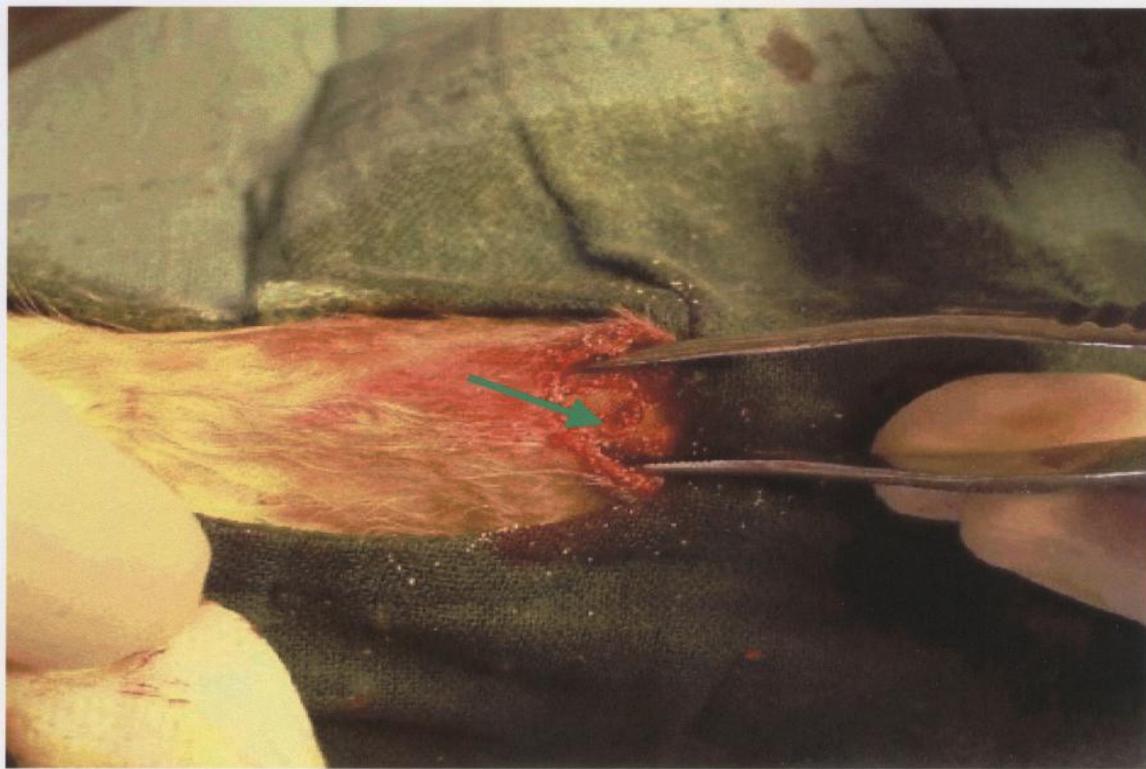
**Photographie 3 : Trépanation de la métaphyse tibiale supérieure**



**Photographie 4 : Fermeture de la cavité à la cire**



**Photographie 5 : Curetage du foyer d'ostéomyélite**



**Photographie 6 : Comblement de la cavité par des microparticules chargées en vancomycine**

### 3.1.4.3 Ostéomyélite sur matériel – matériel en place

#### **Mise au point du modèle : expériences préliminaires**

Le but ultime de ce développement, dont notre étude n'est qu'une phase préliminaire, serait d'utiliser ces microparticules contenant de la vancomycine en clinique humaine afin de traiter des infections sur prothèse.

Cinq expériences sont réalisées afin de mettre au point le modèle expérimental d'ostéomyélite sur matériel. Diverses modalités sont testées afin d'obtenir une prothèse infectée, soit en introduisant dans la circulation générale d'un lapin porteur de broche une suspension bactérienne, soit en implantant chez le lapin une broche colonisée par des bactéries, soit en inoculant au site opératoire une suspension bactérienne, soit en implantant une broche recouverte de gélose contenant l'inoculum bactérien, soit enfin avec la mise en place de broche entourée de cathéter colonisé par des bactéries. Dans chaque cas une radio a été réalisée pour vérifier la mise en place du matériel.

Chaque expérience porte sur des lapins White New Zealand femelles de 2.25 à 2.5 kg. L'état général des lapins est surveillé dans toutes ces études.

#### **1ère expérience : Mise en place d'une broche et injection d'une suspension bactérienne de *S. aureus* souche P9**

A J0, la souche P9 a été repiquée dans en bouillon MH à partir d'une colonie isolée sur gélose MH et mise à incuber pendant 24 h à 37°C.

A J1, 6 lapins ont été anesthésiés par une injection IM de kétamine à la dose de 10 mg/kg. Les faces latérales et frontales du genou droit ont été rasées et leur désinfection a été réalisée à la Bétadine®.

Le genou étant maintenu fléchi, l'abord du tibia droit a été réalisé, une cavité réalisée à l'aide d'une tige en acier inoxydable dans le canal médullaire du tibia

et une broche en acier inoxydable insérée dans ce canal. 1 mL de suspension bactérienne de *S. aureus* P9 à  $10^9$  UFC par mL (3 Mc Farland) a été introduit dans la circulation générale par injection intraveineuse dans la veine marginale de l'oreille des lapins.

A J 8, les lapins ont été sacrifiés, les pattes opérées disséquées et des radios de face et de profil réalisées. Les broches ont ensuite été retirées et des prélèvements de moelle osseuse effectués.

Les broches ont été posées sur des géloses puis retirées et les géloses présentant les empreintes des broches ont été placées à l'étuve à 37°C afin de voir si des bactéries s'étaient fixées sur les broches. Ces broches ont ensuite été placées dans des tubes contenant du bouillon cœur cerveau (BCC), vortexées et placées à 37°C, puis observées au bout de 24 heures.

Les prélèvements de moelle osseuse ont été pesés, placés dans 200 µL d'eau physiologique, broyés et ensemencés sur gélose MH à différentes dilutions.

### **2ème expérience : Mise en place d'une broche placée dans une suspension bactérienne durant 1 nuit.**

Une broche a été placée dans un tube de bouillon BCC ensemencé avec du *S. aureus* P9 et mise à incuber à 37°C pendant 24 heures. Le bouillon était alors trouble ; la broche a été récupérée, lavée et vortexée à l'eau distillée puis replacée dans du bouillon BCC et mise à incuber 24 heures à 37°C. Au bout de ce temps d'incubation, le bouillon était trouble, il restait donc des bactéries fixées sur la broche.

A J0, une broche stérile a été placée dans un tube ensemencé avec la souche de *S. aureus* P9 et mis à incuber à 37°C pendant 48 heures.

A J2, 6 lapins ont été anesthésiés par une injection IM de kétamine à la dose de 10 mg/kg, Les faces latérales et frontales du genou droit ont été rasées et leur désinfection a été réalisée à la Bétadine®.

Le genou étant maintenu fléchi, l'abord du tibia droit a été réalisé, une cavité réalisée à l'aide d'une tige en acier inoxydable dans le canal médullaire du tibia et la broche en acier inoxydable insérée dans ce canal.

A J 15, les lapins ont été sacrifiés, la broche retirée et un prélèvement de moelle osseuse effectué. Les prélèvements ont été pesés, placés dans 400 µL d'eau physiologique, broyés et ensemencés sur gélose MH à différentes dilutions ; les broches ont été déposées sur des géloses, retirées, et les empreintes mises à incuber à 37°C pendant 24 heures. Les broches ont ensuite été placées dans des tubes contenant du bouillon BCC, vortexées et placées à 37°C, puis observées au bout de 24 heures.

### **3<sup>ème</sup> expérience : Mise en place d'une broche et inoculation au site opératoire par du *S. aureus* P9.**

A J0, la souche *S. aureus* P9 a été repiquée en bouillon MH et mise à incuber pendant 24 h à 37°C.

A J1, un dénombrement bactérien a été effectué par repiquage de ce bouillon à différentes dilutions sur gélose MH à l'aide d'un ensemenceur Spirale système®. Le bouillon contient  $1.4 \cdot 10^9$  bact/mL.

4 lapins ont été anesthésiés par une injection IM de kétamine à la dose de 10 mg/kg, Les faces latérales et frontales du genou droit ont été rasées et leur désinfection a été réalisée à la Bétadine®.

Le genou étant maintenu fléchi, l'abord du tibia droit a été réalisé, une cavité réalisée à l'aide d'une tige en acier inoxydable dans le canal médullaire du tibia

et une broche en acier inoxydable insérée dans ce canal ainsi que 100  $\mu\text{L}$  de bouillon bactérien.

Les lapins ont été sacrifiés à différents intervalles de temps, un à J7, un à J14, un à J21 et un à J28 afin d'établir la stabilité du modèle au cours du temps.

A chaque sacrifice, la broche a été retirée et un prélèvement de moelle osseuse effectué, pesé, placé dans 400  $\mu\text{L}$  d'eau physiologique, broyé et ensemencé sur gélose MH à différentes dilutions.

#### **4<sup>ème</sup> expérience : Mise en place d'une broche recouverte de gélose ensemencée par une souche de *S. aureus* P9.**

Pour ce modèle, une expérience préliminaire a été réalisée pour voir si une quantité suffisante de bactéries serait déposée au site opératoire.

A J0, la souche P9 a été repiquée en bouillon MH et mise à incuber pendant 24 h à 37°C.

A J1, un dénombrement bactérien a été effectué par repiquage de ce bouillon à différentes dilutions sur gélose MH à l'aide d'un ensemencateur Spirale système<sup>®</sup>. Le bouillon contient  $1.4 \cdot 10^{10}$  bact/mL.

Une gélose a été préparée en incorporant dans 5 mL de gélose Chapman fondue et ramenée à 25°C, 100  $\mu\text{L}$  de la suspension bactérienne en bouillon MH.

10 broches de poids connu ont ensuite été trempées dans cette préparation et retirées doucement afin qu'un film de gélose se dépose à leur surface. Après refroidissement, ces broches ont été pesées et, si l'on prend une densité de 1 pour la gélose Chapman, l'inoculum par broche est connu.

4 lapins ont été anesthésiés par une injection IM de kétamine à la dose de 10 mg/kg, Les faces latérales et frontales du genou droit ont été rasées et leur désinfection a été réalisée à la Bétadine®.

Le genou étant maintenu fléchi, l'abord du tibia droit a été réalisé, une cavité réalisée à l'aide d'une tige en acier inoxydable réalisé dans le canal médullaire et une broche recouverte de géloseensemencée par les bactéries mise en place dans le canal médullaire.

Les lapins ont été sacrifiés, les broches retirées et des prélèvements de moelle osseuse effectués. Les sacrifices des lapins ont été étalés au cours du temps (J8, J14, J21 et J28) afin d'établir la stabilité du modèle au cours du temps.

Les prélèvements sont pesés, placés dans 400 µL d'eau physiologique, broyés et ensemencés sur gélose MH à différentes dilutions.

### **5<sup>ème</sup> expérience : Mise en place d'une broche entourée d'un cathéter colonisé par du *S. aureus* P9.**

A J0, 10 broches entourées de cathéters ont été déposées dans une suspension bactérienne de *S. aureus* P9 à 37°C.

A J1, au bout de 24 heures, 5 broches ont été prélevées, lavées à l'eau distillée et vortexées ; elles ont été roulées sur des géloses MH, puis placées dans du bouillon MH. Les géloses et les bouillons MH ont été mis à incuber 24 heures à 37°C. Après 24 heures d'incubation, les empreintes des broches étaient recouvertes de bactéries et les bouillons étaient troubles.

A J2, au bout de 48 heures, les autres broches ont été prélevées et ont subi les mêmes opérations. Au bout de 24 heures d'incubation à 37°C, les empreintes présentaient une forte croissance de bactéries et les bouillons un trouble important.

Les bactéries adhéraient donc au cathéter dès 24 heures de contact avec le bouillon bactérien.

A J3, la souche de *S. aureus* P9 a été repiquée dans des tubes de bouillon MH contenant chacun une broche recouverte d'un cathéter et mise à incuber pendant 48 h à 37°C.

A J4, les lapins ont été anesthésiés par une injection IM de kétamine à la dose de 10 mg/kg, Les faces latérales et frontales du genou droit ont été rasées et leur désinfection réalisée à la Bétadine®.

Le genou étant maintenu fléchi, l'abord du tibia droit a été réalisé, une cavité réalisée à l'aide d'une tige en acier inoxydable dans le canal médullaire et une broche recouverte du cathéter mise en place dans le canal médullaire.

A J10, les lapins ont été sacrifiés, les broches retirées et des prélèvements de moelle osseuse effectués.

Les prélèvements ont été pesés, placés dans 500 µL d'eau physiologique, broyés et ensemencés sur gélose MH à différentes dilutions.

## Expérimentation

Le modèle retenu a été celui de la broche entourée d'un cathéter contenant l'inoculum bactérien, l'infection atteignant un niveau suffisamment élevé et l'état général des lapins demeurant satisfaisant.

L'expérimentation a porté sur 12 lapins randomisés en trois groupes :

- un groupe G1 de 5 lapins traité par de la vancomycine en IM à la dose de 100 mg/kg/jour en deux injections,
- un groupe G2 de 5 lapins recevant 40 mg de microparticules implantées au niveau de l'infection, c'est à dire dans le canal médullaire,
- un groupe Témoin de 2 lapins.

A J0, la souche de *S. aureus* P9 a été repiquée dans 4 tubes de bouillon MH à partir d'une colonie isolée sur gélose MH et mise à incuber pendant 48 h à 37°C, avec dans chaque tube une broche entourée par un cathéter (le cathéter, de la longueur de la broche, a été coupé dans le sens de la longueur et placé autour de la broche).

### **1<sup>er</sup> temps : Induction du foyer d'ostéomyélite**

A J2, les lapins ont été anesthésiés par une injection IM de kétamine à la dose de 10 mg/kg.

Les faces latérales et frontales du genou droit ont été rasées et leur désinfection a été réalisée à la Bétadine<sup>®</sup>.

Le genou étant maintenu fléchi, l'abord du tibia droit a été réalisé, une cavité réalisée à l'aide d'une tige en acier inoxydable dans le canal médullaire et une broche recouverte du cathéter mise en place dans le canal médullaire. Les tissus ont été refermés par simple surjet.

## **2<sup>ème</sup> temps : Curetage du foyer d'ostéomyélite et mise en place éventuelle des microparticules contenant de la vancomycine**

Comme précédemment, à J4, les lapins ont été anesthésiés par une injection de kétamine à la dose de 10 mg/kg.

Les faces latérales et frontales du genou ont été rasées et leur désinfection réalisée avec de la Bétadine<sup>®</sup>.

L'incision de la patte a été longitudinale et centrée sur la zone métaphysaire. Les broches ont été retirées de façon stérile et des prélèvements de moelle osseuse effectués par curetage. Les prélèvements ont été pesés, placés de façon stérile dans 500 µL d'eau physiologique, broyés et ensemencés sur gélose MH à différentes dilutions afin d'effectuer la numération bactérienne en nombre de UFC par unité de masse du prélèvement. Ces prélèvements ont permis de quantifier l'infection avant traitement, chaque lapin étant son propre témoin.

Le canal médullaire a ensuite été largement lavé avec de la Bétadine<sup>®</sup>. En fonction du groupe randomisé du lapin, un implant de microparticules a été ou non mis en place dans le canal médullaire. Cet implant était constitué de 40 mg de microparticules mises à congeler à -80°C avec 50 µL d'eau pour préparation injectable afin de pouvoir être placé dans le canal médullaire sous forme de glaçon.

Le groupe de lapins n'ayant pas reçu de microparticules a été traité par de la vancomycine par voie IM à la dose de 100 mg/kg/jour en 2 injections. Le groupe ayant reçu des microparticules n'a pas reçu d'autre traitement.

## **3<sup>ème</sup> temps : Evaluation des traitements**

A J11, les lapins ont été euthanasiés par une injection IV de penthotal dans la veine marginale de l'oreille. Les cuisses des lapins ont été disséquées et ont été radiographiées afin de visualiser la position de la broche à l'intérieur du canal médullaire (Photographies 7, 8 et 9). La moitié proximale du tibia a ensuite été

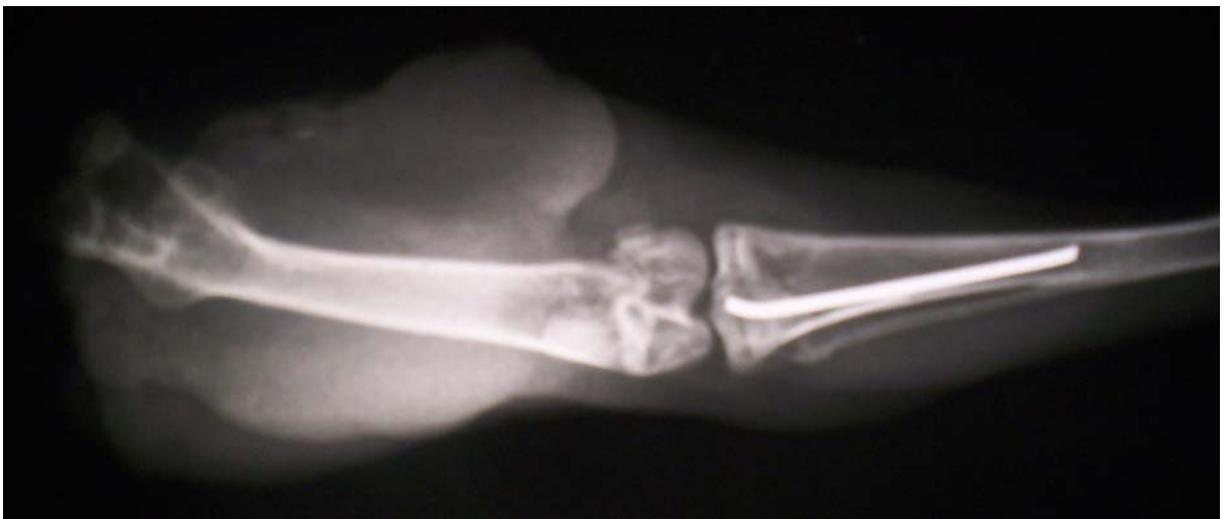
disséquée dans des conditions stériles, des prélèvements de moelle osseuse ont été effectués par curetage et traités de la même façon que précédemment.



**Photographie 7 : Radiographie de la cuisse de lapin – vue de profil**



**Photographie 8 : Radiographie de la cuisse de lapin – vue de face**



**Photographie 9: Radiographie de la cuisse de lapin – vue de face – détail**

## 3.2 RÉSULTATS ET ANALYSE

### 3.2.1 Formulation des microparticules

#### 3.2.1.1 Test de reproductibilité – analyse granulométrique

Les divers paramètres visant à établir la reproductibilité des manipulations sont colligés dans le tableau ci-dessous.

Echantillon	Rendement de préparation (%)	Analyse granulométrique				Taux d'encapsulation (%)
		moyenne± écart-type (µm)	pourcentage par classe granulométrique (moyenne±écart-type sur 3 prises d'essai)			
1	79,84	183,23±54,91	0-80µm 5,38±1,28	80-200 µm 49,71±2,17	200-500 µm 44,91±1,44	51,28
2	81,55	206,57±58,59	4,80±0,49	26,72±5,27	68,48±5,72	49,16
3	79,66	197,00±54,37	4,03±0,50	37,91±6,35	58,06±6,47	50,59
4	81,11	208,20±57,15	3,58±1,24	31,73±8,40	64,69±9,27	41,57
moyenne	80,54±0,93	198,75±56,26	4,45±0,88	36,51±5,55	59,04±5,72	48,15±4,47

**Tableau II: Résultats du test de reproductibilité**

L'analyse granulométrique est homogène, avec une moyenne à 198,75±56,26 µm. Le pourcentage par classe granulométrique montre une forte proportion (59,04±5,72%) dans la classe 200-500µm.

Le rendement de préparation des différent lots est reproductible et important (80,54±0,93%).

Le taux d'encapsulation est également reproductible, mais est plus faible, 48,15±4,47%.

Nous avons alors réalisé une production plus importante pour l'étude bactériologique. Cependant un tamisage sur un tamis de maille 500 µm sera réalisé afin d'éliminer les particules de trop grosse taille.

### 3.2.1.2 Lot de production de microparticules

11 lots ont ainsi été réalisés pour les expérimentations. Les mêmes paramètres de caractérisation ont été étudiés, soit sur chaque préparation (rendement de préparation et taux d'encapsulation), soit sur le lot total pour les paramètres granulométriques.

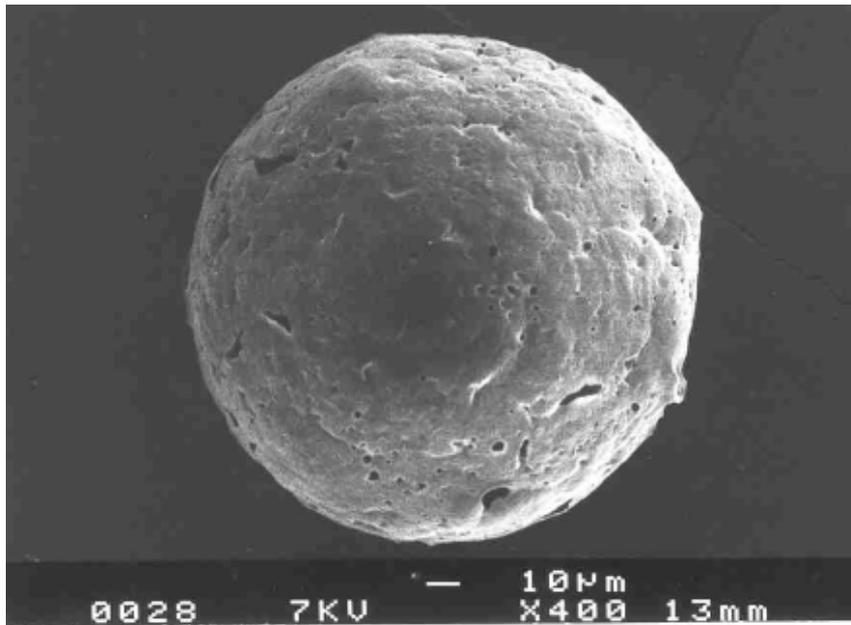
Echantillon	Rendement de préparation (%)	Analyse granulométrique			Rendement réel rapporté à 100 %	
		moyenne± écart-type ( $\mu\text{m}$ )	pourcentage par classe granulométrique (moyenne±écart-type sur 3 prises d'essai)			
			0-80 $\mu\text{m}$	80-200 $\mu\text{m}$	200-500 $\mu\text{m}$	
5	79,41					43,30
6	82,56					48,08
7	76,99					52,53
8	78,25					53,92
9	80,25					49,60
10	80,50					49,14
11	77,80					47,79
12	80,15					52,05
13	84,08					54,01
14	77,60					45,48
15	84,25					ND
moyenne	80,17±2,54	216,27±66,01	3,66±0,15	28,65±4,56	67,59±4,34	49,59±3,58

**Tableau III: Résultats des tests réalisés sur le lot définitif**

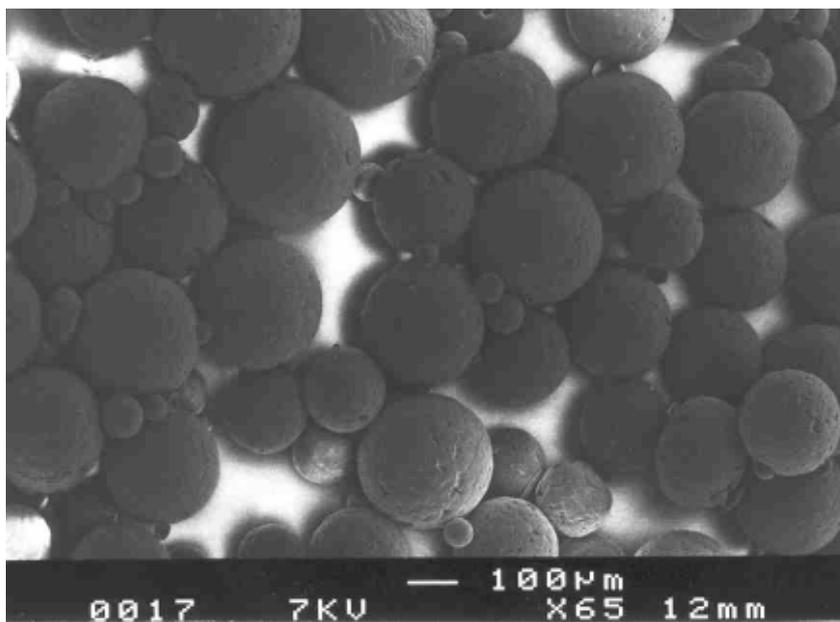
Partant de 250 mg de vancomycine et de 1 g de poly- $\epsilon$ -caprolactone, on obtient 1,125 g microparticules contenant 1 g de poly- $\epsilon$ -caprolactone et 125 mg de vancomycine, les 125 autres mg se retrouvant dans la phase externe. Dans 100 g de microparticules, il y a donc 11.11 g de vancomycine, le taux d'encapsulation est donc de 11.11%.

### 3.2.1.3 Analyse morphologique

En microscopie électronique à balayage (Photographie 10 et Photographie 11), les MP apparaissent sphériques et leur surface semble être criblée de trous. Cette forme sphérique permet le meilleur comblement des cavités osseuses.



**Photographie 10: Photographie prise en MEB d'une microparticule contenant du chlorhydrate de vancomycine (grossissement x 400).**



**Photographie 11: Photographie prise en MEB de microparticules contenant du chlorhydrate de vancomycine (grossissement x 65).**

### 3.2.2 Evaluation de la quantité de vancomycine libérée

Les résultats des pourcentages moyens de vancomycine libérée en fonction du temps, mesurés par HPLC (Tableau IV) et par dosage microbiologique (Tableau V) sont représentés ci-dessous :

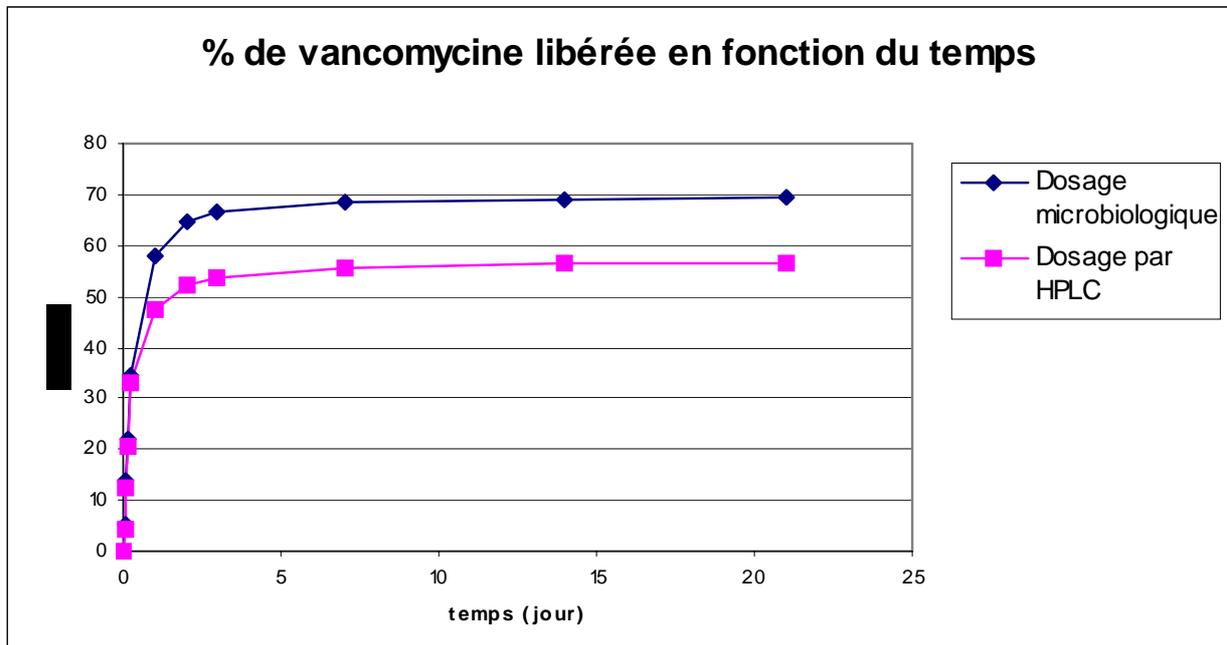
Temps	% moyen	écart-type
0	0	0
1h	4.23	0.28
2h	12.42	0,38
3h	20.48	0.13
6h	32.94	1.88
1j	47.45	1.09
2j	52.16	1.29
3j	53.56	1.11
7j	55.51	1.61
14j	56.31	1.49
21j	56.42	1.48

**Tableau IV : Pourcentage moyen de vancomycine libéré en fonction du temps mesuré par CLHP**

Temps	% moyen
0	0
1h	5.24
2h	14.05
3h	21.91
6h	34.38
1j	57.86
2j	64.86
3j	66.81
7j	68.28
14j	69.15
21j	69.28

**Tableau V: Pourcentage moyen de vancomycine libéré en fonction du temps mesuré par dosage microbiologique**

La représentation graphique de la libération de la vancomycine à partir des microparticules en fonction du temps montre le profil suivant (Figure 5 ).



**Figure 5: Pourcentage de vancomycine libéré à partir des microparticules en fonction du temps**

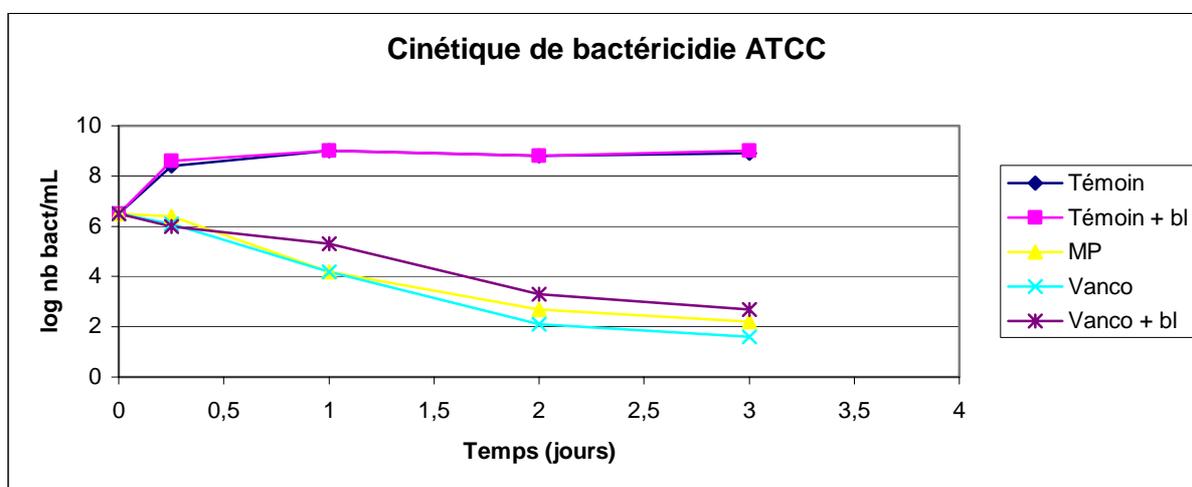
Il y a un relargage important de la vancomycine dès la première heure puis en 24 heures, 47% sont relargués. Au-delà le relargage se poursuit mais il est faible et le maximum de relargage est atteint en 14 jours. Les deux techniques d'évaluation utilisées donnent des résultats concordants, la différence étant due à une mesure d'activité.

Dans la suite de l'étude, le pourcentage de libération de la vancomycine sera pris à 70%, afin de ne pas sous estimer la quantité d'antibiotique libéré et mis en jeu dans les diverses expériences.

### 3.2.3 Etude *in vitro* de l'activité bactéricide de la vancomycine seule et incorporée dans des microparticules

Sur la souche *S. aureus* ATCC 25922 sensible à la méticilline, les cinétiques de bactéricidie obtenues avec les 2 mg de vancomycine libre et avec la même quantité de vancomycine libérable à partir des 26 mg de microparticules sont semblables (Figure 6). Le nombre de bactéries survivantes à 2 jours est compris entre 2 et 3 Log.

De plus, les cinétiques obtenues avec de la vancomycine libre et avec la même quantité de vancomycine libre accompagnée de 26 mg de microparticules inertes, tout comme les celles obtenues pour le témoin et pour le témoin accompagné de microparticules inertes, demeurent identiques. Ceci permet d'affirmer que les composants des microparticules n'ont aucun effet bactéricide intrinsèque.



**Figure 6:** Cinétique de bactéricidie sur la souche *S. aureus* ATCC 25922

Sur les souches de *S. aureus* BCB8 et P9 résistantes à la méticilline, les conclusions sont les mêmes, les microparticules n'interfèrent pas sur les cinétiques, et les profils obtenus avec et sans microparticules inertes sont identiques.

Les cinétiques de bactéricidie obtenues sont présentées Figures 7 et 8.

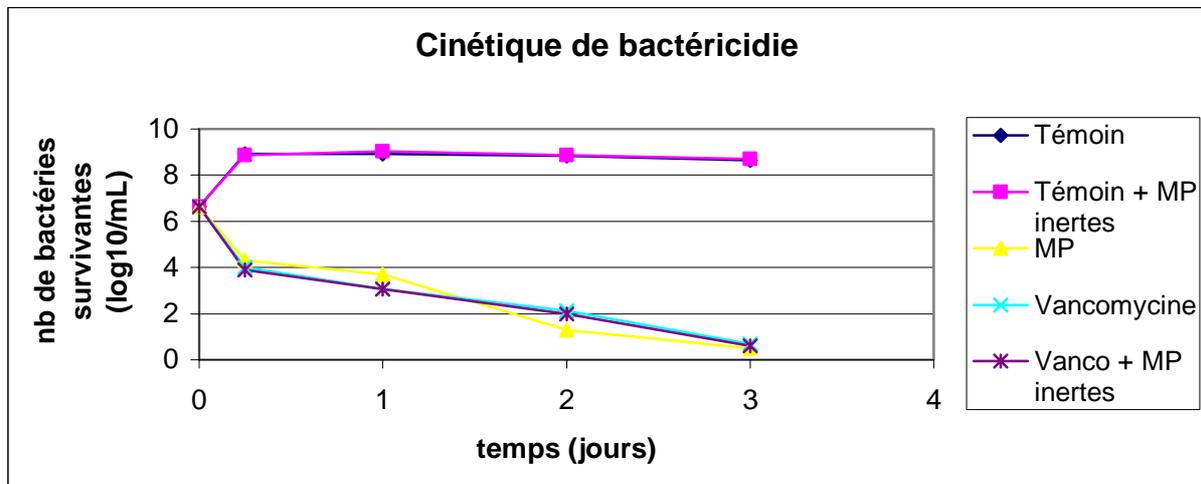


Figure 7: Cinétique de bactéricidie sur la souche de *S. aureus* BCB8

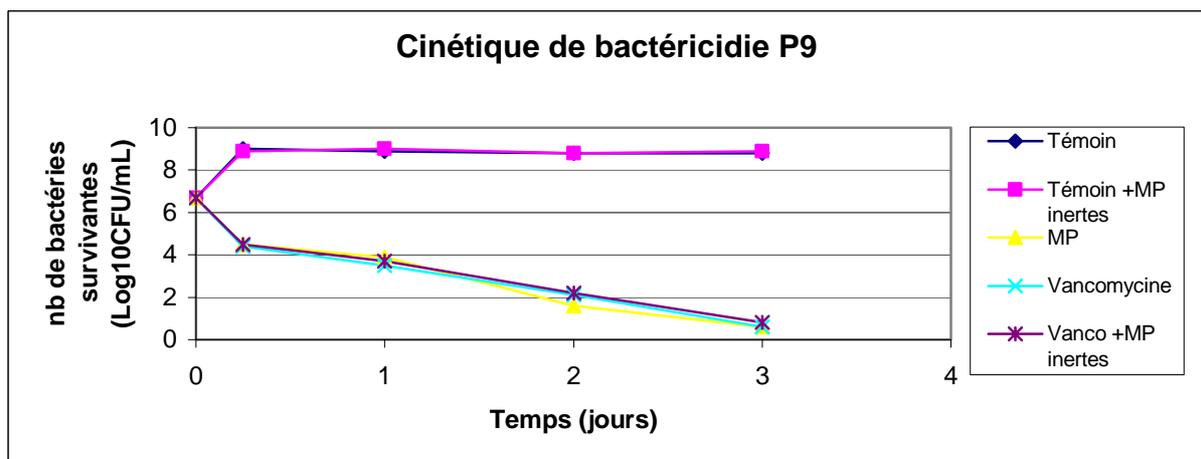


Figure 8: Cinétique de bactéricidie sur la souche de *S. aureus* P9.

Ces études *in vitro* de l'activité bactéricide de la vancomycine microencapsulée permettent de mettre en évidence la conservation de l'activité bactéricide de l'antibiotique après incorporation dans des microparticules de poly- $\epsilon$ -caprolactone sur des souches de staphylocoques sensibles et résistantes à la méticilline.

### 3.2.4 Etude in vivo

#### 3.2.4.1 Ostéomyélite sans matériel

L'induction d'une ostéomyélite a été prouvée à J4 lors du deuxième temps de la technique expérimentale par la présence de nécrose de la moelle osseuse et le développement bactérien au site de l'infection a été quantifié à partir des prélèvements de moelle osseuse effectués chez chaque lapin qui sert de témoin.

Le groupe 1 (G1) est composé des lapins traités par la vancomycine en IM.

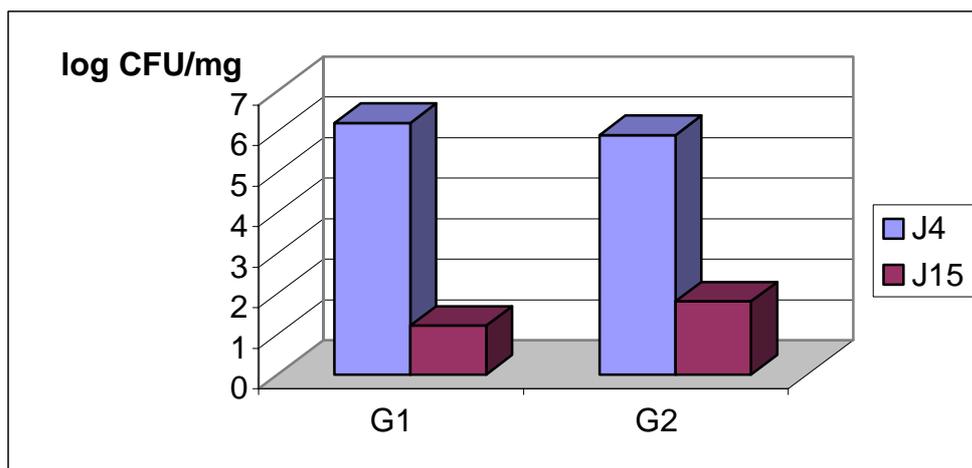
Le groupe 2 (G2) représente les lapins ayant reçu un implant de microparticules contenant de la vancomycine.

Les résultats des numérations bactériennes à J4 avant traitement et à J15 à la fin du traitement à l'échéance du sacrifice sont présentés dans la Figure 9. Dans chaque groupe, un lapin était stérile au site infectieux.

Les résultats sont présentés dans le Tableau VI.

Groupe (Nombre de lapins)	J4	J15	$\Delta \log 10$ UFC/mg
G1 (5)	6.2	1.2	5.0
G2 (5)	5.9	1.8	4.1

**Tableau VI : Nombre de bactéries exprimé en Log UFC/mg de moelle osseuse prélevé à J4 et J15**



**Figure 9 : Evolution de l'infection bactérienne en Log UFC/mg avant et après traitement**

Un lapin de chaque groupe était stérile à J15, au moins au site de l'infection.

Dans les deux groupes, une réduction d'au moins 3 Log de la population bactérienne a été observée. Une diminution de cet ordre révèle une diminution significative d'une population bactérienne par rapport à une population témoin (inoculum bactérien présent chez ces mêmes lapins à J4).

Aucune différence significative au niveau de l'activité bactéricide n'a été mise en évidence entre ces deux modalités de traitement. La vancomycine incorporée dans les microparticules semble donc active *in vivo* et le traitement de l'ostéomyélite aiguë sans matériel chez le lapin par des microparticules contenant de la vancomycine, à la dose de 40 mg, semble être efficace.

La dose de 40 mg de microparticules correspond à 3.11 mg de vancomycine libérée. Cette dose est très inférieure à la dose utilisée lors du traitement habituel par IM (100 mg/kg/jour), ce qui permet d'éviter les problèmes de toxicité au niveau veineux, et certainement de réduire les effets secondaires au niveau du rein et de l'oreille.

### 3.2.4.2 Ostéomyélite sur matériel – matériel en place

#### **Expérience préliminaire - Choix de la méthode :**

**1<sup>ère</sup> expérience : Mise en place d'une broche et injection d'une suspension bactérienne de *S. aureus* P9 dans la circulation générale par l'intermédiaire de la veine marginale de l'oreille.**

Huit jours après l'inoculation de *S. aureus* dans la circulation générale, 5 lapins sur 6 ont été sacrifiés, le 6<sup>ème</sup> lapin étant mort 5 jours après le début du protocole et n'a pas été inclus dans les résultats. Les lapins présentaient une altération de l'état général.

Les géloses présentant les empreintes des broches ne montraient aucune croissance bactérienne, les tubes de bouillon BCC contenant les broches ne présentaient pas de trouble et les dénombrements bactériens effectués sur les prélèvements après sacrifices des lapins se sont tous révélés stériles.

Cette technique ne provoque pas de véritable infection.

**2<sup>ème</sup> expérience : Mise en place d'une broche placée dans une suspension bactérienne de *S. aureus* P9 durant 1 nuit**

Durant cette expérience, les lapins n'ont pas présenté d'altération de l'état général. Les géloses sur lesquelles ont été déposées les broches retirées des tibias des lapins après leur sacrifice présentaient dans 3 cas sur 6 une forte croissance bactérienne au niveau de l'empreinte de la broche. Dans 2 cas une faible croissance et dans 1 cas une absence de croissance bactérienne. Dans les 6 cas, les tubes de bouillon BCC contenant les broches retirées après sacrifice et mis à incuber présentaient un fort trouble. Des bactéries étaient bien présentes à la surface des broches.

Sur les 6 broches, seules 5 étaient situées dans la moelle osseuse du tibia des lapins, la 6<sup>ème</sup> était située dans le muscle. L'infection a été mise en évidence

chez seulement 3 lapins, avec une valeur moyenne en log UFC/mg de prélèvement de 3,78 (3,39 ; 4,19 ; 3,76). La reproductibilité de ce modèle est donc trop faible.

### **3<sup>ème</sup> expérience : Mise en place d'une broche et inoculation au site opératoire d'une suspension bactérienne de *S. aureus* P9**

A chaque échéance de sacrifice, les lapins présentaient une très grande altération de l'état général, avec une mortalité importante des lapins (1/4).

Lors du premier sacrifice, à J7, un prélèvement a été effectué et la valeur moyenne de l'infection a été trouvée à 6,11 log UFC/mg.

A J14, un second lapin présentait une forte altération de l'état général, avec une perte de poids très importante. Au site opératoire, l'infection a été retrouvée à 4,61 log UFC/mg (4,09 et 5,13), avec une poche de pus au niveau de l'articulation, là où a été inoculée la suspension bactérienne.

A J21, le troisième lapin a été sacrifié. Ce lapin présentait une légère altération de l'état général marquée par une perte de poids. L'infection au niveau de la moelle osseuse a été retrouvée à 3,54 log UFC/mg, avec une poche de pus au niveau de l'articulation.

Le dernier lapin a été retrouvé mort à J16.

La mortalité entraînée par ce modèle est trop importante pour qu'il soit retenu.

### **4<sup>ème</sup> expérience : Mise en place d'une broche recouverte de géloseensemencée par une suspension bactérienne de *S. aureus* P9**

Les 4 lapins ont été sacrifiés à différents intervalles de temps et leur état général n'a pas présenté d'altération sur toute cette période. L'infection a été quantifiée au site opératoire à chaque sacrifice, elle était de 4,37 log UFC/mg à J7 ; de 4,35 à J14 ; de 5,61 à J21 et de 3,71 à J28.

L'infection est homogène mais faible.

**5<sup>ème</sup> expérience : Mise en place d'une broche entourée d'un cathéter colonisé par du *S. aureus* P9.**

L'infection atteint un bon niveau dans ce modèle chez les lapins (5.10, 4.85, 6.24 et 6.11 log UFC/mg). Ce modèle sera retenu pour l'évaluation de l'activité bactéricide *in vivo* de la vancomycine incorporée dans les microparticules.

## Expérimentation

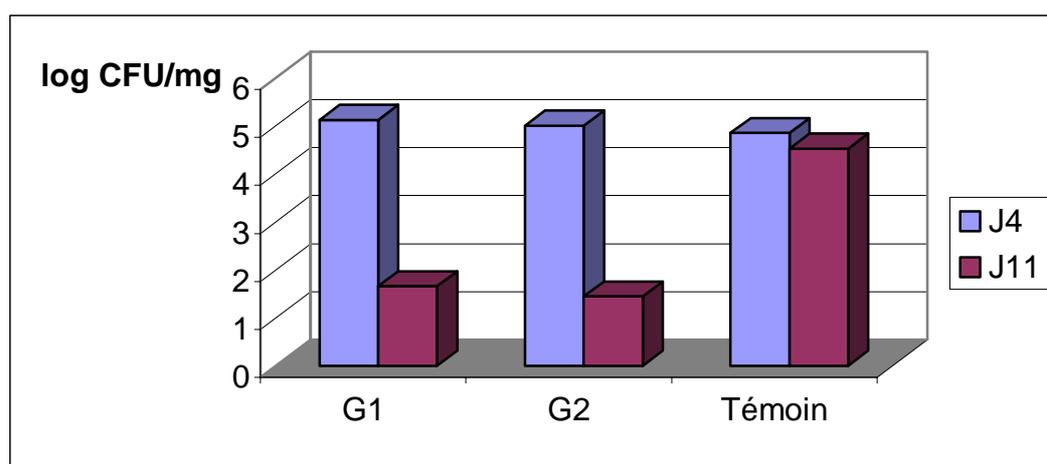
L'induction de l'ostéomyélite a été prouvée à J4 par la présence de nécrose de la moelle osseuse et le développement bactérien au site de l'infection a été quantifié. Chaque lapin est donc son propre témoin.

A J11, aucun lapin des groupes 1 et 2 ne présentait d'altération de l'état général.

Les résultats des numérations bactériennes à J4 avant traitement et à J11 à la fin du traitement sont présentés dans le Tableau VII. Les échantillons de moelle osseuse prélevés chez 2 lapins du groupe 1 et chez 3 lapins du groupe 2 étaient stériles à J11.

Groupe (nombre de lapins)	J4	J11	$\Delta \log_{10}$ UFC/mg
G1 (5)	5.13	1.66	3.47
G2 (5)	5.01	1.45	3.56
Témoin (2)	4.86	4.53	0.33

**Tableau VII : Nombre de bactéries exprimé en Log UFC/mg de moelle osseuse prélevé à J4 et J11**



**Figure 10 : Evolution de l'infection bactérienne avant et après traitement par de la vancomycine en IM et par des MP chargées en vancomycine**

Une diminution de plus de 3 Log, donc significative, a été retrouvée pour les deux modalités de traitement. Les 2 lapins témoin présentaient toujours une infection bactérienne au niveau du foyer infectieux à l'échéance du sacrifice, la diminution de l'infection était donc bien due au traitement antibiotique.

La vancomycine incorporée dans les microparticules de poly- $\epsilon$ -caprolactone présente la même activité bactéricide *in vivo* que la vancomycine libre qui est le traitement de référence.

La dose de 40 mg de microparticules mise en œuvre dans cette expérimentation correspond à 3.11 mg de vancomycine libérée, donc très inférieure à la dose de 100 mg/kg/j de vancomycine utilisée.

Les microparticules de poly-  $\epsilon$ -caprolactone semblent donc être un traitement efficace sur l'ostéomyélite sur matériel et permettent, grâce à la faible quantité de vancomycine libérée, d'éviter les effets indésirables au niveau systémique.

### 3.3 DISCUSSION

L'infection osseuse reste une complication sérieuse après une chirurgie orthopédique. Le germe le plus souvent responsable est *S. aureus*, et l'incidence des souches résistantes à la méticilline (SARM) ne cesse d'augmenter. Ce phénomène restreint le choix thérapeutique, et la molécule de référence dans le traitement des infections à SARM est la vancomycine. Cependant cette molécule est ototoxique, néphrotoxique et veinotoxique, ce qui implique la pose d'un cathéter central. L'administration par voie intra veineuse, à cause de la faible diffusion osseuse et de la faible vascularisation de l'os cortical, ne génère que de faibles quantités d'antibiotique au site de l'infection, et le traitement est long, au moins 6 semaines. Ces effets indésirables incitent à se pencher sur d'autres modalités de traitement afin de limiter la toxicité et de permettre un traitement ambulatoire, mieux accepté par le patient. L'implantation *in situ* d'un système de délivrance d'antibiotique pourrait être une bonne option si la quantité de vancomycine libérée est supérieure à la concentration minimale inhibitrice (CMI) durant les premières heures et peut être maintenue plusieurs semaines.

La vancomycine a déjà été incorporée dans différents biomatériaux, mais jamais dans des microparticules biodégradables de poly- $\epsilon$ -caprolactone qui représente l'objet de notre étude. La poly- $\epsilon$ -caprolactone a été choisie car elle assure la biodégradabilité des microparticules et annule ainsi l'obligation de les retirer après libération du principe actif. La mise au point des microparticules a été réalisée au Laboratoire de Pharmacie Galénique de la Faculté de Nantes et donne de bons rendements d'encapsulation (Le Ray, 2003).

L'étude de la cinétique de relargage a été faite selon un test de diffusion préalablement décrit (Gautier, 2000 et Guicheux, 1997). Cette technique, bonne

alternative à la méthode officielle dite de la palette tournante décrite à la Pharmacopée Européenne, limite les problèmes éventuels d'instabilité de la vancomycine libérée dans le milieu aqueux. Saito a montré que la vancomycine incorporée dans des blocs poreux d'hydroxyapatite restait bactéricide pendant 18 mois (Saito, 2002).

L'équipe de Chang quant à elle s'est attachée au sulfate de gentamicine incorporé dans de la poly- $\epsilon$ -caprolactone, et a montré une libération *in vitro* d'environ 80% sur une durée supérieure à 11 semaines dans du PBS à 37°C. Les matrices chargées de sulfate de gentamicine ont conservé une activité antibactérienne après 14 jours, démontrée par inhibition de la croissance de *S. epidermidis* en culture (Chang, 2006).

Dans notre étude, la quantité de vancomycine libérée a été mesurée par HPLC (De Nozal, 1996) et dosage microbiologique (Lorian, 1991). L'étude de la cinétique de relargage a montré que celui-ci s'est prolongé sur 21 jours, avec des concentrations allant jusqu'à 247 fois la CMI et restant supérieure à la CMI après 21 jours. La méthode microbiologique a également permis de vérifier la conservation de l'activité bactéricide après mise en forme galénique.

L'activité bactériologique des microparticules contenant de la vancomycine a été étudiée *in vitro* sur trois souches de *S.aureus*, une souche ATCC 25922 de référence sensible à la vancomycine et à la méticilline et deux souches BCB8 et P9 résistantes à la méticilline mais sensibles à la vancomycine. Les cinétiques de bactéricidie obtenues avec ces microparticules de poly- $\epsilon$ -caprolactone contenant de la vancomycine sur ces trois souches sont semblables à celles obtenues avec de la vancomycine libre ; l'activité de la vancomycine incorporée n'a été ni retardée ni altérée par la mise en forme galénique. En trois jours, le milieu de culture est stérilisé pour les trois souches de *S. aureus*, avec les microparticules comme avec la vancomycine libre. Des témoins contenant des microparticules de poly- $\epsilon$ -caprolactone inertes, c'est-à-dire ne contenant pas de vancomycine,

ont également permis de montrer l'absence de propriété bactéricide intrinsèque du polymère.

La vancomycine, antibiotique utilisé dans notre étude, a de nombreuses fois été incorporée dans des systèmes de délivrance de principe actif comme nous l'avons vu dans la revue de la littérature. Elle peut être administrée via une pompe externe (Meani, 1994 et Benkalfate, 1996) pour traiter des ostéomyélites chez l'homme. Cette technique permet des taux constants d'antibiotique *in situ*, un traitement en ambulatoire et donc un coût plus faible car les patients ne sont pas hospitalisés et le réservoir peut être rempli en consultation.

En clinique humaine, elle a le plus souvent été utilisée incorporé dans du polyméthylmétacrylate, soit sous forme de ciment orthopédique, autopolymérisable, qui sert à sceller les prothèses articulaires, soit sous forme de billes polymérisées, en chapelet. Mais ce matériau n'est pas biodégradable, n'aide pas à la repousse osseuse et nécessite un second geste chirurgical pour le retirer.

Les céramiques sont un biomatériau très prometteur comme vecteur de la vancomycine. Les blocs d'hydroxyapatite contenant de la vancomycine ont été étudiés dans des ostéomyélites à SARM chez le lapin et ont montré leur efficacité et l'absence d'effets secondaires locaux ou systémiques (Shirtliff, 2002 ; Joosten, 2005).

Nous retrouvons également la vancomycine en clinique humaine incorporée dans du sulfate de calcium, avec de bons résultats dans le traitement d'ostéomyélite chronique (Gitelis, 2002).

Elle est de plus en plus incorporée au stade expérimental dans d'autres matériaux biodégradables, polymères biocompatibles (Veyries, 1999 et Lee, 2004), éponges de collagène (Alpern, 1999) et polyesters, copolymères d'acide lactique et glycolique (Ozalp, 2001 ; Ozalp, 2002 ; Billon, 2005 et Liu, 2002).

La poly- $\epsilon$ -caprolactone qui est au centre de notre étude appartient à la famille des polyesters aliphatiques comme l'acide polylactique et l'acide polyglycolique. Elle est intéressante du fait de sa biocompatibilité et de sa biodégradabilité (Benoit, 1995). C'est un biomatériau non toxique avec les tissus. Sa dégradation est assez lente, permettant une délivrance du principe actif sur une longue période et ne s'accompagne pas de produits de dégradation acides (Hutmacher, 1996 et Engelberg, 1991). Elle a fait l'objet de quelques études.

Elle a été utilisée comme vecteur de la bléomycine dans le traitement de mélanomes chez la souris (Shenoy, 2002). Des études *in vitro* ont permis de vérifier la conservation des propriétés physico-chimiques et la libération après formulation de cet antibiotique antinéoplasique. Des expérimentations *in vivo* avec injection sous cutanée d'un dépôt de poly- $\epsilon$ -caprolactone ont montré une libération contrôlée de la bléomycine et une répression significative de la croissance de la tumeur par rapport à des témoins. Cette formulation avec sa fréquence réduite et sa facilité d'administration devrait permettre un bénéfice économique et une meilleure acceptation du traitement par le patient par rapport aux produits actuellement disponibles pour la chimiothérapie.

La tobramycine a également été incorporée dans de la poly- $\epsilon$ -caprolactone. Une étude *in vitro* de la libération de cet antibiotique à partir de billes de poly- $\epsilon$ -caprolactone et de polyméthylmétacrylate (Burd, 2001) a montré qu'après 8 semaines d'incubation, tous les échantillons présentaient une activité bactériostatique sur *S. aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. La poly- $\epsilon$ -caprolactone a montré des propriétés d'élution de la tobramycine supérieures à celles du polyméthylmétacrylate (38.9% contre 20%).

Ces caractéristiques d'élution de l'antibiotique ont également été montrées *in vivo*. Les taux de tobramycine ont été mesurés régulièrement jusqu'à 56 jours dans les urines, le sérum et au moment du sacrifice au niveau osseux chez des

lapins qui avaient reçu des implants de poly- $\epsilon$ -caprolactone ou de polyméthylmétacrylate contenant de la tobramycine. Le pic de concentration au niveau de l'os a été plus important avec la poly- $\epsilon$ -caprolactone et la diminution de concentration a été plus graduelle.

L'efficacité de la tobramycine dans la poly- $\epsilon$ -caprolactone et dans le polyméthylmétacrylate a été étudiée dans le traitement de l'ostéomyélite chez le lapin (Rutledge, 2003). Après 4 semaines de traitement, il y avait une différence significative entre les lapins témoins uniquement traités par irrigation et ceux traités par les systèmes de délivrance de l'antibiotique. Par contre, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les deux biomatériaux contenant la tobramycine. Aucune toxicité au niveau histologique n'a été observée.

Nos microparticules présentent à la fois les avantages de la vancomycine, molécule de référence dans le traitement des infections osseuses à SARM, et ceux de la poly- $\epsilon$ -caprolactone, à savoir biodégradabilité et parfaite tolérance.

Notre expérimentation a montré l'efficacité de ces microparticules contenant de la vancomycine sur des modèles d'ostéomyélite avec et sans matériel. Cette mise en forme galénique a permis une réduction très importante de la quantité de vancomycine administrée, ce qui devrait permettre de limiter les toxicités rénales et systémiques.

L'introduction des microparticules au site de l'infection demeure difficile du fait de leur très petite taille. Il pourrait être intéressant des les associer à un autre biomatériau afin de faciliter leur mise en place et éventuellement de combler des cavités osseuses plus importantes. Des essais d'association de la poly- $\epsilon$ -caprolactone à un substitut osseux injectable composé de BCP et d'un gel d'hydroxypropylméthylcellulose ont été réalisés afin de combiner aux effets thérapeutiques des microparticules contenant l'antibiotique des propriétés

d'ostéoconduction (Iooss, 2001). Il serait maintenant intéressant de vérifier si l'efficacité de ce substitut osseux injectable associé aux microparticules contenant la vancomycine est aussi efficace *in vivo* pour le traitement de l'ostéomyélite.

### 3.4 CONCLUSION

La délivrance locale d'antibiotiques dans les infections osseuses présente des avantages par rapport au traitement standard par voie intra veineuse. Non seulement il permet d'obtenir de hautes doses d'antibiotique au niveau local, mais il favorise l'acceptation du traitement par le patient en permettant un traitement en ambulatoire, et réduit ainsi les coûts. De plus, les matériaux biodégradables ne nécessitent pas de seconde intervention pour leur retrait.

Notre étude a permis de vérifier la conservation de l'activité bactéricide de la vancomycine après mise en forme galénique, et de prouver l'efficacité des microparticules de poly- $\epsilon$ -caprolactone contenant de la vancomycine dans le traitement d'ostéomyélite à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline chez le lapin, permettant ainsi de diminuer les risques de toxicité au niveau local et systémique.

Cependant les difficultés d'administration de ces microparticules au site de l'infection laissent penser qu'une association avec des granules de BCP dispersées dans un gel cellulosique permettrait d'obtenir un substitut osseux injectable plus facile à mettre en place, conservant les propriétés bactéricides des microparticules contenant la vancomycine, et présentant en plus les propriétés ostéoconductrices du BCP. Cette association permettrait de combler des espaces morts laissés par la chirurgie de tailles plus importantes que par les microparticules seules, et favorise la repousse osseuse.

Mais l'émergence et la progression de souches de cocci à Gram positif multirésistants, en particulier aux glycopeptides, constituent un problème préoccupant. Dès 2002, le premier cas d'infection due à *S. aureus* résistant à la vancomycine a été documenté (Sievert, 2002). Pour faire face à cette émergence et mieux maîtriser les infections à cocci à Gram positif, le linézolide, premier

antibiotique d'une nouvelle classe, les oxazolidinones, a été développé. En raison de sa faible tolérance hématologique et des contraintes de surveillance que cela implique, il pourrait être intéressant d'incorporer le linézolide aux microparticules de poly- $\epsilon$ -caprolactone.

En conclusion, nous pouvons dire que la présente étude montre que le traitement local des ostéomyélites expérimentales à SARM avec et sans matériel chez le lapin par des microparticules de poly- $\epsilon$ -caprolactone contenant de la vancomycine aboutit à l'éradication des souches de SARM. Son efficacité, accompagnée par l'absence de toxicité systémique, et ses propriétés de biodégradation qui permettent de s'affranchir de la nécessité d'un second geste chirurgical pour leur retrait après délivrance de l'antibiotique, encouragent ce nouveau mode de délivrance pour le traitement des ostéomyélites.

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Composition des différents milieux.....	40
Tableau II: Résultats du test de reproductibilité .....	56
Tableau III: Résultats des tests réalisés sur le lot définitif.....	57
Tableau IV : Pourcentage moyen de vancomycine libéré en fonction du temps mesuré par CLHP .....	59
Tableau V: Pourcentage moyen de vancomycine libéré en fonction du temps mesuré par dosage microbiologique.....	59
Tableau VI : Nombre de bactéries exprimé en Log UFC/mg de moelle osseuse prélevé à J4 et J15.....	63
Tableau VII : Nombre de bactéries exprimé en Log UFC/mg de moelle osseuse prélevé à J4 et J11.....	68

## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Dispositif de libération de la vancomycine utilisant le test de diffusion en chambre de culture.....	34
Figure 2 : Domaine de linéarité de l'aire des pics en fonction de la concentration .....	35
Figure 3 : Droite étalon de l'aire des pics en fonction de la concentration ( $y=528474x$ , $R^2=0.9996$ ).....	36
Figure 4 : Gamme étalon de la vancomycine.....	38
Figure 5: Pourcentage de vancomycine libéré à partir des microparticules en fonction du temps .....	60
Figure 6: Cinétique de bactéricidie sur la souche <i>S. aureus</i> ATCC 25922 .....	61
Figure 7: Cinétique de bactéricidie sur la souche de <i>S. aureus</i> BCB8 .....	62
Figure 8: Cinétique de bactéricidie sur la souche de <i>S. aureus</i> P9. ....	62
Figure 9 : Evolution de l'infection bactérienne en Log UFC/mg avant et après traitement.....	64
Figure 10 : Evolution de l'infection bactérienne avant et après traitement par de la vancomycine en IM et par des MP chargées en vancomycine.....	68

## LISTE DES PHOTOGRAPHIES

Photographie 1 : Champ opératoire – vue d’ensemble .....	44
Photographie 2 : Voie d’abord .....	44
Photographie 3 : Trépanation de la métaphyse tibiale supérieure .....	45
Photographie 4 : Fermeture de la cavité à la cire .....	45
Photographie 5 : Curetage du foyer d’ostéomyélite.....	46
Photographie 6 : Comblement de la cavité par des microparticules chargées en vancomycine.....	46
Photographie 7 : Radiographie de la cuisse de lapin – vue de profil .....	55
Photographie 8 : Radiographie de la cuisse de lapin – vue de face .....	55
Photographie 9: Radiographie de la cuisse de lapin – vue de face – détail .....	55
Photographie 10: Photographie prise en MEB d’une microparticule contenant du chlorhydrate de vancomycine (grossissement x 400). .....	58
Photographie 11: Photographie prise en MEB de microparticules contenant du chlorhydrate de vancomycine (grossissement x 65). .....	58

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Alpern E.J., Lin E.T., Miclau T. In Vitro Elution Characteristics of Tobramycin and Vancomycin Release from Locally Implantable Biodegradable Sponges. Orthopaedic Trauma Association 1999, Poster#29.
2. Ambrose C.G., Clyburn T.A., Loudon K., Joseph J.B., Wright J.B., Gulati P., Gogola G.R., Mikos A.G. Effective treatment of osteomyelitis with biodegradable microspheres in a rabbit model. Clin. Orthop. Relat. Res. 2004, 421 :293-9.
3. Benkalfate T., Goldschild M., Le Dantec P., Orain C., Lurton Y., Langlais F. Antibiothérapie par pompe externe dans le traitement des ostéites chroniques. Etude préliminaire de sept cas, Les Annales Orthopédiques de l'Ouest 1996,28 :71-74.
4. Benoit M.A., Youan B.C., Gillard J. Potential of polyester microparticles for the sustained release of oral vaccine. Proc. 1<sup>st</sup> World Meeting APGI/APV, 1995, 431-432.
5. Benoit M.A., 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, 21:403-408.
6. Billon A., Chabaud L., Gouyette A., Bouler J.M., Merle C. Vancomycin biodegradable poly(lactide-co-glycolide) microparticles for bone implantation. Influence of the formulation parameters on the size, morphology, drug loading and in vitro release. J Microencapsul. 2005, 22(8):841-52.
7. Buchholz H.W., Engelbrecht H. Uber die Depotwirkung einiger Antibiotica bei Vermischung mit dem kunstharz Palacos. Chirurg. 1970, 41:511-515.
8. Burd T.A., Anglen J.O., Lowry K.J., Hendricks K.J., Day D. *In vitro* elution of tobramycin from bioabsorbable polycaprolactone beads. J. Orthop. Trauma. 2001, 15(6):424-428.
9. Calhoun J.H., Mader J.T. Treatment of osteomyelitis with a biodegradable antibiotic implant. Orthopaedics & Related Research 1997, 341:206-214.
10. Chang H.I., Perrie Y., Coombes A.G. Delivery of the antibiotic gentamicin sulphate from precipitation cast matrices of polycaprolactone. J. Control Release 2006, 110(2):414-21.
11. Debue-Barazer C. Bulletin des Orthopédistes Francophones. 2003, 51 p. 11.
12. Del Nozal M.J., Bernal J.L., Pampliega A., Marinero P., Lopez M.L., Coco R. High-performance liquid chromatographic determination of vancomycin in rabbit serum, vitreous and aqueous humour after intravitreal injection of the drug. J. Chromatogr. 1996, 727:231-238.
13. Dressman H. Ueber knochenplomberung. Beitr. Clin. Chir. 1892, 9:804-810.
14. Edberg E. Some experiences of filing osteous cavities with plaster. Acta Chir. Scandinavia 1930, 67: 313-319.

15. Engelberg I., Kohn J. Physico-mechanical properties of degradable polymers used in medical applications: a comparative study. *Biomaterials*, 1991, 12:292-304.
16. Engesaeter L.B., Lie S.A., Espehaug B., Furnes O., Vollset S.E., Havelin L.I. 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):644-651.
17. Espehaug B., Engesaeter L.B., Vollset S.E., Havelin L.I., 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):590-595.
18. Feriz H. Experiments with tampons and membranes of collagen. *Surgery* 1940, 8:654-661.
19. Friess W. Collagen-biomaterial for drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1998, 45(2):113-136.
20. Gautier H., Guicheux J., Grimandi G., FaivreChauvet A., Daculsi G., Merle C. *In vitro* influence of apatite-granule-specific area on human growth hormone loading and release. *J. Biomed. Mater. Res.* 1998, 40(4):606-613.
21. Gautier H., Caillon J., Le Ray A.M., Daculsi G., Merle C. Influence of isostatic compression on the stability of vancomycin loaded with a calcium phosphate-implantable drug delivery device. *J. Biomed. Mater. Res.* 2000, 52:308-314.
22. Gitelis S, Brebach GT. The treatment of chronic osteomyelitis with a biodegradable antibiotic-impregnated implant. *J. Orthop. Surg. (Hong Kong)* 2002, 10(1):53-60.
23. Guicheux J., Grimandi G., Trecant M., Faivre A., Takahashi S., Daculsi G. Apatite as carrier for growth hormone: *in vitro* characterization of loading and release. *J. Biomed. Mater. Res.* 1997, 34(2):165-170.
24. Havelin L.I., Espehaug B., Lie S.A., Engesaeter L.B., Furnes O., Vollset S.E. The Norwegian Arthroplasty Register. 11 years and 73,000 arthroplasties. *Acta Orthop. Scand.* 2000, 71 :337-353.
25. Hendricks K.J., Lane D., Burd T.A., Lowry K.J., Day D., Phaup J.G., Anglen J.O. Elution characteristics of tobramycin from polycaprolactone in a rabbit model. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 2001, (392):418-426.
26. Herberts P., Malchau H. Long-term registration has improved the quality of hip replacement: a review of the Swedish THR Register comparing 160,000 cases. *Acta Orthop. Scand.* 2000, 71(2):111-121.
27. Hutmacher D., Hurzeler M.B., Schliephake H. A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for GTR and GBR applications. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 1996, 11(5): 667-78.

28. Iooss P., Le Ray A.M., Grimandi G., Daculsi G., Merle C. A new injectable bone substitute combining poly(epsilon-caprolactone) microparticles with biphasic calcium phosphate granules. *Biomaterials*. 2001, 22(20):2785-94.
29. Itokazu M., Aoki T., Nonomura H. Antibiotic-loaded porous hydroxyapatite blocks for the treatment of osteomyelitis and postoperative infection. A preliminary report. *Bull. Hosp. Jt. Dis.* 1998, 57(3):125-129.
30. Itokazu M., Ohno T., Tanemori T. Antibiotic-loaded hydroxyapatite blocks in the treatment of experimental osteomyelitis in rat. *J. Med. Microbiol.* 1997, 46(9) :779-783.
31. Josefsson G., Gudmundsson G., Kolmert L., Wukstrom S. Prophylaxis with systemic antibiotics *versus* gentamicin bone cement in total hip arthroplasty. A five years survey of 1688 hips. *Clin Orthop.* 1990, 253:173-177.
32. Joosten U., Joist A., Gosheger G. Effectiveness of hydroxyapatite-vancomycine bone cement in the treatment of *Staphylococcus aureus* induced chronic osteomyelitis *Biomaterials* 2005, 26(25):5251-5258.
33. Kanellakopoulou K., Galanakis N., Giamarellos-Bourboulis E.J., Rifiotis C., Papakostas K., Andreopoulos A., Dounis E., Karagianakos P., Giamarellou H. 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.
34. Klemm K. Gentamicin PMMA kugeln in der behandlung abszedieren der Knochen und Weichteilinfektionen. *Zentralbl. Chir.* 1979, 104:934.
35. Lazarettos J., Efstathopoulos N., Papagelopoulos P.J. A bioresorbable calcium phosphate delivery system with teicoplanin for treating MRSA osteomyelitis. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2004, (423) :253-258.
36. Le Ray A.M., Chiffolleau S., Iooss P., Grimandi G., Gouyette A., Daculsi G., Merle C. Vancomycin encapsulation in biodegradable poly(epsilon-caprolactone) microparticles for bone implantation. Influence of the formulation process on size, drug loading, *in vitro* release and cytocompatibility. *Biomaterials* 2003, 24(3):443-449.
37. Lee S.H., Lee J.E., Baek W.Y., Lim J.O. Regional delivery of vancomycin using pluronic F-127 to inhibit methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) growth in chronic otitis media in vitro and in vivo. *J Control Release.* 2004, 96(1):1-7.
38. Liu S.J., Wen-Neng Ueng S., Lin S.S., Chan E.C. In vivo release of vancomycin from biodegradable beads. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002, 63(6):807-13.
39. Lorian V. Antibiotics in laboratory medicine. Laboratory methods used to assess the activity of antimicrobial combinations. 3<sup>rd</sup> ed. The Williams and Wilkins Co. Baltimore, 1991:p.434-444.
40. Lortat-Jacob A. *L'Infection Osseuse Post-Traumatique*. Masson Paris 1992

41. Lucke M., Schmidmaier G., Sadoni S., Wildemann B., Schiller R., Haas N.P., Raschke M. Gentamicin coating of metallic implants reduces implant-related osteomyelitis in rats. *Bone*. 2003, 521-531.
42. Mäkinen T.J., Veiranto M., Lankinen P., Moritz N., Jalava J., Törmälä P., Aro H.T. In vitro and in vivo release of ciprofloxacin from osteoconductive bone defect filler. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005, 56(6):1063-1068.
43. Meani E., Romano C. Treatment of osteomyelitis by local antibiotics using a portable electronic micropump. *Rev. Chir. Orthop. reparatrice Appar. Mot.* 1994, 80(4):285-290.
44. Mehta S., Humphrey J.S., Schenkman D.L., Seaber A.V., Vail T.P. Gentamicin distribution from a collagen carrier. *J. Orthop. Res.* 1996, 14(5):749-54.
45. Mohanty S.P., Kumar M.N., Murthy N.S. Use of antibiotic-loaded polymethyl methacrylate beads in the management of musculoskeletal sepsis--a retrospective study. *J. Orthop. Surg. (Hong Kong)* 2003, 11(1):73-79.
46. Nicoleau D.P., Nie L., Tessier P.R., Kourea H.P., Nightingale C.H. Prophylaxis of acute osteomyelitis with absorbable ofloxacin-impregnated beads. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998, 42(4):840-842.
47. Nie L., Nicoleau D.P., Tessier P.R., Kourea H.P., Browner B.D., Nightingale C.H. Use of bioabsorbable polymer for the delivery of ofloxacin during experimental osteomyelitis treatment. *J. orthop. Res.* 1998, 16(1):76-9.
48. Ozalp Y., Ozdemir N., Kocagoz S., Hasirci V. Controlled release of vancomycin from biodegradable microcapsules. *J Microencapsul.* 2001, 18(1):89-110.
49. Ozalp Y., Ozdemir N., Hasirci V. Vancomycin release from poly(D,L-lactide) and poly(lactide-co-glycolide) disks. *J Microencapsul.* 2002, 19(1):83-94.
50. Peltier L.F., Bickel E.Y., Lillo R., Thein M.S. The use of plaster of Paris to fill defects in bone. *Ann. Surg.* 1957, (146):61-69.
51. Perry C.R., Pearson L.R. Local antibiotic delivery in the treatment of bone and joint infections. *Clin. Orthop.* 1991, (263):215-226.
52. Rutledge B., Huyette D, Day D, Anglen J. Treatment of osteomyelitis with local antibiotics delivered via bioabsorbable polymer. *Clin Orthop Relat. Res.* 2003, (411):280-7.
53. Saito T., Takeuchi R., Hirakawa K., Nagata N., Yoshida T., Koshino T., Okuda K., Takema M., Hori T. Slow-releasing potential of vancomycin-loaded porous hydroxyapatite blocks implanted into MRSA osteomyelitis. *J Biomed Mater Res.* 2002, 63(3):245-51.
54. Serbetci K.; Korkusuz F.; Hasirci N. Thermal and mechanical properties of hydroxyapatite impregnated acrylic bone cements. *Polymer Testing* 2004, 23( 2):145-155.

55. Shenoy B.D., Venkatesh M., Udupa N. Optimization and performance evaluation of peptide-loaded monolithic poly-epsilon-caprolactone microspheres in mice bearing melanoma B16F1. *Pharmazie*. 2002, 57(4):256-60.
56. Shirliff M.E., Calhoun J.H., Mader J.T. Experimental osteomyelitis treatment with antibiotic-impregnated hydroxyapatite. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2002, (401):239-247.
57. Sievert D.M. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin. United States, 2002, 5, 51 (26) 565-567.
58. Stemberger A., Grimm H., Bader F., Rahn H.D., Asherl R. Local treatment of bone and soft tissue infections with the collagen-gentamicin sponge. *Eur. J. Surg.* 1997, (578):17-26.
59. Thomas G. Structure and texture of solids, Chapter 3. In: *Handbook of Powder Technology*, volume 9; *Powder Technology and Pharmaceutical Processes*; Chulia D, Deleuil M, Pourcelot Y (eds) JC Williams and T Allen (advisory eds); Elsevier, Amsterdam, London, New York, Tokyo; 1994: 59-78.
60. Veyries M.L., Couarraze G., Geiger S., Agnely F., Massias L., Kunzli B., Faurisson F., Rouveix B. Controlled release of vancomycin from poloxamer 407 gels. *Int. J. Pharm.* 1999, 192(2):183-93.
61. Walenkamp G.H., Kleijn L.L., de Leeuw M. Osteomyelitis treated with gentamicin-PMMA beads: 100 patients followed for 1-12 years. *Acta Orthop. Scand.* 1998, 69(5):518-522.
62. Walenkamp GHIM. Chronic osteomyelitis. How I do it. *Acta Orthop. Scand.* 1997, 68(5): 497-506.
63. Wei G., Kotoura Y., Oka M., Yamamuro T., Wada R., Hyon S.H., Ikada Y. A bioabsorbable delivery system for antibiotic treatment of osteomyelitis. *J. Bone Joint surg.* 1991, 73-B:246-52.
64. Yamashita Y., Uchida A., Yamakawa T. Treatment of chronic osteomyelitis using calcium hydroxyapatite ceramic implants impregnated with antibiotics. *Int. Orthop.* 1998, 22(4):247-251.
65. Zhu K., Lin X., Yang S. Preparation, characterization, and properties of polylactide(PLA)-poly(ethyleneGlycol)(PEG) copolymers : a potential drug carrier. *J Applied Polymer Science.* 1990, 39 :1-9
66. Zyvoxid® (linézolide): Résumé des Caractéristiques Produit (RCP).

---

Nom –Prénoms : LATY Marie-Katel, Anne, Christiane

Titre de la Thèse :

Evaluation in vitro et in vivo de l'activité bactéricide de la vancomycine incorporée dans des microparticules de poly- $\epsilon$ -caprolactone.

---

Résumé de la Thèse :

Le traitement classique des ostéomyélites à *Staphylococcus aureus* résistant à la pénicilline est la vancomycine. C'est un traitement long et coûteux, avec de nombreux effets indésirables pour le patient. L'utilisation d'implants biodégradables contenant des antibiotiques pour le traitement des infections osseuses est une alternative intéressante. Les implants libèrent de fortes concentrations tissulaires d'antibiotique, comblent les espaces laissés vides par la chirurgie et ne nécessitent pas d'être retirés après libération du principe actif. Les implants de notre étude sont des microparticules biodégradables de poly- $\epsilon$ -caprolactone contenant de la vancomycine. Nous avons tout d'abord vérifié la stabilité de la vancomycine dans ce biomatériau et quantifié la quantité de vancomycine libérée au cours du temps. Puis nous avons évalué l'activité bactéricide in vitro de ces implants. Nous avons voulu valider ces microparticules sur un modèle d'ostéomyélite chez le lapin mis au point au laboratoire de l'équipe EA 3826, en comparant l'activité in vivo de la vancomycine incorporée dans des microparticules de poly- $\epsilon$ -caprolactone à celle de la vancomycine administrée par voie intramusculaire.

---

MOTS CLE :

MICROPARTICULES

POLY- $\epsilon$ -CAPROLACTONE

VANCOMYCINE

OSTEOMYELITE

---

JURY :

PRESIDENT : Mme Françoise BALLEREAU,

ASSESEURS : Mme Jocelyne CAILLON,

Mme Hélène Gautier

Mme Anne-Marie Le Ray

---

Adresse de l'auteur : 1 rue Dumont d'Urville, 17137 Nieul sur Mer