UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Contributions Cliniques et Expérimentales à l'Etude des Infections Ostéo-Articulaires de l'Enfant

Thèse de Doctorat

Ecole Doctorale Chimie-Biologie

Sciences de la Vie et de la Santé
Biomolécules, Pharmacologie, Thérapeutique

Présentée et soutenue publiquement par

Antoine HAMEL

Le 4 juillet 2008

Rapporteurs
M. le Professeur Gérard Bollini, PU-PH, Université de la Méditerranée - Aix-Marseille II
M. le Professeur Jean-Michel Clavert, PU-PH, Université Louis Pasteur, Strasbourg

Examinateurs
M. le Professeur Marc Braun, PU-PH, Université Henri Poincaré, Nancy I
M. le Doyen Jean-Michel Rogez, PU-PH, Université de Nantes

Directeurs de thèse
M. le Professeur Gilles Potel, PU-PH, Université de Nantes
Mme le Docteur Jocelyne Caillon, MCU-PH, Université de Nantes

Tables des matières

Liste des abréviations **7**

Introduction **9**
l'infection ostéo-articulaire **12**

Physiopathologie **13**
des infections ostéo-articulaires **13**
Le site de l'infection 13
La bactérie 15
La porte d'entrée 16
Anatomie-pathologique 17
Pourquoi les infections ostéo-articulaires surviennent-elles ? 18
Conclusion 25
Modèles d'arthrite septique **28**

Modèles d'ostéomyélite **30**

Modèle d'ostéomyélite **33**

introduction 33
Matériel et Méthodes 33
Résultats in vivo et discussion 36
Modèle d'ostéite post-traumatique **40**

Introduction 40
Matériels et Méthodes 40
Résultats 42
Discussion 43
Modèle d'ostéo-arthrite **44**

Introduction 44
Matériel et méthodes 44
Résultats 46
Discussion 48
Quinupristine - Dalfopristine **50**

Introduction 50
Matériels et Méthodes 51
Résultats 54
Discussion 56
Moxifloxacine **62**

Introduction 62
Matériels et Méthodes 62

Résultats 65
Discussion 67
Etude in vivo de l'activité bactéricide de la vancomycine incorporée dans des microparticules de poly-ε-caprolactone. 73

Introduction 73
Matériel et méthodes 74
Résultats 76
Discussion 77
Rôle de l'Immobilisation Plâtrée dans le Traitement d'un Modèle d'Arthrite à Staphylococcus aureus chez le Lapin. 83

Introduction 83
Matériels et Méthodes 84
Déroulement de l'expérimentation 85
Critères de jugement. 86
Groupe contrôle. 88
Critères d'inclusion. 88
Analyse statistique 89
Résultats 89
Discussion 99
Conclusion 102
Matériel d'ostéosynthèse interne et ostéite post-traumatique 104

Introduction 104
Matériels et Méthodes 105
Résultats 108
Discussion 109
Immobilisation et arthrite septique 118

Introduction 118
Matériel et méthodes 119
Résultats 121
Discussion 124
Conclusion 125
Conclusions et Perspectives 128

Bibliographie 131

Liste des abréviations

Liste des abréviations

BCC : Bouillon Cœur Cervelle

BCP : Phosphate Bi Calcique

CFU : Colony Forming Unit

Cmax : Concentration maximale

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

Cmin : Concentration minimale

CRP : C – Réactive Protéine

D : Dalfopristine

g : gramme

h : heure

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

kg : kilogramme

LA : Liquide Articulaire

Log_{10} : logarithme base 10

mg : milligramme

MH : Mueller-Hinton

ML : millilitre

MO : Moelle Osseuse

NaCl : Chlorure de sodium

Q : Quinupristine

Q-D : Quinupristine-Dalfopristine

SARM : *Staphylococcus aureus* Résistant à la méticilline

SASM : *Staphylococcus aureus* Sensible à la méticilline

TS : Tryptycase Soja

UFC : Unité Formant Colonie

Introduction

Introduction

L'infection ostéo-articulaire constitue un challenge quotidien pour tous les orthopédistes pédiatres.

- Challenge diagnostique : le diagnostic précoce des infections ostéo-articulaires de l'enfant est indispensable pour limiter leurs séquelles surtout fréquentes chez le très jeune enfant et pour éviter les décès qui bien que rares sont toujours possibles.

- Challenge thérapeutique : l'antibiothérapie est la base du traitement, mais les traitements associés sont-ils nécessaires ?

Salter dans les années 80 avait montré que la mobilisation passive continue améliorait la cicatrisation du cartilage articulaire au cours d'une arthrite septique. L'immobilisation a-t-elle encore un rôle, pour ses vertus antalgiques ?

L'ablation du matériel d'ostéosynthèse interne modifie-t-elle la réponse au traitement antibiotique dans les ostéites post-traumatiques ?

L'émergence de bactéries résistantes, dans le cadre des infections nosocomiales, mais aussi dans le cadre de la pathologie communautaire, limite l'arsenal thérapeutique à disposition du clinicien. L'évaluation *in vivo* de nouvelles molécules antibiotiques est nécessaire et urgente.

Cette thèse est le travail d'un clinicien confronté à l'ensemble des problèmes exposés ci-dessus. Les réponses que nous avons tentées d'apporter sont cliniques et expérimentales.

La première section de ce travail concerne les bases anatomiques et physio-pathologiques du développement des infections ostéo-articulaires. La deuxième partie est consacrée aux modèles animaux d'infections osté-articulaires, existants et mis au point à l'occasion de cette thèse. Dans la troisième partie sont rapportées les expérimentations évaluant de nouvelles molécules, un nouveau mode d'administration et des traitements adjuvants à l'antibiothérapie. Enfin, nous rapportons une étude clinique évaluant les effets de l'immobilisation au cours du traitement des arthrites septiques.

L’infection ostéo-articulaire de l’enfant

l'infection ostéo-articulaire

Il existe deux grands groupes d'infections ostéo-articulaires chez l'enfant qui se distinguent par leurs différences physio-pathologiques.

- Les infections hématogènes touchent la chondro-épiphyse, l'agent pathogène l'atteint en empruntant le réseau vasculaire.
- Les infections par contamination directe se produisent là où le traumatisme (voulu ou non) a inoculé les bactéries.

Les **infections ostéo-articulaires hématogènes** regroupent deux grands types de pathologies différentes :

- **les arthrites**, qui sont des infections de l'articulation,
- **les ostéomyélites**, qui sont des infections des métaphyses ou des épiphyses, au contact des cartilages de croissance.

Physiopathologie

des infections ostéo-articulaires

Le site de l'infection

La **chondro-épiphyse** est une structure anatomique pluri-tissulaire, située à chacune des deux extrémités d'un os long. Son rôle est essentiel car elle est porteuse du potentiel de croissance en longueur de l'os, son développement détermine également le volume et la forme de la surface articulaire (figure 1). La chondro-épiphyse est donc une structure composite constituée de deux cartilages de croissance (Damsin [1996]). Un cartilage de croissance discoïde pour la croissance axiale, et un cartilage de croissance sphéroïde pour la croissance en volume de l'épiphyse (Hamel [2003]) (figure 2).

Figure 1 : la chondro-épiphyse
de l'extrémité supérieure du fémur

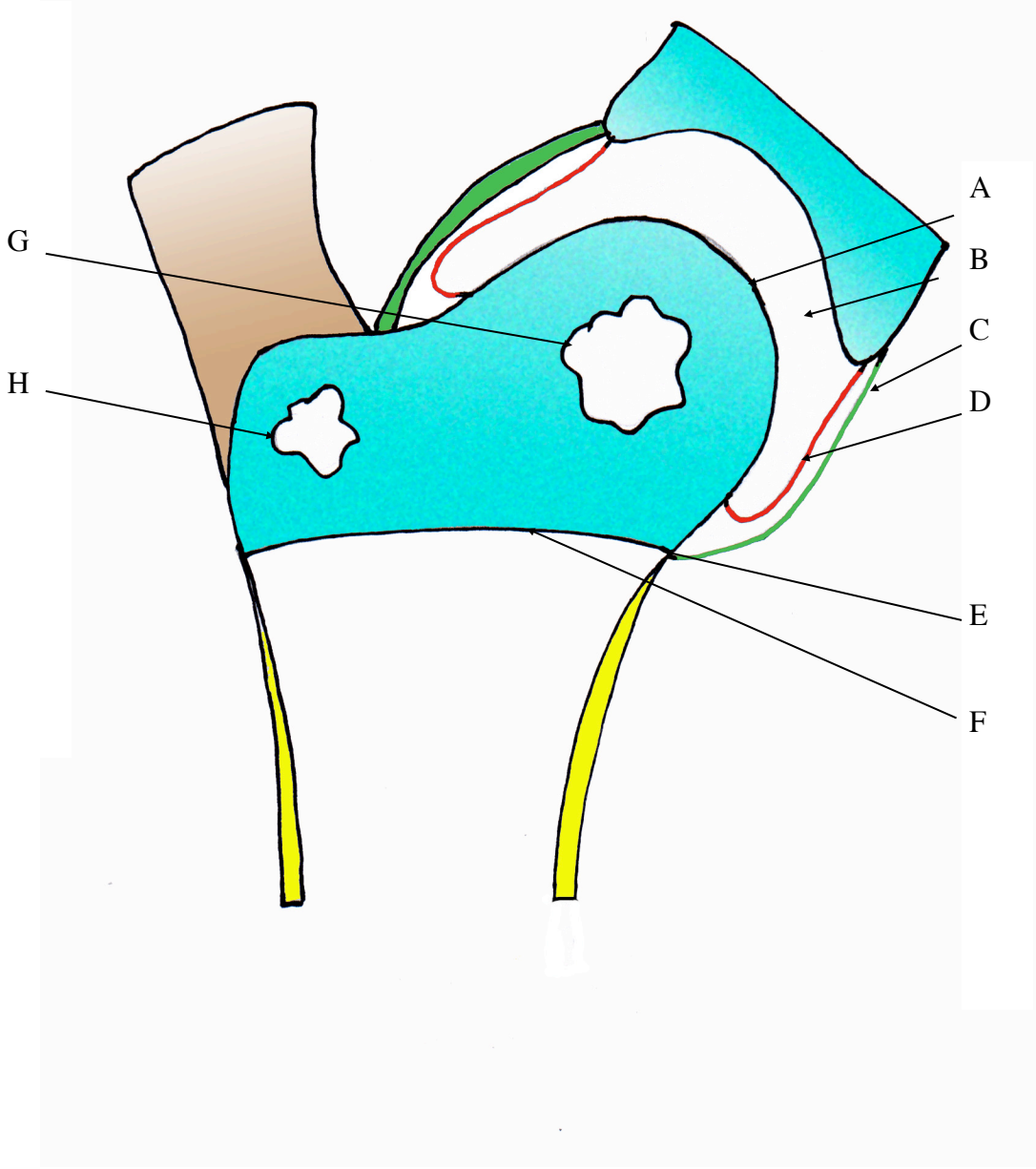


Figure 2 : Anatomie de la chondro-épiphyse

A : surface articulaire
B : cavité articulaire
C : capsule
D : membrane synoviale
E : virole périchondrale
F : cartilage de conjugaison
G : cartilage de croissance épiphysaire
H : cartilage de croissance apophysaire

Les infections ostéo-articulaires sont des infections localisées à la chondro-épiphyse, mais elles sont également septicémiques. Les deux risques majeurs sont donc :

- le risque vital, par choc septique,
- le risque local : • trouble de croissance, par destruction des cellules de croissance.
  • ankylose articulaire par destruction du cartilage hyalin

Les infections ostéo-articulaires peuvent également survenir au niveau du rachis, il s'agit alors des spondylodiscites. Les zones de croissance vertébrales ont une structure un peu différente des chondro-épiphyses, mais la physiopathologie de ces infections est similaire à celles des membres.

La bactérie

La pathogénicité d'une bactérie dépend de sa capacité à envahir l'hôte, puis à se reproduire et à produire des toxines (qui ont un effet général (fièvre, érythème), ou bien local (nécrose)). La capacité d'une bactérie pathogène à entraîner une infection est appeler la virulence. Plus une bactérie est virulente et plus le nombre de bactéries nécessaires pour que l'infection se développe est faible.

La nature des germes responsables d'infections ostéo-articulaires est variable en fonction de l'âge de l'enfant (Shaw [1990], Verdier [2005]).

L'infection ostéo-articulaire du nouveau-né est soit une infection nosocomiale (en particulier si l'enfant est hospitalisé dans un service de réanimation), soit elle entre dans le cadre d'une infection materno-fœtale. Les germes les plus fréquemment retrouvés sont :

- *Streptococcus agalactiæ* (Streptocoque du groupe B)

- *Staphylococcus aureus* (Staphylocoque doré sensible ou résistant à la méticilline)
- Entérobactéries (en particulier *Escherichia coli*)
- *Pseudomonas aeruginosa*

Entre 1 mois et deux ans, les germes les plus fréquemment retrouvés sont :

- *Streptococcus pneumoniæ* (Pneumocoque)
- *Staphylococcus aureus* (Staphylocoque doré sensible ou résistant à la méticilline)
- Streptococcus pyogenes (Streptocoques du groupe A)
- *Streptococcus agalactiæ* (Streptocoque du groupe B)
- *Kingella Kingæ*

La généralisation de la vaccination contre *Hæmophilus influenzæ* a fait quasiment disparaître les infections ostéo-articulaires dues à ce germe. Par contre on voit émerger depuis quelques années les souches de *Kingella kingae* (Verdier [2005])

Après deux ans, le staphylocoque doré était classiquement le germe le plus souvent à l'origine d'une arthrite ou d'une ostéomyélite. Cette première place est actuellement disputée par *Kingella kingæ* (Verdier [2005]).

La porte d'entrée

La porte d'entrée est le site où la bactérie pénètre dans l'hôte. Le mode de propagation de l'infection à l'articulation ou à la métaphyse peut se faire de différentes manières (Bracq [2003]):

- La **voie hématogène** : les bactéries se développent tout d'abord au niveau de la porte d'entrée (qui peut être cutanée, ORL, intestinale, urinaire, …), puis elles passent dans la circulation générale pour gagner le site de l'infection ostéo-articulaire.
- La **voie directe** : les bactéries pénètrent directement dans l'articulation ou dans la métaphyse, à l'occasion d'une plaie profonde, d'une intervention chirurgicale, ou d'une ponction.
- **L'infection par contiguïté** : l'infection se développe initialement dans les parties molles au contact de l'articulation ou de la métaphyse, puis

l'extension du processus infectieux les atteint. D'autre part, lorsque le cartilage de conjugaison est intra-articulaire (comme celui de l'extrémité supérieure du fémur, par exemple), une arthrite peut se propager par contiguïté à la métaphyse et vice-versa, on parle alors d'ostéo-arthrite (Chotel [2003]).

Anatomie-pathologique

L'arthrite septique

Le développement de bactéries dans l'espace articulaire est responsable d'une inflammation de la synoviale (épaississement et hypervascularisation). La membrane synoviale produit alors en grande quantité du liquide articulaire riche en éléments polynucléés et en macrophages. Le liquide articulaire est chargé de bactéries et de cellules de la lignée blanche (plus de 90% de polynucléaires). Les bactéries sont phagocytées par les polynucléaires, les macrophages et les synoviocytes. Les polynucléaires produisent les enzymes protéolytiques. Ces enzymes détruisent les bactéries en endommageant leur paroi, mais elles altèrent également la substance fondamentale du cartilage articulaire. Le système immunitaire est alors débordé par la multiplication des bactéries. En l'absence de traitement, l'évolution peut être fatale, car les bactéries repassent dans la circulation générale, et peuvent entraîner un choc septique. Mais l'infection peut aussi avoir une évolution locale. L'arthrite se propage alors aux structures adjacentes, et en particulier à l'épiphyse et à la métaphyse, transformant alors l'arthrite en ostéo-arthrite. L'évolution naturelle se fait ensuite vers la fistulisation à la peau, mais les séquelles sont lourdes : destruction du cartilage articulaire (responsable d'une ankylose), et des cartilages de croissance de l'épiphyse et de la métaphyse (responsable de déviation axiale et d'inégalité de longueur, d'une incongruence articulaire). Avant la découverte des antibiotiques, 50% des enfants atteints d'une infection ostéo-articulaire décédaient.

L'ostéomyélite aiguë

Les bactéries se développent dans les capillaires métaphysaires, au contact du cartilage de conjugaison. La présence des bactéries est à l'origine de la réponse inflammatoire : engorgement vasculaire, œdème, arrivée des polynucléaires, et nécrose de l'os spongieux secondaire à des thromboses vasculaires. En l'absence de traitement, la nécrose tissulaire laisse place à un abcès intra-osseux, dans lequel on trouve des séquestres osseux. Mais l'infection peut aussi se propager aux structures adjacentes : à l'articulation, à l'épiphyse, ou au périoste (abcès sous-périosté). Les séquelles sont alors lourdes, avec au premier plan, les déviations axiales et les inégalités de longueur. Comme pour l'arthrite aiguë, l'évolution peut être fatale.

Pourquoi les infections ostéo-articulaires surviennent-elles ?

La physiopathologie des infections ostéo-articulaires n'a jamais été établie avec certitude. Cependant des constatations cliniques, anatomiques, et expérimentales permettent de comprendre l'origine et le développement des infections ostéo-articulaires.

Constatations cliniques

La plupart des arthrites et des ostéomyélites sont des infections d'origine hématogène. Les bactériémies, c'est à dire les périodes transitoires pendant lesquelles des bactéries sont présentes dans la circulation générale, sont fréquentes, pluriquotidiennes (après brossage dentaire par exemple). Les périodes de bactériémie ne sont donc pas toutes responsables d'une infection.

Un traumatisme est souvent retrouvé dans les antécédents récents d'un enfant atteint d'une ostéomyélite. S'agit-il d'une association fortuite (les traumatismes sont extrêmement fréquents chez l'enfant) ou existe-t-il une relation entre les deux événements ? la contusion osseuse ferait ainsi le lit de

l'infection. De plus, les ostéomyélites sont plus fréquentes au membre inférieur qui est plus exposé aux traumatismes que le membre supérieur.

Les infections ostéo-articulaires sont beaucoup plus fréquentes chez l'enfant que chez l'adulte. Le régime vasculaire du site de l'infection ostéo-articulaire chez l'enfant est très différent de celui de l'adulte. Chez l'enfant, il s'agit d'une zone richement vascularisée puisque fertile.

Les sites préférentiels de l'infection ostéo-articulaire sont loin du coude et près du genou. Les cartilages de croissance de l'extrémité supérieure de l'humérus, et de l'extrémité inférieure du radius sont les plus actifs du membre thoracique, alors que les cartilages de croissance de l'extrémité inférieure du fémur et de l'extrémité supérieure du tibia sont les plus actifs du membre pelvien (Dimeglio [1983, 1991], Teot [1990], Pous [1990]).

Constatations anatomiques

Les infections ostéo-articulaires de l'enfant sont le plus souvent hématogènes. Il est donc important de connaître la vascularisation des chondro-épiphyses pour comprendre la physiopathologie de l'infection ostéo-articulaire. L'organisation de la vascularisation extra-osseuse est la même pour toutes les chondro-épiphyses (Cahuzac [1973]). En effet, à la base des chondro-épiphyses, il existe un cercle artériel anastomotique. Le cercle artériel est une "base de lancement" des artères épiphysaires, apophysaires, métaphysaires et des artères de la virole périchondrale (Hamel [1998]). Il existe, pour certaines épiphyses, une artère épiphysaire supplémentaire. Cette artère pénètre dans l'épiphyse, par son sommet ; c'est le cas pour l'épiphyse fémorale supérieure qui reçoit l'artère du ligament rond, et pour les épiphyses du genou qui reçoivent l'artère articulaire centrale. Pour les articulations profonde, à la racine des membres (épaule et hanche), il existe un deuxième cercle anastomotique à distance, dans l'épaisseur des masses musculaires, qui permet d'assurer une suppléance souvant efficace en cas d'obstacle sur le tronc artériel principal (figure 3).

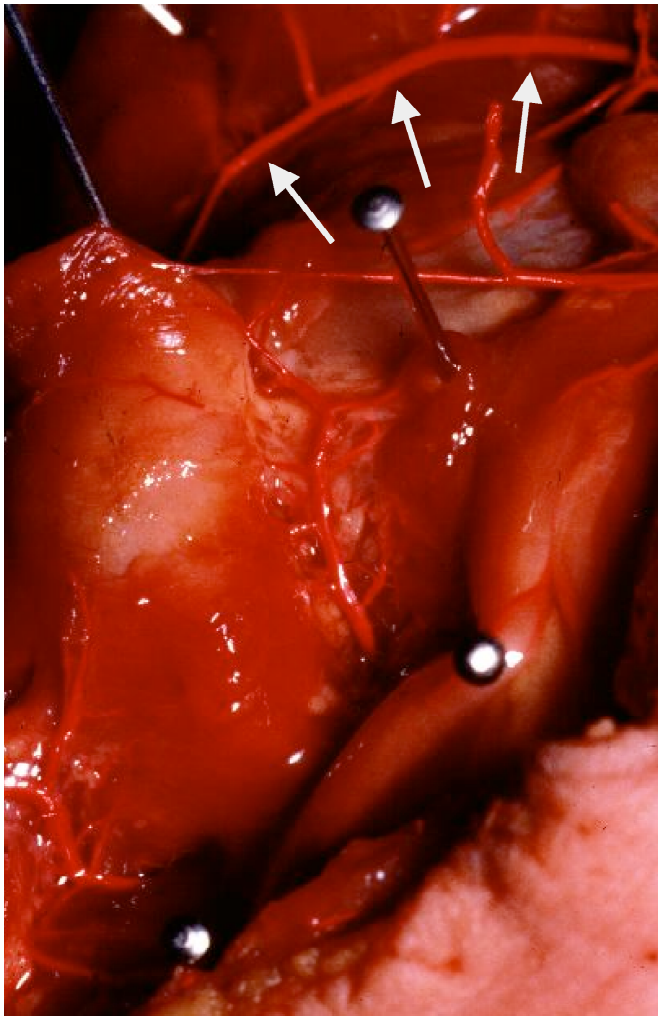


Figure 3 : vue postérieur de l'extrémité supérieure du fémur gauche. L'artère circonflexe médiale de la cuisse chemine à la face postérieure du col fémoral et abandonne des branches pour la grand trochanter et pour l'épiphyse fémorale. Les flêches marquent l'anastomose entre l'artère glutéale supérieure et l'artère glutéale inférieure

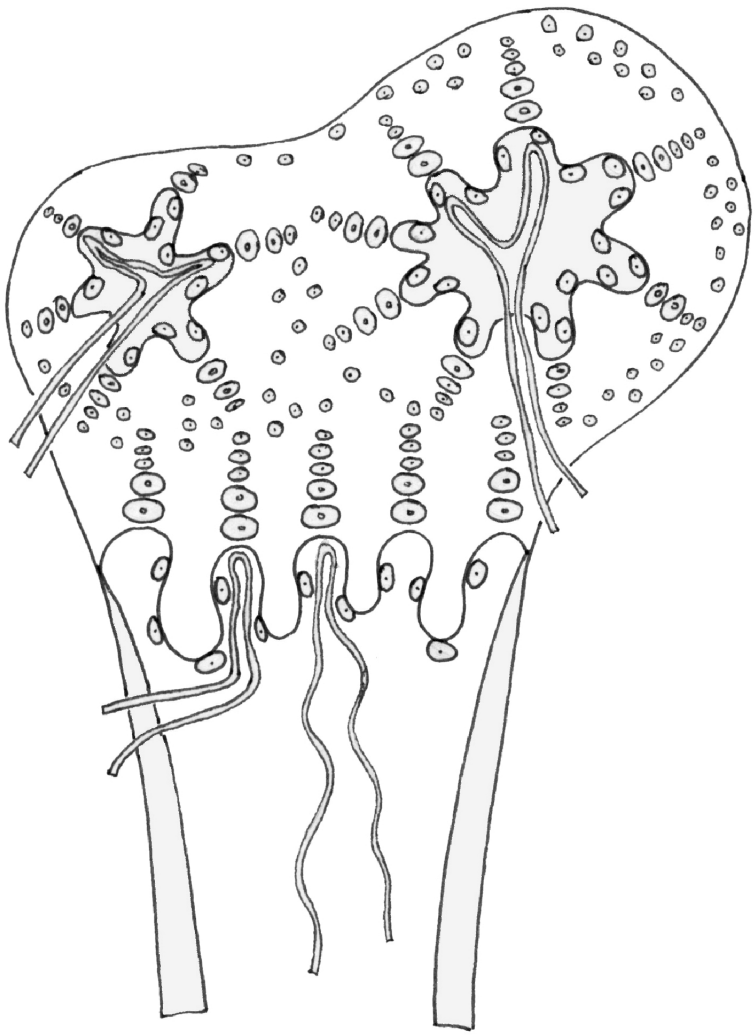


Figure 4 : vascularisation de la chondro-épiphyse
les vaisseaux forment, au contact des différents fronts d'ossification,
des boucles vasculaires où le flux sanguin est ralenti

Les artères qui vascularisent le versant métaphysaire du cartilage de conjugaison sont issues des branches des artères métaphysaires et des branches de l'artère nourricière (Fischer [1978]). Les trois quarts centraux de la surface du cartilage de conjugaison sont sous la dépendance des branches de l'artère nourricière, alors que le quart périphérique est vascularisé par les branches d'origine métaphysaire. Les artères se dirigent vers le cartilage de conjugaison et se divisent au niveau de la zone d'ossification, les dernières branches de division sont alors parallèles entre elles et se réfléchissent au

niveau du front d'ossification (figure 4).

Les artères qui vascularisent le versant épiphysaire du cartilage de conjugaison ont l'aspect des poils d'une brosse. Les cellules germinales des épiphyses ne sont pas vascularisées par les artères du noyau secondaire d'ossification. La nutrition des cellules de la zone de croissance est assurée par les vaisseaux des canaux cartilagineux périphériques (Trueta [1957, 1960]) (figure 4).

Les vaisseaux épiphysaires et métaphysaires, proviennent donc de deux réseaux intra-osseux distincts. Durant la vie fœtale et pendant les premiers mois qui suivent la naissance, il existe quelques anastomoses entre ces deux réseaux, au travers du cartilage de conjugaison (Chotel [2003]). Ces anastomoses peuvent expliquer la fréquence plus importante des atteintes simultanées de la métaphyse et de l'épiphyse chez le jeune enfant. La zone d'ostéomyélite traverse alors le cartilage de conjugaison et réalise le clou ostéomylélitique, qui après cicatrisation aboutira à un pont d'épiphysiodèse (figure 5).

Figure 5: diaphanisation du genou droit d'un nouveau-né, coupe sagittale. Anastomoses entre le réseau métaphysaire et le réseau épiphysaire de l'extrémité inférieure du fémur.

A la fin de la croissance, la fermeture du cartilage de croissance va correspondre à une invasion vasculaire de la totalité de l'épaisseur du cartilage. Ainsi, l'os épiphysaire ou apophysaire et l'os métaphysaire se rejoignent ; par contre les anastomoses entre les vaisseaux épiphysaires, apophysaires et métaphysaires sont rares. Les territoires vasculaires au sein des épiphyses, des apophyses et des métaphyses restent donc identiques après la fermeture des cartilages de croissance (figure 6).

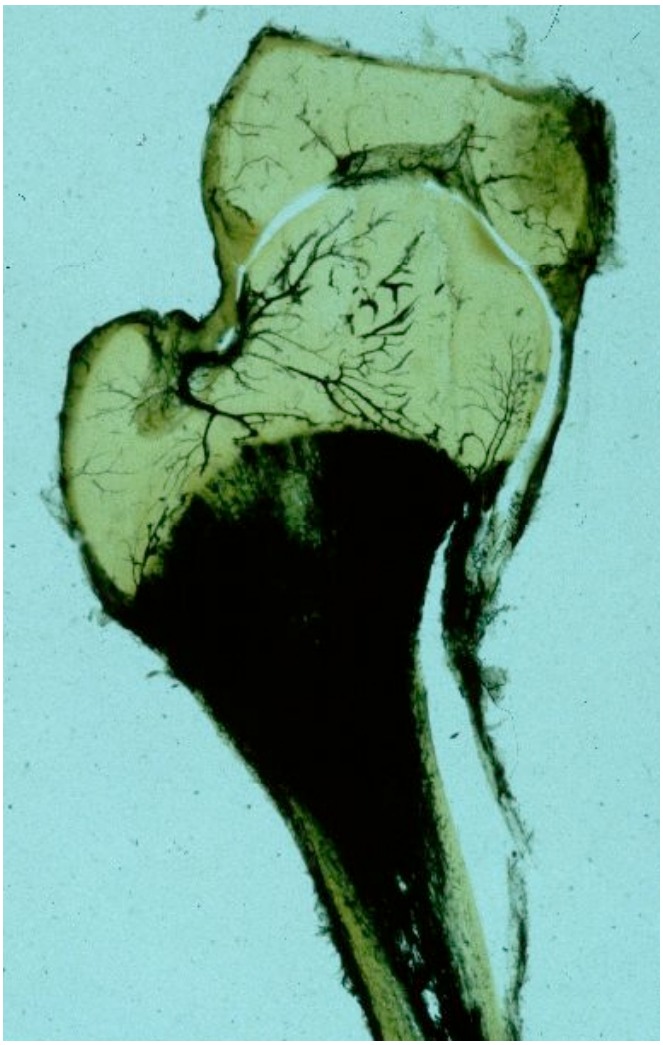


Figure 6 : diaphanisation de l'extrémité supérieure du fémur droit d'un fœtus à 32 semaines d'aménorrhée. Les territoires vasculaires sont identiques en fin de croissance (l'artère circonflexe médiale de la cuisse est la principale artère de l'épiphyse fémorale supérieure)

Le drainage veineux épiphyso-métaphysaire se fait par l'intermédiaire de lacs veineux dont l'organisation est parallèle au système artériel. Les artères

métaphysaires se jettent dans de larges sinusoïdes qui eux mêmes se drainent dans les veines métaphysaires (Crock [1962]). Dans ces sinusoïdes, le flux vasculaire est ralenti, et les parois vasculaires sont poreuses. De plus, l'activité macrophagique est peu intense dans les sinusoïdes métaphysaires. L'association de ces particularités anatomiques et biologiques crée des conditions qui vont favoriser l'implantation et de développement d'une colonie de bactéries.

Constatations expérimentales

Les modèles expérimentaux d'arthrite septique

Il y a deux types de modèles expérimentaux d'arthrites septiques : les modèles "hématogènes" et les modèles par "inoculation directe". Les modèles "hématogènes" ont l'avantage de se rapprocher le mieux de la réalité clinique, mais ce sont des modèles peu reproductibles, l'arthrite ne survenant au mieux que dans 10 à 30% des cas, malgré un inoculum fort. Ceci confirme expérimentalement que les bactériémies ne sont pas toujours à l'origine d'une infection. Les bactéries doivent être éliminées par le système immunitaire au cours de leur passage dans la circulation générale. Les modèles par "inoculation directe" sont beaucoup plus fiables, mais nécessitent l'injection d'une grande quantité de bactéries (au moins 10^8 UFC/mL). Si la taille de l'inoculum est plus faible, les bactéries vont être éliminées rapidement par la membrane synoviale, il s'agit de la clairance articulaire (Curtiss [1965]). Ainsi, si l'inoculum n'est pas trop fort et si la réponse immunitaire locale est normale, il ne se développera pas d'arthrite (Jonhson [1970]).

Les modèles expérimentaux d'ostéomyélite aiguë

De même que pour les modèles d'arthrite septique, il existe des modèles "hématogènes" et des modèles par "inoculation directe". Les modèles

“hématogènes” ont eux aussi l’inconvénient d’être peut reproductible car l’obtention d’une ostéomyélite est aléatoire (Mader [1999], O’Reily [1999]).

Pour obtenir un meilleur rendement pour ces modèles, il est possible de réaliser un traumatisme métaphysaire, quelques heures avant l’injection périphérique de l’inoculum. Le traumatisme métaphysaire est obtenu par injection d’une solution nécrosante dans la métaphyse (le plus souvent du phénol) (Mader [1999]).

Conclusion

Les infections ostéo-articulaires de l’enfant surviennent dans des zones de croissance, richement vascularisées, où le flux vasculaire est ralenti. Ces infections surviennent parfois après un traumatisme, qui peut être à l’origine des modifications locales de la réponse immunitaire, qui favorisent l’implantation et le développement d’une colonie bactérienne. La bactérie responsable de l’infection atteint généralement l’articulation ou la métaphyse après un passage dans la circulation générale, mais toutes les bactériémies ne sont pas à l’origine d’une infection ostéo-articulaire. Par contre, la bactériémie, si elle est importante (inoculum fort des modèles expérimentaux), ou bien s’il existe des modifications locales ou générales de l’immunité, peut être à l’origine d’une infection. Si le déséquilibre entre la défense immunitaire de l’hôte et la virulence de la bactérie persiste, ou en l’absence de traitement, l’infection ostéo-articulaire se développera. Les bactéries repasseront dans la circulation générale, c’est la septicémie. Localement, l’infection se propage à l’articulation, à la métaphyse, au cartilage de conjugaison, au parties molles péri-articulaires. Les conséquences fonctionnelles sont fonction de l’atteinte des différentes structures de la chondro-épiphyse. Le cartilage articulaire est détruit, et ces capacités de cicatrisation sont réduites en raison de son absence de vascularisation. L’atteinte des cartilages de croissance (cartilage de conjugaison ou cartilage de croissance épiphysaire) est synonyme d’épiphysiodèse par destruction des cellules de croissance. L’épiphysiodèse entraîne alors soit un arrêt de croissance, soit une déviation axiale.

Les modèles expérimentaux existants

Modèles d'arthrite septique

La majorité des modèles animaux d'arthrite bactérienne a été décrite chez le lapin, plus rarement sur le chien, le porc, la souris, le rat, le hamster. Le plus souvent, l'inoculation bactérienne est réalisée directement par injection intra-articulaire (Bremell [1999]). Comme énoncé précédemment, dans la plupart des modèles, l'arthrite septique est induite par une injection directe intra-articulaire d'une suspension bactérienne. Les utilisations de la voie sous-cutanée, intra-nasale, intra-vasculaire, ont été également décrites, mais leur utilisation reste marginale en raison du caractère aléatoire de la survenue de l'infection (Bremell [1999], Smith [1987]).Par contre, peu de modèles utilisent la voie hématogène qui pourtant simule le mieux la physiopathologie des arthrites rencontrées en pathologie humaine, et en particulier pédiatrique.

Le modèle d'infection articulaire chez le lapin permet de tester des régimes thérapeutiques associés à des gestes chirurgicaux. Ce qui n'est possible chez la souris ou le rat qu'en utilisant des techniques micro-chirurgicales.

La plupart des auteurs ont préféré utiliser de forts inocula, de 10^8 à 10^9 UFC, afin de réaliser une arthrite septique aiguë dans la totalité des cas. Jonhson [1970] a testé plusieurs inocula de *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus albus.* Il conclut que les inocula supérieurs à 3 x 10^4 provoquent des arthrites chez 100% des lapins. Il a aussi étudié la clairance bactérienne des genoux de lapins New-Zealand. Trente minutes après l'injection de 6 x 10^6 *Staphylococcus aureus*, il ne reste plus dans l'articulation que 10% des bactéries (elles sont phagocytées par les polynucléaires neutrophiles et par les synoviocytes(Curtiss [1965])). Il est donc important d'utiliser un inoculum élevé pour que le modèle soit reproductible.

Staphylococcus *aureus* est sans soute l'espèce bactérienne la plus étudiée en raison de sa forte prédominance chez l'adulte, et chez l'enfant. Mais *Escherichia coli, Neisseria gonorrheæ, Streptococcus pyogenes, Streptococcus*

peumoniæ, ont également été utilisés pour réaliser des arthrites expérimentales.

Le modèle utilisé par Salter [1981], est un modèle d'arthrite septique chez le lapin, par inoculation directe dans le genou. Ce modèle possède de nombreux avantages : simplicité de réalisation, excellent rendement, coût, possibilité d'utiliser des procédures chirurgicales simples (arthrotomie, lavage, …).

Au jour **J0** : sous anesthésie générale (par de la kétamine IM, 15 mg/kg), le genou droit est rasé. Après désinfection cutanée par de la polyvidone iodée, 1 ml d'une suspension bactérienne de *Staphylococcus aureus* à 10^8 UFC/mL est injecté dans la cavité articulaire du genou par voie para-patellaire externe.

24 heures plus tard, **J1** : Une arthrotomie para-patellaire externe est réalisée sous anesthésie générale. Le liquide intra-articulaire est prélevé. La cavité articulaire est lavée par 250 ml de sérum physiologique. L'articulation est fermée par un point de fil nylon dec 1.5 , ainsi que la peau par un surjet.

Modèles d'ostéomyélite

Plusieurs modèles d'ostéomyélite ont été décrits. Les espèces les plus souvent utilisées sont le lapin, la souris et le rat. Certains modèles utilisent la voie hématogène pour induire l'ostéomyélite alors que pour les autres l'infection est obtenue par l'injection directe de bactéries dans l'os (Yin [2005]).

Chez le lapin, deux modèles différents sont couramment utilisés pour l'étude de l'ostéomyélite. Andriole [1974] a décrit un modèle qui est utile pour l'évaluation des traitements associés à une fixation interne. Dans ce modèle, *Staphylococcus aureus* est injecté dans la métaphyse tibiale proximale, par un trou de mèche. L'infection osseuse est obtenue grâce à l'association du germe et du traumatisme local. Le traumatisme local peut également être obtenu en réalisant une fracture du tiers moyen du tibia. La fracture peut être stabilisée ou non par un clou centro-médullaire.

Le second modèle a été développé par Norden [1970]. Ce modèle permet d'obtenir une infection focale qui mime une ostéomyélite aiguë rencontrée en clinique humaine.

Les lapins sont anesthésiés par une injection intra-musculaire de kétamine (45 mg/kg) et de xylazine (5 mg/kg). Une aiguille 18G est introduite latéralement dans la métaphyse tibiale supérieure. 0,15 mL de morrhuate de sodium est injecté dans la cavité médullaire, ainsi que 0,1 mL d'une suspension de *Staphylococcus aureus* (10^7 UFC/mL) et enfin 0,2 mL de sérum physiologique. La quantité de *Staphylococcus aureus* injectés a été déterminée afin d'obtenir un taux élevé d'ostéomyélite à la deuxième semaine sans augmenter en la mortalité. Les animaux sont ensuite remis en cage pour une durée de 2 semaines. La gravité de l'ostéomyélite est déterminée radiographiquement, à partir de la deuxième semaine après l'inoculation.

Ces modèles animaux d'arthrite et d'ostéomyélite ont l'avantage d'être stables et d'avoir été éprouvés par de nombreuses équipes. Nous avons d'ailleurs utilisé le modèle d'arthrite pour évaluer une nouvelle molécule et pour

clarifier le rôle de l'immobilisation. Mais ces modèles existants ne permettent pas de répondre à toutes nos interrogations. Nous avons en effet souhaité mettre au point de nouveaux modèles permettant d'analyser une procédure chirurgicale (changement de matériel, fixation externe) ou un nouveau mode d'administration. Nous avons également souhaité développer un modèle d'ostéo-arthrite sevère à Staphylococcus aureus résistant à la méticilline dont le traitement par la vancomycine serait difficile (comme en pratique clinique) afin d'évaluer dans l'avenir les rares nouvelles molécules anti-staphylococciques à disposition.

Mise au point de nouveaux modèles d'infections ostéo-articulaires

Modèle d'ostéomyélite

introduction

L'obtention d'une ostéomyélite aiguë hématogène est très aléatoire (Mader [1999]), et ne constitue pas un modèle satisfaisant, en raison de sa faible reproductibilité et de son coût. Nous avons donc développé plusieurs modèles d'ostéomyélite, avec et sans matériel de l'extrémité supérieure du tibia chez le lapin New-Zealand. Ces modèles ont été mis au point dans le but d'évaluer l'efficacité d'un traitement local par implantation de microparticules chargées en vancomycine.

Matériel et Méthodes

Les différents modèles d'ostéomyélites aigues ont été réalisés chez des lapins femelles de la race New-Zealand dont le poids était compris entre 2 et 2,5 kg.

Nous avons utilisé une souche de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM).

Ostéomyélite aigue sans matériel.

Le premier jour, sous anesthésie générale (kétamine intra-veineuse, 15 mg/kg), la face interne de l'extrémité supérieure du tibia droit était abordée par une incision verticale. Le périoste était ruginé, et une corticotomie était réalisée à l'aide d'un trocard de biopsie ostéomédullaire. La métaphyse était comblée par une éponge hémostatique (Pangen®) imprégnée par un bouillon contenant 5. 10^8 UFC/mL de SARM. La corticotomie était ensuite fermée par de la cire chirurgicale et la peau et le périoste refermés par un surjet non résorbable. Cinq lapins ont été inclus.

Aux quatrième et quinzième jours, les lapins ont été sacrifiés, par une injection intra-veineuse de thiopental, et des échantillons sont prélevés. Le tissu osseux a été pesé, puis broyé avec 500μL de sérum physiologique. Des dilutions à 10^{-2}, 10^{-4} et 10^{-6} ont ensuite été ensemencés sur géloses Triptycase Soja (TS) et Chapman (milieu d'isolement spécifique du *Staphylococcus aureus*) afin de calculer un dénombrement des bactéries survivantes (exprimé en UFC/g de tissu) au quatrième et au quinzième jour, respectivement B1, et B2. La différence du nombre de bactéries survivantes entre le quatrième et le quinzième jour (B2-B1) était exprimée en $\Delta\log_{10}$.

Ostéomyélite aigue avec matériel.

Expérimentation *in vitro*

Afin d'obtenir un modèle d'ostéomyélite plus difficile à traiter, nous avons développé un modèle d'infection osseuse sur matériel. Divers protocoles ont été réalisés en fonction de différentes modalités d'obtention de l'infection (tableau 1). Des broches de Kirshner 15/10 en acier inoxydable stériles ont été implantés chez les animaux et les bactéries ont été inoculées soit au site opératoire selon le protocole (P1), soit par voie hématogène (P2). Pour les autres protocoles P3 à P5, les broches étaient recouvertes de bactéries selon diverses modalités (tableau 1).

Mais avant d'implanter les broches recouvertes de bactéries, des études *in vitro* ont été effectuées pour dénombrer les bactéries et la reproductibilité de la contamination des broches.

Protocole (P)	Matériel de fixation interne	Mode d'inoculation

1	broche de Kirshner 15/10 en acier inoxidable	infection concomitante du site opératoire par une suspension bactérienne.
2	broche de Kirshner 15/10 en acier inoxidable	infection par voie hématogène par une suspension de SARM injectée dans la veine marginale de l'oreille.
3	broche de Kirshner 15/10 en acier inoxidable	broche préalablement infusée dans une gélose de Mueller-Hinton (MH) contenant la souche de SARM.
4	broche de Kirshner 15/10 en acier inoxidable	broche ayant préalablement séjourné dans un bouillon cœur cervelle (BCC) contenant la souche de SARM
5	broche de Kirshner 15/10 en acier inoxidable	broche associée à un cathéter de polyéthylène ayant préalablement séjourné dans un bouillon cœur cervelle (BCC) contenant la souche de SARM.

Tableau 1 : différents modes de contaminationdes broches

Une série de six broches a été apposée sur une gélose Chapman, pour réaliser une empreinte puis immédiatement incubée 24 heures dans un bouillon cœur cervelle (BCC) afin de vérifier la présence de bactéries au contact du matériel.

Pour chaque modalité opératoire, la colonisation des broches par la souche SARM a été contrôlée :

Pour les six broches non traitées avant implantation, il n'y avait aucune croissance bactérienne sur la gélose, et aucun trouble dans le bouillon BCC.

Pour les six broches ayant séjourné 24 heures dans un bouillon BCC contenant la souche de SARM, il y avait autour de trois empreintes dans la gélose une forte croissance bactérienne. Elle était faible pour 2 empreintes et absente pour une autre. Par contre, tous les bouillons étaient troubles après 24 heures d'incubation à 37°C.

Enfin pour les six broches recouvertes de gélose contenant le SARM et pour les six broches gainées de polyéthylène préalablement incubé dans du BCC contenant le SARM, toutes les empreintes étaient entourées de nombreuses colonies de SARM, et tous les bouillons BCC étaient troubles après 24 heures d'incubation à 37°C.

Expérimentation *in vivo*

La procédure d'implantation du matériel a été dans chaque cas la même. Dans chaque protocole, cinq lapins ont été inclus.

Au premier jour, les lapins New-Zealand femelles étaient anesthésiés par une injection intra-musculaire de kétamine à la dose de 15 mg/kg. Après rasage et désinfection cutanée, l'extrémité supérieure du tibia était abordée par une voie para-patellaire médiale et une corticotomie de la surface intercondylaire antérieure du tibia était réalisée afin de permettre le passage d'une broche de trois centimètres de longueur et de 1,5 millimètres de diamètre, dans la cavité centro-médullaire. La fermeture cutanée était ensuite assurée par un point simple non résorbable.

Au quinzième jour, les lapins ont été sacrifiés par une injection intraveineuse de thiopental, le tibia droit a été prélevé, radiographié afin de contrôler la position du matériel, et des prélèvements sont effectués dans la métaphyse supérieure. Ces échantillons d'os spongieux sont broyés mélangés à 500 μL de sérum physiologique, et étalés à des dilutions de 10^{-2}, 10^{-4} et 10^{-6} sur des géloses de Chapman. Le dénombrement des bactéries survivantes a permis de calculer le nombre d'unités formant colonies par gramme de tissu osseux (UFC/mg).

Résultats *in vivo* et discussion

Ostéomyélite aigue sans matériel.

Les résultats sont exposés dans le tableau 2

B1 (log_{10} UFC/g)	B2 (log_{10} UFC/g)	Δlog (log_{10} UFC/g)
Moyenne ± déviation standard	Moyenne ± déviation standard	Moyenne ± déviation standard
6,2 ± 0,5 (5 lapins)	5,6 ± 0,4 (5 lapins)	-0,6 ± 0,3 (5 lapins)

Tableau 2 : dénombrement bactérien in vivo à J4, et J15

Le modèle d'ostéomyélite aigue sans matériel, utilisant une compresse hémostatique imprégnée de la souche de SARM et implantée dans la métaphyse, semble reproductible. Il permet d'obtenir de fortes concentrations bactériennes au quatrième jour. De plus, le modèle est stable dans le temps et aucun des lapins témoins n'a guéri spontanément, au quinzième jour.

Ostéomyélite aigue avec matériel.

Les résultats du dénombrement bactérien exprimé en log10 par mg d'os à J15 sont colligés dans le tableau 3

Matériel de fixation interne	Mode d'inoculation	Dénombrement bactérien à J15 (log10 UFC/g) Moyenne ± déviation standard
broche de Kirshner 15/10 en acier inoxidable	infection concomitante du site opératoire par une suspension bactérienne.	4,71 ± 1,1 log_{10} UFC/g d'os.
broche de Kirshner 15/10 en acier inoxidable	infection par voie hématogène par une suspension de SARM injectée dans la veine marginale de l'oreille.	Les prélèvements d'os métaphysaire tibial étaient tous stériles
broche de Kirshner 15/10 en acier inoxidable	broche préalablement infusée dans une gélose de Mueller-Hinton (MH) contenant la souche de SARM.	4,5 ± 0,8 log_{10} UFC/g d'os.
broche de Kirshner 15/10 en acier inoxidable	broche ayant préalablement séjourné dans un bouillon cœur cervelle (BCC) contenant la souche de SARM	3,8 ± 0,4 log_{10} UFC/g d'os.
broche de Kirshner 15/10 en acier inoxidable	broche associée à un cathéter de polyéthylène ayant préalablement séjourné dans un bouillon cœur cervelle (BCC) contenant la souche de SARM.	5,6 ± 0,7 log_{10} UFC/g d'os.

Tableau 3 : dénombrement bactérien à J15 en fonction des différents modes de contamination

L'obtention d'une ostéomyélite par voie hématogène est aléatoire dans les modèles précédemment décrits dans la littérature. Elle n'a jamais été possible dans l'expérimentation qui associe la broche intramédullaire et l'injection intraveineuse périphérique de la souche de SARM. L'utilisation de broches associées à une inoculation locale et concomitante de la souche de SARM (soit infection métaphysaire d'une suspension de SARM, soit traitement de la broche par infusion dans le BCC ou la gélose contenant la souche) permet d'obtenir une infection avec des concentrations bactériennes relativement faibles (de l'ordre de 4 log_{10} UFC/g). Par contre l'utilisation du polyéthylène permet d'obtenir des concentrations bactériennes stables dans le temps et supérieures à 5 log_{10} UFC/g. Ces constatations *in vivo* peuvent être expliquées par les manipulations *in vitro*, des broches avant implantations. En

effet, l'adhésion bactérienne qui est la première étape de l'infection sur matériel est facilitée par la présence du polyéthylène qui permet d'augmenter la surface d'adhésion, et augmente ainsi la charge bactérienne (Besnier [1990], Gracia [1998], Gristina [1985], Jansen [1993], Monzon [2002]).

Modèle d'ostéite post-traumatique

Introduction

La prise en charge des infections osseuses post-traumatiques reste controversée. En effet, l'attitude à adopter vis à vis du matériel reste discutée : faut-il conserver une ostéosynthèse interne ou la remplacer par un moyen de fixation externe ? Afin de répondre à cette question, il a été nécessaire avant tout d'avoir à notre disposition un modèle fiable, reproductible et superposable aux situations cliniques rencontrées chez l'homme.

Matériels et Méthodes

Modèle experimental d'ostéite post-traumatique

Au jour **J0** : Sous anesthésie générale par kétamine (intra-musculaire, 15 mg/kg), une ostéotomie diaphysaire bifocale du tibia droit a été réalisée sur des lapins femelles de la race New-Zealand, dont le poids variait de 2 à 2,5 kg. Le fragment diaphysaire intermédiaire a été ensuite infusé dans une gélose contenant 10^8 UFC/mL de la souche de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline. Le fragment a ensuite été replacé dans la jambe. La double ostéotomie était ensuite stabilisée par un enclouage centro-médullaire par une broche de Kirshner 15/10. Le clou était introduit dans l'axe de la diaphyse, en traversant l'épiphyse tibiale supérieure.

Quatre jours plus tard, **J4** : Sous anesthésie générale par kétamine (intra-musculaire, 15 mg/kg), tous les lapins bénéficiaient d'un débridement chirurgical du foyer d'ostéite. Des prélèvements étaient effectués, ils étaient ensuite pesés et dilués dans 200 μL de sérum physiologique. Des dilutions à 10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6} , étaient ensemencées sur gélose TS et Chapman, en utilisant un ensemenceur spiral (Spiral System, Interscience, Saint-Nom-La-Bretèche,

France), ce qui permettait un dénombrement des bactéries survivantes (B1 exprimé en UFC/g de pus), avant traitement. Les animaux étaient ensuite répartis en deux groupes par randomisation.

Pour le groupe 1 (5 lapins), le clou était changé après le débridement et le lavage chirurgical, et la peau était refermée.

Pour le groupe 2 (5 lapins), le clou centro-médullaire était retiré après le débridement et le lavage chirurgical. L'ostéosynthèse était assurée par un fixateur externe en cadre (réalisée par 4 broches placées de part et d'autre du fragment diaphysaire, et par deux tubes plastiques solidarisés aux broches par de la résine polymérisable) (figure 7).

Au huitème jour, **J8** : Les animaux étaient euthanasiés par un injection intra-veineuse de thiopental. De nouveaux prélèvements étaient realisés, ils étaient ensuite pesés et dilués dans 200 μL de serum physiologique. Des dilutions à 10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6} , étaient ensemencées sur gélose TS et Chapman, en utilisant un ensemmenceur spiral (Spiral System; Interscience, Saint-Nom-La-Bretèche, France), ce qui permettait un dénombrement des bactéries survivantes (B2 exprimé en UFC/g de pus), à la fin du traitement. Un Δlog CFU/g = B2-B1, exprimant la diminution du nombre de bactéries entre le début et la fin de l'expérimentation, était calculé

Figure 7 : Vue de face du fixateur externe "maison".

Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée grâce au logiciel Staview (Abacus Concepts, Berkeley, Ca). Une analyse de variance a été utilisée pour comparer les différents groupes, suivie par un test PLSD de Fischer pour les comparaisons multiples. Les résultats ont été exprimés en moyenne ± déviation standard. Une valeur de $p \leq 0,05$ était considérée comme significative.

Résultats

Les résultats sont exposés dans le tableau 4. L'inoculum de départ permet d'obtenir au quatrième jour des concentrations bactériennes élevées et équivalentes pour tous les lapins (6,7 ± 0,5 $\log_{10}$ UFC/g). Au huitième jour, les consttations sont les mêmes et la différence entre B1 et B2 est en moyenne de -0,2 ±0,2 $\log_{10}$ UFC/g. Il n'y a pas de différence entre les deux groupes et aucun lapin n'a guéri spontanément.

Groupe (nb. de lapins)	B1 ($\log_{10}$ UFC/g) Moyenne ± déviation standard	B2 ($\log_{10}$ UFC/g) Moyenne ± déviation standard	Δlog ($\log_{10}$ UFC/g) Moyenne ± déviation standard
G1 (5)	6,8 ± 0,4	6,6 ± 0,4	-0,1 ± 0,1
G2 (5)	6,6 ± 0,6	6,4 ± 0,4	-0,2 ± 0,3
G1 + G2 (10)	6,7 ± 0,5	6,5 ± 0,4	-0,2 ± 0,2

Tableau 4 : dénombrement bactérien au quatrième et au huitième jour

Discussion

Sur le plan infectieux, le modèle permet d'obtenir des concentrations bactériennes élevées dans l'os avant le traitement avec une déviation standard faible. Il s'agit donc d'un modèle d'infection osseuse sévère parfaitement reproductible. Ce modèle est par ailleurs stable dans le temps car tous les lapins ont conservé jusqu'au huitième jour des concentrations bactériennes dans l'os élevées sans que soit observée de guérison spontanée, sans influence du mode opératoire (changement de clou ou remplacement de l'ostéosynthèse interne par un fixateur externe).

Sur le plan chirurgical, le modèle est compatible avec les séquences thérapeutiques qui sont le plus souvent proposé en clinique humaine (débridement – changement de matériel – couverture cutanée)

Dans ce modèle, l'opportunité pour chaque lapin d'être son propre témoin a l'avantage d'améliorer la puissance statistique de l'expérimentation, et dispense d'utiliser un groupe témoin.

Modèle d'ostéo-arthrite

Introduction

Le modèle d'endocardite du lapin est largement utilisé pour évaluer de nouvelles molécules antibactériennes ou de nouvelles associations. Ce modèle est parfaitement maîtrisé et largement utilisé dans le laboratoire. Il a l'avantage de reproduire une infection sévère, difficile à traiter. C'est un modèle reproductible, universellement utilisé. Il nécessite l'utilisation lors de chaque manipulation, d'une série de témoins sacrifiés au début et à la fin de la période de traitement afin de déterminer l'efficacité de la molécule ou de l'association. Le lapin n'est donc pas son propre témoin. Nous avons développé un nouveau modèle d'ostéo-arthrite qui permette de s'affranchir de ces défauts, tout en conservant le caractère de sévérité et de difficulté de traitement.

Matériel et méthodes

Les animaux utilisés pour la mise au point de ce modèle sont des lapins femelles de la race New-Zealand dont le poids variait de 2 à 2,5 kg.

Le premier jour, la peau du genou droit a été rasée et désinfectée par de la polividone iodée. Sous anesthésie générale (kétamine IV, 15 mg/kg et propofol IV 4 mg/kg), le fémur est trépané par voie percutanée transarticulaire, à l'aide d'un trocart à biopsie ostéomédullaire de Jamshidi (8 Ga). Le trocart est introduit entre les condyles, par la gorge trochléenne, dans l'axe de la diaphyse. Il traverse l'épiphyse, le cartilage de conjugaison, la métaphyse pour atteindre le canal médullaire. L'obtention d'une carotte osseuse centrée par le cartilage de conjugaison confirme la bonne position du tunnel. La peau et l'articulation sont ensuite fermées en un plan par un point en X de fil non résorbable, ce qui assure l'étanchéité articulaire. Un millilitre d'une solution bactérienne contenant

10^8 UFC/mL de SARM est injecté dans le genou par une voie parapatellaire médiale.

Une première manipulation a été réalisée afin de vérifier la validité du modèle et l'absence de guérison spontanée : les animaux n'ont reçu aucun traitement complémentaire (la moitié des animaux a été sacrifiée au troisième jour, l'autre moitié au huitième jour)

Une deuxième manipulation a été réalisée afin de déterminer l'influence du lavage du foyer d'ostéo-arthrite et l'influence du traitement par la vancomycine. Le troisième jour de l'expérimentation, après inoculation de la souche de SARM, les animaux sont répartis par tirage au sort dans l'un des groupes suivants :

- Un groupe d'animaux a été traité par la vancomycine, administrée en perfusion continue, à la posologie de 100 mg/kg de façon à obtenir une concentration sérique au steady state de 20 mg/mL. Dans ce groupe, il n'y a pas eu de débridement et donc pas de dénombrement bactérien au troisième jour.
- Un groupe d'animaux a bénéficié, sous anesthésie générale, d'un lavage articulaire et d'un débridement du foyer d'ostéite, par une large voie d'abord parapatellaire médiale.
- Un groupe d'animaux a bénéficié, sous anesthésie générale, d'un lavage articulaire et d'un débridement du foyer d'ostéite, par une large voie d'abord parapatellaire médiale et d'un traitement par la vancomycine, administrée en perfusion continue, à la posologie de 100 mg/kg de façon à obtenir une concentration sérique au steady state de 20 mg/mL

Des prélèvements de liquide articulaire, d'os épiphysaire et de moelle osseuse ont été réalisés chez les animaux opérés au troisième jour. Ces échantillons ont été broyés et mélangés à 500 μL de sérum physiologique, puis étalés sur des géloses de Chapman à des dilutions de 10^{-2}, 10^{-4} et 10^{-6}. Après 24 heures d'incubation à 37°C, le dénombrement des bactéries survivantes est effectué et exprimé en $\log_{10}$ par gramme de tissu (UFC/g).

Le septième jour, les animaux ont été sacrifiés par une injection intraveineuse de thiopental. De nouveaux prélèvements ont été réalisés ce qui permet un dénombrement des bactéries survivantes en fin d'expérimentation.

Résultats

La première manipulation a permis d'affirmer que l'infection était sévère car la mortalité est de l'ordre de 30% (tableau 5).

Au troisième jour, l'infection par la souche de SARM, atteignait l'articulation, l'os épiphysaire et la moelle contenue dans le tiers distal du canal médullaire du fémur. Il s'agissait donc d'une infection massive avec une concentration bactérienne élevée supérieure à 7 Log $_{10}$ UFC/g de tissu. Par ailleurs, l'infection était stable au cours de la première semaine, et il n'a été observé aucune guérison spontanée.

	Os	Moelle osseuse	Liquide articulaire
	Log_{10} UFC/g moyenne ± écart type		
Témoins sacrifiés à J3 (5 lapins)	7,9 ± 0,4	7,5 ± 0,2	9,8 ± 0,1
Témoins sacrifiés à J7 (6 lapins)	8,7 ± 0,5	7,9 ± 1,1	8,7 ± 0,4

Tableau 5 : Dénombrement bactérien dans l'os, la moelle osseuse et dans le liquide articulaire à trois et huit jours après l'inoculation

Les résultats de la deuxième manipulation (tableau 6) montrent que seule l'association d'un débridement du foyer d'ostéo-arthrite et d'un traitement par la vancomycine permet de faire diminuer significativement la concentration bactérienne dans le tissu osseux et dans la cavité médullaire. Par contre il n'y a pas de différence significative de réduction du nombre de bactéries dans le liquide articulaire entre les trois procédures (lavage seul, vancomycine seule, lavage + vancomycine).

	Dénombrement J3 Log_{10} UFC/g moyenne ± écart type			Dénombrement J7 Log_{10} UFC/g moyenne ± écart type			ΔLog Log_{10} UFC/g moyenne ± écart type		
	os	Moelle osseuse	LA	os	Moelle	LA	os	Moelle	LA
Lavage (5lapins)	**7,3 ± 0,2**	**8 ± 0,3**	**8,3 ± 0,6**	**8,2 ± 0,6**	**8,2 ± 0,3**	**8,4 ± 0,5**	**0,3 ± 0,7***	**0,2 ± 0,7****	**0,1 ± 0,7**
Vancomycine (5lapins)				**7,2 ± 0,9**	**5,8 ± 0,6**	**7,7 ±0,2**			
Lavage + vancomycine (5lapins)	**8,3 ± 0,4**	**7,9 ± 0,5**	**8,9 0,5**	**6,9 ± 0,8**	**6,5 ± 1,4**	**7,8 ± 0,9**	**-1,4 ± 1,1***	**-1,4 ± 1,3****	**-1,2 ± 1,1**

*p= 0,0232, Δlog dans le tissu osseux, groupe lavage versus groupe lavage + vancomycine (test de Bonferroni Dunn après ANOVA)

**p=0,0426, Δlog dans la moelle osseuse, groupe lavage versus groupe lavage + vancomycine (test de Bonferroni Dunn après ANOVA)

Tableau 6 : dénombrements bactériens, dans l'os, la moelle osseuse et dans le liquide articulaire, trois et huit jours après l'inoculation.

Discussion

Le modèle d'ostéo-arthrite développé semble donc être valide ; car il permet d'obtenir simplement et dans tous les cas une infection ostéoarticulaire sévère, grévée d'une forte mortalité en l'absence de traitement. Il n'y a pas de guérison spontanée de témoin pendant l'expérimentation. Ce modèle a l'avantage de mimer une infection à forte charge bactérienne locale et probablement septicémique comme en témoigne l'importante mortalité. La sévérité de l'infection est confirmée par la difficulté de la traiter en associant un débridement chirurgical et l'antibiothérapie de référence pour les souches de SARM.

L'expérimentation en deux temps chirurgicaux (au troisième et au septième jour) permet également de calculer pour chaque lapin une diminution de la concentration bactérienne en début et en fin de traitement, ce qui augmente la puissance des tests statistiques, ce qui n'était pas possible avec le modèle d'endocardite. Les prélèvements pluri-tissulaires permettent également d'étudier plus précisément le mode d'action de l'antibiotique, et d'éventuellement comprendre certain échec de l'antibiothérapie.

Ces nouveaux modèles nous ont permis d'évaluer l'efficacité des nouvelles molécules d'antibiotiques antistaphylococcique.

Ils permettent également d'évaluer l'activité des antibiotiques incorporée au site de l'infection ainsi que les traitements adjuvants à l'antibiothérapie.

Evaluation expérimentale de nouvelles molécules anti-infectieuses chez l'animal

Quinupristine - Dalfopristine

Introduction

Les infections ostéo-articulaires à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) sont de plus en plus fréquentes. Ces bactéries sont résistantes à la plupart des antibiotiques disponibles pour l'homme. Les glycopeptides (vancomycine, teicoplanine) sont généralement utilisés en première intention pour traiter les infections à SARM. Cependant, l'émergence de souches de SARM de sensibilité intermédiaire aux glycopeptides au Japon, en Europe et en Amérique du nord, constitue un risque d'échec thérapeutique. Ce risque a d'ailleurs été confirmé par des études cliniques. Jusqu'à récemment les souches de SARM étaient très majoritairement des souches d'origine hospitalière, infectant des patients fragilisés dans les services de réanimation ou de longs séjours. Mais depuis quelques années et dans le monde entier, il a été noté l'émergence de nouvelles souches de SARM, d'origine communautaire infectant cette fois-ci des patients souvent jeunes sans facteur de risque connu d'infection à SARM (Dufour [2002]). Cette constatation est particulièrement inquiétante, car plusieurs auteurs (Dufour [2002], Gonzalez [2005]) ont rapporté une augmentation importante du nombre de jeunes patients très sévèrement atteints avec des localisations infectieuses cutanées, osseuses, articulaires, pulmonaires, dont le pronostic peut être catastrophique.

De plus, les glycopeptides sont des antibiotiques possédant une faible activité bactéricide. Leur administration est difficile et nécessite le recours à une voie veineuse centrale. Leur utilisation n'est par ailleurs pas dénuée de risques, leurs principaux effets secondaires potentiellement graves étant néphrologiques et otologiques, ce qui nécessite une surveillance régulière de leurs taux sériques. L'ensemble de ces constatations incite à rechercher et évaluer de nouvelles molécules antibiotiques.

La quinupristine (Q) et la dalfopristine (D) sont de streptogramines (respectivement de type B et A) solubles dans l'eau et injectables. Cette association, contenant 30% de quinupristine et 70% de dalfopristine, est synergique, et active sur les bactéries gram-positives. Les streptogramines inhibent la synthèse protéique. De précédentes études expérimentales sur l'endocardite (Batard [2002]) ou des infections sur prothèses chez le lapin (Saleh-Mghir [2002]), ont montré un bénéfice potentiel à l'association de Q-D avec d'autres antibiotiques tels que les bêta-lactamines ou la rifampicine (Sambatakou [1998]). Le but de cette étude a été de comparer l'efficacité de Q-D et de la vancomycine, seules ou en association avec la rifampicine, pour le traitement d'un modèle expérimental d'arthrite à SARM chez le lapin.

Matériels et Méthodes

Choix du germe

Nous avons utilisé une souche clinique, isolée dans une hémoculture, de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline, aux fluoroquinolones, mais sensibles aux macrolides.

Etudes *In vitro*.

Les Concentrations Minimales Inhibitrices de Q-D, de la vancomycine et de la rifampicine, pour la souche étudiée, ont été déterminées dans un bouillon de Mueller-Hinton (MH), par la méthode des microdilutions (Amsterdam [1996]).

Des vitesses de bactéricidie ont été réalisées dans des bouillons MH contenant Q-D, ou de la vancomycine, seules ou en association avec de la rifampicine (0.12μg/mL) (Lorian [1991]). Les concentrations (4 ou 8 fois la CMI) correspondent aux concentrations plasmatiques retrouvées chez l'homme. L'inoculum initial était de 7.4 $\log_{10}$ UFC de SARM par mL. Après 3, 6 et 24 heures d'incubation, des prélèvements de 0,1 ml étaient mis en cultures sur une gélose trypticase soja (TS).

Modèle expérimental d'arthrite septique.

Pour l'étude *in vivo*, nous avons utilisé des lapins femelles de la race New-Zealand (dont le poids variait de 1, 5 à 2 kg). Les doses de Q-D, vacomycine et de rifampicine ont été choisies afin d'obtenir des concentrations plasmatiques identiques à celles observées dans les études expérimentales déjà publiées par Batard [2002] et Saleh-Mghir [2002]. Les lapins ont été traités comme suit :

Le premier jour, J0 : Sous anesthésie générale (par kétamine, intra-musculaire, à la dose de 1,5 mg/kg), le genou droit de chaque animal a été rasé et une désinfection cutanée par polyvidone iodée a été réalisée. 1mL d'un bouillon contenant 10^8 UFC/mL SARM a été injecté dans chaque genou droit par voie parapatellaire interne.

24 heures après l'injection intra-articulaire J1 : un lavage chirurgical, par 250 mL de sérum physiologique, a été réalisé par arthrotomie parapatellaire interne, sous anesthésie générale. Des prélèvements de pus ont été réalisés pour chaque genou. Les lapins ont ensuite été répartis par randomisation dans un des cinq groupes suivant, et les antibiotiques ont été administrés pendant cinq jours (tableau 7).

	traitement	posologie	Mode d'administration
Groupe 1	Pas de traitement		
Groupe 2	Vancomycine	120 mg/kg/24h	Perfusion continue
Groupe 3	Vancomycine	120 mg/kg/24h	Perfusion continue
	Rifampicine	10 mg/kg /12h	Intra-musculaire
Groupe 4	Quinupristine-Dalfopristine Q-D	30 mg/kg/8h	Perfusion de 1 heure
Groupe 5	Quinupristine-Dalfopristine Q-D	30 mg/kg/8h	Perfusion de 1 heure
	Rifampicine	10 mg/kg/12h	Intra-musculaire

Tableau 7: Différents régimes antibiotiques

Au cinquième jour de l'expérimentation, J5 : les lapins ont été sacrifiés par une intection létale de thiopental. Des prélèvements de pus ont été obtenus pour chaque genou.

Les bactéries survivantes ont été dénombrées dans le liquide articulaire, obtenu à J1 et à J5 pour chaque lapin. Les échantillons ont été pesés et mélangés à 500 μL de sérum physiologique stériles, puis ensemencés purs ou à des dilutions de 10^{-2}, 10^{-4} et 10^{-6}, sur des géloses TS et Chapman, en utilisant un ensemenceur spiral (Interscience®). La sensibilité de cette méthode est de 20 CFU/mL. La différence du nombre de bactéries survivantes, entre J1 et J5, a été calculée. Les prélèvements provenant des lapins traités par rifampicine ont été ensemencés sur une gélose enrichie en rifampicine (4xCMI) à la recherche de mutants résistants.

Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée grâce au logiciel Staview (Abacus Concepts, Berkeley, Ca). Une analyse de variance a été utilisée pour comparer les différents groupes, suivie par un test PLSD de Fischer pour les comparaisons multiples. Les résultats ont été exprimés en moyenne ± déviation standard. Une valeur de $p \leq 0,05$ était considérée comme significative.

Résultats

Tests de sensibilité

Les CMI de la quinupristine-dalfopristine, de la vancomycine et de la rifampicine étaient respectivement de 0,5, 1 et 0,015 μg/mL.

Les vitesses de bactéricidie sont exposées dans la figure 8. La vancomycine et Q-D étaient plus efficaces seules contre la souche de SARM, avec une diminution de bactéries supérieure à 4 $\log_{10}$ UFC/mL. Une recroissance à 24h, due à la sélection de mutants résistants, est apparue pour la souche de SARM incubée avec la rifampicine seule à 8 fois la CMI. L'utilisation de rifampicine avec Q-D et la vancomycine a permis de prévenir l'apparition de mutants résistants à la rifampicine, au prix d'un discret antagonisme entre les molécules anti-bactériennes (figure 8).

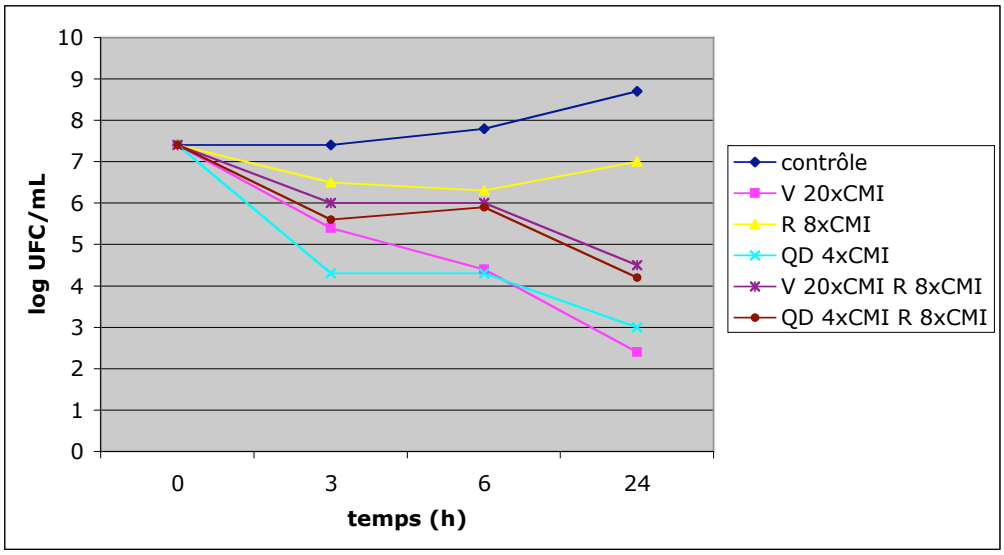


Figure 8: vitesse de bactéricidie pour la vancomycine, Q-D, rifampicine seules; et pour les associations vacomycine + rifampicine et Q-D + rifampicine.

Arthrite septique expérimentale.

Aucun des lapins du groupe contrôle n'a été guéri spontanément, ce qui confirme la validité du modèle. La diminution moyenne de bactéries dans le groupe contrôle était de 2 ± 1,5 $\log_{10}$ UFC/mL. L'association Quinupristine–Dalfopristine a permis une réduction du nombre de bactéries de 2,3 ±1 log UFC/mL. Les traitements par vancomycine seule ou en association avec la rifampicine et par Q-D plus rifampicine ont permis des résultats significativement différents que dans le groupe contrôle et dans le groupe Q-D seul (tableau 8). Aucun mutant résistant n'a été retrouvé, ce qui confirme l'action synergique, *in vivo*, de ces antibiotiques. Cependant aucun liquide articulaire, dans les groupes traités n'était stérile après cinq jours de traitement.

Groupes	Nombre d'animaux	Δ log_{10} UFC/mL moyenne ± écart type
témoins	9	- 2± 1,5
Vancomycine	8	- 3,5± 1 *
Vancomycine + Rifampicine	9	- 3,4± 0,3 *
Q-D	9	-2,3 ± 1
Q-D + Rifampicine	9	- 3,4± 0.5 *

* : p≤0,0426, *versus* contrôle et Q-D (test PLSD de Fischer après ANOVA)

Table 8: Activité antibactérienne des antibiotiques *in vivo*.

Discussion

Le modèle d'arthrite à SARM du lapin permet de simuler de façon satisfaisante la pathologie rencontrée chez l'homme. Ce modèle permet donc de comparer différents régimes thérapeutiques pour le traitement d'infections à SARM. Les infections ostéo-articulaires qu'elles soient hématogènes ou post-opératoires sont fréquentes, et sont souvent des infections à *Staphylococcus aureus*. Une proportion croissante de ces souches de *Staphylococcus aureus* sont résistantes à la méticilline. De plus, des formes variables de résistance aux glycopeptides (dont des résistances de haut niveau) sont apparues pour certaines souches de SARM (Appelbaum [2006]).

La monothérapie pour traiter les infections ostéoarticulaires est une option considérée comme insuffisante, en pratique clinique (Saleh-Mghir [2002], Zimmerli [1998]). L'association à de la rifampicine est donc souvent utilisée du fait de sa bonne pénétration intra-osseuse et intra-cellulaire ; et pourtant aucune synergie n'est mise enévidence in vitro avec les vitesses de bactéricidie quand la rifampicine est associée à un autre antibiotique. L'induction rapide de résistance avec la rifampicine impose de toujours associer cette molécule avec un autre antibiotique.

Peu d'études cliniques ou expérimentales ont évalué l'efficacité de la Quinipristine-Dalfopristine dans le traitement des infections ostéo-articulaires. Certaines de ces études ont montré des résultats encourageant de l'association Q-D et rifampicine dans le traitement d'infection sur matériel orthopédique

(Saleh-Mghir [2002]). Notre étude montre une efficacité satisfaisante de la vancomycine seule ou associée à la rifampicine, dans le modèle d'arthrite à SARM du lapin. Par contre, Q-D utilisée en monothérapie ne réduit pas significativement le nombre de bactéries dans le liquide articulaire. Mais l'association de la rifampicine à Q-D permet d'obtenir une diminution significative du nombre de bactéries tout en évitant l'apparition de mutants résistants à la rifampicine.

Les souches de SARM sont longtemps restées d'origine hospitalière. Depuis la fin des années 1990, des souches de SARM d'origine communautaire sont apparues dans le monde entier. Les caractéristiques démographiques des SARM communautaires diffèrent sensiblement de celles des SARM hospitalières. Les SARM communautaires touchent préférentiellement des patients jeunes sans pathologies sous-jacentes, alors que les SARM hospitalières infectent des patients âgés, fragilisés ou immuno-incompétents (Naimi [2003], Vandenesch [2004])

Q-D (Synercid®) est un antibiotique de la famille des synergistines, qui est actif sur les SARM, et qui offre la possibilité d'un relais *per os* par une molécule de la même famille (pristinamycine). La vancomycine reste la molécule de référence pour le traitement des infections ostéo-articulaires à SARM, elle est souvent associée à la rifampicine. Cependant, l'administration de la vancomycine est contraignante et nécessite l'utilisation d'une voie veineuse centrale en raison de sa veino-toxicité. Par ailleurs les glycopeptides posent le problème d'effets secondaires sur la fonction rénale et sur l'audition. Leur utilisation nécessite donc une surveillance des dosages plasmatiques, et une surveillance rénale et auditive. Les principaux effets secondaires de la Quinupristine-Dalfopristine affectent surtout l'appareil locomoteur. Des myalgies et des arthralgies (dans 10% des cas) ont été rapportées. Elles peuvent nécessiter l'utilisation de morphiniques et cèdent à l'arrêt du traitement (Drew [2000], Moellering [1999], Paterson [2006]). L'intolérance veineuse est aussi fréquente lors de l'utilisation de la Quinupristine-Dalfopristine si elle est administrée par une veine périphérique. Elle n'est par contre ni néphrotoxique ni ototoxique.

Nos résultats montrent que Q-D associé à la rifampicine est une alternative efficace à la vancomycine sans effet secondaire majeur dans le traitement de l'arthrite à SARM.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans : International Journal of Antimicrobial Agents parue en janvier 2008, 31,p 158-160

ELSEVIER

International Journal of Antimicrobial Agents 31 (2008) 158–160

INTERNATIONAL JOURNAL OF Antimicrobial Agents

www.ischemo.org

Short communication

Efficacy of quinupristin/dalfopristin versus vancomycin, alone or in combination with rifampicin, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a rabbit arthritis model

Antoine Hamel, Jocelyne Caillon, Cédric Jacqueline, Eric Batard, Gilles Potel *

Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, Thérapeutiques cliniques et expérimentales des infections, EA 3826, UFR Médecine, 1 rue G. Veil, F-44000 Nantes, France

Received 15 May 2007; accepted 11 September 2007

Abstract

We compared the efficacy of quinupristin/dalfopristin versus vancomycin, alone or in combination with rifampicin, in a rabbit model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-induced arthritis. Vancomycin, alone or in combination with rifampicin, and quinupristin/dalfopristin + rifampicin were significantly more effective than quinupristin/dalfopristin alone.
© 2007 Published by Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy.

Keywords: Quinupristin/dalfopristin; Arthritis; *Staphylococcus aureus*

1. Introduction

Bone and joint infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) are becoming more and more frequent. These microorganisms are resistant to the most commonly used antibiotics. Glycopeptide antibiotics such as vancomycin are generally used in the first round of treatment against MRSA infections. However, the emergence of glycopeptide-intermediate MRSA in Japan, Europe and North America constitutes a risk of clinical failure of glycopeptide therapy, and experimental studies have confirmed this apparent risk [1]. Indeed, the problems associated with glycopeptides, including poor bactericidal activity, difficulty of administration, bacterial resistance and nephrologic and otologic side effects, encourage the search for new antibacterial drugs as well as a better knowledge of the best therapeutic strategies among existing molecules. Quinupristin and dalfopristin are water-soluble, injectable, streptogramin B and streptogramin A antibiotics, respectively, whose combination in a 30:70 ratio acts synergistically on Gram-positive bacteria. Sambatakou et al. [2] have previously shown that quinupristin/dalfopristin (Q/D) is a very potent agent against *Staphylococcus* and that its activity against MRSA strains is enhanced when it is combined with rifampicin. Previous in vivo experimental studies on rabbit endocarditis and prosthetic joint infections [3,4] showed a potential benefit in combining Q/D with other antibiotics such as aminoglycosides and rifampicin. The aim of this study was to compare the efficacy of Q/D with that of vancomycin, with or without rifampicin, in the treatment of MRSA-induced septic arthritis in an experimental rabbit model.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strain

A clinical MRSA strain resistant to fluoroquinolones but susceptible to macrolides, isolated in blood culture, was used.

2.2. Minimum inhibitory concentrations (MICs)

MICs of Q/D, vancomycin and rifampicin for the MRSA strain were determined in Mueller–Hinton broth by the microdilution technique [5].

* Corresponding author. Tel.: +33 2 40 41 28 54; fax: +33 2 40 41 28 54.
E-mail address: gilles.potel@chu-nantes.fr (G. Potel).

0924-8579/$ – see front matter © 2007 Published by Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy.
doi:10.1016/j.ijantimicag.2007.09.004

2.3. Determination of antibiotic concentrations in serum of Q/D

Antibiotic concentrations in serum from three healthy rabbits were determined. Samples were drawn 15, 30, 45, 60, 120, 240 and 360 min after the first injection of Q/D. Concentrations of quinupristin, dalfopristin and Q/D were determined by microbiological assays as described previously by Batard et al. [3]. Lower limits of detection were 0.09 mg/L for quinupristin, 0.06 mg/L for dalfopristin and 0.23 mg/L for Q/D.

Vancomycin was administered as a constant rate, intravenous (i.v.) infusion (120 mg/kg/24 h) to obtain a steady-state serum concentration of ca. 20–25 mg/L in the animal.

2.4. Arthritis model

For the in vivo studies, a rabbit septic arthritis model was chosen, using female New Zealand rabbits (weight range 1.5–2 kg). At Day 0, the right knee was shaved under general anaesthesia (ketamine intramuscular (i.m.), 15 mg/kg). Following cutaneous disinfection by iodized polyvidone, 1 mL of MRSA (10^8 colony-forming units (CFU)/mL) was injected into the knee. Then, 24 h after injection into the joint (Day 1), joint debridement was performed under general anaesthesia and the joint fluid was sampled. An articular wash was performed using 250 mL of sterile saline. Joint and skin closure was performed.

Animals were randomly assigned to no treatment (control group), vancomycin (120 mg/kg/24 h, i.v. infusion at a constant rate, to reach a steady-state concentration of ca. 20–25 mg/L) or Q/D (30 mg/kg, 1 h i.v. infusion, three times a day), either alone or in combination with rifampicin (10 mg/kg, twice a day, i.m.). These doses of Q/D, vancomycin and rifampicin were calculated to obtain serum concentrations equivalent to those obtained in humans after 1-h i.v. infusions. Antibiotics were administered for 5 days. At the end of treatment (Day 5), rabbits were sacrificed by i.v. injection of thiopental. Samples of joint fluid were obtained from each infected knee (mean weight of samples 0.1216 ± 0.1028 g).

Surviving bacteria were counted in joint fluid. Samples of joint fluid obtained on Days 1 and 5 were weighed, mixed with 500 μL of sterile saline and seeded in pure and diluted forms (10^{-2}, 10^{-4} and 10^{-6}) onto trypticase soy agar using a Spiral System® (Interscience). The sensitivity threshold for this method was 20 CFU/mg. The difference in bacterial survival between Day 1 and Day 5 was calculated. Samples taken from rabbits treated with rifampicin were streaked onto rifampicin-enriched agar at 4× MIC in order to detect resistant mutants.

2.5. Statistics

Statistical analysis was performed with StatView software (Abacus Concepts, Berkeley, CA). Analysis of variance (ANOVA) was used to compare the effects between the different groups, followed by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test for multiple comparisons. Results were expressed as mean ± standard deviation. A *P*-value ≤ 0.05 was considered significant.

Table 1
Mean ± standard deviation peak concentration (C_{max}) of quinupristin, dalfopristin and quinupristin/dalfopristin (Q/D) in three healthy rabbits after a single injection of Q/D (30 mg/kg)

Drug	C_{max} (mg/L)
Quinupristin	1.5 ± 0.4
Dalfopristin	6.9 ± 0.5
Q/D	5.4 ± 1.8

3. Results

3.1. MICs

The MICs of Q/D, vancomycin and rifampicin were 0.5, 1 and 0.015 mg/L, respectively.

3.2. Serum antibiotic levels

The pharmacokinetics of quinupristin, dalfopristin and Q/D are shown in Table 1.

3.3. Arthritis model

None of the rabbits in the control group were cured spontaneously on Day 5, confirming the validity of the model. The mean spontaneous decrease in bacterial counts was 1.5 ± 1.6 $\log_{10}$ CFU/mL in the control group. Q/D alone caused a mean decrease in bacteria of 2.4 ± 1.2 $\log_{10}$ CFU/mL. Treatment with vancomycin alone, vancomycin + rifampicin and Q/D + rifampicin resulted in significantly different outcomes compared with those obtained in the control group and in the group treated with Q/D alone (Table 2). No rifampicin-resistant mutants were found, confirming the synergistic action of Q/D with rifampicin. All joint fluid taken from the treated groups was sterile after 5 days of antibiotic treatment.

4. Discussion

The rabbit model of arthritis used in this study closely mimics a human infection. Association of surgical debridement and antibiotics mimics the management of septic arthritis in humans. This model allowed us to compare different therapeutic regimens in the treatment of MRSA infection. Haematogenous and post-surgical bone and joint infections are common and are frequently caused by *S. aureus*. Moreover, an increasing proportion of *S. aureus* strains are MRSA. In addition, various forms of glycopeptide resistance have appeared in MRSA strains, including rare high-level

Table 2
Antibacterial activity of drugs in the rabbit model after 1 day and 5 days of treatment

Regimen	No. of rabbits	Mean ± S.D. ($\log_{10}$) (CFU/mL)		Mean ± S.D. ($\Delta\log_{10}$) (CFU/mL)
		Day 1	Day 5	
Control	9	5.9 ± 0.8	4.4 ± 1.7	−1.5 ± 1.6[a,b,c]
Vancomycin	8	5.6 ± 0.6	2.1 ± 0.6	−3.5 ± 1
Vancomycin + rifampicin	9	5.5 ± 0.5	2.1 ± 0.4	−3.4 ± 0.3
Q/D	9	5.7 ± 0.8	3.3 ± 1.1	−2.4 ± 1.2[d,e,f]
Q/D + rifampicin	9	5.8 ± 0.6	2.4 ± 0.5	−3.4 ± 0.5

S.D., standard deviation; CFU, colony-forming units; Q/D, quinupristin/dalfopristin.
[a] $P = 0.0006$ vs. vancomycin + rifampicin (Fisher's PLSD test after ANOVA).
[b] $P = 0.0003$ vs. vancomycin (Fisher's PLSD test after ANOVA).
[c] $P = 0.0005$ vs. Q/D + rifampicin (Fisher's PLSD test after ANOVA).
[d] $P = 0.0426$ vs. vancomycin + rifampicin (Fisher's PLSD test after ANOVA).
[e] $P = 0.0230$ vs. vancomycin (Fisher's PLSD test after ANOVA).
[f] $P = 0.0426$ vs. Q/D + rifampicin (Fisher's PLSD test after ANOVA).

resistance [1]. The use of monotherapy for treating bone and joint infections is insufficient [4,6]. Addition of rifampicin is often used, perhaps owing to better intraosseous and intracellular penetration, despite a lack of evidence for synergy. However, the rapid induction of resistance to rifampicin makes it necessary to combine it with another molecule. Few clinical or experimental studies have evaluated the use of Q/D for the treatment of bone and joint infections. The results of those studies are encouraging, as the Q/D and rifampicin combination was efficient in the treatment of infections related to orthopaedic devices [4]. Our study confirmed the efficacy of vancomycin, both alone and in combination with rifampicin, in the elimination of MRSA from a septic arthritis model. The combination of Q/D + rifampicin significantly reduced the number of bacteria in joint fluid while preventing the selection of rifampicin-resistant mutants.

Unlike vancomycin, Q/D has no otologic or nephrologic side effects and does not necessitate administration via a central venous line. Principal side effects of Q/D are myalgia and arthralgia (ca. 10%) [7–9]. These symptoms generally do not necessitate discontinuation of therapy, but sometimes necessitate co-administration of opioid analgesia.

Our results confirm the in vitro results described by Sambatakou et al. [2] and indicate that Q/D combined with rifampicin is an effective and safe alternative to vancomycin in the treatment of MRSA-induced arthritis and could be orally administered after the i.v. period.

Funding: None.

Competing interests: None declared.

Ethical approval: All animal studies were carried out in accordance with the Animals (Scientific Procedures) Act 1986 and the Code of Practice for the Housing and Care of Animals used in Scientific Procedures (1989).

References

[1] Appelbaum PC. The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect 2006;12:16–23.

[2] Sambatakou H, Giamarellos-Bourboulis EJ, Grecka P, Chryssouli Z, Giamarellou H. In-vitro activity and killing effect of quinupristin/dalfopristin (RP59500) on nosocomial *Staphylococcus aureus* and interactions with rifampicin and ciprofloxacin against methicillin-resistant isolates. J Antimicrob Chemother 1998;41:349–55.

[3] Batard E, Jacqueline C, Boutoille D, et al. Combination of quinupristin–dalfopristin and gentamicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: experimental rabbit endocarditis study. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:2174–8.

[4] Saleh-Mghir A, Ameur N, Muller-Serieys C, et al. Combination of quinupristin–dalfopristin (Synercid) and rifampin is highly synergistic in experimental *Staphylococcus aureus* joint prosthesis infection. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:1122–4.

[5] Amsterdam D. Susceptibility testing of antibiotics in liquid media. In: Lorian V, editor. Antibiotics in laboratory medicine. 4th ed. Baltimore, MD: Williams and Wilkins Co; 1996. p. 52–111.

[6] Zimmerli W, Widmer AF, Blatter M, Frei R, Ochsner PE. Role of rifampin for treatment of orthopedic implant-related staphylococcal infections: a randomized controlled trial. Foreign-Body Infection (FBI) Study Group. JAMA 1998;279:1537–41.

[7] Drew RH, Perfect JR, Srinath L, Kurkimilis E, Dowzicky M, Talbot GH. Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections with quinupristin–dalfopristin in patients intolerant of or failing prior therapy. For the Synercid Emergency-Use Study Group. J Antimicrob Chemother 2000;46:775–84.

[8] Moellering RC. Quinupristin/dalfopristin: therapeutic potential for vancomycin-resistant enterococcal infections. J Antimicrob Chemother 1999;44(Suppl. A):25–30.

[9] Paterson DL. Clinical experience with recently approved antibiotics. Curr Opin Pharmacol 2006;6:486–90.

Moxifloxacine

Introduction

Les fluoroquinolones (ciprofloxacine et ofloxacine), utilisées seules ou en association, ont montré leur efficacité dans le traitement des infections squelettiques (Gentry [1991], Mader 1990], Rissing [1997]). La moxifloxacine, dernière molécule de la famille des fluoroquinolones, possède une activité étendue sur *Staphylococcus aureus* (Ince [2003], MacGowan [1999]). La moxifloxacine a une capacité de sélection, *in vitro* et *in vivo*, de mutants-résistants moindre que les autres fluoroquinolones (Allen [2004], Firsov [2003], Lister [2001], Metzler [2004], Sierra [2005]). Dan [2004] a montré sa bonne diffusion dans le liquide synovial.

Le but de cette étude a été d'évaluer l'efficacité *in vivo* de la moxifloxacine et de comparer son activité avec celles de la cloxacilline et de la vancomycine sur un modèle d'arthrite septique chez le lapin à *Staphylococcus aureus* : une souche sensible à la méticilline et l'autre résistante.

Matériels et Méthodes

Choix du germe

Les deux souches de *Staphylococcus aureus* étudiées étaient sensibles aux quinolones. Une des souches, isolée dans un liquide articulaire, au cours d'une arthrite septique, était sensible à la méticilline. La seconde souche, isolée dans une hémoculture, était résistante à la méticilline.

Etudes *In vitro*.

Les Concentrations Minimales Inhibitrices CMI, de la moxifloxacine et de la vancomycine ont été déterminées par la technique de microdilution sur bouillon de Mueller-Hinton (MH). Les CMI de la cloxacilline ont été déterminées par la même méthode, mais sur un bouillon MH contenant 2% de NaCl.

Modèle expérimental d'arthrite septique.

L'arthrite a été obtenue en injectant 1 mL d'une suspension contenant 10^8 UFC/mL de *Staphylococcus aureus*, dans le genou droit de chaque lapin. Les animaux ont été ensuite répartis par randomisation dans un des groupes suivant :

- pour les animaux infectés par la souche de *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline, les animaux ont été traités par :
    - moxifloxacine
    - cloxacilline
- pour les animaux infectés par la souche de *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline :
    - moxifloxacine
    - vancomycine
- deux groupes de témoins (un groupe pour chaque souche) ont été également constitués afin de s'assurer de l'absence de guérison spontanée.

Les traitements ont été débutés 24 heures après l'injection intra-articulaire de *Staphylococcus aureus*, et ont duré 7 jours.

La moxifloxacine a été administrée par seringue électrique dont le débit était contrôlé par un logiciel permettant de simuler une dose orale de 400 mg par jour, chez l'homme selon le modèle décrit par Bugnon (Bugnon [1998]). La vancomycine a été administrée en perfusion continue, à la posologie de 100 mg/kg de façon à obtenir une concentration sérique au steady state de 20 mg/kg. La cloxacilline a été administrée, à la dose de 50 mg/kg trois fois par jour,

par voie intra-musculaire, afin d'atteindre une concentration supérieure à la CMI (Dhawan [2000]).

Avant de débuter le traitement, un prélèvement par ponction articulaire a été réalisé pour chaque lapin. A la fin du traitement, le liquide synovial a été prélevé en totalité, au cours d'une arthrotomie. Les deux prélèvements ont été pesés (de 20 à 150 mg) et mélangés à 0,5 mL de sérum physiologique. Ils ont été ensuite étalés sur des géloses de Mueller-Hinton et sur des géloses au charbon afin de prévenir l'effet "carry-over" (Xiong [1995]). Des homogénats non dilués ont également été étalés sur des géloses contenant de la moxifloxacine à des concentrations correspondant à deux et quatre fois la CMI, à la recherche de mutants résistants. Le dénombrement des bactéries a été réalisé après 48 heures d'incubation à 37°C.

L'administration simulée de la moxifloxacine avait pour but d'obtenir des paramètres pharmacologiques proches de ceux observés chez des volontaires sains ayant reçu une dose orale de 400 mg. C'est à dire une demi-vie variant de 8 à 12 heures, un pic de concentration (Cmax) de 2,5 à 3 mg/L, et une Cmax survenant une heure après le début de la perfusion, et enfin une aire sous la courbe "temps-concentration" de 35 à 40 mg. h /L (Stass [1999], Sullivan [1999], Wise [1999]). Une dose totale de 45 mg/kg a été administrée dans un volume de 50 mL aux lapins sur une période de 24 heures, pour simuler un dose orale de 400 mg par jour.

Les concentrations de la moxifloxacine et de la cloxacilline dans le sérum et dans le liquide synovial ont été déterminées par méthode microbiologique (limite de détection : 0,125 mg/L pour la moxifloxacine et 0,5 mg/L pour la cloxacilline). Le dosage sérique de la vancomycine a été réalisé par HPLC..

Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée grâce au logiciel GraphPad (Graph Pad Software, San Diego, Ca). Les analyses ont été effectuées séparément pour chaque souche, en comparant les traitements deux à deux. Le test t de Student a été utilisé pour comparer la différence de concentration bactérienne dans le liquide synovial avant et après traitement $\Delta \log_{10}$ UFC/g de liquide

synovial). Les résultats ont été exprimés en moyenne ± déviation standard. Une valeur de $p \leq 0,05$ était considérée comme significative.

Résultats

Tests de susceptibilité

Les CMI de la moxifloxacine et de la vancomycine étaient respectivement de 0,032 mg/L et 1 mg/L pour les deux souches. La CMI de la cloxacilline était de 0,5 mg/L pour la souche sensible et de 4mg/L pour la souche résistante.

Paramètres pharmacocinétiques

Le profil sérique pharmacologique chez le lapin, après administration d'une dose "humaine" de 400 mg et les données humaines correspondantes sont exposés sur la figure 9 (Cmax = 2,85 mg/L, Aire sous la courbe des 24 heures = 37,5 mg.h/L, demi-vie = 8,2 h) (figure 9). Les paramètres pharmocinétiques et pharmacodynamiques ont été calculés à partir de ces données comme suivent : rapport Aire sous la courbe/CMI supérieur à 1000, et Cmax/CMI = 90.

La moyenne ± déviation standard de la concentration (Cmin) de la moxifloxacine dans le liquide synovial (3,90 ± 1,70 mg/L) était proche de la Cmax dans le sérum (Cmin/CMI = 121). La moyenne ± déviation standard de la concentration sérique de la cloxacilline chez le lapin était de 0,80 ± 0,2 mg/L, 6 heures après l'injection, ce qui dépassait pour cette période largement la CMI (6 heures réprésentant 70% de l'intervalle entre deux administrations de cloxacilline). La Cmin de la cloxacilline dans le liquide synovial était de 2,90 ± 0,5 mg/L (soit à peu près 5 fois la CMI) permettant d'obtenir une concentration supérieure à la CMI pendant toute la durée séparant deux administrations. La concentration sérique de vancomycine au steady–state était de 26,3 ± 2,9 mg/L. Les dosages de la vancomycine dans le liquide articulaire n'ont pas été réalisés.

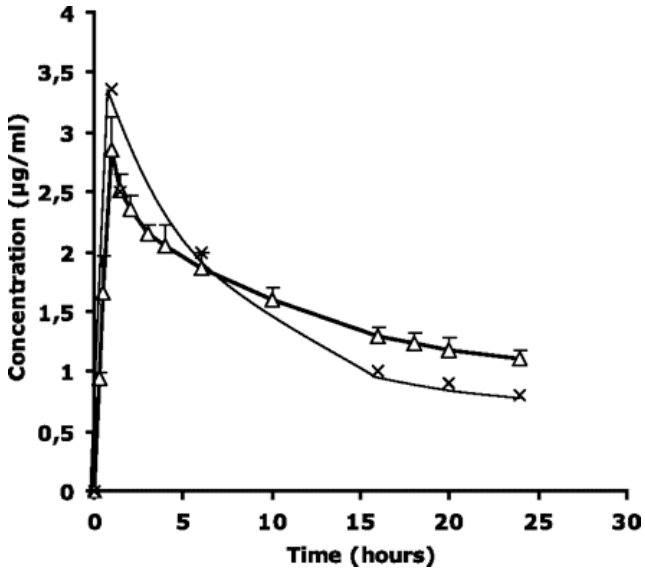


Figure 9 : pharmacocinétique simulée de la moxifloxacine dans le sérum de lapin après une administration d'une dose "humaine orale" de 400 mg (Δ), et pharmacocinétique humaine correspondante (x)

Arthrite septique expérimentale.

Les résultats de l'expérimentation *in vivo* sont exposés dans le tableau 1. Dans le groupe contrôle, la valeur moyenne du $\Delta\log_{10}$ était de –1,1 ± 0,8 UFC/g pour la souche de *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline et de 0,6 ± 1,91 UFC/g pour la souche de *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline. Il n'y avait pas de différence significative entre les différents traitements. Aucun mutant résistant n'a été sélectionné par le traitement par moxifloxacine.

traitement	*Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline	*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline
	Δ $\log_{10}$ UFC/g de liquide synovial (moyenne ± déviation standard)	
Groupe contrôle	-1,1 ± 0,8 (5 lapins)	0,6 ± 1,9 (5 lapins)
Moxifloxacine	4,34 ± 0,55 (9 lapins)	4,47 ± 1,30 (9 lapins)
Cloxacilline	4,60 ± 1,60 (6 lapins)	
Vancomycine		3,74 ± 1,06 (6 lapins)

Tableau 9 : Différence des concentrations bactériennes dans le liquide synovial entre le premier et le septième jour de traitement.

Discussion

Aucune étude bien conduite, évaluant l'efficacité de différents régime thérapeutique sur l'arthrite septique, n'a été publiée. 10% des souches de *Staphylococcus aureus*, responsables d'arthrites septiques, sont résistantes à la méticilline, chez l'adulte (Entenza [2001], Gupta [2001]). L'émergence récente de souches de *Staphylococcus aureus* "communautaire" résistantes à la méticilline, mais sensibles aux quinolones est en train de modifier l'épidémiologie bactérienne pour cette pathologie.

Les échecs thérapeutiques des infections ostéo-articulaires traités par les plus anciennes des quinolones étaient en rapport avec l'apparition de mutants résistants. Par ailleurs, plusieurs études (Allen [2004], Lister [2001], Metzler [2004], Sierra [2005]) ont montré la faible propension de la moxifloxacine à sélectionner des mutants résistants. La moxifloxacine possède également une bonne activité (CMI = 0,25 μg/mL) sur les mutants résistants de premier niveau induits par la ciprofloxacine (Entenza [2001]). Frippiat [2004] a rapporté sept succès de traitement d'infections ostéo-articulaires par la moxifloxacine associée à la rifampicine. Mais actuellement aucune étude clinique n'a montré l'efficacité de la moxifloxacine au cours du traitement des arthrites septiques.

Cette étude montre que sur un modèle expérimental d'arthrite, l'activité de la moxifloxacine est similaire à celles des molécules de référence sur les souches de *Staphylococcus aureus* sensibles aux quinolones. Le rapport aire

sous la courbe / CMI supérieur à 1000, et le rapport Cmax / CMI supérieur à 90 dépassent largement les paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques (aire sous la courbe / CMI > 100 et Cmax / CMI > 8) associés au succès thérapeutique des fluoroquinolones (Andes [1998]). La moxifloxacine diffuse bien dans le liquide synovial et dans les épanchements inflammatoires, avec un profil pharmacocinétique identique au sérum humain après une administration orale unique (Dan [2004], Wise [1999]). Nous avons montré que la concentration dans le liquide synovial au septième jour (Cmin) était équivalente à la Cmax dans le sérum, probablement à cause d'un phénomène d'accumulation.

En raison de son profil pharmacocinétique et de sa biodisponibilité (MacGowan [1999], Stass [1999]), la moxifloxacine administrée par voie orale peut être considérée comme une alternative thérapeutique valable pour les traitement des arthrites à *Staphylococcus aureus* sensibles aux quinolones. Son utilisation en association avec d'autres antibiotiques, et en particulier la rifampicine est conseillée, surtout en cas de traitement de longue durée.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans : Antimicrobial Agents and Chemotherapy parue en Septembre 2007, p3401-3403.

ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Sept. 2007, p. 3401–3403 Vol. 51, No. 9
0066-4804/07/$08.00+0 doi:10.1128/AAC.01520-06
Copyright © 2007, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

In Vivo Efficacy of Moxifloxacin Compared with Cloxacillin and Vancomycin in a *Staphylococcus aureus* Rabbit Arthritis Experimental Model[▽]

Olivier Grossi, Jocelyne Caillon,* Cedric Arvieux, Cedric Jacqueline, Denis Bugnon, Gilles Potel, and Antoine Hamel

Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, Thérapeutiques Cliniques et Expérimentales des Maladies Infectieuses, EA 3826, Faculté de Médecine, Nantes F-44000, France

Received 4 December 2006/Returned for modification 26 March 2007/Accepted 7 June 2007

We investigated the efficacies of moxifloxacin, cloxacillin, and vancomycin in a rabbit model of *Staphylococcus aureus* arthritis. No significant difference between therapeutic regimens was observed after a 7-day treatment. Oral moxifloxacin could be a suitable alternative to standard parenteral therapy for *S. aureus* arthritis.

Nongonococcal acute septic arthritis remains a leading cause of destructive joint disease (14, 26). Treatment includes both drainage of the infected joint and antibiotic therapy. *Staphylococcus aureus* is the pathogen most often involved in bacterial arthritis (9, 14, 26). Therapy consists of intravenous penicillinase-resistant penicillin or vancomycin for 1 or 2 weeks. A switch to oral therapy is typical following clinical improvement (4). The successful use of ciprofloxacin or ofloxacin alone (13, 21, 25) or in combination (8) for treatment of *S. aureus* skeletal infections has been described. Moxifloxacin exhibits enhanced activity against *S. aureus* (16, 19), has a low propensity to select in vitro and in vivo resistant mutants (1, 11, 18, 21, 25), and diffuses well in synovial fluid (SF) (6). One paper has reported the successful use of moxifloxacin in bone and joint infections in the clinical setting (12). The aim of this study was to evaluate the in vivo efficacy of moxifloxacin in comparison with cloxacillin and vancomycin in a rabbit arthritis model induced with methicillin-susceptible and -resistant *S. aureus* (MSSA and MRSA, respectively) strains.

Two quinolone-susceptible *S. aureus* strains were studied. One clinical isolate from a case of acute arthritis was an MSSA strain, and the other, isolated from blood culture, was methicillin resistant (MRSA).

The MICs of moxifloxacin and vancomycin were determined by microdilution in Mueller-Hinton broth (2, 24). The MICs of cloxacillin were determined by the same method, but with Mueller-Hinton broth containing 2% NaCl (22).

Rabbit arthritis was induced by injection of 1 ml of a 10^8-CFU inoculum of MSSA or MRSA into the joint space of the right knee (17). Animals infected with MSSA were randomly assigned to the moxifloxacin or cloxacillin group, and those infected with MRSA were randomly assigned to the moxifloxacin or vancomycin group. A control group without treatment was also constituted to ensure that the lowering of the bacterial concentration was not because of an immunologic response. The treatments were started 24 h after bacterial challenge, and all animals were treated for 7 days. A computer controlled the flow rate of moxifloxacin in order to simulate a human oral dose of 400 mg daily (5). Vancomycin was administered by a constant intravenous infusion and allowed to reach a 20-mg/liter serum steady-state concentration (dose of 100 mg/kg of body weight daily). Cloxacillin was injected via the intramuscular route at a dose leading to supra-MIC levels in serum (50 mg/kg three times a day) (7). Before treatment, an SF sample (SF 1) was taken from each infected rabbit knee. At the end of the treatment, all of the SF (SF 2) was removed from each infected rabbit knee by a surgical procedure. SF 1 and SF 2 samples were weighed (range, 20 to 150 mg), homogenized in 0.5 ml of saline buffer, and spread on Mueller-Hinton agar plates and on charcoal agar plates to prevent a carryover effect (30). Undiluted homogenates were also spread on agar plates containing moxifloxacin at concentrations corresponding to two and four times the MIC in order to determine resistant variants. Bacterial counts were determined after 48 h of incubation.

The moxifloxacin simulation was intended to provide pharmacokinetic parameters close to those observed in healthy volunteers after administration of a single 400-mg oral dose, including a half-life of about 8 to 12 h, a peak concentration (C_{max}) of about 2.5 to 3 mg/liter, a time to C_{max} of about 1 h, and an area under the concentration-time curve from 0 to 24 h (AUC_{0-24}) of about 35 to 40 mg · h · liter^{-1} (26, 27, 29). A total dose of 45 mg/kg (in a volume of 50 ml) was administered to the rabbits over a 24-h period in order to simulate human serum kinetics after a 400-mg oral dose.

Free moxifloxacin and cloxacillin concentrations in serum and SF were determined by microbiologic assay methods (limits of detection, 0.125 mg/liter and 0.5 mg/liter for moxifloxacin and cloxacillin, respectively). Vancomycin dosage in serum was performed by bioassay (limit of detection, 2 mg/liter). The linearity of the standard curve used for the bioassays was 0.98 (r^2). Inter- and intraplaque variations were <10%.

Statistical and pharmacokinetic analyses were performed with GraphPad Prism v4.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA). Analyses were performed separately for each strain by comparing therapeutic regimens two by two. Student's *t* tes

* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire EA 3826, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes Cedex 01, France. Phone and fax: (33) 240 41 2854. E-mail: jocelyne.caillon@univ-nantes.fr.
▽ Published ahead of print on 18 June 2007.

was used to compare the mean difference in bacterial concentrations in SF before and after treatment ($\Delta\log_{10}$ CFU per gram of SF). A P value of ≤ 0.05 was considered statistically significant.

MICs of moxifloxacin and vancomycin were 0.032 mg/liter and 1 mg/liter for MSSA and MRSA, respectively. MICs of cloxacillin were 0.5 mg/liter for MSSA and 4 mg/liter for MRSA. The serum pharmacokinetic profile obtained in rabbits after the first "human" oral dose of 400 mg of moxifloxacin (C_{max} = 2.85 mg/liter; AUC_{0-24} = 37.5 mg · h · liter^{-1}; half-life = 8.2 h) and the corresponding human data are shown in Fig. 1. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters were calculated from these data as follows: AUC/MIC ratio, >1,000; and C_{max}/MIC ratio = 90.

The mean (± standard deviation [SD]) trough concentration (C_{min}) of moxifloxacin in SF (3.90 ± 1.70 mg/liter) was close to the C_{max} in serum (C_{min}/MIC ratio in SF − 121). The mean (± SD) concentration achieved in rabbit serum with cloxacillin was 0.80 ± 0.2 mg/liter at 6 h, which slightly exceeded the MIC, at least for the duration of 6 h (approximately 70% of the dosing interval). The C_{min} of cloxacillin in SF remained about 2.90 ± 0.5 mg/liter (about 5× MIC), allowing a concentration time over the MIC of about 100% of the dosing interval. Steady-state concentrations of vancomycin in serum were 26.3 ± 2.9 mg/liter. Vancomycin dosages in SF were not performed.

The in vivo outcomes are shown in Table 1. For the control group, the mean $\Delta\log_{10}$ value (± SD) was −1.1 ± 0.8 CFU/g with the MSSA strain and 0.6 ± 1.91 CFU/g with the MRSA strain. Differences in log reductions between moxifloxacin and comparators were not significant ($P > 0.05$; Student's t test). None of the regimens studied yielded *S. aureus* colonies on agar plates containing moxifloxacin at two and four times the MIC.

No well-conducted controlled clinical trials evaluating the efficacies of antibiotic regimens for bacterial arthritis have been published. Ten percent of *S. aureus* strains are methicillin resistant in this pathology only (9, 15). The recent emergence of community-acquired MRSA strains (28) susceptible to quinolones is likely to change the epidemiology of this pathology.

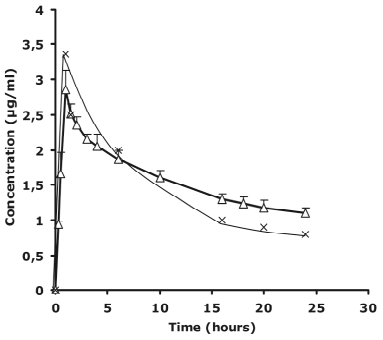


FIG. 1. Simulated pharmacokinetics of moxifloxacin in sera of rabbits following the first "human" oral dose of 400 mg (△) and corresponding human pharmacokinetics (×).

TABLE 1. Differences in bacterial concentrations in SF between the first and seventh days of treatment

Drug regimen	$\Delta\log_{10}$ CFU/g of SF (mean ± SD [no. of rabbits])	
	MSSA	MRSA
Controls	−1.1 ± 0.8 (5)	0.6 ± 1.9 (5)
Moxifloxacin	4.34 ± 0.55 (9)	4.47 ± 1.30 (9)
Cloxacillin	4.60 ± 1.60 (6)	
Vancomycin		3.74 ± 1.06 (6)

Treatment failures of *S. aureus* skeletal infections observed with older fluoroquinolones were mostly related to the emergence of quinolone-resistant strains. Moxifloxacin could be preferred in this clinical setting. Indeed, studies have shown the lower propensity of moxifloxacin to select resistant mutants in vitro and in vivo among staphylococci (1, 18, 21, 25) and its activity against first-level ciprofloxacin-resistant MRSA strains with a MIC of 0.25 µg/ml (10). Frippiat et al. recently reported favorable outcomes with moxifloxacin in association with rifampin in seven clinical cases of staphylococcal bone and joint infections (12). To date, no study has shown the efficacy of moxifloxacin against acute septic arthritis.

The present study revealed that in the arthritis model, moxifloxacin exhibited a similar in vivo efficacy to that of reference antibiotic therapy against both *S. aureus* strains susceptible to quinolones. The AUC/MIC ratio of >1,000 and C_{max}/MIC ratio of >90 greatly overcome pharmacokinetic/pharmacodynamic ratio breakpoints (AUC/MIC ratio of >100 and C_{max}/MIC ratio of >8) correlated with therapeutic success of fluoroquinolones (3). Moxifloxacin diffuses well in SF and inflammatory fluids, with a similar pharmacokinetic profile to that in serum from humans after a single oral dose (6, 29). We found that C_{min} values of moxifloxacin in SF at 7 days (3.90 ± 1.70 mg/liter) were close to the C_{max} in serum, probably because of accumulation.

Regarding its excellent pharmacokinetic profile and bioavailability (19, 26), oral moxifloxacin could be considered an alternative treatment for quinolone-susceptible *S. aureus* arthritis. However, its use in association with another antibiotic such as rifampin, is likely warranted in the clinical setting especially when prolonged therapy is required.

REFERENCES

1. **Allen, G. P., G. W. Kaatz, and M. J. Rybak.** 2004. In vitro activities of mutan prevention concentration-targeted concentrations of fluoroquinolone against *Staphylococcus aureus* in a pharmacodynamic model. Int. J. Antimi crob. Agents **24:**150–160.
2. **Amsterdam, D.** 1996. Susceptibility testing of antibiotics in liquid media, p 52–111. *In* V. Lorian (ed.), Antibiotics in laboratory medicine, 4th ed. Th Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD.
3. **Andes, D. R., and W. A. Craig.** 1998. Pharmacodynamics of fluoroquinolone in experimental models of endocarditis. Clin. Infect. Dis. **27:**47–50.
4. **Black, J. T., T. L. Hunt, P. J. Godley, and E. Matthew.** 1987. Oral antimi crobial therapy for adults with osteomyelitis or septic arthritis. J. Infect. Dis **155:**968–972.
5. **Bugnon, D., G. Potel, J. Caillon, D. Baron, H. B. Drugeon, P. Feigel, an M. F. Kergueris.** 1998. In vivo simulation of human pharmacokinetics in th rabbit. Bull. Math. Biol. **60:**545–567.
6. **Dan, M., O. Keynan, Z. Feldbrin, and F. Poch.** 2004. Concentrations o moxifloxacin in serum and synovial fluid, and *ex-vivo* bacterial activity agains arthritis-causing pathogens. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **48:**283–286.
7. **Dhawan, W. K., A. S. Bayer, and M. R. Yeaman.** 2000. Thrombin-induce platelet microbicidal protein susceptibility phenotype influences the out come of oxacillin prophylaxis and therapy of experimental *Staphylococcu aureus* endocarditis. Antimicrob. Agents Chemother. **44:**3206–3209.

8. **Drancourt, M., A. Stein, J. N. Argenson, R. Roiron, P. Groulier, and D. Raoult.** 1997. Oral treatment of *Staphylococcus spp.* infected orthopaedic implants with fusidic acid or ofloxacin in combination with rifampicin. J. Antimicrob. Chemother. **39:**235–240.
9. **Dubost, J. J., M. Soubrier, C. De Champs, J. M. Ristori, J. L. Bussière, and B. Sauvezie.** 2002. No changes in the distribution of organisms responsible for septic arthritis over a 20-year period. Ann. Rheum. Dis. **61:**267–269.
10. **Entenza, J. M., Y. A. Que, J. Vouillamoz, M. P. Glauser, and P. Moreillon.** 2001. Efficacies of moxifloxacin, ciprofloxacin, and vancomycin against experimental endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* expressing various degrees of ciprofloxacin resistance. Antimicrob. Agents Chemother. **45:**3076–3083.
11. **Firsov, A. A., S. N. Vostrov, I. Y. Lubenko, K. Drlica, Y. A. Portnoy, and S. H. Zinner.** 2003. In vitro pharmacodynamic evaluation of the mutant selection window hypothesis using four fluoroquinolones against *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. **47:**1604–1613.
12. **Frippiat, F., F. Meunier, and G. Derue.** 2004. Place of newer quinolones and rifampicin in the treatment of gram-positive bone and joint infections. J. Antimicrob. Chemother. **54:**1158.
13. **Gentry, L. O., and G. Rodriguez-Gomez.** 1991. Ofloxacin versus parenteral therapy for chronic osteomyelitis. Antimicrob. Agents Chemother. **35:**538–541.
14. **Goldenberg, D. L.** 1998. Septic arthritis. Lancet **351:**197–202.
15. **Gupta, M. N., R. D. Sturrock, and M. Field.** 2001. A prospective 2-year study of 75 patients with adult-onset septic arthritis. Rheumatology **40:**24–30.
16. **Ince, D., X. Zhang, and D. C. Hooper.** 2003. Activity of and resistance to moxifloxacin in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. **47:**1410–1415.
17. **Johnson, A. H., W. G. Campbell, and B. C. Callahan.** 1970. Infection of rabbit knee joints after intra-articular injection of *Staphylococcus aureus*. Comparison with joints infected with *Staphylococcus albus*. Am. J. Pathol. **60:**165–203.
18. **Lister, P. D.** 2001. Pharmacodynamics of moxifloxacin and levofloxacin against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in an in vitro pharmacodynamic model. Clin. Infect. Dis. **32**(Suppl. 1)**:**S33–S38.
19. **MacGowan, A. P.** 1999. Moxifloxacin (Bay 12-8039): a new methoxy quinolone antibacterial. Expert Opin. Investig. Drugs **8:**181–199.
20. **Mader, J. T., J. S. Cantrell, and J. Calhoun.** 1990. Oral ciprofloxacin compared with standard parenteral antibiotic therapy for chronic osteomyelitis. 1990. J. Bone Joint Surg. Am. **72:**104–110.
21. **Metzler, K., G. M. Hansen, P. Hedlin, E. Harding, K. Drlica, and J. M. Blondeau.** 2004. Comparison of minimal inhibitory and mutant prevention drug concentrations of four fluoroquinolones against clinical isolates of methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus*. Int. J. Antimicrob. Agents **24:**161–167.
22. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 1997. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 4th ed. Approved standard M7–A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
23. **Rissing, J. P.** 1997. Antimicrobial therapy for chronic osteomyelitis in adults: role of the fluoroquinolones. Clin. Infect. Dis. **25:**1327–1333.
24. **Shirliff, M. E., and T. J. Mader.** 2002. Acute septic arthritis. Clin. Microbiol. Rev. **15:**527–544.
25. **Sierra, J. M., J. G. Cabeza, M. Ruiz Chaler, T. Montero, J. Hernandez, J. Menza, M. Llagostera, and J. Vila.** 2005. The selection of resistance to and the mutagenicity of different fluoroquinolones in *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*. Clin. Microbiol. Infect. **11:**750–758.
26. **Stass, H., and D. Kubitza.** 1999. Pharmacokinetics and elimination of moxifloxacin after oral and intravenous administration in man. J. Antimicrob. Chemother. **43**(Suppl.B)**:**83–90.
27. **Sullivan, J. T., M. Woodruff, J. Lettieri, V. Agarwal, G. J. Krol, P. T. Leese, S. Watson, and A. H. Heller.** 1999. Pharmacokinetics of a once-daily oral dose of moxifloxacin (Bay 12-8039), a new enantiomerically pure 8-methoxy quinolone. Antimicrob. Agents Chemother. **43:**2793–2797.
28. **Weber, J. T.** 2005. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin. Infect. Dis. **41**(Suppl. 4)**:**S269–S272.
29. **Wise, R., J. M. Andrews, G. Marshall, and G. Hartman.** 1999. Pharmacokinetics and inflammatory-fluid penetration of moxifloxacin following oral or intravenous administration. Antimicrob. Agents Chemother. **43:**1508–1510.
30. **Xiong, Y. Q., G. Potel, J. Caillon, G. Stephant, F. Jehl, D. Bugnon, P. Le Conte, D. Baron, and H. Drugeon.** 1995. Comparative efficacies of ciprofloxacin and pefloxacin alone or in combination with fosfomycin in experimental endocarditis induced by multidrug-susceptible and -resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. **39:**496–499.

Evaluation expérimentale d’alternatives à l’antibiothérapie intraveineuse chez l’animal

Etude *in vivo* de l'activité bactéricide de la vancomycine incorporée dans des microparticules de poly-ε-caprolactone.

Introduction

Les infections osseuses à *Staphylococcus aureus* resistant à la méticilline posent de nombreux problèmes thérapeutiques. Les glycopeptides sont jusqu'à présent les molécules de référence pour le traitement de ces infections. Cependant ces antibiotiques présentent une mauvaise pénétration intra-osseuse. Cette caractéristique est de plus aggravée par les phénomènes de nécrose au sein du foyer infectieux, ce qui diminue d'autant plus la concentration de l'antibiotique dans l'os. Par ailleurs l'utilisation des glycopeptides, et en particulier de la vancomycine, impose l'utilisation d'une voie veineuse centrale en raison de sa toxicité sur les veines périphériques de petit calibre, et impose une surveillance attentive des concentrations plasmatiques afin d'éviter les complications otologiques et rénales en cas de surdosage.

L'utilisation des antibiotiques dans le site même de l'infection est une alternative théoriquement séduisante à l'administration intraveineuse de ces drogues. En effet, l'antibiothérapie locale possède l'avantage de fournir des concentrations tissulaires d'antibiotique élevées avec des taux sériques faibles, ce qui permet donc d'éviter les effets secondaires associés. Par ailleurs, l'antibiotique utilisé localement est associé à un vecteur qui va permettre sa libération progressive. Ce vecteur assure également un rôle de comblement de la cavité osseuse infectée, et évite la formation d'un hématome intra-osseux, excellent milieu de culture pour le germe présent.

L'utilisation de vecteurs d'antibiotique dans le site de l'infection n'est pas récente. L'utilisation des ciments de polyméthylmétacrylate chargés

d'aminoside date des années 1970. Le ciment est associé à un aminoside et se présente sous forme de poudre pour le scellement des arthroplasties ou sous forme de billes pour le traitement des foyers d'ostéite (Scott, [1988], Argenson [1993]).

Mais les ciments PMMA ne sont pas biodégradables, et nécessitent une seconde intervention, pour en réaliser leur ablation. Il a donc été développé des associations réunissant un antibiotique et un matériau biodégradable (éponge de collagène (Stemberger [1997], Friess [1998]), des céramiques de type hydroxyapatite, tri-phospate de calcium ou biphasique associant ces deux composant (Shirtliff [2002], Iooss [2001], Hamanishi [1996], Saito [2002]), du sulfates de calcium ou des polymères (Kanellakopoulou [2000], Benoit [1995]).

Le poly-ε-caprolactone (Tone® P787, Union Carbide SA, France) est un polymère biodégradable (Guzman [1996], Thomazeau [1996], Jameela [1997], Le Ray [2003], Lowry [1997], Menei [1994]), qui appartient à la famille des polyesters aliphatiques. Le chlorhydrate de vancomycine utilisé pour l'expérimentation *in vivo* a été incorporé aux microparticules dans le laboratoire de Pharmacie galénique de la faculté de Pharmacie de Nantes.

Matériel et méthodes

Choix du germe

Nous avons utilisé une souche de *Staphylococcus aureus*, souche clinique isolée d'une hémoculture, résistante à la méticilline (SARM), aux fluoroquinolones, mais sensibles aux macrolides.

Modèle expérimental : Ostéomyélite

Cette étude a été menée en utilisant les deux modèles d'ostéomyélite, avec et sans matériel.

Ostéomyélite sans matériel

Le premier jour, sous anesthésie générale (kétamine intra-veineuse, 15 mg/kg), la face interne de l'extrémité supérieure du tibia droit a été abordée afin de réaliser une corticotomie grâce à un trocart à biopsie ostéomédullaire. La métaphyse est comblée par une éponge hémostatique (Pangen®) imprégnée par une suspension bactérienne contenant 5. 10^8 UFC/mL de SARM. La corticotomie a été ensuite fermée par de la cire chirurgicale et la peau et le périoste refermés par un surjet non résorbable.

Ostéomyélite avec matériel

Au premier jour, les lapins New-Zealand femelles ont été anesthésiées par une injection intra-musculaire de kétamine à la dose de 15 mg/kg. Après rasage et désinfection cutanée, l'extrémité supérieure du tibia a été abordée afin de réaliser un enclouage centro-médullaire par une broche de trois centimètres de longueur et de diamètre 15/10, recouverte d'un cathéter de polyéthylène (préalablement infusée dans un bouillon cœur cervelle (BCC) contenant la souche de SARM).

Au quatrième jour, les lapins ont été à nouveau anesthésiés. Le foyer d'ostéomyélite a été cureté et des échantillons sont prélevés. Ces échantillons d'os spongieux ont été broyés mélangés à 500 μL de sérum physiologique, et étalés à des dilutions de 10^{-2}, 10^{-4} et 10^{-6} sur des géloses de Chapman. Le dénombrement des bactéries survivantes (B1) a permis de calculer le nombre d'unités formant colonies par gramme de tissu osseux (UFC/g). La broche recouverte du cathéter a été remise en place. Les lapins ont été répartis par tirage au sort dans un des quatre groupes suivants :

- Un groupe d'ostéomyélite sans matériel avec un traitement par vancomycine 100 mg/kg/jour en deux injections intramusculaires.
- Un groupe d'ostéomyélite sans matériel traité à l'aide de microparticules chargées de vancomycine (40 mg de microparticules contenant 3,11mg de vancomycine).
- Un groupe ostéomyélite avec matériel avec un traitement par vancomycine 100 mg/kg/jour en deux injections intramusculaires.

- Un groupe d'ostéomyélite avec matériel traité à l'aide de microparticules chargées de vancomycine (40 mg de microparticules contenant 3,11mg de vancomycine).

Au quinzième jour, les lapins ont été sacrifiés par une injection intraveineuse de thiopental, des prélèvements ont été effectués dans la métaphyse supérieure.

Le tissu osseux a été pesé, puis broyé avec 500μL de sérum physiologique. Des dilutions à 10^{-2}, 10^{-4} et 10^{-6} ont ensuite été ensemencés sur géloses Triptycase Soja (TS) et Chapman afin de dénombrer les bactéries survivantes (exprimé en UFC/g de tissu) (B2) fin de traitement. La diminution du nombre de bactéries survivantes entre le quatrième et le quinzième jour $\Delta\log_{10}$ (B2-B1) a été calculée.

Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée grâce au logiciel Staview (Abacus Concepts, Berkeley, Ca). Une analyse de variance a été utilisée pour comparer les différents groupes, suivie par un test PLSD de Fischer pour les comparaisons multiples. Les résultats ont été exprimés en moyenne ± déviation standard. Une valeur de $p \leq 0,05$ était considérée comme significative.

Résultats

La vancomycine administrée par voie intramusculaire ou délivrée localement par les microparticules de poly-ε-caprolactone, au cours du traitement de l'ostéomyélite avec ou sans matériel, a permis une diminution d'au moins 3,5 log du nombre de bactéries par gramme d'os. Par contre, il n'y avait pas de différence entre le traitement par voie générale et le traitement

local pour les lapins traités pour une ostéomyélite avec matériel et pour les lapins traités pour une ostéomyélite sans matériel (tableau 10).

Groupes	B1	B2	Δlog
	log_{10} UFC/g	Moyenne ± déviation standard	
Ostéomyélite sans matériel			
Vancomycine intramusculaire (5)	6,2 ± 0.4	1,2 ± 0.2	-5 ± 0,4*
*µ*particules chargées de vancomycine (5)	5,9 ± 0,3	1,8 ± 0,3	-4,1 ± 0,3*
Témoins (5)	6,2 ± 0,5	5,6 ± 0,4	-0,6 ± 0,3
Ostéomyélite avec matériel			
Vancomycine intramusculaire (5)	5,2 ± 0,3	1,7 ± 0,2	-3,5 ± 0,2*
*µ*particules chargées de vancomycine (5)	5 ± 0,2	1,4 ± 0,2	-3,5 ± 0,2*
Témoins (5)	5,6 ± 0,7	5,4 ± 0,6	-0,1 ± 0,2

* :p<0,0001 *vs* témoins (test de Bonferroni Dunn après ANOVA).

Tableau 10 : Dénombrement bactérien au quatrième jour et au quinzième jour, respectivement B1 et B2 et diminution de la concentration bactérienne dans l'os après traitement.

Discussion

Le traitement des ostéomyélites à SARM nécessite un traitement par vancomycine intraveineuse pendant au moins 6 semaines. L'implantation de poly-ε-caprolactone chargée en vancomycine semble être une alternative séduisante si le relargage de l'antibiotique permet d'atteindre des concentrations supérieures à la CMI pendant les premières heures, et si ces concentrations peuvent être maintenues pendant plusieurs semaines. La vancomycine associée aux microparticules a montré une activité bactéricide équivalente à la vancomycine administrée par voie générale sur une souche de SARM. Le relargage de la vancomycine augmente rapidement dans les

premières heures puis se stabilise après 48 heures. Après 21 jours, 56,4% de la vancomycine a été libérée par les microparticules (résultats obtenus par HPLC) (Del Nozal [1996]). Ce relargage in situ prolongé permet une diminution importante de la dose de vancomycine utilisée (respectivement 3,11mg et 3g, pour l'administration locale et pour l'administration intramusculaire), ce qui permet de s'affranchir des effets secondaires rénaux et otologiques de l'antibiotique. Yenice [2003] a montré que l'antibiotique était présent sur le site 5 semaines après son implantation. Par contre, les microparticules de poly-ε-caprolactone sont lentement éliminées (Engelberg [1991], Hutmacher [1996], Pitt [1985]), et peuvent être présentent plus d'un an après leur implantation.

L'association d'un antibiotique à tri-phosphate de calcium, une hydroxyapatite ou un BCP permettrait théoriquement de cumuler les effets antibactériens de l'antibiotique et les effets ostéoconducteurs du vecteur.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans Antimicrobial Agents Chemotherapy

ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, July 2005, p. 3025–3027 Vol. 49, No. 7
0066-4804/05/$08.00+0 doi:10.1128/AAC.49.7.3025–3027.2005
Copyright © 2005, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

In Vitro and In Vivo Bactericidal Activities of Vancomycin Dispersed in Porous Biodegradable Poly(ε-Caprolactone) Microparticles

Anne-Marie Le Ray,[1,2] Hélène Gautier,[1,2] Marie-Katel Laty,[2] Guy Daculsi,[1] Christian Merle,[1,2] Cédric Jacqueline,[3] Antoine Hamel,[3] and Jocelyne Caillon[3]*

Centre de Recherche sur les Matériaux d'Intérêt Biologique, Equipe INSERM 99-03, UFR Odontologie,[1] Laboratoire de Pharmacie Galénique, UFR de Pharmacie, [2] and UPRES EA 3826, UFR de Médecine,[3] University of Nantes, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes, France

Received 18 October 2004/Returned for modification 15 November 2004/Accepted 23 March 2005

Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis requires a prolonged antibiotic therapy with vancomycin. Because of its weak diffusion, the in situ implantation of vancomycin could be interesting. The activity of vancomycin encapsulated in microparticles was evaluated in vitro and in vivo on rabbit osteomyelitis and showed a good activity compared to intravenous administration.

Vancomycin is used to treat methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections (2, 5, 22). Bone infections are treated by parenteral administration of vancomycin, but it does not provide high local bone concentration due to the poor vascularization of the cortical bone and the low penetration of this drug. Moreover, this antibiotic presents nephrotoxicity, ototoxicity, and poor venous tolerance. A decrease of this systemic toxicity would be resolved by directly implanting antibiotic-loaded biomaterials into the infected bone. Vancomycin cements (1, 12) have proven their efficacy in treating bone infections, but the release of vancomycin in such associations was observed over a limited time period. The interest of other devices (8, 9) lies in the prolonged in situ release of vancomycin over a period of several weeks, avoiding administration by a central catheter (27, 28, 30). We propose development of a drug delivery system (DDS) using poly(ε-caprolactone) (PCL) (11, 14, 15, 17, 33) as the biomaterial with both biodegradable (24, 25, 29) and prolonged-release properties (18) and good immune tolerance (20, 21). The aim of this study was first to check the vancomycin stability in microparticles, to evaluate the in vitro bactericidal activity of vancomycin encapsulated in such microparticles, and to compare the in vivo bactericidal activity of vancomycin incorporated into microparticles to that of vancomycin administered intravenously on a rabbit model of osteomyelitis.

Poly(ε-caprolactone) microparticles (Union Carbide SA, Rungis, France) were prepared using a simple emulsion (oil/water) technique with one gram of PCL and 250 mg of micronized vancomycin (Lilly France SA) powder. Results of laser granulometer analysis showed that microparticles with a mean diameter of 216.3 ± 66.0 μm were obtained.

Microparticles appeared as spherical particles with a riddled area resembling little craters by scanning electron microscopy.

Microparticle drug loading was indirectly detected in the external phase by vancomycin chlorhydrate dosage by UV spectrophotometer, and encapsulation efficiency was calculated. Microparticles were loaded with 49.6% ± 3.6% of vancomycin (110 mg of vancomycin per g of microparticles).

In vitro studies of vancomycin release from microparticles were controlled using a previously described dissolution test (7, 10) with 200 mg of microparticles corresponding to approximately 22.06 mg of loaded vancomycin. The amount of vancomycin released into aqueous solution was first determined by an high-performance liquid chromatography (HPLC) dosage (3). The HPLC results are expressed as the mean cumulated percentage of drug released ± standard deviation (SD) as a function of time. The second dosage method is a microbiological assay that permits estimation of the active amount of vancomycin released during the in vitro dissolution test (19). Results for vancomycin HPLC and microbiological concentrations were compared using Tukey's test.

We studied two strains: *S. aureus* ATCC 25922, susceptible to methicillin and vancomycin (MSSA), and *S. aureus* P9, resistant to methicillin but susceptible to vancomycin (MRSA). MIC of vancomycin was 1 mg/liter for both strains. Bactericidal activity was studied by producing killing curves with an inoculum of 10^7 CFU/ml and 2 mg of free vancomycin, 26 mg of vancomycin-loaded microparticles (i.e., 2.86 mg of vancomycin), and 2 mg of vancomycin added to 26 mg of unloaded microparticles. Two controls without antibiotic (one with free microparticles and one without microparticles) were performed. Bacteria counts were realized after 0, 6, 24, and 48 h.

The efficacy of vancomycin microparticles was investigated in a chronic osteomyelitis rabbit model (23). A corticotomy of the left superior tibial metaphysis was performed. A hemostatic compress impregnated with 10^7 CFU of MSSA or MRSA strain was implanted in the metaphysis. After 4 days, compresses were removed, and a surgical lavage was performed. A bacterial count (B1) in bone marrow was performed. Before treatment, the animals were randomly assigned to two groups, G1 and G2 (five animals per group). In G1, animals received an 11-day treatment with intravenous vancomycin twice a day (100 mg/kg/day), corresponding to 30 mg/kg in human. In G2, 40 mg of microparticles containing 4.4 mg of vancomycin was implanted without any further treatment for 11 days. At the end of the treatment, animals were sacrificed. A new bacterial

* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Microbiologie, EA 3826, UFR de Médecine, University of Nantes, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes, France. Phone and fax: (33) 240-412-854. E-mail: jocelyne.caillon@univ-nantes.fr.

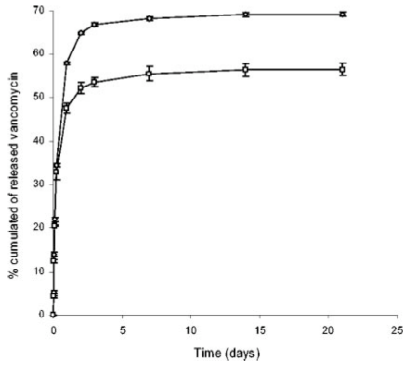


FIG. 1. Cumulated release rates of vancomycin after dissolution test. ◇, microbiological assay; □, HPLC assay. Error bars represent standard deviations.

count (B2) in bone marrow was performed. Bacteria were expressed in $\log_{10}$ CFU/mg, and the difference of $\log_{10}$ CFU/mg (B1 – B2) was calculated for each animal. The quantitative results were expressed as mean ± SD. Analysis of variance (Statview; Abacus Concepts, Berkeley, CA) was used to compare the effects of the different groups, followed by a Scheffe test.

The release rate results of vancomycin obtained from HPLC and microbiological measurements are presented in Fig. 1. Vancomycin release occurred quickly up to 48 h and then was stable ($P < 0.001$). After 21 days, 56.4% of vancomycin was released from microparticles as evaluated by HPLC and 69.3% as evaluated by the microbiological test. Vancomycin concentrations were significantly higher with microbiological assay than with HPLC assay ($P = 0.08$).

Figure 2a (MSSA) and 2b (MRSA) show that the bactericidal activity of vancomycin dispersed in beads was similar for the two strains. Unloaded MP did not exhibit any intrinsic activity against *S. aureus* strains.

The bacterial count in bone was 6 $\log_{10}$ CFU/mg before treatment. Decreases (B1 – B2) of 5.00 ± 0.5 $\log_{10}$ CFU/mg in G1 and of 4.10 ± 0.5 $\log_{10}$ CFU/mg in G2 were observed after treatment. The implantation of vancomycin dispersed in microparticles allowed significant killing in vivo after 11 days, and no difference between the two groups was observed ($P < 0.05$).

Treatment of MRSA osteomyelitis always requires a prolonged antibiotic therapy at least 6 weeks with vancomycin. The in situ implantation of antibiotic DDS could be a good option (18, 26) if the released vancomycin concentration is superior to the MIC during the first hours and can be maintained for several weeks. Vancomycin dispersed in microparticles showed a good bactericidal activity on the two strains, similar to that obtained with intravenous vancomycin or vancomycin added to unloaded microparticles.

This prolonged-release formulation allowed great reduction of the administered vancomycin dose and would limit the systemic administration and the renal toxicity. The in vivo test was performed during 11 days. Yenice et al. showed an antibiotic

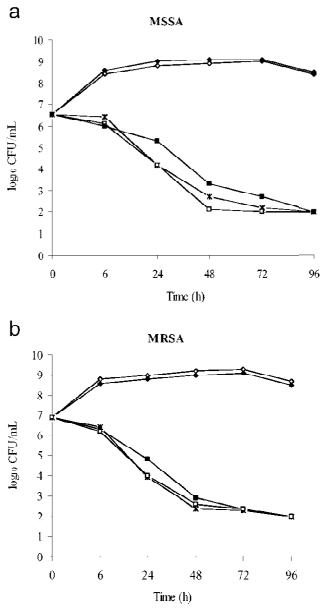


FIG. 2. Bactericidal activity of vancomycin alone and dispersed in microparticles. ◇, control; ♦, control plus unloaded MP; 218, loaded MP; ■, vancomycin plus unloaded MP; □, vancomycin.

presence throughout 5 weeks in synovial sample (32). Nevertheless, it will be necessary to check the in vivo biodegradation of the poly(ε-caprolactone), as this polymer has a very slow degradation rate (6, 13, 24, 25) and could remain in the implantation site for a period greater than 1 year.

We plan in the future to associate these vancomycin microparticles to biphasic calcium phosphate granules (16) dispersed in a gel to form an injectable bone substitute (4, 31) to combine osteoconduction properties and therapeutic effects.

This study demonstrates the stability of vancomycin dispersed in poly(ε-caprolactone) microparticles and suggests that this DDS is a suitable vehicle for the delivery of high local concentrations of vancomycin in an implantation site. Vancomycin biodegradable microparticles could be used in implantation sites to avoid systemic side effects.

REFERENCES

1. **Argenson, J. N.** 1993. Etude de l'association vancomycine-tobramycine et ciment orthopédique (diffusion, propriétés mécaniques, efficacité). Ph.D thesis. UFR de Medecine, University of Marseille, Marseille, France.
2. **Benoit, M. A., B. Mousset, C. Delloye, R. Bouillet, and J. Gillard.** 1997. 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. **21:**403–408.
3. **Del Nozal, M. J., J. L. Bernal, A. Pampliega, P. Marinero, M. L. Lopez, and R. Coco.** 1996. High-performance liquid chromatographic determination of vancomycin in rabbit serum, vitreous and aqueous humour after intravitreal injection of the drug. J. Chromatogr. **727:**231–238.
4. **Dupraz, A., T. P. Nguyen, M. Richard, J. Delecrin, and G. Daculsi.** 1996. Microcharacterization of a new injectable polymer/ceramic composite as bone substitute in spine surgery. J. Mater. Sci. Mater. Med. **7:**52–55.

5. **El Kouri, D., F. Le Gallou, A. Kenzi, D. Trewick, D. Baron, and G. Potel.** 1998. Thérapeutique des infections à staphylocoques. Encycl. Med. Chir. **10:**1–7.
6. **Engelberg, I., and J. Kohn.** 1991. Physico-mechanical properties of degradable polymers using in medical applications: a comparative study. Biomaterials **12:**292–304.
7. **Gautier, H., J. Caillon, A. M. Le Ray, G. Daculsi, and C. Merle.** 2000. Influence of isostatic compression on the stability of vancomycin loaded with a calcium phosphate implantable drug delivery device. J. Biomed. Mater. Res. **52:**308–314.
8. **Gautier, H., G. Daculsi, and C. Merle.** 2001. Association of vancomycin and calcium phosphate by dynamic compaction: in vitro characterization and microbiological activity. Biomaterials **22:**2481–2487.
9. **Gautier, H., C. Merle, J. L. Auget, and G. Daculsi.** 2000. Isostatic compression, a new process for incorporating vancomycin into biphasic calcium phosphate: comparison with a classical method. Biomaterials **21:**243–249.
10. **Guicheux, J., G. Grimandi, M. Trécant, A. Faivre, S. Takahashi, and G. Daculsi.** 1997. Apatite as carrier for growth hormone: in vitro characterization of loading and release. J. Biomed. Mater. Res. **34:**165–170.
11. **Guzman, M., J. Molpeceres, F. Garcia, and M. R. Aberturas.** 1996. Preparation, characterization and in vitro drug release of poly-ε-caprolactone and hydroxypropylmethylcellulose phtalate ketoprophen loaded microspheres. J. Microencapsulation **13:**25–39.
12. **Hamanishi, C., K. Kitamoto, S. Tanaka, M. Otsuka, Y. Doi, and T. Kitahashi.** 1996. A self-setting TTCP-DCPD apatite cement for release of vancomycin. J. Biomed. Mater. Res. **33:**139–143.
13. **Hutmacher, D.** 1996. A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for GTR and GBR applications. Int. J. Oral Maxillofac. Implants **11:**667–678.
14. **Iooss, P., A. M. Le Ray, G. Grimandi, G. Daculsi, and C. Merle.** 2001. A new injectable bone substitute combining poly(ε-caprolactone) microparticles with biphasic calcium phosphate granules. Biomaterials **22:**2785–2794.
15. **Jameela S. R., N. Suma, and A. Jayakrishnan.** 1997. Protein release from poly(ε-caprolactone) microspheres prepared by melt encapsulation and solvent evaporation techniques: a comparative study. J. Biomater. Sci. **8:**457–466.
16. **Jarcho, M.** 1981. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. Clin. Orthop. Relat. Res. **157:**259–278.
17. **Le Ray, A. M., S. Chiffoleau, P. Iooss, G. Grimandi, A. Gouyette, G. Daculsi, and C. Merle.** 2003. Vancomycin encapsulation in biodegradable poly(ε-caprolactone) microparticles for bone implantation. Influence of the formulation process on size, drug loading, in vitro release and cytocompatibility. Biomaterials **24:**443–449.
18. **Liu, S. J., S. Wen-Neng Ueng, S. S. Lin, and E. C. Chan.** 2002. In vivo release of vancomycin from biodegradable beads. J. Biomed. Mater. Res. **63:**807–813.
19. **Lorian, V.** 1991. Laboratory methods used to assess the activity of antimicrobial combinations, p. 434–444. *In* V. Lorian (ed.), Antibiotics in laboratory medicine, 3rd ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md.
20. **Lowry, K. J., K. R. Hamson, L. Bear, Y. B. Peng, R. Calaluce, M. L. Evans, J. O. Anglen, and W. C. Allen.** 1997. Polycaprolactone/glass bioabsorbable implant in a rabbit humerus fracture model. J. Biomed. Mater. Res. **36:**536–541.
21. **Menei, P., A. Croué, V. Daniel, A. Pouplard-Barthelaix, and J. P. Benoît.** 1994. Fate and biocompatibility of three types of microspheres implanted into the brain. J. Biomed. Mater. Res. **28:**1079–1085.
22. **Nicas T. I., and R. D. G. Cooper.** 1997. Vancomycin and other glycopeptides, p. 363–392. *In*: W. R. Strohl (ed.), Biotechnology of antibiotics, 2nd ed. Marcel Dekker Inc., New York, N.Y.
23. **Norden, C. W.** 1970. Experimental osteomyelitis I: a description of the model. J. Infect. Dis. **122:**410–418.
24. **Pitt, C. G., F. I. Chasalow, Y. M. Hibionada, D. M. Klimas, and A. Schindler.** 1981. Aliphatic polyesters. I. The degradation of poly(ε-caprolactone) in vivo. J. Appl. Polym. Sci. **26:**3779–3787.
25. **Pitt, C. G., M. M. Gratzl, G. L. Kimmel, J. Surles, and A. Schindler.** 1981. Aliphatic polyesters. II. The degradation of poly (DL-lactide), poly(ε-caprolactone), and their copolymers in vivo. Biomaterials **2:**215–220.
26. **Saito, T., R. Takeuchi, K. Hirakawa, N. Nagata, T. Yoshida, T. Koshino, K. Okuda, M. Takema, and T. Hori.** 2002. Slow-releasing potential of vancomycin-loaded porous hydroxyapatite blocks implanted into MRSA osteomyelitis. J. Biomed. Mater. Res. **63:**245–251.
27. **Scott, D. M., J. C. Rotschafer, and F. Behrens.** 1988. Use of vancomycin and tobramycin polymethylmethacrylate impregnated beads in the management of chronic osteomyelitis. Drug Intell. Clin. Pharm. **22:**480–483.
28. **Shirtliff, M. E., J. H. Calhoun, and J. T. Mader.** 2002. Experimental osteomyelitis treatment with antibiotic impregnated hydroxyapatite. Clin. Orthop. **401:**239–247.
29. **Thies, C.** 1981. Biodegradable polymers for parenteral administration. Int. J. Pharm. Technol. Prod. **2:**25–32.
30. **Thomazeau, H., and F. Langlais.** 1996. Relargage d'antibiotiques par implantation osseuse de phosphate tricalcique: Pharmacocinétique in vitro et in vivo de formes galéniques différentes. Chirurgie **121:**663–666.
31. **Weiss, P., O. Gauthier, J. M. Bouler, G. Grimandi, and G. Daculsi.** 1999. Injectable bone substitute using a hydrophilic polymer. Bone **25**(Suppl. 2)**:** 67S–70S.
32. **Yenice, I., S. Calis, B. Atilla, H. S. Kas, M. Ozalp, M. Ekizoglu, H. Ilgili, and A. A. Hincal.** 2003. In vitro and in vivo evaluation of the efficiency of teicoplanin-loaded biodegradable microparticles formulated for implantation to infected bone defects. J. Microencapsul. **20:**705–717.
33. **Youan, B. B. C., M. A. Benoit, B. Baras, G. Riveau, and J. Gillard.** 1997. Poly(ε-caprolactone) microparticles containing muramyl dipeptide for oral controlled release of adjuvant. J. Control. Release **48:**339.

Evaluation expérimentale de traitements adjuvants à l’antibiothérapie

Rôle de l'Immobilisation Plâtrée dans le Traitement d'un Modèle d'Arthrite à *Staphylococcus aureus* chez le Lapin.

Introduction

Les infections ostéo-articulaires à *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline sont fréquentes chez l'enfant. Thomas Smith cité par Wilson [1986] a été le premier à rapporter son expérience de 21 cas, dans la littérature, en 1874. La mortalité dans la série de cet auteur dépassait les 50%. L'avènement de l'antibiothérapie a bien sûr amélioré le pronostic vital, cependant les infections ostéo-articulaires exposent à de graves séquelles, le diagnostic et le traitement sont donc une véritable urgence.

Il est classique d'associer au traitement antibiotique (le plus souvent l'oxacilline associée ou non à un autre antistaphylococcique), une immobilisation plâtrée comprenant l'articulation sus et sous-jacente, dont la durée varie elle aussi en fonction des équipes, de quelques jours à six semaines (Barton [1987], Glorion [1993, 1994], Jackson [1982], Norris [1983]). L'immobilisation était justifiée, avant l'avènement des antibiotiques, car elle assurait une ankylose articulaire en bonne position. Actuellement elle est justifiée pour ses vertus antalgiques et anti-inflammatoires.

Cependant, depuis 1960 quelques études expérimentales et cliniques ont prouvé le caractère délétère de l'immobilisation, sur le cartilage, dans différentes pathologies articulaires (Enneking [1972], Salter [1972, 1981, 1989]) : arthrites septiques, arthrites inflammatoires, mais aussi au décours des traumatismes articulaires. Salter [1981] fut le premier à évaluer le rôle de l'immobilisation dans le traitement d'un modèle d'arthrite septique. Les animaux utilisés pour cette étude étaient des lapins New-Zealand en fin de croissance.

Le germe utilisé pour créer l'infection était un *Staphylococcus aureus* sensible à la pénicilline. Les souches de *Staphylococcus aureus* sensibles à la pénicilline sont exceptionnellement rencontrées en pratique clinique.

Notre hypothèse principale est que l'immobilisation n'améliore pas l'efficacité du traitement antibiotique. Notre seconde hypothèse est que l'immobilisation, au cours d'une arthrite septique expérimentale à *Staphylococcus aureus*, aggrave les lésions cartilagineuses

Après avoir montré la reproductibilité du modèle d'arthrite à *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline chez le lapin en croissance, nous avons tenté de vérifier ces deux hypothèses.

Matériels et Méthodes

Choix du germe.

Nous avons utilisé une souche de *Staphylococcus aureus* (figure 10) isolée dans le liquide articulaire d'une enfant de 12 ans. Il s'agit d'une souche sensible à la méticilline. La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) est de 1mg/L, et la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) de 2 mg/L pour l'oxacilline.

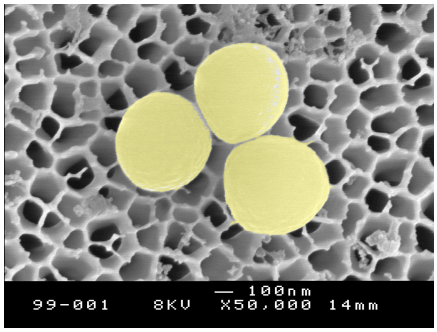


Figure 10 : colonie de *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline

Choix du modèle expérimental.

Nous avons choisi d'utiliser un modèle, dérivé du modèle de Salter [1981], nous permettant de nous rapprocher le plus possible de l'arthrite hématogène à *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline de l'enfant. Par

contre, nous utilisons des lapins plus jeunes, dont le potentiel de croissance est important. Il s'agit de lapins femelles New Zealand dont le poids est compris entre 1,5 et 2 kg.

Déroulement de l'expérimentation

Au jour **J0** : Sous anesthésie générale (par de la kétamine IM, 15 mg/kg), le genou droit a été rasé. Après désinfection cutanée par de la polyvidone iodée, 1 ml d'une suspension bactérienne de *Staphylococcus aureus* à 10^8 UFC/mL a été injecté dans la cavité articulaire du genou par voie para-patellaire externe.

24 heures plus tard **J1** : Sous anesthésie générale, une arthrotomie para-patellaire externe a été réalisée. L'aspect intra-articulaire (le type d'épanchement, l'aspect du cartilage articulaire, et l'aspect du cartilage de croissance) a été noté.

Le liquide intra-articulaire a été prélevé. Un lavage articulaire par 250 ml de sérum physiologique a été réalisé. L'articulation a été fermée par un point de fil nylon dec 1.5 , ainsi que la peau par un surjet.

Après tirage au sort, les animaux ont été répartis en quatre groupes :

- groupe 1 : les animaux ont reçu de l'oxacilline 50 mg/Kg intra-musculaire trois fois par jour, pendant 21 jours,
- groupe 2 : les animaux ont reçu de l'oxacilline 50 mg/Kg intra-musculaire trois fois par jour, associée à une immobilisation par un plâtre « pelvi-pédieux », pendant 21 jours,
- groupe 3 : les animaux n'ont pas reçu pas de traitement complémentaire au lavage articulaire,
- groupe 4 : les animaux ont été immobilisés par un plâtre « pelvi-pédieux », pendant 21 jours.

Trois semaines plus tard **J21** : l'euthanasie a été pratiquée par une injection intra-veineuse, à dose létale (100 mg), de thiopental

Les deux genoux de chaque animal ont été radiographiés de profil.

Des prélèvements à visée bactériologique et histologique ont été effectués au niveau de chaque genou infecté.

Critères de jugement.

Critères cliniques

Le poids a été mesuré à J1, J7, J14, et J21. La perte de poids a été calculée chaque semaine (Poids J1 - Poids Jx).

L'état cutané a été évalué à J1, J7, J14 et J21, pour les lapins non plâtrés et à J1, et J21 pour les autres. Le score permettant l'évaluation s'étendait de 0 à 3 (0 normal, 1 tuméfaction et/ou inflammation discrète, 2 tuméfaction et/ou inflammation modérée , 3 tuméfaction et inflammation nettes) (Bremell [1999]).

La fonction a été évaluée à J1, J7, J14 et J21. Une fonction normale était cotée 0. Une boiterie était cotée 1. L'impotence fonctionnelle totale, c'est à dire une esquive de l'appui, était cotée 2.

A J1 et à J21, l'aspect intra-articulaire a été noté. L'aspect du cartilage est coté de 0 à 4. Les quatre critères ont été additionnés afin d'obtenir un score macroscopique à J1 et à J21 (de 0 à 9).

- type d'épanchement :
    - •0 : pas d'épanchement
    - •1 : épanchement séro-sanglant
    - •2 : épanchement purulent,
- l'aspect du cartilage articulaire :
    - •0 : normal
    - •1 : dépoli
    - •2 : rouge
    - •3 : défect,
    - •4 : nécrose complète
- l'aspect des parties molles :
    - •0 : normal
    - •1 : abcès des parties molles,
- l'aspect du cartilage de croissance :
    - •0 : normal
    - •1 : décollement partiel
    - •2 : décollement complet,

Critères radiologiques

Au 21ème jour de traitement, des radiographies des deux genoux de profil ont été réalisées (au Potter, 50 KV, 5 mAs, 7ms). Ces radiographies ont été lues en aveugle afin d'établir un score, somme de quatre critères. Les trois premiers critères ont été cotés de 0 à 2 ; le dernier, l'ostéolyse, afin de lui donner plus de poids dans le calcul, a été cotée de 0 à 3. Les quatre critères ont été additionnés pour obtenir un score radiologique (de 0 à 9)

- l'aspect du cartilage de croissance fémoral inférieur :
  - •0 : normal
  - •1 : décollement inférieur à 50% de la surface
  - •2 : décollement supérieur à 50 % de la surface,
- l'aspect de l'interligne articulaire :
  - •0 : normale
  - •1 : élargie
  - •2 : pincée,
- la condensation de l'os sous-chondral :
  - •0 : absence de condensation
  - •1 : condensation inférieure à 50 % de la surface
  - •2 : condensation supérieure à 50 % de la surface,
- la présence d'une ostéolyse :
  - •0 : absence d'ostéolyse
  - •1 : 1 à 2 géodes
  - •2 : plus de 2 géodes
  - •3 : ostéolyse majeure.

Critères bactériologiques

Un dénombrement des bactéries a été réalisé, dans le liquide articulaire. Les prélèvements de liquide articulaire effectués à J1 et J21, ont été pesés et mélangés à 200 μl de sérum physiologique. La solution obtenue a été ensuite ensemencée pure et diluée à 10^{-2}, 10^{-4}, et 10^{-6} sur une gélose Chapman, à l'aide d'un ensemenceur Spiral (INTERSCIENCE®).

Un antibiogramme sur la souche *de Staphylococcus aureus* exposée à 21 jours de traitement par l'oxacilline (groupes 1 et 2) a été réalisé. En cas de culture positive, afin de s'assurer de l'absence de surinfection et de modification de sensibilité de la souche.

Groupe contrôle.

Afin de contrôler la validité du modèle, huit lapins ont été infectés à J0 sous anesthésie générale par une injection intra-articulaire de 1mL d'une suspension de *Staphylococcus aureus* à 10^8 UFC/mL. Deux animaux ont été sacrifiés à J1, J7, J14 et J21. Le même protocole d'analyse radiographique, bactériologique et histologique a été mis en œuvre.

Critères d'inclusion.

Seuls les lapins, ayant reçu 21 jours de traitement, ont été inclus dans les résultats. Une mortalité d'environ 50 % a été observée dans les deux groupes traités par l'oxacilline. Les lapins de ces groupes souffraient d'une diarrhée, accompagnée d'une déshydratation et d'une perte de poids pouvant atteindre 47 % du poids initial. La mortalité n'était en revanche que de 11 % dans les deux groupes sans antibiotique ; c'est à dire dans le groupe "sans traitement complémentaire", et dans le groupe "plâtre"). Cependant, il n'existait pas de différence significative de mortalité entre les différents groupes, (test du chi2, p=0,0661). Les lapins sont décédés d'une probable déshydratation après une à deux semaines de diarrhée. La perte de poids finale, par rapport au poids initial, des lapins décédés était de 35,5 ± 5,2 %.

Afin de comprendre cette surmortalité dans les deux groupes "oxacilline" et "oxacilline + plâtre", nous avons traité quatre lapins par oxacilline à la même dose, et avec le même rythme d'administration, que dans le protocole. Deux de ces quatre lapins sont décédés au cours des deux premières semaines de déshydratation, après une perte de poids respectivement de 36 et de 41 %. A l'autopsie, il existait des lésions coliques de type inflammatoire. Ceci a permis d'évoquer une hypothèse toxique expliquant les décès sous oxacilline.

Analyse statistique

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type, et comparés en utilisant de façon appropriée des tests paramétriques (ANOVA et test de Bonferroni-Dunn) et non paramétriques (test de Kruskal-Wallis, et test de Mann et Whitney). Un $p<0,05$ était considéré comme significatif.

Résultats

Paramètres cliniques.

Evolution du poids.

Le poids des lapins des quatre groupes a été mesuré chaque semaine. Il n'existe pas de différence significative de poids entre les lapins des quatre différents groupes, à J0 (test de Bonferonni après ANOVA)(tableau 10).
Le poids des lapins a progressivement diminué, au cours des deux premières semaines de traitement. Le poids s'est ensuite stabilisé, certains lapins ont même repris du poids, sans jamais retrouver leur poids initial.

	Poids (kg) (moyenne ± écart type)			
Groupe (nb de lapins)	J1	J7	J14	J21
Groupe 1 (6)	1,84 ± 0,20	1,61 ± 0,20	1,58 ± 0,22	1,72 ± 0,22
Groupe 2 (6)	1,88 ± 0,17	1,59 ± 0,17	1,63 ± 0,17	1,60 ± 0,34
Groupe 3 (8)	1,88 ± 0,11	1,66 ± 0,15	1,67 ± 0,14	1,72 ± 0,16
Groupe 4 (8)	1,82 ± 0,11	1,56 ± 0,10	1,53 ± 0,12	1,57 ± 0,09

Tableau 10 : évolution du poids

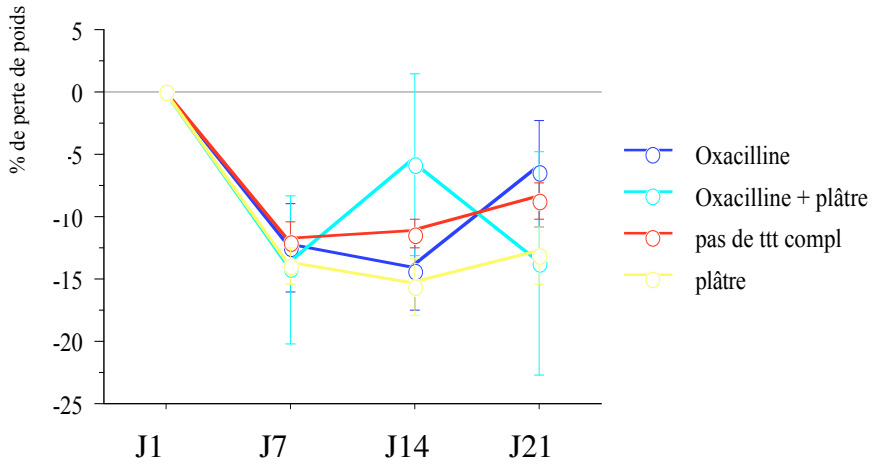


Figure 11: évolution de la perte de poids (en %) au cours du traitement

La perte de poids moyenne atteignait, au maximum, 16,2 %, au quatorzième jour (de 11,4 % pour le groupe 3, à 24,4 % pour le groupe 2).

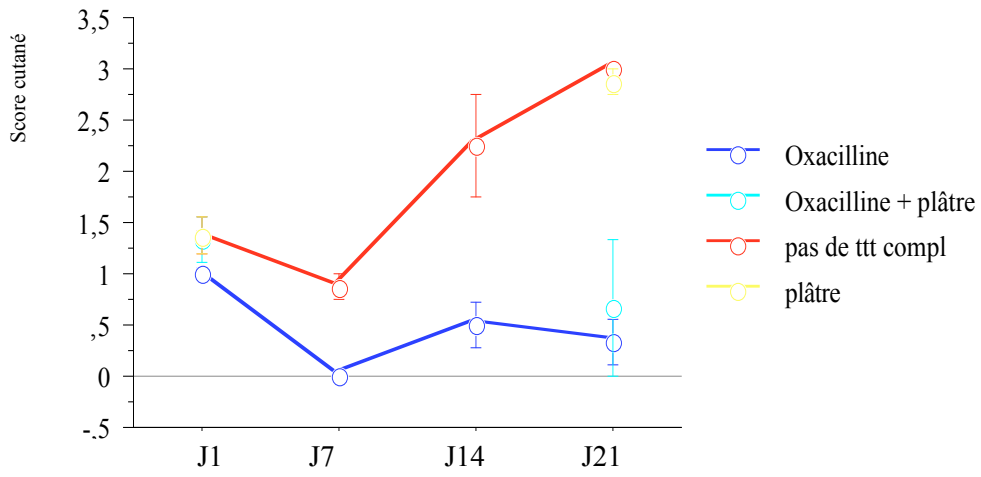
Cependant, il n'y avait pas de différence significative entre les pertes de poids des quatre groupes à J7 (p=0,9455), à J14 (p=0,2912) et à J21 (p=0,6419) (figure 11).

Evolution de l'état cutané

A 24 heures de l'injection intra-articulaire de *Staphylococcus aureus*, les signes cutanés étaient le plus souvent discrets. Il n'existait pas de différence significative entre les quatre différents groupes, après le test de Kruskal-Wallis (p=0,9074) (figure 12).

Aux septième et quatorzième jours, seuls les deux groupes non plâtrés (groupe 1= "oxacilline" et groupe 3 = "sans traitement complémentaire") étaient évaluables sur le plan cutané. Ces deux groupes ont été comparés à l'aide d'un test de Mann et Whitney. Il existait une différence significative entre ces deux groupes aux septième et quatorzième jours (à J7 p=0,0067, à J14 p=0,0389).

A 21 jours de traitement, après ablation des plâtres, la différence est significative respectivement entre les différents groupes traités par oxacilline et



IFigure 12: évolution de l'état cutané

es groupes sans antibiotique (p<0,0024). Mais il n'y a pas de différence significative entre le groupe traité par oxacilline et le groupe traité par oxacilline et plâtre, d'une part, et les groupes sans antibiotique, d'autre part (p>0,5218).

Evolution de la fonction.

A J1, il n'y avait pas de différence entre les quatre groupes (p=0,6783). Ensuite, seuls les deux groupes non immobilisés ont pu être comparés (figure 13).

A J7, les scores de fonction étaient identiques (p>0,9999) dans le groupe "oxacilline" et dans le groupe "sans traitement complémentaire".

A J14, il n'existait pas de différence significative de fonction entre le groupe "oxacilline" et dans le groupe "sans traitement complémentaire" (p=0,2453).

A la fin du traitement, les lapins du groupe "sans traitement complémentaire" ont tous une impotence fonctionnelle totale, alors que la moyenne des scores de fonction du groupe "oxacilline" est significativement meilleure(p=0,0098).

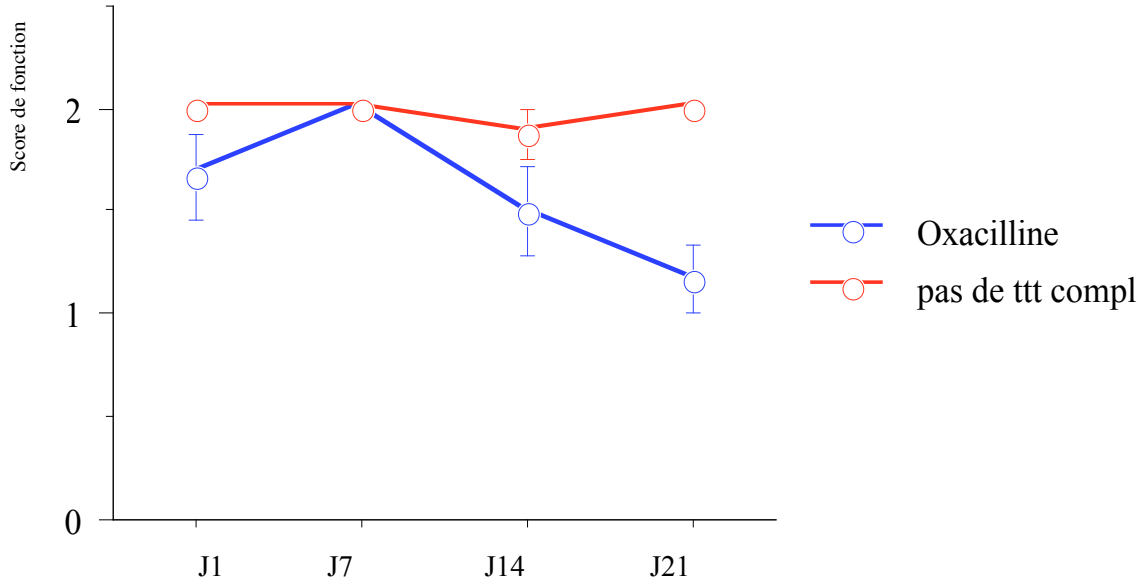


Figure 13 : évolution de la fonction des groupes non immobilisés

Constatations macroscopiques

Des constatations macroscopiques concernant le cartilage articulaire, le cartilage de croissance fémoral inférieur, l'épanchement intra-articulaire, et les parties molles, ont été notées, lors de l'arthrotomie initiale à J1, et lors de l'autopsie. La somme de ces quatre critères correspond aux scores macroscopiques à J1 et à J21(figure 14, tableau 12).

Alors qu'à J1, le score macroscopique n'est pas significativement différent entre les quatre groupes (test de Kruskal-Wallis, p=0,4949), par contre, à J21, il existe une différence significative entre les groupes (test de Kruskal-Wallis, p=0,0007). Un test de Kruskal-Wallis a été réalisé pour chacun des quatre critères .

Les scores macroscopiques à J21 des groupes "oxacilline" et "oxacilline + plâtre" étaient significativement meilleurs que ceux des groupes "plâtre" et "sans traitement complémentaire" (test de Mann et Whitney, p≤0,0142). Les lésions macroscopiques du cartilage articulaire et des parties molles étaient significativement moins importantes dans le groupe "oxacilline" que dans les groupes "plâtre" et "sans traitement complémentaire" (test de Mann et Whitney, p≤0,0389).

Les lésions des parties molles étaient significativement moins importantes dans le groupe “oxacilline + plâtre“ que dans les groupes “plâtre“ et “sans traitement complémentaire“ (test de Mann et Whitney, p=0,0098). Les lésions du cartilage articulaire étaient significativement moins importantes dans le groupe “oxacilline + plâtre“ que dans le groupe “sans traitement complémentaire“ (test de Mann et Whitney, p=0,0454)

L’immobilisation n’a jamais fait la preuve de son intérêt pour limiter les lésions macroscopiques intra-articulaires.

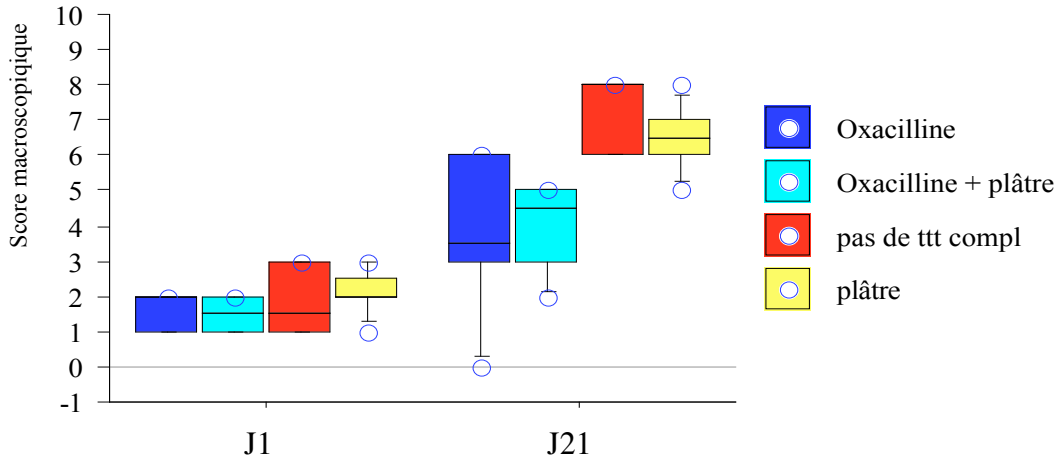


Figure 14 : évolution des scores macroscopiques au début et en fin de traitement

	Constatations macroscopiques à J21 (moyenne ± écart type)				
Groupe (nb de lapins)	**Cartilage articulaire**	**Epanchement intra-articulaire**	**Parties molles**	**Cartilage de croissance**	**Score macroscopique**
Groupe 1(6)	**1,7 ± 1,2 [a]**	**1,5 ± 1,8**	**0,3 ± 0,5 [a]**	**0,2 ± 0,4**	**3,7 ± 2,3 [a]**
Groupe 2(6)	**2,3 ± 1,2 [c]**	**1 ± 0,6**	**0,2 ± 0,4 [b,c]**	**0,5 ± 0,5**	**4 ± 1,3 [b,c]**
Groupe 3(8)	**3,6 ± 0,5**	**1,6 ± 0,5**	**1 ± 0,0**	**1 ± 0,0**	**7,2 ± 1**
Groupe 4(8)	**3,1 ± 1**	**1,6 ± 0,5**	**1 ± 0,0**	**0,8 ± 0,5**	**6,5 ± 0,9**

a : *vs* groupes 3 et 4 (test de Mann et Whitney, p≤0,0389). b : *vs* groupe 4 (test de Mann et Whitney, p≤0,0098). c : *vs* groupe 3 (test de Mann et Whitney, p≤0,00454).

Tableau 12: score macroscopique en fin de traitement.

Paramètres paracliniques.

Bactériologie

Pour chaque lapin, un dénombrement bactérien a été effectué dans le liquide articulaire, à J1 et à J21. La limite de sensibilité de la méthode est de 20 UFC / mL. La diminution de la charge bactérienne intra-articulaire, exprimée en $\Delta\log_{10}$, après 21 jours de traitement a été calculée (figure 15).

Tous les lapins traités par oxacilline étaient “stérilisés“ après 21 jours de traitement. Dans les groupes “sans traitement complémentaire“ et “plâtre“, la quantité de pus intra-articulaire avait considérablement augmenté, mais la concentration de *Staphylococcus aureus* dans le pus était en moyenne restée stable.

Il n’y avait pas de différence de dénombrement bactérien entre les deux groupes traités par oxacilline. De même, il n’y avait pas de différence significative de concentration intra-articulaire entre les deux groupes sans antibiotiques.

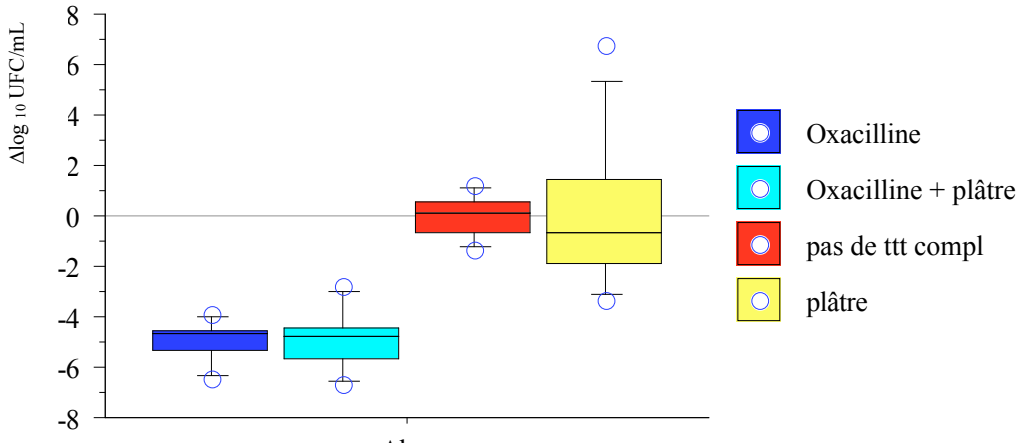


Figure 15 : diminution de la charge bactérienne intra-articulaire après 21 jours de traitement, en Δlog UFC/mL

Radiologie

L'analyse des radiographies de profil des genoux (photos 2 à 5) a permis de calculer un score radiologique (figure 16, tableau 13), en fonction des critères définis. Un test de Kruskal-Wallis a été réalisé pour comparer le score radiologique ainsi que les quatre critères séparément.

Le test de Kruskal-Wallis était significatif pour le score radiologique (p=0,0005). Il l'était également pour les critères radiologiques étudiés séparément à l'exception de l'aspect du cartilage de croissance fémoral inférieur.

Un test de Mann et Whitney a donc été effectué afin de comparer le score radiologique, la taille de l'interligne articulaire, la condensation de l'os sous-chondral et l'ostéolyse pour les groupes pris deux à deux.

Le score radiologique était significativement plus élevé dans le groupe "oxacilline + plâtre" que dans le groupe "oxacilline"(test de Mann et Whitney, p=0,0250). L'ostéolyse et la condensation de l'os sous-chondral étaient significativement plus importantes dans le groupe "oxacilline + plâtre" que dans le groupe "oxacilline" (test de Mann et Whitney, p≤0,0306).

Le score radiologique était significativement moins élevé dans le groupe "oxacilline" que dans le groupe "plâtre" et que dans le groupe "sans traitement complémentaire" (test de Mann et Whitney, p=0,0019). L'ostéolyse, la condensation de l'os sous-chondral et le pincement de l'interligne articulaire étaient significativement moins marqués dans le groupe "oxacilline" que dans le groupe " plâtre " et que dans le groupe " sans traitement complémentaire"(test de Mann et Whitney, p≤0,030).

Le score radiologique était significativement moins élevé dans le groupe "oxacilline + plâtre" que dans le groupe "plâtre" (test de Mann et Whitney, p=0,0282).

Le score radiologique était significativement plus élevé dans le groupe "sans traitement complémentaire" que dans le groupe " oxacilline + plâtre" (test de Mann et Whitney, p=0,0067). L'ostéolyse et la condensation de l'os sous-chondral étaient significativement plus marquées dans le groupe "sans traitement complémentaire" que dans le groupe "oxacilline + plâtre " (test de Mann et Whitney, p=0,0389).

L'immobilisation semble avoir aggravé les lésions radiologiques (en particulier la condensation de l'os sous-chondral et l'ostéolyse) au cours du traitement.

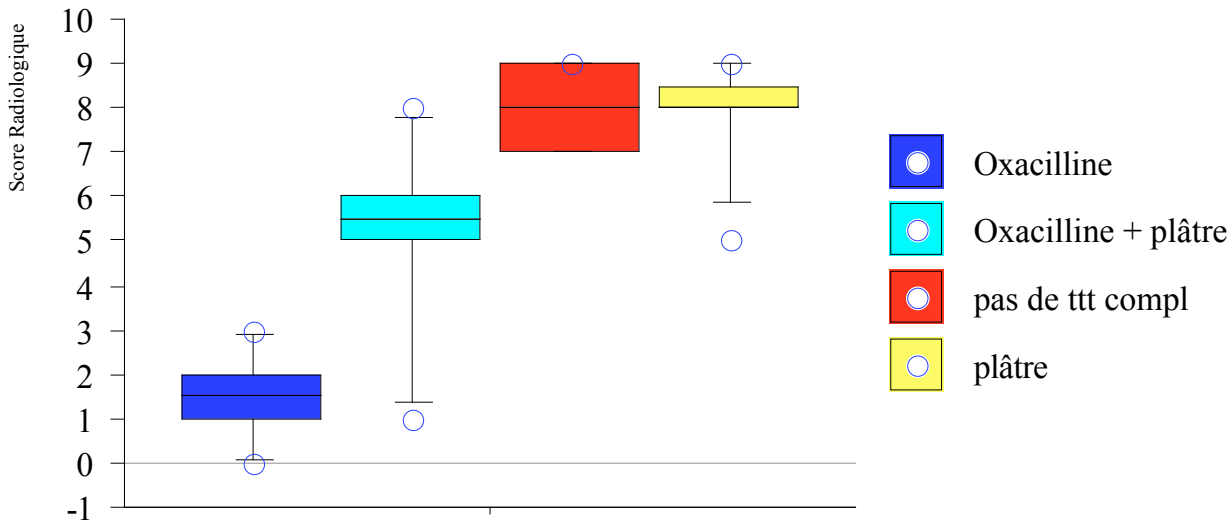


Figure 16 : score radiologique

	Score radiologique à J21 (moyenne ± écart type)				
Groupe (nb de lapins)	**Cartilage de croissance**	**Interligne articulaire**	**Condensation de l'os sous-chondral**	**Ostéolyse**	**Score radiologique**
Groupe 1(6)	**0,7 ± 0,5**	**0,3 ± 0,5**	**0 ± 0,0[a]**	**0,5 ± 0,5[a]**	**1,5 ± 1[a]**
Groupe 2(6)	**1 ± 0,0**	**1,2 ± 0,8**	**1,2 ± 0,8[b]**	**2 ± 1,1[b]**	**5,3 ± 2,3[b,c]**
Groupe 3(8)	**1,5 ± 0,5**	**1,8 ± 0,5**	**2 ± 0,0**	**3 ± 0,0**	**8,2 ± 0,9**
Groupe 4(8)	**1,2 ± 0,5**	**1,9 ± 0,4**	**1,9 ± 0,4**	**2,9 ± 0,4**	**7,9 ± 1,2**

a : *vs* groupes 2, 3 et 4 (test de Mann et Whitney, p≤0,0306). b : *vs* groupe 3 (test de Mann et Whitney, p≤0,0389). c : *vs* groupe 4 (test de Mann et Whitney, p=0,0282).

Tableau 13 : Score Radiologique en fin de traitement.

Discussion

Le choix du germe.

Afin de se rapprocher le plus de la pathologie pédiatrique, nous avons choisi d'utiliser, pour provoquer une arthrite septique, une souche de *Staphylococcus aureus*, sensible à la méticilline et résistante à la pénicilline G. Ce germe a été isolé dans un liquide articulaire d'une jeune fille de 12 ans souffrant d'une arthrite de genou. *Staphylococcus aureus* est un des germes le plus souvent responsable d'arthrite chez l'enfant de plus de deux ans.

Les modèles animaux d'arthrites septiques.

Nous avons choisi d'utiliser le modèle d'arthrite septique chez le lapin, en utilisant un fort inoculum intra-articulaire(10^8 UFC). Ce modèle nous a permis de réaliser simplement un lavage articulaire et une immobilisation. De plus, ce modèle a eu l'avantage d'être très reproductible et d'être peu coûteux.

Le lavage articulaire a été réalisé dès la vingt-quatrième heure, afin de ne pas laisser évoluer les lésions cartilagineuses. Ce délai de 24 heures est souvent retrouvé, en clinique, entre le début des signes cliniques et le lavage articulaire.

Le traitement des infections articulaires nécessite d'être prolongé (au-delà de quinze jours), malheureusement le lapin s'avère être particulièrement sensible à l'antibiothérapie au-delà d'une semaine. Dans notre série, la mortalité atteignait 50%, dans les groupes traités par l'oxacilline. Cette surmortalité a déjà été rapportée par Crémieux [1997] par diarrhée et par colite pseudo-membraneuse, chez le lapin après antibiothérapie prolongée.

L'immobilisation au cours des pathologies articulaires

Depuis le dix-huitième siècle il était établi que toute affection articulaire devait être immobilisée. Waring cité par Crenshaw [1971], rappelait que l'immobilisation était aussi importante que le traitement antibiotique, dans la prise en charge des arthrites septiques. Mais aucune expérimentation n'a évalué le rôle de l'immobilisation sur le plan bactériologique Dans notre série, les résultats bactériologiques étaient similaires entre les deux groupes traités par l'oxacilline, avec ou sans immobilisation. L'efficacité du traitement antibiotique n'a donc pas été influencée par l'immobilisation.

Les premières publications expérimentales concernant les effets de l'immobilisation sur les surfaces cartilagineuses datent du début des années 60 (Enneking [1972], Salter [1972, 1981, 1989]). En 1972, Enneking [1972] a réalisé une étude histologique de dix genoux d'adultes immobilisés par des dispositifs externes pendant plusieurs mois. Les résultats obtenus ont été comparés aux données expérimentales chez l'animal. Il s'est avéré qu'il existait une corrélation entre les lésions observées chez ses patients et chez l'animal. Initialement, au cours de l'immobilisation, un tissu fibro-adipeux apparaissait dans l'espace articulaire. Microscopiquement, l'interface entre le cartilage et le tissu de comblement était nette. Mais, plus tard l'interface était remplacée par du tissu conjonctif mature. Lorsque les surfaces articulaires étaient en contact, il était noté l'apparition de kystes intra-cartilagineux, puis d'une nécrose cartilagineuse, puis d'une invasion de l'os sous-chondral par du tissu mésenchymateux provenant des espaces médullaires. Si la durée d'immobilisation se prolongeait, les surfaces cartilagineuses disparaissaient complètement, ce qui aboutissait à une fusion des pièces osseuses.

En 1972, Salter comparaît les effets de la mobilisation passive continue, de l'immobilisation et de la mobilisation active discontinue, sur le cartilage articulaire. L'expérimentation était menée chez des lapins adolescents et adultes, chez lesquels étaient créés des défects cartilagineux à l'emporte-pièce. Les animaux étaient soumis à un des régimes de mobilisation pendant une période variant de une à dix semaines. Les fémurs étaient ensuite prélevés pour examen histologique après coloration hématoxilline éosine safran, et bleu de toluidine afin de mettre en évidence la matrice cartilagineuse. Salter [1972] concluait à la supériorité de la mobilisation passive continue pour la cicatrisation cartilagineuse, en avançant l'hypothèse que la mobilisation continue induisait la

néo-chondrogénèse grâce à des cellules pluripotentes apparues au niveau de l'os sous-chondral. Salter [1981] a donc posé l'hypothèse que la mobilisation passive continue, dont le bénéfice a été démontré pour la cicatrisation des défects cartilagineux créés chirurgicalement, devait avoir un effet bénéfique pour prévenir la dégradation du cartilage lors des arthrites septiques. Les résultats radiologiques, histologiques et biochimiques sont meilleurs dans le groupe mobilisation passive continue et mobilisation active discontinue.

Dans notre série, les résultats sont similaires. Les résultats radiographiques sont significativement différents entre les deux groupes traités par oxacilline, avec et sans immobilisation. Dans cette série, l'immobilisation n'a donc pas été efficace sur le plan bactériologique, mais en plus a eu un effet délétère sur le plan radiologique. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour tenter d'expliquer les effets bénéfiques de la mobilisation. La mobilisation préviendrait la survenue de l'adhésion du pannus synovial. Le liquide synovial ne peut plus jouer son rôle nutritif. De plus la membrane synoviale, riche en enzymes collagénolytiques, est alors en contact direct avec le cartilage articulaire. De même, la mobilisation améliorerait la diffusion et donc le pouvoir nutritif du liquide synovial et de l'antibiotique (sans qu'il y ait d'incidence sur le résultat bactériologique). La mobilisation augmenterait la clairance articulaire des enzymes lysosomales. La mobilisation passive aurait un rôle inducteur sur la métaplasie de cellules indifférenciées pluripotentes. Ces cellules seraient à l'origine de la meilleure cicatrisation cartilagineuse. Alors qu'au contraire, l'immobilisation diminuerait la synthèse des protéoglycanes de la matrice cartilagineuse (Salter [1981]).

Cependant, la notion de mobilisation passive continue, définie par Salter [1989] au début des années 70, semble donner de meilleurs résultats que la mobilisation active discontinue. En effet, les animaux laissés libres dans leur cage mettent leurs surfaces articulaires en charge, alors que la fragilité du cartilage est maximale dans les premières semaines d'une arthrite. La mobilisation passive discontinue améliorerait la stimulation des chondroblastes sans leurs imposer de trop fortes contraintes en compression.

Conclusion

L'immobilisation n'est pas un traitement adjuvant efficace du traitement antibiotique. L'immobilisation, au cours d'une arthrite septique à *Staphylococcus aureus* chez le lapin, aggrave les lésions ostéo-cartilagineuses visibles radiologiquement.

La prise en charge des arthrites septiques doit débuter dès que le diagnostic est évoqué. Elle doit combiner un lavage articulaire, réalisé en urgence, afin de diminuer la charge bactérienne et enzymatique intra-articulaire (Daniel [1976]). Un traitement antibiotique doit y être associé, actif sur le germe suspecté. Enfin, la décharge de l'articulation atteinte est indispensable pour ne pas aggraver les lésions cartilagineuses pendant les premières semaines du traitement. L'immobilisation ne semble pas être un moyen satisfaisant de diminuer les contraintes intra-articulaires. Par contre, la mobilisation passive continue ou discontinue, associée à la décharge, semble être un moyen efficace de lutter contre les séquelles potentielles des arthrites septiques.

Ce travail a fait l'objet d'un Poster présenté au "40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy", à Toronto en septembre 2000.

40th
ICAAC
995

Immobilization of the Joint has no Beneficial Effect on the Antibacterial Activity of Oxacillin on a Rabbit *S aureus* Arthritis Experimental Model (RSAM).

A. HAMEL*, J. CAILLON, C. JACQUELINE, E. BATARD, D. BOUTOILLE, D. BUGNON, A.F. MIEGEVILLLE, G. POTEL.
Laboratoire d'Antibiologie, Faculté de Médecine, Université de Nantes. France.

ABSTRACT

Acute septic arthritis due to *S aureus* (SA) is a potentially destructive disorder of joints, despite early diagnosis and surgical drainage combined with antibiotic treatment. The immobilization of the joint is an additive widely recognized treatment. The purpose of this study was to compare the effects of immobilization *vs* intermittent active motion as adjunctive treatment to antibacterial drug, in a RSAM.

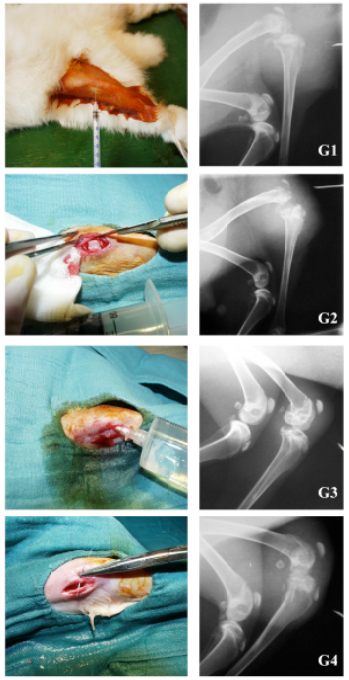
MATERIALS AND METHODS

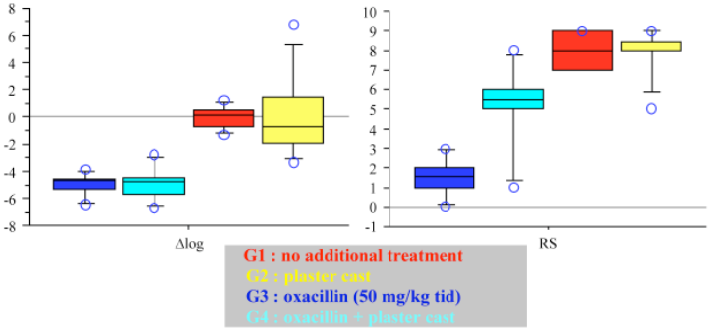
- **Day 0 : a 10^8 CFU inoculum of a methicillin-susceptible SA clinical strain was injected in the right knee of each rabbit.**
- **Day 1 : articular lavage - bacterial count in pus. Rabbits were assigned to one of the following groups (G).**
  - **G1 : no additional treatment,**
  - **G2 : plaster cast,**
  - **G3 : oxacillin (50 mg/kg tid),**
  - **G4 : oxacillin + plaster cast.**
- **Day 21 : the animals were sacrificed - bacterial count in pus.**
  - **Difference of $\log_{10}$ CFU/mL (day21-day1) was calculated for each animal ($\Delta\log_{10}$ CFU/mL).**
  - **Lateral radiogram of the knees.**
  - **Blindly calculation of a radiological score (RS)**

RESULTS

Groups (nb of rabbits)	Growth plate	Cartilage space	Sub-chondral bone condensation	Osteolysis	RS
Group 1(8)	1,5 ± 0,5	1,8 ± 0,5	2 ± 0,0	3 ± 0,0	8 ± 0,9
Group 2(8)	1,2 ± 0,5	1,9 ± 0,4	1,9 ± 0,4	2,9 ± 0,4	7,9 ± 1,2
Group 3(6)	0,7 ± 0,5	0,3 ± 0,5	0 ± 0,0 (a)	0,5 ± 0,5 (a)	1,5 ± 1 (a)
Group 4(6)	1 ± 0,0	1,2 ± 0,8	1,2 ± 0,8 (c)	2 ± 1,1 (c)	5,2 ± 2,3

a : *vs* G1, G2 et G4 (Mann Whitney, p≤0,0306). b : *vs* G1 (Mann Whitney, p=0,0239).
c : *vs* G2 (Mann Whitney, p≤0,0389).





CONCLUSION

Immobilization of the joint had no beneficial effect on the efficacy of oxacillin, and a deleterious effect on the RS.

REFERENCES

1 Bremell T : Experimental models of infectious arthritis. *In Handbook of animals models of infection. Academic Press* , 1999 : 539-547.
2 Cremieux AC, Carbon C : Experimental models of bone and prosthetic joint infections. *Clin Infect Dis* 1997 ; 25 : 1295-1302.
3 Daniel D, Akeson W, Amiel D, Ryder M, Boyer J : Lavage of septic joints in rabbits : effects of chondrolysis. *J Bone Joint Surg* 1976 ; 58-A: 393-395.
4 Enneking WF, Horowitz M : The intra-articular effects of immobilization on the human knee. *J Bone Joint Surg* 1972 ; 54-A : 973-985.
5 Jonnson AH, Campbell WG, Callahan BC : Infection of rabbit knee joints after intra-articular injection of *Staphylococcus aureus* . Comparison with joints infected with *Staphylococcus albus* . *Am J Pathol* 1970 ; 60 : 165-203.
6 Salter RB, Bell RS, Keeley FW : The protective effect of continuous passive motion on living articular cartilage in acute septic arthritis. An experimental investigation in the rabbit . *Clin Orthop* 1981 ; 159 : 223-247.
7 Smith RL, Schurman DJ, Kajiyama G Mell M, Gilkerson E : The effect of the antibiotics on the destruction of the cartilage in experimental infectious arthritis. *J Bone Joint Surg* 1987 ; 69-A : 1063-1068.

Matériel d'ostéosynthèse interne et ostéite post-traumatique

Introduction

L'ostéite post-traumatique est une complication fréquente et redoutable en traumatologie. Elle est redoutable parce que le pronostic vital peut-être engagé et parce que la conservation du membre atteint n'est pas toujours possible. Les buts du traitement sont d'obtenir la guérison du foyer infectieux et la consolidation osseuse. Le traitement est médico-chirurgical, associant une antibiothérapie adaptée et possédant une bonne pénétration osseuse (El Kouri [1998]), à un programme chirurgical permettant un débridement du foyer infectieux, éventuellement l'ablation de séquestres, et la couverture et la stabilisation du foyer de fracture. Il s'agit donc d'un challenge médico-chirurgical où la guérison est longue à obtenir et où les échecs ne sont pas rares. Dans les cas d'ostéites post-traumatiques sur matériel, il est souvent recommandé de retirer ce matériel afin d'augmenter les chances de succès. Malgré ces recommendations, certains auteurs ont rapporté des succès de traitements d'ostéites post-traumatiques et d'infections sur prothèses articulaires sans ablation du matériel. D'autres ont aussi rapporté des succès sans recours à la chirurgie dans le cadre d'infections aiguës sur matériel (Drancourt [1997], Stein [1998]). Quoiqu'il en soit, le débridement chirurgical et l'ablation du matériel restent largement recommandés pour le traitement des infections tardives sur matériel.

La prise en charge chirurgicale de telles infections reste donc discutée, mais aucune étude expérimentale n'a été publiée concernant l'influence de la présence du matériel d'ostéosynthèse sur l'efficacité du traitement antibiotique.
Un modèle expérimental d'ostéite post-traumatique a été développé au sein du laboratoire permettant de répondre à cette question.

Matériels et Méthodes

Choix du germe

Nous avons utilisé une souche clinique de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline, isolée dans une hémoculture (BCB8).

Milieux

Le bouillon de Muller-Hinton (MH) (Sanofi Diagnostics Pasteur, Marne la Coquette, France) supplémenté en calcium (25 mg/L) et en magnésium (12.5 mg/L) a été utilisé pour le test de susceptibilité aux antibiotiques et pour les vitesses de bactéricidie. Le dénombrement bactérien a été déterminé sur des géloses Trypticase Soja (TS) et sur des géloses de Chapman (Difco).

Etudes *In vitro*.

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de la vancomycine pour la souche de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline a été déterminée par la méthode de microdilutions (Amsterdam [1996]).

Les vitesses de bactéricidie ont été déterminées dans des tubes contenant du bouillon MH et un inoculum initial de 5 x 10^6 UFC/mL, en présence de vancomycine dont la concentration était équivalente à 8 fois la CMI. Un tube sans antibiotique servait de contrôle. Les bactéries survivantes ont été dénombrées après 0, 3, 6 et 24 heures d'incubation à 37°C, en mettant en culture 50 μL du bouillon sur une gélose TSA. Un effet bactéricide était défini par une diminution d'au moins 3 $\log_{10}$ UFC/mL par rapport à l'inoculum initial à partir après 24 heures d'incubation.

Modèle expérimental d'ostéite post-traumatique

Au premier jour, J0 : Sous anesthésie générale par kétamine (intra-musculaire, 15 mg/kg), une ostéotomie diaphysaire bifocale du tibia droit a été réalisée sur des lapins femelles de la race New-Zealand, dont le poids variait de 2 à 2,5 kg. Le fragment diaphysaire intermédiaire a été ensuite infusé dans une

gélose contenant 10^8 UFC/mL de la souche de *Staphylococcus aureus* BCB8 résistant à la méticilline. Le fragment a ensuite été replacé dans la jambe. La double ostéotomie était ensuite stabilisée par un enclouage centro-médullaire par une broche de Kirshner 15/10. Le clou était introduit dans l'axe de la diaphyse en traversant l'épiphyse tibiale supérieure. (figures 17A, 17B).

Lors du quatrième jour, J4: Sous anesthésie générale par kétamine (intra-musculaire, 15 mg/kg), tous les lapins bénéficiaient d'un débridement chirurgical du foyer d'ostéite. Des prélèvements étaient effectués, ils étaient ensuite pesés et dilués dans 200 μL de sérum physiologique. Des dilutions à 10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6} , étaient ensemencées sur gélose TSA et Chapman, en utilisant un ensemenceur spiral (Spiral System; Interscience, Saint-Nom-La-Bretèche, France), ce qui permettait un dénombrement des bactéries survivantes (B1 exprimé en UFC/mg de pus), au début du traitement. Les animaux étaient ensuite répartis en deux groupes par randomisation. Pour le groupe 1 (G1), après le débridement et le lavage chirurgical, la peau était refermée. Pour le groupe 2 (G2), après le débridement et le lavage chirurgical, le clou centro-médullaire était retiré et l'ostéosynthèse assurée par un fixateur externe en cadre (réalisée par 4 broches placées de part et d'autre du fragment diaphysaire, et par deux tubes plastiques solidarisés aux broches par de la résine polymérisable) (figures 17C, 17D). Le traitement par la vancomycine était ensuite débuté pour les deux groupes. La vancomycine était administrée par voie intra-musculaire, deux fois par jour, à la dose de 60 mg/kg par injection. Le traitement antibiotique était poursuivi jusqu'au huitième jour.

Au huitième jour, J8: Les animaux étaient euthanasiés par une injection intra-veineuse de thiopental. De nouveaux prélèvements étaient réalisés, ils étaient ensuite pesés et dilués dans 200 μL de sérum physiologique. Des dilutions à 10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6} , étaient ensemencées sur gélose TSA et Chapman, en utilisant un ensemenceur spiral, ce qui permettait un dénombrement des bactéries survivantes (B2 exprimé en UFC/mg de pus), à la fin du traitement. La diminution du nombre de bactéries entre le début et la fin du traitement (B2-B1), était calculé et exprimé en $\Delta\log_{10}$ UFC/mg.

figure 1

Figure 17 :

A: radiographie de face de la jambe droite. La double ostéotomie tibiale est stabilisée par une broche centro-médullaire.

B: radiographie de profil de la jambe droite. La double ostéotomie tibiale est stabilisée par une broche centro-médullaire.

C: radiographie de face de la jambe droite. La double ostéotomie tibiale est stabilisée par un fixateur externe en cadre.

D: radiographie de profil de la jambe droite. La double ostéotomie tibiale est stabilisée par un fixateur externe en cadre.

Etude pharmacocinétique

La vancomycine était administrée par voie intra-musculaire,à la dose de 60 mg/kg, des prélèvements sanguins artériels, étaient réalisés 15 minutes et 12 heures après l'injection afin de déterminer la concentration maximale et la concentration minimale avant la prochaine injection.

Analyse statistique

L'analyse statistique des résultats a été réalisée à l'aide du logiciel StatView (Abacus Concepts, Berkeley, Ca). Une analyse de variance (ANOVA) a été utilisée, suivie d'un test de Bonferroni, pour comparer les deux groupes. Une valeur de $p \leq 0.05$ a été considérée comme significative.

Résultats

Tests de sensibilité

La concentration minimale inhibitrice (CMI) de la vancomycine pour la souche de *Staphylococcus aureus* étudiée était de 1 mg/L.

Vitesse de bactéricidie

La vancomycine permettait une diminution du nombre de bactérie de 2 $\log_{10}$ UFC/mL en 24 heures, à une concentration équivalent à 8 fois la CMI (BCB8V8)(figure 18).

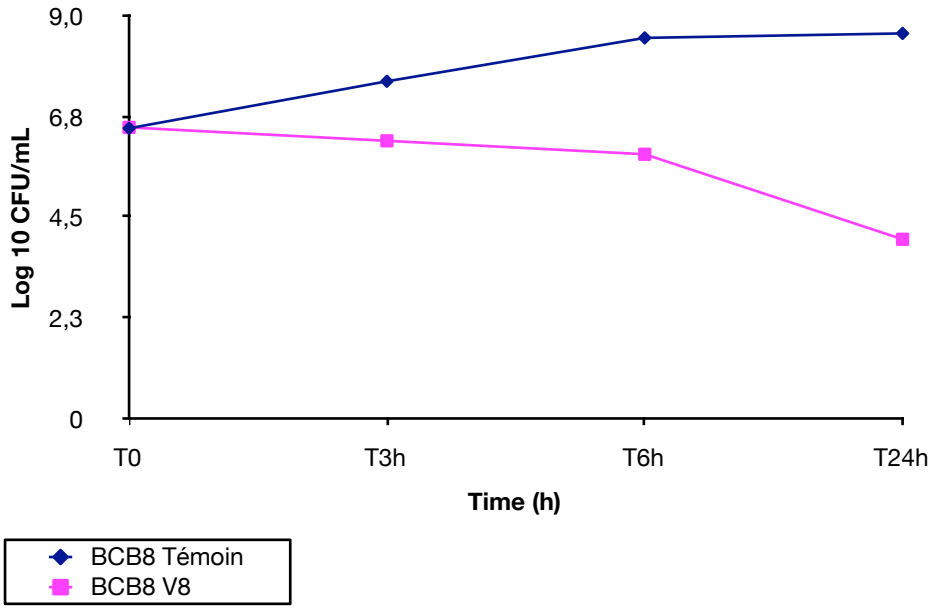


Figure 18 : vitesse de bactéricidie de la vancomycine sur la souche de *Staphylococcus aureus* BCB8 (◆ : témoin ; ■ avec une concentration de vancomycine à 8 fois la CMI)

Etude pharmacocinétique

La concentration maximale, 15 minutes après l'administration, était de 46,5 ± 7,4. La concentration minimale juste avant la seconde injection était de 14,8 ± 3,5 mg/L.

Ostéite post-traumatique expérimentale.

Au quatrième jour, il n'y avait pas de différence significative du nombre de bactéries survivantes (B1) entre le groupe 1 et le groupe 2 (p=0.465, B1 groupe 1 *versus* B1 groupe 2, test de Bonferroni après ANOVA) (tableau 14). Aucun foyer d'ostéite (avec ou sans changement du matériel d'ostéosynthèse) n'a été stérilisé après quatre jours de traitement. Par contre, il existait une différence significative de la diminution du nombre de bactéries entre le début et la fin du traitement entre les deux groupes (Δlog=B2-B1) (p=0.0123, Δlog groupe 1 *versus* Δlog groupe 2, test de Bonferroni après ANOVA). L'efficacité de la vancomycine était augmentée en cas d'ablation du matériel d'ostéosynthèse interne.

Groupe (n. de lapins)	B1 (log_{10} UFC/g) Moyenne ± déviation standard	B2 (log_{10} UFC/g) Moyenne ± déviation standard	Δlog (log_{10} UFC/g) Moyenne ± déviation standard
G1 (5)	6.3 ± 0.8	5.2 ± 0.4	-1.2 ± 0.5*
G2 (5)	6.8 ± 0.9	3.9 ± 1.7	-2.9 ± 1.1*

*p= 0.0123, Δlog groupe 1 *versus* Δlog groupe 2, test de Bonferroni après ANOVA

Tableau 14: Efficacité de la vancomycine dans le modèle d'ostéite post-traumatique du lapin.

Discussion

Les infections sur matériel d'ostéosynthèse ont souvent des conséquences dramatiques pour le patient : hospitalisation prolongée, nécessité d'une antibiothérapie intra-veineuse (le plus souvent sur une voie

centrale), interventions chirurgicales répétées ; par ailleurs, la conservation du membre n'est pas toujours possible et le pronostic vital peut être engagé. Le traitement de l'ostéite post-traumatique reste donc un challenge pour l'équipe médico-chirurgicale qui la prend en charge. L'ostéite post-traumatique survient souvent dans un contexte nosocomial, et les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline en sont fréquemment responsables (Besnier [1990]). Une équipe française a publié des succès de traitements d'infections sur matériel sans chirurgie initiale (Brouqui [1995], Stein[1998]). Malgré tout, une antibiothérapie immédiate, après avoir réalisé les prélèvements locaux, et une ablation du matériel reste la solution recommandée (Jansen [1993]).

Les glycopeptides sont des molécules anti-staphylococciques efficaces, elles ont été largement utilisées et étudiées dans le cadre du traitement des infections osseuses (Gracia [1998]). Bien que des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la vancomycine aient été isolées dans plusieurs pays (Hamilton-Miller[2002], Hiramatsu [1998], Smith [1999]), les glycopeptides restent le traitement de référence des infections osseuse à SARM (Smith [1999]). La vancomycine est un antibiotique temps dépendant et les études pharmacocinétiques ont montré une concentration sérique minimale de l'ordre de 10 fois la Concentration Minimale Inhibitrice. La vitesse de bactéricidie à une concentration de 8 fois la concentration Minimale Inhibitrice, met en évidence une réduction de 2 $\log_{10}$ de la concentration bactérienne à 24 h. Ainsi, le régime thérapeutique choisi dans cette étude (60 mg/kg deux fois par jour) semble être adéquat pour le traitement de ce modèle d'ostéite post-traumatique.

Cette étude a évalué les effets de l'ablation du matériel sur l'efficacité du traitement antibiotique. Les prélèvements au quatrième jour ont permis de confirmer la réalité de l'infection du site opératoire. Les prélèvements réalisés au quatrième jour ont également permis de faire de chaque lapin son propre témoin, et donc d'augmenter la puissance des tests statistiques. De plus le modèle chez le lapin permet de mimer de façon satisfaisante la pathologie rencontrée chez l'homme et sa prise en charge.

Les infections sur matériel orthopédique sont fréquentes. Tattevin [1998] a démontré que les taux de succès de traitement des infections sur prothèses, sans ablation du matériel étaient meilleurs si le débridement chirurgical était réalisé avant le quatrième jour suivant l'apparition des signes cliniques.

L'adhésion microbienne est considérée comme la première étape de l'infection sur corps étranger (Besnier [1990], Gracia [1998], Gristina [1985], Jansen [1993], Monzon [2002]). C'est un phénomène complexe qui met en jeu des facteurs d'origine bactérienne (espèce, capacité à produire des adhésines formant le glycocalix ou slime), des facteurs dépendants du corps étranger (design du matériel, hydrophobicité), et des facteurs dépendant de l'hôte (Arens [1996, 1999], Melcher [1994]). En pratique clinique, il est relativement aisé d'agir sur certains facteurs d'origine bactérienne. Le lavage chirurgical et l'excision des tissus infectés diminuent la concentration bactérienne, l'ablation du matériel orthopédique permet d'altérer l'adhésion bactérienne en diminuant les surfaces ou ce phénomène peut se produire.

Cette étude a comparé deux options chirurgicales différentes pour la prise en charge des infections osseuses sur matériel. L'efficacité de la vancomycine a été augmentée de façon significative après ablation du matériel d'ostéosynthèse interne, confirmant ainsi la nécessité de l'ablation du matériel à chaque fois que la situation clinique le permettait.

Ce travail est accepté pour publication dans Journal of Children's Orthopædics

J Child Orthop
DOI 10.1007/s11832-008-0102-4

BASIC SCIENCE

Internal device decreases antibiotic's efficacy on experimental osteomyelitis

Antoine Hamel · Jocelyne Caillon · Cédric Jacqueline · Jean-Michel Rogez · Gilles Potel

Received: 10 February 2008 / Accepted: 9 April 2008
© EPOS 2008

Abstract
Purpose We have evaluated the effect of internal and external osteosynthesis devices on the efficacy of vancomycin treatment in a rabbit model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)-induced post-traumatic osteomyelitis.
Methods Double tibial osteotomies in female New Zealand rabbits were performed, inoculated with a MRSA strain, then fixed with an intramedullary rod. A debridement was performed 4 days later for each rabbit, and a bacterial count in pus was determined (B1). In the first group (G1), the osteosynthesis material was removed and replaced by a new sterile nail. In the second group (G2), the intramedullary rod was removed and then replaced by an external fixator. Immediately after surgery, G1 and G2 rabbits were treated with vancomycin (60 mg/kg twice a day). The animals were sacrificed at the end of a 5-day period, and a bacterial count in pus was performed again (B2).
Results The difference of $\log_{10}$ colony forming units per milliliter (CFU/ml) (B2−B1) was -1.2 ± 0.5 and -2.9 ± 1.1, respectively, for G1 and G2.
Conclusion The efficacy of vancomycin treatment increased after removal of the internal osteosynthesis device.

A. Hamel · J. Caillon · C. Jacqueline · G. Potel
Laboratoire de Thérapeutiques Cliniques et Expérimentales des Infections, EA 3826, Faculté de Médecine de Nantes, Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, rue Gaston Veil, Nantes 44000, France

A. Hamel (✉) · J.-M. Rogez
Hôpital Mère-Enfant, Service de Chirurgie Pédiatrique, quai Moncousu, Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Nantes 44093, France
e-mail: antoine.hamel@chu-nantes.fr

Keywords Orthopedic device · Osteomyelitis · Trauma

Introduction

The pathogenesis of foreign body infection has been well known since Zimmerli's work [1, 2]. He showed the presence of local granulocyte defect around the foreign body, explaining subsequent tendency to infection. Septic post-traumatic osteomyelitis is a difficult-to-treat complication associated with reconstructive surgery and joint replacement. Vital prognosis can be engaged and limb preservation is not always possible. Post-traumatic osteomyelitis requires lengthy treatment, and therapeutic failures are not rare. Removal of the osteosynthesis device is sometimes recommended [3]. However, some authors have reported clinical success in the treatment of post-traumatic osteomyelitis and prosthetic joint infection without removal of the orthopedic implant [4]. Others have reported clinical success in the treatment of early acute osteomyelitis after surgical debridement without the removal of the osteosynthesis device. Immediate antimicrobial chemotherapy and removal of the infected device are the preferred treatment methods for late-stage osteomyelitis.

Animal models were especially developed to study pathogenesis of bone infection or to evaluate antimicrobial agents [5, 1, 2], but not one was developed to evaluate a surgical procedure used to treat a post-traumatic osteomyelitis.

The aim of this experimental study was to compare two surgical procedures (external fixation and internal fixation after removal of internal osteosynthesis) on vancomycin

UNCORRECTED PROOF

efficacy in a rabbit model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-induced post-traumatic osteomyelitis.

Materials and methods

Microorganism

One clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from blood culture was studied.

Medium

Mueller Hinton (MH) broth (Sanofi Diagnostics Pasteur, Marne la Coquette, France) supplemented with calcium (25 mg/l) and magnesium (12.5 mg/l) was used for susceptibility tests and killing curve experiments. Colony counts were determined on trypticase soy agar (TSA) (Difco) for the time-kill experiments.

In vitro studies

The minimal inhibitory concentration (MIC) of vancomycin for the MRSA strain was determined in cation-supplemented MH broth using the microdilution technique. Time-kill experiments were performed in glass flasks containing MH broth with an initial inoculum of 5×10^6 CFU/ml in the presence of vancomycin at 8× MIC. One flask without antibiotics served as a control. Surviving bacteria were counted after 0, 3, 6 and 24 h of incubation at 37°C, by subculturing 50-µl samples (in 0.9% NaCl) on TSA. A bactericidal effect was defined as a 3 $\log_{10}$ CFU/ml or greater decrease compared with the initial inoculum after 24 h of incubation.

Experimental post-traumatic osteomyelitis model

All the animal studies were carried out in accordance with the scientific procedures act (animals) 1986 and the code of practice for the housing and care of animals used in scientific procedures 1989.

Day 0: under general anesthesia, using an anteromedial approach, a bifocal tibial osteotomy was performed on a female New Zealand rabbit. The intermediate tibial fragment was infused in a 10^8 CFU/ml MRSA strain agar and then replaced in the rabbit's leg. The double osteotomy was stabilized with an intramedullar nail (Kirshner's wire 15/10) (Fig. 1a, b).

Day 4: an extensive surgical debridement (excluding resection of the intermediate tibial fragment) of the osteomyelitis was performed and the intramedullar nail was removed. Samples were collected, weighed, and suspended in 200 µl sterile saline. Serial dilutions (10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6}) were made and plated on TSA, using a spiral plater (Spiral System; Interscience, Saint-Nom-La-Bretèche, France) to calculate the bacterial count (B1) in pus at the beginning of treatment. Animals were randomly assigned to one of two treatment groups. Group 1 (five rabbits): after debridement and surgical wash, a new internal osteosynthesis was performed with a sterile nail (Kirshner's wire 15/10) and skin closure; group 2 (five rabbits): after debridement and surgical wash, skin closure was performed and a new osteosynthesis was performed using a homemade bilateral external fixator (Fig. 1c, d; 2). Vancomycin was administered intramuscularly twice daily (60 mg/kg b.i.d.) to all rabbits (groups 1 and 2) until day 8.

Day 8: animals were sacrificed by means of a lethal thiopental injection. Samples were collected, weighed, and suspended in 200 µl sterile saline. Serial dilutions (10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6}) were made and plated on TSA, using a spiral plater to calculate the bacterial count (B2) in pus at the end of treatment. A $\Delta\log$ CFU/mg = B2−B1 expressing the

Fig. 1 **a** Frontal radiogram of the *right* leg. The double tibial osteotomy was stabilized with an intramedullar rod. **b** Lateral radiogram of the *right* leg. The double tibial osteotomy was stabilized with an intramedullar rod. **c** Frontal radiogram of the *right* leg. The double tibial osteotomy was stabilized with a bilateral external fixator. **d** Lateral radiogram of the *right* leg. The double tibial osteotomy was stabilized with a bilateral external fixator

UNCORRECTED

Fig. 2 Frontal view of the *right* leg with homemade external fixator

decrease in bacterial count between day 4 and day 8 was calculated.

Pharmacokinetic studies

Vancomycin was administered intramuscularly to animals b.i.d. (60 mg/kg). Samples were collected at the end of the treatment. Assays of serum were performed to determine peak and trough levels of vancomycin.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using StatView software (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA). Analysis of variance (ANOVA) was used to compare the effects among the different groups, followed by Bonferroni's test to compare the two groups. A P value ≤ 0.05 was considered significant.

Results

Susceptibility test

The minimum inhibitory concentration (MIC) of vancomycin for the *S. aureus* strain was 1 mg/l.

Time-kill curves

A decrease of 2 $\log_{10}$ CFU/ml was observed after 24 h with vancomycin at 8× MIC (Fig. 3).

Pharmacokinetic study

Peak and trough vancomycin concentrations were 46.5 ± 7.4 and 14.8 ± 3.5 mg/l, respectively.

Experimental post-traumatic osteomyelitis

At day 4, the bacterial counts (B1) in pus were 6.3 ± 0.8 $\log_{10}$ CFU/mg and 6.8 ± 0.9 $\log_{10}$ CFU/mg in groups 1 and 2, respectively; there was no difference between the two groups ($P = 0.465$, B1 group 1 vs B1 group 2; Bonferroni's test after ANOVA) (Table 1). None of the rabbits was cured after 4 days of antibiotic treatment with or without the removal of the internal osteosynthesis device. At day 8, the bacterial counts in pus were 5.2 ± 0.4 $\log_{10}$ CFU/mg and 3.9 ± 1.7 $\log_{10}$ CFU/mg in groups 1 and 2, respectively. On this occasion, there was a significant decrease in bacterial count between these groups (Δlog – B2−B1) ($P = 0.0123$, Δlog group 1 vs Δlog group 2, Bonferroni's test after ANOVA). The efficacy of vancomycin treatment increased after removal of the internal osteosynthesis device.

Discussion

Infections related to osteosynthesis devices often result in dramatic consequences for the patient. Prolonged hospitalization with intravenous antimicrobial chemotherapy and repeated surgical procedures are common, and even amputation and death may occur. Treatment of post-traumatic osteomyelitis is still a challenge for the physician and the surgeon, and the agents of nosocomial bone infections are often MRSA strains [6]. Few investigators have suggested treating infections related to orthopedic

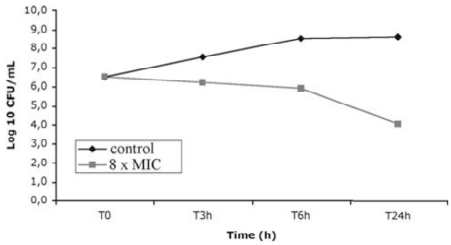


Fig. 3 Time-kill curve of vancomycin

UNCORRECTED PROOF

Table 1 Efficacy of vancomycin in a rabbit model of post-traumatic osteomyelitis

Group (no. of rabbits)	B1 ($\log_{10}$ CFU/mg) mean ± SD	B2 ($\log_{10}$ CFU/mg) mean ± SD	Δlog ($\log_{10}$ CFU/mg) mean ± SD
G1 (5)	6.3 ± 0.8	5.2 ± 0.4	−1.1 ± 0.5*
G2 (5)	6.8 ± 0.9	3.9 ± 1.7	−2.9 ± 1.1*

*$P = 0.0123$, Δlog group 1 vs Δlog group 2, Bonferroni's test after ANOVA

devices without initial surgery [3, 4]. Instead, immediate antimicrobial chemotherapy and removal of the infected device is preferred [7].

Glycopeptides are effective against all staphylococcal strains and have been studied extensively in the treatment of bone infections [8]. Although sporadic strains of vancomycin-resistant *S. aureus* have been isolated in several countries [9, 10, 11], glycopeptides are still considered the gold standard in treatment of MRSA-induced bone infections [11]. Vancomycin is a time-dependent, antimicrobial drug. Pharmacokinetic studies showed a peak concentration equivalent to ten times the MIC. Time-kill curves (8× MIC) showed a reduction of 2 log at 24 h. Thus, the vancomycin regimen chosen for this study (60 mg/kg b.i.d.) seems to be an adequate treatment in this model. Jacqueline et al. [12] demonstrated that continuous infusion and intramuscular (twice daily) administration of vancomycin have a similar efficacy in a rabbit endocarditis model. Intramuscular administration allowed to avoid stabling, rabbits being free of movement in their cages.

A limitation of the present study could be the use of a single drug regimen, because it has been shown in clinical studies that dual drug therapy may be more adequate [13]. Zimmerli et al. showed the high efficacy of regimen including rifampin on implant-related bacterial infection [13]. However, vancomycin alone can still be considered a valuable regimen in other experimental animal models of infection with foreign bodies [12].

In our study, we evaluated the effect of removing the infected device on the efficacy of the antibiotic treatment. Samples collected at day 4 confirmed infection at the surgical site. Since the decrease in bacterial count between day 8 and day 4 can be calculated for each rabbit, the power of the statistical test is increased. In addition, the rabbit model is applicable to human pathology and clinical management of infection.

Infections related to orthopedic devices are frequent. Tattevin and colleagues [14] have demonstrated that the success rate for the treatment of joint prosthesis infection without removal of the orthopedic device was better if surgical revision was performed before the fourth day after clinical signs appeared, suggesting that the best chance of clinical success is correlated with early and efficient treatment. Microbial adherence is recognized as the first step of foreign body infection [7, 8, 15, 16, 17]. It is a complex phenomenon involving bacterial factors (bacterial species, production of adhesins forming glycocalyx or slime), foreign body design and hydrophobicity, and host factors [18, 19, 20]. In clinical practice, it is quite easy to modify the bacterial factors. Surgical debridement and excision of infected tissues decrease the local bacterial count, and removal of the orthopedic device alters microbial adherence.

Moreover, orthopedic device removal (and that of fibrous tissues surrounding it) allows improvement of antibiotic diffusion in the infected site and eventually prevents a cellular penetration of *Staphylococcus aureus* that may be considered as a cause of clinical failure.

The choice of a double tibial osteotomy was made in order to infuse the intermediate tibial fragment in a MRSA strain agar and eventually emphasize the local bone and soft tissue infections. During the surgical debridement, the intermediate tibial fragment wasn't removed because of early bone healing; then this fragment wasn't considered as a sequestrum.

It's likely that if the treatment had been prolonged more than 4 days, both groups might have been cured. However, the duration of treatment was deliberately restricted to 4 days as we aimed to show a difference of efficacy of antimicrobial treatment between the two groups. Furthermore, treatment efficacy should be obtained as soon as possible; thus the first days of treatment are critical. Consequently, extensive surgical debridement and double antimicrobial regimen are recommended. In this experimental study, removal of the osteosynthesis device allowed an increased efficacy of vancomycin at day 4.

This study only compared two different surgical techniques in the management of an infection related to the implantation of an osteosynthesis device, although clinical management of patients with post-traumatic osteomyelitis may be more complex, depending on the type of microorganism, status of the skin and soft tissues, patient status, and stability of the osteosynthesis device. However, the efficacy of vancomycin treatment increased significantly after removal of the internal osteosynthesis device, confirming the necessity of removing such a device whenever it is clinically possible.

UNCORRECTED PROOF

References

1. Zimmerli W, Lew PD, Waldvogel FA (1984) Pathogenesis of foreign body infection. Evidence for a local granulocyte defect. J Clin Invest 73:1191–1200
2. Zimmerli W, Waldvogel FA, Vaudaux P, Nydegger UE (1982) Pathogenesis of foreign body infection: description and characteristics of an animal model. J Infect Dis 146:487–497
3. Stein A, Bataille JF, Drancourt M, Curvale G, Argenson JN, Groulier P, Raoult D (1998) Ambulatory treatment of multidrug-resistant *Staphylococcus*-infected orthopedic implants with high-dose oral co-trimoxazole (trimethoprim-sulfamethoxazole). Antimicrob Agents Chemother 42:3086–3091
4. Brouqui P, Rousseau MC, Stein A, Drancourt M, Raoult D (1995) Treatment of pseudomonas æruginosa infected orthopedic prostheses with ceftazidime–ciprofloxacin antibiotic combination. Antimicrob Agents Chemother 39:2423–2425
5. Yin LY, Lazzarini L, Li F, Stevens CM, Calhoun JH (2005) Comparative evaluation of tigeciline and vancomycin, with and without rifampicin, in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* experimental osteomyelitis in a rabbit model. J Antimicrob Chemother 55:995–1002
6. Cunha BA (2002) Osteomyelitis in elderly patients. Clin Infect Dis 35:287–293
7. Jansen B, Peters G (1993) Foreign body associated infection. J Antimicrob Chemother 32(Suppl A):69–75
8. Gracia E, Lacleriga A, Monzon M, Leiva J, Oteiza C, Amorena B (1998) Application of a rat osteomyelitis model to compare in vivo and in vitro the antibiotic efficacy against bacteria with high capacity to form biofilms. J Surg Res 79:146–153
9. Hamilton-Miller JM (2002) Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a real and present danger? Infection 30:118–124
10. Hiramatsu K (1998) The emergence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Japan. Am J Med 104:7S–10S
11. Smith TL, Pearson ML, Wilcox KR, Cruz C, Lancaster MV, Robinson-Dunn B, Tenover FC, Zervos MJ, Band JD, White E, Jarvis WR (1999) Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* working group. N Engl J Med 340:493–501
12. Jacqueline C, Batard E, Perrez L, Boutoille D, Hamel A, Caillon J, Kergueris MF, Potel G, Bugnon D (2002) In vivo efficacy of continuous infusion versus intermittent dosing of linezolid compared to vancomycin in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* rabbit endocarditis model. Antimicrob Agents Chemother 46:3706–3711
13. Zimmerli W, Widmer AF, Blatter M, Frei R, Ochsner PE (1998) Role of rifampin for treatment of orthopedic implant-related staphylococcal infections: a randomized controlled trial. Foreign-body infection (FBI) study group. JAMA 279:1537–1541
14. Tattevin P, Crémieux AC, P. Pottier P, D. Huten D, Carbon C (1998) Prosthetic joint infection: when can prosthesis salvage be considered? Clin Infect Dis 29:292–295
15. Bessier JM, Leport C (1990) Effect of antibiotics on bacterial adherence to foreign material. Pathol Biol 38:243–248
16. Gristina AG, Costerston JW (1985) Bacterial adherence to biomaterials and tissues. The significance of its role in clinical sepsis. J Bone Joint Surg Am 67:264–273
17. Monzon M, Garcia-Alvarez F, Lacleriga A, Amorena B (2002) Evaluation of four experimental osteomyelitis infection models by using precolonized implants and bacterial suspensions. Acta Orthop Scand 73:11–19
18. Arens S, Eijer H, Schegel U, Printzen G, Perren SM, Hansis M (1999) Influence of the design for fixation implants on local infection. An experimental study of DC-plates vs. Point-contact-fixators in rabbits. J Orthop Trauma 13:470–473
19. Arens S, Schlegel U, Printzen G, Ziegler WJ, Perren SM, Hansis M (1996) Influence of the materials for fracture fixation implants on the development of local infection. An experimental study of steel vs. Titanium DC-plates in rabbits. J Bone Joint Surg Br 78:647–651
20. Melcher GA, Claudi B, Schlegel U, Perren SM, Printzen G, Munzinger J (1994) Influence of type of medullary nail on the development of local infection. An experimental study of solid and slotted nails in rabbits. J Bone Joint Surg Br 76:955–959

UNCORRECTED PROOF

Etude clinique

Immobilisation et arthrite septique

Introduction

Salter [1981, 1989] a démontré la supériorité de la mobilisation passive continue sur un modèle d'arthrite chez le lapin. De même, nous avons démontré expérimentalement (Hamel [2000]), sur un modèle d'arthrite à *Staphylococcus aureus* chez le lapin, le caractère délétère de l'immobilisation. Actuellement l'immobilisation est justifiée pour ses vertus antalgiques et anti-inflammatoires. Mais aucune étude clinique n'a été publiée depuis les travaux de Salter.

Ces résultats expérimentaux ont modifié les pratiques cliniques et ont fait abandonner l'immobilisation au cours du traitement des infections ostéo-articulaires. Nous avons revu deux séries d'enfants traités pour des arthrites septiques, et étudié l'influence de l'immobilisation au cours de leur prise en charge.

Matériel et méthodes

Nous rapportons une série rétrospective de 20 enfants traités consécutivement pour une arthrite septique dans le service de chirurgie infantile du CHU de Nantes.

La prise en charge des infections articulaires dans le service, comprend toujours une ponction articulaire en urgence, sous anesthésie générale, ainsi qu'un lavage articulaire par du sérum physiologique est ensuite réalisé. Une double antibiothérapie intraveineuse est mise en route pour 7 jours. L'efficacité du traitement est contrôlée cliniquement et biologiquement (Numération Formule Sanguine et dosage de la C Réactive Protéine à J0, J3, J7, et J30). Si l'examen clinique est rassurant et si le bilan biologique s'est normalisé, une monothérapie per os est mise en place pour six semaines supplémentaires. La surveillance radiographique est réalisée, lors du diagnostic, après un mois de traitement, et lors de chaque consultation. Dans cette série, les dix premiers enfants ont été immobilisés (dans un appareil plâtré immobilisant les articulations sus et sous-jacentes). Les dix derniers enfants n'ont pas été immobilisés, seul l'appui était interdit pour le premier mois.

L'analyse des dossiers a concerné des critères cliniques, biologiques et radiologiques.

Critères cliniques :

- age
- suivi maximal
- site articulaire atteint
- mobilité articulaire (souplesse / raideur) le jour du diagnostic
- mobilité articulaire (souplesse / raideur) à la fin du premier mois
- mobilité articulaire (souplesse / raideur) au dernier recul
- aspect du liquide articulaire lors de la ponction
- type d'antibiothérapie

- intensité de la douleur lors de l'hospitalisation (classe d'antalgique utilisée)

Critères biologiques :

- germe isolé éventuellement dans la culture du liquide articulaire
- numération des leucocytes le jour du diagnostic
- numération des leucocytes le troisième jour
- numération des leucocytes le septième jour
- numération des leucocytes le trentième jour
- dosage de la C Réactive Protéine le jour du diagnostic
- dosage de la C Réactive Protéine le troisième jour
- dosage de la C Réactive Protéine le septième jour
- dosage de la C Réactive Protéine le trentième jour

Critères radiologiques :

- radiographies de l'articulation atteinte le jour du diagnostic
- radiographies de l'articulation atteinte le trentième jour
- radiographies de l'articulation atteinte au dernier recul

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type, et comparés en utilisant de façon appropriée des tests paramétriques (ANOVA et test de Bonferroni-Dunn) et non paramétriques (test de Fischer exact et test de Mann et Whitney). Un $p<0,05$ était considéré comme significatif.

Résultats

Critères cliniques

Les enfants de la série étaient âgés de 4,5 ± 4,1 ans (de 0 à 15,3 ans).

Dans le groupe des enfants immobilisés, l'âge était de 3,7 ± 3,3 ans (de 0,1 à 9 ans)

Dans le groupe des enfants non immobilisés, l'âge était de 5,3 ± 4,8 ans (de 0 à 15,3 ans). Il n'y avait pas de différence significative entre les deux groupes (p =0,5205, test de Mann et Whitney)

Le recul moyen dans la série était de 0,9 ± 0,6 ans (de 0,1 à 2 ans).

Dans le groupe des enfants immobilisés, le recul moyen était de 1,1 ± 0,7 ans (de 0,1 à 2 ans)

Dans le groupe des enfants non immobilisés, le recul moyen était de 0,8 ± 0,5 ans (de 0,1 à 1,7 ans). Il n'y avait pas de différence significative entre les deux groupes (p =0,4497, test de Mann et Whitney)

Le genou et la hanche étaient les deux articulations les plus souvent atteintes. Ces deux sites représentaient 85% des localisations articulaires de la série (9 genoux et 8 hanches) (tableau 15).

	Nombre total	Nombre "immobilisés"	Nombre "non immobilisés"
Sterno-claviculaire	1	0	1
Gléno-humérale	1	1	0
Poignet	1	1	0
Hanche	8	5	3
Genou	9	3	6
Total	20	10	10

Tableau 15 : Distribution par sites des arthrites, dans chaque groupe

Puisqu'il s'agit d'une étude rétrospective, l'analyse précise des amplitudes articulaires n'a pas été possible. L'articulation infectée était notée souple si des amplitudes normales étaient relevées dans le dossier, alors qu'elle était notée raide si les amplitudes étaient diminuées (sans indication sur l'importance de l'atteinte).

Lors du diagnostic, toutes les articulations infectées étaient enraidies.

Après un mois de traitement, une différence nette entre les deux groupes était observée (p<0,0001 test de Fisher exact). En effet, toutes les articulations étaient raides dans le groupe des enfants immobilisés (les articulations venaient juste d'être libérées du plâtre).

Par contre, au dernier recul, toutes les articulations étaient souples, quel que soit le groupe.

Le liquide articulaire, lors de la ponction initiale, avait toujours un aspect purulent.

L'antibiothérapie a été adaptée au germe lorsque ce dernier a put être isolé. Dans le cas contraire, les enfants de moins de deux ans ont été traités par du CLAFORAN® ou une autre céphalosporine de troisième génération, et de la FOSFOCINE®, pour être actif sur les souches de *Streptococcus pneumoniæ*, *Hæmophilus influenzæ*, et *Staphylococcus aureus*. Après deux ans, les enfants sont traités par du BRISTOPEN® et de la FOSFOCINE® en raison de la forte prédominance du *Staphylococcus aureus* et de *Kingella kingæ*.

Les antalgiques utilisés étaient pratiquement toujours des antalgiques de classe I (paracétamol). Le recours à des antalgiques plus puissant tels que le NUBAIN® n'a été que ponctuel (trois fois dans le groupe des enfants immobilisés, et une fois dans le groupe des enfants non immobilisés). Il n'y avait aucune différence significative entre les deux groupes, pour l'utilisation des antalgiques (p=0,5762, test de Fischer exact). Dans cette série, l'immobilisation plâtrée n'a pas fait preuve de ses propriétés antalgiques.

Critères biologiques :

Treize fois un germe a été isolé dans la culture du liquide articulaire, soit dans 65% des cas. Il s'agissait 7 fois d'un staphylocoque (6 fois un *Staphylococcus aureus*), quatre fois d'un streptocoque (2 fois un

pneumocoque) une fois d'un *Citrobacter braaki*, et une fois d'une Neisseria (tableau 16)

	Nombre total	Nombre "immobilisés"	Nombre "non immobilisés"
Citrobacter braaki	1	1	0
Neisseria gonorrheæ	1	0	1
Staphylococcus aureus	6	4	2
Staphylococcus epidermidis	1	1	0
Streptococcus pneumoniæ	2	1	1
Streptococcus agalactiæ	1	1	0
Streptococcus pyogenes	1	0	1
total	13	8	5

Tableau 16 : Distribution par germes isolés, dans chaque groupe

La diminution de l'hyperleucocytose a été identique dans les deux groupes (p≥0,0802, test de Bonferroni Dunn après ANOVA) (figure 19)

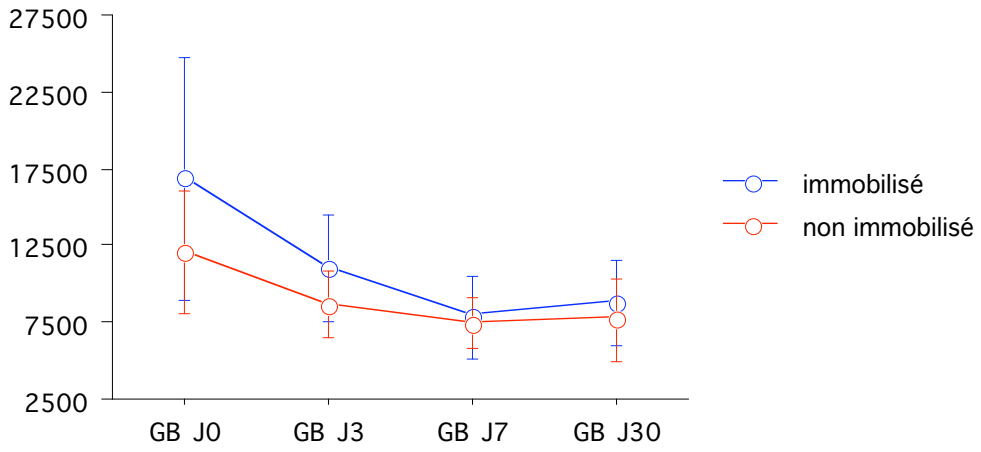


Figure 19 : Numération sanguine des leucocytes

La diminution de la C Réactive Protéine a été identique dans les deux groupes (p≥0,1264, test de Bonferroni Dunn après ANOVA) (figure 20)

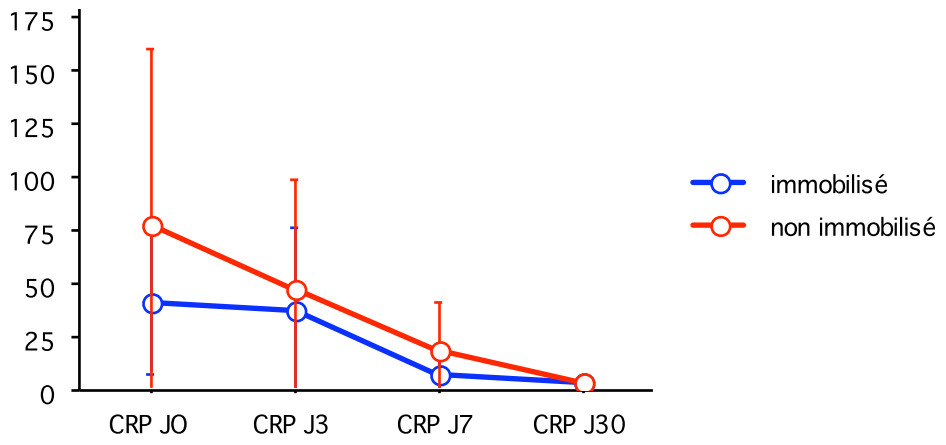


Figure 20: Dosage de la C Réactive Protéine

L'immobilisation n'a donc pas accéléré la normalisation des paramètres biologiques de l'infection dans cette série.

Critères radiologiques :

Peu d'anomalies radiographiques ont été relevées à l'examen des dossiers. Il n'existe aucune différence significative entre les deux groupes, à J0, J30, et au recul maximal ($p>0,9999$, test de Fischer exact). Les radiographies étaient anormales pour deux enfants atteints d'une arthrite néonatale de hanche. Pour l'un, la hanche était initialement luxée, les radiographies se sont ensuite normalisées. Pour l'autre, la hanche était excentrée, et des signes de souffrance épiphysaire sont apparus secondairement.

Discussion

L'immobilisation a longtemps été la seule mesure thérapeutique disponible pour traiter les infections ostéo-articulaires. Elle permettait d'obtenir

une relative indolence et elle assurait surtout une ankylose en position de fonction. Après la découverte des antibiotiques, l'immobilisation est restée un des piliers du traitement des infections ostéo-articulaires. Ses vertus antalgiques étaient alors très utiles, à une période où la prise en charge médicamenteuse de la douleur était balbutiante. L'aphorisme concernant l'ostéomyélite : "les antibiotiques dans le quart d'heure et le plâtre dans l'heure" a sans aucun doute permis de transmettre aux étudiants en médecine le caractère urgent du traitement des infections ostéo-articulaires. Mais il a aussi entretenu la confusion : l'absence d'immobilisation aurait été facteur d'échec.

Salter, au début des années 70, a développé le concept de mobilisation passive continue. Il a démontré l'amélioration de la cicatrisation des nerfs périphériques et du cartilage lorsque le membre atteint est soumis à une mobilisation passive et continue sur arthromoteur. Il a démontré en quelle que sorte que "la vie c'est le mouvement".

Malheureusement aucune étude clinique n'est venue confirmer ce que Salter avait si clairement démontré chez le lapin. Les Anglo-saxons puis les Français ont progressivement allègé et raccourci l'immobilisation au cours des infections ostéo-articulaires, sans pour autant utiliser le concept de mobilisation passive continue qui est difficile à mettre en œuvre en pratique clinique quotidienne.

La supériorité de la mobilisation passive continue et celle de mobilisation active discontinue ayant été démontrées chez le lapin, il semble éthiquement impossible d'en faire la démonstration chez l'enfant, car elle nécessiterait le recours à une biopsie cartilagineuse.

Notre étude clinique a cependant démontré que la mobilisation immédiate, en décharge des articulations infectées permettait de retrouver plus rapidement les amplitudes complètes, sans modifier les paramètres biologiques inflammatoires et sans augmenter la consommation d'antalgiques.

Conclusion

Cette série rétrospective et nos travaux expérimentaux concernant l'immobilisation des infections articulaires ont des résultats convergents : l'immobilisation n'est pas un traitement adjuvant efficace du traitement

antibiotique. La prise en charge des arthrites septiques doit débuter dès que le diagnostic est évoqué. Elle doit combiner un lavage articulaire, réalisé en urgence, afin de diminuer la charge bactérienne et enzymatique intra-articulaire [5]. Un traitement antibiotique doit y être associé, actif sur le germe suspecté. Enfin, la décharge de l'articulation atteinte est indispensable pour ne pas aggraver les lésions cartilagineuses pendant les premières semaines du traitement. L'immobilisation ne semble pas être un moyen satisfaisant de diminuer les contraintes intra-articulaires. Par contre, la mobilisation passive continue ou discontinue, associée à la décharge, semble être un moyen efficace de lutter contre les séquelles potentielles des arthrites septiques.

Conclusions et perspectives

Conclusions et Perspectives

Alors que le troisième millénaire débute à peine, que les antibiotiques ne sont utilisés que depuis une soixantaine d'année, l'infection, et en particulier l'infection ostéo-articulaire de l'enfant, reste une problème de santé publique toujours d'actualité :

- Les infections sont toujours aussi fréquentes.
- Mais l'épidémiologie est en perpétuel changement (espèces bactériennes, résistances)
- Les difficultés de prise en charge restent entières (en particulier pour les infections sur matériel, ou les infections sur terrains immunodéprimés)
- La chondro-épiphyse est une structure anatomique fragile et les possibilités de reconstruction biologique satisfaisantes manquent cruellement

Ces constatations imposent de poursuivre les travaux cliniques et expérimentaux pour améliorer la prise en charge des infections.

La maîtrise des modèles expérimentaux et la mise au point de nouveaux modèles permettra :

- d'évaluer *in vivo* les rares nouvelles molécules anti-bactériennes en cours de développement.
- d'évaluer de nouveaux matériaux dont les propriétés antibactériennes pourraient prévenir ou faciliter le traitement des infections (prothèses avec traitement de surface, biomatériaux chargés d'antibiotiques, …)

Il est souhaitable, parallèlement de développer la recherche clinique concernant l'infection ostéo-articulaire de l'enfant. Les durées de traitement sont sans doute inadaptées (probablement trop longues), car les diagnostics

sont majoritairement précoces et car l'épidémiologie bactérienne a changé (prédominance probable de Kingella kingæ).

L'association au sein d'un laboratoire de recherche, de biologistes fondamentaux, de microbiologistes et de cliniciens est sans aucun doute une méthode efficace pour progresser et pour améliorer le traitement de nos patients et ainsi limiter les séquelles.

Bibliographie

Bibliographie

1. **Allen GP, Kaatz GW, Rybak MJ**. 2004. *In vitro* activities of mutant prevention concentration-targeted concentrations of fluoroquinolones against Staphylococcus aureus in a pharmacodynamic model. Int. J. Antimicrob. Agents 24:150-160.
2. **Amsterdam D**. 1996. Susceptibility testing of antibiotics in liquid media, p. 52-111. In V. Lorian (ed.), Antibiotics in laboratory medicine, 4th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD.
3. **Andes DR, Craig WA**. 1998. Pharmacodynamics of fluoroquinolones in experimental models of endocarditis. Clin. Infect. Dis. 27:47-50.
4. **Andriole VT, Nagel DA, Southwick WO**. 1974. Chronic staphylococcal osteomyelitis: an experimental model.Yale J Biol Med. 47:33-9.
5. **Appelbaum PC**. 2006. The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin –resistant Staphylococcus aureus. Clin Microbiol Infect.12 : 16-23
6. **Arens S, Eijer H, Schegel U, Printzen G, Perren SM, Hansis M**. 1999. Influence of the design for fixation implants on local infection. An experimental study of DC-plates vs. Point-contact-fixators in rabbits. J Orthop Trauma. 13:470-473.
7. **Arens S, Schlegel U, Printzen G, Ziegler WJ, Perren SM, Hansis M**. 1996. Influence of the materials for fracture fixation implants on the development of local infection. An experimental study of steel vs. Titanium DC-plates in rabbits. J Bone Joint Surg. 78B:647-651.
8. **Argenson JN**. 1993. Etude de l'association vancomycine-tobramycine et ciment orthopédique (diffusion, propriétés mécaniques, efficacité). Ph.D thesis. UFR de Medecine, University of Marseille, Marseille, France.
9. **Barton L, Dunkle L, Habib F**.1987 . Septic arthritis in childhood, a 13 years' review. Am J Dis Child. 14 : 898-900.

10. **Batard E, Jacqueline C, Boutoille D, Hamel A, Drugeon HB, Asseray N, Leclercq R, Caillon J, Potel G, Bugnon D**. 2002. Combination of quinupristin-dalfopristin and gentamicin against methicillin-resistant Staphylococcus aureus: experimental rabbit endocarditis study. Antimicrob. Agents Chemother. 46 :2174-8.
11. **Benoit MA, Mousset B, Delloye C, Bouillet R, Gillard J**. 1997. 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. 21:403-408.
12. **Besnier JM, Leport C**. 1990. effect of antibiotics on bacterial adherence to foreign material Pathol Biol (Paris). 38:243-248.
13. **Bracq H**. 2003. Physiopathologie de l'infection ostéo-articulaire. In les infections ostéo-articulaires de l'enfant. Sauramps Médical (Montpellier, France), 41-4
14. **Bremell T**. 1999. Experimental models of infectious arthritis. In Handbook of animals models of infection. Academic Press, : 539-547.
15. **Brouqui P, Rousseau MC, Stein A, Drancourt M, Raoult D**. 1995. Treatment of Pseudomonas æruginosa infected orthopedic prostheses with ceftazidime-ciprofloxacin antibiotic combination. Antimicrob Âgents Chemother. 39:2423-2425.
16. **Bugnon D, Potel G, Caillon J, Baron D, Drugeon HB, Feigel P, Kergueris MF**. 1998. *In vivo* simulation of human pharmacokinetics in the rabbit. Bull. Math. Biol. 60:545-567.
17. **Cahuzac JP**. 1973. Contribution à l'étude de la vascularisation des épiphyses chez le fœtus. Thèse pour le doctorat d'état en médecine. Faculté de médecine. Université de Toulouse III, : 139p.
18. **Chotel F**. 2003. L'épiphyse et l'infection, physiopathologie et séquelles. In la pathologie épiphysaire de l'enfant. Sauramps Médical (Montpellier, France), : 83-96
19. Conférence de consensus concernant les infections bactériennes ostéo-articulaires. 1991. In Med Mal Infect, 20 : 37-44
20. **Cremieux AC, Carbon C**. 1997. Experimental models of bone and prosthetic joint infections. Clin Infect Dis 25 : 1295-1302.

21. **Crenshaw AH**. 1971. In Campbell's operative Orthopedics St Louis, CV Mosby, : p. 963
22. **Crock HV**. 1962. The arterial supply and venous drainage of the bones of the human knee joint. Anat. Rec., 144 : 199-218
23. **Curtiss PH, Klein L**. 1965. Destruction of articular cartilage in septic arthritis. II *in vivo* studies. J Bone Joint Surg. 47-A : 1595-1604
24. **Damsin JP, Djenadi K, Josset P, Wioland M**. 1996. Cartilage de croissance et croissance en orthopédie. Encycl. Méd. Chir. (Elsevier, Paris), appareil locomoteur I, 14009 a10 : 13p.
25. **Dan M, Keynan O, Feldbrin Z, Poch F**. 2004. Concentrations of moxifloxacin in serum and synovial fluid, and ex-vivo bacterial activity against arthritis-causing pathogens. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 48:283-286.
26. **Daniel D, Akeson W, Amiel D, Ryder M, Boyer J**. 1976. Lavage of septic joints in rabbits : effects of chondrolysis. J Bone Joint Surg. 58-A: 393-395.
27. **Del Nozal MJ, Bernal JL, Pampliega A, Marinero P, Lopez ML, Coco R**. 1996. High-performance liquid chromatographic determination of vancomycin in rabbit serum, vitreous and aqueous humour after intravitreal injection of the drug. J. Chromatogr. 727:231-238.
28. **Dhawan WK, Bayer AS, Yeaman MR**. 2000. Thrombin-induced platelet microbicidal protein susceptibility phenotype influences the outcome of oxacillin prophylaxis and therapy of experimental Staphylococcus aureus endocarditis. Antimicrob. Agents Chemother. 44:3206-3209.
29. **Dimeglio A**. 1991. Orthopédie pédiatrique quotidienne. Sauramps Médical (Montpellier, France), 2ème édition, tome I :460 p.
30. **Dimeglio A, Pous JG, Bonnel F**. 1983 . Le cartilage de croissance. Encycl. Méd. Chir. (Elsevier, Paris), appareil locomoteur I, 14009 b10,: 10 p.
31. **Drancourt M, Stein A, Argenson JN, Roiron R, Groulier P, Raoult D**. 1997. Oral treatment of Staphylococcus spp. infected orthopaedic implants with fusidic acid or ofloxacin in combination with rifampicin. J. Antimicrob. Chemother. 39:235-240.

32. **Drew RH, Perfect JR, Srinath L, Kurkimilis E, Dowzicky M, Talbot GH**. 2000. Treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections with quinupristin-dalfopristin in patients intolerant of or failing prior therapy. For the Synercid Emergency-Use Study Group. J. Antimicrob. Chemother. 46 :775-84.
33. **Dufour P, Gillet Y, Bes M, Lina G, Vandenesch F, Floret D, Etienne J, Richet H**. 2002. Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in France: emergence of a single clone that produces Panton-Valentine leukocidin. Clin. Infect. Dis. 35 : 819-24.
34. **El Kouri D, Le Gallou F, Kenzi A, Trewick D, Baron D, Potel G**. 1998. Thérapeutique des infections à staphylocoques. Encycl. Med. Chir. 10:1-7.
35. **Engelberg I, Kohn J**. 1991. Physico-mechanical properties of degradable polymers using in medical applications: a comparative study. Biomaterials 12:292-304.
36. **Enneking WF, Horowitz M**.1972. The intra-articular effects of immobilization on the human knee. J Bone Joint Surg; 54-A : 973-985.
37. **Entenza JM, Que YA, Vouillamoz J, Glauser MP, Moreillon P**. 2001. Efficacies of moxifloxacin, ciprofloxacin, and vancomycin against experimental endocarditis due to methicillin-resistant Staphylococcus aureus expressing various degrees of ciprofloxacin resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 45:3076-3083.
38. **Firsov AA, SVostrov SN, Lubenko IY, Drlica K, Portnoy YA, Zinner SH**. 2003. *In vitro* pharmacodynamic evaluation of the mutant selection window hypothesis using four fluoroquinolones against Staphylococcus aureus. Antimicrob. Agents Chemother. 47:1604-1613.
39. **Fischer LP, Carret JP**. 1978. Vascularisation artérielle des os chez l'homme. Bul. Ass. Anat. 62(179) : 59-92
40. **Friess W**. 1998. Collagen-biomaterial for drug delivery. Eur J Parm Biopharm. 45 : 113-136.
41. **Frippiat F, Meunier F, Derue G**. 2004. Place of newer quinolones and rifampicin in the treatment of gram-positive bone and joint infections. J. Antimicrob. Chemother. 54:1158.

42. **Gautier H, Merle C, Auget JL, Daculsi G**. 2000. Isostatic compression, a new process for incorporating vancomycin into biphasic calcium phosphate: comparison with a classical method. Biomaterials 21:243-249.
43. **Gautier H, Daculsi G, Merle C**. 2001. Association of vancomycin and calcium phosphate by dynamic compaction: *in vitro* characterization and microbiological activity. Biomaterials 22:2481-2487.
44. **Gautier H, Caillon J, Le Ray AM, Daculsi G, Merle C**. 2000. Influence of isostatic compression on the stability of vancomycin loaded with a calcium phosphate-implantable drug delivery device. J. Biomed. Mater. Res. 52:308-314.
45. **Gentry LO, Rodriguez-Gomez G**. 1991. Ofloxacin versus parenteral therapy for chronic osteomyelitis. Antimicrob. Agents Chemother. 35:538-541.
46. **Glorion C**. 1994. Arthrites septiques de l'enfant. Rev Prat; 44 : 2581-2586.
47. **Glorion C, Palomo J, Bronfen C, Touzet P, Padovani JP, Rigault P**. 1993. Les arthrites aiguës infectieuses du genou de l'enfant, pronostic et discussion thérapeutique à propos de 51 cas ayant un recul moyen de 5 ans. Rev Chir Orthop Réparatrice Appar Mot. 79 : 650-660.
48. **Goldenberg DL**. 1998. Septic arthritis. Lancet 351:197-202.
49. **Gonzalez BE, Martinez-Aguilar G, Hulten KG,. Hammerman WA, Coss-Bu J, Avalos-Mishaan A, Mason EO Jr, Kaplan SL**. 2005. Severe Staphylococcal sepsis in adolescents in the era of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Pediatrics. 115 : 642-8.
50. **Gracia E, Lacleriga A, Monzon M, Leiva J, Oteiza C, Amorena B**. Application of a rat osteomyelitis model to compare *in vivo* and *in vitro* the antibiotic efficacy against bacteria with high capacity to form biofilms. J Surg Res. 1998;79:146-153.
51. **Gristina AG, Costerston JW**. 1985. Bacterial adherence to biomaterials and tissues. The significance of its role in clinical sepsis. J Bone Joint Surg. 67A:264-273.

52. **Gupta MN, Sturrock RD, Field M**. 2001. A prospective 2-year study of 75 patients with adult-onset septic arthritis. Rheumatology 40:24-30.
53. **Guzman M, Molpeceres J, Garcia F, Aberturas MR**. 1996. Preparation, characterization and *in vitro* drug release of poly--caprolactone and hydroxypropylmethylcellulose phtalate ketoprophen loaded microspheres. J. Microencapsulation 13:25-39.
54. **Hamanishi C, Kitamoto K, Tanaka S, Otsuka M, Doi Y, Kitahashi T**. 1996. A self-setting TTCP-DCPD apatite cement for release of vancomycin. J. Biomed. Mater. Res. 33:139-143.
55. **Hamel A**. Embryologie et anatomie de la chondro-épiphyse. 2003. In la pathologie épiphysaire de l'enfant. Sauramps Médical (Montpellier, France): 13-20
56. **Hamel A**. 1998. La vascularisation artérielle des grosses apophyses du membre pelvien. Thèse pour le doctorat d'état en médecine. Faculté de médecine. Université de Nantes,: 90p.
57. **Hamel A, Caillon J, Jacqueline C, Batard E, Boutoille D, Bugnon D, Miégeville AF, Potel G**. 2000. Immobilization of the joint has no beneficial effect on the anti-microbial activity of oxacillin on a rabbit S. aureus arthritis experimental model. 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Toronto.
58. **Hamilton-Miller JM**. 2002. Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus : a real and present danger ? Infection.30:118-124.
59. **Hiramatsu K**. 1998. The emergence of Staphylococcus aureus with reduced susceptibility to vancomycin in Japan. Am J Med. 104:7S-10S
60. **Hutmacher D**. 1996. A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for GTR and GBR applications. Int. J. Oral Maxillofac. Implants 11:667-678.
61. **Ince D, Zhang X, Hooper DC**. 2003. Activity of and resistance to moxifloxacin in Staphylococcus aureus. Antimicrob. Agents Chemother. 47:1410-1415.
62. **Iooss P, Le Ray A.M, Grimandi G, Daculsi G, Merle C**. 2001. A new injectable bone substitute combining poly(-caprolactone) microparticles with biphasic calcium phosphate granules. Biomaterials 22:2785-2794.

63. **Jackson MA, Nelson JD**. 1982. Etiology and managment of accute suppurative bone and joint infections in pediatric patients. J Pediatr Orthop. 2 : 313-323.

64. **Jameela SR, Suma N, Jayakrishnan A**. 1997. Protein release from poly (-caprolactone) microspheres prepared by melt encapsulation and solvent evaporation techniques: a comparative study. J. Biomater. Sci. 8:457-466.

65. **Jansen B, Peters G**. 1993. Foreign body associeted infection. J Antimicrob Chemother.32 Suppl A:69-75.

66. **Johnson AH, Campbell WG, Callahan BC**. 1970. Infection of rabbit knee joints after intra-articular injection of Staphylococcus aureus. Comparison with joints infected with Staphylococcus albus. Am. J. Pathol. 60:165-203.

67. **Kanellakopoulou K, Galanakis N, Giamarellos-Bourboulis EJ, Rifiotis C, Papakostas K, Andreopoulos A, Dounis E, Karagianakos P, Giamarellou H**. 2000. Treatment of experimental osteomyelitis caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus with a biodegradable system of lactic acid polymer releasing pefloxacin. J Antimicrob Chemother. 46: 311-4.

68. **Le Ray AM, Chiffoleau S, Iooss P, Grimandi G, Gouyette A, Daculsi G, Merle C**. 2003. Vancomycin encapsulation in biodegradable poly(-caprolactone) microparticles for bone implantation. Influence of the formulation process on size, drug loading, *in vitro* release and cytocompatibility. Biomaterials 24:443-449.

69. **Lister PD**. 2001. Pharmocodynamics of moxifloxacin and levofloxacin against Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis in an *in vitro* pharmacodynamic model. Clin. Infect. Dis. 32(Suppl. 1):S33-S38.

70. **Lorian V**. 1991. Laboratory methods used to assess the activity of antimicrobial combinations, p. 434-444. In V. Lorian (ed.), Antibiotics in laboratory medecine, 3rd ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md.

71. **Lowry KJ, Hamson KR, Bear L, Peng YB, Calaluce R, Evans ML, Anglen JO, Allen WC**. 1997. Polycaprolactone/glass bioabsorbable implant in a rabbit humerus fracture model. J. Biomed. Mater. Res. 36:536-541.
72. **MacGowan AP**. 1999. Moxifloxacin (Bay 12-8039): a new methoxy quinolone antibacterial. Expert Opin. Investig. Drugs 8:181-199.
73. **Mader JT, Cantrell JS, Calhoun J**. 1990. Oral ciprofloxacin compared with standard parenteral antibiotic therapy for chronic osteomyelitis. 1990. J. Bone Joint Surg. Am. 72:104-110.
74. **Mader JT, Shirtliff ME**.1999. The rabbit model of bacterial osteolyelitis of the tibia. Academic Press, : 581-591.
75. **Melcher GA, Claudi B, Schlegel U, Perren SM, Printzen G, Munzinger J**. 1994. Influence of type of medullary nail on the development of local infection. An experimental study of solid and slotted nails in rabbits. J Bone Joint Surg. 76B:955-959.
76. **Menei P, Croué A, Daniel V, Pouplard-Barthelaix A, Benoît JP**. 1994. Fate and biocompatibility of three types of microspheres implanted into the brain. J. Biomed. Mater. Res. 28:1079-1085.
77. **Metzler K, Hansen GM, Hedlin P, E. Harding, Drlica K, Blondeau JM**. 2004. Comparison of minimal inhibitory and mutant prevention drug concentrations of four fluoroquinolones against clinical isolates of methicillin-susceptible and -resistant Staphylococcus aureus. Int. J. Antimicrob. Agents 24:161-167.
78. **Moellering RC**. 1999. Quinupristin/dalfopristin: therapeutic potential for vancomycin-resistant enterococcal infections, J Antimicrob Chemother 44 (Suppl. A) : 25–30.
79. **Monzon M, Garcia-Alvarez F, Lacleriga A, Amorena B**. 2002. Evaluation of four experimental osteomyelitis infection models by using precolonized implants and bacterial suspensions. Acta Orthop Scand. 73:11-19.

80. **Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K, Borchardt SM, Boxrud DJ, Etienne J, Johnson SK, Vandenesch F, Fridkin S, O'Boyle C, Danila RN, Lynfield R**. 2003. Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection. JAMA. 290 :2976-84.
81. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 4th ed. Approved standard M7-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
82. **Norden CW**. 1970. Experimental osteomyelitis I: a description of the model. J. Infect. Dis. 122:410-418.
83. **Norris SH**.1983. The diagnosis and managment of septic arthritis in children. J Antimicrob Chemother. 12 : 203-205
84. **O'Reily T, Mader JT**. 1999. Rat model of bacterial osteomyelitis of the tibia. In Handbook of animals models of infection. Academic Press, : 561-573.
85. **Paterson DL**. 2006. Clinical experience with recently approved antibiotics. Curr. Opin. Pharmacol. 6 :486-90
86. **Pitt CG, Chasalow FI, Hibionada YM, Klimas DM, Schindler A**. 1981. Aliphatic polyesters. I. The degradation of poly(-caprolactone) *in vivo*. J. Appl. Polym. Sci. 26:3779-3787.
87. **Pous JG, Dimeglio A, Baldet P, Bonnel F**. 1980. Cartilage de conjugaison et croissance, notions fondamentales en orthopédie. Doin (Paris, France),: 308 p.
88. **Rissing JP**. 1997. Antimicrobial therapy for chronic osteomyelitis in adults: role of the fluoroquinolones. Clin. Infect. Dis. 25:1327-1333.
89. **Saito T, Takeuchi R, Hirakawa K, Nagata N, Yoshida T, Koshino T, Okuda K, Takema M, Hori T**. 2002. Slow-releasing potential of vancomycin-loaded porous hydroxyapatite blocks implanted into MRSA osteomyelitis. J. Biomed. Mater. Res. 63:245-251.

90. **Saleh-Mghir A, Ameur N, Muller-Serieys C, Ismael F, Lemaitre F, Massias L, Feger C, Bleton R, Cremieux AC**. 2002 .Combination of quinupristin-dalfopristin (Synercid) and rifampin is highly in experimental Staphylococcus aureus joints prosthesis infection. Antimicrob. Agents Chemother. 46 : 1122-4

91. **Salter RB**. 1989. The biologic concept of continuous passive motion of synovial joints. The first 18 years of basic research and its clinical application. Clin Orthop; 242 : 12-25.

92. **Salter RB, Bell RS, Keeley FW**. 1981. The protective effect of continuous passive motion on living articular cartilage in acute septic arthritis. An experimental investigation in the rabbit. Clin Orthop. 159 : 223-247.

93. **Salter RB, Simmonds DF, Malcom BW, Rumble EJ, Mac Micheal D, Clements ND**.1972. The biological effect of continuous passive motion on the healing of full-thickness defects in articular cartilage. An experimental investigation in the rabbit. J Bone Joint Surg. 68-A : 1232-1251.

94. **Sambatakou H, Giamarellos-Bourboulis EJ, Grecka P, Chryssouli Z, Giamarellou H**. 1998. In-vitro activity and killing effect of quinupristin/ dalfopristin (RP59500) on nosocomial Staphylococcus aureus and interactions with rifampicin and ciprofloxacin against methicillin-resistant isolates, J Antimicrob Chemother. 41 : 349–355.

95. **Scott DM, Rotschafer JC, Behrens F.** 1988. Use of vancomycin and tobramycin polymethylmethacrylate impregnated beads in the management of chronic osteomyelitis. Drug Intell. Clin. Pharm. 22:480-483.

96. **Shaw BA, Kasser JR** . 1990. Acute septic arthritis in infancy and childhood. Clin Orthop; 257 : 212-225.

97. **Shirtliff ME, Mader TJ**. 2002. Acute septic arthritis. Clin. Microbiol. Rev. 15:527-544.

98. **Shirtliff ME, Calhoun JH, Mader JT**. 2002. Experimental osteomyelitis treatment with antibiotic impregnated hydroxyapatite. Clin. Orthop. 401:239-247.

99. **Sierra, J. M., J. G. Cabeza, M. Ruiz Chaler, T. Montero, J. Hernandez, J. Menza, M. Llagostera, J. Vila**. 2005. The selection of resistance to and the mutagenicity of different fluoroquinolones in Staphylococcus aureus and Streptococcus pneumoniae. Clin. Microbiol. Infect. 11:750-758.

100. **Smith RL, Schurman DJ, Kajiyama G Mell M, Gilkerson E**. 1987. The effect of the antibiotics on the destruction of the cartilage in experimental infectious arthritis. J Bone Joint Surg. 69-A : 1063-1068.

101. **Smith TL, Pearson ML, Wilcox KR , Cruz C, Lancaster MV, Robinson-Dunn B, Tenover FC, Zervos MJ, Band JD, White E, Jarvis WR**. 1999. Emergence of vancomycin resistance in Staphylococcus aureus glycopeptide-intermediate Staphylococcus aureus Working group. N Engl J Med. 340:493-501

102. **Stass H, Kubitza D**. 1999. Pharmacokinetics and elimination of moxifloxacin after oral and intravenous administration in man. J. Antimicrob. Chemother. 43(Suppl.B):83-90.

103. **Stein A, Bataille JF, Drancourt M, Curvale G, Argenson JN, Groulier P, Raoult D**. 1998. Ambulatory treatment of multidrug-resistant Staphylococcus-infected orthopedic implants with high-dose oral co-trimoxazole (trimethoprim-sulfamethoxazole). Antimicrob Âgents Chemother. 42:3086-3091.

104. **Stemberger A, Grimm H, Bader f, Rahn HD, Asherl R**. 1997. Eur J Surg Supl. 598 : 17-26

105. **Sullivan JT, Woodruff M, Lettieri J, Agarwal V, Krol GJ, Leese PT, Watson S, Heller AH**. 1999. Pharmacokinetics of a once-daily oral dose of moxifloxacin (Bay 12-8039), a new enantiomerically pure 8-methoxy quinolone. Antimicrob. Agents Chemother. 43:2793-2797.

106. **Tattevin P, Crémieux AC, Pottier P, Huten D, Carbon C**. 1998. Prosthetic joint infection : when can prosthesis salvage be considered ? Clin Infect Dis.29:292-295

107. **Teot L., Vannereau H**. Le cartilage de croissance. 1990. In les fractures des membres chez l'enfant. Clavert J.M., Métaizeau J.P. Sauramps Médical (Montpellier, France), 51-76

108. **Thies C**. 1981. Biodegradable polymers for parenteral administration. Int. J. Pharm. Technol. Prod. 2:25-32.

109. **Thomazeau H, Langlais F**. 1996. Relargage d'antibiotiques par implantation osseuse de phosphate tricalcique: Pharmacocinétique *in vitro* et *in vivo* de formes galéniques différentes. Chirurgie 121:663-666.

110. **Trueta J**. 1957. The normal vascular anatomy of the human femoral head during growth. J. Bone Joint Surg. 39b(2) : 358, 394

111. **Trueta J, Amato VP**. 1960. The vascular contribution to osteogenesis. Changes in the growth cartilage caused by experimentally induced ischaemia. J. Bone Joint Surg. 42b(3) : 571-587

112. **Trueta J, Little K**. 1960. The vascular contribution to osteogenesis. Studies with the electron microscope. J. Bone Joint Surg. 42b(2) : 367-376

113. **Vandenesch F, Etienne J**. 2004. How to prevent transmission of MRSA in the open community ? Euro Surveill. 9 : 5

114. **Verdier I, Gayet-Ageron A, Ploton C, Taylor P, Benito Y, Freydiere AM, Chotel F, Bérard J, Vanhems P, Vandenesch F**. 2005 . Contribution of a broad range polymerase chain reaction to the diagnosis of osteoarticular infections caused by Kingella kingae: description of twenty-four recent pediatric diagnoses. Pediatr Infect Dis J. 24:692-6.

115. **Weber JT**. 2005. Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Clin. Infect. Dis. 41(Suppl. 4):S269-S272.

116. **Weiss P, Gauthier H, Bouler JM, Grimandi G, Daculsi G**. 1999. Injectable bone substitute using a hydrophilic polymer. Bone 25(Suppl. 2):67S-70S.

117. **Wilson NIL, Di Paola M** . 1986. Acute septic arthritis in infancy and childhood, 10 years' experience. J Bone Joint Surg . 68-B : 584-587.

118. **Wise R, Andrews JM, Marshall G, Hartman G**. 1999. Pharmacokinetics and inflammatory-fluid penetration of moxifloxacin following oral or intravenous administration. Antimicrob. Agents Chemother. 43:1508-1510.

119. **Wood MJ**. 1996. The comparative efficacy and safety of teicoplanin and vancomycin. J Antimicrob Chemother. 37 : 209-22

120. **Xiong YQ, Potel G, Caillon J, Stephant G, Jehl F, Bugnon D, Le Conte P, Baron D, Drugeon HB**. 1995. Comparative efficacies of ciprofloxacin and pefloxacin alone or in combination with fosfomycin in experimental endocarditis induced by multidrug-susceptible and -resistant Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob. Agents Chemother. 39:496-499.

121. **Yenice I, Calis S, Atilla B, Kas HS, Ozalp M, Ekizoglu M, Ilgili H, Hincal A**. 2003. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the efficiency of teicoplanin-loaded biodegradable microparticles formulated for implantation to infected bone defects. J. Microencapsul. 20:705-717.

122. **Yin LY, Lazzarini L, Li F, Stevens CM, Calhoun JH**. 2005. Comparative evaluation of tigeciline and vancomycin, with and without rifampicin, in the treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus experimental osteomyelitis in a rabbit model. J Antimicrob Chemother. 55:995-1002.

123. **Youan BBC., Benoit MA, Baras B, Riveau G, Gillard J**. 1997. Poly(-caprolactone) microparticles containing muramyl dipeptide for oral controlled release of adjuvant. J. Control. Release 48:339.

124. **Zimmerli W, Widmer AF, Blatter M, Frei R, Ochsner PE**. 1998. Role of rifampin for treatment of orthopedic implant-related staphylococcal infections: a randomized controlled trial. Foreign-Body Infection (FBI) Study Group. J.A.M.A. 279 :1537-41.

Contributions Cliniques et Expérimentales à l'Etude des Infections Ostéo-Articulaires de l'Enfant

Résumé : l'infection ostéo-articulaire de l'enfant constitue un challenge diagnostique et thérapeutique pour l'orthopédiste pédiatre, car elle peut être responsable de séquelles majeures. L'expérimentation animale a permis d'évaluer de nouvelles molécules actives contre les souches communautaires émergentes de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline et contre les souches émergentes résistantes à la vancomycine. La mise au point de nouveaux modèles d'infections a permis d'évaluer des modes d'administration des antibiotiques et d'évaluer des pratiques chirurgicales dans le traitement des infections osseuses avec et sans matériel. L'expérimentation animale et une étude clinique ont également permis d'évaluer le rôle de l'immobilisation dans le traitement des arthrites septiques de l'enfant.

Mots-Clés : arthrite, ostéomyélite, ostéite, *Staphylococcus aureus*, modèle animal, immobilisation, enfant

Clinical and Experimental Contributions to Bone and Joint Infections Study in Children

Summary : Bone and joint infection is a diagnostic and therapeutic challenge for pædiatric surgeon as it may be source of major functional sequellæ. Animal experimentation has contributed to evaluate new molecules active against community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains and against emerging vancomycin resistant *Staphylococcus* strains. Development of new animal models has led to evaluate different modes of antbiotics administration and to assess surgical pratices used for managment of bone infections, with or without orthopædic device. Animal experimentation and a clinical study have also contributed to clarify the role of immobilization in the treatment of septic arthritis in children.

Key words : arthritis, osteomyelitis, *Staphylococcus aureus*, animal model, immobilization, children

Antoine Hamel
Laboratoire d'Anatomie
Faculté de Médecine de Nantes
Rue Gaston Veil, 44035 Nantes cedex

Service de Chirurgie Infantile
Centre Hospitalier Universitaire de Nantes
Quai Moncousu, 44093 Nantes cedex