

**ÉCOLE DOCTORALE - Sciences Santé et Technologie**

**Equipe d'Accueil 3854 – « Agents Transmissibles et Infectiologie », UFR Médecine,  
Université François Rabelais, Tours**

**THÈSE** présentée par :

**Saïd ZAYANE**

Soutenue le : **13 décembre 2010**

Pour obtenir le grade de :

**Docteur de l'Université François Rabelais de Tours**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

**Evaluation des granules de phosphate dicalcique di-hydraté-  
phosphate tricalcique  $\beta$ -gentamicine dans le traitement local  
de l'ostéite expérimentale à *staphylococcus aureus***

**THÈSE dirigée par :**

**M. BESNIER Jean Marc**  
**M. ROSSET Philippe**

Professeur, Université François Rabelais, Tours  
Professeur, Université François Rabelais, Tours

**RAPPORTEURS :**

**M. CHAVANET Pascal**  
**M. THOMAZEAU Hervé**

Professeur, Université de Bourgogne, Dijon  
Professeur, Université de Rennes

**JURY :**

**M. BARROUG Allal**  
**M. BESNIER Jean Marc**  
**M. CHAVANET Pascal**  
**M. IRAQI Moulay Ahmed**  
**Mme LE GUELLEC Chantal**  
**M. QUENTIN Roland**  
**M. ROSSET Philippe**  
**M. THOMAZEAU Hervé**

Professeur, Université Cadi Ayyad, Marrakech  
Professeur, Université François Rabelais, Tours  
Professeur, Université de Bourgogne, Dijon  
Professeur, Université Hassan II, Casablanca  
Maître de Conférences, Université François Rabelais, Tours  
Professeur, Université François Rabelais, Tours  
Professeur, Université François Rabelais, Tours  
Professeur, Université de Rennes I

*Je dédie ce travail à...*

*Mouna, Ali et Youssef pour leur patience,*

*Mes parents*

*Mes frères*

*Toute ma famille*

*Mes amis*

*Toutes celles et ceux qui me sont chers.*

*Mon grand père qui aurait souhaité lire ce travail,*

*Qu'il repose en paix.*

## *Remerciements à...*

***Monsieur le Professeur Jean Marc Besnier, mon directeur de thèse,***

Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Chef du service de Maladies infectieuses au CHRU Bretonneau, Tours;

Vous m'avez aidé dans la conception de ce travail. Vous avez suivi de près toutes les étapes de sa réalisation et vous m'avez encouragé dans les moments de doute... Même après votre maladie, vous n'avez épargné aucun effort pour m'aider dans la rédaction de cette thèse et des articles qui en sont issus. Votre clairvoyance est pour moi un exemple et n'a d'égal que vos immenses qualités humaines et professionnelles. Je vous souhaite un prompt rétablissement. Soyez assuré de ma reconnaissance, de mon estime et de mon profond respect.

***Monsieur le Professeur Philippe Rosset, mon co-directeur de thèse***

Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Chef du service de chirurgie Orthopédique et Traumatologique 2 au CHRU Trousseau-Tours et Responsable du CRIOGO, Centre de référence des infections ostéo-articulaires du grand-Ouest en France;

Vous m'avez aidé dans la conception de ce travail et vous n'avez épargné aucun conseil utile. Vos réflexions étaient toujours d'une grande aide pour moi.

Soyez assuré de mon profond respect.

***Monsieur le Professeur Roland Quentin,***

Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Chef du Laboratoire de Bactériologie et d'Hygiène Hospitalière au CHRU Trousseau-Tours, Responsable de l'Equipe de Recherche EA3854, de l'Institut Fédératif de Recherche, IFR 136;

Vous m'avez ouvert grandes les portes de votre laboratoire et facilité mon accès aux autres structures de recherche. Ceci m'a permis de réaliser mes expérimentations dans de très bonnes conditions techniques.

Vous m'avez aidé sans compter dans la rédaction des articles issus de ce travail;

Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

***Monsieur le Professeur Pascal Chavanet***

Professeur des Universités, Praticien Hospitalier;

Chef du Département d'Infectiologie au CHU de Dijon,

Professeur de Maladies infectieuses à l'Université de Bourgogne, Dijon,

Vous me faites l'honneur d'accepter de juger ce travail et d'en être rapporteur,

Soyez assuré de mon grand respect et de ma sincère reconnaissance.

***Monsieur le Professeur Hervé Thomazeau***

Professeur des Universités, Praticien Hospitalier dans le Service de Chirurgie Orthopédique et Réparatrice au CHRU de Rennes;

Vous avez été un de mes illustres maîtres en chirurgie orthopédique et traumatologique lors de ma formation chirurgicale et mon DEA à Rennes. Vous me faites l'honneur et un immense plaisir d'accepter de juger ce travail et d'en être rapporteur;

Soyez assurés, cher maître, de mon grand respect et de ma sincère reconnaissance.

***Monsieur le Professeur Moulay Ahmed Iraqi,***

Professeur d'Enseignement supérieur;

Chef du Service d'Anatomopathologie au CHRU Ibn Rochd de Casablanca;

Président de la Société Marocaine des Sciences Médicales;

Ancien Ministre de l'Ecologie et de la Protection de l'Environnement du Royaume du Maroc;

Vous me faites l'immense honneur d'accepter de faire partie du jury de mon travail de thèse d'Université, après avoir fait partie de celui de ma thèse de Doctorat en Médecine;

Vous m'avez appris les bases de l'Anatomopathologie;

Soyez assuré, cher maître, de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

***Madame le Docteur Chantal le Guellec,***

Maître de Conférences Universitaire, Praticien Hospitalier (MCU-PH) au Laboratoire de Pharmacologie Clinique CHRU Bretonneau;

Tes conseils avisés en pharmacologie, aussi bien pour les "manip" que pour l'exploration des résultats m'ont été d'une grande utilité tout au long de ce travail, qui est aussi le tien,

Sois assurée de ma sincère reconnaissance,

Reçois toute mon amitié.

***Madame le Docteur Nathalie van der Mee-Marquet,***

Praticien Hospitalier, Laboratoire de Bactériologie et d'Hygiène Hospitalière au CHRU Trousseau, Tours; Responsable du réseau des Hygiénistes du Centre de la France.

Pour tes conseils avisés le long de toutes les étapes expérimentales au sein du Laboratoire de Bactériologie et d'Hygiène Hospitalière;

Pour ton aide précieuse dans la discussion des résultats de Bactériologie;

Sois assurée de mon amitié sincère et de ma reconnaissance profonde.

***Monsieur le Professeur Gonzague de Pinieux,***

Professeur des Universités, Praticien Hospitalier au Laboratoire d'anatomopathologie du CHRU Trousseau à Tours;

Pour votre aide précieuse pour la conception de ce travail dans sa partie anatomopathologique. Vous avez consacré beaucoup de votre temps pour faire réaliser soigneusement les lames et pour leur lecture et interprétation. Vous m'avez appris les bases utiles de l'anatomopathologie de l'infection osseuse. Merci pour la qualité des photos;

Votre gentillesse et disponibilité n'ont d'égal que votre professionnalisme;

Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

***Monsieur le Professeur Allal Barroug,***

Professeur de l'Enseignement Supérieur; Département de Chimie à la Faculté des Sciences Semlalia de l'Université Cadi Ayyad à Marrakech;

Tu me fais l'honneur d'accepter de juger mon travail;

Sois assuré de ma profonde gratitude et de ma sincère amitié.

***Madame Joëlle Loulergue,***

Praticien Hospitalier, Laboratoire de Bactériologie et d'Hygiène Hospitalière au CHRU Trousseau, Tours;

Vous m'avez appris comment réaliser les comptes bactériens, comment les interpréter, quel test faut-il faire et à quel moment... Votre aide pour la conception et la réalisation de ce travail dans son volet bactériologique m'a été d'une grande utilité;

Votre gentillesse n'a d'égal que votre disponibilité, votre dynamisme et vos grandes qualités professionnelles,

Soyez assurée, Madame, de ma profonde gratitude.

***Monsieur Pierre Yves Sizaret,***

Ingénieur en Microscopie Electronique

Vous avez été d'une grande aide pour la réalisation de l'étude des échantillons en microscopie électronique et pour la rédaction de la partie correspondante.

Je garde de vous un très bon souvenir;

Soyez assuré de ma sincère reconnaissance.

***Monsieur David Ternant,***

Doctorant en Pharmacologie;

Ton aide pour les "manip" des dosages de la gentamicine m'ont été d'une grande aide. Tu étais un bon compagnon des "soirées d'expérimentation". Je garde de toi un très bon souvenir,

Reçois mon amitié.

***Monsieur Nicolas Guéna,***

Directeur des Laboratoires Kasios,

Votre aide pour la conception des granules de Dicalcium Phosphate- $\beta$ -Tricalcium Phosphate (DCPD- $\beta$ -TCP) nous a été précieuse;

Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

***Monsieur Alain Lerch***

Chimiste, Directeur associé des Laboratoires Kasios  
Votre aide pour la conception et la fabrication des granules de DCPD-β-TCP nous a été précieuse;  
Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

***Madame Juliette Cognie***

Ingénieur-chercheur agronome à l'INRA, Nouzilly, Tours,  
Vous m'avez été d'une aide très importante dans l'établissement des protocoles chirurgicaux chez le lapin;  
Soyez assurée de ma profonde reconnaissance et de ma sincère amitié.

***A Toute l'Equipe de l'INRA***

François Paulmier, Gilles Gomont, Jacques Limouzin, Christian Moussu, Luc Perrigouard, Jean Paul Petit, Jean Philippe Dubois de l'unité Physiologie, A Jacques Auger et Philippe Vincent de l'Animalerie;  
Votre aide pour la réalisation des expérimentations animales était très précieuse. La réalisation de l'anesthésie du lapin et sa surveillance, la réalisation des radiographies, des prélèvements sanguins et urinaires, et la veille quotidienne sur les lapins a permis de cette recherche d'aller au bout et à ce travail d'exister.  
Je tiens à vous exprimer ma reconnaissance pour votre professionnalisme et gentillesse.

***Aux techniciennes de Microbiologie du Laboratoire de Bactériologie et d'Hygiène Hospitalière du CHRU Trousseau, Tours,***

Marie-Dominique Poty, Marie-Pierre Goulot, Marie-Christine Bernard, Laurence Arnault, Valérie Touzalin, Christine Bouvet.  
Merci à toutes pour votre gentillesse et pour avoir bien voulu me laisser une place aux paillasses pour les expérimentations bactériologiques malgré l'exiguïté des lieux. Je tiens à vous exprimer mon admiration pour votre professionnalisme.  
A Patricia pour la commande efficace et rapide du matériel nécessaire aux expérimentations,  
A Béatrice pour sa sympathie et son efficacité, à Dominique pour le café de 6H 30 du matin...  
Merci pour tout.

***Mes compagnons de recherche et des années de clinicat à Tours,***

Anne Sophie, Mazen, Jean François, Hélène, David et Mohammed,  
Merci à toutes et à tous pour votre solidarité  
Recevez l'expression de mes amitiés sincères.  
Avec mes meilleurs souvenirs.

***Mes maîtres,***

Monsieur le Professeur Jean Louis Husson, Monsieur le Docteur Fattah Missouri,  
Monsieur le Docteur Patrick Chatelier, du Service d'Orthopédie-Traumatologie A, du CHRU de Rennes;  
Monsieur le Professeur Frantz Langlais, Monsieur le Professeur Hervé Thomazeau, Monsieur le Docteur Jean Christophe Lambotte du Service de Chirurgie Orthopédique et Réparatrice du CHRU de Rennes;  
Monsieur le Professeur Christian Bonnard, Monsieur le Docteur Benoît de Courtivron, du Service de Chirurgie Orthopédique Infantile du CHRU Clocheville de Tours;  
Qui ont contribué à ma formation en Chirurgie Orthopédique et Traumatologique Adulte (CHRU de Rennes) et Infantile (CHRU de Tours).

***Mon maître feu Monsieur le Professeur Frantz Langlais,***

Ancien Chef du Service de Chirurgie Orthopédique et  
Réparatrice au CHRU de Rennes;  
Qui m'a initié à la recherche fondamentale,  
Disparu tragiquement et prématurément,  
Que son âme repose en paix.

## Abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique (DNA)  
AG ou APG : Acide Glycolique ou Polymère d'acide glycolique ou PolyGlycolique (GLA ou PGA : Glycolic Acid ou Polyglycolic Acid)  
APA : Acide PolyAcrylique; PAA : Polyacrilique Acid  
ARN : Acide Ribonucléique (RNA)  
CB : Comptes Bactériens; BC : Bacterial count  
CPC : Ciment phosphocalcique ; Calcium Phosphate Cement  
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice (MIC: Minimum Inhibitory Concentration)  
Da : Dalton  
DCPD- $\beta$ -TCP : Phosphate dicalcique-Phosphate tricalcique  $\beta$  ou Dicalcium Phosphate- $\beta$ -Tricalcium Phosphate  
DDS : Drug Delivery System; VM: Vecteur de Médicaments  
EMIT : Technique Immuno-Enzymatique (de dosage pharmacologique)  
FDR : Facteurs de risque  
G : Gauge (Aiguille 23 Gauge)  
GEN : Gentamicine; Gentamicin  
HA : Hydroxyapatite  
HIV : Human Immunodeficiency Virus  
IM : Intra-musculaire  
IRM ou RMN : Imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire  
MCPM : Phosphate monocalcique monohydraté  
mg : Milligramme  
ml: Millilitre  
MPa : MégaPascal  
OM : Ostéomyélite; Osteomyelitis  
OMA : Ostéomyélite aiguë  
OMC : Ostéomyélite chronique  
ORL : Oto-Rhino-Laryngologique  
PAL : Polymère d'Acide Lactique; PLA : Polymer of Lactic acid  
PAL-AG : Polymère-copolymère d'acide Lactique et d'acide Glycolique; PLA-GLA : Polymères et copolymères  
PBS : Phosphate Buffer Saline  
PFGE : Pulsed-field gel electrophoresis typing; Typage par électrophorèse en champ pulsé  
PHB-PHV : Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)  
PHBV : Hydroxybutiric-co-hydroxyvaleric acid  
PMMA : Polyméthacrylate de méthyl; Polymethylmethacrylate  
PTH : Prothèse Totale de Hanche  
PTG : Prothèse Totale du Genou  
SARM : Staphylocoque Aureus Résistant à la Méthicilline  
SCV : Small Colony Variant  
SG : Sulfate de gentamicine  
STS : Sulfate de Tetradecyl Sodique; Sodium Tetradecyl Sulfate  
TCP : Tricalcium Phosphate- $\beta$ ;  $\beta$ -TriCalcium Phosphate ( $\beta$ -TCP)  
TDM : Tomodensitométrie  
UFC : Unités Formant Colonie; CFU : Colony Forming Unit.  
VAL: Vecteur d'antibiothérapie locale; LADS : Local Antibiotic Delivery System (LADS)

## Résumé

Le traitement antibiotique local de l'infection osseuse par le polyméthacrylate de méthyle (PMMA), chargé de gentamicine ou de tobramycine, montre actuellement des limites. Ses inconvénients sont liés à la non résorbabilité du PMMA et à la rétention d'une grande partie de l'antibiotique intégré au PMMA. L'association fréquente à l'infection de pertes de substance osseuse a favorisé la recherche de vecteurs d'antibiothérapie locale, alternative au PMMA, parmi les substituts de comblement osseux résorbables et ostéoconducteurs. Les ciments phosphocalciques (CPCs) pourraient devenir parmi les plus performants dans cette utilisation. Ils sont biocompatibles et offrent avec le phosphate dicalcique di-hydraté-phosphate tricalcique  $\beta$  (DCPD- $\beta$ -TCP), un CPC, la possibilité d'obtention d'un mélange DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine à une température de 43°C n'altérant pas l'antibiotique, contrairement aux céramiques phosphocalciques qui sont fabriquées par frittage à très haute température. Le but de notre travail était de tester *in vitro* (élution d'antibiotique) et *in vivo* (essai de traitement d'une ostéite expérimentale) le DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine comme alternative possible au PMMA-gentamicine.

L'élution *in vitro* de gentamicine par six échantillons de granules de 2 à 3 mm de DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine [2 quantités -300 et 600 mg de granules- issues de 3 pâtes de ciment de concentrations 1% (10 mg de gentamicine / g de DCPD- $\beta$ -TCP), 2% (20 mg/g) et 3% (30 mg/g)] a été évaluée. Le but était de choisir, pour l'expérimentation *in vivo*, la ou les préparations présentant la meilleure cinétique de relargage de la gentamicine. Nous avons également vérifié la non-altération de la gentamicine, éluee *in vitro*, par le mélange initial de celle-ci avec le DCPD- $\beta$ -TCP, en testant son activité antibactérienne vis-à-vis d'une souche de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. La biocompatibilité et l'ostéoconduction du DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine ont été vérifiées chez le lapin, d'abord en site osseux tibial non infecté, puis en site osseux infecté à *S. aureus* méthicilline-sensible. La toxicité, par diffusion systémique importante éventuelle, de la gentamicine implantée localement, a été vérifiée. Pendant cette phase d'essais préliminaires –indispensables- nous avons développé notre modèle d'ostéite, inspiré de celui de Norden, afin de le valider pour les expérimentations suivantes. Nous avons enfin réalisé notre essai thérapeutique expérimental sur un modèle d'infection validé, avec ses caractéristiques cliniques, radiologiques, bactériologiques et histopathologiques. Le DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine a été comparé au PMMA-gentamicine.

Le meilleur profil de cinétique de relargage *in vitro* a été obtenu avec le DCPD- $\beta$ -TCP- 600 -1% (600 mg de granules de DCPD- $\beta$ -TCP chargés de 1% de gentamicine). Cette préparation a élué des concentrations de gentamicine supérieures à la CMI (de gentamicine

vis-à-vis de *S. aureus*, 1 µg/ml) pendant 42 jours et supérieures à 10 fois la CMI pendant les 7 premiers jours. A partir du 6<sup>ème</sup> jour, le DCPD-β-TCP- 600 -1% (chargé de 6 mg de gentamicine) éluait des quantités de gentamicine plus élevées que celles éluées par le DCPD-β-TCP- 600 -2% (600 mg de granules de DCPD-β-TCP, chargés de 2% de gentamicine, 12 mg) et par le DCPD-β-TCP- 600 -3% (600 mg de granules de DCPD-β-TCP, chargés de 3% de gentamicine, 18 mg). La conservation de l'activité antibactérienne de la gentamicine éluée à partir du DCPD-β-TCP-gentamicine a été confirmée. Le DCPD-β-TCP- 600 -1% a été choisi pour être testé *in vivo*. Les tests préliminaires *in vivo* ont confirmé la biocompatibilité et l'ostéoconduction du DCPD-β-TCP-gentamicine et l'absence de toxicité locale ou générale de la gentamicine. La validation du modèle nous a permis de vérifier que, sur le plan histopathologique, l'infection créée était toujours aiguë, même après six semaines d'évolution naturelle. Des lésions chroniques –réaction au produit sclérosant utilisé pour la création du modèle- ont été retrouvées en périphérie de la lésion centrale constituée par un abcès. La nécessité d'obtenir une infection localisée, adaptée pour tester un traitement local, nous a conduits à proposer une nouvelle classification radiologique améliorant celle de Mader. Elle devrait permettre d'éliminer les pandiaphysites au moment de la randomisation. La parfaite maîtrise des détails de l'induction de l'infection osseuse expérimentale devrait permettre de restreindre le nombre d'animaux à utiliser. La comparaison du DCPD-β-TCP- 600 -1% et du PMMA-300-2% (300 mg de granules de PMMA, chargés de 2% de gentamicine) a montré une guérison bactériologique comparable de l'ostéite expérimentale pour les 2 biomatériaux (dans l'ordre 4 lapins 5 vs. 3 lapins sur 5;  $P > 0.05$ ), mais nettement supérieure au lavage-curetage seul et au contrôle ( $P = 0,0003$ ). La constatation clinique et l'évaluation radiologique ont mis en évidence une meilleure tolérance du DCPD-β-TCP par rapport au PMMA ( $p = 0,05$ ) et une meilleure reconstruction osseuse obtenue avec le premier qu'avec le second biomatériau ( $P = 0.025$ ). Ces résultats ont été confirmés par l'anatomopathologie.

L'ensemble de ces données suggère que le DCPD-β-TCP- 600 -1% est efficace pour traiter une infection localisée par contact direct avec les niches bactériennes propres à l'ostéite chronique. Ces niches constituent le principal obstacle à la pénétration de l'antibiothérapie systémique dans le tissu osseux. Le DCPD-β-TCP- 600 -1% offrirait une véritable alternative au PMMA-gentamicine, en particulier dans les indications du traitement par antibiothérapie locale curative. La résorbabilité à long terme du DCPD-β-TCP mérite d'être vérifiée par une étude avec un plus long recul. Cependant, la biocompatibilité du DCPD-β-TCP, sa résorption partielle, ses propriétés ostéoconductrices – mais surtout finalement sa nature phosphocalcique proche de la constitution du minéral osseux – lui permettant d'être intégré

dans le tissu osseux devraient lui permettre d'être utilisé dans des essais cliniques. L'efficacité du faible dosage DCPD- $\beta$ -TCP- 600 – gentamicine 1% *in vitro* et son efficacité *in vivo* pourrait permettre de traiter des infections osseuses même étendues, après un curetage carcinologique des séquestres, sans la crainte de toxicité.

Mots-clés: Ostéites, ostéomyélites, antibiothérapie locale, ciments phosphocalciques, granules.

## Résumé en Anglais (Abstract)

Local treatment of osteomyelitis is generally based on the use of gentamicin- (or tobramycin-) loaded polymethylmethacrylate (PMMA). These two aminoglycosides are effective against most cultured orthopedic microorganisms, including *Staphylococcus aureus*, the most frequent cause of infection. The extensive use of PMMA as a Local Antibiotic Delivery System (LADS) has various disadvantages. Firstly, only a small proportion (about 5 to 17%) of the antibiotic is released by the cement (trapping effect). Secondly, the most significant problem is that PMMA is not resorbable and presents a physical obstacle to osteogenesis. A second surgical operation is therefore always required to remove the PMMA and to fill the cavity caused by bone loss with a bone graft or a synthetic substitute. Several biodegradable synthetic substitutes, such as calcium phosphate ceramics, calcium sulfate, and polymers of polylactic-polyglycolic acids, have been investigated as antibiotic carriers. These synthetic substitutes are largely underused as LADS in clinical practice. Polymers are not perfectly biocompatible, and ceramics provide a burst release of antibiotics as a consequence of their manufacturing techniques (Antibiotic uptake onto the carrier, after sintering of the carrier at high temperatures, 1000-1200°C).

We have developed a possible alternative to gentamicin-loaded PMMA for local treatment of osteomyelitis in the form of novel calcium phosphate cement (CPC): dicalcium phosphate dihydrate- $\beta$ -tricalcium phosphate (DCPD- $\beta$ -TCP). The biocompatibility of such a cement has been demonstrated experimentally and has been clinically confirmed for the treatment of burst fractures and for filling bone cavities in osteoporotic fractures. DCPD- $\beta$ -TCP is made in granules from 2 to 3 mm in diameter to avoid the superficial “creeping substitution” observed when DCPD- $\beta$ -TCP is used as a cement block.

We first tested six preparations *in vitro*: 2 quantities of granules (300 mg and 600 mg), each loaded with 3 concentrations of gentamicin (1% (10 mg/g), 2% (20 mg/g) and 3% (30mg/g)) to select the preparation for testing in the *in vivo* experiments. We evaluated the pharmacokinetics of antibiotic release from these preparations, and the antimicrobial activity of the gentamicin released by testing it against *S. aureus* ATCC 25923. The aim was to establish whether the antibiotic released, originally mixed with DCPD- $\beta$ -TCP powder, with an exothermic reaction of about 43°C, effectively conserved its normal antibacterial activity. Secondly, we explored the biocompatibility and the osteoconduction properties of our LADS when implanted in rabbit tibia. Gentamicin concentrations were measured in the serum and urine to check systemic exposure. During these stages of the necessary preliminary tests, we developed our tibial osteomyelitis model according to Norden's model, preparing the

experimental animal trial to test our local antibiotic treatment. In the third stage, in a reliable model of osteomyelitis, we tested the gentamicin-loaded DCPD- $\beta$ -TCP granules, and we compared them to similar (in terms of the form and antibiotic dosage) gentamicin-loaded PMMA granules.

The 600 mg DCPD- $\beta$ -TCP 1% GEN formulation (600 mg DCPD- $\beta$ -TCP granules 1% gentamicin loaded, 10 mg/g) exhibited the best release kinetics of gentamicin. It released GEN at least 1  $\mu$ g/ml/24H ( $\geq$  MIC of *S. aureus* for gentamicin) over 42 days, and more than 10 times the MIC of *S. aureus* for gentamicin for the first seven days. The 600 mg DCPD- $\beta$ -TCP 1% GEN formulation (containing 6 mg of gentamicin) released gentamicin concentrations higher than those released from the 600 mg DCPD- $\beta$ -TCP 2% GEN (12 mg of gentamicin) and 3% GEN (18 mg of gentamicin) formulations, from the sixth day onwards. Gentamicin mixed with, and released from, DCPD- $\beta$ -TCP effectively conserved its normal antibacterial activity in all the formulations tested and the 600 mg DCPD- $\beta$ -TCP 1% GEN formulation was chosen for use in animal trials for local treatment of experimental osteomyelitis.

The preliminary *in vivo* tests confirmed the biocompatibility and osteoconduction properties of DCPD- $\beta$ -TCP and the absence of gentamicin toxicity. Our rabbit osteomyelitis model in the upper tibia showed that the osteomyelitis was acute, even after six weeks of natural evolution. Chronic histopathologic lesions were found at the edge of a central abscess, produced by the bone tissue reaction to the sclerosing agent. We suggest a new radiological scale of localized osteomyelitis for testing local antibiotic treatment, making it possible to achieve accurate randomization by eliminating diffuse osteomyelitis grades. Certain technical precautions should achieve a high rate of localized osteomyelitis, and thus avoid the need to use a large number of animals for such experiments.

No bacteriological difference was found when comparing groups of rabbits treated locally with gentamicin. Infection was cured (Bacterial count = 0) in 4 of 5 rabbits in group 1 (treated with 600 mg DCPD- $\beta$ -TCP 1% GEN) and 3 of 5 rabbits in group 2 (treated with 300 mg PMMA 2% GEN). These results were significantly different ( $P=0.0003$ ) from those for group 4 (1 of 6 rabbits cured), treated with debridement alone and group 5 (0 of 5 rabbits cured), the infected but untreated control group. Clinical (fistula), radiographic and histology scores showed that DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicin was more biocompatible than PMMA-gentamicin (fistulae:  $P=0.025$ ; radiographic lucent border:  $P=0.05$ ).

Taken together our findings suggest that gentamicin-loaded DCPD- $\beta$ -TCP is effective for treating localized osteomyelitis. The direct contact of the antibiotic, loaded onto the

LADS, with the quiescent bacteria of chronic osteomyelitis in sequestra, which are the greatest obstacle to systemic antibiotic therapy, will allow eradication of osteomyelitis. The 1% gentamicin-loaded DCPD- $\beta$ -TCP granules might constitute an optimal alternative to gentamicin-loaded PMMA, particularly as a curative antibiotic delivery system. Although, the long-term resorbability of DCPD- $\beta$ -TCP requires checking, its biocompatibility and osteoconduction properties which allowed its integration into bone-tissue will warrant its use in humans, firstly in clinical trials. The low dose 1% gentamicin-loaded DCPD- $\beta$ -TCP granules, should allow its use to treat osteomyelitis without antibiotic toxicity, even in large cavities caused by bone loss after debridement.

Key-words: Calcium phosphate cement, Granules, Osteomyelitis, Local antibiotic therapy,

# Table des matières

Abréviations .....	9
Résumé.....	10
Résumé en Anglais (Abstract) .....	13
Table des matières .....	16
Tableaux .....	20
INTRODUCTION GENERALE.....	23
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE .....	28
<b>A. Introduction</b> .....	29
<b>B. Mise au point étymologique</b> .....	29
<b>C. Physiopathologie des modifications osseuses d'origine infectieuse</b> .....	30
<b>D. Types d'ostéites</b> .....	30
1. <b>Ostéite post-traumatique</b> .....	30
2. <b>Ostéite post-chirurgicale</b> .....	31
3. <b>Ostéomyélite hématogène</b> .....	32
<b>E. Epidémiologie et répartition géographique des infections osseuses</b> .....	33
1. <b>Dans les pays en développement</b> .....	34
2. <b>Dans les pays développés</b> .....	34
<b>F. Etiologies des ostéites et ostéomyélites</b> .....	35
1. <b>Staphylococcus aureus</b> .....	35
2. <b>Autres germes</b> .....	36
3. <b>Résistance de <i>S. aureus</i> à la gentamicine</b> .....	37
<b>G. Gravité et pronostic de l'infection osseuse</b> .....	37
<b>H. Stratégies de lutte contre l'infection osseuse</b> .....	39
1. <b>Prévention</b> .....	39
2. <b>Traitement curatif</b> .....	41
<b>I. Antibiothérapie locale et biomatériaux</b> .....	43
1. <b>Antibiothérapie locale à la gentamicine</b> .....	43
2. <b>Autres antibiotiques</b> .....	44
3. <b>PMMA vecteur d'antibiotiques</b> .....	45
4. <b>Biomatériaux résorbables vecteurs d'antibiothérapie locale</b> .....	47
<b>J. Modèles expérimentaux d'infection osseuse</b> .....	63
1. <b>Evolution des modèles animaux</b> .....	63
2. <b>Essais thérapeutiques chez l'animal</b> .....	73

<b>K. Classification des ostéites et ostéomyélites expérimentales.....</b>	<b>73</b>
1. Classifications physiopathologiques.....	73
2. Classifications topographiques.....	76
<b>TRAVAIL PERSONNEL .....</b>	<b>77</b>
<i>Première partie .....</i>	<i>79</i>
<b>Etude <i>In Vitro</i>.....</b>	<b>79</b>
<b>Article 1 .....</b>	<b>80</b>
<b>Low gentamicin load in granules of calcium phosphate for local treatment of osteomyelitis: an in vitro study.....</b>	<b>80</b>
<b>L. Discussion de la première partie .....</b>	<b>97</b>
<i>Deuxième partie .....</i>	<i>99</i>
<b>Etudes préliminaires <i>in vivo</i>.....</b>	<b>99</b>
<i>Première étape .....</i>	<i>100</i>
<b>Evaluation de la biocompatibilité et de l'ostéoconduction des granules de DCPD-<math>\beta</math>-TCP-gentamicine implantés en site osseux non infecté chez le lapin et recherche d'une éventuelle toxicité locale ou systémique de la gentamicine .....</b>	<b>100</b>
<b>M. Introduction .....</b>	<b>101</b>
<b>N. Matériels et Méthodes .....</b>	<b>101</b>
1. Préparation des granules .....	101
2. Implantation des granules .....	102
3. Suivi des lapins.....	103
4. Radiographies .....	103
5. Recherche de gentamicine dans le sang et dans les urines.....	103
6. Dosage de gentamicine .....	104
7. Recueil des échantillons .....	104
8. Analyse macroscopique.....	104
9. Analyse histopathologique .....	105
<b>O. Résultats .....</b>	<b>105</b>
1. Suivi clinique.....	105
2. Suivi radiologique.....	105
3. Etude histologique .....	105
4. Etude biologique .....	106
<b>P. Discussion et perspectives .....</b>	<b>107</b>
<i>Deuxième étape.....</i>	<i>109</i>

<b>Analyse du passage systémique de la gentamicine implantée en site osseux infecté</b> .....	109
<b>Q. Introduction</b> .....	110
<b>R. Matériels et méthodes</b> .....	110
1. Préparation des granules .....	110
2. Procédure d'inoculation .....	110
3. Implantation des granules .....	111
4. Suivi des lapins.....	111
5. Prélèvements et dosage de gentamicine.....	112
<b>S. Résultats</b> .....	112
<b>T. Discussion et perspectives</b> .....	112
<i>Troisième étape</i> .....	113
<b>Choix du site d'induction de l'infection expérimentale</b> .....	113
<b>U. Introduction</b> .....	114
<b>V. Matériels et méthodes</b> .....	114
1. Préparation des granules .....	114
2. Procédure d'inoculation .....	114
3. Procédure d'implantation des granules.....	115
4. Suivi des lapins.....	116
5. Radiologie.....	116
6. Recueil des échantillons .....	116
7. Histologie.....	117
<b>W. Résultats</b> .....	117
1. Groupe F (Fémur) .....	117
2. Groupe T (Tibia).....	119
<b>X. Discussion</b> .....	119
<i>Quatrième étape</i> .....	123
<b>Choix de l'inoculum optimal de <i>S. aureus</i> et caractérisation de l'infection osseuse expérimentale localisée chez le lapin</b> .....	123
<b>Article 2</b> .....	123
<b>Experimental osteomyelitis in rabbit models: Is the disease acute or chronic, diffuse or localized?</b> .....	123
<b>Y. Discussion et perspectives</b> .....	142
<i>Troisième partie</i> .....	143

<b>Essai thérapeutique <i>in vivo</i> chez le lapin comparant DCPD-β-TCP-gentamicine et PMMA-gentamicine .....</b>	<b>143</b>
<b>Article 3 .....</b>	<b>144</b>
<b>Low-dose gentamicin-loaded calcium phosphate granules as a local treatment for severe osteomyelitis in a rabbit model.....</b>	<b>144</b>
<b>Z. Discussion de la 3<sup>ème</sup> partie .....</b>	<b>167</b>
<b>DISCUSSION GENERALE .....</b>	<b>169</b>
<b>CONCLUSION FINALE ET PERSPECTIVES D'AVENIR.....</b>	<b>175</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE GLOBALE .....</b>	<b>177</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>193</b>
Résumé en anglais .....	202
Résumé .....	203

## Tableaux

- Tableau A:** Modèles d'ostéite expérimentale avec application de traitements locaux par des biomatériaux vecteurs d'antibiotiques (LADS). **75**
- Table 1 (Article 1) :** Concentrations of gentamicin released over 42 days into PBS by 300 mg and 600 mg of 2-3 mm granules of dicalcium phosphate dihydrate- $\beta$ -tricalcium phosphate loaded with 1%, 2% and 3% of gentamicin **93**
- Tableau B :** Implantation en fémoral distal et tibial proximal chez le lapin de granules DCPD- $\beta$ TCP-gentamicine pour évaluation de l'ostéoconduction. **103**
- Tableau C :** Passage de gentamicine dans le sang (H1 à H4 et de J1 à J5) à partir de 300 mg de granules de DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine à 3% implantés au niveau du fémur distal ou du tibia proximal chez le lapin non infecté (n=4). **106**
- Tableau D :** Dosage de gentamicine *in situ* et dans le sang, 21 jours après l'implantation, au niveau du fémur distal ou du tibia proximal chez le lapin, de 300 mg de granules de DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine à 3% (n=3). **107**
- Tableau E :** Dosage de gentamicine dans les urines des 24 heures à J1, J2 et J5 de l'implantation au niveau du fémur distal ou du tibia proximal chez le lapin de 300 mg de granules de DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine à 3% (n=5 pour J1 et n=4 après J1). **107**
- Tableau F :** Passage de gentamicine dans le sang (H0, 10 min, 30 min et 60 min) à partir de 600 mg de granules de DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine à 3% implantés au niveau du fémur proximal chez le lapin infecté (n=3). **112**
- Tableau G :** Evaluation de la faisabilité du modèle de Schulz et de l'efficacité du traitement de l'infection osseuse expérimentale par un traitement local par des granules de Dicalcium Phosphate- $\beta$ -Tricalcium Phosphate (DCPD- $\beta$ -TCP) chargés de gentamicine en site fémoral (F) proximal chez le lapin. **118**
- Tableau H :** Evaluation de la faisabilité du modèle de Norden-Mader et de l'efficacité (radiographique et bactériologique) du traitement local, de l'infection osseuse expérimentale en site tibial proximal chez le lapin, par des granules de Dicalcium Phosphate- $\beta$ -Tricalcium Phosphate (DCPD- $\beta$ -TCP) chargés de gentamicine. **121**
- Table 1 (Article 2) :** Successive experiments for validation of a model of localized tibial *S. aureus* osteomyelitis in the rabbit. **136**
- Table 2 (Article 2):** *S. aureus* experimental osteomyelitis evaluated with Mader radiographic grading [22] and the mean bacterial count (MBC). **136**
- Table 1 (Article 3) :** Comparison of Mader radiographic scores<sup>25</sup>, and of mean bacterial count (BC) (multivariate analysis's) of five groups of infected rabbits, at the time of their randomization for treatment, 15 days after inoculation with  $6.2 \pm 0.1$   $1 \log_{10}$  CFU *S. aureus* in tibia. **158**
- Table 2 (Article 3):** Fistula distribution, in rabbits infected with *S. aureus* osteomyelitis, a few days after treatment with different regimen of local treatment<sup>a</sup>. **159**
- Table 3 (Article 3) :** MICs<sup>a</sup> ( $\mu\text{g/ml}$ ) of gentamicin and tobramycin for small-colony variants (SCVs), normal colonies and parental colonies of *S. aureus* isolates (from uncured rabbits). **159**

## Figures

- Figure A:** Différentes formes d'infection osseuse : Ostéite post-traumatique avec pseudarthrose hypotrophique (A1); Ostéomyélite chronique d'origine hémotogène avec sclérose osseuse et séquestres (image TDM) (A2); Infection osseuse sur prothèse de hanche avec ostéolyse fémorale étendue et calcifications périprothétiques (A3). **30**
- Figure B:** Colonies homogènes de *staphylococcus aureus* ou staphylocoque doré (B1). Colonies de *staphylococcus aureus* associées à des "Small Colony Variant" (SCVs) sur gélose au sang (B2). **35**
- Figure C:** Micropores représentant les espaces entre les cristaux (ici cristaux de carbonate de calcium de synthèse –Aragonite- en microscopie électronique (C1). Macropores d'une céramique phosphocalcique (ici la Triosite) biphasique (C2). **49**
- Figure D:** Macropores interconnectés d'une trame d'os spongieux bovin céramisé. **57**
- Figure 1 (Article 1).** Macroscopic aspect of dicalcium phosphate dihydrate- $\beta$ -tricalcium phosphate (DCPD- $\beta$ -TCP) granules. **95**
- Figure 2 (Article 1).** Release kinetics of gentamicin in PBS by 300 mg (G300) and 600 mg (G600) granules of dicalcium phosphate dihydrate- $\beta$ -tricalcium phosphate loaded with 1%, 2% and 3% gentamicin. **95**
- Figure 3 (Article 1).** Yield (%) of gentamicin released by 300 mg (G300) and 600 mg (G600) granules of dicalcium phosphate dihydrate- $\beta$ -tricalcium phosphate loaded with 1%, 2% and 3% gentamicin. **96**
- Figure 4 (Article 1).** Representative SEM micrographs of gentamicin-loaded dicalcium phosphate dihydrate- $\beta$ -tricalcium phosphate granules (DCPD- $\beta$ -TCP) analysed before release (native form) and after 42 days of gentamicin release. **96**
- Figure E:** L'observation en microscope à lumière polarisée montre le biomatériau phosphocalcique (BPC) représenté par les granules de DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine bien intégré dans l'os environnant à J45 de leur implantation (E1; agrandissement x 100). Remarquez les processus du "bone ongrowth" le long de la surface du biomatériau "allongé" et le processus du "bone ingrowth" autour de la paroi vasculaire d'un vaisseau ayant pénétré dans un macropore –espace entre les granules– d'environ 200  $\mu$ m (diamètre d'au vaisseau sanguin).  
L'observation en microscopie photonique conventionnelle montre la néo-ostéogenèse produite par les ostéoblastes (très nombreux: zone d'activité, front de minéralisation) sur os mature avec présence d'ostéocytes "enchâssés" dans la matrice osseuse (à J+ 3 mois de l'implantation des granules de DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine; E2; agrandissement x 200). **106**
- Figure F:** Radiographies du fémur à J15 de l'inoculation de *S. aureus* au niveau du 1/3 supérieur du fémur. Les clichés ne montrent pas la zone concernée et sont mal centrées malgré un bon réglage de l'appareil de radiologie et la répétition de plusieurs clichés. **117**
- Figure G:** La résorption des granules lente. Les granules de DCPD- $\beta$ -TCP gardent les mêmes aspects et volumes à J15 (curetage du tissu infecté et remplissage de la cavité par ostéotomie réalisée par volet antérolatéral) (G1 et G3) qu'à J42 où on constate une consolidation de l'ostéotomie (G2 et G4). **119**
- Figure 1 (Article 2).** Various expressions of radiographic grade 4 lesions according to Mader score in a rabbit tibial osteomyelitis model. **139**
- Figure 2 (Article 2).** Localized osteomyelitis of the proximal tibia in a rabbit model, radiologically and histopathologically characterized. **139**
- Figure 3 (Article 2).** Day 15, day 30 and day 42 radiographic signs of osteomyelitis in rabbit tibial model and histology corresponding to day 42. **140**
- Figure 4 (Article 2).** Macroscopic finding in a rabbit tibial *S. aureus* osteomyelitis. **140**
- Figure 5 (Article 2).** Radiographic grading proposed to characterize a localized tibial osteomyelitis in a rabbit model. **141**
- Figure 1 (Article 3).** Experimental sequence in the rabbit tibial osteomyelitis model. **163**
- Figure 2 (Article 3).** Semi-quantitative evaluation of *S. aureus* OM in rabbit tibia. **163**
- Figure 3 (Article 3).** Bacterial count (BC in log<sub>10</sub> CFU/g bone) on day 15, after inoculation with *S. aureus* to generate tibial osteomyelitis in rabbit, and on day 42, after 4 weeks of treatment; comparison with control BC. **164**

<b>Figure 4 (Article 3).</b> X-ray of bone reconstruction and DDS granule behavior in the tibias of rabbits treated and cured with 3 regimens of DDS; comparison with controls.	<b>164</b>
<b>Figure 5 (Article 3).</b> Radiographic semi-quantitative evaluation.	<b>165</b>
<b>Figure 6 (Article 3).</b> Histologic evaluation of new bone formation (NBF) in rabbits cured of <i>S. aureus</i> tibial osteomyelitis at day 42, by treatment with dicalcium phosphate- $\beta$ -tricalcium phosphate (DCPD- $\beta$ -TCP) and polymethylmethacrylate (PMMA) gentamicin (GEN) delivery systems.	<b>165</b>
<b>Figure 7 (Article 3).</b> X-ray and histologic evaluation in uncured rabbits.	<b>166</b>
<b>Figure 8 (Article 3) :</b> Genomic DNA typing study, by PFGE	<b>166</b>

# **INTRODUCTION GENERALE**

Le traitement local de l'infection osseuse chronique est justifié par la mauvaise pénétration des antibiotiques, apportés par voie systémique, dans le tissu scléreux des ostéites et ostéomyélites chroniques. En effet, dans ces ostéites et ostéomyélites, le traitement est long et difficile et la guérison n'est obtenue globalement que dans 3/4 des cas. Nous disposons de peu de données concernant les ostéomyélites chroniques hématogènes, mais le taux de récurrences peut atteindre ou dépasser 50% des cas malgré une antibiothérapie suppressive.

Les options thérapeutiques vis-à-vis de l'infection osseuse chronique sont nombreuses (simple antibiothérapie suppressive au long court, débridement et ablation du matériel d'ostéosynthèse ou d'une prothèse et son remplacement en un ou deux temps, arthrodèse, résection tête et col, amputation ou désarticulation, lambeau musculaire, greffe...). Cette diversité des choix thérapeutiques traduit la multiplicité des formes de l'infection osseuse, mais aussi la complexité de la prise en charge de cette pathologie.

Le principe du traitement local de l'infection osseuse récalcitrante est d'associer au débridement, qui doit être "carcinologique", une antibiothérapie portée par un biomatériau dit vecteur d'antibiotique. C'est le principe de libération locale des antibiotiques ou "Local Antibiotic Delivery System" (LADS). Ce principe vise à contourner l'obstacle de sclérose osseuse qui se dresse contre l'antibiothérapie systémique, en apportant l'antibiotique au contact de l'infection.

Le premier système de libération locale des antibiotiques utilisé en chirurgie orthopédique est le polyméthacrylate de méthyle (PMMA). Il a été utilisé depuis son introduction par Buchholz et Engelbrecht (1970) sous forme de ciment acrylique (Palacos®) chargé de pénicilline (puis de gentamicine et d'érythromycine en Europe et de tobramycine en Amérique du Nord par la suite) pour fixer les prothèses de hanche de première intention et prévenir leur contamination. La première utilisation des LADS l'a été donc d'abord comme antibiothérapie locale préventive. Cette antibioprofylaxie par le PMMA-gentamicine a été utilisée de façon très étendue en Europe du Nord où existent des registres de prothèses ayant permis de rendre compte de son efficacité [Engesaeter *et al.*, 2003; Josefsson et Kolmert, 1993; Malchau *et al.*, 1993; McQueen *et al.*, 1987], puis partout dans le monde, confirmant cette efficacité [Chiu *et al.*, 2002; Jiranek *et al.*, 2006]. Même si elle reste controversée par certains chercheurs [Bourne, 2004; Hanssen, 2004], l'antibioprofylaxie par le PMMA-gentamicine a permis de réduire le taux d'infection sur prothèse de première intention de la hanche ou du genou à environ 1 à 2 % [Josefsson et Kolmert, 1993; Lentino, 2004].

Comme traitement local curatif de l'infection sur prothèse, le ciment PMMA-antibiotique a été utilisé avec une efficacité de l'ordre de 70 à 80 % pour les traitements

comportant le changement de la prothèse en un temps et de l'ordre de 90% pour les traitements comportant le changement prothétique en deux temps [Haddad *et al.*, 2000; Lombardi *et al.*, 2007; Magnan *et al.*, 2001; Scharfenberger *et al.*, 2007; Zimmerli et Oschsner, 2003].

Les billes de PMMA, chargées de gentamicine (Gentabilles, Septopal®), ont été utilisées pour le traitement curatif des ostéites post-chirurgicales et des ostéomyélites [Lazzarini *et al.*, 2004; Walenkampf *et al.*, 1998] et ont prouvé leur efficacité comme arme curative pour les infections osseuses après fractures. Ainsi, Ostermann *et al.* (1995) ont montré, dans une étude rétrospective de 1085 cas de fractures ouvertes, la capacité du PMMA-gentamicine (ou tobramycine), associé à d'autres traitements locaux, à réduire l'incidence de l'infection osseuse de 12 à 3,7 %, en particulier dans les stades sévères III-B et III-C de Gustilo pour les infections aiguës et dans les stades II et III-B pour les infections chroniques [Gustilo *et al.*, 1990].

Les cas d'échecs ou de récurrences malgré le traitement par le PMMA-antibiotique (10 à 30 % dans le cas des infections sur prothèses) peuvent être expliqués de différentes façons. Les études d'éluion *in vitro* de gentamicine à partir du PMMA ont montré, dès les premiers travaux sur le sujet, un relargage limité de la quantité d'antibiotique mise initialement dans le PMMA. Ainsi seulement 5 % de cette quantité a été élue au bout de 8 semaines d'observation du ciment Palacos® à la gentamicine et 67 % (de ces 5 %) est relarguée au bout des 24 premières heures [Hoff *et al.*, 1981]. Cette rétention de l'antibiotique par son vecteur en PMMA ("effet trapping") aboutit enfin de compte à un relargage lent et prolongé - pendant des années - de l'antibiotique à des concentrations sub-inhibitrices. La conséquence est la repousse de germes au contact des implants en PMMA et le développement de résistance bactérienne [Neut *et al.*, 2001; Van de Belt *et al.*, 1999]. Autre inconvénient indéniable, et qui a fait couler beaucoup d'encre, est la production du biofilm. Cette substance mucopolysaccharidique, produite par certaines bactéries au contact des implants métalliques, mais aussi au contact du ciment ou des billes en PMMA, est à l'origine de la résistance bactérienne au traitement antibiotique apporté localement par ce support non résorbable qui aboutit enfin de compte à une infection sur matériel [Campoccia *et al.*, 2006; El Asri *et al.*, 2002; Gristina *et al.*, 1985; Harris et Richards, 2006; Jabra-Rizk *et al.*, 2006; Verhelle *et al.*, 2003; Zimmerli et Oschsner, 2003]. Ces inconvénients, associés à la nécessité d'oter le ciment (ou les gentabilles) -biomatériau inerte, non résorbable et non ostéoconducteur- lors d'une deuxième intervention a rendu nécessaire la recherche d'une alternative au PMMA [Ambrose *et al.*, 2003].

La recherche d'alternative, en particulier dans l'indication du traitement curatif local de l'infection osseuse, s'est orientée vers les biomatériaux résorbables. En effet, le recours de plus en plus fréquent à l'utilisation de biomatériaux résorbables et ostéoconducteurs comme substituts osseux – à la greffe autologue – pour le comblement des pertes de substance osseuse [Beaman *et al.*, 2006; Libicher *et al.*, 2006; Saikia *et al.*, 2008; Uchida *et al.*, 1990; Yamamoto *et al.*, 2000], et l'association fréquente des pertes de substance osseuse à l'infection ont fait penser à la possibilité d'utilisation de ces substituts osseux comme vecteurs d'antibiothérapie locale.

Plusieurs familles de biomatériaux de synthèse ont été explorées comme vecteurs d'antibiothérapie locale. Il s'agissait principalement des céramiques phosphocalciques, du sulfate de calcium ou plâtre de Paris et des polymères dérivés des acides polylactique et polyglycolique (PLA-GLA) [Itokasu *et al.*, 1995; Lucke *et al.*, 2005; Mader *et al.*, 1997; Mäkinen *et al.*, 2005; Turner *et al.*, 2005]. Cependant, ces vecteurs de synthèse sont sous-utilisés en pratique clinique. Les polymères ne sont pas de véritables biomatériaux de substitution osseuse, car ne possédant pas de véritables propriétés d'ostéocoduction. De plus, la biocompatibilité de leurs produits de dégradation n'est pas parfaite [Böstman *et al.*, 1998; Santavirta *et al.*, 1990; Weiler *et al.*, 2000]. Cet inconvénient explique leur rare utilisation clinique malgré de très nombreuses expérimentations chez l'animal [Ambrose *et al.*, 2004; Calhoun et Mader, 1997; Kanellakopoulou *et al.*, 2000; Sasaki et Ishii, 1999]. Le relargage des antibiotiques à partir des céramiques phosphocalciques est massif et est de courte durée (en flush ou burst release) [Stallmann *et al.*, 2003] et la résorption du plâtre de Paris est trop rapide pour permettre une ostéocoduction optimale [Bouillet *et al.*, 1989].

Nous avons développé un nouveau biomatériau, appartenant à la famille des ciments phosphocalciques (CPCs). Il s'agit du Phosphate Dicalcique Dihydraté-Phosphate Tricalcique  $\beta$  (DCPD- $\beta$ -TCP). La biocompatibilité des CPCs, appréciés pour leurs qualités mécaniques, a été bien établie expérimentalement et confirmée cliniquement dans le traitement des fractures communitives et/ou survenant sur os ostéoporotique [Apelt *et al.*, 2004; Keating *et al.*, 2003; Kwon *et al.*, 2002; Libicher *et al.*, 2006]. Leur utilisation comme pate durcissant *in situ*, dans le traitement des fractures, a aboutit à une résorption superficielle [Libicher *et al.*, 2006; Theiss *et al.*, 2005]. Ils ont été testés *in vitro*, sous forme de ciment massif comme vecteur de tetracycline [Ratier *et al.*, 2001] et reçemment comme vecteur de gentamicine en association avec un polymère de PLA-GLA [Schnieders *et al.*, 2006], mais n'ont pas été testés *in vivo*.

Dans notre étude, nous avons préparé notre dérivé de CPC, le DCPD- $\beta$ -TCP, chargé de sulfate de gentamicine, sous une nouvelle forme pour son utilisation comme vecteur d'antibiothérapie locale. C'est la forme granules de 2 à 3 mm. Le but de l'utilisation de cette forme était de parer à la résorption uniquement superficielle obtenue avec la forme massive en ciment. Aussi, les espaces existants entre des granules tassés dans une cavité osseuse, obtenue après débridement des sequestres et des tissus infectés de l'ostéite, seraient propices à une ostéconduction optimale. En effet, dans ces situations d'infection chronique le débridement énergétique, l'ablation de tous les corps étrangers (implants, séquestres) et le comblement de l'espace mort constituent les piliers majeurs du traitement de l'infection osseuse. L'espace mort, laissé après le débridement, doit être nécessairement comblé. C'est ce principe qui a motivé la recherche explorant le concept de l'antibiothérapie locale utilisant des substituts de comblement osseux comme vecteurs d'antibiotiques.

L'objectif de notre étude était de tester le DCPD- $\beta$ -TCP, un biomatériau phosphocalcique biocompatible et biodégradable, chargé de sulfate de gentamicine comme vecteur d'antibiothérapie locale, en vue de le proposer comme alternative au PMMA-gentamicine pour le traitement curatif de l'infection osseuse à *Staphylococcus aureus*. A notre connaissance, il n'y a pas eu d'utilisation antérieure d'un biomatériau dérivé d'un CPC sous forme de granules comme vecteur d'antibiotique. Nous avons procédé à des études d'éluion *in vitro* de la gentamicine à partir du biomatériau. Ensuite, après validation du modèle d'ostéite à *S. aureus*, nous avons testé la capacité de ces granules de DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine à traiter cette ostéite expérimentale préalablement validée. Ces expérimentations ont été réalisées :

- ✓ à l'institut National de Recherche Agronomique de la région Centre (INRA – Nouzilly – Tours);
- ✓ au Laboratoire de Pharmacologie et de Toxicologie du CHRU de Bretonneau;
- ✓ au Laboratoire d'Anatomo-pathologie du CHRU de Trousseau;
- ✓ au Laboratoire de Microscopie électronique de la faculté de Médecine de Tours;
- ✓ au Laboratoire de Bactériologie et d'Hygiène Hospitalière dans le cadre de l'équipe d'Accueil (EA) 3854 de l'Institut Fédératif de Recherche (IFR) 136 « Agents transmissibles et Infectiologie » de Tours.

## **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

*Cette revue porte sur les 3 aspects suivants:*

- *Infections osseuses chez l'Homme et leurs traitements,*
- *Biomatériaux et leurs propriétés,*
- *Infections osseuses expérimentales.*

## **A. Introduction**

L'infection osseuse est définie comme la colonisation du tissu osseux (cortical, spongieux ou médullaire) par un microorganisme, le plus souvent une bactérie, associée à une inflammation et une destruction osseuse [Wright et Nair, 2009]. On ne connaît pas de virose osseuse. L'infection parasitaire ou mycosique de l'os est rare [Doury, 1985; De La Cambe et Duquesnoy, 1985]. La syphilis osseuse, infection bactérienne à tréponème, est désormais historique [Vicens *et al.*, 1985]. La tuberculose osseuse reste relativement fréquente dans les pays où l'infection à bacille de Koch est encore endémique [Pertuiset, 2004]. Cependant, la préoccupation actuelle est liée à l'ostéite chronique récalcitrante, principalement à *staphylocoque*, quelle que soit son origine: post-traumatique (après fracture ouverte), ou après implantation de prothèse ou de matériel d'ostéosynthèse. Aussi récalcitrante, mais posant des problèmes différents dans un contexte différent, est l'ostéomyélite chronique hématogène de l'adolescent ou de l'adulte jeune faisant suite à l'ostéomyélite aiguë infantile.

## **B. Mise au point étymologique**

Il faut faire une distinction entre les termes anglais et français d'ostéomyélite. "Osteomyelitis" désigne chez les anglophones toutes les infections osseuses que la propagation soit par contigüité ou hématogène, que l'atteinte soit initialement corticale ou médullaire. Pour les francophones, le terme ostéomyélite désigne l'infection osseuse due à une propagation hématogène, avec atteinte initialement médullaire, qu'il s'agisse de la forme infantile aiguë ou subaiguë (abcès de Brodie) ou de la forme chronique. Les autres infections osseuses, liées à une contamination directe, se propageant le plus souvent par contigüité et survenant après fracture ouverte, mise en place d'une ostéosynthèse, ou d'une prothèse, sont appelées ostéites. "L'osteomyelitis" des anglophones regroupe donc l'ostéomyélite et l'ostéite "francophones".

Il faut également distinguer l'ostéoarthrite, atteinte infectieuse de l'os et de l'articulation, de l'ostéite sans oublier que l'infection sur prothèse, souvent groupée dans la littérature avec les ostéites, est une ostéoarthrite.

Notre travail de thèse s'intéressera à l'infection osseuse en général, en excluant l'ostéoarthrite "non prothétique".

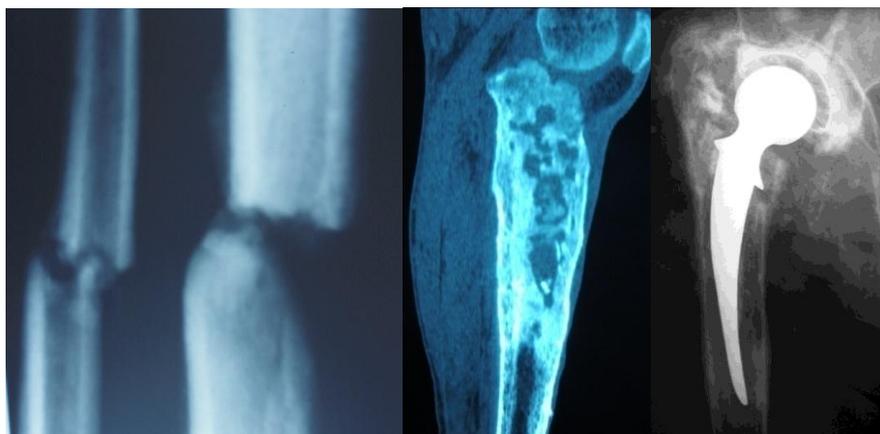
## C. Physiopathologie des modifications osseuses d'origine infectieuse

L'infection à *Staphylococcus aureus* initie une production locale et systémique de TNF (tumor necrosis Factor) et d'interleukines 1 et 6. L'augmentation de ces cytokines perturbe l'homéostasie du renouvellement osseux en induisant un déséquilibre en faveur des ostéoclastes aux dépens des ostéoblastes. Ceci induit une résorption osseuse accrue non contrebalancée par une production de matrice osseuse et sa minéralisation ce qui aboutit à la destruction osseuse [Wright et Nair, 2009]. Après la période d'ostéolyse, survient une période de tentative de reconstruction avec apposition périostée et sclérose endostée. Cette reconstruction est plus au moins organisée et peut aboutir à la guérison après un traitement bien conduit, ou à la désorganisation de l'architecture des travées d'os spongieux, à un épaissement de l'os cortical avec élargissement du diamètre de la diaphyse. Le stade ultime est la formation de séquestres (territoires osseux scléreux et non vascularisés). Ces aspects peuvent rester localisés, surtout dans les ostéites après fracture ouverte ou sur matériel, ou bien devenir diffus avec constitution d'une pandiaphysite, surtout dans l'ostéomyélite chronique hémotogène (Fig. A2).

## D. Types d'ostéites

### 1. Ostéite post-traumatique

L'infection osseuse survient après un traumatisme, en général une fracture ouverte avec ou non perte de substance osseuse (Fig. A1).



A1

A2

A3

**Figure A:** Différentes formes d'infection osseuse : Ostéite post-traumatique avec pseudarthrose hypotrophique (A1); Ostéomyélite chronique d'origine hémotogène avec sclérose osseuse et séquestres (image TDM) (A2); Infection osseuse sur prothèse de hanche avec ostéolyse fémorale étendue et calcifications périprothétiques (A3).

L'infection au stade initial est aiguë avec abcès et fièvre, ou subaiguë avec une inflammation régionale ostéo-musculo-cutanée. Le syndrome inflammatoire est net avec élévation du taux de fibrinogène dans le sang, de la vitesse de sédimentation (VS), de la "C-reactive protein" (CRP) et une hyperleucocytose à prédominance de polynucléaires neutrophiles. L'évolution peut se faire vers la chronicité.

## **2. Ostéite post-chirurgicale**

L'infection osseuse peut survenir après la mise en place de matériel d'ostéosynthèse pour fixer une fracture ou stabiliser une ostéotomie. Le tableau clinico-biologique est variable: aigu, subaigu ou chronique. La radiographie est normale au stade aigu et subaigu. Au stade chronique, elle montre un liseret de condensation entourant une fine ostéolyse autour du matériel (clou, plaque, vis, fiche de fixateur externe...). La bactériologie du prélèvement de la plaie opératoire apporte le diagnostic étiologique et oriente le traitement.

Dans l'infection sur prothèse (plus souvent au niveau de la hanche ou du genou et rarement au niveau de l'épaule, du coude, de la main ou de la cheville) la contamination peut survenir, en peropératoire ou après l'intervention. En post-opératoire, la contamination se fait par contiguité (à partir de la région périnéale pour la prothèse de hanche) ou par l'intermédiaire d'un drain de redon, ou d'un cathéter (erreur d'asepsie). La contamination peut également être hématogène à l'occasion d'une bactériémie à partir d'un foyer infectieux à distance (dentaire, cutané, génito-urinaire, digestif ou pulmonaire). Dans d'autres situations, c'est la réactivation d'une infection ostéo-articulaire qui peut être en cause [Besnier, 1998]. L'infection sur prothèse avec contamination peri-opératoire se manifeste par une douleur sourde précoce chez un patient "qui n'a jamais été bien" après la mise en place de la prothèse. L'appui monopodal est douloureux. Dans le cas d'une contamination secondaire par bactériémie, la douleur est plus tardive avec un intervalle libre entre la mise en place de la prothèse et l'apparition de l'infection. La biologie montre un syndrome inflammatoire parfois discret. La radiographie est normale au stade de début. Au stade chronique, les signes radiologiques (liseré péri-prothétique), importants pour le diagnostic, doivent cependant être interprétés avec discernement. L'évolutivité dans le temps est significative et deux aspects radiographiques sont typiques de l'infection sur prothèse: un liseré large continu, rapidement supérieur à 2 millimètres et une géode endostée (Fig. A3) [Dellamonica, 2002]. Les autres techniques radiologiques (fistulographie, arthrographie, TDM, IRM) sont peu utilisées en pratique courante. La scintigraphie, notamment aux polynucléaires marqués, peut rendre de précieux services dans certaines situations. Le liseré de l'interface os-prothèse peut évoluer, par la suite, vers une lyse osseuse significative parfois très étendue aboutissant à un

descellement septique. Le diagnostic est confirmé par la bactériologie. Les cultures des prélèvements de fistules ne constituent pas un bon moyen de diagnostic. Même si elles sont concordantes avec les prélèvements profonds dans 78% pour *S. aureus*, elles sont peu sensibles (44%) [Besnier, 1998]. La ponction articulaire radioguidée, pratiquée dans des conditions d'asepsie chirurgicale, peut être utile au diagnostic. Elle fait partie du bilan d'une reprise de prothèse présumée septique, mais ne doit pas être pratiquée de façon systématique avant tout changement de prothèse. Les prélèvements peropératoires sont évidemment les plus fiables pour porter le diagnostic du germe. Ils doivent être multiples (au moins 5), destinés à l'examen bactériologique et anatomopathologique.

La survenue de l'infection peut être insidieuse. Dans ce cas, elle est souvent paucibacillaire. Aussi, le diagnostic peut être porté seulement en per-opératoire par la découverte du germe responsable lors d'une intervention de reprise pour descèlement de prothèse présumé aseptique. Dans ces cas "difficiles", l'apport de la bactériologie moléculaire est indéniable, par la détection de l'ADN codant l'ARN ribosomal (fragment 16 S) présent chez toutes les bactéries [Société Française de Microbiologie, 2007].

### **3. Ostéomyélite hématogène**

#### **a) Ostéomyélite aiguë**

L'ostéomyélite aiguë (OMA) est l'infection osseuse de l'enfant en croissance. Due à *staphylococcus aureus* provenant d'un foyer infectieux à distance - "porte d'entrée"- le plus souvent cutané, elle se localise avec prédilection au niveau des métaphyses fertiles des os longs ("près du genou, loin du coude") [Waldvogel *et al.*, 1970]. L'OMA est caractérisée par une inflammation aiguë et la survenue de phénomènes de thrombose vasculaire localisés près du cartilage de croissance [Labbé *et al.*, 2010]. En cas de traitement rapide et de durée suffisante (supérieure à 3 semaines par voie générale), ces phénomènes sont réversibles et l'infection est alors éradiquée et l'évolution vers la chronicité est prévenue [Dich *et al.*, 1975]. En l'absence de traitement ou si celui-ci est inadéquat ou insuffisant, les phénomènes de thrombose vasculaire aboutissent à une nécrose tissulaire (et de polynucléaires) avec formation de pus : c'est l'abcès sous-périosté, forme subaiguë de l'ostéomyélite. Dans la forme du nourrisson, la perméabilité du cartilage de croissance aboutit à la constitution d'une ostéoarthrite. Le germe prédominant est dans ce cas *hemophilus Influenzae* provenant d'une porte d'entrée le plus souvent ORL.

Le tableau clinique typique d'OMA est celui d'une douleur aiguë invalidante "pseudo-fracturaire". La fièvre peut être absente ou modérée, la biologie est perturbée et la

radiographie est normale au stade aigu et peut montrer un décollement du périoste au stade subaigu. Le diagnostic doit être fait en urgence pour démarrer le traitement sans attendre le résultat de la ponction osseuse, en pratique peu réalisée. La maxime "l'antibiotique dans le 1/4 d'heure, le plâtre dans les 2 heures. Traiter à coup sûr, c'est traiter trop tard" reste toujours valable. En l'absence de traitement, ou en cas de traitement insuffisant, l'évolution se fait, après le stade subaigu, vers l'ostéomyélite chronique.

### *b) Ostéomyélite chronique*

L'exacerbation des phénomènes de nécrose osseuse, par défaut d'irrigation due à la thrombose vasculaire, entraîne l'extension de l'atteinte, initialement médullaire, vers les zones diaphysaires et épiphysaires, aboutissant à la formation de séquestres. Ces séquestres constitués par de "l'os mort" sont de véritables niches d'infection (Fig. A2). A l'intérieur de ces niches ou au contact d'elles les germes se protègent des défenses immunes de l'hôte et des antibiotiques [Norden, 1999; Lew et Waldvogel, 2004]. L'ostéomyélite chronique (OMC) avec séquestres est une "véritable catastrophe" transformant une "maladie systémique" initialement maîtrisable par les antibiotiques en une "maladie orthopédique" aux conséquences fonctionnelles désastreuses par la constitution de déformations osseuses et articulaires parfois très importantes et invalidantes. Le tableau est évident chez un adolescent ou un adulte jeune ayant eu une histoire déjà ancienne d'OMA négligée ou insuffisamment traitée. Sur le plan infectieux, l'évolution est marquée par des séquences de poussées-rémissions. Lors des poussées, les douleurs sont lancinantes et ne sont soulagées que par l'extériorisation de l'abcès intraosseux avec fistulisation à la peau et élimination parfois de séquestres. La fièvre est absente et les marqueurs biologiques sont le plus souvent normaux. L'imagerie (radiographie standard, TDM, IRM) est une grande aide au diagnostic et pour préciser l'évolution dans le temps [Lew et Waldvogel, 2004]. Elle montre un os remanié avec alternance de zones claires de lyse osseuse et opaques de sclérose et de séquestres (Fig. A2). Le prélèvement des fistules a peu d'intérêt en raison des contaminations [Mackowiack *et al.*, 1978] et la biopsie osseuse rétablit le diagnostic histopathologique de l'OMC et précise l'étiologie par l'examen bactériologique direct et les cultures.

## **E. Epidémiologie et répartition géographique des infections osseuses**

L'infection osseuse chronique constitue, dans beaucoup de pays de part le monde, un réel problème de santé publique, qu'il s'agisse d'infection post-traumatique, ou d'ostéomyélite

chronique hémotogène. En Europe, aux Etats-Unis d'Amérique et au Japon, c'est l'infection liée à l'implantation de matériels qui pose problème, en particulier l'infection sur prothèse articulaire, essentiellement de la hanche ou du genou.

## **1. Dans les pays en développement**

L'ostéite post-traumatique est l'entité la plus fréquente. L'ostéite après fracture ouverte représente dans une étude Indienne plus du 1/3 des infections osseuses: 34,3% contre 24,4% d'ostéomyélites chroniques et 23,3% d'infections post-chirurgicales (Agrawal *et al.*, 2008).

Dans une étude Marocaine, l'incidence de l'infection osseuse parmi les patients hospitalisés dans un service de traumatologie de CHU, drainant une population de 3 Millions d'habitants, est de l'ordre de 2,7% (154 sur 5607 patients hospitalisés entre janvier 2005 et décembre 2007). Il y avait 118 cas d'ostéites (77%), 28 ostéomyélites (18%) et 8 ostéoarthrites (5%). Les infections étaient chroniques dans 81% des cas. Parmi les 118 cas d'ostéites, 70 étaient post-chirurgicales, après ostéosynthèse (59,3%), 46 survenaient après fracture ouverte (39%) et 2 cas après PTH (1,7%). Ce taux faible d'infection sur PTH, contrastant avec celui très élevé après ostéosynthèse, est lié au faible nombre de pose de PTHs (Compaoré, 2009).

Dans une méta-analyse de la littérature Brésilienne, les infections après fracture ouverte représentent entre 20,5 et 40,3%, alors que les infections sur prothèse sont de l'ordre de 15 % après PTH et de l'ordre de 7,5 % après PTG (Jorge *et al.*, 2010).

## **2. Dans les pays développés**

L'infection sur prothèse est la préoccupation essentielle en raison du nombre important de prothèses de hanche (PTH) et de genou (PTG) posées par an. En effet, aux USA, 220 000 PTH et 418 000 PTG ont été insérées en 2003. Même si l'incidence de l'infection sur prothèse est de plus en plus faible (2% pour les prothèses de première intention et environ 4% après une reprise de prothèse [Leekha *et al.*, 2010]), cela représente pour une incidence moyenne de 3%, respectivement 6600 infections sur PTH et 12540 cas d'infection sur PTG par an pour le cas des USA [Lee et Goodman, 2008].

Les ostéites après fracture ouverte sont ubiquitaires et restent assez fréquentes. Leur fréquence dépend de leur association à certains facteurs de risque (FDR). Elle est de 4% en l'absence de FDR, de 15% en présence de 1 ou 2 FDR et de 30% en présence d'au moins 3 FDR [Bowen et Widmaier, 2005].

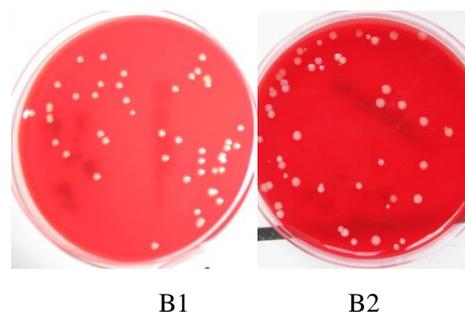
Concernant l'infection post-chirurgicale de façon générale, la tendance est à la baisse de fréquence en rapport avec la généralisation des mesures préventives (que nous

développerons plus loin, Chapitre H). Ainsi, au Japon, sur 226 644 patients opérés en chirurgie orthopédique et traumatologique entre 2006 et 2007 -intéressant par ordre de fréquence la pathologie traumatique, suivie des chirurgies rachidiennes, du genou puis de la hanche- l'incidence de l'infection du site opératoire est de l'ordre de 0,63% (1428 patients) [Kadono *et al.*, 2010]. Incidence proche de celle rapportée dans une étude danoise où sur 80756 PTH de hanche de première intention mises en place entre janvier 1995 et Décembre 2008, 597 PTH ont été révisées pour infection, soit 0,7 % [Pederson *et al.*, 2010]. L'ostéomyélite chronique est exceptionnelle dans ces pays.

## F. Etiologies des ostéites et ostéomyélites

### 1. Staphylococcus aureus

*S. aureus* prédomine dans les ostéites post-traumatiques, les ostéomyélites chroniques et les ostéites sur matériel métallique [Harris et Richards, 2006] avec une fréquence de 38% à 67% des cas [Arnold *et al.*, 2006; Grammatico *et al.*, 2008]. *S. aureus* est un germe saprophyte de la peau et du nasopharynx. A l'examen direct des prélèvements pathologiques, c'est un cocci à Gram + regroupé en grappes de raisin caractéristiques. Il est aérobie, anaérobie facultatif, ce qui explique sa persistance et sa viabilité à l'intérieur de la sclérose osseuse et des séquestres, sous un matériel d'ostéosynthèse ou dans la zone périprothétique immunodéficente [Gristina, 1994]. La capacité de résistance de *S. aureus* aux défenses de l'hôte en milieu anaérobie a été confirmée expérimentalement par une diminution de la phagocytose de *S. aureus* en présence d'une faible pression d'oxygène [Mader *et al.*, 1980]. *S. aureus* est un germe coagulase +, c'est à dire producteur de coagulase d'où sa capacité thrombogène expliquant l'évolution des ostéites et des ostéomyélites aiguës vers la chronicité avec formation de séquestres. *S. aureus* est le plus souvent sensible à la méticilline et à la gentamicine. Sur gélose au sang, il produit des colonies jaunes brillantes, d'où son nom de staphylocoque doré (Fig. B1), souvent entourées d'un halot autour des colonies attestant du caractère  $\beta$ -hémolytique.



**Figure B:** Colonies homogènes de *staphylococcus aureus* ou staphylocoque doré (B1). Colonies de *staphylococcus aureus* associées à des "small colony variant" (SCVs) sur gélose au sang (B2).

## 2. Autres germes

Le germe responsable de l'infection sur prothèse appartient 4 fois sur 5 à l'espèce *staphylococcus* et il s'agit 2 fois sur 3 de *staphylococcus aureus* ou *epidermidis* [Campoccia *et al.*, 2006]. *S. epidermidis* est le plus fréquent des staphylocoques à *coagulase négative* qui représentent 5 à 15 % des étiologies des ostéites [Arnold *et al.*, 2006; Grammatico *et al.*, 2008]. Il est retrouvé dans 1/3 des infections sur matériel [Campoccia *et al.*, 2006, Zimmerli et Oschsner, 2003]. C'est un germe saprophyte de la peau, pathogène opportuniste, parfois responsable d'infections nosocomiales plus sévères et/ou plus résistantes que celles associées à *S. aureus* [Johnson, 2003; Vuong et Otto, 2002]. *S. epidermidis* a une capacité particulière à adhérer à la surface des implants, en particulier celle des polymères (telle que le PMMA), et à les coloniser. D'autres staphylocoques peuvent être exceptionnellement rencontrés dans les infections osseuses, notamment *S. hominis* et *S. haemolyticus* [Campoccia *et al.*, 2006].

*Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (*SARM*) tient une place à part dans les étiologies des infections sur prothèses en raison de sa résistance aux antibiotiques. Les infections à *SARM* sont graves et peuvent être communautaires ou hospitalières nosocomiales [Brady *et al.*, 2006; Dombrowski et Winston, 2008; Fang *et al.*, 2004; Graber *et al.*, 2007; Rice et Mendez-Vigo, 2009]. La résistance du *SARM* est manifeste pour les  $\beta$ lactamines (Oxacilline, penicilline, amoxicilline) et peut concerner les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, la streptomycine, la tétracycline et les sulfamides. C'est une résistance plasmidique, le plus souvent, expliquant son extension assez rapide [Harris et Richards, 2006]. Dans le cadre des essais sur l'antibiothérapie locale, plusieurs modèles d'ostéite expérimentale utilisent comme souche d'inoculation un *SARM*, témoignant de l'importance du sujet [Dacquet *et al.*, 1992; Fujimura *et al.*, 2009; Giavaresi *et al.*, 2008; Isiklar *et al.*, 1993; Kanellakopoulou *et al.*, 2000; Lazarettos *et al.*, 2004]. Nous discuterons de certains de ces modèles dans le chapitre consacré aux modèles animaux (Chapitre J).

D'autres bactéries peuvent être à l'origine des ostéites, telles que des bactéries à *Gram positif* comme les streptocoques, ou à *Gram négatif* comme *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *pseudomonas*, ou encore des germes anaérobies tels que les *Corynebacteries* et *Clostridium* [Campoccia *et al.*, 2006]. Dans d'autres circonstances (immunodépression, hémoglobinopathies...) des germes comme le bacille de Koch (tuberculose osseuse), les salmonelles ou les brucelles peuvent être en cause. Enfin, il peut s'agir d'infections polymicrobiennes, notamment dans les contaminations telluriques massives de fractures ouvertes sévères [Desplaces, 2001; Wilkins et Patzakis, 1991].

### 3. Résistance de *S. aureus* à la gentamicine

Décrite pour la première fois par Lacey et Mitchell (1969), la résistance de *S. aureus* à la gentamicine est rare. Pour plusieurs aminoglycosides (amikacine, gentamicine, kanamycine, nétilmicine, sisomicine et tobramycine), testés par Harrell et Evans (1978) dans des conditions aérobies et anaérobies, les CMI en anaérobiose pouvaient augmenter dans 95% des cas, mais sans dépasser 4 fois les CMI en aérobiose vis-à-vis du *S. aureus* (ATCC 25923) (germe aérobie, mais aussi anaérobie facultatif). Cette augmentation était surtout observée avec amikacine, kanamycine ou nétilmicine. Ceci suggère, que dans les ostéomyélites à *S. aureus*, où le milieu est en partie anaérobie, la gentamicine reste active [Harrell et Evans, 1978]. Souvent associée à la résistance à la méthicilline, la résistance à la gentamicine a été peu décrite pour les ostéites [Cafferkey, 1983; Carroll *et al.*, 1989] et la gentamicine a gardé toute sa place dans l'arsenal thérapeutique antibactérien, antistaphylococcique en particulier.

Récemment, a été décrite la résistance du *S. aureus* aux aminoglycosides associée aux "Small Colony Variants" (SCVs). Ces souches, définies comme des colonies de taille 10 fois plus petite que la taille des colonies parentales (Fig. B2), présentent une anomalie de transport membranaire par déficit des protéines hémine et/ou ménadione [Lattar *et al.*, 2009]. Ces colonies sont présentes à côté de colonies normales dans les cultures de *S. aureus* [Proctor *et al.*, 1998]. Les SCVs ont été associées à des infections récidivantes, résistantes au traitement, qu'il s'agisse de traitements systémiques ou de traitements par antibiothérapie locale, telle que les gentabilles (billes de polyméthacrylate de méthyle (PMMA) chargés de gentamicine) [Sendi *et al.*, 2006; Von Eiff *et al.*, 1997; Von Eiff et Becker, 2007; Von Eiff, 2009; Wright et Nair, 2009]. Ces souches présentaient alors des CMI aux aminoglycosides élevées. Les SCVs doivent être recherchées avec soin dans les prélèvements pathologiques des infections osseuses et l'éventualité de leur existence doit être envisagée à chaque fois que les cultures paraissent inhomogènes, au même titre que l'élimination des germes contaminants éventuels.

### G. Gravité et pronostic de l'infection osseuse

Au stade aigu, le pronostic de l'infection osseuse est lié à son éventuelle dissémination associée à une gravité à court terme (septicémie, choc septique). Le pronostic à long terme est en rapport avec l'évolution vers la chronicité.

Au stade chronique, le pronostic est lié: 1) à l'handicap fonctionnel conséquence des déformations osseuses et articulaires secondaires dans l'OMC hématogène, 2) à la défaillance de l'arthroplastie dans le cas d'ostéite chronique sur prothèse. Cette défaillance peut nécessiter le recours à des mesures extrêmes telles que la résection arthroplastie (dite résection tête et

col), ou la désarticulation au niveau de la hanche – en cas d'infection sur prothèse de hanche - ou à l'amputation du membre – en cas d'infection sur prothèse de genou - pour sauver une situation pouvant engager parfois le pronostic vital, 3) à la pseudarthrose septique récidivante dans l'ostéite chronique faisant suite à une fracture ouverte.

Dans tous les cas, la gravité de l'infection osseuse est liée à la "lourdeur" de la prise en charge infectieuse, avec des interventions et des hospitalisations multiples pour traiter les récurrences septiques. Le retentissement devient alors physique (fonctionnel), psychologique, économique et social [Cheatle, 1991].

La gravité de l'ostéite sur matériel est liée, à côté des facteurs généraux liés au malade (âge, diabète, traitement immunosuppresseur, dénutrition, polyarthrite rhumatoïde...) [Berbari *et al.*, 1998; Zimmerli et Oschsner, 2003], à l'adhérence des germes au matériel "étranger" et à la formation du glycocalyx (appelé aussi slime ou biofilm). La production par les bactéries de cette substance mucopolysaccharidique, à la surface du matériel en une ou plusieurs couches, protège les bactéries de l'action des cellules phagocytaires. L'infection est ainsi pérennisée avec développement de bactéries résistantes aux antibiotiques [Campoccia *et al.*, 2006; El Asri *et al.*, 2002; Gristina *et al.*, 1985; Harris et Richards, 2006; Jabra-Rizk *et al.*, 2006; Verhelle *et al.*, 2003; Zimmerli et Oschsner, 2003]. Ces données ont été largement confirmées par des études expérimentales animales. Ainsi, dans un modèle d'ostéite à *S. aureus* chez la poule, la microscopie électronique révèle la formation extensive de glycocalyx autour des bactéries, suggérant son rôle important dans le processus d'adhésion bactérienne [Speers et Nade, 1985]. Dans un autre modèle d'infection staphylococcique sur "matériel étranger", développé au niveau tibial chez le lapin, la formation de larges agrégats de bactéries et de glycocalyx formerait une barrière difficilement pénétrable par les antibiotiques et résistante aux processus de défense immunitaire de l'hôte [Mayberry-Carson *et al.*, 1984].

L'état de surface des implants a également une influence sur l'incidence de l'infection sur matériel. Ainsi, dans un modèle d'ostéite chez le chien, l'association de différents implants - alliages en aluminium ou en chrome-cobalt, polyéthylène de haute densité, PMMA prépolymérisé (Gentabilles) et PMMA polymérisé *in vivo* (Ciment PMMA) - à l'inoculation de *S. aureus*, *S. epidermidis* ou *E. Coli*, a permis de mettre en évidence que tous les implants étaient associés à l'infection de façon plus significative que ne l'étaient les contrôles (alésage médullaire + inoculation de bactérie sans implant) [Petty *et al.*, 1985]. De plus, en comparant les différents implants entre eux, le ciment PMMA (polymérisé *in vivo*) était retrouvé – vraisemblablement en raison de sa surface cruentée – associé à l'infection à *S. epidermidis* de façon plus significative que les autres implants [Petty *et al.*, 1985]. Dans un modèle

d'infection sur clou centro-médullaire implanté au niveau tibial chez le lapin, Melcher *et al.* (1994) ont mis en évidence que l'infection était significativement plus fréquente avec l'implantation d'un clou fendu qu'avec un clou plein (59% vs. 27%), démontrant ainsi que l'étendue de la surface des implants est également un facteur facilitant la virulence des bactéries. Dans une autre étude, la couverture de la surface des broches par l'héparine ou par l'urokinase semble réduire l'incidence de l'infection [Nakamoto *et al.*, 1995]. Le mécanisme semble être lié à l'inhibition de l'adhérence bactérienne par l'héparine et par les agents fibrinolytiques. Toutes ces études montrent donc l'importance de l'état de surface dans le processus d'adhérence bactérienne, de production de slime et par conséquent dans la pérennisation de l'infection sur matériel.

L'incidence actuelle de l'infection osseuse sur prothèse de première intention de la hanche ou du genou est de l'ordre de 1 à 2% [Josefsson 1990; Lentino 2004], et peut atteindre 5% [Campoccia *et al.*, 2006]. Ceci représente 2200 à 11000 cas d'infection sur prothèse des 220 000 prothèses de hanches et 4180 à 20900 cas d'infections sur prothèse des 418 000 prothèses de genou qui ont été insérées en 2003 aux USA où l'on projette de poser 572 000 prothèses de hanche en 2030 [Lee et Goodman, 2008]. En France, environ 100000 prothèses totales sont posées chaque année [Bernard, 2003].

En termes économiques, les coûts, humains, en temps et en matériel, engendrés par cette pathologie sont très importants [Herbert *et al.*, 1996]. Ainsi, le coût social d'un seul épisode de reprise de prothèse totale est estimé à l'équivalent de 50000 € [Berbari *et al.*, 1998]. Après une première reprise, le risque de récurrence devient de l'ordre de 10% [Campoccia *et al.*, 2006] et le coût économique d'une deuxième reprise est encore plus élevé.

## **H. Stratégies de lutte contre l'infection osseuse**

### **1. Prévention**

Le lavage des mains, les conditions de circulation et de travail des personnes au bloc opératoire, de circulation et de stérilisation du matériel, la lutte contre l'hypothermie chez les opérés et la standardisation des interventions sont les principales mesures pour minimiser la contamination durant la chirurgie. Le rôle du flux laminaire (filtration de l'air dans les salles d'opération) dans la prévention de l'infection reste discuté [Hanssen et Rand, 1998].

L'antibioprophylaxie systémique, consistant en l'administration, moins de 2 heures avant une intervention (en pratique lors de l'induction anesthésique) comportant l'implantation d'un matériel d'ostéosynthèse, ou d'une prothèse, d'une injection de dose unique d'un antibiotique antistaphylococcique - généralement une céphalosporine ou un polypeptide - est

une pratique courante depuis longtemps [Hill *et al.*, 1981]. Des protocoles d'antibioprophylaxie ont été définis en fonction de la classification du "National Research Council Americain" (NRC) qui distingue les interventions en 5 classes (Classe I: hyperpropre, Classe II: propre, Classe III: propre-contaminée, Classe IV: contaminée et Classe V: sale) [Desplaces, 2001]. Dans les deux dernières classes, il s'agit d'une antibiothérapie dont la durée dépasse en général 48 heures. Dans les 3 premières classes, l'injection d'antibiotique, peut être répétée (en cas d'intervention prolongée), mais ne doit pas être prolongée au-delà de 24 heures [Desplaces, 2001; An et Friedman 1996]. L'antibioprophylaxie systémique permet de réduire le risque d'infection par contamination péri-opératoire de 4 % à moins de 2 % pour les interventions comportant une ostéosynthèse et de 3,4% à 0,8% pour les interventions de mise en place de prothèse [Lidwell *et al.*, 1982]. Actuellement, des protocoles d'antibioprophylaxie systémique sont établis pour chaque catégorie d'interventions (voir Annexe).

Les mesures d'isolement des patients infectés permettent d'éviter la propagation de l'infection nosocomiale et participent à la prévention de l'infection osseuse [Strachan, 1995]. Ainsi, l'utilisation de l'antibiothérapie prophylactique, l'organisation du travail au bloc opératoire et les mesures périopératoires qui accompagnent une intervention orthopédique avec implantation de matériel ont contribué à réduire le taux d'infection de 5,9% en 1975 à 1,2% en 1993 [An et Friedman 1996a].

L'antibioprophylaxie locale utilisant les ciments aux antibiotiques permet la prévention de l'infection en traitant une éventuelle contamination péri-opératoire par le relargage massif initial de l'antibiotique *in situ* [Wininger et Fass, 1996; Langlais *et al.*, 1988]. Par le relargage prolongé, elle permet de traiter une éventuelle contamination secondaire; nous y reviendrons (voir Chapitre I).

Une autre stratégie pour prévenir les infections sur implants commence à se développer, mais n'a pas dépassé le stade expérimental. C'est la mise en place d'implants enrobés de biomatériaux résorbables – "coating" – chargés d'antibiotiques [Luke *et al.*, 2005; Mäkinen *et al.*, 2005; Price *et al.*, 1996; Radin *et al.*, 1997; Schmidmaier *et al.*, 2006]. La validation clinique de tels implants pourrait dispenser dans l'avenir de l'utilisation du ciment PMMA chargé d'antibiotiques dans un but préventif. Par ailleurs, le "coating" a, à côté de l'effet purement antibioprophyllactique lié à la présence de l'antibiotique, un effet anti-infectieux par entrave de l'adhérence bactérienne à la surface des implants, comme cela a été prouvé dans une étude expérimentale chez le lapin. En effet, l'adhérence à la surface des implants et la colonisation de ceux-ci par *S. epidermidis* producteur de slime a été possible dans seulement 27% d'implants couverts d'albumine et soumis à l'inoculation par *S.*

*epidermidis*, contre 62% pour les implants non couverts et soumis à l'inoculation par la même bactérie [An *et al.*, 1996b].

## **2. Traitement curatif**

Le but du traitement curatif est d'éradiquer l'infection osseuse et d'éviter l'évolution d'une infection aiguë vers une infection chronique de traitement beaucoup plus difficile.

### ***a) Antibiothérapie systémique***

L'antibiothérapie par voie veineuse garde une place prépondérante dans le traitement des infections osseuses. Elle est associée à l'immobilisation plâtrée dans les OMA [Harik et Smeltzer, 2010], à la fixation osseuse et à la couverture tégumentaire dans les ostéites post-fracturaires [Jupiter *et al.*, 1988; Hanel, 1989], à l'évacuation chirurgicale pour le traitement de l'abcès sous-périosté et à l'ablation du "matériel étranger" et à l'excision des tissus nécrosés pour le traitement des ostéites sur matériel [Campoccia *et al.*, 2006; Zimmerli et Oschner, 2003; Hanssen et Rand, 1998]. Dans ce dernier cas, la voie d'administration et la durée du traitement systémique restent sujets à controverses. Il est recommandé d'utiliser la voie veineuse pour une durée de 45 jours, même si aucune étude prospective n'a validé cette durée consensuelle de traitement. Des durées très variables (de 0 à 9 semaines pour l'antibiothérapie intraveineuse, et plus de 2 ans pour l'antibiothérapie orale suppressive) ont été rapportées [Hanssen et Rand, 1998; Lazzarini *et al.*, 2004; Lew et Waldvogel, 2004].

Différents antibiotiques sont utilisés pour traiter les infections osseuses: les penicillines M (Oxacilline, Floxacilline), les aminosides avec la gentamicine, la tobramycine et la kanamycine, les fluoroquinolones telle que l'ofloxacine. La riampicine, associée à d'autres antibiotiques, est également utilisée avec une grande efficacité. Les polypeptides vancomycine et teicoplanine sont utilisés en cas de suspicion de présence de *SARM*. Les antibiotiques sont proposés en fonction du germe isolé et de l'antibiogramme. Leurs posologies et rythmes d'administration recommandés actuellement sont détaillés dans l'Annexe (Antibiothérapie systémique).

### ***b) Chirurgie***

L'excision des tissus nécrosés (ou "débridement") et l'ablation de l'implant, support du slime, dans "l'implant-related osteomyelitis"; le curetage des séquestres dans l'OMC hémotogène, associés à l'antibiothérapie systémique, font partie des principaux piliers du traitement de l'infection osseuse. Ces mesures peuvent être suivies de l'implantation de gentamicines (Septopal®) (voir Chapitre I. 3b). Dans la littérature ancienne ou récente, les

auteurs insistent sur l'aspect "carcinologique" que doit revêtir le débridement [Jenny et Taglang, 1979; Pollak *et al.*, 2010].

Dans l'infection post-traumatique, le traitement est assuré par le débridement, l'antibiothérapie systémique, associée ou non à l'antibiothérapie locale [Adams *et al.*, 1992; Calhoun et Mader, 1989; Walenkamp *et al.*, 1998]. Associée à ces mesures, la fixation externe, assurant la stabilisation osseuse, est requise pour éradiquer l'infection [Green, 1991]. Dans les cas où existe une perte de substance osseuse, les transferts osseux vascularisés peuvent être pratiqués [Minami *et al.*, 2000]. Les défauts de couverture sont confiés aux lambeaux musculaires ou cutané-aponévrotiques, locorégionaux ou libres [Fitzgerald *et al.*, 1985; Frykman et Leung 1986; Ngoi *et al.*, 1987; Verhelle *et al.*, 2003].

Dans le cas d'infection sur prothèse, les options thérapeutiques sont nombreuses allant de la simple antibiothérapie suppressive au long court jusqu'à la résection arthroplastique pour les prothèses de hanche infectées ou l'arthrodèse pour les prothèses de genou infectées [Lortat-Jacob, 1997; Lortat-Jacob, 1998]. Dans les situations intermédiaires, le traitement consiste en l'association de l'antibiothérapie et du traitement chirurgical selon différentes modalités. L'intervention de nettoyage avec maintien de la prothèse est souvent insuffisante, malgré l'antibiothérapie systémique, quand l'infection est déjà installée [Kilgus *et al.*, 2002]. Souvent le changement prothétique est nécessaire, associé à une antibiothérapie spécifique adaptée au germe retrouvé dans le liquide de ponction articulaire. Le changement de la prothèse se fait en un ou deux temps [Hanssen et Rand, 1998; Magnan *et al.*, 2001; Zimmerli et Oschsner, 2003]. Dans la stratégie de changement en un temps, le chirurgien procède à l'ablation de la prothèse et de tout matériel étranger et met en place une nouvelle prothèse. Le scellement de cette nouvelle prothèse est assuré par un ciment aux antibiotiques. Dans la stratégie en deux temps, la prothèse et tout matériel étranger sont ôtés lors d'une première intervention. Une nouvelle prothèse n'est posée que quelques semaines ou mois plus tard, après stérilisation du site d'implantation. Cette nouvelle prothèse est scellée ou non par un ciment aux antibiotiques. Certaines équipes mettent en place entre les deux temps un espaceur en ciment [Lombardi *et al.*, 2007; Magnan *et al.*, 2001; Scharfenberger *et al.*, 2007; Younger *et al.*, 1998;] (voir Chapitre I. 3b). En cas de pertes de substance osseuse étendues liées au descellement septique de la prothèse, la reconstruction par des allogreffes morcelées devient nécessaire [Benjamin *et al.*, 2001; Gie *et al.*, 1993]. Le comblement des zones de pertes de substances, par des biomatériaux résorbables chargés en antibiotiques, peut s'avérer ici très utile.

Dans certains cas d'infections très sévères, survenant sur terrain immunodéficient et/ou avec des tares multiples, pouvant aboutir au décès, le traitement de sauvetage peut être l'amputation ou la désarticulation après échec respectivement de l'arthrodèse au niveau du genou [Widel, 2002] ou de la résection tête-col au niveau de la hanche (intervention de Girdlestone) [Morscher, 1995].

L'ostéomyélite chronique, dans les pays où elle reste relativement fréquente, est traitée par excision des fistules et des trajets fistuleux, débridement des séquestres, suivi par la technique de suction-drainage [Oguachuba, 1983; Pfister et Oshsner, 1993; Hashmi *et al.*, 2004]. Dans d'autres mains, la technique de Papineau est appliquée pour combler - après débridement - l'espace mort par greffe spongieuse [Papineau, 1979]. C'est dans ces indications que le traitement par des biomatériaux résorbables chargés d'antibiotiques peut être capital.

### *c) Antibiothérapie locale*

L'utilisation de l'antibiothérapie locale pour traiter les infections osseuses a connu plusieurs phases évolutives. Les antibiotiques étaient d'abord mélangés avec des antiseptiques dans le liquide d'irrigation-lavage [Oguachuba, 1983] ou délivrés par l'intermédiaire de pompes implantables [Perry *et al.*, 1988]. Cependant, la forme d'utilisation qui a le plus résisté à l'épreuve du temps est l'utilisation des antibiotiques associés à des biomatériaux dits vecteurs et dont le plus connu et le plus largement diffusé est le PMMA-gentamicine (ou tobramycine), utilisé depuis les années 1970 (Buchholz *et al.*) jusqu'à nos jours. Les biomatériaux résorbables, vecteurs d'antibiotiques, ont été beaucoup développés en expérimentation animale mais restent, en 2010, peu utilisés en clinique. Différents biomatériaux vecteurs d'antibiotiques ont été testés chez l'animal et/ou utilisés chez l'Homme, inaugurant le nouveau concept thérapeutique de "Drug Delivery System" (DDS) en général, ou de "Local Antibiotic Delivery System" (LADS) en particulier.

## **I. Antibiothérapie locale et biomatériaux**

### **1. Antibiothérapie locale à la gentamicine**

La gentamicine est un antibiotique hydrosoluble appartenant à la famille des aminoglycosides. Son poids moléculaire est de 477 Da (gentamicine base) et de 567 Da (sulfate de gentamicine). Son spectre d'activité est large couvrant les bactéries à *gram positif* (dont le *staphylocoque aureus*, germe le plus souvent en cause dans les ostéites) et les bactéries à *gram négatif*. Il peut être d'origine naturelle (production par des *actinomycetales*, ainsi que par des souches de *bacillus* ou de *pseudomonas*) ou semi-synthétique [Modai, 1982]. Il agit par inhibition de la synthèse protéique et altération de la membrane de la cellule

bactérienne. Son efficacité est dite « concentration-dépendante » et l'effet bactéricide est lié à l'obtention d'une concentration maximale de l'ordre de 10 fois la CMI du germe [Caron et Humbert, 1992].

La gentamicine est, de loin, l'antibiotique le plus utilisé dans l'antibiothérapie locale. Ainsi, utilisant comme mots-clés "Local treatment AND osteomyelitis", dans une recherche bibliographique dans la base de données Pub Med, nous avons obtenu 987 références. Ces références comportaient aussi bien des articles concernant les traitements par une antibiothérapie locale que ceux relatant d'autres traitements locaux de l'infection osseuse (irrigation lavage, fixation, lambeaux...). Concernant l'antibiothérapie locale, après élimination des articles de revue et de ceux utilisant la gentamicine comme antibiotique de comparaison, nous avons obtenu 187 articles utilisant l'association d'un biomatériau et d'un antibiotique, publiés entre 1965 et 2010. Parmi ces 187 articles, 84 utilisaient de la gentamicine comme antibiotique principal (dans des études expérimentales ou chez l'Homme), soit près de 45%.

## **2. Autres antibiotiques**

Dans la même recherche, nous avons dénombré 20 articles utilisant une quinolone, 18 utilisant la tobramycine et 18 la vancomycine. Onze articles concernaient une céphalosporine, 5 la teicoplanine, 5 de la pénicilline G, 4 de l'acide fucidique. L'amikacine, l'ampicilline, la daptomycine, un polypeptide appelé Dhvar -5 ont été utilisés chacun 2 fois. Les 14 citations restantes (parmi les 187 articles) utilisaient d'autres antibiotiques 1 fois. La tobramycine reste l'aminoside le plus testé après la gentamicine [Scott *et al.*, 1999; DiCicco *et al.*, 2003; Ambrose *et al.*, 2004; Hendricks, 2003, Korkusuz *et al.*, 2001; Mader *et al.*, 2002; Nelson *et al.*, 2002; Rutledge *et al.*, 2003]. Les quinolones [Kanellakopoulou *et al.*, 1999; Kwok *et al.*, 1999] et les polypeptides, vancomycine et teicoplanine, ont été beaucoup testés chez l'animal dans le but de faire face à la recrudescence des infections nosocomiales à SARM [Benoit *et al.*, 1997; Calhoun et Mader, 1997; Fujimura *et al.*, 2009; Ozaki *et al.*, 1998; Shirliff *et al.*, 2002; Dacquet *et al.*, 1992; Lazarettos *et al.*, 2004, Yenice *et al.*, 2004]. Les autres antibiotiques sont principalement des antistaphylococciques témoignant de la prédominance des staphylocoques dans les infections osseuses: les céphalosporines [Doadrio *et al.*, 2004; Gursel *et al.*, 2001; Ramchandani et Robinson, 1998; Wang *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 1992] et l'acide fucidique [Atkins et Gottlieb, 1999; Buranapanitkit *et al.*, 2004; Coombs, 1990; Mousset *et al.*, 1995] ont été, parmi les antibiotiques, les plus testés.

### 3. PMMA vecteur d'antibiotiques

#### a) *PMMA vecteur d'antibiothérapie locale préventive*

Le polyméthacrylate de méthyle (chargé de gentamicine ou tobramycine) est, en 2010, le LADS le plus utilisé. Son utilisation pendant 3 décennies suivant la première publication par Buchholz et Engelbrecht (1970) a conforté sa position de vecteur d'antibiothérapie locale prophylactique dans les prothèses articulaires [Wahlig et Dingledein, 1980; Walenkamp *et al.*, 1986; Henry et Galloway, 1995; Walenkamp *et al.*, 1998; Winger et Fass, 2006]. Cette efficacité clinique a été vérifiée par des études expérimentales. En effet, Petty *et al.* (1988) ont comparé l'effet de l'irrigation de la cicatrice au sérum salé (SS) pur, au SS à la néomycine, à l'utilisation du PMMA-antibiotique et à l'utilisation d'une antibiothérapie systémique dans la prévention de l'infection sur prothèse. Ils ont montré que l'irrigation au SS n'avait pas d'effet sur le taux d'infection, que l'usage systémique de la céfazoline + irrigation à la néomycine réduisaient le taux d'infection, et que l'utilisation du ciment à la gentamicine entraînait une baisse significative du taux d'infection. L'effet de cette antibioprohylaxie locale, par le ciment acrylique PMMA chargé en antibiotique, est assuré par le relargage massif initial de l'antibiotique *in situ* assurant le traitement précoce d'une éventuelle contamination péri-opératoire (prévention primaire) [Wahlig et Dingledein, 1980; Walenkamp *et al.*, 1998] et par le relargage secondaire progressif qui permet de traiter une éventuelle contamination secondaire de l'implant par bactériémie.

#### b) *PMMA vecteur d'antibiothérapie locale curative*

En 1972, Buchholz et Gartmann ont rapporté un taux de succès de 69% dans le traitement curatif des infections sur prothèses de hanche. Après une expérience de 10 ans, leur taux de réussite était de 77% dans les changements prothétiques en un temps et de 90% dans les changements en deux temps [Buchholz *et al.*, 1981]. Pour les autres types d'infection (ostéite post-traumatique, ostéite sur matériel d'ostéosynthèse, ostéomyélite chronique), après avoir eu des difficultés à retirer le ciment Palacos, chargé de gentamicine, utilisé initialement pour traiter ces infections, Klemm (1976) a inventé les gentabilles pour remplacer le ciment dans ces indications. Après une première fabrication manuelle en peropétoire, à partir d'un mélange des poudres de PMMA et de l'antibiotique, les gentabilles étaient ensuite produites industriellement sous forme de billes de 6 à 7 mm de diamètre, liées entre elles par un fil d'acier inoxydable, formant des chaînettes de 30 ou 60 billes (Septopal®). Ces billes étaient proposées pour le traitement curatif des ostéites. Wahlig et Dingledein (1980), puis Klemm

(1988) ont ensuite précisé les indications de ce véritable premier vecteur d'antibiothérapie locale curative.

Le Septopal® a connu un grand succès dans le traitement des ostéites, principalement post-traumatiques et post-chirurgicales, assez fréquentes à l'époque du développement et de l'expansion de l'ostéosynthèse et de la chirurgie invasive aux dépens des traitements orthopédiques. Il a également donné satisfaction dans le traitement des infections des tissus mous [Aubry *et al.*, 1986; Spence *et al.*, 1984; Vecsei, 1981]. Il était devenu alors courant en cas d'infection sur matériel de retirer celui-ci et de mettre en place, après un curetage et parage "carcinologique" des tissus infectés, des chapelets de PMMA-gentamicine. L'extrémité du (es) chapelet (s) était laissée en dehors de la plaie pour permettre leur extraction progressive au fur et à mesure que les signes d'infection s'amendaient [Klemm, 1988; Wahlig et Dingledein, 1980]. Cette technique était source de contamination, ce qui a amené les chirurgiens ensuite à enfouir les chapelets au niveau du foyer infectieux et de fermer complètement la plaie, d'autant plus qu'il n'était pas pratique de laisser dépasser les chapelets quand plusieurs chaînes ont été utilisées, quand il s'agissait de longs chapelets de 60 billes, ou dans la situation où la presque-totalité du chapelet était mise en place en intramédullaire [Henry et Galloway, 1995; Walenkamp *et al.*, 1998]. Utilisés pendant trois décennies, les chapelets de gentabilles ont rendu des services appréciables et ont apporté un plus à l'antibiothérapie systémique. Ils ont permis d'apporter de fortes concentrations d'antibiotiques localement (jusqu'à 5 à 10 fois la dose apportée par l'utilisation systémique) et d'éviter les effets secondaires liés à l'utilisation de l'antibiothérapie systémique [Henry et Galloway, 1995].

Les espaceurs en ciment de PMMA, chargés d'antibiotiques (le plus souvent gentamicine ou tobramycine), ont été utilisés avec efficacité comme traitement curatif adjuvants dans les reprises en deux temps des infections après PTH ou PTG [Lombardi *et al.*, 2007; Magnan *et al.*, 2001; Scharfenberger *et al.*, 2007; Stevens *et al.*, 2005; Zimmerli et Oschsner, 2003]. Ils permettent de préserver la longueur du membre entre les deux temps en évitant la rétraction des tissus, de réduire la durée d'hospitalisation et de stériliser le foyer infectieux dans 96% des cas [Younger *et al.*, 1998].

### *c) Effet "trapping" du PMMA*

Malgré ses avantages, et après 4 décennies d'utilisation, le PMMA vecteur d'antibiotique a révélé des inconvénients. Les études d'élution *in vitro* de gentamicine à partir du PMMA ont montré, dès les premiers travaux sur le sujet, un relargage limité de la quantité d'antibiotique mise initialement dans le PMMA. Ainsi seulement 5% ont été élués au bout de 8 semaines d'observation du ciment Palacos® à la gentamicine et 67% (de ces 5%) sont

relargués au bout des 24 premières heures [Hoff *et al.*, 1981]. Cette rétention de l'antibiotique dans le ciment est indépendante de la nature de l'antibiotique. Elle a été confirmée par d'autres travaux avec la gentamicine [Van de Belt *et al.*, 2000], mais aussi avec la tobramycine et la vancomycine [Penner *et al.*, 1996]. L'effet "trapping" est également indépendant de la nature du ciment. Ainsi, l'élution de la gentamicine à partir de 3 types différents de ciments (CMV3®, Palacos®, Palamed®) ne dépassait pas 15% de la quantité totale d'antibiotique introduite initialement dans le ciment [Neut *et al.*, 2003]. Cette rétention de l'antibiotique est principalement dûe à la porosité du ciment et à ses caractéristiques de surface [Baker et Greenham, 1988; Masri *et al.*, 1995]. La forme compact du ciment ne facilite pas la libération de grandes quantités d'antibiotique et les billes de PMMA sont à cet égard plus avantageuses – même si les deux formes n'ont pas la même utilisation – par l'effet augmentation de la surface d'échange [Wahlig *et al.*, 1978; Wininger et Fass, 2006]. Cependant, le relargage de quantités d'antibiotiques suffisantes pour donner des concentrations 8, 10, voire 20 fois supérieures à la CMI des germes visés, expliquant l'effet thérapeutique de ce traitement, faisait passer le problème du "trapping" au second plan. Mais, le relargage lent et prolongé de l'antibiotique à des concentrations subinhibitrices, pendant des années, a fait émerger des phénomènes de résistance bactérienne, avec la découverte, à l'ablation du ciment ou des billes, de germes poussant au contact des implants en PMMA [Van de Belt *et al.*, 1999, Neut *et al.*, 2001].

Ces inconvénients, associés à la nécessité d'oter le ciment (ou les gentabilles) lors d'un deuxième temps chirurgical, ont fini par porter préjudice à l'utilisation du PMMA comme vecteur d'antibiotique. La recherche d'alternative, en particulier dans l'indication du traitement curatif local de l'infection osseuse, s'est orientée vers les biomatériaux résorbables.

#### **4. Biomateriaux résorbables vecteurs d'antibiothérapie locale**

L'antibiothérapie locale a connu ces dernières années un regain d'intérêt par le développement des biomatériaux résorbables [Hanssen, 2005]. Ces biomatériaux ont d'abord été utilisés comme substituts de comblement des pertes de substance osseuse non infectieuses [Yamamoto *et al.*, 2000; Uchida *et al.*, 1990]. La quantité limitée de la greffe autologue et la morbidité propre du site de prélèvement [Silber *et al.*, 2003; Boone, 2003] ont favorisé l'utilisation de ces substituts osseux de synthèse pour combler les pertes de substance osseuse post-traumatiques, celles secondaires à un curetage d'une tumeur bénigne, ou associées à un descellement d'une prothèse [Uchida *et al.*, 1990; Oonishi *et al.*, 1997]. Ces biomatériaux, en particulier phosphocalciques, sont également devenus compétitifs avec les allogreffes pour le

remplissage des pertes de substance étendues, en raison de leur disponibilité en quantité illimitée - substituts synthétiques - et parce que l'utilisation des allogreffes était devenue problématique à cause de l'apparition de nouvelles maladies virales (HIV, prions....) [Friedlander, 1991; Nemzek *et al.*, 1996].

L'infection osseuse s'accompagne de pertes de substance osseuse secondaires à l'ostéolyse infectieuse ou survenant après l'excision chirurgicale des tissus nécrosés et des séquestres. Les propriétés de comblement et d'ostéoconduction des biomatériaux résorbables sont apparues comme un avantage indéniable par rapport au PMMA en faveur de l'utilisation de ces biomatériaux comme vecteurs d'antibiotiques. Ces propriétés permettraient aux biomatériaux vecteurs d'antibiotique de relarguer l'antibiotique *in situ*, puis de se dégrader progressivement favorisant la reconstruction osseuse sans le besoin d'un deuxième temps chirurgical.

Après un rappel sur les propriétés intrinsèques des biomatériaux de comblement, et leur interaction avec le tissu osseux, nous étudierons les différentes familles de biomatériaux, testés *in vitro* et/ou *in vivo* et parfois utilisés chez l'Homme comme potentiels "LADS", afin de dégager les avantages et les inconvénients qui les qualifient ou non à être utilisés, de façon optimale, pour le traitement local de l'infection osseuse. Pour chaque famille, nous nous intéresserons leur utilisation comme substituts de comblement osseux, puis comme vecteurs potentiels d'antibiothérapie locale.

#### a) *Propriétés intrinsèques des biomatériaux de comblement.*

L'ostéoconduction et l'ostéoinduction sont les propriétés les plus appréciées pour un biomatériau substitut de comblement osseux [Zhao *et al.*, 2009; Boyde *et al.*, 1999].

##### (1) Ostéoinduction

L'ostéoinduction est la capacité d'un biomatériau à induire une néo-ostéogenèse même quand il est implanté en tissu extra-osseux. Seule l'autogreffe et les BMPs (Bone morphogenetic proteins) sont ostéo-inductrices [Cheng et Jiang, 2003; Gupta et Maitra, 2003]. Les biomatériaux synthétiques ne sont pas ostéo-inducteurs.

##### (2) Ostéoconduction

L'ostéoconduction est la capacité d'un biomatériau bioactif à avoir une interaction avec l'os receveur permettant de produire une néo-ostéogenèse à la surface du biomatériau (bone ongrowth) ou à l'intérieur de celui-ci (bone ingrowth). L'ostéoconduction dépend de deux

paramètres: l'indice phosphocalcique et la porosité qui englobe macroporosité et microporosité.

### (3) Indice phosphocalcique

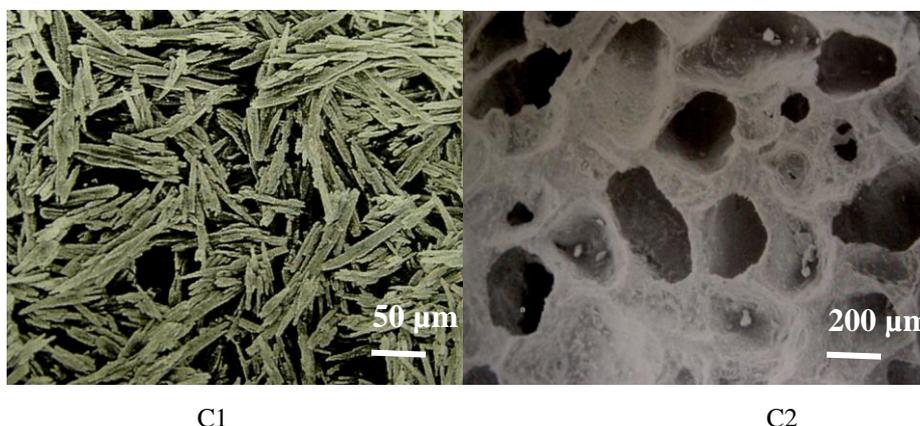
L'indice phosphocalcique d'un biomatériau est égal au rapport des molécules de calcium et de phosphate présentes dans la composition du biomatériau. Le rapport Ca/P considéré comme référence est celui de l'os. Il est égal à 1,61 pour l'os bovin. Un rapport Ca/P de 1,67 correspond à la stochiométrie qui est l'absence de lacune dans les sites anioniques et cationiques: c'est le cas de l'hydroxyapatite  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ . L'indice Ca/P n'est applicable que pour les biomatériaux phosphocalciques. Plus il est bas plus grande est la bioactivité du biomatériau en milieu osseux.

### (4) Microporosité

La microporosité correspond aux interstices entre les microcristaux. Elle dépend de la cristallographie du produit et de son mode de fabrication. Les micropores mesurent en moyenne de 10 à 75  $\mu\text{m}$  (Fig. C1).

### (5) Macroporosité

La macroporosité se définit par des pores de taille supérieure à 75  $\mu\text{m}$ . Pour les céramiques phosphocalciques que sont l'hydroxyapatite (HA), le phosphate tricalcique  $\beta$  (TCP) et leur composites dits biphasés (voir Chapitre I.4.i), la macroporosité peut être contrôlée à la fabrication. L'utilisation de porogène à base de billes de naphthalène intégrées dans le biomatériau lors de la phase de céramisation permet d'obtenir (après soustraction du naphthalène par phénomène de sublimation à 1000-1200°C) les macropores souhaités. Le contrôle des diamètres des macropores est permis par le choix de la taille des billes du porogène. (Fig. C2).



**Figure C:** Micropores représentant les espaces entre les cristaux (ici cristaux de carbonate de calcium de synthèse –Aragonite- en microscopie électronique (C1). Macropores d'une céramique phosphocalcique (ici la Triosite) biphasique (C2).

## *b) Interaction des biomatériaux de comblement avec le tissu osseux*

### (1) Bioactivité

Les dérivés phosphocalciques (céramiques et ciments phosphocalciques) dont la composition est proche de celle de l'os se sont toujours révélés être supérieurs aux autres biomatériaux dans l'interaction avec le tissu osseux. Ils sont dits bioactifs (par opposition aux biomatériaux bio-inertes que sont les implants métalliques ou acryliques) [Bohner et Lemaire, 2009; Kokubo et Takadama, 2006]. En effet, les échanges ioniques avec les biomatériaux bioactifs sont plus faciles: la dissolution du phosphate de calcium au contact des liquides biologiques induit une augmentation de la teneur locale en calcium au niveau du milieu interstitiel. Cette "hypercalcémie" locale déclenche des phénomènes chimiotactiques faisant appel à une activation des ostéoclastes *in situ* et à un afflux des macrophages vers le site d'implantation. Ceux-ci déclenchent et effectuent le processus de détersion et de résorption osseuse, préliminaire à la néo-ostéogenèse [Daculsi, 1992; Baslé *et al.*, 1993; Delecrin *et al.*, 1997]. La première étape de la néo-ostéogenèse est constituée par la production de collagène de type II. Cette trame organique, produite et excrétée par les fibroblastes dans le milieu extracellulaire polysaccharidique, va subir le phénomène de nucléation. C'est le dépôt, sur la trame organique collagénique, des premiers "noyaux" du minéral phosphocalcique. C'est le début de la cristallisation qui aboutira à la formation d'os nouveau au niveau du front de minéralisation. Ces phénomènes complexes font intervenir différentes protéines (telle que l'ostéopontine) et des enzymes, principalement les phosphatases alcalines. Ce sont les fibroblastes, ayant terminé leur mission de production de la trame collagénique, qui se transforment en ostéoblastes, mais aussi des ostéocytes "dormants" qui – redevenant ostéoblastes – reprennent leur activité de production du minéral osseux. Celui-ci est constitué d'abord par un os jeune dit "os tissé" ou "woven bone". Le remodelage de l'os tissé va aboutir à la formation de l'os mature dont les dépôts successifs des "différentes vagues" aboutiront à la transformation des ostéoblastes en ostéocytes.

### (2) Biocompatibilité

La biocompatibilité est la capacité d'un biomatériau à être acceptée par le tissu hôte. Elle se manifeste par l'absence de réaction de rejet: écoulement, réaction à corps étranger, encapsulation fibreuse. Sur le plan expérimental, elle est testée par le test MTT qui explore la toxicité du biomatériau envers le système mitochondrial cellulaire. Ce test reste cependant non spécifique.

### (3) Résorbabilité

La résorbabilité est la capacité d'un biomatériau à être dégradé par les cellules du tissu hôte aboutissant *in fine* à sa disparition totale. Tous les stades intermédiaires entre la résorption très rapide, assimilée à une dissolution, et la résorption très lente et progressive existent pour les différentes familles de biomatériaux. L'idéal est une résorption qui se fait progressivement en synchronisation avec la reconstruction osseuse: la quantité résorbée du biomatériau de comblement est remplacée par une quantité équivalente d'os nouveau : c'est la notion de "creeping substitution". La résorbabilité est liée à la biocompatibilité et à la nature du biomatériau. Le biomatériau de substitution idéal doit être résorbable et ses produits de dégradation doivent être biocompatibles.

#### c) *Propriétés des biomatériaux vecteurs d'antibiothérapie locale*

La biocompatibilité est la propriété essentielle que doit avoir un biomatériau destiné à être implanté en site osseux, en particulier en milieu septique. Cette biocompatibilité doit être parfaite pour ne pas rajouter d'inflammation à l'inflammation du sepsis.

L'ostéocoduction est fortement souhaitée. En effet, l'infection osseuse s'accompagne souvent de pertes de substance osseuse et la propriété d'ostéoconduction favoriserait la reconstruction osseuse.

La résorbabilité est variable entre les différentes familles de biomatériaux et reste, en 2010, le paramètre le plus difficile à contrôler. Pour l'utilisation comme LADS, le biomatériau idéal serait biocompatible, ostéconducteur, libérant progressivement et totalement l'antibiotique, au fur et à mesure de sa résorption, laissant en place une infection guérie et un os reconstitué.

Les biomatériaux résorbables ont d'abord été utilisés comme vecteurs de différentes substances pharmacologiquement actives, en particulier des hormones et des médicaments anticancéreux: c'est le concept général de Drug Delivery System (DDS) [Bajpai et Benghuzzi, 1988; Barroug et Glimcher, 2002; Ginebra *et al.*, 2006].

Concernant les antibiotiques, plusieurs familles de biomatériaux ont été testées comme Local Antibiotic Delivery System (LADS), soit *in vitro* pour étudier la cinétique d'élution de l'antibiotique, soit *in vivo* chez l'animal pour étudier soit le relargage *in situ* et/ou systémique de l'antibiotique incorporé au biomatériau vecteur, soit l'effet thérapeutique antibactérien pour traiter une ostéite expérimentale, mais très peu de ces biomatériaux vecteurs d'antibiotique ont été utilisés en pratique clinique chez l'Homme.

Les propriétés de biocompatibilité, d'ostéoconduction et de résorbabilité sont variables en fonction des différentes classes de biomatériaux.

#### *d) Sulfate de Calcium*

Le sulfate de calcium ou plâtre de Paris est historiquement l'un des premiers biomatériaux utilisés en chirurgie pour le comblement des pertes de substance osseuse. C'est un substitut osseux minéral à base de sulfate de calcium di-hydraté ( $\text{CaSO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ ). Il est obtenu par calcination du gypse. Le rapport Ca/P n'est pas applicable en l'absence de phosphate et on ne peut parler de « porosité » quand la technique de fabrication est une compression de la poudre [GESTO, 2005]. Il se présente sous forme de pastilles de 4,8 mm ou de 3 mm de diamètre (Osteoset®). Le sulfate de calcium ( $\text{CaSO}_4$ ) se dégrade de façon complète chez l'animal sain en 2 à 5 semaines et chez l'homme dans un délai de 4 à 6 semaines [GESTO, 2005]. La résorption "trop rapide" est un inconvénient pour le sulfate de calcium qui ne laisse pas le temps à l'ostéogénèse de se faire. Ceci ne permet pas de classer le sulfate de calcium comme biomatériau ostéoconducteur, même si Turner *et al.* (2005) rapportent une néo-ostéogénèse chez le chien au bout de 6 semaines. Par contre, le sulfate de calcium serait utile comme substitut de comblement pour compléter l'autogreffe, augmentant de façon efficace la quantité greffée dans les arthrodèses rachidiennes par exemple.

Pour l'utilisation comme vecteur d'antibiotique, le sulfate de calcium est commercialisé sous le nom d'Osteoset T® (sulfate de calcium contenant 4% de Tobramycine). Des publications déjà anciennes ont montré son efficacité pour assécher des ostéites et ostéomyélites chroniques [Bouillet *et al.*, 1989; Sulo, 1993], mais la libération de l'antibiotique semblait se faire sur le mode "burst release" (libération en flush). Ainsi, dans une étude *in vitro*, l'élution de l'antibiotique à partir de billes de  $\text{CaSO}_4$  -chargées de 2,5 ou de 5% de lincomycine, céphazoline ou gentamicine- est de 3 et 6 jours respectivement pour la lincomycine 2,5% et 5%, et de 6 et 14 jours respectivement pour la céphazoline 2,5 et 5%. Près de 60% à 80% de gentamicine est relarguée dès le 1<sup>er</sup> jour [Mackey *et al.*, 1982].

Afin d'allonger la durée de relargage de l'antibiotique, Benoît *et al.* (1997) ont enrobé des billes de sulfate de calcium, chargées de vancomycine, par des couches d'épaisseur croissante de polymère-copolymère de polylactide-coglycolide ( $\text{PLA}_{45}\text{GA}_{10}$ ). La charge initiale en antibiotique était de 6% (60 mg/g) et la libération du principe actif à partir de ces vecteurs biodégradables a été évaluée *in vitro* et *in vivo* après implantation du biomatériau au niveau du condyle fémoral chez le lapin. L'enrobage maximal, de 162  $\mu\text{m}$  d'épaisseur de  $\text{PLA}_{45}\text{GA}_{10}$ , a prolongé la durée d'élution de l'antibiotique à 5 semaines, alors que les billes non enrobées éluaient 70% de vancomycine dès le premier jour et la totalité de l'antibiotique

en une semaine. Ces données *in vitro* ont été confirmées par les résultats *in vivo*. Dans cette étude, la radiographie a été uniquement utilisée pour repérer le bon emplacement des implants et il n'a pas été réalisé d'étude histologique évaluant la qualité de l'ostéogénèse.

Comme traitement local d'une ostéite expérimentale à *S. aureus* chez le lapin, le sulfate de calcium chargé de 5 % de gentamicine (50 mg/g) n'a permis de guérir (compte bactérien = 0) que 2 lapins sur 10 [Dahners et Funderburk, 1987]. Il n'a pas été réalisé, dans cette étude, de radiographie ni d'étude anatomopathologique permettant d'évaluer la qualité de la reconstruction osseuse.

Par ailleurs, dans une étude clinique, Mc Kee *et al.* (2002) ont implanté des billes de sulfate de calcium (de 5x3mm de diamètre contenant 2,6 mg de tobramycine / 100 mg) chez 25 patients porteurs d'ostéites post-traumatiques dont 16 pseudarthroses septiques. La guérison de l'infection était obtenue, pour un recul moyen de 28 mois, dans 23 cas sur 25. Cependant, tous les patients ont eu un débridement avec lavage abondant au serum physiologique et aux antibiotiques, une antibiothérapie générale par voie veineuse pendant 7 jours, relayée par une antibiothérapie per os pendant 7 semaines. Il a été effectué 6 lambeaux de couverture et l'apport de greffe autologue a été associé dans 9 cas. Cette multiplicité de traitements utilisés de façon concomittente rend toute conclusion concernant l'efficacité du CaSO<sub>4</sub> comme vecteur d'antibiothérapie locale impossible.

Au total, la résorption du sulfate de calcium serait relativement rapide et ne permet pas une ostéoconduction adéquate. Les composites avec l'enrobage au PLA-GLA ajoutent aux inconvénients du sulfate de calcium ceux de l'incompatibilité imparfaite du polymère (voir Chapitre I.4.e).

### *e) Polymères et apparentés*

Les polymères d'acide lactique (PLA) et d'acide glycolique (GLA) n'ont pas été utilisés comme substituts de comblement. Ces biomatériaux ont été à l'origine utilisés pour la fabrication des fils de suture résorbables (vicryl®) utilisés dans tous les domaines de la chirurgie. Ensuite, à partir de ces polymères ont été développés des implants résorbables (vis, plaques, ancras) utilisés pour l'ostéosynthèse des fractures ou pour la fixation tendineuse en chirurgie de l'appareil locomoteur [Hovis *et al.*, 1998; Simon *et al.*, 1997a; Simon *et al.*, 1997b].

Les polymères PLA et GLA, seuls ou associés en co-polymères, sont les plus utilisés dans cette famille et sont probablement les biomatériaux ayant été les plus testés chez l'animal comme vecteurs d'antibiotiques [Ambrose *et al.*, 2003; Ambrose *et al.*, 2004; Kanellakopoulou *et al.*, 2000; Korkuzuz *et al.*, 2001; Mader *et al.*, 1997; Naraharisetti *et al.*,

2006]. La raison de cet intérêt pour les polymères de PLA et/ou GLA est probablement liée à leur maniabilité et au contrôle possible de leur résorbabilité permis par la variation de leur poids moléculaire [Ambrose *et al.*, 2003; Baro *et al.*, 2002; Benoît *et al.*, 1997]. Aussi, comme nous l'avons écrit plus haut (chapitre I4d), la variation de l'épaisseur des polymères enrobant un autre polymère ou un autre biomatériau vecteur d'antibiotique permettent d'allonger la durée de relargage de l'antibiotique [Ambrose *et al.*, 2003; Naraharietti *et al.*, 2006].

En tant que vecteurs d'antibiotique, pour traiter une ostéite expérimentale, ces polymères chargés de tobramycine, avec un ratio antibiotique/biomatériau de 10% [Korkuzuz *et al.*, 2001], ou de vancomycine avec un ratio de 9% [Calhoun et Mader, 1997], ont permis de baisser la charge bactérienne sans éradiquer l'infection expérimentale. Ainsi, pour Mader *et al.* (2002), l'utilisation des billes de PLA-PL:CG (copolymère d'acide polylactique-poly(DL-lactide):co-glycolide) chargées de vancomycine entraîne une baisse de la charge bactérienne de 1,5 Log d'unités formant colonie (UFC) dans les groupes traités par antibiotérapie locale seule (2,93 Log UFC) ou associée à la vancomycine systémique (2,84 Log UFC) par rapport aux groupes "contrôle" non traité (4,55 Log UFC) ou traité par débridement seul (4,53 Log UFC). Dans une autre étude, la baisse de la charge bactérienne était plus importante mais sans aboutir à un compte bactérien nul [Kanellakopoulou *et al.*, 2000].

Par ailleurs, si les polymères de PLA-GLA sont appréciés pour leur résorption relativement rapide, se faisant dans un délai de 6 mois à 1 an [Wang *et al.*, 2004; Mader *et al.*, 1997], ils ne sont ni bioactifs vis-à-vis du tissu osseux ni ostéoconducteurs. De plus, leurs produits de dégradation ne sont pas toujours parfaitement biocompatibles, et des réactions manifestes de type corps étranger avec ostéolyse ont été rapportées [Santavirta *et al.*, 1990; Böstmann *et al.*, 1991; Böstmann *et al.*, 1998]. Cette intolérance vis à vis des PLA-GLA a été ensuite confirmée, par Weiler *et al.* (2000), dans une méta-analyse de la littérature regroupant des réactions sous forme d'ostéolyse, de réaction synoviale, ou d'inflammation des parties molles.

D'autres biomatériaux apparentés aux polymères ont été testés chez l'animal comme vecteur d'antibiothérapie locale. Il s'agit de polyesters, chargés de sulbactam-cefoperazone (Sulpérazone®) ou de sulbactam-ampicilline (Duocid®) [Gürsel *et al.*, 2001], du polycaprolactone, chargé de tobramycine [Hendricks *et al.*, 2001] du chitosan [Cevher *et al.*, 2006], ou de l'acide hydroxybutirique-co-hydroxyvalérique (PHBV) associé à la gentamicine [Rossi *et al.*, 2004]. Certains de ces polymères et polyestères sont intéressants par leur résorbabilité, mais ils sont pour la grande majorité non ostéoconducteurs.

### f) Dérivés du fibrinogène

Le fibrinogène et les dérivés collagéniques ne sont pas des biomatériaux de comblement osseux. L'utilisation de la composante organique de l'os qui est biocompatible, comme vecteur d'antibiotique, était censée constituer le support idéal d'une minéralisation aboutissant à la reconstruction osseuse des zones d'ostéolyse infectieuse ou des cavités résultant du débridement chirurgical. Les résultats des expérimentations animales sont variables. Mader *et al.* (2002) rapportent des résultats avec de la fibrine-tobramycine inférieurs à ceux obtenus par le PMMA-tobramycine comme traitement local d'une ostéite expérimentale chez le lapin. Ainsi, l'implantation de "fibrin sealant-tobramycine" au niveau tibial permet de stériliser 62,5% des tissus spongieux ostéomédullaires vs. 87,5% pour le PMMA-tobramycine et la stérilisation de seulement 38,5% des prélèvements osseux pour la fibrine vs. 62,5% pour le PMMA. Mendel *et al.* (2005) ont, dans un modèle expérimental d'ostéite à *S. aureus* chez le rat de laboratoire, comparé les traitements locaux par éponges de collagène chargées de gentamicine aux billes de PMMA-gentamicine, associés, l'un et l'autre, à un traitement parentéral par céfazoline selon différentes modalités. Le meilleur résultat a été obtenu avec l'association de céfazoline parentérale pendant 4 semaines + traitement local par éponges de collagène chargées de gentamicine, avec guérison de l'ostéite chez 9 lapins sur 11. Dans une autre étude chez la souris, infectée à *Pseudomonas Aeruginosa*, Grzybowski *et al.* (1997) ont testé l'efficacité à traiter l'ostéite par une membrane + éponge de collagène d'origine bovine, chargée d'amikacine, et l'ont comparé à un traitement par le même biomatériau chargé de gentamicine. Avec une charge initiale de 0,3 mg d'antibiotique/cm<sup>2</sup> de collagène, ils obtiennent un relavage lent pendant trois jours réduisant la charge bactérienne de *P. Aeruginosa*, mais sans stérilisation du foyer infectieux. Dans un modèle d'antibioprophylaxie locale de l'infection osseuse à *S. aureus* chez le lapin, Riegels-Nielsen *et al.* (1995) ont démontré l'efficacité du collagène -d'origine bovine- chargé de gentamicine (Gentacoll®) à prévenir l'infection. Sans tenir compte des résultats des dérivés collagéniques comme vecteurs d'antibiotiques – en réalité variables –, l'origine bovine du fibrinogène et l'apparition de la maladie du prion chez les bovins, dans les années 1990, ont mis un frein à l'utilisation de ces biomatériaux, même après une utilisation chez l'Homme assez réussie pour les éponges de collagène chargées de gentamicine (Collatamp®) développés par l'école allemande à l'origine du développement du Septopal® et du Palacos® (PMMA-gentamicine) [Wernet *et al.*, 1992; Letsch *et al.*, 1993].

### *g) Carbonates de calcium*

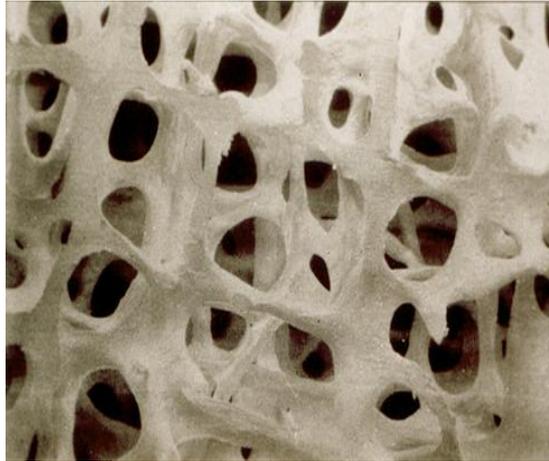
Les carbonates de synthèse sont dérivés du corail naturel qui a connu beaucoup de succès comme matériau de comblement en raison de sa structure macroporeuse. Ses pores ouverts et interconnectés permettaient une ostéoduction optimale [Bransu, 1988, Loty *et al.*, 1990; De Peretti, 1996]. Après environ une décennie d'utilisation, le corail a été éliminé de l'arsenal thérapeutique des substituts de comblement osseux en raison des écoulements aseptiques associés son utilisation. Ces écoulements, gênants, étaient attribués à des impuretés liées à la contamination du corail par des matériaux lourds (Pb, Zn) non éliminés par les procédés de stérilisation [Kenesi *et al.*, 1997; Lucas *et al.*, 2005]. Le corail a été ensuite remplacé par les carbonates de synthèse, telle que l'aragonite. Mais l'utilisation de l'aragonite était restée éparsée et principalement expérimentale [Lucas *et al.*, 2005]. La nacre, produit naturel à base de carbonate de calcium n'a pas connu un grand développement malgré des premières utilisations prometteuses [Lamghari *et al.*, 1999, Delloye et Sedel, 1997].

### *h) Silices et bioverres*

Les silices et oxydes de silice ( $\text{SiO}_2$ ) sont les composants du verre. L'utilisation du verre (ou bioverre) comme substitut de comblement était basée sur sa bioactivité et sa biocompatibilité, mais aussi en raison de sa résistance mécanique utile pour le comblement des pertes de substance osseuse en zones de charge. La résistance à la flexion est de 215 MPa; celle à la compression est de l'ordre de 1080 MPa, sachant que l'os cortical humain a une résistance de 16 à 109 MPa [Yamamuro, 1997; Oonishi *et al.*, 2000]. L'utilisation en tant que vecours d'antibiotiques a connu les mêmes limites que les céramiques phosphocalciques.

### *i) Céramiques phosphocalciques*

Les céramiques phosphocalciques sont des biomatériaux de synthèse. Ce sont les biomatériaux ostéoconducteurs par excellence, biocompatibles et partiellement résorbables. Elles ont été largement utilisées dans les indications de comblement des pertes de substance osseuse de toute origine [Yamamoto *et al.*, 2002; Oonishi *et al.*, 1997]. Elles sont caractérisées par leur composition proche du minéral osseux, ce qui facilite leur bioactivité, et par leur mode de fabrication par frittage à haute température (environ 1200°C), d'où le nom de céramiques. Le frittage, dérivé des techniques de céramisation industrielle, permet de contrôler la porosité de ces biomatériaux et donc leurs propriétés ostéoconductrices [voir Chapitre I.4.a. (2) et (5)]. L'ostéoconduction est d'autant plus importante que les macropores sont interconnectés (Fig. D).



**Figure D:** Macropores interconnectés d'une trame d'os spogieux bovin céramisé.

Les deux céramiques les plus utilisées sont, par ordre de fréquence, l'hydroxyapatite (HA), de formule  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$ , suivie du phosphate tricalcique bêta ( $\beta$ -TCP), de formule chimique  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . L'utilisation des composés biphasiques, mélange des deux (HA-TCP) à des proportions variables, permet d'augmenter la bioactivité du substitut avec le tissu osseux [Daculsi, 1992; Delecrin *et al.*, 1997; Delecrin *et al.*, 2000; Ransford *et al.*, 1998].

L'HA est une céramique phosphocalcique de synthèse dont les blocs sont obtenus par pressage et frittage de la poudre initiale. Le rapport Ca/P est compris entre 1,66 et 1,68, expliquant la lente résorption du biomatériau. Le volume poreux global est variable, il est de l'ordre de  $30 \pm 5 \%$  pour la Cerapatite®, dont les macropores de 100 à 400  $\mu\text{m}$  représentent 80% du volume poreux global. Avec ces caractéristiques la résistance en compression est de 65 à 75 MPa. La poudre de HA peut également être utilisée pour réaliser des enrobages d'implants métalliques en vue de faciliter leur fixation et intégration à l'os receveur [Overgaard *et al.*, 1997; Sanden *et al.*, 2002; Regner *et al.*, 1998, Tonino *et al.*, 1999; Munting, 1996; Regner *et al.*, 1998, Tonino *et al.*, 1999]. Ce procédé d'enrobage a été testé expérimentalement pour fixer à la surface des implants métalliques des antibiotiques mélangés à la couche de poudre de la céramique. Il est prometteur dans le cadre de l'antibioprophylaxie locale [Radin *et al.*, 1997] et agirait par prévention primaire (anti-contamination peri-opératoire) ou secondaire (anti-bactériémie) et par effet antiadhérence bactérienne (premier stade de l'infection sur matériel par les souches productrices de slime). En effet, le resurfaçage des implants par de la poudre de céramique facilite la fixation par ostéconduction produisant une ostéocoalescence entre l'os et l'implant, sans l'interposition de couche fibreuse semblable à celle décrite avec la fixation des prothèses par du ciment acrylique (PMMA). Cette couche fibreuse correspond à la zone immunodéficente de Gristina

(1994) autour des implants prothétiques et dans l'espace os-matériel d'ostéosynthèse non couvert par l'HA.

Le  $\beta$ -TCP est un biomatériau fabriqué par synthèse chimique, selon la technique de frittage à haute température. Il contient plus de 95% de phosphate tricalcique cristallisé (95 % de TCP et 5 % d'HA). Le rapport Ca/P est compris entre 1,49 et 1,51, expliquant sa résorbabilité plus rapide que celle de l'HA (Ca/P = 1,61 pour l'os, variable selon l'âge du sujet et 1,67 pour l'HA) [Jarcho, 1981]. Il existe sous forme de cubes parallélépipédiques, de granules, de coins, etc... Le volume poreux global varie de 0 à 70 % (suivant le type et l'indication de l'implant). La taille et la forme dépend du moule utilisé lors de la fabrication qui peut être complétée par une phase d'usinage.

Les céramiques phosphocalciques biphasiques sont à base de HA +  $\beta$ -TCP (à proportions variables). Ils ont une meilleure bioactivité que chacun des 2 composés séparément et conservent les qualités mécaniques de l'HA. A titre d'exemple, la macroporosité de la Triosite® est de  $50 \pm 5$  %. La taille des macropores, qui sont interconnectés, est de 400 à 600  $\mu\text{m}$  de diamètre. La microporosité est de  $17 \pm 1$  %, soit une porosité globale de 67 % [Delecrin *et al.*, 1997].

Pour l'utilisation comme vecteur d'antibiotique, le frittage à haute température empêche le mélange à la fabrication des antibiotiques avec les céramiques. D'autres procédés ont été utilisés pour contourner cet obstacle. Ainsi, Hasegawa *et al.* (2004) ont procédé à l'intégration de l'antibiotique (sulfate d'isepamicine, vancomycine ou flomoxef) à l'HA par une technique d'adsorption sous pression, après la phase du frittage. Le relargage de l'antibiotique était rapide, même si les auteurs, comparant le comportement de deux HA de porosités différentes, ont constaté que les pores les plus petits (10 à 100  $\mu\text{m}$ ) relarguaient l'antibiotique sur une plus longue durée alors que les pores de diamètre plus important (50 à 300  $\mu\text{m}$ ) relarguaient rapidement l'antibiotique dès les premières heures de contact avec la solution d'élution. La macroporosité utile pour l'ostéoconduction, l'est moins pour le contrôle du relargage. Afin d'allonger la durée du relargage de l'antibiotique *in situ*, Itokazu *et al.* (1995) ont développé un procédé de centrifugation afin d'intégrer l'antibiotique au cœur du biomatériau. La durée de relargage n'a cependant pas dépassé 18 jours. Pour leur part, Yamashita *et al.* (1998) ont utilisé un biomatériau cubique en HA, de porosité 50 à 150  $\mu\text{m}$ , dans lequel était creusé un défaut cylindrique pour recevoir l'antibiotique. Ce biomatériau vecteur a été utilisé avec succès pour traiter 18 patients porteurs d'ostéomyélite chronique. Il n'y avait aucune récurrence infectieuse au recul moyen de 52 semaines. L'intégration du biomatériau était confirmée par l'histologie avec une résorption progressive. Dans cette étude,

le biomatériau n'a pas été caractérisé de façon précise, notamment par des études préalables *in vitro* et *in vivo* chez l'animal. De plus, l'antibiotique n'a pas une répartition homogène et enfin, le recul est court pour pouvoir se prononcer sur les récurrences éventuelles de l'infection.

Contrairement à l'HA-antibiotique, Le  $\beta$ -TCP-antibiotique n'a pas dépassé, à notre connaissance, le stade de l'expérimentation *in vitro* et *in vivo* chez l'animal. *In vitro*, Brouard *et al.* (1997), utilisant des billes de  $\beta$ -TCP, de porosité globale 66 à 72%, contenant 2 à 5% de gentamicine ou de vancomycine, ont montré qu'au bout de 4 heures, 67% de vancomycine et 93% de gentamicine ont été élués dans le PBS. Au bout de 20 heures, le biomatériau avait livré la totalité de sa charge en antibiotique. L'utilisation de billes plus compactes à 20% et à 40% de porosité par Thomazeau *et al.* (1996) a permis de prolonger la durée de relargage de la vancomycine jusqu'à J21 à des doses encore égales à 1,5 fois la CMI. Cependant, concernant la gentamicine cette prolongation du relargage n'a pas dépassé la 32<sup>ème</sup> heure. Silvermann *et al.* (2007) ont associé du collagène à un caillot sanguin ou à des cylindres de TCP (de dimension 1x2 à 1x3 cm) chargés de gentamicine, et ont comparé les éluions *in vitro* de gentamicine. Ils ont montré que la gentamicine piégée par le caillot de sang (ou par la moelle osseuse) – mimant les situations *in vivo* – était relarguée plus lentement (pendant 2 semaines) que lorsque le mélange se fait par simple imprégnation en solution aqueuse.

En expérimentation animale, Lambotte *et al.* (1998), testant chez le lapin des sphérules de  $\beta$ -TCP, chargées de gentamicine et de vancomycine (par immersion), ont montré que le relargage de l'antibiotique dans l'os est total et précoce et se fait avant le 2<sup>ème</sup> jour. Murase *et al.* (2003) ont utilisé le  $\beta$ -TCP chargé de teicoplanine au contact d'implants vasculaires en dacron infectés par du *Staphylococcus aureus* chez des lapins. Les tests d'éluion, réalisés sur des implants retirés après 1, 2, 3 et 4 semaines d'implantation, montrent un relargage dégressif de teicoplanine au fil du temps: 33,2 mg/ml à J3, 24,7 mg/ml à J14 et 15 mg/ml à J28. Les doses relarguées restent supérieures à la CMI de teicoplanine vis-à-vis du *S. aureus* jusqu'à J28. L'analyse bactériologique montre une supériorité du  $\beta$ -TCP chargé de teicoplanine dans le traitement de l'infection staphylococcique, par rapport aux 3 groupes témoins (curetage + apport local de 40 mg de teicoplanine solution, curetage + apport local de 60 mg de teicoplanine solution et curetage seul). Les cultures restaient positives chez 5 lapins sur 6 du groupe curetage seul, chez 3 lapins sur 6 dans les cas d'apport local de teicoplanine en solution, alors qu'elles sont négatives dans le groupe  $\beta$ -TCP.

Les céramiques phosphocalciques, malgré leur biocompatibilité et leurs excellentes propriétés ostéoconductrices, posent toujours le problème non résolu d'intégration de

l'antibiotique à la céramique. Cette difficulté est à l'origine du relargage rapide de l'antibiotique.

### j) Ciments phosphocalciques

Les ciments phosphocalciques (CPCs) est une famille de biomatériaux qui a été utilisée avec succès dans le comblement des pertes de substance osseuse. Appelés également hydrauliques ou ioniques, par opposition au ciment acrylique non résorbable qu'est le PMMA. Il en existe quatre classes: Les ciments au dicalcium phosphate dihydraté (pH 5), les ciments au phosphate de calcium et de Magnésium (pH 10), ceux à l'octocalcium phosphate (pH 7 à 8) et ceux constitués d'apatite non stoechiométrique (voir Tableau 1 de l'Annexe).

Les CPCs durcissent *in vivo* après injection sous forme pâteuse. Ils nécessitent une préparation extemporanée (par mélange de la poudre et du solvant) avant l'injection. Les CPCs sont bioactifs, de par leur nature proche du minéral osseux. Le rapport Ca/P varie de 0,5 à 2 en fonction de la classe du ciment (Voir Tableau 1 de l'Annexe). Leur biocompatibilité et leur résorbabilité ont été prouvées chez l'animal, par des études macroscopiques et histomorphométriques chez la brebis [Apelt *et al.*, 2004; Theiss *et al.*, 2005] et confirmées chez l'homme. Ils possèdent de bonnes propriétés mécaniques expliquant leur utilisation en traumatologie [Thordarson *et al.*, 1999; Kwon *et al.*, 2002]. Leur disponibilité sous forme de pâte à durcissement *in situ* permet leur utilisation dans le relèvement des fractures enfoncement des plateaux tibiaux [Keating *et al.*, 2003], la fixation mini-invasive des fractures articulaires du radius distal [Higgins *et al.*, 2002 ; Kopylov *et al.*, 2002], permettant de se passer d'une ostéosynthèse invasive mais aussi dans les fractures sur os ostéoporotique [Libicher *et al.*, 2006].

Concernant l'utilisation des CPCs en tant que vecteurs d'antibiotiques, Bohner *et al.* (1997) ont étudié l'élution de gentamicine *in vitro* de deux formes différentes de CPCs. Afin d'allonger la durée de relargage de l'antibiotique, ils utilisaient, en association avec les ciments sous forme massive, 4 types d'hydrogels (l'hydroxypropylcellulose, de l'aginate de sodium, de l'acide polyacrylique et de carboxyméthylcellulose). Des concentrations de 3% et 16% de sulfate de gentamicine ont été choisies pour l'étude. Pour 6 des 8 compositions de ciment testées, la dose de charge totale de sulfate de gentamicine a été éluee en 7 jours, indiquant qu'il n'y a pas de liaison irréversible entre sulfate de gentamicine et le ciment. Lorsqu'une quantité minimale d'hydroxypropylcellulose ou d'acide polyacrylique a été rajoutée au ciment, la fraction maximale de sulfate de gentamicine éluee était moindre que la dose totale de charge ; ce qui suggère l'existence d'une liaison se faisant entre le polymère et le sulfate de gentamicine. Le taux d'élution *in vitro* de sulfate de gentamicine est fortement

influencé par la présence d'ions sulfate dans la pâte du ciment et par la porosité du ciment : Plus il y a d'ions sulfate dans la pâte du ciment, plus basse est la libération de gentamicine (relargage contrôlé). Quand la porosité initiale du ciment passe de 38 à 69%, le taux de relargage de sulfate de gentamicine triple, passant de 0,16 à 0,45 mg/L. L'activité antibactérienne de gentamicine est conservée et elle n'est pas altérée par le mélange. Mesurée par la technique de diffusion sur gélose, sur souche de *Staphylococcus epidermidis*, l'activité inhibitrice de la bactérie est observée jusqu'au 7<sup>ème</sup> jour d'éluotion.

Dans une étude *in vivo* chez le lapin, Lazarettos *et al.* (2004) ont analysé l'efficacité d'un CPC chargé de teicoplanine, glycopeptide bacéricide actif sur le *S. aureus*, à traiter une ostéomyélite expérimentale à *SARM*. Les poudres de l'antibiotique et du CPC ont été mélangées (dose de charge en antibiotique de 3%). L'ostéite était induite par l'inoculation au niveau du 1/3 supérieur du fémur de 8 Log<sub>10</sub> UFC de *SARM*, selon un modèle expérimental d'"implant-related osteomyelitis". Les animaux étaient répartis en 6 groupes (6 lapins dans chaque groupe, 5 groupes avec un traitement local et 1 groupe témoin). Les lapins étaient sacrifiés respectivement à 1, 2, 3, 4, 5 et 6 semaines après l'implantation. L'évaluation était radiologique, pharmacologique (mesure de la teicoplanine relarguée par l'os), bactériologique (comptes bactériens) et histopathologique. Parmi les 36 lapins utilisés, 34 ont développé une culture positive à *SARM* de l'implant (aiguille) et 36 ont eu une culture positive du produit de curetage osseux prélevé à 3 semaines de l'inoculation. Les radiographies montraient un épaissement cortical et de la sclérose dans 25% des échantillons, des kystes multiples dans 25% des cas, une pandiaphysite dans 22% et une fracture pathologique dans 8% des cas. Les comptes bactériens étaient devenus stériles à partir de la 2<sup>ème</sup> semaine, alors que les cultures des animaux témoins restaient positives tout le long des 6 semaines de l'expérimentation. L'histologie avait montré une diminution progressive de l'inflammation, une repousse osseuse intense autour du ciment, et son remplacement progressif par de l'os. Des signes actifs d'inflammation sont confirmés sur tous les échantillons témoins (infectés non traités). La résorbabilité au long court de la pâte de CPC n'est pas prouvée et il a été montré par d'autres travaux que la résorption de la pâte ou du ciment phosphocalcique sous forme massive reste superficielle [Liverneaux, 2003; Liverneaux et Khallouk 2006]. Aucun CPC chargé d'antibiotique n'a été testé sous forme de granules.

### *k) Biomatériaux composites*

Afin d'améliorer la cinétique de relargage des antibiotiques, permise par les procédés d'enrobage par des composés polymères-copolymères (PLA, GLA), sans perdre le bénéfice de l'ostéoconduction, permise par les biomatériaux phosphocalciques, en particulier par les

céramiques macroporeuses, Baro *et al.* (2002) ont analysé *in vitro et in vivo* l'efficacité d'un biomatériau composite composé de d'hydroxyapatite (HA), de phosphate tricalcique (TCP) et d'acide polylactique (PLA). Quatre formulations de ce biomatériau composite ont été testées avec une charge initiale de gentamicine entre 3,5 et 7%. L'éluion de l'antibiotique *in vitro* et le relargage *in vivo* – après implantation dans les condyles fémoraux du lapin – ont été analysés. Les implants non couverts de PLA ont relargué la gentamicine de façon rapide, alors que les implants enrobés de PLA présentaient une cinétique de relargage plus lente et progressive dont la proportion dépendait du poids moléculaire du PLA utilisé. Dans le même but, Buranapanitkit *et al.* (2004) ont analysé l'éluion *in vitro* de la vancomycine, de la fosfomycine et de l'acide fucidique associés au composite hydroxyapatite-sulfate de calcium-chitosan (polysaccharide biodégradable dérivé de la chitine). La vancomycine et la fosfomycine ont vu leur éluion prolongée jusqu'à 3 mois, alors que celle de l'acide fucidique a duré 8 semaines. La technique d'éluion utilisée ici est critiquable car n'utilise pas un milieu liquide, mais solide (gélose au sangensemée de *S. aureus* certes testant directement l'activité de l'antibiotique, mais ne tenant pas compte de l'effet flux sanguin que reproduit le modèle d'éluion en milieu liquide). Cependant, le mélange à la fabrication du biomatériau et de l'antibiotique, utilisé dans cet essai est intéressant et permet probablement d'expliquer en partie les longues durées d'éluion observées. Ragel et Vallet-Regi (2000) ont analysé le relargage de gentamicine *in vitro* par le composite bioverre ( $\text{SiO}_2\text{-CaO-PO}_5$ )-polymère (PLA)- polymère (PMMA). L'éluion de gentamicine reste rapide avec relargage de 65% de la charge initiale en 10 heures, puis de 15 % entre 10h et 48h et de 1% après 14 jours. Bohner *et al.* (2000) ont expérimenté un CPC à base de poudre  $\beta$ -TCP et de monocalcium phosphate monohydraté (MCPM), chargé de gentamicine et associé à l'acide polyacrylique (PAA) qui forme un gel avec l'antibiotique. A des concentrations basses de PAA, la gentamicine a été relarguée en 1 à 2 jours, mais une partie du sulfate de gentamicine reste piégée dans le CPC. Cette partie non relarguée varie de 0 à 58% au fur et à mesure qu'augmente la quantité de PAA dans le ciment. Aux concentrations élevées de PAA, le relargage du sulfate de gentamicine (SG) se prolonge pendant 8 jours et la fraction relarguée de l'antibiotique passe de 58% à 100% au fur et à mesure qu'augmente la concentration de PAA. Le relargage du SG dépend de 2 mécanismes : 1) de la diffusion des molécules libres du SG à travers les pores du ciment et 2) et de la dissociation du SG du complexe PAA-GS. Le premier mécanisme semble prédominer.

La critique principale des biomatériaux composites est que le mélange de familles de biomatériaux différents, et de propriétés parfois très éloignées les unes des autres, rend les

interprétations difficiles. De plus, les polymères, associés aux CPCs, apportent leurs inconvénients propres cités plus haut (voir chapitre I.4.e).

## **J. Modèles expérimentaux d'infection osseuse**

### **1. Evolution des modèles animaux**

Différents types d'ostéites et d'ostéomyélites ont été développés. Le modèle expérimental le plus aboutit –historiquement– et qui est le plus fréquemment reproduit dans les expérimentations actuelles est celui "d'ostéomyélite chronique" staphylococcique chez le lapin, publié par Norden et Kennedy (1970). Quelques modèles se sont ensuite distingués, pendant les années 80 et 90, par des paramètres particuliers : l'espèce animale, la bactérie utilisée, le facteur de virulence ou le type d'ostéite créée. Le but était de reproduire les différents types d'infection osseuse rencontrés chez l'Homme. Ces modèles ont évolué avec l'évolution de l'épidémiologie de l'infection osseuse. Plusieurs phases sont à distinguer:

#### *a) Phases des premières expérimentations*

Si nous devons donner une succession historique de l'évolution des idées pour la création des modèles d'infection osseuse, avant le modèle de Norden, nous disposons de l'article de Wertheimer et Martin (1964) qui est d'un grand apport sur le plan historique. Rodet (1884) était le premier à obtenir la formation d'un abcès osseux après une injection intraveineuse de *S. aureus* chez le lapin [Wertheimer et Martin, 1964]. C'était la première ostéite expérimentale chez le lapin, mais les doses d'inocula bactériens utilisés étaient léthales. Dix années plus tard, Lexer (1894) vérifia la nécessité de réduire les doses des inocula afin de prolonger la survie des lapins. En 1921, Hobo prouva que les bactéries inoculées se fixaient initialement au niveau épiphysaire et métaphysaire sur les os longs et 6 ans plus tard, Wilensky (1927) précisa le rôle des thromboses vasculaires dans l'étiopathogénie de l'ostéomyélite hématogène [Wertheimer et Martin, 1964]. Shioda (1936) obtint 23% de lapins infectés et Thompson et Dubos (1938) obtinrent 58% d'infection chez des lapins préalablement immunisés par des faibles doses de microorganismes [Wertheimer et Martin, 1964]. Shemann (1941) était le premier à établir une ostéomyélite chez le lapin après inoculation directe de *S. aureus*, précédée par l'injection métaphysaire tibiale d'un agent sclérosant, dérivé de l'acide muriatique. C'est ce modèle qui deviendra plus tard, après amélioration, le modèle classique de référence de Norden.

## *b) Modèle de Norden*

Le modèle de Norden consiste à injecter chez le lapin New Zeland, par une aiguille 18G, au niveau tibial par voie latérale 100 µl de morrhuate de sodium à 5%, suivie de 6,2 Log<sub>10</sub> UFC (100 µl d'une suspension de 7,2 Log<sub>10</sub> UFC de *S. aureus* soit 3x10<sup>6</sup> UFC). Tous les lapins ainsi inoculés ont été infectés. Les radiographies ont été effectuées entre 5 et 11 jours, entre 14 et 21 jours, à J40 et vers J108. Les lapins ont été sacrifiés entre J60 et J180 et les prélèvements ont été évalués bactériologiquement et radiologiquement. L'injection de la bactérie seule ou du morrhuate de sodium seul n'entraînent pas de modification radiologique et les cultures restent stériles entre 14 et 60 jours. Norden en conclut **qu'il faut l'injection des deux associés (*S. aureus* + sclérosant)** pour créer l'OM. Ainsi, avec l'association des deux agents, il obtenait 16% de mortalité avant J14 et 14% de mortalité après J15. Quarante des 45 lapins survivants (89%) (sacrifiés entre 60 et 180 jours) montraient des signes radiologiques évidents d'ostéite. La bactériologie montrait un compte bactérien moyen à 3,9 x 10<sup>5</sup> UFC de *S. aureus*. L'analyse radiographique montrait l'absence de signes d'ostéite entre 5 et 11 jours. Par contre entre 2 à 3 semaines, il se produisait un élargissement du tibia proximal, une interruption periostée, et une désorganisation de l'architecture normale de l'os associée à une néoformation osseuse. A J40, ces signes devenaient plus évidents avec ostéolyse, ostéocondensation et formation de séquestres. La formation des séquestres a été observée macroscopiquement chez 76% de lapins sacrifiés à J60. L'infection par un autre *S. aureus* (isolé chez un patient porteur d'infection urinaire) n'avait pas donné lieu à une ostéomyélite. Pour produire une ostéomyélite expérimentale chez le lapin il fallait **associer un produit sclérosant à un *S. aureus* à tropisme osseux**. Il faut donc récupérer une souche provenant d'un patient porteur d'ostéite ou d'ostéomyélite. A noter qu'il n'y avait pas de modification radiographique (notamment absence de nécrose aseptique) chez les lapins injectés uniquement de morrhuate de sodium. Par contre, il y avait 90% de thrombose vasculaire et de nécrose pour induire l'OM lorsque le morrhuate de sodium était associé à *S. aureus*. A 6 mois, les jambes des lapins continuaient de montrer des signes évidents d'OMC et les *S. aureus* infectants ont été retrouvés dans la majorité des prélèvements de moelle osseuse. Ce modèle ressemble à celui d'OMC chez l'Homme. Il a permis une première approche physiopathologique de l'OMC hématogène si fréquente de façon ubiquitaire à l'époque [Norden et Kennedy, 1970].

### *c) Première approche des facteurs de virulence*

Après la démonstration par Norden du rôle d'un facteur de virulence chimique (le produit sclérosant, morrhuate de sodium) dans la genèse de l'infection expérimentale, Andriole *et al.* (1973) analysa le rôle de facteurs physiques (fracture, implantation de clou centromédullaire) comme facilitateurs de la production de l'infection osseuse expérimentale. Il reproduisit le premier modèle d'ostéite chronique staphylococcique post-fracture, mais aussi d'ostéite chronique sur matériel au niveau du tibia. A noter qu'il s'agissait de l'étude avec la plus longue période de surveillance et de suivi d'ostéite expérimentale décrite à nos jours (18 mois). Soixante cinq lapins ont été répartis en 3 groupes: inoculation de *S. aureus* sans implant et sans fracture (n=30), fracture médiadiaphysaire + enclouage centromédullaire + inoculation (n=22) et enfin enclouage centromédullaire sans fracture + inoculation (n=13). Des concentrations décroissantes d'inocula ont été testées. L'inoculation de  $2 \times 10^9$  UFC *S. aureus*/mL entraînait le décès de tous les lapins et avec  $2 \times 10^8$  UFC il y avait eu 5 décès sur 7. L'inoculum optimal était de  $2 \times 10^7$  UFC. Cette expérimentation apportait des renseignements forts utiles: 1) L'inoculation isolée de  $10^8$  UFC *S. aureus*/mL n'entraîne pas d'infection de tibia non fracturé, mais induit une ostéite chronique sur tibia "fracturé et encloué". Ceci suggère un rôle de la fracture ou du matériel étranger (clou), ou des deux à la fois, dans le développement de l'ostéite expérimentale. 2) L'inoculation isolée de  $10^6$  UFC *S. aureus*/mL n'entraîne pas d'infection sur tibia fracturé, mais induit une ostéite chronique sur tibia encloué non fracturé, ce qui suggère un rôle plus important de la présence du matériel étranger que de la fracture dans la genèse de l'infection osseuse. La présence de clou joue ici le même rôle que le produit sclérosant dans le modèle de Norden (production d'ischémie régionale et de nécrose tissulaire qui fait le lit de l'infection osseuse). Cependant, cette virulence pourrait être en réalité en rapport avec la production du slime non encore identifiée à l'époque de cette expérimentation.

### *d) Affinement et caractérisation du modèle du lapin*

Crane *et al.* (1977) ont défini les caractéristiques radiographiques, bactériologiques et histopathologiques de l'ostéite staphylococcique tibiale inspirée du modèle de Norden. En sacrifiant les lapins (après réalisation des radiographies) à J2, J5, J10, J15 et J20, ils ont montré les mêmes aspects radiographiques que ceux observés par Norden en les confirmant par l'histopathologie. Ils ont ainsi mis en évidence la présence d'abcès ou de microabcès, d'infiltration inflammatoire et de séquestres. La propagation de l'infection se faisait à partir de la zone d'inoculation métaphysaire proximale initiale vers le reste de la diaphyse. C'est cet aspect qui est à l'origine de la nomination "d'ostéite progressive" : l'infection atteint d'abord le

tibia proximal: ostéite localisée. Elle peut ensuite rester localisée au tibia proximal ou diffuser vers le 1/3 moyen du tibia. De la même façon, l'infection peut rester localisée au 1/3 moyen ou diffuser vers le tibia distal. L'aspect de diffusion généralisée à la totalité de l'os (pandiaphysite), avec décollement périosté, destruction corticale, extension des zones de séquestres et effraction articulaire (observée à J20), était probablement facilitée par le choix de lapins jeunes (2 mois, 2 kg) avec un cartilage de conjugaison encore perméable (ce qui rappelle la transformation de l'ostéomyélite aiguë en ostéoarthrite chez le nourrisson).

Afin de proposer des modèles adaptés aux essais thérapeutiques, une fois passées les phases de compréhension physiopathologique et de caractérisation des modèles, Norden *et al.* (1980) ont reproduit un modèle d'ostéite avec un suivi de plus courte durée que leur premier modèle. Ils inoculèrent des lapins séparément à *S. aureus* et à *Pseudomonas Aeruginosa*. Sacrifiés à J7, J14 et J28, les animaux ont été évalués radiologiquement, bactériologiquement et histologiquement (l'étude histopathologique était absente du premier modèle de Norden et Kennedy (1970). Sur le plan radiographique, les lésions allaient crescendo de J7 à J28 avec extension progressive de l'infection aboutissant à la destruction osseuse et à la formation de séquestres. Sur le plan histopathologique, à J7, se produisait la constitution d'un large abcès au niveau du tibia proximal. A J14, l'inflammation intramédullaire était aiguë et la réaction périostée diffuse. La destruction extensive de la corticale tibiale s'accompagnait de la formation de séquestres. A J28, l'inflammation médullaire était encore aiguë à tous les niveaux et la plus grande partie de l'os cortical était détruite avec extension extraosseuse des lésions. Les auteurs avaient noté que les lésions osseuses obtenues étaient plus sévères avec *S. aureus* qu'avec *P. Aeruginosa*. Ainsi, histologiquement, avec *P. Aeruginosa*, l'aspect d'abcès aigu étendu était moins évident à J7 et les cellules inflammatoires présentes à J14 représentaient un mélange d'inflammation aiguë et chronique. A J28, l'inflammation chronique était prédominante, avec cicatrisation fibreuse et néo-ostéogénèse [Norden *et al.*, 1980].

#### e) *Exploration des ostéites chez différentes espèces animales*

Pendant les années 80, des modèles animaux d'ostéite -autres que le lapin- ont été développés. Ainsi Emslie *et al.* (1983) ont développé le **premier modèle d'ostéomyélite aiguë**, identique à celui de l'enfant. Il s'agissait d'un modèle aviaire. En injectant dans la veine de l'aile de poules âgées de 29 jours des inocula allant de  $10^4$  UFC à  $10^8$  UFC de *S. aureus*, les auteurs avaient réussi à induire une OMA qu'il définissait comme "l'évidence histologique d'au moins un abcès dans le tibia proximal ou bien dans le fémur distal après 8 jours d'une inoculation intraveineuse de bactérie". L'inoculum minimum nécessaire à infecter une poule

sur 2 était de  $5,5 \times 10^5$  UFC de *S. aureus*. Les poules étaient sacrifiées entre J1 et J8 après l'inoculation, elles ont été évaluées bactériologiquement, radiologiquement et histologiquement. Les abcès étaient retrouvés avec prédilection à proximité du cartilage de conjugaison tibial proximal et fémoral distal. Occasionnellement, il a été observé des abcès adjacents au périoste métaphysaire ressemblant à l'abcès sous-périosté chez l'Homme. L'examen post-mortem des poules infectées n'avait pas mis en évidence d'abcès hépatique, pulmonaire ou rénal, suggérant que la bactérie était restée localisée en région métaphysaire des os longs.

Fitzgerald (1983) a décrit son modèle canin **d'ostéite tibiale à corps étranger** (en PMMA) - et son traitement préventif ou curatif par du PMMA-gentamicine -. Pour cela, le PMMA-gentamicine a été implanté en même temps que l'injection intramédullaire de  $10^9$  UFC de *S. aureus* (recherche d'effet préventif), ou bien 1 mois, 2 mois et 3 mois après l'inoculation de *S. aureus* (recherche d'effet curatif). L'infection a été obtenue dans 100% de cas. L'auteur a montré que le PMMA-gentamicine était efficace pour prévenir l'infection avec stérilisation de 9 chiens sur 10, mais que ce traitement était incapable de traiter une infection déjà installée, avec stérilisation de seulement 2 lapins sur 5 dans le groupe traitement curatif. A noter que le rôle du débridement n'a pas été analysé dans cette étude.

Passl *et al.* (1984) ont développé un **modèle d'ostéite post-traumatique** chez le cochon-dinde de Guinée, en réalisant des fractures du fémur et en les ostéosynthésant chez une partie des animaux par une broche endomédullaire. Ils injectèrent au niveau du site fracturaire soit *E. Coli*, soit *S. aureus*. L'infection était obtenue chez la majorité des animaux, mais contrairement *au S. aureus*, *E. Coli* n'a pas été retrouvé au niveau osseux lors de l'autopsie au moment du sacrifice. Ceci a mis en évidence **l'affinité particulière de *S. aureus* à rester dans l'os et à y développer l'ostéite (ou l'ostéomyélite) chronique.**

EitenMüller *et al.* (1985) inauguraient **les essais thérapeutiques** sur les modèles animaux d'ostéite. Ils ont inoculé, chez des chiens Mongrol,  $10^6$  UFC de *S. aureus* dans des cavités préalablement créées en métaphysaire tibial proximal et comblées d'une éponge faisant office de corps étranger. Après développement de l'infection (3 semaines après l'inoculation), les éponges ont été ôtées et les cavités comblées, soit par des granules d'hydroxyapatite (HA) chargés de ciprofloxacine, de fosfomycine ou d'antiseptique, soit par des granules de HA sans antibiotique ni antiseptique. D'autres cavités témoins ont été comblées par de l'os spongieux. Ces situations expérimentales reproduisaient les situations classiques en clinique humaine de traitement de l'infection post-traumatique à *S. aureus* de l'époque par le lavage-drainage à l'aide d'un antiseptique et/ou antibiotique associés au

comblement par autogreffe spongieuse selon la technique de Papineau *et al.* (1979) et/ou par Gentabilles (Septopal®). Les auteurs avaient conclu à la supériorité du traitement antibiotique local par rapport au traitement antiseptique, et ont confirmé les bons résultats de la technique de Papineau. Ils suggèraient le remplacement du traitement de l'infection chronique - réalisé classiquement par la succession, en plusieurs temps, de curetage, irrigation lavage antiseptique/antibiotique, comblement temporaire par du Septopal®, puis définitif par de l'os spongieux- par la technique curetage-comblement en un temps par un biomatériau chargé d'antibiotique. C'était l'amorce des bases théoriques de l'évolution pratique actuelle.

Rissing *et al.* (1985) créèrent un modèle d'ostéite chronique expérimentale chez la souris. **La souris étant plus adaptée aux traitements systémiques** que le lapin et permet la comparaison des traitements systémiques et locaux. Le modèle d'ostéite chez la souris a été bien établi par Zak *et al.* (1981) en utilisant la même procédure expérimentale que Norden - chez le lapin- avec injection tibiale du morrhuate de sodium comme produit sclérosant, suivie de l'inoculation de *S. aureus* et/ou de *Pseudomonas aeruginosa*. Rissing *et al.* (1985) ont reproduit ce modèle en créant des lésions d'ostéomyélite chronique pour montrer la résistance de cette infection au traitement systémique par des antibiotiques antistaphylococciques utilisés à doses adaptées (Oxacilline 120 mg/Kg/jour; ceftriaxone 50 mg/Kg/jour) et pendant une durée suffisante (14 et 28 jours). C'est **la raison d'exister de l'antibiothérapie locale**.

Worlock *et al.* (1988) a développé un modèle **d'ostéite post-traumatique chez le lapin**. Utilisant 19 lapins, il avait procédé à la réalisation d'une fracture médiadiaphysaire du tibia, suivie par l'introduction d'une broche centro-médullaire (identique au modèle d'Andriole). Une aiguille 23 G était ensuite mise en place en percutanée pour inoculer le site de fracture chez 3 groupes de lapins par  $10^5$ ,  $10^6$  ou  $10^7$  UFC de *S. aureus* (provenant d'un patient porteur d'ostéite chronique). Les lapins étaient sacrifiés à 12 semaines. Il n'y avait pas d'infection dans le groupe contrôle (n=5, injection de serum salé sans bactérie), 0 infection dans le groupe  $10^5$  UFC (n=4), 2 infections dans le groupe  $10^6$  UFC (n=5) et 4 infections dans le groupe  $10^7$  UFC (n=5). L'intérêt de cet article était de montrer l'importance d'un **inoculum suffisant** pour obtenir un pourcentage suffisamment élevé d'infection osseuse, comme l'ont redémontré récemment Fukushima *et al.* (2005) chez le rat avec un inoculum minimum de  $10^6$  UFC nécessaire pour obtenir l'infection osseuse.

Dans un article de revue sur les modèles animaux d'ostéites et d'ostéomyélites, Norden (1988) a défini les avantages et les inconvénients des modèles existants. Il soulignait

la variabilité de la maladie et conclut à la nécessité de définir un modèle acceptable à défaut d'être idéal afin de contrôler les multiples variables de la maladie infectieuse osseuse.

A la fin de la décennie 1980, Morrissy et Haynes (1989) ont développé **le premier modèle d'ostéomyélite aigüe chez le lapin**, après le modèle aviaire d'Emslie *et al.* (1983), 108 ans après les constatations de Hobo (1921) que les bactéries inoculées, par voie hématogène, se fixaient initialement au niveau épiphysaire et métaphysaire sur les os longs et 102 ans après celles Wilensky (1927) qui précisa le rôle des thromboses vasculaires dans l'étiopathogénie de l'ostéomyélite hématogène [Wertheimer et Martin, 1964]. Dans le travail de Morrissy et Haynes (1989), l'ostéomyélite était associée à un traumatisme de la plaque de croissance métaphysaire supérieure du tibia chez des lapins jeunes (âgés de 6 semaines; sachant que le cartilage de croissance du lapin se ferme vers l'âge de 3 mois). L'inoculation bactérienne était réalisée par voie hématogène par une souche de *S. aureus* ( $10^8$  UFC/ml). Les animaux des différents groupes testés (groupe 1: Fracture de la plaque de conjugaison; groupe 2: Injection intraveineuse de *S. aureus* sans fracture; groupe 3: Fracture + inoculation) étaient sacrifiés entre J1 et J7 après le début de l'expérimentation. Dans le groupe 1, la cicatrisation de la fracture était obtenue en 7 jours. Dans le groupe 2, un seul foyer limité d'OMA a été obtenu chez un lapin sur 11 avec l'utilisation de 100 µl de suspension bactérienne et 10 lapins sur 11 ont été infectés en utilisant 200 µl de suspension bactérienne. Dans ce dernier cas, Cinq prélèvements sur 10 étaient positifs à *S. aureus* (l'atteinte était tibiale proximale ou fémorale distale). Dans le groupe 3, l'OMA était obtenue dans 94% des cas dans le sous groupe inoculés de 100 µl de suspension bactérienne et dans 100% des cas dans le sous groupe inoculés de 200 µl de suspension bactérienne [Morrissy et Haynes, 1989], à comparer avec les 50% d'OMA obtenues sans traumatisme dans le modèle d'Emslie *et al.* (1983). Ceci suggère l'importance des deux facteurs – traumatisme de la plaque conjugale, quantité élevée d'inoculum – pour le développement de l'OMA, avec probablement un rôle plus important du traumatisme affaiblissant le plaque de croissance et prédisposant la région métaphysaire à "accrocher" la bactérie.

A partir des années 1990, les essais thérapeutiques sur les ostéites chez l'animal ont connu un grand essor et différents modèles "d'implant related osteomyelitis" ont été développés pour répondre à l'augmentation des infections nosocomiales, en particulier les infections sur prothèses.

Ainsi, Johansson *et al.* (1991) ont développé un modèle d'ostéite à corps étranger à germe anaerobi ( $10^7$  UFC de *Bacteroides Fragilis*) au niveau de la métaphyse tibiale supérieure du lapin. Une éponge de polyvinyl servait de corps étranger associée au sclérosant

(Morrhuate de sodium). Le développement de l'infection a été obtenu au bout de 5 semaines. Les lapins avaient un suivi radiographique et tomодensitométrique. Le sacrifice des animaux à 18 semaines a mis en évidence des cultures positives au germe initial. Il s'est produit une infection du côté controlatéral (injecté uniquement au liquide de Ringer, au morrhuate de sodium sur implantation préalable d'une éponge de polyvinyl) témoignant d'un passage systémique de la bactérie. Ceci reproduisait l'infection des prothèses chez les patients à partir d'un foyer infectieux à distance.

Lambe *et al.* (1991) ont développé un modèle d'ostéite expérimentale à un corps étranger chez le lapin. Le canal médullaire du tibia a été préparé pour recevoir un cathéter de 4,5 cm de long, de 2,2 mm de diamètre externe et de 1 mm de diamètre interne. Il a été ensuite réalisé une injection séquentielle dans la lumière du cathéter de 100 µl de morrhuate de sodium, puis de 100 µl de  $10^7$  UFC de *Bacteroides fragilis*, puis de 100 µl de  $10^7$  UFC de *Staphylococcus epidermidis*, puis de 100 µl de PBS. D'autres groupes de lapins ont été inoculés de la même façon avec l'un ou l'autre des germes. Les radiographies ont été réalisées à 4, 7 et 14 semaines après l'infection. Les lapins développant l'ostéite étaient sacrifiés pour analyse biologique: Bactériologie du fragment du corps étranger (CE), de la moelle osseuse (MO) et d'un fragment osseux pulvérisé (FO). L'histologie des différents fragments osseux a été effectuée. Deux lapins sur 5 du groupe *S. epidermidis* ont développé l'ostéite avec un germe retrouvé dans les 3 prélèvements (CE, MO, FO) de chacun des animaux. Les 3 lapins n'ayant pas développé d'OM (OM-), le prélèvement FO était négatif alors que les prélèvements CE et MO étaient positifs à *S. epidermidis*. Histologiquement, 2 des 3 lapins OM- présentaient une résorption osseuse. L'examen en microscopie électronique montrait des cathéters (CE) couverts de cellules coccoïdes avec des microcolonies bien développées; quelques cocci étaient présents dans le prélèvement MO du même lapin et plus rarement sur le prélèvement FO. Une section du cathéterisme montrait un épais agglomérat de cocci gram+ entouré de glycocalyx. Cette étude confirme **le rôle croissant du *S. epidermidis* producteur de slime** dans "l'implant related osteomyelitis" et l'intérêt des **prélèvements multiples** intéressant le liquide et tissus endomédullaires, mais aussi des fragments osseux et quand c'est possible des échantillons de l'implant retiré pour affirmer l'ostéite et éviter les faux négatifs que nous connaissons en pratique clinique dans les infections sur prothèse. L'analyse des autres groupes (infectés à *B. fragilis* seul ou associé à *S. epidermidis*) avait mis en évidence que les bactéries gram + (*S. epidermidis*) étaient associés de façon prédominante à la formation de biofilm.

Rissing (1991) a publié un article intéressant intitulé "Animal models of osteomyelitis" où il retrace l'histoire des modèles animaux d'ostéomyélite et d'ostéite et analyse les particularités des 5 animaux utilisés: le lapin, le chien, la poule, le rat et le cochon-dinde (Guinea pig). Après une analyse de la pathogénie de l'infection osseuse, l'auteur évoque la classification des ostéites dans le but de leur utilisation thérapeutique. Nous verrons plus loin l'intérêt des classifications pour la réalisation d'essais thérapeutiques expérimentaux fiables.

Spagnolo *et al.* (1993) avait décrit un nouveau modèle d'OMC tibiale chez le rat utilisant la colle biologique, dérivée du collagène, comme agent sclerosant. L'inoculum de *S. aureus* était de  $2 \times 10^6$  UFC/5 $\mu$ l. Les rats ont été sacrifiés entre 1 et 6 mois. L'évaluation était **clinique, radiographique, macroscopique, histopathologique et bactériologique (comptes bactériens)**. Cliniquement, il existait des fistules chez plus de 80% des rats. L'ostéomyélite était confirmée par l'anatomopathologie dans 90% des cas, et les comptes bactériens étaient positifs dans 86% des cas. L'injection de fibrine seule n'induisait pas d'OM. Cet article met le doigt sur l'importance des **cinq paramètres** qui doivent être analysés pour l'évaluation de tout modèle expérimental d'ostéite.

Garvin *et al.* (1994) ont utilisé le chien adulte de race Mongrel pour tester un polymère-copolymère des acides lactique et glycolique (PLA-GLA) résorbable chargé de gentamicine dans le traitement d'une ostéite expérimentale locale. Le modèle utilisé était celui de Fitzgerald (ostéite expérimentale locale sur corps étranger en PMMA). Trois groupes thérapeutiques ont fait l'objet de cette expérimentation: G1 (n=16), traité par gentamicine en IM (3 mg/kg/j en 3 fois), G2 (n=9), traité par PMMA-gentamicine et G3 (n=9), traité par PLA-GLA50-gentamicine. L'infection a été éradiquée chez 10 chiens sur 16 dans le G1 (traitement systémique), chez 8 cas sur 9 dans le G2 (PMMA-gentamicine) et chez 9 cas sur 9 dans le G3 (PLA-GLA-gentamicine). Il n'y avait pas de différence significative entre les groupes 2 et 3, alors qu'il existait une différence significative entre les groupes 2 et 1 et entre les groupes 3 et 1 (respectivement  $p=0,04$  et  $0,08$ ). Il n'y avait pas de corrélation entre l'aspect radiographique et l'éradication de l'infection, ni entre l'aspect histologique et l'éradication de l'infection. Cette étude n'a pas évalué l'aspect biocompatibilité en tissu osseux des biomatériaux implantés. Elle a montré néanmoins la supériorité du traitement local par rapport au traitement systémique dans l'ostéite sur corps étranger.

Arens *et al.* (1996) ont montré l'influence du type d'implant dans l'induction locale de l'infection osseuse à *S. aureus*. Utilisant un modèle d'ostéite chez le lapin, ils ont testé deux plaques d'ostéosynthèse (en aluminium et en titane) et ont montré que l'infection était obtenue plus fréquemment (75 %) avec l'aluminium qu'avec le titane (35 %). Toujours concernant

l'ostéite sur matériel, mais dans un autre registre, celui d'infection sur prothèse, Belmatoug *et al.* (1996) ont développé un modèle d'infection sur prothèse du genou chez le lapin en utilisant  $5 \times 10^6$  UFC d'une souche à *SARM*. C'est la première étude utilisant **l'imagerie par résonance magnétique nucléaire** (IRM ou RMN) pour mettre en évidence les signes de l'infection expérimentale dès J7 alors que ces signes n'apparaissent qu'à J14 en radiographie standard [Belmatoug *et al.*, 1996; Volk *et al.*, 1994]. Le même modèle a été utilisé par **Mghir *et al.*** (1998) afin de comparer l'efficacité de deux antibiotiques, utilisés par voie systémique, dans le traitement de l'infection osseuse sur prothèse. Ces auteurs ont montré la capacité de la vancomycine et de la teicoplanine à réduire significativement la charge bactérienne de  $5,04 \pm 1,4 \log_{10}$  UFC/g d'os à  $3,3 \pm 1,6$  pour la vancomycine et à  $2,7 \pm 1,3 \log_{10}$  UFC/g d'os pour la teicoplanine, sans stériliser complètement le foyer infectieux. Ceci montre encore une fois l'incapacité de l'antiothérapie systémique seule à éradiquer l'infection sur corps étranger et confirme la place que doit tenir l'antibiothérapie locale dans ces indications.

Enfin, dans une revue détaillée de la littérature citant 128 références, An *et al.* (2006) ont fait une synthèse des différents aspects concernant les modèles expérimentaux d'ostéite:

- les espèces animales les plus utilisées sont (dans l'ordre): le lapin, le rat et le chien; les moins utilisés sont: la poule, le cochon-dinde, les mini-cochons, la chèvre et la brebis.
- Les os les plus utilisés pour créer une ostéite locale sont (dans l'ordre): le tibia, le fémur, le radius; les moins fréquemment utilisés sont: la mandibule et le rachis.
- Les questions à poser avant tout projet de création d'un modèle animal d'ostéite sont: quel animal? Quel os? Quelle voie d'inoculation (locale ou systémique)? Quelle bactérie utiliser et quelle est la concentration de l'inoculum bactérien à injecter? Si et quel agent sclérosant, corps étranger ou implant faudrait-il utiliser? Enfin, un traumatisme local est-il nécessaire pour la création du modèle?
- Les méthodes d'évaluation actuelles de base sont: l'observation clinique, la radiographie, la microbiologie et l'histopathologie.

Ainsi, L'accumulation de travaux explorant et caractérisant les différents champs expérimentaux -pathogénie, diagnostic et traitement- des différents types d'infection osseuse, a permis d'aboutir, principalement durant la décennie écoulée, à l'éclosion de travaux concernant les modèles expérimentaux d'ostéite centrés sur les aspects thérapeutiques.

## 2. Essais thérapeutiques chez l'animal

Les principales études testant des traitements locaux d'ostéite chez l'animal sont résumées dans le tableau A. Les constatations principales, dans ces modèles, qui représentent l'état de l'art actuel dans le domaine des modèles expérimentaux animaux d'ostéite, sont:

- Le lapin est l'animal de choix, quel que soit le type d'ostéite développé.
- Le tibia est le site de choix: sur les 13 modèles de ce tableau, le tibia est utilisé 8 fois, contre 3 fois le fémur et 2 fois le radius.
- Le facteur de virulence utilisé pour favoriser le développement de l'infection osseuse est plus fréquemment un corps étranger (6 fois) en rapport avec la fréquence et la préoccupation actuelle de l'infection sur prothèse. Un produit sclérosant est utilisé 4 fois pour simuler une ostéomyélite hématogène. Dans 3 papiers, aucun facteur de virulence n'a été utilisé.
- La dose d'inoculum la plus communément utilisée est 6 Log<sub>10</sub> UFC (10 fois contre 2 fois 7 Log<sub>10</sub> UFC et 1 fois 4 Log<sub>10</sub> UFC).
- L'intervalle inoculation-traitement était de 2 semaines dans 6 études, de 3 semaines dans 3 études et de 4 semaines dans 3 publications (tableau A).. Dans une étude, reproduisant un modèle d'antibioprophylaxie locale, l'inoculation et le traitement ont eu lieu au même temps [Stalman *et al.*, 2004].
- Le biomatériau LADS était 5 fois un polymère ou apparenté, 2 fois un CPC massif, 2 fois du sulfate de calcium et 1 fois chacun des biomatériaux suivants: fibrine, PMMA, HA et composite CPC-polymère.

## K. Classification des ostéites et ostéomyélites expérimentales

### 1. Classifications physiopathologiques

Pour pouvoir réaliser des essais thérapeutiques chez l'animal, il est très utile de disposer de classifications reproductibles afin de pouvoir comparer les différents résultats dans une même étude ou les différentes études entre elles. Deux classifications basées sur la physiopathologie du développement de l'ostéite ou de l'ostéomyélite étaient usuellement utilisées dans ce domaine :

- Classification de Waldvogel *et al.* (1970):
  - i. Type 1 : ostéomyélite hématogène;
  - ii. Type 2 : ostéite locale par contiguïté;
  - iii. Type 3 : ostéite associée à une maladie vasculaire;
  - iv. Type 4 : ostéomyélite chronique.
- Classification de Cierny-Mader (1985):
  - i. Stade I : ostéite médullaire;
  - ii. Stade II : ostéite superficielle;
  - iii. Stade III : ostéite localisée;
  - iv. Stade IV : ostéite diffuse.

La classification de Waldvogel *et al.* (1970), inspirée de la clinique Humaine, est peu adaptée aux essais thérapeutiques: le type 3 est inapplicable en expérimentation animale. La classification de Cierny-Mader (1985) est plus adaptée, mais en pratique seuls les stades III et IV peuvent être diagnostiquées facilement par la radiographie standard et reproductibles pour les comparaisons. Le stade I nécessite l'utilisation de l'IRM et le stade II a peu d'intérêt. De plus, cette classification a pour inconvénient de ne pas séparer de façon nette les différents stades, puisqu'une ostéite peut être médullaire et localisée ou médullaire et diffuse, d'où l'intérêt des classifications topographiques.

**Tableau A:** Modèles d'ostéite expérimentale avec application de traitements locaux par des biomatériaux vecteurs d'antibiotiques (LADS).

Caractéristiques du modèle Auteurs/ Année	Modèle	Site	Sclérosant/Corps étranger/ Implant	Bactérie/ Inoculum en UFC <sup>d</sup>	Inoculation -traitement (semaines)	Biomaté-riau LADS <sup>g</sup>	Antibio-tique
Ambrose <i>et al.</i> , 2004	Lapin NZ <sup>a</sup>	Radius	-	<i>S. aureus</i> / 2x10 <sup>6</sup>	4	Polymère PLA-GLA <sup>h</sup>	TM <sup>l</sup>
Calhoun et Mader, 1997	Lapin NZ	Tibia proximal	Bouchon en PMMA <sup>c</sup>	<i>S. aureus</i> / 5x10 <sup>4</sup>	2	PLA-PL-GC	VM <sup>m</sup>
Dahners et Funderburk, 1987	Lapin NZ	Tibia proximal	Morrhuate de sodium	<i>S. aureus</i> / 3x10 <sup>6</sup>	2	Sulfate de Calcium	GM <sup>n</sup>
Gürsel <i>et al.</i> , 2001	Lapin LA	Tibia proximal	Implant métallique (Broche)	<i>S. aureus</i> / 2,5x10 <sup>6</sup>	3	Polyester PHB PHBV <sup>i</sup>	SC et SA <sup>o</sup>
Kanellakopoulou <i>et al.</i> , 2000	Lapin	Tibia proximal	Implant métallique (Aiguille)	SARM <sup>e</sup> / 3,7x10 <sup>6</sup>	3	PLA-GLA <sup>h</sup>	PF <sup>p</sup>
Lazarettos <i>et al.</i> , 2004	Lapin NZ	Fémur proximal	Implant métallique (Aiguille)	SARM <sup>e</sup> / 10 <sup>7</sup>	3	CPC <sup>j</sup>	TC <sup>q</sup>
Mader <i>et al.</i> , 2002	Lapin NZ	Tibia proximal	Cathéter	<i>S. aureus</i> / 10 <sup>6</sup>	2	Fibrine	TM <sup>l</sup>
Nelson <i>et al.</i> , 2002	Lapin NZ	Radius	-	<i>S. aureus</i> / 10 <sup>6</sup>	4	Sulfate de Calcium	TM <sup>l</sup>
Nijhof <i>et al.</i> , 2001	Lapin NZ	Tibia Endomé-dullaire	Implant métallique (Broche)	<i>S. aureus</i> / 10 <sup>5</sup> et 10 <sup>6</sup>	4	PMMA <sup>c</sup>	TM <sup>l</sup>
Rutledge <i>et al.</i> , 2003	Lapin NZ	Fémur Endomé-dullaire	Morrhuate de sodium	<i>S. aureus</i> / 10 <sup>6</sup>	2	Polycapro-lactone	TM <sup>l</sup>
Sasaki et Ishii, 1999	Lapin JWR	Tibia proximal	Sclérosant	<i>S. aureus</i> / 10 <sup>7</sup>	2	CPC-PLA	GM <sup>n</sup>
Shirliff <i>et al.</i> , 2002	Lapin NZ	Tibia proximal	Morrhuate de sodium	SARM <sup>e</sup> / 10 <sup>6</sup>	2	HA <sup>k</sup>	VM <sup>m</sup>
Stallmann <i>et al.</i> , 2004	Lapin NZ	Fémur proximal <sup>b</sup>	-	<i>S. aureus</i> / 10 <sup>6</sup>	0 <sup>f</sup>	CPC <sup>j</sup>	HLF1-11 <sup>f</sup> & GM <sup>n</sup>

<sup>a</sup>Lapin NZ: Lapin de race NewZealand. <sup>b</sup>L'abord pour inoculation est proximal, avec alésage du fût fémoral sur toute la longueur de la diaphyse. <sup>c</sup>PMMA: Polyméthylméthacrylate. Le bouchon est utilisé ici pour boucher le trou d'inoculation bactérienne et éviter la diffusion de l'infection vers les tissus mous. <sup>d</sup>UFC: Colony forming unit. <sup>e</sup>SARM: *S. aureus* résistant à la méticilline. <sup>f</sup>Modèle avec essai thérapeutique au CPC-antibiotique dans un but prophylactique. <sup>g</sup>LADS: Local antibiotic delivery system. <sup>h</sup>PLA-GLA: Acide polylactique-acide polyglycolique. <sup>i</sup>PHB PHBV: le poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate. <sup>j</sup>CPC: Ciment phosphocalcique. <sup>k</sup>HA: Hydroxyapatite. TM<sup>l</sup>: Tobramycine, VM<sup>m</sup>: Vancomycine, GM<sup>n</sup>: Gentamicine, SC<sup>o</sup>: sulbactam-cefoperazone (Sulpérazone®) et SA<sup>o</sup>: sulbactam-ampicilline (Duocid®), PF<sup>p</sup>: Pefloxacin, TC<sup>q</sup>: Teicoplanine, HLF1-11<sup>f</sup> & GM<sup>n</sup>: Un peptide antimicrobien (Human lactoferrin 1-11) est comparé à la gentamicine.

## 2. Classifications topographiques

Elles sont définies sur les radiographies et destinées à des comparaisons assez précises. L'exemple type est la classification de Mader *et al.* (1999; 2002) en pourcentage de l'aire osseuse atteinte. La sévérité de l'ostéomyélite est définie selon le score visuel suivant (modification de l'architecture osseuse en 5 stades progressifs):

- 0 : Architecture osseuse normale.
- 1+ : Hypertrophie ou interruption du périoste ou des deux à la fois; épaissement des parties molles.
- 2+ : < 10% d'interruption de l'architecture normale de l'os.
- 3+ : 10 – 40 % d'interruption de l'architecture normale de l'os.
- 4+ : > 40% d'interruption de l'architecture normale de l'os.

Pour son auteur, seuls les lapins présentant les scores radiologiques de sévérité 3+ et 4+ sont intégrés dans les groupes thérapeutiques ou témoins [Mader et Shirtliff, 1999; Mader *et al.*, 2002]. C'est une bonne classification, mais le stade 4 manque de précision et peut inclure deux situations aussi différentes que l'atteinte localisée de 50% de l'os utilisé (pouvant être intégrée dans un protocole de traitement par antibiothérapie locale) et l'atteinte de toute la diaphyse donnant une pandiaphysite (ne pouvant être intégrée raisonnablement dans un protocole de traitement par antibiothérapie locale).

D'autres classifications ont été développées [Morrissy et Haynes, 1989; Schulz *et al.*, 2001], mais aucune ne permet une randomisation des lapins au moment du traitement de façon bien codifiée. Nous proposerons plus loin une nouvelle classification affinant celle de Mader.

# **TRAVAIL PERSONNEL**

Notre travail expérimental qui avait pour objectif de tester un nouveau biomatériau vecteur d'antibiothérapie locale, le DCPD- $\beta$ -TCP chargé de gentamicine, a été réalisé en trois étapes. Chaque étape expérimentale a abouti à la rédaction d'un article. Nous avons choisi, dans la rédaction de cette thèse, une présentation de ces travaux en trois parties s'articulant chacune autour d'un article. Chaque partie est terminée par une discussion de synthèse:

- 1) La première étape expérimentale a consisté à réaliser des études d'élution *in vitro* de la gentamicine à partir de différents lots de granules de DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine, afin de choisir la plus optimale parmi plusieurs présentations (de différentes concentrations en antibiotique). La 1<sup>ère</sup> partie rédactionnelle de cette thèse, consacrée à l'étude *in vitro*, sera présentée sous forme d'article (article 1).
- 2) La deuxième étape expérimentale a consisté à:
  - a. valider la biocompatibilité et l'ostéoconduction du DCPD- $\beta$ -TCP,
  - b. vérifier l'absence de toxicité de la gentamicine associée au DCPD- $\beta$ TCP,
  - c. valider un modèle d'ostéite localisée destiné à tester notre biomatériau comme vecteur d'antibiothérapie locale.

La deuxième partie portera sur les travaux préliminaires des sous-étapes a. et b. (non publiées). La validation de notre modèle expérimental animal (sous-étape c.), ayant fait l'objet d'un second article (article 2), sera présentée en fin de cette partie.

- 3) La troisième étape expérimentale a consisté à tester, sur modèle d'ostéite validé, l'efficacité des granules de DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine (comparées aux granules de PMMA-gentamicine, apportant localement la même quantité d'antibiotique) comme traitement local de l'ostéite expérimentale.

La troisième partie, consacrée à cet essai thérapeutique *in vivo* chez l'animal, sera présentée sous forme d'article (Article 3).

Une discussion globale portant sur l'ensemble des travaux réalisés sera présentée à la fin de ce manuscrit; Ensuite une conclusion finale cloturera notre thèse.

## ***Première partie***

### ***Etude In Vitro***

*Cette étude a pour but de choisir la présentation optimale du biomatériau vecteur d'antibiotique, en l'occurrence le DCPD- $\beta$ -TCP vecteur de gentamicine, susceptible d'être utilisé in vivo.*

## **Article 1**

**Low gentamicin load in granules of calcium phosphate for local treatment of osteomyelitis: an in vitro study.**

Saïd Zayane, Jean Marc Besnier, Chantal le Guelle, Nathalie Van Der Mee, Pierre Yves Sizaret, Philippe Rosset and Roland Quentin.

*Soumis à Journal of Biomedical Material Research: Part B (Applied Biomaterials) (Année 2010)*

Low gentamicin load in granules of calcium phosphate for local treatment of osteomyelitis: an *in vitro* study.

Saïd Zayane<sup>1,6</sup>, Jean Marc Besnier<sup>1,2</sup>, Chantal le Guellec<sup>3</sup>, Nathalie Van Der Mee<sup>1,4</sup>, Pierre Yves Sizaret<sup>5</sup>, Philippe Rosset<sup>6</sup> and Roland Quentin<sup>1,4</sup>.

1. Université F. Rabelais de Tours, Equipe d'Accueil 3854 – Institut Fédératif de Recherche 136 « Agents transmissibles et Infectiologie », UFR Médecine, 37032 Tours Cedex, France.
2. Université F. Rabelais de Tours ; CHU de Tours, Service de maladies infectieuses 37044 Tours Cedex 09, France.
3. Université F. Rabelais de Tours ; CHU de Tours, Service de pharmacologie-Toxicologie, 37044 Tours Cedex 09, France.
4. Université F. Rabelais de Tours ; CHU de Tours, Service de bactériologie et d'hygiène hospitalière, 37044, Tours Cedex 09, France.
5. Université F. Rabelais de Tours, Service de microscopie électronique, UFR Médecine, 37044 Tours Cedex, France.
6. Université F. Rabelais de Tours ; CHU de Tours, Service de chirurgie orthopédique et traumatologique 37044, Tours Cedex 09, France.

Mailing address: Equipe d'Accueil 3854 – Institut Fédératif de Recherche 136. UFR Médecine, Université François Rabelais de Tours, 10 Boulevard Tonnelé 37032 Tours Cedex – France.

Phone: 33 2 47 47 81 13. Fax: 33 2 47 47 85 30. E-mail: [saidzayane@yahoo.fr](mailto:saidzayane@yahoo.fr)

**ABSTRACT.** To substitute to the non-absorbable gentamicin-loaded polymethylmetacrylate for the local treatment of osteomyelitis, we developed an absorbable biomaterial using dicalcium phosphate dihydrate- $\beta$ -tricalcium phosphate (DCPD- $\beta$ -TCP) in the form of granules two to three millimeters in diameter. We studied the properties of this novel carrier *in vitro* as a drug delivery system (DDS) when loaded with 1% (10 mg/g), 2% (20 mg/g) and 3% gentamicin (30 mg/g). Each preparation was studied for its ability to release gentamicin using 300 mg (G300) and 600 mg (G600) of granules per milliliter of PBS. Two release phases were observed. During seven days, there was a 3 log<sub>10</sub> decrease in the concentration of gentamicin (in mg/24h). From day eight to the end of the experiment (42 days), there was a 2 log<sub>10</sub> (G300) and 1 log<sub>10</sub> (G600) decrease. G600 was the best preparation. It released gentamicin at detectable concentrations for at least 42 days, and at high concentrations during the first week. The G600-1% formulation (i.e. 6 mg gentamicin) eluted gentamicin concentrations higher than those eluted by the G600-3% (18 mg of gentamicin) from the sixth day, and by G300-2% (6 mg gentamicin) from the twelfth hour. The cumulative amount of drug released using G600 (42% to 50%) was not influenced by the concentration of gentamicin loaded into the biomaterial carrier. In conclusion, DCPD- $\beta$ -TCP formulated in 2-3 mm granules loaded with 1% gentamicin and used *in vitro* at 600 mg/mL or cm<sup>3</sup> showed the best characteristics and was selected for *in vivo* experiments in animal.

**KEYWORDS:** *In vitro*; bone cement-PMMA; calcium phosphate granules; drug delivery/release; infection.

## 1. Introduction

Osteomyelitis is treated by local administration of antibiotics because of poor penetration and diffusion of systemic antibiotherapy in sclerosed and poorly vascularized bone tissue and sequestrum. Polymethylmethacrylate (PMMA) is the most widely used drug delivery system (DDS) for administering antibiotics. Gentamicin-loaded PMMA beads are used to treat osteomyelitis<sup>1,2</sup> and PMMA cement is used to treat or prevent articular infections in prostheses<sup>2-7</sup>. Gentamicin and tobramycin are the two aminoglycosides most commonly used with PMMA bone cement. They are effective against most cultured orthopaedic microorganisms, including *Staphylococcus aureus*, which is the most frequent cause of infection<sup>8</sup>.

The extensive use of PMMA as a DDS has various disadvantages. Firstly, only a small proportion, about 5 to 17%, of the antibiotic is released by cement because of the "trapping effect"<sup>9,10</sup>. The use of PMMA beads has improved this release<sup>2</sup>. Secondly, the most important problem is that PMMA is not resorbable and presents a physical obstacle to osteogenesis. Thirdly, PMMA acts as a biomaterial surface to which bacteria preferentially adhere, grow and potentially develop antibiotic resistance, especially in the presence of the retained antibiotic<sup>10-12</sup>. Consequently, a second surgical operation is always necessary to remove PMMA and to fill the bone loss by bone graft, or with the use of a synthetic substitute.

Several absorbable synthetic substitutes, such as phosphocalcic ceramics, calcium sulfate, and polymers of polylactic-polyglycolic acids (PLA-GLA), have been investigated as antibiotic carriers<sup>13-17</sup>. These synthetic substitutes are largely underdeveloped in clinical use. Polymers are not perfectly biocompatible<sup>18-20</sup>, and ceramics provide burst release of antibiotics as a consequence of their preparation techniques<sup>21</sup>. The reported results for calcium sulfate are varied: for some authors, it is poorly effective<sup>22</sup>, and barely osteoconductive<sup>23</sup>; for others, calcium sulfate pellets could be used as a DDS for antibiotics<sup>17</sup>, but burst release has been observed<sup>24</sup>.

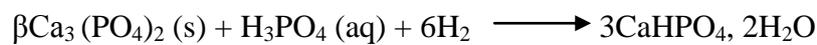
We developed a novel biomaterial belonging to the calcium phosphate cement family (CPC): dicalcium phosphate dihydrate- $\beta$ -tricalcium phosphate (DCPD- $\beta$ -TCP). The biocompatibility of these cements was experimentally established<sup>25</sup> and clinically confirmed when used as a self-setting bone cement to treat burst-fractures and to fill bone losses in osteoporotic fractures<sup>26-28</sup>. This biomaterial had never been used as DDS for antibiotics in human beings and it gives only a superficial "creeping substitution" when used as a self-setting bone cement<sup>28,29</sup>. It was tested, in vitro, in cement form, as a carrier of tetracycline<sup>30</sup>

and recently as a carrier of gentamicin, mixed with PLA-GLA<sup>31</sup>. In this study, we prepared a new form of DCPD- $\beta$ -TCP by preparing 2 to 3 mm diameter granules. That creates spaces to facilitate the biomaterial resorption and osteoconduction. Two quantities of DCPD- $\beta$ -TCP granules were loaded with three concentrations of gentamicin. We evaluated these six preparations as a DDS for gentamicin by determining, *in vitro*, the kinetics of antibiotic release.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Preparation of granules

$\beta$  tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) powder was mixed with orthophosphoric acid and water to produce brushite according to the following reaction :



DCPD and  $\beta$ -TCP powders (Kasios®, Launaguet, France) were then mixed (55% and 45% respectively). The setting process consists in dissolution of  $\beta$ -TCP, in water and orthophosphoric acid, followed by the progressive incorporation of DCPD throughout the paste. Minor amounts of sodium pyrophosphate and sulphuric acid were added to facilitate the acid-base reaction which is exothermic (43°C). Gentamicin sulfate powder (A & K b. v. Molenwerf 13, Uitgeest, Netherlands) was added to the mixture. The paste was left to harden overnight at room temperature. It was then crushed and sifted. We obtained granules of a mean size of about 2 to 3 mm per granule (Fig. 1). Microporosity, obtained by mercury intrusion porosimetry, was about 7  $\mu\text{m}$  ( $\pm 3$ ) and there was no macroporosity. Global porosity was approximately 40%. Sterilization was carried out using gamma rays, with a dose of at least 25 kgray. Three types of granules were prepared using 1% gentamicin sulfate (10 mg/g dry weight), 2% gentamicin sulfate (20 mg/g), and 3% gentamicin sulfate (30 mg/g). Two amounts of granules were used for the release experiments: 300 mg (i.e., 12 granules, referred to as G300) and 600 mg (i.e., 24 granules, referred to as G600). Six lots were thus prepared and tested.

### 2.2. Sampling for release experiments

Each lot of granules was placed in 1 ml of pH 7.4 isotonic phosphate-buffered saline (PBS). The granules were shaken for 10 seconds and incubated at 37°C. The amount G300 and G600 corresponded to the amount of biomaterial usually used in surgical practice to fill one  $\text{cm}^3$  of bone loss. PBS was changed completely after 1, 4 and 12 hours of contact (H1, H4 and H12) and then once daily from the 2<sup>nd</sup> to the 42<sup>nd</sup> day. We measured the gentamicin concentrations in the PBS from the three samples on the first day (H1, H4, H12) to detect a possible early burst release. Gentamicin concentrations were then determined daily until day 8

(D8), and subsequently on days 14, 21, 28 and 42 for the last period. Two aliquots of 500  $\mu$ L PBS were removed at each time point and were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . One aliquot was used for immuno-enzymatic measurements of gentamicin. The other was used to test the microbiological activity of gentamicin.

### 2.3. Gentamicin measurement

Gentamicin concentrations were determined using an immunoenzymatic assay (EMIT® 2000 Gentamicin Plus Assay - Dade Behring, U.K.). This technique allows accurate measurement between 0.25 to 10  $\mu\text{g/ml}$ <sup>32</sup>. Therefore, if necessary, aliquots were diluted in phosphate-buffered saline (PBS) and the values corrected for the dilution factor.

The two preparations of 300 and 600 mg of granules were used in 1 ml of PBS; thus, the amount of the antibiotic measured by EMIT, in  $\mu\text{g/ml}$ , represented the total amount of antibiotic released by the two preparations of biomaterial.

### 2.4. Kinetics of antibiotic release

The kinetics of antibiotic release from the granules was determined from the amount of antibiotic released for each sampling period, and expressed in mg/24h.

### 2.5. Antimicrobial activity

To ensure that no loss of activity occurred during the fabrication process, a reference agar diffusion test was used with known standard concentrations of gentamicin (1  $\mu\text{g/mL}$  to 2048  $\mu\text{g/mL}$ ). All experiments were carried out in duplicate. Mueller-Hinton agar plates (Biorad®) were seeded by flooding with an inoculum of 6  $\text{Log}_{10}$  CFU/mL of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, for which the minimum inhibitory concentration (MIC) of gentamicin is 0.25  $\mu\text{g/mL}$ . Three 6-mm-diameter absorption disks (Antibiotic Assay disks, Whatman®, England) were then placed per agar plate, each soaked with 20  $\mu\text{L}$  of aliquot from gentamicin elutions of different batches tested at each time point. After 18 to 20 hours of incubation at  $37^{\circ}\text{C}$ , the diameter of the zone of inhibition was measured for each PBS sample using a Diffusion Zone Reader (Dynatech microtiter® MK II) and compared with the reference diameter obtained using standard concentration. Intra-observer and inter-observer agreement was validated by analysis of 100 specimens. The measurement error was 1 mm, and the concordance 92%.

### 2.6. Scanning electron microscopy

Native samples of DCPD- $\beta$ TCP granules and samples obtained after 42 days of gentamicin release in PBS were pasted on aluminium stubs with carbon glue and sputter coated with an 8 nm thick platinum layer (Sputter Coater JUC 5000, Jeol). The specimens were then observed under a scanning electron microscope (SEM) (Zeiss Gemini 982) using a

low accelerating voltage of 3 Kv in secondary electron mode, imaged with magnifications of  $\times 1000$ ,  $\times 3000$  and  $\times 10000$ . Qualitative analysis of the different granule crystals was performed using the energy dispersive X-ray technique (EDS).

### 3. Results

#### 3.1. Amounts of antibiotic released

A large amount of gentamicin was released during the first few hours: between 795.2  $\mu\text{g/mL}$  for G300-1% and 5250  $\mu\text{g/mL}$  for G600-3% during the first hour and between 164  $\mu\text{g/mL}$  for G300-1% and 2190  $\mu\text{g/mL}$  for G600-3% in the time interval 1 - 4 h (Table 1). Gentamicin was detected throughout the whole experiment period (42 days) for all the lots tested. The duration of gentamicin elution was better for the 1% formulation. From day 3 to day 42, the G300-1% formulation eluted more gentamicin than the G300-2% and G300-3% formulations. From day 6 to day 42, the G600-1% formulation eluted more gentamicin than G600-2% and G600-3% (Table 1). Although G300-2% and G600-1% were loaded with similar amounts of gentamicin (i.e. 6 mg), the elution of the antibiotic was better with G600-1% than with G300-2% from the 12<sup>th</sup> hour up to the last measurement.

#### 3.2. Kinetics of antibiotic release

The kinetics detailing the release of gentamicin (Fig. 2) was calculated using the amounts of gentamicin reported in table 1. Two phases of release were observed on the semi-logarithmic plot. The release was fast for both G300 and G600 during the first week, with a 3  $\log_{10}$  decrease in the amount of gentamicin released. Thereafter, the release was slower, and from day 8 to day 42, there was a 2  $\log_{10}$  decrease and a 1  $\log_{10}$  decrease for gentamicin released from G300 and G600 preparations, respectively.

#### 3.3. Yield of the gentamicin-releasing DDS

For each lot tested *in vitro*, the percentage cumulative release of gentamicin was calculated using the cumulative amount released at each time point divided by the amount of gentamicin originally loaded in the carrier. The percentage yield of the DDS at the end of the experiment was between 37.5% and 63% of the amount of gentamicin originally contained in granules (Fig. 3).

The volume of PBS used in this study was always one milliliter. Therefore, the density of the biomaterial was lower in the G300 preparation (12 granules per ml) than the G600 preparation (24 granules per ml). The concentration of gentamicin slightly influenced the rate of gentamicin release in the denser G600 formulation (42% to 50%) relative to G300 (37.5% to 63%).

#### 3.4. Antibacterial activity

The inhibition diameters obtained with each supernatant compared well to those expected with standard solutions of gentamicin at the corresponding concentrations (data not shown), thus confirming the antibacterial activity of the gentamicin released.

### 3.5. Scanning electron microscopy

Qualitative analysis by scanning electron microscopy observation (Fig. 4) showed a predominance of phosphate and calcium ions in polyhedron and tablet crystal forms (A). The gentamicin-loaded DCPD- $\beta$ TCP granule observed before and after release of the antibiotic displayed a high level of dissolution after 42 days of elution, principally in tablet crystal form (A and B).

## 4. Discussion

PMMA is the biomaterial most often used as a DDS for gentamicin or tobramycin when treating bone infections<sup>2,33</sup>. There are several disadvantages to aminoglycoside-loaded PMMA, such as the trapping effect<sup>9,10</sup>, the prolonged release of antibiotics at very low concentrations inducing bacterial resistance<sup>11,12</sup>, and the necessity of secondary surgery to remove the PMMA<sup>8,33</sup>; thus, it is necessary to find suitable alternatives. DCPD- $\beta$ -TCP may be a good candidate. It is biocompatible, and is already used as cement block to fill bone losses or to enhance mechanical resistance in fractures of osteoporotic bone<sup>26-28</sup>. However, in this form, the resorption is superficial<sup>28,29</sup>, and it is yet to be used as an antibiotic DDS for treating patients.

Here, we developed a biomaterial that uses DCPD- $\beta$ -TCP, but in the form of small granules 2 to 3 mm in diameter. As previously shown, this form allows better resorption than the cement-block form and facilitates bone reconstruction by allowing osteoconduction through the spaces between granules<sup>34</sup>. The resorption of granules, due principally to dissolution of DCPD compound as reported previously<sup>35</sup> and confirmed by our SEM analysis (Fig. 4B), may facilitate their subsequent substitution by new bone, therefore avoiding the need for secondary surgery to remove biomaterial.

The first advantage of gentamicin-loaded DCPD- $\beta$ -TCP is that the antibiotic and DCPD- $\beta$ -TCP powders are mixed at about 43°C, a temperature that theoretically does not modify the antibiotic molecule. Our data confirmed that the released antibiotic effectively conserved its normal antibacterial activity. Indeed, the antibiotic concentrations measured by EMIT correlate strongly with the expected antimicrobial activity (inhibition diameter) on *S. aureus* strains that exhibit a MIC at 0.25  $\mu$ g/ml. This avoids developing a complex process for incorporating the antibiotic into the carrier by immersion, as required for phosphocalcic ceramics, which are fabricated at about 1200°C<sup>36,37</sup>.

The resorption of DCPD- $\beta$ -TCP granules may also avoid the antibiotic “trapping effect” (observed with the non-resorbable PMMA<sup>9-11</sup>). The percentage yields for the release of gentamicin in this study were between 37.5% and 63%. These yields are as good as the best yields obtained with the other DDSs tested (PMMA beads and cements, HA cement and ceramics, and PLA-GLA polymers), which are between 5% and 60.8%<sup>9,36,38,39</sup>. The relative release of gentamicin from cement cylinders of six CPCs was recently studied: this resulted in yields between 36% and 85%, but the duration of antibiotic release did not exceed 17 days<sup>40</sup>. Six ceramic granules were also analyzed in the same study. The release of gentamicin was between 30% and 62%, but burst release was observed during the first day and the release period was short<sup>40</sup>. This was probably due to the manufacturing process used, as gentamicin was introduced into the DCPD- $\beta$ TCP powder when the DDS was manufactured. This may favour a more progressive release than when the antibiotic is adsorbed –by immersion- onto the biomaterial surface<sup>21,40</sup>. Ceramics are sintered at high temperature and therefore subsequent immersion is required to incorporate, secondarily, the gentamicin at low temperature. Contrary to ours, this process induces a drug-adsorption only onto the granule surface.

The methodologies used in studies that evaluate the capacity of biomaterials to release antibiotics vary and are not standardized. Most aim to determine the duration of elution of the antibiotic from the carrier<sup>13,15,17,36</sup>. The period of treatment for osteomyelitis is generally reported to be about four to six weeks<sup>41,42</sup>; therefore, one of the objectives was to study the release the antibiotic for at least this duration. With quantities of 300 or 600 mg of granules/ml, amounts that could be used in clinical practice to fill each cm<sup>3</sup> of bone loss, our DDS released gentamicin to at least the 42<sup>nd</sup> day (Table 1). This is a longer period than that obtained for isepamicin-loaded hydroxyapatite (HA) (18 days)<sup>36</sup>, and gentamicin-loaded PLA-GLA (30 days)<sup>43,44</sup>. It is similar to that reported for tobramycin-loaded PLA-GLA<sup>38</sup>, and that of arbekacin-sulfate-loaded HA cubic blocks<sup>13</sup> (at least 45 days). Nevertheless, some of these biomaterials are not biocompatible<sup>18-20</sup>, while others were only weakly bioabsorbable (HA).

In addition to the total duration of release and the percentage yield of antibiotic released from the carrier, two other variables may be important. The first is the period during which the biomaterial releases a concentration of antibiotic above the sensitivity breakpoint concentration (i.e., 1  $\mu$ g/ml for gentamicin)<sup>45,46</sup>. Indeed, this period possibly reflects the period during which the antibiotic is locally active on all susceptible bacterial strains (i.e., all strains with an MIC  $\leq$  1 mg/l)<sup>47,48</sup>. Unfortunately, the results of *in vitro* experiments cannot

be extrapolated in these terms as they are conducted in close space and may not represent the “volume” in which the drug will diffuse *in vivo*. The second factor, that is rarely addressed but is probably of importance, is the kinetics of the antibiotic release. Indeed, the methodology used differs significantly between studies in terms of sampling intervals and in the volume of medium used for elution. Establishing a kinetic curve for the release of antibiotics, for example in  $\mu\text{g}/24\text{h}$ , as which is independent of the method of elution used, would facilitate a comparison between the performance of various antibiotic DDSs studied. We observed a two-phase kinetic release with our biomaterial. The rapid initial release of aminoglycosides, displaying concentration-dependent bactericidal effect during the first phase (7 days), may be important for a more rapid and extensive response; thus, this may prevent the emergence of mutant *S. aureus* subpopulations. This first release phase should predominantly represent the antibiotic release from the surface of the carrier, depending to a basic diffusion mechanism, when the gradual release of the second phase would correspond to deeper layers as exposed by Stallmann<sup>40</sup> and might be facilitated by progressive dissolution of the granules in the PBS solution.

Our *in vitro* experiments cannot be directly extrapolated in terms of efficacy *in vivo*. Indeed, the concentrations measured in this study are dependent on the volume of PBS used in the experiments, and they are of no value for the local *in vivo* situation. However, these results served us as a basis to select the dose of granules to be used in an *in vivo* study on a rabbit model of osteomyelitis, which provided very satisfactory results (submitted).

An *in vitro* study has shown that applying a constant high concentration of tobramycin ( $> 1000 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) locally results in a decrease of osteoblast growth, and a concentration greater than  $10000 \mu\text{g}/\text{mL}$  causes cell death<sup>49</sup>. Using 10% of gentamicin in the DDS<sup>14,50</sup> may be toxic. Therefore, to avoid possible bone toxicity, the best preparations may be those which release less than  $1000 \mu\text{g}/24\text{H}$ ; thus, the preparations loaded with 1% gentamicin may be appropriate (Fig. 2).

Cure of bone infection must also be obtained without causing toxicity. Studies in animal models and in human beings have shown that low concentrations of gentamicin are detectable in serum when antibiotics are used locally in cements and beads<sup>2,22,39</sup>. However, only one clinical case of associated renal failure has been described in an old patient treated for infected total knee arthroplasty, gentamicin being used locally at high cumulative concentrations<sup>51</sup>. In another study, measurements of tubular and glomerular function showed no abnormalities in several patients treated with gentamicin-impregnated beads<sup>52</sup>.

In conclusion, the DCPD- $\beta$ TCP preparation of granules loaded with 1% gentamicin used at 600 mg/mL (therefore 600 mg/cm<sup>3</sup>) released the antibiotic with conserved antibacterial activity for a period and concentrations appropriate for treating osteomyelitis and was thus selected for subsequent animal experiments.

## Acknowledgments

We thank Joëlle Loulergue and David Ternant for technical assistance, Pascal Garaud for help with the statistical analyses. We are grateful to Mary Bouley for relecture of the manuscript and to Kasios® for manufacturing DCPC- $\beta$ TCP - gentamicin granules and for supplying the EMIT® 2000 Gentamicin Plus Assay reagents.

## References

1. Kent ME, Rapp RP, Smith KM. Antibiotic beads and osteomyelitis: Here today, What's coming tomorrow? *Orthopedics* 2006;29:599-603.
2. Wining DA, Fass RJ. Antibiotic-Impregnated Cement and Beads for Orthopedic Infections. *Minireview Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:2675-2679.
3. Buchholz HW, Elson RA, Engelbrecht E, Lodenkamper H., Rottger J, Siegel A. Management of deep infection of total hip replacement. *J Bone Joint Surg Br* 1981;63:342-353.
4. Jiranek WA, Hanssen AD, Greenwald AS. Antibiotic-loaded bone cement for infection prophylaxis in total joint replacement. *J Bone Joint Surg Am* 2006;88:2487-2500.
5. Josefsson G, Gudmundsson G, Kolmert L, Wijkstrom. Prophylaxis with systemic antibiotics versus gentamicin bone cement in total hip arthroplasty: a five-year survey of 1688 hips. *Clin Orthop Relat Res* 1990;253:173-178.
6. Josefsson G, Kolmert L. Prophylaxis with systemic antibiotics versus gentamicin bone cement in total hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 1993;292:210-214.
7. Nelson CL, Evans RP, Balha JD, Calhoun J, Henry S, Patzakis MJ. A comparison of gentamicin-impregnated polymethyl-methacrylate beads implantation to conventional parenteral antibiotic therapy in infected total hip and knee arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 1993;295:96-101.
8. Henry SL, Galloway LP. Drug Delivery System: Local antibacterial therapy for management of orthopaedic infections. Pharmacokinetic considerations. *Clin Pharmacokinet* 1995;29:36-45.
9. Hoff SF, Fitzgerald RH, Kelly PJ. The depot administration of penicillin G and gentamicin in acrylic bone cement. *J Bone Joint Surg Am* 1981;63:798-804.
10. Van de Belt H, Neut D, Uges DRA, Schenk W, Van Horn JR, Van Der Mei HC, Busscher HJ. Surface roughness, porosity and wettability of gentamicin-loaded bone cements and their antibiotic release. *Biomaterials*. 2000;21:1981-1987.
11. Neut D, Van de Belt H, Stokroos I, Van Horn JR, Van der Mei HC, Busscher HJ. Biomaterial-associated infection of gentamicin-loaded PMMA beads in orthopaedic revision surgery. *J Antimicrob Chemother* 2001;47:885-891.
12. Van de Belt H, Neut D, Van Horn JR, Van Der Mei HC, Schenk W, Busscher HJ. Antibiotic resistance. To treat or not to treat? *Nat Med* 1999;5:358-359.
13. Itokazu M, Matsunaga T, Kumazawa S, Wenyi Y. A novel drug delivery system for osteomyelitis using porous hydroxyapatite blocks loaded by centrifugation. *J Appl Biomater* 1995;6:167-169.
14. Lucke M, Wildemann B, Sadoni S, Surke C, Schiller R, Stemberger A, Raschke M, Haas NP and Schmidmaier G. Systemic versus local application of gentamicin in prophylaxis of implant-related osteomyelitis in a rat model. *Bone* 2005;36:770-778.

15. Mader JT, Calhoun J, Cobos J. *In vitro* evaluation of antibiotic diffusion from antibiotic-impregnated biodegradable beads and polymethylmethacrylate beads. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:415-418.
16. Mäkinen TJ, Veiranto M, Knuuti J, Jalava J, Törmälä P and Aro HT. Efficacy of bioabsorbable antibiotic containing bone screw in the prevention of biomaterial-related infection due to *Staphylococcus aureus*. *Bone* 2005;36:292-299.
17. Turner TM, Urban RM, Hall DJ, Chye PC, Segreti J, Gitelis S. Local and systemic levels of tobramycin delivered from calcium sulphate bone graft substitute pellets. *Clin Orthop Relat Res* 2005;437:97-104.
18. Böstman OM. Osteoarthritis of the ankle after foreign-body reaction to absorbable pins and screws: A three to nine follow-up study. *J Bone Joint Surg Br* 1998;80:333-338.
19. Santavirta S, Konttinen YT, Saito T, Grönblad M, Partion E, Kempainen P, Rokkanen P.. Immune response to polyglycolic acid implants. *J Bone Joint Surg Br*1990;72:597-600.
20. Weiler A, Hoffmann FGR, Stählen AC, Helling HJ, Südkamp NP. Biodegradable implants in sports medicine: The biological base. *Arthroscopy* 2000;16:305-321.
21. Stallmann HP, Faber C, Slotema E, Lyaruu DM, Bronckers ALJJ, Amerongen AVN, Wuisman PIJM. Continuous-release or burst-release of the antimicrobial peptide human lactoferrin 1-11 (hLF1-11) from calcium bone substitutes. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:853-855.
22. Dahners LE, Funderburk CH. Gentamicin-loaded plaster of Paris as a treatment of experimental osteomyelitis in rabbits. *Clin Orthop Relat Res* 1987;219:278-282.
23. Bouillet R, Bouillet B, Kadima N, Gillard J. Traitement de l'ostéomyélite chronique en milieu Africain par implants de plâtre imprégnés d'antibiotiques. *Acta Orthop Belg* 1989 ;55:1-11.
24. Saniola SM, Albert SF. The *in vitro* elution characteristics of vancomycin and tobramycin from calcium sulphate beads. *J Foot Ankle Surg* 2005;44:121-124.
25. Apelt D, Theiss F, El-Warrak AO, Zlinszky K, Bettschart-Wolfisberger R, Bohner M, Matter S, Auer JA, Von Rechenberg B. In vivo behavior of three different hydraulic calcium phosphate cements. *Biomaterials* 2004;25:1439-1451.
26. Keating JF, Hajducka CL, Harper J. Minimal internal fixation and calcium-phosphate cement in the treatment of fractures of the tibial plateau. A pilot study. *J Bone Joint Surg Br* 2003;85:68-73.
27. Kwon BK, Goertzen DJ, O'Brien PJ, Broekhuysen HM, Oxland ThR. Biomechanical evaluation of proximal humeral fracture fixation supplemented with calcium phosphate cement. *J Bone Joint Surg Am* 2002;85:951-961.
28. Libicher M, Hillmeier J, Liegibel U, Sommer U, Pyerin W, Vetter M, Meinzer HP, Grafe I, Meeder P, Noldge G, Nawroth P, Kasperrk C. Osseous integration of calcium phosphate in osteoporotic vertebral fractures after kyphoplasty: initial results from a clinical and experimental pilot study. *Osteoporos Int* 2006;17:1208-1215.
29. Theiss F, Apelt D, Brand B, Kutter A, Zlinsky K, Bohner M, Matter S, Frei C, Auer JA, Von Rechenberg B. Biocompatibility and resorption of a burshite calcium phosphate cement. *Biomaterials* 2005;26:4383-4394.
30. Ratier A, Gibson IR, Best SM, Freche M, Lacout JL, Rodriguez F. Setting characteristics and mechanical behaviour of a calcium phosphate bone cement containing tetracycline. *Biomaterials* 2001;22:897-901.
31. Schnieders J, Gbureck U, Thull R, Kissel Th. Controlled release of gentamicin from calcium phosphate-poly(lactic acid-co-glycolic acid) composite bone cement. *Biomaterials*. 2006;27:4239-4249.
32. EMIT® 2000 Gentamicin Plus Assay. Actualized informations. Dad Behring Inc. Melton Keynes. 2004 : 1-4.
33. Wang J, Calhoun JH, Mader JT. The applications of bioimplants in the managements of chronic osteomyelitis. *Orthopedics* 2002;25:247-252.
34. Oonishi H, Hench LL, Wilson J, Sugihara F, Tsuji E, Matsuura M, Kin S, Yamamoto T, Mizokawa S. Quantitative comparison of bone growth behavior in granules of bioglass, A-W glass-ceramic, and hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res* 2000;51:37-46.

35. Frayssinet P, Gineste L, Conte P, Fages J, Roupuet N. Short-term implantation effects of a DCPD-based calcium phosphate cement. *Biomaterials* 1998;19:971-977.
36. Hasegawa M, Sudo A, Komlev VS, Barinov SM, Uchida A. High release of antibiotic from a novel hydroxyapatite with bimodal pore size distribution. *J Biomed Mater Res B (Appl Biomater)* 2004;70:332-339.
37. Saito T, Takeuchi R, Hirakawa K, Nagata N, Yoshida T, Koshino T, Okuda K, Takema M, Hori TJ. Slow releasing potential of vancomycin-loaded porous hydroxyapatite implanted into MRSA osteomyelitis. *Biomed. Mater. Res. B (Appl. Biomater)* 2002;63:245-251.
38. Ambrose CG, Gogola GR, Clyburn TA, Raymond AK, Peng AS, Mikos AG. Antibiotic microspheres: preliminary testing for potential treatment of osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res* 2003;415:279-285.
39. Joosten U, Joist A, Frebel T, Brandt B, Diederichs S, Von Eiff C. Evaluation of an in situ setting injectable calcium phosphate as a new carrier material for gentamicin in treatment of chronic osteomyelitis. *Biomaterials* 2004;25:4287-4295.
40. Stallmann HP, Faber C, Bronckers AL, Amerongen AVN, Wuisman PI. *In vitro* gentamicin release from commercially available calcium-phosphate bone substitutes influence of carrier type on duration of the release profile. *BMC Musculoskelet Disord* 2006;7:18.
41. Lazzarini L, Mader JT, Calhoun JH. Osteomyelitis in long bones. *J Bone Joint Surg Am* 2004;86:2305-2318.
42. Lew DP, Waldvogel FA. Osteomyelitis. *Lancet* 2004;364:369-379.
43. Baro M, Sanchez E, Delgado A, Perera A, Evora C. In vitro-in vivo characterization of gentamicin bone implants. *J Control Release* 2002;83:353-364.
44. Narahariseti PK, Lee HCG, Fu Y, Lee D, Wang C. *In vitro* and *in vivo* release of gentamicin from biodegradable discs. *J Biomed Mater Res B (Appl Biomater)* 2006;77:329-337.
45. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Concentrations, diamètres critiques et règles de lecture interprétative pour le *Staphylococcus* spp. 2009;33-35. Société Française de Microbiologie. Créteil. – <http://www.sfm.asso.fr/>
46. National committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *In* NCCLS approved standard M100-S14 NCCLS, Wayne, PA USA. 2004.
47. Andrews JM,. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob. Chemother* 2001;48,suppl1:5-16.
48. MacGowan AP, Wise R. Establishing MIC breakpoints and the interpretation of *in vitro* susceptibility tests. *J Antimicrob Chemother* 2001;48, Suppl 1:17.
49. Miclau T, Edin ML, Lester GE, Lindsey RW, Dahners LE. Bone toxicity of locally applied aminoglycosides. *J Orthop Trauma* 1995;9:401-406.
50. Lucke M, Schmidmaier G, Sadoni S, Wildemann B, Schiller R, Haas NP and Raschke M. Gentamicin coating of metallic implants reduces implant-related osteomyelitis in rats. *Bone* 2003;32:521-531.
51. Van Raaij TM, Visser LE, Vulto AG, Verhaar AN. Acute renal failure after local gentamicin treatment in an infected total knee arthroplasty. *J Arthroplasty* 2002;17:948-950.
52. Walenkamp GHIM, Vree TB, Van Rens TJG. Gentamicin-PMMA beads: pharmacokinetic and nephrotoxicological study. *Clin Orthop Relat Res* 1986;205:171-183.

**Table 1.** Concentrations of gentamicin released over 42 days into PBS by 300 mg and 600 mg of 2-3 mm granules of dicalcium phosphate dihydrate- $\beta$ -tricalcium phosphate loaded with 1%, 2% and 3% of gentamicin.

<b>Lots of granules (mg)</b>	<b>300</b>			<b>600</b>		
<b>Initial GEN<sup>a</sup> load</b>	1%	2%	3%	1%	2%	3%
Time (days: D)	Concentrations of GEN <sup>a</sup> released into PBS ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>c</sup>					
0.041 (1h <sup>b</sup> )	795.20	3065.60	4556.80	1653.00	4236.00	5250.00
0.17 (4h <sup>b</sup> )	164.00	517.00	850.00	460.00	1264.00	2190.00
0.5 (12h <sup>b</sup> )	53.50	128.40	185.20	164.00	324.00	606.00
D2 (24 h <sup>b</sup> )	35.00	44.70	60.50	76.60	123.00	175.40
D3 (48 h <sup>b</sup> )	23.16	16.80	21.84	47.20	58.10	80.30
D4 (72 h <sup>b</sup> )	16.66	6.41	7.78	30.00	29.90	46.90
D5	10.28	5.36	6.52	19.60	18.00	27.00
D6	6.88	3.48	4.54	22.10	17.70	20.20
D7	3.52	2.68	2.58	10.90	8.80	10.40
D8	4.10	1.89	2.31	7.24	3.04	5.84
D14	2.43	1.20	1.46	6.20	4.00	5.10
D21	1.27	1.06	0.76	2.26	2.36	2.95
D28	1.12	0.36	0.48	2.59	1.70	2.06
D42	0.70	0.10	0.66	1.94	1.37	1.61

<sup>a</sup>Gentamicin, <sup>b</sup>hour. <sup>c</sup>One measurement was performed for each time-point after calibration of the apparatus (Cobas Mira): EMIT allows measurement from 0.25 to 10  $\mu\text{g/mL}$ , with a coefficient of variation of 5.6%, 1.9% and 1.7% at low (1.2  $\mu\text{g/mL}$ ), medium (3.5  $\mu\text{g/mL}$ ), and high (7.6  $\mu\text{g/mL}$ ) concentrations, respectively [19]. When necessary, aliquots were therefore diluted in PBS and the values reported were corrected for the dilution factor.

**Fig. 1.** Macroscopic aspect of dicalcium phosphate dihydrate- $\beta$ -tricalcium phosphate (DCPD- $\beta$ -TCP) granules.

**Fig. 2.** Release kinetics of gentamicin in PBS by 300 mg (G300) and 600 mg (G600) granules of dicalcium phosphate dihydrate- $\beta$ -tricalcium phosphate loaded with 1%, 2% and 3% gentamicin.

PS: The kinetics detailing the release of gentamicin (in  $\mu\text{g}/24\text{h}$ ) were calculated using the amounts of gentamicin reported in table 1. The amount of PBS used was always 1 ml.

**Fig. 3.** Yield (%) of gentamicin released by 300 mg (G300) and 600 mg (G600) granules of dicalcium phosphate dihydrate- $\beta$ -tricalcium phosphate loaded with 1%, 2% and 3% gentamicin.

**Fig. 4.** A) Representative SEM micrographs of gentamicin-loaded dicalcium phosphate dihydrate- $\beta$ -tricalcium phosphate granules (DCPD- $\beta$ TCP) analysed before release (native form). In the horizontal view ( $\times 1000$ ), three main crystalline forms were observed: (a) tablet ( $\times 10000$ ), (b) “gypsum flower-like” crystal form and (c) polyhedral crystal form ( $\times 3000$ ). The tablet form corresponded to the dicalcium phosphate dihydrate (DCPD) compound. The polyhedral form corresponded to  $\beta$ tricalcium phosphate ( $\beta$ TCP) compound. The “gypsum flower-like” crystal form probably corresponded to apatitic crystallisation of calcium and phosphate.

B) Representative SEM micrographs of dicalcium phosphate dihydrate- $\beta$ -tricalcium phosphate granules (DCPD- $\beta$ TCP) after 42 days of gentamicin release. The “horizontal view” ( $\times 1000$ ) and its enlargement ( $\times 3000$ ) show that the “gypsum flower-like” crystal form seemed less numerous than in the specimen before elution (d and e). The polyhedra remained unchanged, but seemed more distinctive and exhibited more frequent interstices between them (e compared to c). The tablet became irregular, laminated and striated (f compared to a) ( $\times 10000$ ).



Figure 1.

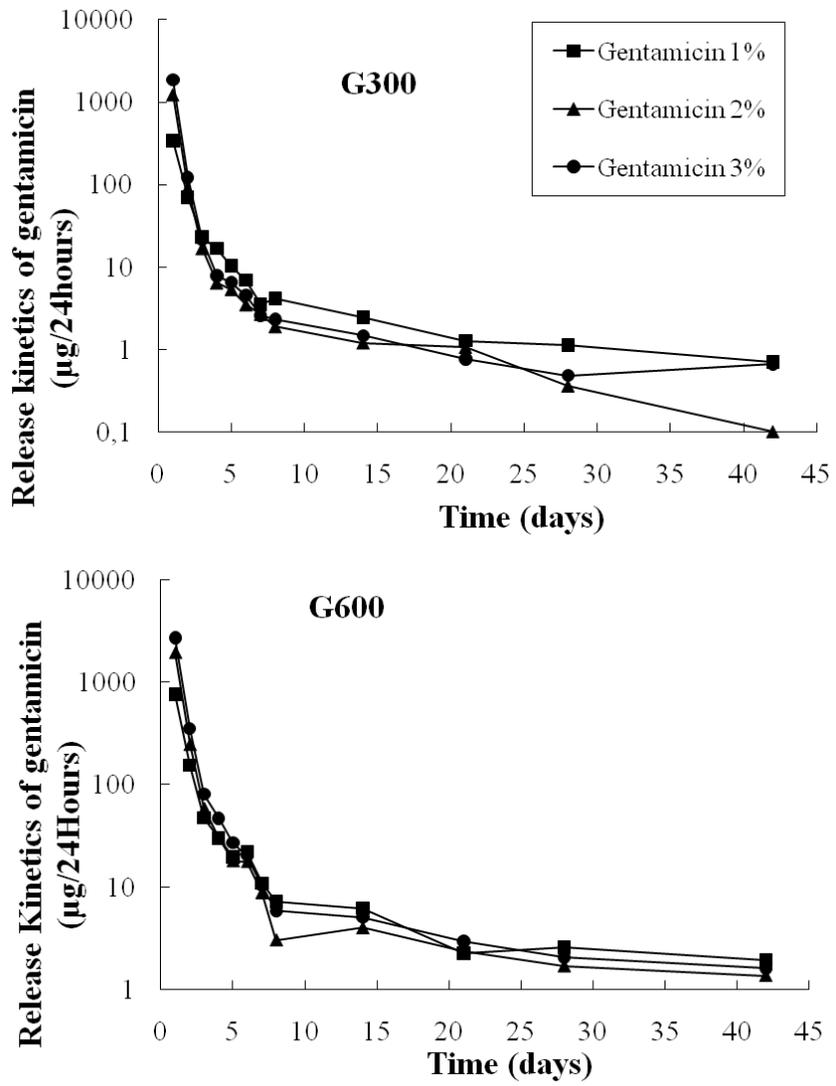


Figure 2.

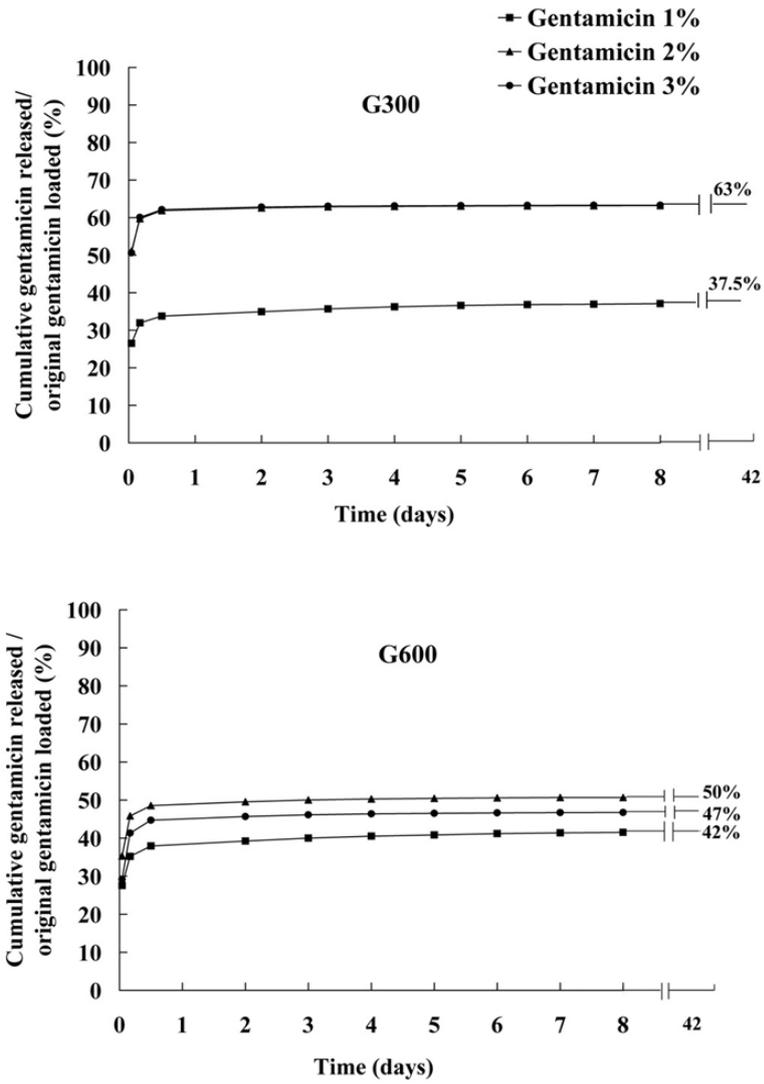


Figure 3.

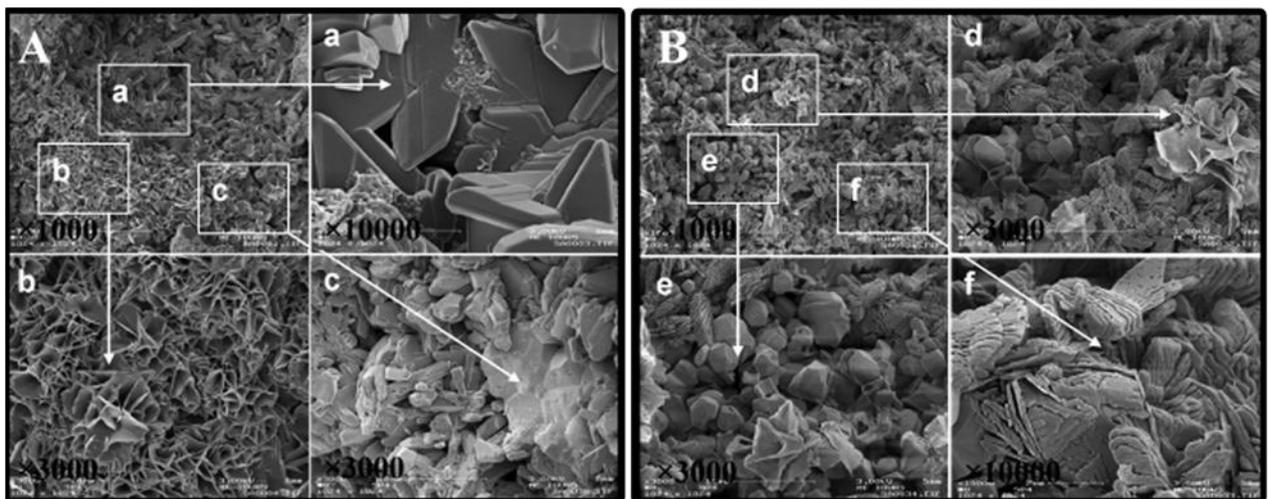


Figure 4.

## L. Discussion de la première partie

L'étude *in vitro* d'élution de l'antibiotique à partir du biomatériau support était l'étape préalable indispensable avant l'expérimentation *in vivo*. En effet, avant de passer au modèle animal, il fallait définir quelle quantité de granules fallait-il utiliser et quelle charge en antibiotique fallait il choisir. Jiranek (2006), dans une revue consacrée aux différents types de ciments en PMMA chargés d'antibiotiques (aminoglycosides), distingue les ciments chargés de fortes doses d'antibiotique (de l'ordre de 3,6 g d'antibiotique par 40 g de ciment, soit une concentration de 9 %) destinés à l'antibiothérapie curative, des ciments chargés de faibles doses d'antibiotique (de l'ordre de 1 g/40 g, soit une concentration de 2,5 %), destinés à l'antibioprophylaxie locale. Dans certaines études expérimentales, la concentration de l'antibiotique dans le biomatériau pouvait atteindre 10 % [Mader *et al.*, 1997; Sasaki et Ishii, 1999; Kanellakopoulou *et al.*, 2000; Shirtliff *et al.*, 2002; Turner *et al.*, 2005]. Dans d'autres études, cette concentration de charge initiale en antibiotique pouvait aller jusqu'à 25 % [Wei *et al.*, 1991; Turner *et al.*, 2005]. En réalité, le problème n'est pas un problème de charge en antibiotique, mais celui de la pénétration des antibiotiques apportés (par voie systémique) dans le tissu osseux scléreux de l'infection chronique. La solution n'est donc pas, à notre avis, d'apporter plus d'antibiotique, mais d'assurer "l'arrivée à destination" de l'antibiotique apporté. Pour cette raison, nous avons choisi de tester dans nos expérimentations *in vitro*, 3 concentrations croissantes et faibles de gentamicine (1 %, 2 % et 3 %). De plus, ces concentrations faibles étaient équivalentes à celles utilisées (en curatif, contrairement à la classification de Jiranek (2006)) dans les gentabilles de PMMA (Septopal®) (1g de gentamicine par 40 g de PMMA, soit une concentration en antibiotique de l'ordre de 2,5 %).

Les quantités 300 mg et 600 mg de granules ont été choisies après des tests préalables sur os sec de lapin (tibia): l'évidement de la partie métaphysoépiphysaire du 1/4 proximal de cet os (zone évasée d'induction habituelle d'ostéite expérimentale) et qui correspondait à un volume d'environ 1 cm<sup>3</sup> pouvait admettre entre 300 mg (remplissage lâche) et 600 mg (remplissage serré) de granules de DCPD-β-TCP.

Les granules de DCPD-β-TCP ont été mis en immersion dans une solution phosphatée isotonique (ou PBS pour Phosphate Buffer Saline) qui était changée régulièrement pendant 42 jours (Voir article 1, Materials and Methods). L'utilisation de ce liquide à PH 7 et le rythme élevé de changement de ce liquide d'élution permettait classiquement une reproduction des lavages fréquents des granules par la circulation sanguine et les liquides biologiques des milieux interstitiels si ces granules étaient implantés *in vivo* [Lambotte *et al.*, 1998].

La cinétique d'éluion globale s'est révélée être meilleure avec des granules de DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine à 1 % qu'avec ceux chargés de 2 % et 3 % de gentamicine. Ainsi, la préparation G600-1% (6 mg de gentamicine) qui correspond à l'échantillon de 600 mg de granules de DCPD- $\beta$ -TCP chargés de 1 % de gentamicine éluait, du 6<sup>ème</sup> au 42<sup>ème</sup> jour d'expérimentation, des concentrations de gentamicine plus élevées que G600-2% (12 mg de gentamicine; 600 mg de granules de DCPD- $\beta$ -TCP chargés de 2 % de gentamicine) et que G600-3% (18 mg de gentamicine). D'autre part, G600-1% (6 mg de gentamicine) éluait également des concentrations de gentamicine plus élevées que G300-2% (6 mg de gentamicine) et ce dès la 12<sup>ème</sup> heure. G600-1% éluait jusqu'à J42 des concentrations de gentamicine supérieures à la CMI de gentamicine vis-à-vis de *S. aureus*, et de J1 à J7 des concentrations supérieures à 10×CMI de gentamicine vis-à-vis de *S. aureus*. L'éluion massive initiale, observée avec d'autres biomatériaux, semble être liée à un mécanisme de diffusion de l'antibiotique à partir des couches superficielles du CPC [Stallmann *et al.*, 2003], alors que l'éluion progressive et faible secondaire semble se faire par mécanisme de dissolution graduelle du CPC, principalement de sa composante DCPD tel que cela a été démontré par Frayssinet (1998) et confirmé dans notre étude par l'analyse des échantillons en microscopie électronique. La libération massive initiale (10×CMI pendant 7 jours) peut être utile pour stériliser le foyer infectieux et empêcher l'émergence de souches résistantes puisqu'il s'agit d'un antibiotique concentration-dépendant, mais ceci doit être confirmé par l'étude *in vivo*. La libération progressive secondaire qui dure pendant 42 jours est supérieure à celle observée avec d'autres biomatériaux vecteurs d'aminosides tel que le couple HA-Isépaamicine (18 jours) [Hasegawa *et al.*, 2004] et le couple PLA-GLA-gentamicine (30 jours) [Baro *et al.*, 2002; Naraharisetti *et al.*, 2006]. En plus de cette cinétique favorable, la formulation G600-1% ne dépasse jamais le seuil d'éluion de gentamicine de 1000  $\mu\text{g/mL}$  qui semble présenter une toxicité pour les ostéoblastes de la part des aminosides [Miclau *et al.*, 1995]; mais ceci doit être confirmé *in vivo*.

La gentamicine eluée par le DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine a gardé toute son activité antibactérienne pour tous les échantillons testés. La présentation 600 mg de granules de DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine à 1% présente la meilleure cinétique parmi les 6 présentations testées *in vitro*. Elle a été choisie comme la présentation à tester *in vivo* pour affirmer ou infirmer son efficacité à traiter une ostéite expérimentale à *S. aureus*, en comparaison avec le PMMA-gentamicine.

## *Deuxième partie*

### **Etudes préliminaires *in vivo***

*Après avoir caractérisé la cinétique d'élu­tion in vitro des granules de DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine et avant de tester l'efficacité de l'application locale des granules de la présentation dosée à 1% de gentamicine (présentation qui s'est révélée posséder le meilleur profil de relargage de l'antibiotique) comme traitement de l'ostéite expérimentale, il a fallu d'abord caractériser in vivo ces granules de DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine d'une part; puis valider le modèle d'ostéite expérimentale d'autre part. C'était l'objet des études préliminaires in vivo qui sont présentées suivant les 4 étapes successives de leur réalisation.*

### **Première étape**

**Evaluation de la biocompatibilité et de l'ostéoconduction des granules de DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine implantés en site osseux non infecté chez le lapin et recherche d'une éventuelle toxicité locale ou systémique de la gentamicine**

## M. Introduction

La biocompatibilité du DCPD- $\beta$ TCP non chargé de gentamicine a déjà été prouvée par d'autres travaux fondamentaux [Frayssinet *et al.*, 1998]. Celle des ciments phosphocalciques (CPCs), dont le DCPD- $\beta$ TCP fait partie, a été prouvée par des études expérimentales et cliniques. Ces études ont également montré que les CPCs possédaient des propriétés ostéoconductrices satisfaisantes [Apelt *et al.*, 2004; Theiss *et al.*, 2005; Kopylov *et al.*, 2002; Libicher *et al.*, 2006]. Cependant, ni la biocompatibilité, ni l'ostéoconduction n'ont été prouvées pour le DCPD- $\beta$ -TCP chargé de gentamicine. Le premier objectif de cette première étape des évaluations préliminaires *in vivo* était de tester, en site osseux non infecté chez le lapin, la biocompatibilité et l'ostéoconduction du DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine.

Aussi, fallait-il s'assurer de l'absence de toxicité locale de gentamicine vis-à-vis des ostéoblastes, toxicité rapportée avec d'autres aminosides [Miclau *et al.*, 1995]; mais aussi de l'absence de passage systémique de la gentamicine portée par le DCPD- $\beta$ -TCP, tel que cela a été vérifié pour le PMMA-gentamicine chez l'animal et chez l'Homme avant son utilisation à grande échelle [Wahlig *et al.*, 1978; Wahlig *et al.*, 1984; Walenkamp *et al.*, 1986]. Le deuxième objectif de cette partie de l'étude était de vérifier l'absence de toxicité locale ou systémique de la gentamicine associée au DCPD- $\beta$ -TCP implanté en site osseux non infecté.

## N. Matériels et Méthodes

### 1. Préparation des granules

La poudre de DCPD- $\beta$ -TCP (55%-45%) (Kasios®, Launaguet, France) et la poudre de sulfate de gentamicine (A & K b. v. Molenwerf 13, Uitgeest, Netherlands) ont été mélangées avec de l'acide phosphorique pour produire une pâte. La réaction est exothermique, mais la température dégagée ne dépasse pas 43°. La pâte est laissée à durcir à température ambiante, ensuite elle est fragmentée, puis tamisée afin d'obtenir des granules de 2 à 3 mm de diamètre (voir Figure 1, Article 1). La microporosité des granules est de l'ordre 5 to 10  $\mu$ m et il n'y a pas de macroporosité. La porosité globale est de l'ordre de 40%. Les granules étaient stérilisés par 25 kGrays de rayons gamma. Des échantillons de granules de 300 mg de DCPD- $\beta$ -TCP chargés de 1 % de gentamicine ont été utilisés pour cette expérimentation.

## 2. Implantation des granules

Des lapins adultes de la race New Zealand (3-3.5 kg) ont été utilisés selon le protocole no. 2006-019 approuvé par le *Comité régional d'éthique pour l'expérimentation animale (CREEA) de la région Centre-Limousin* (voir Attestation du CREEA à l'Annexe). Les expérimentations ont été réalisées à l'*Institut National de Recherche Agronomique (INRA, Nouzilly-Tours, France)* selon les règles de bonne pratique de laboratoire. Les lapins ont été accueillis pendant 7 à 10 jours dans leur nouveau lieu d'hébergement avant de commencer les expérimentations. Cette période d'adaptation « psychologique » nécessaire aux lapins est aussi une période d'observation permettant d'éliminer les animaux porteurs d'une infection préalable éventuelle [Mader et Shirtliff, 1999].

Avant la chirurgie, les lapins ont été mis à la diète la veille des interventions. L'anesthésie générale a été réalisée à l'aide 8 à 10 mg/kg de xylazine hydrochloride (Rompun® 2%, Bayer, Kiel, Allemagne) et de 100 mg/kg ketamine hydrochloride (Clorketam®, Vetoquinol, Lure, France) injectés en sous-cutané. Le genou gauche a été rasé, puis la patte arrière gauche lavée à l'aide de povidone-iodine moussante (Vétédine®, Vetoquinol, Lure, France). La zone opératoire a été ensuite badigeonnée à l'aide d'une solution antiseptique iodée povidone-iodine (Vétédine solution®, Laboratoire Vétquinol, Lure, France), puis isolée à l'aide de draps stériles. Pendant l'intervention l'anesthésie a été maintenue par un flux inhalé de mélange gazeux contenant 45% d'oxygène, 53,3% d'air et 1,5% d'halothane (Fluothane®, Laboratoire Bélamont, Neuilly sur Seine, France).

L'incision était latérale centrée sur le genou. Les métaphyses distale du fémur et proximale du tibia ont été abordées, sans ouvrir l'articulation du genou. A l'aide de mèches de diamètres croissants, une perforation d'un trou de 6 mm de diamètre a été réalisée dans chacune des métaphyses, à l'aide d'un moteur à rotation lente associée à un lavage permanent –afin d'éviter l'élévation de la température du tissu osseux, pouvant être source de nécrose- Des curettes courbes de diamètres croissants ont été ensuite passées dans la cavité métaphysaire afin de l'agrandir, sans enlever tout le tissu spongieux métaphysaire. Une des cavités a été remplie de granules de DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine alors que l'autre était laissée vide en guise de témoin. Ainsi chaque lapin était le témoin de lui-même. Les cavités métaphysaires fémorale et tibiale ont été remplies de granules de DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine en alternance selon le tableau B (voir ci-dessous).

### 3. Suivi des lapins

Les lapins ont reçu une injection intramusculaire de 0.03 mg/kg buprenorphine (Temgesic®, Reckitt & Colman Products, Kingston-upon-Hull, United Kingdom) dès le réveil de l'anesthésie, puis quotidiennement pendant les 3 premiers jours post-opératoires.

L'état général des lapins, leur appétit (en évaluant la quantité de nourriture restante), l'état de leurs plaies opératoires ont été surveillés quotidiennement pendant la première semaine, puis 2 fois par semaine.

Tableau B: Implantation en fémoral distal et tibial proximal chez le lapin de granules DCPD-βTCP-gentamicine pour évaluation de l'ostéoconduction.

	Site fémoral distal	Site tibial proximal
Lapin O1	300 mg de granules de DCPD-βTCP-gentamicine 1%	Trou témoin laissé vide
Lapin O2	Trou témoin laissé vide	300 mg de granules de DCPD-βTCP-gentamicine 1%
Lapin O3	300 mg de granules de DCPD-βTCP-gentamicine 1%	Trou témoin laissé vide
Lapin O4	Trou témoin laissé vide	300 mg de granules de DCPD-βTCP-gentamicine 1%
Lapin O5	300 mg de granules de DCPD-βTCP-gentamicine 1%	Trou témoin laissé vide
Lapin O6	Trou témoin laissé vide	300 mg de granules de DCPD-βTCP-gentamicine 1%

### 4. Radiographies

Des radiographies de face et de profil des genoux implantés de granules ont été réalisées en post-opératoire, puis au 15<sup>ème</sup>, au 21<sup>ème</sup> et au 45<sup>ème</sup> jour, puis à 3 mois. L'existence de géodes osseuses ou de liserets autour des granules (signes d'intolérance éventuelle) ont été recherchée avec attention.

### 5. Recherche de gentamicine dans le sang et dans les urines

#### a) Dans le sang

Pour chaque lapin, des échantillons de 1 à 2 ml ont été prélevés, pendant l'intervention d'implantation des granules, au niveau de la veine centrale de l'oreille, à 0 heure (H0), une

heure (H1) et quatre heures (H4) après l'implantation des granules, puis au premier, deuxième et cinquième jour (J1, J2 et J5) après l'intervention.

### ***b) Dans l'espace endoméduillaire***

La moitié des lapins a eu, à 3 semaines de l'implantation des granules (J21), au bloc opératoire, sous anesthésie générale, selon les règles d'asepsie chirurgicale, une ponction osseuse du site d'implantation. Cette ponction consistait à prélever le liquide circulant autour des granules afin de détecter la présence éventuelle de gentamicine *in situ*.

Trois lapins de ce groupe ont été sacrifiés 2 à J45 et 1 à J90.

### ***c) Dans les urines***

Chez tous les lapins, un recueil des urines des 24H a été réalisé au premier, deuxième et cinquième jour post-implantation des granules (J1, J2 et J5).

## **6. Dosage de gentamicine**

Les dosages de gentamicine, dans le sang et dans les urines, ont été réalisés par la technique EMIT (EMIT® 2000 Gentamicin Plus Assay - Dade Behring, UK) [EMIT 2004].

Les limites de detection de la technique sont 0,25 µg/mL et 10 µg/mL.

## **7. Recueil des échantillons**

Les animaux restés vivants jusqu'à la fin de l'expérimentation (n=4) ont été euthanasiés 1 à 15 jours, 2 à 45 jours et 1 à 3 mois. L'euthanasie a été réalisée par une injection intraveineuse "d'overdose" de thiopental sodium (Nesdonal®, Rhône Mérieux, Lyon, France). Les moitiés distale du fémur et proximale du tibia ont été prélevées selon les règles de l'asepsie chirurgicale. Les pièces ont été sectionnées dans le plan sagittal à l'aide d'une scie oscillante (Synthes®). Nous obtenions deux tranches identiques "en miroir". L'une des tranches était conservée pour analyse macroscopique et l'autre était fixée au formol à 10% et adressée au laboratoire d'anatomopathologie pour analyse microscopique.

## **8. Analyse macroscopique**

L'analyse macroscopique d'une des deux tranches osseuses avait consisté à rechercher un abcès, un écoulement autour des granules, de la nécrose tissulaire, de la fibrose, ou l'existence de géodes ou de tout autre signe d'intolérance des granules.

## **9. Analyse histopathologique**

Après deux jours de fixation dans le formol, l'une des sections comportant le biomatériau subissait la déminéralisation, puis l'inclusion en paraffine. Des sections de 4 à 6 mm ont été ensuite réalisées. Les lames ont été colorées à l'hématoxyline-Eosine –Safran. Les lames étaient évaluées en semi-quantitatif grâce à la microscopie photonique conventionnelle et en quantitatif par un examen en microscope à lumière polarisée. En microscopie photonique, le tissu osseux mature apparaissait en rose fuchsia ; le tissu collagène « jeune » de la matrice ostéoïde apparaissait en bleu pâle. Le biomatériau ne prenait pas de coloration et restait blanc. Ces lames permettaient l'analyse des « accidents » éventuels de l'ostéogenèse. En lumière polarisée, le collagène apparaissait coloré en jaune – orangé fluorescent.

## **O. Résultats**

### **1. Suivi clinique**

Six lapins ont été utilisés dans cette expérimentation. Deux étaient décédés à J0 et J2. L'analyse des résultats des 4 lapins suivis jusqu'à l'euthanasie ont permis de constater l'absence d'anomalie des plaies opératoires qui ont cicatrisé entre 8 et 10 jours. Il n'a pas été observé de réaction d'intolérance des granules de type écoulement anormal ou isolement fibreux (Tableau 2 de l'Annexe).

### **2. Suivi radiologique**

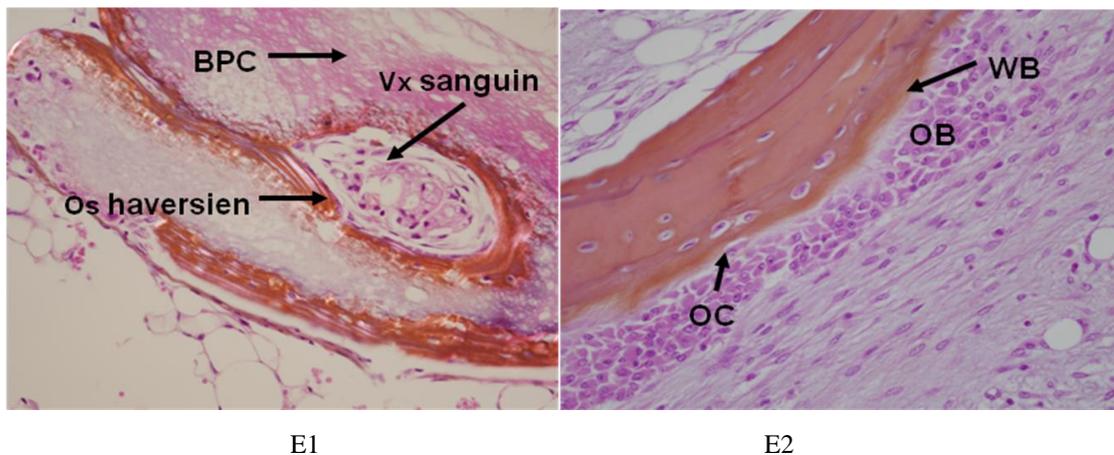
La résorption des granules, analysée visuellement sur les radiographies, n'a été que partielle, avec une résorption assez rapide initialement constatée dès J21 entraînant une diminution de la taille des granules et un émoussement des bords de ceux-ci. Cette résorption semblait ensuite stagner à J45 chez 2 lapins sur 3 (Tableau 3 de l'Annexe). Il n'a pas été constaté sur les radiographies de nécrose osseuse, ni de géodes ostéoclastiques.

Chez le lapin suivi jusqu'à 3 mois, nous avons observé une ostéointégration des granules au tissu osseux environnant avec une "ostéo-intégration" assez nette (confusion des granules avec l'endoste, appelée ostéocoalescence).

### **3. Etude histologique**

L'ostéoconduction a été évaluée de façon semiquantitative et nous avons observé la présence d'os lamellaire de type os tissé ou "woven bone" au contact des granules à J45 et une formation osseuse mature évaluée chez un lapin de cette série sacrifié à J+3 mois (Fig. D). Il

n'a pas été constaté de toxicité locale sur les lames histologiques, ni de réaction de type histocytaire "à corps étranger".



**Figure E:** l'observation en microscope à lumière polarisée montre le biomatériau phosphocalcique (BPC) représenté par les granules de DCPD- $\beta$ TCP-gentamicine bien intégré dans l'os environnant à J45 de leur implantation (E1; agrandissement x 100). Remarquez les processus du "bone ongrowth" le long de la surface du biomatériau "allongé" et le processus du "bone ingrowth" autour de la paroi vasculaire d'un vaisseau ayant pénétré dans un macropore –espace entre les granules– d'environ 200  $\mu$ m (diamètre d'au vaisseau sanguin).

L'observation en microscopie photonique conventionnelle montre la néo-ostéogenèse produite par les ostéoblastes (très nombreux: zone d'activité, front de minéralisation) sur os mature avec présence d'ostéocytes "enchassés" dans la matrice osseuse (à J+ 3 mois de l'implantation des granules de DCPD- $\beta$ TCP-gentamicine; E2; agrandissement x 200).

#### 4. Etude biologique

Six lapins ont été utilisés pour cette étude. Un lapin était décédé en fin d'intervention (à J0) et un autre à J2. Le passage de gentamicine dans le sang, aux premières heures et aux premiers jours de l'implantation des granules de DCPD- $\beta$ -TCP, chargés de gentamicine, dans les extrémités distale du fémur et proximale du tibia, n'a été détecté que sous forme de traces (avec des valeurs inférieures au seuil de détection de la technique EMIT; tableau C et tableau 3 de l'Annexe).

Tableau C: Passage de gentamicine dans le sang (H1 à H4 et de J1 à J5) à partir de 300 mg de granules de DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine à 3% implantés au niveau du fémur distal ou du tibia proximal chez le lapin non infecté (n=4).

	H0	H1	H4	J1	J2	J5
Gentamicin ( $\mu$ g /mL)*	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25

\*Les résultats détaillés sont présentés dans le Tableau 4 de l'Annexe.

A J21 de l'implantation des granules, il n'a pas été détecté de gentamicine dans dans le sang périphérique, ni dans le sang de ponction endomedullaire (Tableau D).

Tableau D: Dosage de gentamicine *in situ* et dans le sang, 21 jours après l'implantation, au niveau du fémur distal ou du tibia proximal chez le lapin, de 300 mg de granules de DCPD-β-TCP-gentamicine à 3 % (n=3).

	Sang périphérique	Sang endoméduculaire
Gentamicin (µg /mL)	<0,25	<0,25

Dans les urines des 24heurs, les valeurs de gentamicine retrouvées sont présentées dans le tableau E et le tableau 4 de l'Annexe.

Tableau E: Dosage de gentamicine dans les urines des 24 heures à J1, J2 et J5 de l'implantation au niveau du fémur distal ou du tibia proximal chez le lapin de 300 mg de granules de DCPD-β-TCP-gentamicine à 3% (n=5 pour J1 et n=4 après J1).

	J1	J2	J5
Gentamicin (µg /mL)*	3,5 ± 2,7	0,69 ± 0,2	0,43 ± 0,3

\*Pour les résultats détaillés cf Tableau 5 de l'Annexe.

## P. Discussion et perspectives

Les granules de DCPD-β-TCP-gentamicine se sont révélés être biocompatibles. Ils s'intégraient bien au milieu environnant en site osseux non infecté. Leur ostéoconduction a été confirmée par l'apparition d'une ostéogénèse au contact des granules qui ont subi une résorption partielle. Cette ostéoconduction semble être permise par deux facteurs complémentaires: un facteur chimique liée à la nature phosphocalcique des granules responsable de leur bioactivité et un facteur physique lié aux interstices entre les granules se comportant comme des macropores induisant une néo-ostéogénèse par pénétration vasculaire de ces "macropores artificiels" (Fig. E1).

La gentamicine, intégrée au biomatériau vecteur DCPD-β-TCP, à faibles doses semble être inoffensive vis-à-vis du tissu osseux.

Le passage de gentamicine dans le sang des lapins implantés, en site osseux non infecté, par des granules de DCPD-β-TCP-gentamicine, semblait être très faible, inférieur au seuil de détection de la technique de dosage EMIT. La détection, dans les urines, de concentrations de gentamicine assez faibles (entre 0,43 et 3,5 µg/ml) indiquait que le passage de l'antibiotique dans le sang était bref et de courte durée échappant aux techniques de mesure. Le faible dosage des granules implantés (300 mg de granules de DCPD-β-TCP chargés de 1 % de gentamicine) et la non-exploration de la période précoce (avant la première heure, entre H0 et H1) étaient vraisemblablement à l'origine de la non-détection de gentamicine dans le sang, d'où la nécessité d'explorations complémentaires de la toxicité

systemique de la gentamicine utilisée en antibiothérapie locale portée par des granules de DCPD- $\beta$ -TCP.

Par ailleurs, la résorption des granules n'était que partielle pendant les 3 mois qu'avait duré cette expérimentation. L'évaluation de la résorption des granules de DCPD- $\beta$ -TCP nécessite donc une étude avec un plus long recul.

**Deuxième étape**

**Analyse du passage systémique de la gentamicine implantée en  
site osseux infecté**

## **Q. Introduction**

Les conditions de l'infection osseuse sont différentes de celles du tissu sain. En effet, les granules bien tolérés en site osseux non infecté peuvent être mal tolérés en site osseux infecté. Renseignés par l'expérimentation précédente, nous avons recherché à nouveau la toxicité locale et systémique éventuelle de la gentamicine éluee à partir du DCPC- $\beta$ -TCP, mais en modifiant les conditions: tests sur lapins infectés, site fémoral proximal plus vascularisé et entouré de muscles, en plus de l'hypervascularisation liée à l'inflammation infectieuse, choix des granules de DCPC- $\beta$ -TCP-gentamicine à implanter relativement fortement dosés en antibiotique (600 mg de granules de DCPC- $\beta$ -TCP chargés de 3 % de gentamicine (DCPC- $\beta$ -TCP G600-3%) vs. 300 mg de granules de DCPC- $\beta$ -TCP chargés de 1% de gentamicine (DCPC- $\beta$ -TCP G300-1%) pour l'expérimentation précédente, soit 6 fois plus en quantité globale de gentamicine (18 mg vs. 3 mg). De plus, l'échantillon DCPC- $\beta$ -TCP G600-3% élueait *in vitro* 5250  $\mu$ g/ml de gentamicine à la première heure et 2190  $\mu$ g/ml à la quatrième heure) (Voir Table 1, Article 1). Aussi, nous avons exploré dans la présente expérimentation la période 0H à 1H non explorée lors de l'expérimentation précédente.

## **R. Matériels et méthodes**

### **1. Préparation des granules**

Les granules de DCPD- $\beta$ TCP-gentamicine ont été préparés de la même façon que précédemment (Voir Chapitre N.1). Des échantillons de 600 mg de DCPD- $\beta$ -TCP chargés de 3 % de gentamicine ont été utilisés pour cette expérimentation.

### **2. Procédure d'inoculation**

Des lapins adultes de la race New Zealand (3-3.5 kg) étaient préparés selon les mêmes modalités expérimentales et le même protocole anesthésique que l'expérimentation sur la biocompatibilité et l'ostéoconduction (Chapitre N. 2). Seule la zone opératoire était différente. Ici, la patte et l'arrière-train gauches ont été rasés, puis lavés à la bétadine mossante (Vetedine®, Vetoquinol, Lure, France). La région de la hanche gauche était badigeonnée à l'aide d'une solution antiseptique iodée de povidone-iodine (Vétédine solution®, Laboratoire Vétquinol, Lure, France), puis isolée à l'aide de draps steriles. L'inoculation était ensuite réalisée en endoméduillaire fémoral [Schulz 2001], selon le protocole de Norden (sclérosant, *s. aureus*, serum salé à 9 %°; voir ci-dessous et Article 3) à l'aide d'un trocard 13 gauge,

introduit par le sommet du trochanter. Les lapins étaient ensuite remis dans leurs cages individuelles.

Le procédé d'inoculation comportait la succession suivante: injection de 100 µl de 3% sodium tetradecyl sulfate (STS) (Thrombovar®, Innothera, Chouzy-sur-Cisse, France) comme agent sclérosant, en remplacement du morrhuate de sodium utilisé par Norden [Norden 1970], suivi de 100 µl d'une suspension de  $7 \log_{10}$  UFC/ml ( $6 \log_{10}$  UFC) de *S. aureus*, puis de 200 µl de serum salé à 9%°. La souche de *S. aureus* a été isolée d'un patient porteur d'ostéite. Elle était sensible à la gentamicine. Un comptage bactérien a été réalisé après chaque série d'inoculation afin de vérifier la concentration bactérienne de la suspension effectivement inoculée.

### **3. Implantation des granules**

Avant la chirurgie, les lapins ont été mis à la diète la veille des interventions. L'anesthésie est la même que celle utilisée pour le procédé d'inoculation (Chapitre N.2), complétée et maintenue pendant la durée de l'intervention un flux inhalé de mélange gazeux contenant 45% d'oxygène, 53,3% d'air et 1,5% d'halothane (Fluothane®, Laboratoire Bélamont, Neuilly sur Seine, France).

La patte et l'arrière-train gauches ont été rasés, puis lavés à la bétadine moussante (Vetedine®, Vetoquinol, Lure, France).

La région de la hanche gauche a été badigeonnée à l'aide d'une solution antiseptique iodée de povidone-iodine (Vétédine solution®, Laboratoire Vétéquinol, Lure, France), puis isolée à l'aide de draps stériles. L'incision était centrée sur le 1/3 supérieur du fémur exposant le sommet du trochanter. Le trou ayant servi à l'inoculation était repris et est élargi à la mèche de diamètre 4,5 mm. Après curtage du fût fémoral (le produit de curetage était prélevé pour étude bactériologique) et lavage abondant au serum physiologique, 600 mg de granules de DCPD-β-TCP-gentamicine 3 % ont été implantés (par le sommet du trochanter au niveau du 1/3 supérieur du fémur). L'aponévrose, le plan sous-cutané ont été fermés par du fil résorbable Safil® (B. Braun Médical SA, Boulogne-Billancourt, France), puis la peau a été suturée par du monofil non résorbable, Flexidène® (Braun Médical SA), sans drainage.

### **4. Suivi des lapins**

Les lapins recevaient une injection intramusculaire de 0.03 mg/kg buprenorphine (Temgesic®, Reckitt & Colman Products, Kingston-upon-Hull, United Kingdom) dès le réveil de l'anesthésie, puis quotidiennement pendant les 3 premiers jours post-opératoires.

## 5. Prélèvements et dosage de gentamicine

Un à deux millimètres de sang ont été prélevés à 0 minutes (mn), 30 et à 60 mn de l'implantation des granules de DCPD- $\beta$ TCP-gentamicine, selon la même technique que précédemment (Chapitre N. 5). Les serums (surnageants), obtenus après centrifugation (2500 tours/10 minutes), étaient stockés à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à réalisation des dosages par la technique EMIT (EMIT® 2000 Gentamicin Plus Assay - Dade Behring, UK) (EMIT 2004). Les limites de détection de la technique sont situées entre  $0,25 \mu\text{g/mL}$  et  $10 \mu\text{g/mL}$ .

## S. Résultats

Quatre lapins ont été utilisés pour cette expérimentation. Un lapin était impossible à prélever (spasme vasculaire). Deux lapins ont pu être prélevés au temps 10 minutes, 3 lapins à 30 minutes et 2 lapins à 60 minutes. L'évaluation du relargage *in vivo* aux temps précoces a mis en évidence la présence de gentamicine dans le sang à des quantités de l'ordre de  $0,25$  à  $1 \mu\text{g/mL}$  (Tableau F).

Tableau F: Passage de gentamicine dans le sang aux temps précoces à partir de 600 mg de granules de DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine à 3 % implantés au niveau du fémur proximal chez le lapin infecté (n=3).

	H0	10 min	30 min	60 min
Gentamicine ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	0	<0,25	$0,5 \pm 0,4$	$0,4 \pm 0,2$

## T. Discussion et perspectives

Compte tenu de ces résultats et de ceux de l'expérimentation précédente, il est clair que le passage de gentamicine dans le sang se fait très précocement pendant la première heure, celle du relargage massif de l'antibiotique par le biomatériau détecté dans l'étude *in vitro* (voir Tableau 1- Article 1). Même en site infecté, et avec l'implantation de granules DCPD- $\beta$ TCP-gentamicine relativement fortement dosés (600 mg de granules DCPD- $\beta$ TCP-gentamicine à 3 %, soit 18 mg de gentamicine), les quantités de gentamicine passant dans le sang restent minimales, très en deçà (16000 fois moins) des doses reconnues comme toxiques chez l'homme ( $8 \text{ mg/mL}$ ). Même si nous ne connaissons pas les doses toxiques chez le lapin, ces doses semblent trop faibles pour induire une quelconque toxicité. Ceci est en accord avec les travaux précédents testant le PMMA-gentamicine [Wahlig *et al.*, 1978; Walenkamp *et al.*, 1986].

### **Troisième étape**

**Choix du site d'induction de l'infection expérimentale**

## **U. Introduction**

Le tibia, le fémur et le radius sont les sites les plus utilisés pour réaliser des modèles d'ostéite chez le lapin, plus rarement la mandibule ou le rachis [An *et al.*, 2006]. Le fémur et le tibia ont été utilisés dans nos précédentes étapes expérimentales. Le fémur distal et le tibia proximal ont été utilisés pour tester la biocompatibilité et l'ostéoconduction des granules de DCPD- $\beta$ TCP-gentamicine en site osseux indemne d'infection (1<sup>ère</sup> étape de la partie 2). Le fémur proximal a été utilisé pour tester le passage systémique et son éventuelle toxicité de la gentamicine après implantation en site osseux infecté de granules de DCPD- $\beta$ TCP chargés de gentamicine (2<sup>ème</sup> étape de la partie 2). Avant de tester l'efficacité thérapeutique d'un biomatériau vecteur d'antibiotique, il est indispensable de valider d'abord le modèle d'ostéite [An *et al.*, 2006]. Après le choix du lapin comme modèle d'expérimentation, il était primordial de choisir le site d'induction de l'infection entre les deux sites les plus utilisés, le fémur [Wei *et al.*, 1991; Schulz *et al.*, 2001; Rutledge *et al.*, 2003; Lazarettos *et al.*, 2004; Stallmann *et al.*, 2004] et le tibia [Norden et Kennedy, 1970; Dahners et Funderburk, 1987; Mader et Shirliff, 1999; Sasaki et Ishii, 1999; Kanellakopoulou *et al.*, 2000; Gürsel *et al.*, 2001; Nijhof *et al.*, 2001; Mader *et al.*, 2002; Shirliff *et al.*, 2002]. C'est l'objectif de cette étape expérimentale.

## **V. Matériels et méthodes**

### **1. Préparation des granules**

Les granules de DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine ont été préparés de la même façon que précédemment (Chapitre N. 1). Des échantillons de granules 300 mg de DCPD- $\beta$ -TCP chargés de 3 % de gentamicine et des échantillons de granules de 600 mg de DCPD- $\beta$ -TCP chargés de 3 % de gentamicine ont été utilisés pour cette expérimentation.

### **2. Procédure d'inoculation**

Des lapins adultes de la race New Zealand (3-3.5 kg) étaient utilisés selon les mêmes modalités expérimentales et le même protocole anesthésique que l'expérimentation sur la biocompatibilité et l'ostéoconduction (Chapitre N. 2). Seules les voies d'abord différaient. La patte et l'arrière-train gauches ont été rasés, puis lavés à la bétadine moussante (Vetedine®, Vetoquinol, Lure, France). Les lapins ont été ensuite répartis arbitrairement en deux groupes au moment de l'inoculation: groupe fémoral (F) et groupe tibial (T). Pour le groupe F, la

région de la hanche gauche a été badigeonnée à l'aide d'une solution antiseptique iodée de povidone-iodine (Vétédine solution®, Laboratoire Vétquinol, Lure, France), puis isolée à l'aide de draps stériles. Une incision de 1 cm en regard du sommet du trochanter a été réalisée. L'introduction d'une aiguille par le sommet du trochanter (aiguille à biopsie : 2 mm de diamètre et 8 mm de long) a permis l'injection séquentielle (après aspiration de 1 ml de moelle osseuse) de 0,1 ml de Thrombovar à 3%, suivie de 0,1 ml de suspension de *staphylococcus aureus* 10<sup>7</sup> UFC/ml, puis de 0,5 ml de PBS stérile [Schulz, 2001].

Pour le groupe T, la région du genou et l'extrémité proximale du tibia ont été préparés stérilement, puis isolées à l'aide de draps stériles. L'inoculation a eu lieu selon protocole de Norden modifié: injection de 100 µl de 3 % sodium tetradecyl sulfate (STS) (Thrombovar®, Innothera, Chouzy-sur-Cisse, France) comme agent sclérosant, en remplacement du morrhuate de sodium utilisé par Norden [Norden 1970], suivi de 100 µl d'une suspension de 7 Log<sub>10</sub> UFC/ml (6 Log<sub>10</sub> UFC) de *S. aureus*, puis de 200 µl de serum salé à 9 %° au niveau de la face latérale de la métaphyse tibiale proximale. Les lapins ont été ensuite remis dans leurs cages individuelles.

La souche de *S. aureus* a été isolée d'un patient porteur d'ostéite. Elle était sensible à la gentamicine. Un comptage bactérien a été réalisé après chaque série d'inoculation afin de vérifier la concentration bactérienne de la suspension effectivement inoculée.

### **3. Procédure d'implantation des granules**

Quinze jours ou trois semaines après la procédure d'inoculation, l'ostéite a été diagnostiquée par la clinique et la radiographie et confirmée (ou non) à postériori par la bactériologie et l'anatomopathologie. A ces délais, la moitié des effectifs des lapins dans chacun des 2 groupes a été sacrifiée afin de confirmer l'infection "sur pièce". L'autre moitié a été réopérée pour le traitement de l'ostéite expérimentale par "débridement" et implantation des granules. Avant la chirurgie, les lapins ont été mis à la diète la veille des interventions. L'anesthésie était la même que celle utilisée pour le procédé d'implantation précédent (Chapitre R.2).

La patte et l'arrière-train gauches ont été rasés, puis lavés à la bétadine moussante (Vetédine®, Vetoquinol, Lure, France).

Pour le groupe F (fémur), la région de la hanche gauche a été préparée et abordée et les granules (600 mg de DCPD-β-TCP-gentamicine 3 %) implantés de la même façon que l'exploration précédente (Chapitre R3)

Pour les lapins du groupe T (tibia), le genou gauche a été préparé et le tibia abordé de la même façon que dans le chapitre N.2. Après l'incision cutanée, les muscles de la loge externe de la jambe sont réclinés exposant le tibia. Il existait dans 3 cas sur 4 un abcès en regard de la zone d'inoculation, parfois très étendu. Le trou de ponction était élargi. Il était alors inclus dans une fenêtre d'ostéotomie réalisée pour avoir un accès aisé à la cavité médullaire. La confection de cette ostéotomie à la scie "minifragments" (Synthes®) était gênée par la fibula, qui se termine chez le lapin à la jonction 1/3 supérieur-1/3 moyen de la face latérale du tibia. Après curetage du canal médullaire (le produit de curetage était prélevé pour étude bactériologique) et lavage abondant au serum physiologique, 300 mg de granules de DCPD-β-TCP-gentamicine 3 % ont été implantés dans la cavité médullaire. L'aponévrose, le plan sous-cutané et la peau étaient fermés selon le protocole habituel.

#### **4. Suivi des lapins**

Le traitement de la douleur était assuré selon le protocole habituel (Chapitre R. 4). La surveillance clinique comportait l'évaluation de l'état général des lapins, de leur appétit (en évaluant la quantité de nourriture restante), et l'état de la plaie opératoire. La surveillance a été quotidienne pendant la première semaine puis 2 fois par semaine ensuite. Les lapins ont été pesés 2 fois par semaine en post-opératoire puis 1 fois par semaine ensuite jusqu'à l'euthanasie.

#### **5. Radiologie**

Les radiographies, de face et de profil, ont été réalisés à J0 pour tous les lapins, puis à J15 pour la moitié de chaque groupe et à J21 pour l'autre moitié. Ensuite tous les lapins survivants après J21 ont eu des radiographies du genou de face et de profil à J45, sous anesthésie avant l'euthanasie.

Les signes d'ostéite et/ou de reconstruction osseuse ont été analysés. Pour le groupe tibial, la consolidation de la fenêtre d'ostéotomie et la résorption des granules ont été évalués. Ce dernier paramètre n'a pu être analysé pour le groupe fémoral (nous verrons pourquoi dans le chapitre résultats).

#### **6. Recueil des échantillons**

Les animaux ont été euthanasiés, 42 jours après l'inoculation, par une injection intraveineuse "d'overdose" de thiopental sodium (Nesdonal®, Rhône Mérieux, Lyon, France). Les moitiés proximales des fémurs et des tibias ont été prélevées selon les règles d'asepsie chirurgicale. Les pièces ont été ensuite sectionnées dans le plan sagittal à l'aide d'une scie

oscillante (Synthes®). Nous obtenions deux tranches identiques "en miroir". L'une des tranches était analysée macroscopiquement (photos) puis fixée au formol à 10% et adressée au laboratoire d'anatomopathologie. L'os spongieux et le produit de curetage de la médullaire de la deuxième tranche ont été récupérés (après ablation des granules) pour étude bactériologique (dont la procédure est détaillée dans l'article 3, chapitre matériels et méthodes, Microbiology).

## 7. Histologie

Après deux jours de fixation dans le formol, les pièces fémorales et tibiales subissaient le procédé de déminéralisation, puis d'inclusion en paraffine. Des sections de 4 à 6 mm ont été colorées à l'Hématoxyline–Eosine–Safran (HES). L'évaluation des lames était centrée sur la recherche d'abcès, d'inflammation subaiguë ou chronique, de séquestres et de réaction à corps étranger. La néostéogenèse était également évaluée. En microscopie photonique, le tissu osseux mature apparaît en rose fuchsia ; le tissu collagène « jeune » de la matrice ostéoïde en bleu pâle et les abcès en violet foncé. Le biomatériau ne prend pas de coloration et reste blanc.

## W. Résultats

Les résultats de la comparaison entre les sites fémoral et tibial pour la réalisation d'un modèle d'ostéite chez le lapin étaient les suivants. Ils sont regroupés dans les tableaux G et H.

### 1. Groupe F (Fémur)

Neuf lapins ont été utilisés. Il y a eu deux décès en peropétoire (F3 et F4, Tableau G). Parmi les 7 lapins suivis jusqu'à l'ethanasie, 4 étaient euthanasiés (2 à J15 et les 2 autres à J21) pour affirmer bactériologiquement l'infection osseuse. Les cultures étaient positives à 3 Log<sub>10</sub> UFC/gr d'os et 2 Log<sub>10</sub> UFC/gr d'os chez 2 lapins (F1 à J15, et F5 à J21) (Tableau G). Les cultures des 2 autres lapins étaient restées négatives (F9 à J15, et F7 à J21). Les radiographies étaient, pour ce groupe, très peu contributives (Fig. E).



**Figure F:** Radiographies du fémur à J15 de l'inoculation de *S. aureus* au niveau du 1/3 supérieur du fémur. Les clichés ne montrent pas la zone concernée et sont mal centrés malgré un bon réglage de l'appareil de radiologie et la répétition de plusieurs clichés.

Radiographier la région des condyles fémoraux était aisée, alors que celle de l'extrémité proximale du fémur était laborieuse, gênée par la région de la racine de la patte. Néanmoins, parmi les 3 lapins implantés – à J15– de granules DCPD-β-TCP chargés de gentamicine (G600-3 %) et suivis jusqu'à l'euthanasie à J42 (F2, F6 et F8), nous avons pu mettre en évidence une pandiaphysite dans 1 cas (F8), non guérie par l'implantation locale de granules chargé de gentamicine. Dans 2 autres cas, nous avons noté des signes de reconstruction osseuse avec disparition des signes d'infection (F2 et F6). Les comptes bactériens à J42 étaient positifs (à 5 Log<sub>10</sub> UFC/gr d'os) dans la pandiaphysite et négatifs chez les deux autres animaux (voir tableau G).

Tableau G. Evaluation de la faisabilité du modèle de Schulz et de l'efficacité du traitement de l'infection osseuse expérimentale par un traitement local par des granules de Dicalcium Phosphate-β-Tricalcium Phosphate (DCPD-β-TCP) chargés de gentamicine en site fémoral (F) proximal chez le lapin.

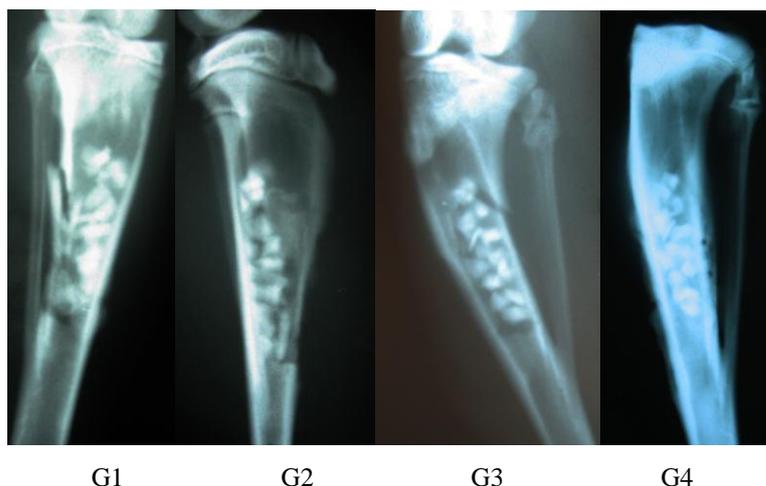
Lapins	Radiographie à J15 ou J21	Implantation des granules	Bactériologie à J15 ou J21	Radiographie à J42	Bactériologie à J42
F1	J15: Radio non centrée sur le fémur proximal. Euthanasie.		CB à J15: 3 log <sub>10</sub> UFC		
F2	Stigmates d'infection, mais Radio non centrée	Dt + DCPD-β-TCP G600-3%. Abscès des PM		Réparation osseuse. Disparition des signes d'oséite	CB négatifs
F3	Décès peropératoire				
F4	Décès peropératoire				
F5	J21: inexploitable. Euthanasie.		CB à J21: 2 log <sub>10</sub> UFC		
F6	J15: Signes d'infection	Dt + DCPD-β-TCP G600-3%.		Rx de mauvaise qualité. réparation satisfaisante	CB négatifs
F7	J21: Rx non centrée sur fémur proximal Euthanasie.		CB à J21: négatifs		
F8	J15: Ballonisation condyle fémoral++	Dt + DCPD-β-TCP G600-3%.		Pandiaphysite, geodes multiples, sclérose corticale	CB à 5 log <sub>10</sub> UFC
F9	J15: Rx mal centrée. Euthanasie		CB à J15: négatifs		

Rx: radiographie; Dt: débridement; CB: comptes bactériens; UFC: unité formant des colonies.

## 2. Groupe T (Tibia)

Six lapins parmi les 9 utilisés dans ce groupe ont été euthanasiés pour attester de l'ostéite sur pièce – 3 à J15: T1, T3 et T9 et 3 à J21: T4, T5 et T7– (voir tableau H). Les comptes bactériens se sont révélés être positifs dans 4 cas sur 6 avec des valeurs assez élevées à 4, 4 et 3 Log<sub>10</sub> UFC/gr d'os chez les lapins sacrifiés à J15 et 4 log UFC chez un lapin sacrifié à J21. Deux lapins sacrifiés à J21 ont eu des CB négatifs (voir tableau H).

Sur le plan radiographique, les signes francs d'infection ont été retrouvés chez 4 lapins (T1, T4, T7 et T9) parmi les 6 lapins sacrifiés à J15 et à J21 (T1, T3, T4, T5, T7 et T9) (voir tableau H). Les 3 lapins, ayant reçu des granules chargés de gentamicine à J15 et qui ont été euthanasiés à J42 (T2, T6 et T8) ont montré une guérison de l'infection avec des comptes bactériens négatifs. Radiologiquement, ces 3 lapins ont montré une consolidation de l'ostéotomie, une reconstruction osseuse, mais sans résorption de granules à ce stade de l'évolution (Fig. F.).



**Figure G:** La résorption des granules de DCPD-β-TCP est lente. Les granules gardent les mêmes aspects et volumes à J15 (curetage du tissu infecté et remplissage de la cavité par ostéotomie réalisée par volet antérolatéral) (G1 et G3) qu'à J42 où on constate une consolidation de l'ostéotomie (G2 et G4).

## X. Discussion

Le lapin a été choisi comme modèle. Cet animal est le plus adapté à la création des ostéites expérimentales localisées subaiguës ou chroniques [Mader *et al.*, 2002; Mader et Shirliff, 1999]. La brebis a été utilisée dans certains rares essais avec l'avantage d'être proche du poids de l'Homme. Elle représente le modèle idéal pour les études comportant une analyse biomécaniques des implants [An *et al.*, 2006]; ce qui n'est pas le cas de nos recherches. Le chien a été utilisé comme modèle d'infection sur corps étranger [Fitzgerald, 1983; Garvin *et*

*al.*, 1994]. Il pose le problème de gestion de l'hébergement et du coût global des expérimentations. Les lapins blancs de la race nouvelle Zélande, pesant 2 kg à 3 Kg 500 (8 à 12 semaines d'âge) ont été choisis par Mader *et al.* (1999; 2002) pour leur moindre agressivité à cet âge, mais ils posent le problème de diffusion articulaire de l'infection (leur cartilage de croissance est encore ouvert à cet âge). Pour notre part, nous avons choisi des lapins âgés de plus de 3 mois pour ne pas interférer avec la pathologie du cartilage de croissance (dont la fermeture se fait vers le 3<sup>ème</sup> mois), mais aussi pour disposer d'os de diamètres plus larges rendant plus aisées les pratiques d'ostéotomie, de curetage et l'implantation des granules de DCPD-β-TCP.

L'abord du fémur s'est avéré être facile, mais la ponction du trochanter –massif et profond était difficile. Le tibia était d'abord facile, surtout sur la face médiale. La ponction était également facile, à condition de diriger l'aiguille de ponction assez verticalement (20 à 30° par rapport à l'axe de la jambe).

La réalisation des radiographies était plus difficile pour le fémur (surtout pour le 1/3 supérieur) et les clichés obtenus étaient peu contributifs. Ceci disqualifie pour nous le site fémoral comme site éventuel d'ostéite expérimentale. Les condyles fémoraux restent cependant la zone de prédilection pour évaluer le relargage *in vivo* des antibiotiques à partir de ces biomatériaux vecteurs [Wei *et al.*, 1991; Benoît *et al.*, 1997; Baro *et al.*, 2002; Rutledge *et al.*, 2003]. Les radiographies du tibia étaient de réalisation plus facile et les clichés étaient de bonne qualité. De plus, la situation superficielle du tibia rend son abord et sa manipulation faciles. Cette facilité qualifie le tibia pour être le site de choix pour la réalisation des modèles d'ostéites, confirmant sa préférence par la plupart des auteurs, en particulier le tibia proximal [Norden et Kennedy, 1970; Dahners et Funderburk, 1987; Mader et Shirtliff, 1999; Sasaki et Ishii, 1999; Kanellakopoulou *et al.*, 2000; Gürsel *et al.*, 2001; Nijhof *et al.*, 2001; Mader *et al.*, 2002; Shirtliff *et al.*, 2002]. Un avantage cependant du fémur par rapport au tibia est représenté par sa capacité à contenir plus de granules (750 à 1000 mg vs 600 mg).

Concernant l'évidence diagnostique de l'infection, radiologique et surtout bactériologique et histopathologique, il n'y avait pas pour le site fémoral de différence entre les lapins sacrifiés à J15 et ceux sacrifiés à J21. Le taux de confirmation de l'infection était de l'ordre de 50%, alors qu'il était de 66% pour le site tibial qui semblait, de plus, présenter une infection plus fiable et plus nette, radiologiquement et bactériologiquement à J15 par rapport à J21 (Tableau H)

Tableau H. Evaluation de la faisabilité du modèle de Norden-Mader et de l'efficacité (radiographique et bactériologique) du traitement local, de l'infection osseuse expérimentale en site tibial proximal chez le lapin, par des granules de Dicalcium Phosphate- $\beta$ -Tricalcium Phosphate (DCPD- $\beta$ -TCP) chargés de gentamicine.

	Radiographie à J15 ou J21	Implantation des granules	Bactériologie à J15 ou J21	Radiographie à J42	Bactériologie à J42
T1	J15: S. francs d'ostéite Euthanasie.		CB à J15: 4 log <sub>10</sub> UFC		
T2	Stigmates d'infection	Dt + DCPD- $\beta$ -TCP G600-3%.		Consolidation de l'ostéotomie, reconstr. oss. Disparition des signes d'oséite; pas de résorption des granules	CB négatifs
T3	J15: S. d'ostéite assez nets Euthanasie.		CB à J15: positifs à 4 log <sub>10</sub> UFC		
T4	J21: S. francs d'ostéite Euthanasie.		CB à J21: positifs à 4 log <sub>10</sub> UFC		
T5	J21: S. min. d'ostéite. Euthanasie.		CB à J21: négatifs		
T6	J15: S. francs d'ostéite. Euthanasie.	Dt + DCPD- $\beta$ -TCP G600-3%.		Consolidation de l'ostéotomie, reconstr. Oss. Disparition des signes d'oséite, mais pas de résorption de gr.	CB négatifs
T7	J21: S. d'infect. Rn endomedull. Epaiss. Cortical. Euthanasie		CB à J21: négatifs		
T8	J15: S. min. d'ostéite. Euthanasie.	Dt + DCPD- $\beta$ -TCP G600-3%.		Consolidation de l'ostéotomie, reconstr. oss. Disparition des signes d'oséite, mais pas de résorption des granules.	CB négatifs
T9	J15: S. francs d'infection, Rn médull. et corticale Euthanasie		CB à J15: positifs à 3 log <sub>10</sub> UFC		

Rx: radiographie; Dt: débridement; CB: comptes bactériens; UFC: unité formant des colonies.

Le délai de deux semaines est considéré par la majorité des auteurs comme l'intervalle de temps minimum pour le développement d'une infection radiologiquement évidente [Calhoun et Mader, 1997; Mader *et al.*, 2002; Rutledge *et al.*, 2003; Sasaki et Ishii, 1999;

Shircliff *et al.*, 2002]. L'abcès, synonyme de lésion aigüe active sur le plan anatomopathologique, était présent dans les infections des deux sites.

A ce stade des expérimentations préliminaires, nous avons pu mettre en évidence l'efficacité des granules de DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine à traiter l'infection osseuse expérimentale dans les 2 sites. La guérison de celle-ci a été confirmée, dans ce modèle, par la consolidation de l'ostéotomie et l'apparition d'une reconstruction osseuse (en rapport avec une néo-ostéogenèse) à J45 pour le site tibial, même si les granules ne montraient que des signes de résorption lente à ce stade de l'évolution.

Globalement, notre expérience rapportée ici et les données de la littérature sont en faveur de l'utilisation du site tibial proximal comme lieu d'inoculation pour l'obtention d'un modèle d'ostéite expérimentale à *S. aureus* chez le lapin. L'efficacité du traitement local était cependant obtenue seulement dans les cas où l'infection restait localisée. Il n'y avait à l'évidence aucune efficacité des granules de DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine, implantés localement, à traiter une pandiaphysite. Ceci nous a incité, lors de la dernière étape des expérimentations préliminaires, avant la réalisation de l'essai thérapeutique expérimental, à rechercher à valider un modèle d'ostéite localisée : c'est l'objet de l'étape 4 des études préliminaires présentée sous forme d'article.

## **Quatrième étape**

### **Choix de l'inoculum optimal de *S. aureus* et caractérisation de l'infection osseuse expérimentale localisée chez le lapin**

#### **Article 2**

##### **Experimental osteomyelitis in rabbit models: Is the disease acute or chronic, diffuse or localized?**

Saïd Zayane, Gonzague de Pinieux, Roland Quentin, Jean Marc Besnier, Philippe Rosset.

Article soumis à la revue "Clinical Orthopaedic and Related Research", 2010.

*L'objectif des travaux regroupés dans cet article était de valider les caractéristiques biologiques (bactériologie, anatomopathologie) et morphologiques (radiologie) d'un modèle d'ostéite localisée chez le lapin destiné à tester des traitements antibiotiques locaux portés par un biomatériau vecteur (LADS).*

Experimental osteomyelitis in rabbit models: Is the disease acute or chronic, diffuse or localized?

Saïd Zayane<sup>1,2,3</sup>, Gonzague de Pinieux<sup>1,2</sup>, Roland Quentin<sup>1,2,3</sup>, Jean Marc Besnier<sup>1,2,3</sup>, Philippe Rosset<sup>1,2</sup>.

1. Université François Rabelais de Tours; CHRU de Tours, 2 Boulevard Tonnellé 37044 Tours Cedex 09 – France.
2. Centre de référence des infections ostéo-articulaires du grand-Ouest (CRIOGO), 2 Boulevard Tonnellé – 37044 Tours Cedex 09 – France.
3. Institut Fédératif de Recherche (IFR) 136 « Agents transmissibles et Infectiologie », Equipe d'Accueil (EA) 3854, 10 Boulevard Tonnellé – 37044 Tours Cedex 09 – France.

Mailing address: Université François Rabelais de Tours; CHRU de Tours, Service des maladies infectieuses, 2 Boulevard Tonnellé 37044 Tours Cedex 09 – France.

Phone: 33 2 47 47 81 13. Fax: 33 2 47 47 85 30. E-mail: [saidzayane@yahoo.fr](mailto:saidzayane@yahoo.fr)

**KEYWORDS:** acute osteomyelitis; chronic osteomyelitis, localized osteomyelitis, Rabbit, Local Antibiotic Delivery System.

## **ABSTRACT:**

Precise characterization of osteomyelitis models is required to test different local antibiotic delivery systems (LADS). The aim of this study was to answer two questions: Is the osteomyelitis that is often used in rabbit models as chronic really chronic and is the osteomyelitis used to test local antibiotic therapy localized or diffuse?

We used four groups of rabbits and one control group: G1 (n=6), G2 (n=6), G3 (n=6) and G4 (n=6) were inoculated successively according to a modified Norden's procedure with  $8 \pm 0.4$ ,  $7 \pm 0.2$ ,  $6 \pm 0.2 \log_{10}$  CFU and  $6 \pm 0.2 \log_{10}$  CFU *S. aureu* respectively. The G5 (n=4), control group, was inoculated with only the sclerosing agent. Rabbits in groups G1, G2, G3 and G5 were sacrificed at day 15, whereas G4 was followed until day 42. X-rays were performed at day 15 for G1, G2, G3 and G5, and at days 15, 30 and 42 for G4. Bacterial count (BC) and histological assessments were performed after sacrifice. Infection severity was defined according to Mader's radiographic score, BC, and Smeltzer's histologic score.

Localized osteomyelitis was achieved in G3 and G4, the mortality rate was high in G1 and severe osteoarthritis occurred in G2. Mader scores were 3, 3, 3, 4 and 4 in group 3, when the mean BC was  $5.9 \pm 1.3 \log_{10}$  CFU/g bone. There was acute inflammation with localized abscesses in G1, G2, G3 and G4, whatever the stage of the infection (day 15, 30 or 42). Lymphoplasmocytic infiltration was predominant in G5 and at the periphery of the acute inflammation in the other groups.

The radiographic grading we propose will allow satisfactory randomization by excluding diffuse osteomyelitis. Some technical precautions have to be observed for inducing localized osteomyelitis, which is the more suitable for testing LADS. Theses precautions should avoid the need of using a large number of animals for theses experiments.

## INTRODUCTION

Osteomyelitis (OM) remains a major problem of the orthopaedic surgery. It is due mostly to *Staphylococcus aureus*. Infection in post-traumatic OM occurs, by exogenous contamination of open wounds. In material-related OM, contamination may follow the implantation of devices (pins, screws, plates, nails, or prostheses). In infantile acute OM, contamination occurred via a haematogenous route [18, 19]. Post-traumatic infection can remain localized, implant-related infection can be diffuse but is often localized and, chronic haematogenous OM is often diffuse because of its mode of contamination, but it may be localized in some stages of its natural course, as demonstrated by scintigraphy and MRI [6, 11].

Local antibiotic treatment combined with debridement has an increasingly important place in the treatment of the various forms of OM, historically treated with antibiotic-loaded PMMA, as beads, as bone cement for fixation of prostheses or as a spacer, and currently with absorbable biomaterials.

Several animal OM models have been developed to mimic the various presentations of OM in humans in order to test and compare different treatments such as systemic or local antibiotic therapy [3]. Some authors have tested chronic modes of OM but reported the presence of abscesses on histology [7]. Others, in a model creating implanted-related OM in the rabbit, incubate the device in a solution of 4.2 Log CFU/mL *S. aureus* for 6 min [23], whereas others injected 2 Log CFU/mL in the medullary canal of rat tibia before implanting the device [20]. Informations concerning the characteristics of the models tested are often insufficient. In the other hand, the information is given but without precise characterization of the model.

The aim of this study was to find answers to the question: Is experimental osteomyelitis in rabbit models acute or chronic, diffuse or localized?

We present a model of *staphylococcus aureus* osteomyelitis in the rabbit tibia. A reliable localized OM model was developed that is more suited for testing local antibiotic delivery systems, and we propose a novel radiographic classification to distinguish localized from diffuse OM.

## MATERIALS AND METHODS

### 1. Inoculation procedure

Adult male New Zealand rabbits (3-3.5 kg) were used in an approved protocol (Protocol no. 2006-019, approved by the Animal Care and Use Committee). The experiments

were performed in accordance with OECD Good Laboratory Practice, at the *Institut National de Recherche Agronomique* (INRA, Nouzilly-Tours, France). Experiments were carried out in 28 rabbits. We then successively infected 24 rabbits (6 rabbits per group in G1, G2, G3, and G4 groups), according to a modified version of the Norden model, using 3% sodium tetradecyl sulfate (STS) (Trombovar®, Innothera, Chouzy-sur-Cisse, France) as a sclerosing agent before inoculating bacteria, in place of the sodium morrhuate used in Norden's model [26]. The four remaining rabbits were injected with only STS (G5 control group).

Before surgery, food and water were withheld for 24 hours. General anesthesia was induced with 8 to 10 mg/kg xylazine hydrochloride (Rompun® 2%, Bayer, Kiel, Germany), and 100 mg/kg ketamine hydrochloride (Clorketam®, Vetoquinol, Lure, France), injected subcutaneously between the shoulder blades. The left knee area was shaved and washed with povidone-iodine (Vetedine®, Vetoquinol, Lure, France). The area of the surgical intervention was then painted with povidone-iodine (Vétédine solution®, Laboratoire Vétquinol, Lure, France) and isolated with sterile drapes. A 16-gauge needle was inserted percutaneously into the anteromedial surface of the upper tibia (rather than the anterolateral surface, as in Norden's model), under X-ray control. STS was introduced directly into the medullary canal of the tibia, followed by 100 µl of *S. aureus* suspension of 9 log<sub>10</sub> CFU/mL (8 Log<sub>10</sub> CFU) in G1, of 8 log<sub>10</sub> CFU /mL (7 Log<sub>10</sub> CFU) in G2, of 7 log<sub>10</sub> CFU/mL (6 Log<sub>10</sub> CFU) in G3 and G4, and 200 µl of sterile saline, to ensure that all the sclerosing agent and bacteria entered the medullary canal. The strain used was a methicillin-susceptible *S. aureus* isolated from a patient with chronic OM and stored at -80°C in BHI-glycerol medium. Culture was set up on a blood agar plate 48 hours before the inoculation procedure. On the day of inoculation, bacterial suspensions of 10<sup>9</sup>, 10<sup>8</sup>, and 10<sup>7</sup> colony-forming units per milliliter (CFU/mL) from this plate were prepared in PBS. After the inoculation procedure, the remaining inoculum was serially diluted, plated on blood agar and cultured to check the number of viable bacteria in fact used for inoculation.

In G5, the sclerosing agent was administered alone without *S. aureus* inoculation to both two tibias, as in the inoculation procedure.

## **2. Acquisition of samples**

Rabbits of G1, G2, G3, and G5 were sacrificed on day 15. Two rabbits of G4 were killed on day 15, two others on day 30 and the last two on day 42. They were initially sedated, as in the protocol for surgery. They were then sacrificed by intravenous injection of an overdose of thiopental sodium (Nesdonal®, Rhône Mérieux, Lyon, France). The left tibia was

excised under strictly aseptic conditions. A high-speed drill (Synthes®) was used to saw through the upper part of the tibia. Each sample obtained was then split down the sagittal plane, to obtain two standardized samples of about 25 mm in length. These two comparable metaphyso-epiphyseal fragments were photographed, and then used for bacteriological counts and histological studies. The bacteriology samples were crushed with a freeze-pulverizer, at –180°C (Spex CertiPrep 6750®, Bioblock Scientific, Illkirch, France), weighed, stored at 4°C and rapidly cultured in a sterile laminar flow cabinet for quantitative evaluation (bacterial count, BC). The histology samples were fixed by incubation in 10% formaldehyde until analysis (Fig. 1). Rabbits in G5 had only histology examination.

### **3. Follow-up**

One hour after inoculation (day 0), and twice daily on the three days following the inoculation, the rabbits received an intramuscular injection of 0.03 mg/kg buprenorphine (Temgesic®, Reckitt & Colman products, Kingston-upon-Hull, United Kingdom). Each animal was monitored daily and examined on days 1, 2, 5, 10 (after inoculation) and on day 15 before sacrificing, for G1, G2, G3, and G5, and on days 1, 2, 5, 10 and once weekly thereafter until they were all killed (day 42) for rabbits of G4. Each animal was weighed and wounds were inspected for local signs of infection (swelling, fistulae).

### **4. X-ray examination**

Standard anteroposterior and lateral X- rays were performed for each animal on day 0, just before inoculation, on day 15 for all the surviving rabbits of G1, G2, G3 and G5 groups before sacrificing, and then on day 30 and day 42 before they were sacrificed for all the surviving G4 rabbits.

Radiographic signs of infection were classified according to the Mader scale, from 0 to 4: 0 = no change with respect to the original X-ray; 1 = elevation of the periosteum; 2 = < 10% disruption of normal bone architecture; 3 = 10% to 40% disruption of normal bone architecture; 4 = > 40% disruption of normal bone architecture [21]. X rays were double-blind scored. On day 15, the severity of the infection was determined by radiographic analysis for all rabbits and chronologic changes in radiographic lesions were observed on days 30 and 42 in the rabbits of G4.

### **5. Microbiology**

The pulverized bones were homogenized in 2 ml of BHI. Bacterial count (BC) was determined by serially diluting the homogenate and plating a standard volume (100 µL, in duplicate) on blood agar, and incubating the plates for 48 h at 37°C. BC was determined

manually and is expressed as the number of CFU per gram of bone tissue (CFU/g bone). The detection limit was 1 log CFU/ml. For positive cultures, identification of *S. aureus* was confirmed by the Coagulase Staph-Test (ID Staph 32, BioMérieux®, Marcy l'Etoile, France) and API panel (Biomérieux®) technique to eliminate contaminating strains. Isolated *S. aureus* strains were then compared with the original strain used for inoculation by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing. Genomic DNA was extracted from the isolates, digested with *Sma*I and subjected to PFGE [35]. PFGE patterns were analyzed by eye.

BCs were scored as follows: grade 0 =  $0 \log_{10}$  CFU/g bone; grade 1 =  $0 < BC \leq 2 \log_{10}$  CFU/g bone; grade 2 =  $2 < BC \leq 4 \log_{10}$  CFU/g bone; grade 3 =  $4 < BC \leq 6 \log_{10}$  CFU/g bone and grade 4 =  $6 < BC \leq 8 \log_{10}$  CFU/g bone.

## 6. Histology

Two days after formalin fixation, bone samples were decalcified and embedded in paraffin. Sections (4 to 6  $\mu$ m) were cut, mounted on slides and stained with hematoxylin-eosin-safran (HES). The decalcified samples were observed under a light microscope. A simplified Smeltzer score was used to classify infection into five grades of severity: 0 = absence of inflammation; 1 = minimal to mild inflammation, without abscess; 2 = moderate inflammation without abscess and/or presence of a microabscess; 3 = presence of a localized abscess; 4 = presence of diffuse abscesses [33]. Inflammation was defined as the presence of a large number of damaged or undamaged granulocytes (acute inflammation) or lymphoplasmocytic infiltration with or without foreign body reaction (chronic inflammation). Microabscesses were defined as microaggregates of damaged neutrophil granulocytes. Localized abscesses were circumscribed foci of acute inflammation. Diffuse abscesses corresponded to diffuse acute inflammation extending to the whole medullary canal and infiltrating the epiphyseal cartilage.

## RESULTS

### 1. Clinical, X-ray and microbiological finding

G1 (n=6) was inoculated with a  $8.35 \pm 0.15 \log_{10}$  CFU. Three rabbits died, probably from generalized bacteremia and septic shock (Table 1). Surgical exploration of two of these three rabbits, which died on days 2 and 3 after inoculation, showed multiple abscesses in the liver and lung. The BC obtained in one rabbit showed a high level of infection ( $7.7 \log_{10}$  CFU/g bone). X-ray of the three surviving rabbits in this group had a Mader score of 4 (Fig. 1 and Table 2), and the BCs were 8.18, 8.1 and 6 (mean  $7.42 \pm 1.2 \log_{10}$  CFU/g bone; Table 2).

G2 (n=6) was inoculated with  $7.22 \pm 0.15 \log_{10}$  CFU. One rabbit died (Table 1). All five surviving rabbits had severe OM lesions and a Mader score of 4. However, four of the five rabbits had osteoarthritis (Fig. 1, Table 1 and Table 2). BCs on day 15, determined after the rabbits had been killed, were 4.07, 6.1, 6.8, 5.44 and 7.66 (mean  $6.01 \pm 1.4 \log_{10}$  CFU/g bone; Table 2).

G3 (n=6) was inoculated with  $6.38 \pm 0.22 \log_{10}$  CFU. One of these rabbits died (Table 1). Three of the five surviving rabbits had a Mader score of 3 on day 15, whereas the other two had a Mader score of 4 (Table 2). None of the rabbits had osteoarthritis and the localized OM was associated with osteocondensation and osteolytic lesions in the upper tibia (Fig. 2A). The severity of the OM obtained was demonstrated by various histopathologic features: central abscess surrounded by lymphoplasmocytic granuloma resembling that of the rabbits injected with only the sclerosing agent (Figs 2B, 2C and 2D) and confirmed by a high level of BCs in the five survived rabbits of G3: 3.57, 5.7, 6.76, 7.48 and 5.9 (mean of  $5.88 \pm 1.5 \log_{10}$  CFU/g bone; Table 2).

X-ray in G4 showed images of localized OM with osteocondensation and osteolytic lesions in the upper tibia, as observed in G3 on day 15, whereas day 42 X-rays showed a tendency to cyst formation (Fig 3). BCs on day 42 in the five survived rabbits of G4 were 4.67, 5.54, 5.38, 6.74 and 5.69 (mean of  $5.6 \pm 0.7 \log_{10}$  CFU/g bone; Table 2).

## **2. Macroscopic findings**

The explanted tibiae of infected rabbits showed that infection involved the proximal quarter of the tibia, with a central abscess predominating in the metaphyseal area (Fig 4A). Extensive formation of sequestra in cancellous bone, with a "shell form" surrounding the cavity of the localized infection was observed in some rabbits (Fig. 4B).

## **3. Microscopic findings**

### *a). In the non-infected rabbits*

G5, the group of rabbits injected in the tibia with 3% sodium tetradecyl sulfate (STS), a sclerosing agent, in the absence of bacterial inoculation, showed lesions consistent with chronic inflammation, with a polymorphic histiocytic reaction, including lymphocytes, granulocytes and plasmocytes, surrounding sequestra as foreign body reaction (Figs 2B). There were no acute lesions, such as abscesses.

### *b). In the infected rabbits*

In rabbits injected with STS + *S. aureus* (G1, G2, G3) severe OM was observed (on day 15), with damaged granulocytes, and diffuse inflammation (Fig. 2C) in the center of the

infection focus, and lesions with chronic inflammation, resembling those observed in G5 (Fig. 2B), were observed at the periphery of the infection focus (Fig. 2D).

On day 15, and on day 30, G4 rabbits – sacrificed at these dates respectively – displayed a central abscess and peripheral lesions of subacute and chronic inflammation.

Rabbits sacrificed on day 42 from G4 rabbits displayed the same central abscess with no tendency to regression, but sometimes a diffusion throughout the epiphysis cartilage (Fig 3G). Chronic reactions were always present with oedematous fibrosis, lymphoplasmocytic granuloma and bony remodeling.

DNA analysis with PFGE at the end of all the experiments, showed the same strain of *S. aureus* as that inoculated initially (Data not shown).

## DISCUSSION

Several animal models of OM have been reported [2, 3, 8, 10, 14, 29], but the rabbit model remains the most promising [1, 4, 12, 15, 17, 21, 22, 25, 30, 32]. The tibia is the most frequently studied site of infection [4, 12, 15, 21, 22, 25, 32] although some researchers have developed models based on infection at other sites, such as the radius [1, 16] and femur [17, 30, 31]. We investigated the tibia and femur in a preliminary study and found the tibia-based model to be more practical for surgery and X-rays (unpublished data). The tibia is also the main site of bone infection in human patients [18, 19].

In tibial rabbit model, we found that the best inoculum dose to obtain a reliable and severe localized OM ( $5.9 \pm 1.5 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g bone}$ , Table 1) was about a  $6 \text{ Log}_{10} \text{ CFU}$  ( $6.4 \pm 0.2 \text{ Log}_{10} \text{ CFU}$  for G3 and  $6.3 \pm 0.2 \text{ Log}_{10} \text{ CFU}$  for G4). We thus confirmed the findings of other studies [1, 12, 15, 22, 25, 30, 32]. The relationship between inoculum volume and the development of infection has been studied previously [2, 9, 34]. We tested several models of different inocula volumes and obtained localized infection at the end. Indeed, by injecting  $8 \pm 0.4 \text{ log}_{10} \text{ CFU/ml}$  methicillin-susceptible *S. aureus* into the upper tibia, we achieved high mortality rates (3 of 6 rabbits). Inoculation with  $7 \pm 0.2 \text{ log}_{10} \text{ CFU}$  resulted in lower mortality rates (1/6), but with severe lesions (Mader score 4) in all five surviving rabbits and osteoarthritis (an unwanted complication) in four rabbits. Inoculation with  $6 \pm 0.1 \text{ Log}_{10} \text{ CFU}$  achieved reliable, severe ( $6.4 \pm 1 \text{ log}_{10} \text{ CFU/g bone}$ ) localized OM in five of six rabbits (only one rabbit died) 15 days after inoculation without osteoarthritis. The infection was clinically obvious, with significant weight loss, evident radiographic signs of infection, such as osteolytic and osteocondensed bone lesions, and acute osteomyelitis with active abscesses in histology (Fig 2).

Except in Norden's and Mader models [21, 22, 26, 27], the degree of infection extension has been seldom standardized. Our successive experiments showed that it is difficult to create localized OM, as reported by other studies [21, 27]. Fitzgerald obtained localized OM in dog model with 9 Log CFU *S. aureus* by closing the hole drilled in the upper tibia with PMMA wax to avoid diffusion of the infection to the soft tissues and to the knee [8]. The Mader score is useful to define the degree of severity of the infection and its diffusion [22]. However, this score does not distinguish proximal and distal diffusion of the infection in grade 4, and discrimination important for randomizing infected rabbits for local antibiotic therapy. We suggest a new classification (figure 5). Our grading may improve comparison of randomized rabbits in trials of local antibiotic delivery systems. It can be applied to proximal and to distal tibial osteomyelitis. It will allow accurate definition of infection, choice of an accurate zone for device or DDS implantation, and achieving exact assessment. Limitation of this grading is that requires exclusion of osteoarthritis and diffuse lesions in the second half of the tibia (grade 4), thus needing much of rabbits for the study. However, some technical precautions are required to provide this localized model: using a thin needle for inoculation (16 gauge), injecting the sclerosing agent slowly (3 to 5 min) and compressing the puncture zone after removing the needle (3 to 5 min). Inserting the needle percutaneously into the anteromedial surface of the upper tibia (rather than the anterolateral surface, as in Norden's model), to avoid the fibula, made compression of the inoculation site easier, in order to avoid extravasation of the sclerosing agent and *S. aureus*. Such acting, we can obtain a great rate of localized osteomyelitis by using only few animals.

We showed histologically in G1, G2, and G3 that in rabbits killed and analyzed on day 15, there was a predominance of acute inflammation with localized abscesses. Aspects of chronic inflammation (lymphoplasmocytic infiltration with or without foreign body reaction) were situated on the periphery of the infected site. On days 30 and 42 (G4), there were the same lesions without abscess regression. There peripheral chronic lesions were interspersed with new bone formation. To generate bone tissue necrosis and sequestra as those present in chronic OM in humans, many authors use a chemical sclerosing agent [21, 26], whereas a physical agent, such as pin, nail or PMMA wax was used in other studies [8, 13, 24, 28]. The chronic lesions present in our study were probably due to the presence of the sodium tetradecyl sulfate, our chemical sclerosing agent. Thus, the lesions often described in models as chronic OM are lesions due to these physical or chemical agents. By generating bone tissue necrosis and sequestra, the sclerosing agent (physical or chemical) facilitate the induction of infection, which is in fact acute and not really chronic, as we showed in our study with the

presence of acute inflammation and abscesses, surrounded in the peripheral areas – areas where was injected the sclerosing agent – with chronic lesions. Fukushima et al., *Emslie et al.* developed an acute model of OM [5, 9] with intravenous inoculation of the bacteria. Some studies try to define the chronicity by a longer time interval inoculation-investigation (as long as possible) [1, 16, 25], but it is obvious that the chronicity not depends from this parameter as shown with our finding in the different subgroups of G4 rabbits (day 15, day 30 and day 42). That's why this interval-time is often limited to 15 days [4, 22, 30, 32]. In addition, it allows having short period of experiments reducing thus their cost. Furthermore, infection seems to be maximal at two weeks, with a peak of BC as shown in our experiments, and two week is the recommended time to treat a localized osteomyelitis [26, 27]. In our study, with high initial inoculum volume, the infection remained acute at four and at six weeks after inoculation, inspite of cyst formation on X-ray at day 42 (Fig. 4D and 4F), proving that prolonging time interval inoculation-investigation (in the aim to obtain a chronic OM) is not necessary.

## **IN CONCLUSION**

A reliable model of tibial rabbit osteomyelitis can be induced by inoculation of  $10^6$  Colony forming units of *S. aureus* associated with a sclerosing agent. Some technical precautions are required to provide localized osteomyelitis. We suggest a new radiographic scale (in 4 grades). It will allow to randomly assigning in groups for local antibiotic therapy testing only the infected rabbits with localized osteomyelitis, excluding thus the grade 4 diffuse osteomyelitis.

## **Acknowledgements**

We are grateful to Dr. Benoit de Courtivron for radiographic analysis, and Juliette Cognie, Gilles Gomont and his team (INRA) for their valuable assistance. The study was supported by INRA within the framework of the University-CHU-INRA collaboration.

## REFERENCES

1. Ambrose CG, Clyburn TA, Loudon K, Joseph J, Wright J, Gulati P, Gogola GR, Mikos AG. Effective treatment of osteomyelitis with biodegradable microspheres in a rabbit model. *Clin Orthop Relat Res* 2004; 421:293-9.
2. An YH, Friedman R. Animal models of orthopaedic implant infection. *J Invest Surg* 1998;11:139 – 46.
3. An YH, Kang QK, Arciola CR. Animal Models of OM. *Int J Artif Organs*. 2006;29:407-20.
4. Calhoun JH, and Mader JT. Treatment of osteomyelitis with biodegradable antibiotic implant. *Clin Orthop Relat Res* 1997; 341:206-14.
5. Emslie KR, Ozanne NR, Nade SM. Acute hematogenous osteomyelitis: an experimental model. *J Pathol* 1983;141:157-67.
6. Erdmann WA, Tamburro F, Jayson HT, Weatherall PT, Ferry KB, Peschok R. Osteomyelitis: Characteristics and pitfalls of diagnosis with MR Imaging. *Radiology* 1991;180:533-39.
7. Faber C, Stallmann HP, Lyaruu DM, Joosten U, Von Eiff C, Amerongen AVN, Wuisman PIJM. Comparable efficacies of the antimicrobial peptide human lactoferrin 1-11 and gentamicin in a chronic methicillin-resistant *staphylococcus aureus* osteomyelitis model. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:2438-44.
8. Fitzgerald RH Jr. Experimental osteomyelitis: description of canine model and the role of depot administration of antibiotics in the prevention and treatment of sepsis. *J Bone Joint Surg (A)* 1983; 65(3):371–380.
9. Fukushima N., Yokoyama K. Sasahara T., Dabashi Y., Itoman M. Establishment of a rat model of acute staphylococcal OM: relationship between inoculation dose and development of OM. *Arch Orthop Trauma Surg* 2005;125:169-76.
10. Garvin KL, Miyano JA, Robinson D, Giger D, Novak J and Radio S. Polylactide/polyglycolide antibiotic implants in treatment of osteomyelitis. A canine model. *J Bone Joint Surg* 1994;76A,10:1500 – 6.
11. Guhlmann A, Brecht-Krauss D, Suger G, Glatting G, Katzerk J, Kinzi L, Reske SN. Chronic osteomyelitis detection with FDG PET and correlation with histopathologic findings. *Radiology* 1998;206,3:749-754.
12. Gürsel I, Korkusuz F, Türesin F, Alaeddinoglu G, Hasirci V. *In vivo* application of biodegradable controlled antibiotic release systems for the treatment of implant-related osteomyelitis. *Biomaterials* 2001;22:73-80.
13. Horn J, Schlegel U, Krettek C, Ito K. Infection resistance of unreamed solid, hollow slotted and cannulated intramedullary nails: An *in vivo* experimental comparison. *J Orthop Res* 2005;23:810-5.
14. Kaarsemaker S, Walenkamp GHM, Bogaard AEJ. New model for chronic osteomyelitis with *Staphylococcus aureus* in sheep. *Clin Orthop Relat Res* 1997;339:246-52.
15. Kanellakopoulou K, Galanakis N, Giamarellos-Bourboulis EJ, Rifiotis C, Papakostas K, Andreopoulos A, Dounis E, Karagianakos P, Giamarellou H. Treatment of experimental osteomyelitis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a biodegradable system of lactic acid polymer releasing pefloxacin. *J Antimicrobial Chemotherapy*; 2000, 46: 311–14.
16. Korkusuz F, Korkusuz P, Ekşioğlu F, Gürsel I, Hasirci V. *In vivo* response to biodegradable controlled antibiotic release systems. *J Biomed Mater Res* 2001;55:217-28.
17. Lazaretos J, Efstathopoulos N, Papagelopoulos PJ, Savvidou OD, Kanellakopoulou K, Giamarellou H, Giamarellos-Bourboulis EJ, Nikolaou V, Kapranou A, Papalois A, Papachristou G. A bioresorbable calcium phosphate delivery system with teicoplanin for treating MRSA osteomyelitis. *Clin Orthop* 2004;423:253–258.
18. Lazzarini L, Mader JT and Calhoun JH. Osteomyelitis in long bones. *J Bone Joint Surg* 2004;86-A:2305–18.
19. Lew DP, Waldvogel FA. Osteomyelitis. *Lancet* 2004;364:369-79.

20. Lucke M, Wildemann B, Sadoni S, Surke C, Shiller R, Sremberger A, Raschke M, Haas NP, Schmidmaier G. Systemic versus local application of gentamicin in prophylaxis of implant-related osteomyelitis in a rat model. *Bone* 2005;36:770-78.
21. Mader JT, Shirliff ME. The rabbit model of bacterial osteomyelitis of the tibia. In: *Handbook of Animal Models of Infection*. Zak O, Sande MA, Ed, Academic Press, New York 1999;68:581-91.
22. Mader JT, Stevens CM, Stevens JH, Ruble R, Lathrop JT, Calhoun JH. Treatment of experimental osteomyelitis with a fibrin sealant antibiotic implant. *Clin Orthop Relat Res* 2002;403:58-72.
23. Mäkinen TJ, Veiranto M, Knuuti J, Jalava J, Törmälä P, Aro HT. Efficacy of a bioabsorbable antibiotic containing bone screw in the prevention of biomaterial-related infection due to *Staphylococcus aureus*. *Bone* 2005;36:292-299.
24. Melcher GA, Claudi B, Schlegel U, Perren SM, Printzen G, Munzinger J. 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]* 1994;76:955-9.
25. Nijhof MW, Fleer A, Hardus K, Vogely HC, Schouls LM, Verbout AJ, Dhert WJ. Tobramycin-containing bone cement and systemic cefazolin in one-stage revision treatment of infection in a rabbit model. *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)* 2001;58:747-53.
26. Norden CW, Kennedy E. Experimental osteomyelitis. A description of the model. *J Infect Dis* 1970;122: 410-418.
27. Norden CW, Myerowitz RL, Keleti E, Experimental osteomyelitis due to *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa*: A radiographic-pathological correlative analysis. *Br J Exp Pathol* 1980;61:451-60.
28. Petty W, Spanier S, Shuster JJ, Silverthorne C. The influence of skeletal implants on incidence of infection. Experiments in a canine model. *J Bone Joint Surg [Am]* 1985;67:1236-44.
29. Rissing JP. Animal models of osteomyelitis. *Infect Dis Clin North Am* 1991;4:377-90.
30. Rutledge B, Huyette D, Day D and Anglen J. Treatment of osteomyelitis with local antibiotics delivered via bioabsorbable polymer. *Clin Orthop Relat Res* 2003;411:280-7.
31. Schulz S, Steinhart H, Mutters R. Chronic osteomyelitis in a new rabbit model. *J Invest Surg* 2001;14:121-131.
32. Shirliff ME, Calhoun JH, Mader JT. Experimental osteomyelitis treatment with antibiotic-impregnated hydroxyapatite. *Clin Orthop Relat Res* 2002; 401:239-47.
33. Smeltzer MS, Thomas JR, Hickmon SG, Skinner RA, Nelson CL, Griffith D, Parr TR, Evans RP. Characterization of rabbit model of staphylococcal osteomyelitis. *J Orthop Res* 1997;15:414-21.
34. Southwood RT, Rice JL, McDonald PJ, Hakendorf PH, Rozenbils MA. Infection in experimental hip arthroplasties. *J Bone Joint Surg [Br]* 1985;67:229-31.
35. Van der Mee-Marquet, N., A. S. Domelier, N. Girard, R. Quentin. Epidemiology and typing of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bloodstream infections. *J Clin. Microbiol* 2004;42:5650-7.

**Table 1.** Successive experiments for validation of a model of localized tibial *S. aureus* osteomyelitis in the rabbit.

rabbits per Group (n)	Inoculum (Log <sub>10</sub> CFU)	rabbits dying during experiment (n)	rabbits died during experiment (n)	rabbits followed until the end of experiment (n)	rabbits with osteoarthritis (n)
G1 (n=6)	8.4 ± 0.2	3	3*	3*	–
G2 (n=6)	7.2 ± 0.2	1	5*	5*	4
G3 (n=6)	6.4 ± 0.2	1	5*	5*	0
G4 (n=6)	6.3 ± 0.2	1	5**	5**	0
Total (n=24)		6	18	18	

\* Rabbits sacrificed on day 15.

\*\* Rabbits sacrificed on day 42.

**Table 2.** *S. aureus* experimental osteomyelitis evaluated with Mader radiographic grading [22] and the mean bacterial count (MBC).

n of survived rabbits	Mader grade 3*	Mader grade 4*	MBC (Log <sub>10</sub> CFU/g bone) on day 15	MBC (Log <sub>10</sub> CFU/g bone) on day 42
Group 1 (n=3)	0	3	7.4 ± 1.2	–
Group 2 (n=5)	0	5	6.1 ± 1.4	–
Group 3 (n=5)	3	2	5.9 ± 1.5	–
Group 4 (n=5)	3	2	–	5.6 ± 0.7
Total (n=18)	6	12		

\*Radiographic evaluation at day 15. \*\*Rabbit were inoculated successively in groups 1, 2, 3 and 4 with 8.4 ± 0.2, 7.2 ± 0.2, 6.4 ± 0.2, and 6.3 ± 0.2 Log<sub>10</sub> CFU *S. aureus* respectively.

**FIG. 1. Different expressions of radiographic grade 4 lesions according to Mader score in a rabbit tibial osteomyelitis model.** A) diaphyseal predominance of lesions, B) metaphyso-epiphyseal predominance of lesions. C) pandiaphysitis: lesions diffusing with the totality of the tibia. D) Osteoarthritis obtained metaphyseal inoculation of *S. aureus*. Notice the osteolysis at the tibial upper end, and the diffusion to the distal femur and proximal fibula.

**FIG. 2. Localized osteomyelitis of the proximal tibia in a rabbit model, radiologically and histopathologically characterized.** A) Osteocondensation (OC) and osteolytic (OL) metaphyso-epiphyseal lesions on day 15. B) Chronic inflammation, with a combination of granuloma (Gr), giant cell foreign body histiocytic reaction (Fbr) and sequestra (Sq) was observed in rabbits injected with 3% sodium tetradecyl sulfate (STS), the sclerosing agent, without bacterial inoculation. In the background, it was a mild to moderate lymphoplasmocytic infiltrate with a fibrosis. There were no acute lesions, such as abscesses. C) Severe OM was observed in rabbits injected with STS + *S. aureus*, with damaged granulocytes (AG), abscess and diffuse inflammation D) Beside to the acute inflammation (AI), as this shown in C, it was a chronic inflammation, with foreign body reaction and sequestra, as in B ( PES coloration, x1000).

**FIG. 3. Day 15, day 30 and day 42 radiographic signs of osteomyelitis in rabbit tibial model and histology corresponding to day 42.** Osteolytic and osteocondensing lesions were localized in the upper tibia on day 15 (A and B), confirmed at day 30 (C and D) before decline and tendency toward cyst formation on day 42 (E and F). Histopathologic finding at day 42 showed although diffuse abscess in epiphyseal area with chondral separation and sequestra formation (G, x100). In the periphery of the abscess (the same photo of G) showed, loose fibrosis with a new bone formation (H, x1000).

**FIG. 4. Macroscopic finding in a rabbit tibial *S. aureus* osteomyelitis.** The infection was localized in the proximal quarter of the tibia, with an intramedullary abscess (A), and sequestra separation (see also figure 3G) in the cancellous bone of the metaphyso-epiphysis area (B).

**FIG. 5. Radiographic grading proposed to characterize a localized tibial osteomyelitis in a rabbit model.** Localized osteomyelitis to one half of the tibia may be adapted to test the local antibiotic delivery systems: a: proximal grade 1 with infection signs located in epiphyso-

metaphyseal area; b: distal grade 1 with infection signs located in metaphyso-diaphyseal area; c: grade 2 with infection signs located in proximal diaphyseal area; d: grade 3 with infection signs located in distal diaphyseal area; e: grade 4 with infection extended to the other half of the tibia. ►Inoculation zone.

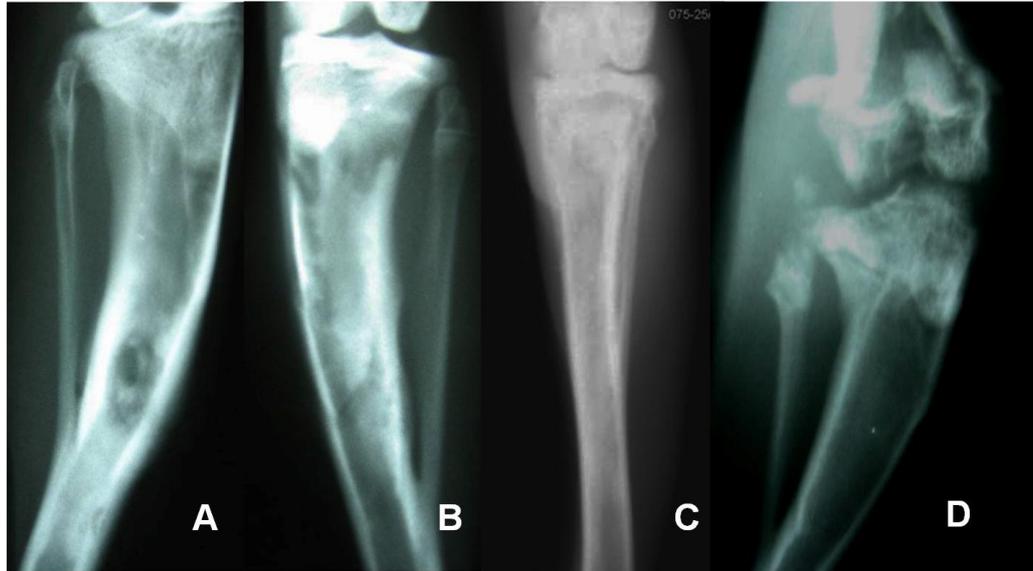


Figure 1.

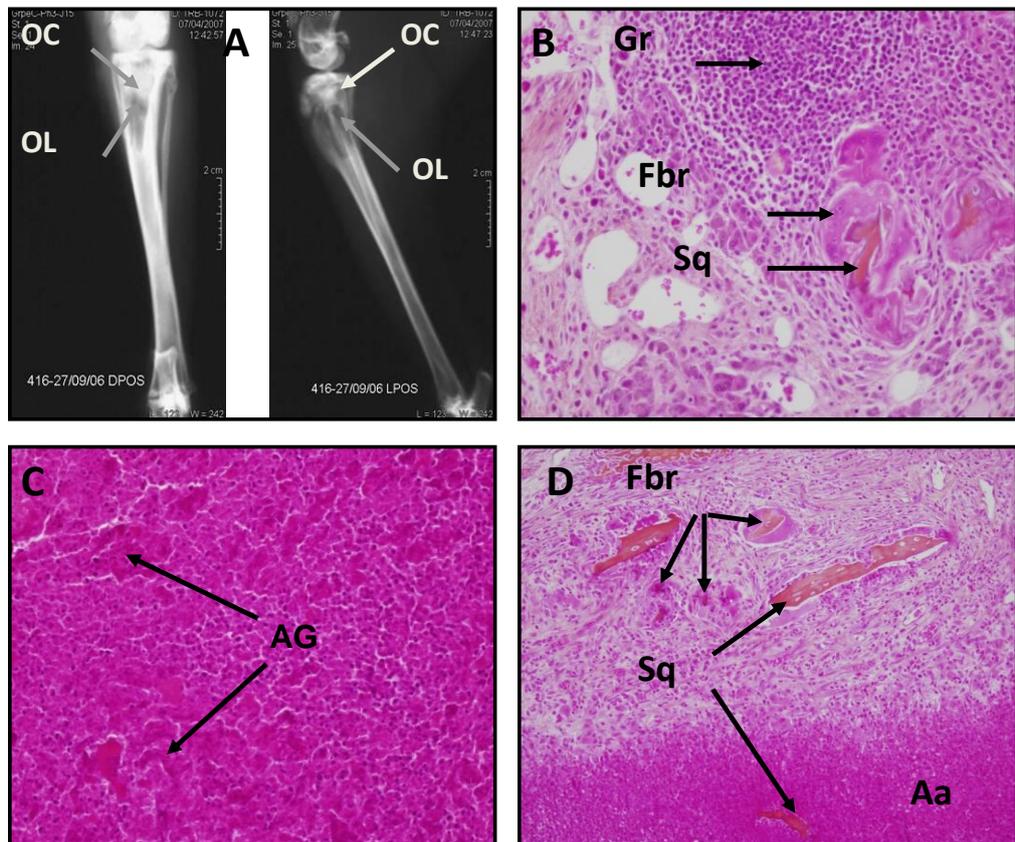


Figure 2.

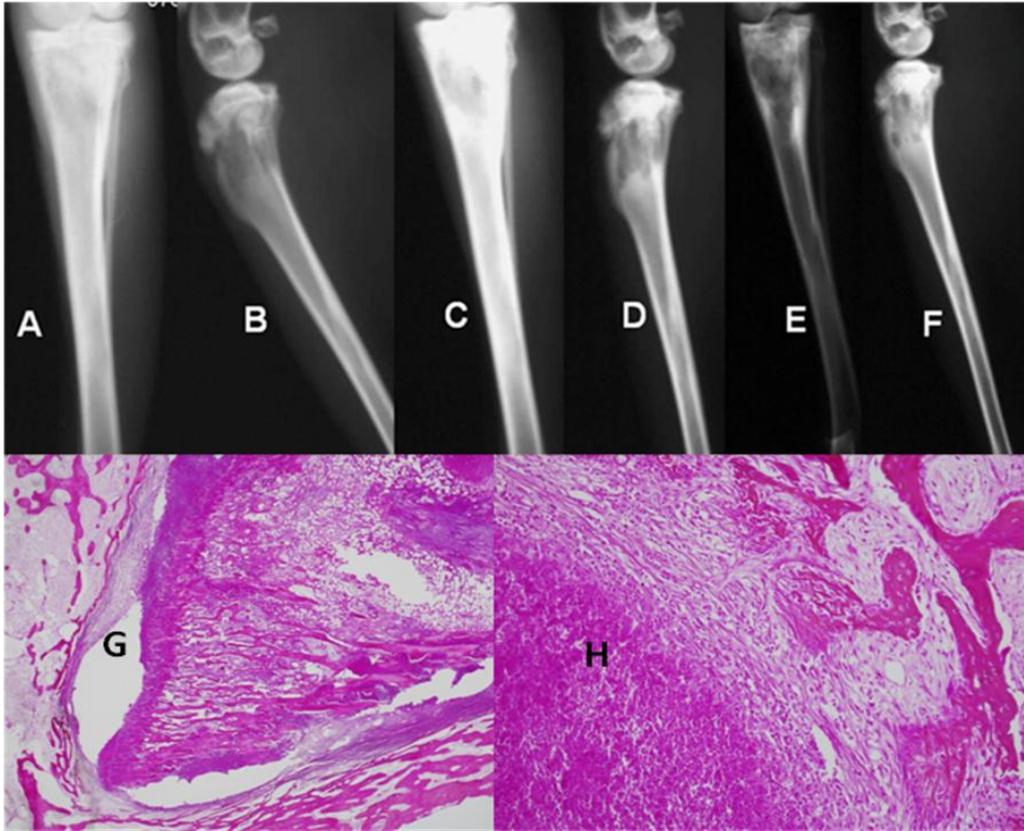


Figure 3.

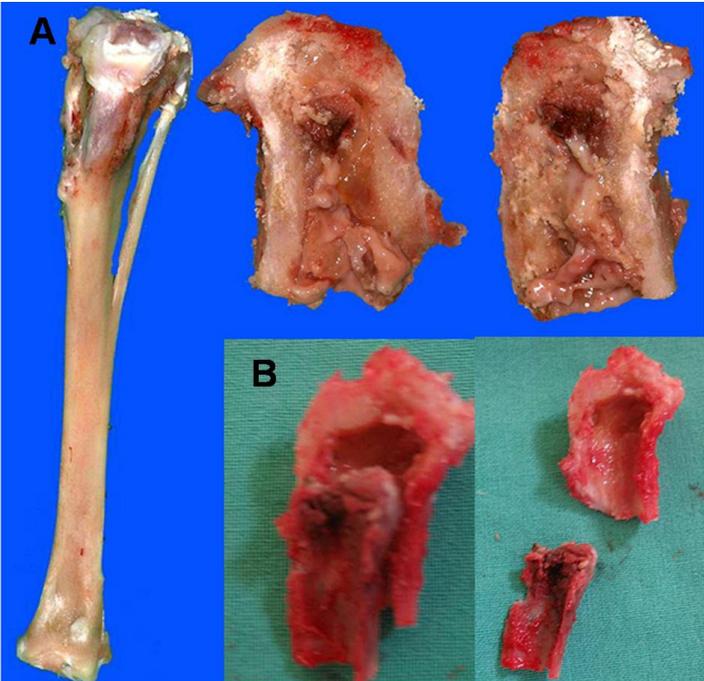


Figure 4.

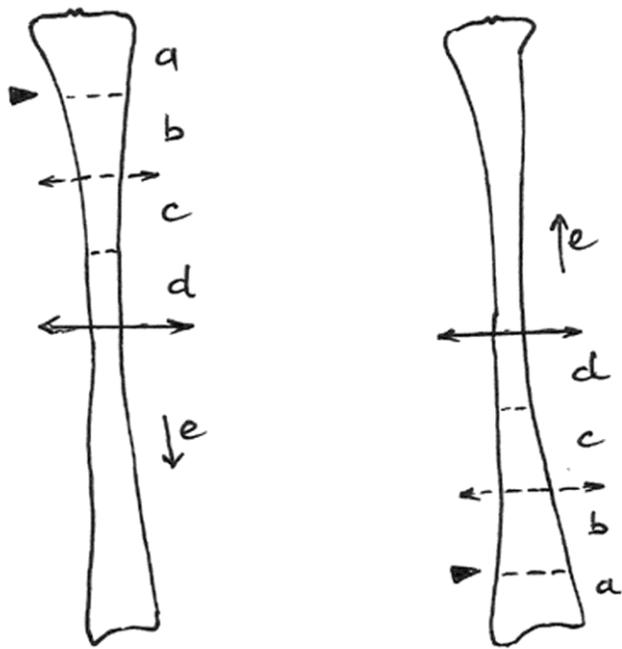


Figure 5.

## Y. Discussion et perspectives

L'inoculum optimal pour induire une ostéite expérimentale localisée chez le lapin avec le minimum de léthalité est de 6 Log<sub>10</sub> CFU de *S. aureus*. Ceci a confirmé les résultats d'autres études [Ambrose *et al.*, 2004; Gürsel *et al.*, 2001; Mader *et al.*, 2002; Rutledge *et al.*, 2003]. L'inoculum de 8 Log<sub>10</sub> CFU a produit une mortalité excessive (50%) et l'inoculum de 7 Log<sub>10</sub> CFU a donné une ostéite diffuse prédominante avec atteinte articulaire indésirable.

Les lésions radiologiques qui permettent de caractériser une ostéite (images d'ostéolyse et d'ostéocondensation) ont été retrouvées dans notre modèle. Nous avons proposé une nouvelle classification radiologique d'ostéite localisée, en 4 stades, de gravité croissante permettant de ne garder pour la randomisation que les ostéites ne dépassant pas 50% de la surface osseuse. Cette classification est une amélioration de la classification de Mader *et al.* (2002). Elle a permis d'améliorer le modèle et de l'adapter aux essais par des traitements par des biomatériaux vecteurs d'antibiotique. Des améliorations techniques ont permis d'optimiser ce modèle et de restreindre l'infection le plus souvent à la moitié proximale du tibia. La reproduction de cette infection localisée permettrait d'utiliser un nombre minimum d'animaux en optimisant la randomisation pour les essais thérapeutiques testant des traitements locaux.

Sur le plan histologique, le modèle créé est une ostéite aiguë avec comme lésion centrale un abcès franc, entouré de lésions subaigües et en périphérie des lésions chroniques dues à l'agent sclérosant. Cette configuration était toujours la même quelque soit l'intervalle de temps entre l'inoculation du germe et l'exploration de l'infection, prouvant l'inutilité de prolonger cet intervalle de temps à la recherche de modèle d'ostéite chronique [Ambrose *et al.*, 2004; Korkusuz *et al.*, 2001; Nijhof *et al.* 2001]. De plus, cette prolongation pourrait aboutir à rater le moment opportun où le compte bactérien est le plus significatif pour permettre des tests thérapeutiques satisfaisants et des évaluations bactériologiques valables et significatives. De plus, la limitation de la durée de séjour des lapins réduira le coût des expérimentations.

La validation de ce modèle et sa caractérisation précise nous a permis de passer à l'étape suivante, celle de tester notre biomatériau vecteur d'antibiotique: 600 mg de granules de DCPD-β-TCP chargés de 1% de gentamicine pour traiter cette ostéite expérimentale validée. C'est l'objet de la 3<sup>ème</sup> partie de ce travail, présentée sous forme d'article.

*Troisième partie*

**Essai thérapeutique *in vivo* chez le lapin comparant  
DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine et PMMA-gentamicine**

### **Article 3**

#### **Low-dose gentamicin-loaded calcium phosphate granules as a local treatment for severe osteomyelitis in a rabbit model.**

Saïd Zayane, Gonzague de Pinieux, Nathalie van der Mee-Marquet, Chantal le Guellec, Philippe Rosset, Roland Quentin, Jean Marc Besnier

Article soumis à Journal of Bone and Joint Surgery, American Volume, 2010.

*L'article 3 représente l'aboutissement de ce travail de thèse, puisqu'il regroupe et utilise les données des articles précédents et les conclusions des expérimentations non publiées sous forme d'articles. Ainsi, la formulation 600 mg de granules de DCPD- $\beta$ -TCP chargés de 1 % de gentamicine, qui a présenté la meilleure cinétique de relargage dans l'étude in vitro, a été choisie pour être testée in vivo chez le lapin.*

*Les études préliminaires à la validation du modèle expérimental d'ostéite ont permis de démontrer la biocompatibilité des granules de DCPD- $\beta$ -TCP en tissu sain et en milieu septique et de confirmer les capacités ostéoconductrices de ces granules. L'inocuité de la gentamicine associée à ces granules a également été préalablement démontrée.*

*Enfin, la validation du modèle d'ostéite localisée au tibia proximal chez le lapin a permis d'envisager de tester notre vecteur d'antibiothérapie locale. La classification radiologique de l'ostéite localisée, que nous proposons dans l'article 2 ne sera pas utilisée ici dans notre essai thérapeutique expérimental étant donnée qu'elle n'est pas encore validée (Article soumis) et nous utiliserons la classification de Mader.*

Low-dose gentamicin-loaded calcium phosphate granules as a local treatment for severe osteomyelitis in a rabbit model

Saïd Zayane<sup>1,2,3</sup>, Gonzague de Pinieux<sup>1,5</sup>, Nathalie van der Mee-Marquet<sup>2,3</sup>, Chantal le Guellec<sup>1,6</sup>, Philippe Rosset<sup>1,2,4</sup>, Roland Quentin<sup>1,2,3</sup>, Jean Marc Besnier<sup>1,2</sup>

4. Université François Rabelais de Tours; CHRU de Tours, 2 Boulevard Tonnellé 37044 Tours Cedex 09 – France.
5. Centre de référence des infections ostéo-articulaires du grand-Ouest (CRIOGO)\*, 2 Boulevard Tonnellé – 37044 Tours Cedex 09 – France.
6. Institut Fédératif de Recherche (IFR) 136 « Agents transmissibles et Infectiologie », Equipe d’Accueil (EA) 3854, 10 Boulevard Tonnellé – 37044 Tours Cedex 09 – France.
7. Chirurgie Orthopédique et Traumatologique 2. Centre Hospitalier Universitaire, TOURS 37044 Tours Cedex 1, France.
8. Service d’Anatomo-pathologie, CHU Trousseau, 3, rue de Loches 37044 Tours Cedex 09 – France.
9. Service de pharmacologie-Toxicologie, CHU Bretonneau, 2 Boulevard Tonnellé, 37032 Tours Cedex, France.

\* GRIOGO : Service de chirurgie orthopédique et traumatologique + Service de bactériologie et d’hygiène hospitalière + Service des maladies infectieuses.

Corresponding author: Dr Saïd Zayane

Phone: 00 33 2 47 47 97 74; 33 2 47 47 37 14; 00 212 6 61 34 60 05

Fax: 33 2 47 47 37 31.

E-mail: [saidzayane@yahoo.fr](mailto:saidzayane@yahoo.fr)

Address: Institut Fédératif de Recherche 136 « Agents transmissibles et Infectiologie », Equipe d’Accueil 3854, 10 Boulevard Tonnellé – 37044 Tours Cedex 09 – France.

## ABSTRACT

**Background:** Antibiotic loaded polymethylmetacrylate (PMMA) is widely used for treating osteomyelitis. However, PMMA is not absorbable and needs a second operation for its removal. As bioabsorbable alternative, we evaluated a low-dose gentamicin-loaded dicalcium phosphate- $\beta$ -tricalcium phosphate granules (DCPD- $\beta$ -TCP) for *staphylococcus aureus* osteomyelitis treatment in rabbit.

**Methods:** We used a Norden's model. Fifteen days after inoculation, rabbits with severe osteomyelitis according to Mader radiographic grading underwent surgery for debridement, with or without local antibiotic treatment. Bacterial counts (BC in  $\log_{10}$  CFU/g pulverized bone) and histologic analyses were carried out to confirm osteomyelitis. Twenty-seven of the 34 rabbits inoculated were infected ( $6.4 \pm 1 \log_{10}$  CFU/g bone) and randomly assigned to five groups: G1 (n=5), G2 (n=5), and G3 (n=6), each receiving 6 mg gentamicin loaded into granules of 600 mg of DCPD- $\beta$ -TCP (1%), 300 mg of PMMA (2%), and 300 mg of DCPD- $\beta$ -TCP (2%) respectively, G4 (n=6), and G5 (n=5), corresponding to debridement alone and untreated control. On day 42, animals were evaluated radiologically and killed for bacterial and histological assessments.

**Results:** Four rabbits in G1, three in G2 and four in G3 were cured (BC=0), when only 1 rabbit was cured in G4 and none in G5 ( $P=0.0003$ ). No significant difference in BC was found between G1 and G2 and between G3 and G2, but clinical (fistula), radiographic and histologic scores showed that DCPD- $\beta$ -TCP (G1 and G3) was more biocompatible than PMMA (G2) (fistulae:  $P=0.025$ ; radiographic lucent border:  $P=0.05$ ). Abundant new bone formation was observed for G1, confirming the tight filling importance for eliminating the dead space after debridement, thus containing infection and facilitating bone reconstruction.

**Conclusions:** The 1% GEN-loaded DCPD- $\beta$ -TCP (6 mg/600 mg) granules effectively treated severe *S. aureus* osteomyelitis in this model. This treatment could thus be suitable for testing in clinical trials.

## Introduction

Local antibiotic delivery systems (LADSs), one of the treatment options for the various types of OM<sup>1-3</sup>, were first developed by Buchholz, who used antibiotic-loaded polymethylmetacrylate (PMMA)<sup>4</sup>. Gentamicin- or tobramycin-loaded PMMA has been used, in bead form, for temporary treatment of chronic OM<sup>5,6</sup>, or as an antibiotic-loaded bone cement for prophylactic or curative use in prosthesis-related infection<sup>7-10</sup>. The action of the antibiotic-loaded PMMA is based on the controlled release of the antibiotic, with the aim of achieving adequate local bactericidal concentrations in tissues for prolonged periods of time, without significant systemic exposure<sup>11</sup>. However, in addition to the "trapping effect"<sup>12</sup>, the two main shortcomings of PMMA are that it is neither bioresorbable nor osteoconductive<sup>13</sup>. For these reasons, it is necessary to remove it in a second surgical operation and to fill any residual bone defect with a bone graft or synthetic substitute. It is therefore necessary to find an alternative to PMMA as an antibiotic delivery system among the bioresorbable biomaterials developed over the last 20 years for the filling of bone cavities<sup>14-18</sup>. Such alternatives would make it possible to treat the infection and the bone defect in a single operation. Calcium phosphate ceramics and calcium phosphate cements (CPC) have a composition resembling that of bone and appear to be the most appropriate materials for this purpose, as demonstrated by their use in clinical practice<sup>15,17-19</sup>. Various studies with CPC have shown them to be highly biocompatible and osteoconductive<sup>20-22</sup>. They stimulate osteogenesis, by supporting ion exchange with host tissues, and osteoconduction, the process by which newly formed bone tissue spreads over the surface of the biomaterial (bone ongrowth) or into the pores of the biomaterial (bone ingrowth). This leads to the resorption of the biomaterial and its progressive replacement by a new bone or, at least, the incorporation of the biomaterial into the surrounding bone tissue.

Dicalcium phosphate dihydrate- $\beta$ -tricalcium phosphate (DCPD- $\beta$ -TCP), a CPC, was developed, in granule form, to increase the area of the carrier exposed, thereby increasing antibiotic delivery and biomaterial resorption. Granules may be resorbed more efficiently than the block form, for which only superficial resorption is observed<sup>15,23</sup>. Granules are also generally easier to use in bone cavities. To our knowledge, no granulated CPC has ever before been used as an antibiotic delivery system.

The aim of this study was to compare DCPD- $\beta$ TCP and PMMA granules loaded with equal, small amounts of gentamicin, for the treatment of severe *S. aureus* osteomyelitis in a rabbit model.

## **Materials and methods**

### ***Granule production***

DCPD-βTCP (55%-45%) (Kasios®, France) and gentamicin (GEN) sulfate (A & K b. v. Molenwerf, Netherlands) powders were mixed with phosphoric acid to produce a paste. The reaction was exothermic (43°C). The paste was left to harden overnight at room temperature. It was then crushed and sifted. The mean diameter of each granule was 2 to 3 mm, with a microporosity of about 5 to 10 μm, and no macroporosity. Global porosity was approximately 40%. Granules were sterilized with at least 25 kGrays of gamma rays. The same procedure was used to produce PMMA granules loaded with 2% GEN (20 mg/g), concentration equivalent to that in the 6-7 mm PMMA beads (Septopal®, Biomet Deutschland) used in patients. However, as PMMA beads are too large for use with rabbit tibias, we produced granules 2 to 3 mm in diameter to facilitate adaptation of the biomaterial to any bone cavity after Dt.

In a previous *in vitro* study, we investigated the elution of GEN from 300 and 600 mg of DCPD-β-TCP granules loaded with 1%, 2% and 3% GEN (six preparations). The 1% GEN-600 DCPD-β-TCP preparation (600 mg of DCPD-β-TCP granules loaded with 6 mg GEN) was found to have the best gentamicin release profile (*Submitted*). We therefore decided to test it *in vivo*, comparing it to 2% GEN-300 PMMA (300 mg of PMMA granules loaded with 6 mg GEN), and to 2% GEN-300 DCPD-β-TCP (300 mg of DCPD-β-TCP granules loaded with 6 mg GEN). We analyzed the efficacy of each preparation for curing bone infections in rabbit. We also tested two procedures for the filling of the bone cavity: tight (600 mg/cm<sup>3</sup>) and loose (300 mg/cm<sup>3</sup>) filling, after Dt, and we assessed the extent to which the infection was cured and bone reconstruction achieved with these two procedures.

### ***Experimental model***

Sequencing was carried out as shown in Figure 1.

#### **Inoculation procedure**

New Zealand rabbits (3-3.5 kg) were used in an approved protocol (no. 2006-019-Comité d'éthique de la région Centre, France). Rabbits were infected according to a modified version of the Norden model, using 3% sodium tetradecyl sulfate (STS) (Trombovar®, Innothera, France) as a sclerosing agent, in place of the sodium morrhuate used in Norden's model<sup>24</sup>.

General anesthesia was induced with 8 to 10 mg/kg xylazine hydrochloride (Rompun® 2%, Bayer, Germany), and 100 mg/kg ketamine hydrochloride (Clorketam®, Vetoquinol, France), injected subcutaneously between the shoulder blades. The left knee area

was prepared under strictly surgical aseptic conditions. A 16-gauge needle was inserted percutaneously into the upper tibia, under X-ray control, and the inoculation sequencing according to Norden was applied<sup>24</sup>. The strain used for this study (6 Log<sub>10</sub> CFU) was a methicillin-susceptible *S. aureus*, isolated from a patient with chronic OM and stored at –80°C in BHI-glycerol medium. A culture was set up on a blood agar plate 48 hours before the inoculation procedure, and the inocula used were checked by bacterial count after inoculation procedure.

#### **Debridement and treatment procedure**

Fifteen days after inoculation, rabbits with severe localized OM, according to Mader radiographic score<sup>25</sup>, were randomly assigned to five groups: G1 = Dt plus 600 mg of DCPD-β-TCP granules loaded with 6 mg gentamicin; G2 = Dt plus 300 mg of PMMA granules loaded with 6 mg gentamicin; G3 = Dt plus 300 mg of DCPD-β-TCP granules loaded with 6 mg gentamicin; G4 = Dt alone and G5 = rabbits inoculated but not treated, used as a control. All the rabbits other than those in the control group underwent surgery again. Anesthesia protocol of inoculation procedure was used. A 3 cm incision was made in the anteromedial area of the upper tibia, and a 15 x 5 mm cortical flap was reclined to provide access to the tibial canal for debridement. We removed as much infected and necrotic tissue as possible both for treatment purposes and for culture and histology. The granules of GEN-loaded DCPD-βTCP or PMMA were inserted into the upper third of the tibial canal, in a cavity of about 1 cm<sup>3</sup> (Fig. 1). The cortical flap was then closed and the fascia and skin were stitched, without drainage.

#### **Follow-up**

One hour after inoculation (day 0) and on day 15 after Dt ± gentamicin delivery system (GDS) implantation, the rabbits received an intramuscular injection of 0.03 mg/kg buprenorphine (Temgesic®, Reckitt & Colman, United Kingdom). This injection was repeated twice daily on the three days following surgery. Each animal was examined, for local signs of infection (swelling, fistulae), and weighed on days 1, 2, 5, 10 (after inoculation) and on day 15, and then days 16, 17, 20 and once weekly thereafter until euthanasia procedure (day 42).

#### **Killing of the rabbits and acquisition of samples**

On day 42, the animals were initially sedated, as in the protocol for surgery, and then killed by intravenous injection of an overdose of thiopental sodium (Nesdonal®, Rhône Mérieux, France). The left tibia was excised under strictly aseptic conditions. The upper part of the bone was recovered and then split down the sagittal plane to obtain two standardized

samples of about 30 mm in length. One of these comparable samples was used for bacteriological counts and the other was used for histology. Both were split into a proximal metaphyso-epiphyseal part and a distal diaphyseal part, each about 15 mm in length, for analyzing the extent of the lesion (Fig. 1). The “bacteriological” samples were crushed with a freeze-pulverizer, at  $-180^{\circ}\text{C}$  (Spex CertiPrep 6750®, Bioblock Scientific, France), weighed, stored at  $4^{\circ}\text{C}$  and rapidly cultured in a sterile laminar flow cabinet for quantitative evaluation (bacterial count, BC). The “histologic” samples were fixed by incubation in 10% formaldehyde until analysis (Fig. 1).

### ***X-ray examination***

Antero-posterior and lateral X rays were taken for each animal on day 0, just before inoculation, on day 15 before surgery (to confirm OM and for randomization), and after surgery (to check that the granules were implanted in the correct position; Fig. 1). On day 42, all the surviving rabbits underwent X-ray examination before they were killed (Fig. 1).

Radiographic signs of infection were classified according to the 0-4 grades Mader scale<sup>25</sup>. X rays were scored with double-blind evaluation. On day 15, the severity of infection was determined for all rabbits, and only those rabbits with a Mader’s scale grade of at least 3 were randomly assigned to five treatment groups (see section: **Debridement and treatment procedure**). Day 42 X rays were scored on the same scale, to determine whether the “infectious” signs had disappeared or decreased, and the modified Norden score was used to evaluate bone healing<sup>26</sup>, by scoring the presence (1) or absence (0) of: diaphyseal periosteal reaction, osteolysis, sequestrum, joint effusion, a border surrounding the granules, epiphyseal extension, diaphyseal extension and osteotomy pseudarthrosis. The modified Norden score was used only in groups treated and cured with GDS (G1, G2 and G3), to assess the quality of bone reconstruction obtained with each granule preparation.

### ***Microbiology***

The debridement products (day 15) and the pulverized bone tissue (day 42) were homogenized in 2 ml of BHI broth. Bacterial count (BC) was determined by serial dilution of the homogenate followed by plating of 100  $\mu\text{l}$  of the resulting suspension, in duplicate, on blood agar. Plates were incubated for 48 h at  $37^{\circ}\text{C}$ . BC was expressed as the number of CFU per gram of bone tissue (CFU/g bone). We carefully checked for the presence of small-colony variants (SCVs). Their susceptibility to GEN and tobramycin was determined by E-test (0.16 – 256  $\mu\text{g/ml}$ ) (AB Biodisk®, Sweden). *S. aureus* strains cultured from bone tissues were compared with the original strain used for inoculation, by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing<sup>27</sup>.

Bacterial counts were scored as follows: grade 0 =  $0 \log_{10}$  CFU/g bone; grade 1 =  $0 < BC \leq 2 \log_{10}$  CFU/g bone; grade 2 =  $2 < BC \leq 4 \log_{10}$  CFU/g bone; grade 3 =  $4 < BC \leq 6 \log_{10}$  CFU/g bone and grade 4 =  $6 < BC \leq 8 \log_{10}$  CFU/g bone.

### ***Histology***

Two days after formalin fixation, samples were decalcified and embedded in paraffin. Sections (4 to 6  $\mu\text{m}$ ) were cut, mounted on slides and stained with hematoxylin-eosin-safran (HES). The decalcified samples were observed under a light microscope. A simplified Smeltzer score was used to classify infection into five grades: 0 = absence of inflammation; 1 = minimal to mild inflammation, without abscess; 2 = moderate inflammation without abscess and/or presence of a microabscess; 3 = presence of a localized abscess; 4 = presence of a diffuse abscess<sup>28</sup>. Inflammation was defined as the presence of a large number of altered or unaltered granulocytes (acute inflammation) or lymphoplasmocytic infiltration with or without foreign body reaction (chronic inflammation). Microabscesses are microaggregates of altered granulocytes. Localized abscesses are circumscribed foci of acute inflammation with altered granulocytes. Diffuse abscesses correspond to altered granulocytes extending to the whole medullary canal and infiltrating the epiphyseal cartilage.

### ***Statistical analysis***

Mann-Whitney U tests were used to compare bacterial inocula on day 0, and BCs, radiographic and histologic scores on day 15 (in infected animals) and on day 42 (after 4 weeks of treatment). Wilcoxon and Fisher's exact tests were used to compare scores for qualitative data relating to OM cure and bone reconstruction. Differences were considered significant if  $P \leq 0.05$ .

### ***Source of funding***

There was no external funding source for this study.

## **Results**

### ***Osteomyelitis model***

We inoculated 34 rabbits with inocula of similar sizes ( $6.2 \pm 0.1 \log_{10}$  CFU each). Four rabbits died from septicemia or septic shock, and three had mild signs of infection on X ray (Mader score  $< 3$ ) and were not randomized on day 15. Twenty-seven rabbits with a Mader score  $\geq 3$  were randomized into five groups (See section: ***Debridement and treatment procedure***). This high radiographic score ( $\geq 3$ ), which was necessary for randomization as severe localized OM, was subsequently confirmed by a high bacterial count ( $\geq 3 \log_{10}$  CFU/g bone), and a high median Smeltzer score ( $\geq 3$ ), with the presence of a localized central

abscess surrounded by lesions of chronic inflammation. There were 19 rabbits with a Mader score of 3 and eight with a Mader score of 4 (Table 1).

### ***Evaluation of osteomyelitis cure***

#### **Clinical features**

All groups displayed progressive weight loss, beginning 2 days after *S. aureus* inoculation. Weight gain was observed from day 18 to day 42, and was greater for the three groups treated with local antibiotics (data not shown).

Fistulae were present on a few days after day 15-surgery (Table 2). They disappeared after day 30 for G1, G2 and G3 and persisted until the time of death (day 42) for G4. Fistula rate differed significantly between treatment groups (Table 2).

#### **Radiographic, microbiologic and histologic findings**

Bacterial counts, radiologic and histologic scores were evenly distributed between the different groups (G1, G2, G3 and G4) on day 15 (Table 2 and Fig. 2A). On day 42, a significant decrease in disease severity was observed for rabbits treated with the GDS (G1, G2 and G3), but not in those treated by Dt alone (G4) or left untreated (G5, Control) (Fig. 2B). Bone culture was the principal technique for demonstrating infection cure. Mean bacterial count was strongly and significantly different between the groups treated with the GDS (whatever the carrier, G1, G2 or G3) and the groups not treated with the GDS (G4 and G5) ( $P = 0.0003$ ; Fig. 3).

Histology confirmed the bacteriological cure of the experimental OM in G1, with the disappearance of all signs of inflammation in both proximal metaphyseal and distal diaphyseal samples in the four rabbits with a bacterial count of 0. Smeltzer grade 2 inflammation persisted only in the distal tibial fragment of the single rabbit still infected on day 42 in G1 (Fig. 2B), and minimal to moderate inflammation (Smeltzer 1 or 2) persisted in 2 of 3 and in 2 of 4 rabbits cured respectively in G2 and G3 (Fig. 2B), but with no active infection (BC = 0) (Fig. 2B).

#### **Qualitative evaluation**

X-ray examination showed clearance of the infection in the proximal third of the tibia in the groups treated with the GDS (G1, G2 and G3), after 30 days of local treatment. The geodic metaphyseal areas were replaced by bone reconstruction (Fig. 4 F, G and H, compare with A, B and C, respectively), contrasting with X rays of G4 and G5 animals (Fig. 4)

Biomaterial biocompatibility, and bone healing with a decrease in signs of bone destruction in rabbits of G1, treated and cured (i.e. BC=0) with Dt plus 600 mg of 1% GEN-loaded DCPD- $\beta$ -TCP granules, and rabbits of G3, treated and cured with Dt plus 300 mg 2%

GEN-loaded DCPD- $\beta$ -TCP granules were significantly different from those observed in rabbits of G2 treated and cured with Dt plus 300 mg 2% GEN-loaded PMMA granules (Fig. 5).

G1 rabbits had larger numbers of sites covered by new bone than did G3 rabbits (data not shown). Both these groups displayed higher levels of new bone formation than G2 (Fig. 6).

No cytotoxicity (bone necrosis) was observed on histologic slides, in any of the rabbits.

### ***Analysis of uncured rabbits***

Despite local treatment with GEN, delivered by DCPD- $\beta$ TCP or PMMA, at the infection site, one in five of the rabbits in G1 (3.5 log<sub>10</sub> CFU/g bone, with BC possible only for the distal diaphyseal sample), two of the five rabbits in G2 (2.9 and 5.2 log<sub>10</sub> CFU/g bone), and two of the six rabbits in G3 (3.6 and 4 log<sub>10</sub> CFU/g bone) remained infected. X rays of these GDS-treated but uncured rabbits showed an extension of the infection (Fig. 7 A and B). Four (1 from G1, 1 from G2 and 2 from G3) of these five rabbits had a Mader score of 4 on day 15, scores this high being found in only eight of the 27 rabbits initially randomized ( $P=0.05$ ; Fisher's test). This extension of the infection was confirmed histologically, and most frequently observed in G2 and G3 rabbits, after loose filling of the tibiae (Fig. 7 C and D). However, these uncured rabbits did display a significant decrease in mean bacterial count (from day 15 to day 42). No such decrease was observed for the uncured rabbits in G4 and G5, for which the mean bacterial count remained similar to that confirming infection on day 15 ( $6.4 \pm 1$  log<sub>10</sub> CFU/g bone) (Fig. 3).

Small-colony variants (SCVs) were detected, interspersed with "normal" colonies (NCs), in seven of the 15 uncured rabbits. We found SCVs in one rabbit in G1, one in G3, two in G4 and three rabbits in G5. Their MICs, for gentamicin and tobramycin, are shown in Table 3.

Bacterial DNA analysis exhibited similar band pattern of parental final strains, SCVs, and the original strain (Fig. 8).

### **Discussion**

OM (BC > 3 log<sub>10</sub> CFU/g bone) was reliably obtained in 27 of 34 rabbits (infection efficiency of 82.4%). With identical inoculum sizes, we obtained similar bacterial counts, radiologic and histologic scores in all the randomized groups (Table 1 and Fig. 2A). The infection obtained in our model was acute (localized abscess) and surrounded by lesions of chronic inflammation. Dt is important for elimination of the abscess, but is insufficient to treat

the chronic component of the infection, as shown by our findings for rabbits treated by Dt alone (G4), and by other studies<sup>13,29</sup>. Instead, the elimination of chronic lesions was ensured by the antibiotic loaded onto the DDS.

Rabbits with severe OM were indeed cured with gentamicin delivered by DCPD- $\beta$ -TCP (4 of 5 cases in G1, 4 of 6 cases in G3) and with gentamicin delivered by PMMA (3 of 5 cases in G2), as confirmed by radiographic, bacterial and histologic data (Fig. 2B and 3). Bacteriologically, the infection was cured with both DCPD- $\beta$ -TCP and PMMA ( $P = 0.69$ ) (Fig. 3). Similar findings have been reported for various DDSs compared with PMMA in other animal studies<sup>29-32</sup> and patients<sup>6,7,33</sup>. However, the clinical data (fistulae), radiographic scores and histologic findings showed that DCPD- $\beta$ -TCP was more biocompatible than PMMA and gave better bone reconstruction (Fig. 4, Fig. 5 and Fig. 6).

Our analysis of rabbits treated but not cured by GDS (1 in G1, 2 in G2 and 2 in G3) showed these rabbits to have, on day 15, more severe and diffuse infection — extending to epiphyseal and diaphyseal areas — than the others (Fig. 7). Epiphyseal infection foci were not accessible to Dt and infection spreading to the whole diaphysis could not be reached by the localized implantation of a quantity of antibiotic delivery granules limited by the predefined experimental protocol (no more than 300 and 600 mg, regardless of extension into the bone cavity after Dt). Mäkinen *et al.* demonstrated, with a ciprofloxacin-loaded DDS, that high antibiotic concentrations were limited to the areas of tissue close to the implantation site<sup>34</sup>. Thus, it is important to fill the whole bone cavity with gentamicin-loaded DDS after Dt to fill all the dead space.

SCVs, which are considered a risk factor for the recurrence of chronic infections subject to “antibiotic pressure” (systemic antibiotic therapy and/or antibiotic-loaded PMMA beads)<sup>35,36</sup>, were present both in rabbits treated with antibiotics (1 in G1, 1 in G3) and in those not treated with antibiotics (2 in G4 and 3 in G5), at similar frequency ( $P = 0.08$ ), and they were absent from our GEN-PMMA group (G2). Aminoglycosides have higher MICs for some SCVs<sup>37</sup>. However, the MIC for gentamicin (and tobramycin) was greater than 1  $\mu\text{g/ml}$  for only one of our seven isolates (Table 3). This SCV was isolated from one distal sample of the tibia, which the granules probably failed to reach. It would probably have been eradicated by the tight filling procedure if this procedure had not been limited, by the experimental protocol, to 600 mg granules per  $\text{cm}^3$ . The better bone reconstruction obtained with the tight filling procedure, suggests that the quantity of granules used should be increased, rather than the amount of antibiotic loaded onto the carrier. Indeed, the difficulty to treat OM in patients is due to the presence of the recalcitrant tissue fibrosis, sequestra and/or slime<sup>38</sup>, and to the

persistence, even after the surgical debridement of niches not reached by systemic antibiotics, even given at adequate doses. Thus, loading onto the DDS a high dose of antibiotics – as 10% to 25%, 100 to 250 mg/g DDS– as reported<sup>30,39-42</sup> is not necessary. We demonstrate here the efficacy of DCPD- $\beta$ -TCP granules loaded with only 20 mg/g or 10 mg/g gentamicin for treating this severe OM. In addition, loading with the lower of these two doses should make it possible to use as many granules as necessary in clinical situations, potentially combined with a limited period of systemic antibiotic treatment (not tested in our model) without fear of toxicity. This should make it possible to attain the two main goals of chronic OM treatment: i) to deliver locally high concentrations of antibiotic as close as possible to the infectious niches persisting despite radical Dt, to prevent the emergence of mutant strains; ii) to fill bone cavities remaining after Dt, regardless of their size, thereby eliminating the dead space and facilitating infection cure and bone reconstruction without the need for further surgery.

### **In conclusion**

GEN-loaded granules of DCPD- $\beta$ -TCP were found to be an efficient DDS for the local treatment of severe *S. aureus* OM in rabbit. This treatment is at least as good, in bacteriologic terms, as the clinically proven GEN-loaded PMMA treatment. It has two main advantages over PMMA: resorbability and osteoconduction. Adequate filling of the infected bone cavity after Dt is essential, to optimize bone reconstruction. Our results suggest that GEN-loaded DCPD- $\beta$ -TCP should be tested in a clinical trial.

### **References**

1. Lazzarini L, Mader JT, Calhoun JH. Osteomyelitis in long bones. *J Bone Joint Surg Am.* 2004;86:2305–2318.
2. Darouiche RO. Treatment of infections associated with surgical implants. *N Eng J Med.* 2004;350:1422-29.
3. Zimmerli W, Ochsner PE. Management of infection associated with prosthetic joints. *Review. Infection* 2002;30:99-108.
4. Buchholz HW, Engelbrecht H. Über die depotwirkung einiger antibiotica bei vermischung mit dem kunstharz Palacos. *Chirurg.* 1970;41:511-15. German.
5. Klemm KW. Gentamicin-PMMA chains (Septopal chains) for the local antibiotic treatment of chronic osteomyelitis. *Reconstr Surg Traumatol.* 1988;20:11-35.
6. Walenkamp GHIM, Kleijn LLA, De Leeuw M. Osteomyelitis treated with gentamicin-PMMA beads: 100 patients followed for 1-12 years. *Acta Orthop Scand.* 1998;69:518–22.
7. Haddad FS, Masri BA, Campbell D, McGraw RW, Beauchamp CP, Duncan CP. The Prostalac functional spacer in two-stage revision for infected knee replacements. *Prosthesis of antibiotic-loaded acrylic cement. J Bone Joint Surg Br.* 2000;82:807-12.

8. Diefenbeck M, Mükley T, Hofmann G. Prophylaxis and treatment of implant-related infections by local application of antibiotics. *Injury*. 2006;37:S95-S104.
9. Jiranek WA, Hanssen AD, Greenwald AS. Antibiotic-loaded bone cement for infection prophylaxis in total point replacement. *J Bone Joint Surg Am*. 2006;88:2487–500.
10. Sterling GJ, Crawford S, Potter JH, Koerbin G, Crawford R. The pharmacokinetics of Simplex-tobramycin bone cement. *J Bone Joint Surg Br*. 2003;85:646-9.
11. Winingar DA, Fass RJ. Antibiotic-impregnated cement and beads for orthopedic infections. Minireview. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996;40:2675–79.
12. Neut D, Van de Belt H, Stokroos I, Van Horn JR, Van der Mei HC, Busscher HJ. Biomaterial-associated infection of gentamicin-loaded PMMA beads in orthopaedic revision surgery. *J Antimicrob Chemother*. 2001;47:885-891.
13. Ambrose CG, Clyburn TA, Loudon K, Joseph J, Wright J, Gulati P, Gogola GR, Mikos AG. Effective treatment of osteomyelitis with biodegradable microspheres in a rabbit model. *Clin Orthop Relat Res*. 2004;421:293-9.
14. Beaman FD, Bancroft LW, Peterson JJ, Kransdorf MJ. Bone graft materials and synthetic substitutes. *Radiol Clin North Am*. 2006;44:451-61.
15. Libicher M, Hillmeir J, Liegibel U, Sommer U, Pyerin W, Vetter M, Meinzer HP, Grafe I, Meeder P, Noldge G, Nawroth P, Kasperrk C. Osseous integration of calcium phosphate in osteoporotic vertebral fractures after kyphoplasty: initial results from a clinical and experimental pilot study. *Osteoporos Int*. 2006;17:1208–15.
16. Saikia KC, Bhattacharya TD, Bhuyan SK, Talukdar DJ, Saikia SP, Jitesh P. Calcium phosphate ceramics as bone graft substitutes in filling bone tumor defects, *Indian J Orthop*. 2008;42:169-72.
17. Uchida A, Araki N, Shinto Y, Yoshikawa H, Kurisaki E, Ono K. The use of calcium hydroxyapatite ceramic in bone tumor surgery. *J Bone Joint Surg Br*. 1990;72:298-302.
18. Yamamoto T, Onga T, Marui T, Mizuno K. Use of hydroxyapatite to fill cavities after excision of benign bone tumors. *J Bone Joint Surg Br*. 2000; 82:1117-21.
19. Liverneaux P, Khallouk R. Calcium phosphate cement in wrist arthrodesis: three cases. *J Orthop Sci*. 2006;11:289-93.
20. Apelt D, Theiss F, El-Warrak AO, Zlinszky K, Bettschart-Wolfisberger R, Bohner M, Matter S, Auer JA, Von Rechenberg B. *In vivo* behavior of three different hydraulic calcium phosphate cements. *Biomaterials*. 2004;25:1439-51.
21. Kurashina K, Kurita H, Hirano M, Kotani A, Klein CPAT, de Groot K. *In vivo* study of calcium phosphate cements: implantation of an  $\alpha$ -tricalcium phosphate/dicalcium phosphate dibasic/tetracalcium phosphate monoxide cement paste. *Biomaterials*. 1997;18:539-43.
22. Ooms EM, Wolke JGC, Van de Heuvel MT, Jeschke B, Jansen JA. Histological evaluation of the bone response to calcium phosphate cement implanted in cortical bone. *Biomaterials*. 2003;24:989-1000.
23. Theiss F, Apelt D, Brand B, Kutter A, Zlinsky K, Bohner M, Matter S, Frei C, Auer JA, Von Rechenberg B. Biocompatibility and resorption of a burshite calcium phosphate cement. *Biomaterials*. 2005;26:4383–94.
24. Norden CW, Kennedy E. Experimental osteomyelitis. A description of the model. *J Infect Dis*. 1970;122:410-18.
25. Mader JT, Shirliff ME. The rabbit model of bacterial osteomyelitis of the tibia. In: *Handbook of Animal Models of Infection*. Zak O, Sande MA, Ed, Academic Press, New York. 1999;68:581-91.

26. Norden CW, Myerowitz RL, Keleti E. Experimental osteomyelitis due to *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa*: A radiographic-pathological correlative analysis. *Br J Exp Pathol*. 1980;61:451-60.
27. Van der Mee-Marquet N, Domelier AS, Girard N, Quentin R. Epidemiology and typing of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bloodstream infections. *J Clin Microbiol*. 2004;42:5650-7.
28. Smeltzer MS, Thomas JR, Hickmon SG, Skinner RA, Nelson CL, Griffith D, Parr TR, Evans RP. Characterization of rabbit model of staphylococcal osteomyelitis. *J Orthop Res*. 1997;15:414-21.
29. Calhoun JH, Mader JT. Treatment of osteomyelitis with biodegradable antibiotic implant. *Clin Orthop Relat Res*. 1997;341:206-14.
30. Lucke M, Wildemann B, Sadoni S, Surke C, Schiller R, Stemberger A, Raschke M, Haas NP and Schmidmaier G. Systemic versus local application of gentamicin in prophylaxis of implant-related osteomyelitis in a rat model. *Bone*. 2005;36:770-78.
31. Joosten U, Joist A, Frebel T, Brandt B, Diederichs S, Von Eiff C. Evaluation of an *in situ* setting injectable calcium phosphate as a new carrier material for gentamicin in treatment of chronic osteomyelitis. *Biomaterials*. 2004;25: 4287-95.
32. Narahariseti PK, Lee HCG, Fu Y, Lee D, Wang C. *In vitro* and *in vivo* release of gentamicin from biodegradable discs. *Appl Biomater*. 2006;77:329-337.
33. Gitelis S, Brebach CT. The treatment of chronic osteomyelitis with a biodegradable antibiotic-impregnated implant. *J Orthop Surg*. 2002;10:53-60.
34. Mäkinen TJ, Veiranto M, Lankinen P, Moritz N, Jalava J, Törmälä P and Aro HT. *In vitro* and *in vivo* release of ciprofloxacin from osteoconductive bone defect filler. *J Antimicrob Chemother*. 2005;56:1063-68.
35. Von Eiff C, Becker K. Small-colony variants (SCVs) of staphylococci: a role in foreign body-associated infections. *Int J Artif Organs*. 2007;30:778-85.
36. Wright JA, Nair SP. Interaction of staphylococci with bone. *Mini-review*. *Int J Med Microbiol*. 2009. doi: 10.1016/j.ijmm.2009.10.003.
37. Proctor RA, Kahl B, Von Eiff C, Vaudaux PE, Lew DP, Peters G. Staphylococcal small colony variants have novel mechanisms for antibiotic resistance. *Clin Infect Dis*. 1998;27-Suppl 1:S68-S74.
38. Gristina AG, Shibata Y, Giridhar G, Kreger A, Myrvik QN. The glycocalyx, biofilm, microbes, and resistant infection. *Semin Arthroplasty*. 1994;5:160-70.
39. Turner TM, Urban RM, Hall DJ, Chye PC, Segreti J, Gitelis S. Local and systemic levels of tobramycin delivered from calcium sulphate bone graft substitute pellets. *Clin Orthop Relat Res* 2005;437:97-104.
40. Shirliff ME, Calhoun JH, Mader JT. Experimental osteomyelitis treatment with antibiotic-impregnated hydroxyapatite. *Clin Orthop Relat Res* 2002; 401:239-47.
41. Kanellakopoulou K, Galanakis N, Giamarellos-Bourboulis EJ, Rifiotis C, Papakostas K, Andreopoulos A, Dounis E, Karagianakos P, Giamarellou H. Treatment of experimental osteomyelitis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a biodegradable system of lactic acid polymer releasing pefloxacin. *J Antimicrobial Chemotherapy*; 2000, 46: 311-14.
42. Wei G., Kotoura Y., Oka M. et al. A bioresorbable delivery system for antibiotic treatment of osteomyelitis. The use of lactic acid oligomer as a carrier. *J Bone Joint Surg*. 1991; 73B: 246 - 252.

**Table 1.** Comparison of Mader radiographic scores<sup>25</sup>, and of mean bacterial count (BC) (multivariate analysis's) of five groups of infected rabbits, at the time of their randomization for treatment, 15 days after inoculation with  $6.2 \pm 0.1$   $1 \log_{10}$  CFU *S. aureus* in tibia.

Rabbit Group (G) (n = 27)	Mader's radiographic scores		Mean bacterial count (BC) <sup>b</sup> (6.4±1)
	Grade 3 <sup>a</sup> (n = 19)	Grade 4 <sup>a</sup> (n = 8)	
G1 <sup>c</sup> (n=5)	3	2	6.4±0.4 <sup>b</sup>
G2 <sup>c</sup> (n=5)	4	1	6.1±1.1 <sup>b</sup>
G3 <sup>c</sup> (n=6)	3	3	6.6±0.7 <sup>b</sup>
G4 <sup>c</sup> (n=6)	6	0	6.4±0.8 <sup>b</sup>
G5 <sup>c</sup> (n=5)	3	2	-

<sup>a</sup>*P* = 0.4 for (G1 + G2 + G3) vs. (G4 + G5); <sup>a</sup>*P* = 0.7 for G1 vs. G2; <sup>a</sup>*P* = 0.4 for G2 vs. G3, and <sup>a</sup>*P* = 0.8 for G 1 vs. G3 (Mann-Whitney U test).

<sup>b</sup>*P* = 0.5 for (G1 + G2 + G3) vs. G4; <sup>b</sup>*P* = 0.7 for G1 vs. G2; <sup>b</sup>*P* = 0.5 for G2 vs. G3 and <sup>b</sup>*P* = G 1 vs. G3 (Mann-Whitney U test).

<sup>c</sup> G1 = group of rabbits treated with debridement (Dt) plus 600 mg of Dicalcium phosphate dihydrate- $\beta$ -tricalcium phosphate (DCPD- $\beta$ -TCP) granules loaded with 6 mg gentamicin (1% GEN-600 DCPD- $\beta$ -TCP); G2 = treated with Dt plus 300 mg of polymethylmetacrylate (PMMA) granules loaded with 6 mg gentamicin (2% GEN-300 PMMA); G3 = Dt plus 300 mg of DCPD- $\beta$ -TCP granules loaded with 6 mg gentamicin (2% GEN-300 DCPD- $\beta$ -TCP); G4 = Dt alone and G5 = rabbits inoculated but not treated, used as a control.

PS: groups were compared as follows, in<sup>a</sup> and in<sup>b</sup> respectively: i) Rabbits treated with local gentamicin delivery systems (DCPD- $\beta$ -TCP or PMMA, G1, G2 and G3) vs. Dt alone (G4) + untreated control group (G5); ii) G1 (DCPD- $\beta$ -TCP) vs. G2 (PMMA); iii) G2 (PMMA) vs. G3 (DCPD- $\beta$ -TCP) and iv) G1 (tight filling) vs. G3 (loose filling).

**Table 2.** Fistula distribution, in rabbits infected with *S. aureus* osteomyelitis, a few days after treatment with different regimen of local treatment<sup>a</sup>.

Group of rabbits (n=27)	G1 (n=5)	G2 (n=5)	G3 (n=6)	G4 (n=6)	G5 (n=5)
No. with fistulae	2	5 <sup>b</sup>	1	4 <sup>b</sup>	0

<sup>a</sup>G1: rabbits treated with debridement (Dt) plus 600 mg of dicalcium phosphate-β-tricalcium phosphate (DCPD-β-TCP) granules loaded with 6 mg GEN (1% GEN-600 DCPD-β-TCP). G2: treated with Dt plus 300 mg of polymethylmethacrylate (PMMA) granules loaded with 6 mg GEN (2% GEN-300 PMMA). G3: treated with Dt plus 300 mg of DCPD-β-TCP granules loaded with 6 mg GEN (2% GEN-300 DCPD-β-TCP). G4: treated with Dt alone. G5: untreated control group.

<sup>b</sup>(G1+G3) vs. G2 ( $P = 0.025$ ). G1+G3 vs. G2+G4 ( $P = 0.03$ ).

**Table 3.** MICs<sup>a</sup> (μg/ml) of gentamicin and tobramycin for small-colony variants (SCVs), normal colonies and parental colonies of *S. aureus* isolates (from uncured rabbits).

Antibiotic	Gentamicin	Tobramycin
Strain		
G1 <sup>b</sup> SCV (D <sup>c</sup> )	2	2
G3a <sup>b</sup> SCV (D <sup>c</sup> )	0.5	0.5
G4a <sup>b</sup> SCV (D <sup>c</sup> )	0.75	0.75
G4b <sup>b</sup> SCV (M <sup>c</sup> )	1	1
G5a <sup>b</sup> SCV (M <sup>c</sup> )	0.5	0.5
G5b <sup>b</sup> SCV (M <sup>c</sup> )	0.5	0.38
G5c <sup>b</sup> SCV (M <sup>c</sup> )	1	0.75
Parent strain	1	1
NC (normal colony) (n = 15)	0.93 ± 0.1	0.95 ± 0.1
Mean for SCV MIC (n = 7)	0.89 ± 0.53	0.84 ± 0.55

<sup>a</sup>MIC of gentamicin and tobramycin for *S. aureus* is 1 μg/ml.

<sup>b</sup>Strains isolated from rabbits in G1, uncured with debridement (Dt) plus 600 mg of dicalcium phosphate-β-tricalcium phosphate (DCPD-β-TCP) granules loaded with 6 mg GEN (1% GEN-600 DCPD-β-TCP), G3, uncured with Dt plus 300 mg of DCPD-β-TCP granules loaded with 6 mg GEN (2% GEN-300 DCPD-β-TCP), G4 uncured with Dt alone, and G5, untreated (control).

<sup>c</sup>D = strains isolated from diaphyseal bone samples; M = strains isolated from metaphyseal bone samples.  $P = 0.08$  (Fisher's test) for comparing strains subjected to "antibiotic pressure" (G1+G3) (2 SCVs from 16 rabbits) vs. strains not subjected to "antibiotic pressure" (G4+G5) (5 SCVs from 11 rabbits).

**FIG. 1. Experimental sequence in the rabbit tibial osteomyelitis model.** On day 0, rabbits were inoculated with  $10^6$  CFU *S. aureus*. On day 15, three groups (G1, G2 and G3) of rabbits underwent the implantation of GEN-loaded reliable biomaterial after Dt. X rays were carried out for all groups of rabbits, on days 0, 15 and 42. On day 15, the Dt products were examined bacteriologically and histologically to confirm and quantify the infection. On day 42, all animals underwent another X ray and were killed. The samples taken from the upper half of the tibia were intended for pairwise comparisons (proximal and distal) to assess infection cure based on the bacterial count, and to determine the degree of inflammation and of new bone healing.

**FIG. 2. Semi-quantitative evaluation of *S. aureus* osteomyelitis in rabbit tibia.** The evaluation, with median values assessing infection (day 15; A) and its cure (day 42; B), was based on bacterial, Mader radiographic<sup>25</sup> and simplified Smeltzer histologic<sup>28</sup> scores.

<sup>a</sup>p = 0.0003 for (G1+G2+G3) vs. (G4+G5),

<sup>b</sup>p = 0.003 for (G1+G2+G3) vs. (G4+G5),

<sup>c</sup>p = 0.0015 for (G1+G2+G3) vs. (G4+G5),

\* The results for day 42 include those for both cured and uncured rabbits.

**FIG. 3. Bacterial count (BC in log<sub>10</sub> CFU/g bone) on day 15, after inoculation with *S. aureus* to generate tibial osteomyelitis in rabbit, and on day 42, after 4 weeks of treatment; comparison with control BC.**

Dt + DCPD 600-1% GEN indicates treatment with Dt plus 600 mg of DCPD-βTCP granules loaded with 6 mg GEN (G1). Dt + PMMA 2% GEN indicates treatment with Dt plus 300 mg of polymethylmethacrylate (PMMA) granules loaded with 6 mg GEN (G2). Dt + DCPD 300-2% GEN indicates treatment with Dt plus 300 mg of DCPD-βTCP granules loaded with 6 mg GEN (G3). The debridement (Dt) group was treated by Dt alone (G4). The control rabbits were inoculated with  $6 \text{ Log}_{10}$  CFU *S. aureus*, but not treated (G5).

**FIG. 4. X-ray evaluation of bone reconstruction and DDS granule behavior in the tibias of rabbits treated and cured with 3 regimens of DDS; comparison with controls.**

All groups treated with granules displayed bone healing (a) (compare F, G and H with A, B and C, respectively). However, in G1 (treated with Dt plus 600 mg DCPD-βTCP granules loaded with 1% GEN) and G3 (Dt plus 300 mg DCPD-βTCP granules loaded with 2% GEN), DCPD-β-TCP granules were partly absorbed (b) and merged with the posterior cortices of the

tibia (c) (F and H), whereas tibias in G2 (treated with Dt plus 300 mg PMMA granules loaded with 2% GEN) did not seem to display absorption, with the granules surrounded by a lucent border (d) (G).

In G4 (treated by Dt only), infection was progressive, with osteotomy pseudarthrosis and diffusion of the infection to the joint (I, compare with D). In G5 (control group), a tendency toward cyst formation was observed (J, compare with E).

### **FIG. 5. Radiographic semi-quantitative evaluation**

Evaluation, on the basis of modified radiographic Norden score<sup>26</sup> (See section: *X-ray examination* in Materials and Methods), for rabbits cured (bacterial count = 0) with Dt + 600 mg dicalcium phosphate- $\beta$ -tricalcium phosphate (DCPD- $\beta$ -TCP) granules loaded with 6 mg gentamicin (GEN) (G1), Dt plus 300 mg of polymethylmethacrylate (PMMA) granules loaded with 6 mg GEN (G2) and Dt + 300 mg DCPD- $\beta$ -TCP granules loaded with 6 mg GEN (G3).

### **FIG. 6. Histologic evaluation of new bone formation (NBF) in rabbits cured of *S. aureus* tibial osteomyelitis at day 42, by treatment with dicalcium phosphate- $\beta$ -tricalcium phosphate (DCPD- $\beta$ -TCP) and polymethylmethacrylate (PMMA) gentamicin (GEN) delivery systems.**

A) NBF (bone ongrowth; Bo) was noted in direct contact with the edge (arrows) of the DCPD- $\beta$ -TCP granules (Gran) ( $\times 40$ ).

B) NBF into the granules (bone ingrowth; large arrows) occurred following the penetration of the granule by a vascular bud ( $\times 100$ ).

In rabbits cured with GEN-PMMA, two modes of healing were observed. C) NBF (Bo) was noted (as with DCPD- $\beta$ TCP), but was separated from the carrier by a layer of fibrosis (Fi) (C;  $\times 100$ ). D) No bone formation was noted; the carrier was surrounded with multinucleated giant cells (GC), indicative of a foreign body reaction (D;  $\times 200$ ).

The dark microgranules (dmg) in figures C and D correspond to the remains (zirconium dioxide) of PMMA granules removed by a decalcification procedure during staining.

### **FIG. 7. X-ray and histologic evaluation in uncured rabbits**

A) Extension of the infection to the diaphyseal zone (arrows).

B) Extension of the infection of the epiphyseal zone (left arrow), with pseudarthrosis of the osteotomy (right arrow).

C) The inflammation observed in these cases extended to the intramedullary canal, sometimes in contact with the carrier: microabscess (arrow) (rabbit of G2).

D) Inflammation infiltrating the epiphyseal cartilage.

**FIG. 8 Genomic DNA typing study, by PFGE.** A single pulsotype was obtained for the 15 strains isolated from rabbits still infected at day 42. This pulsotype was identical to that of the parental strain initially used for inoculation (O). Small-colony variants (SCVs) and strains with a normal phenotype had identical *Sma*I PFGE band patterns. The SCV were G1, G3a, G4a, G4b, G5a, G5b and G5c.

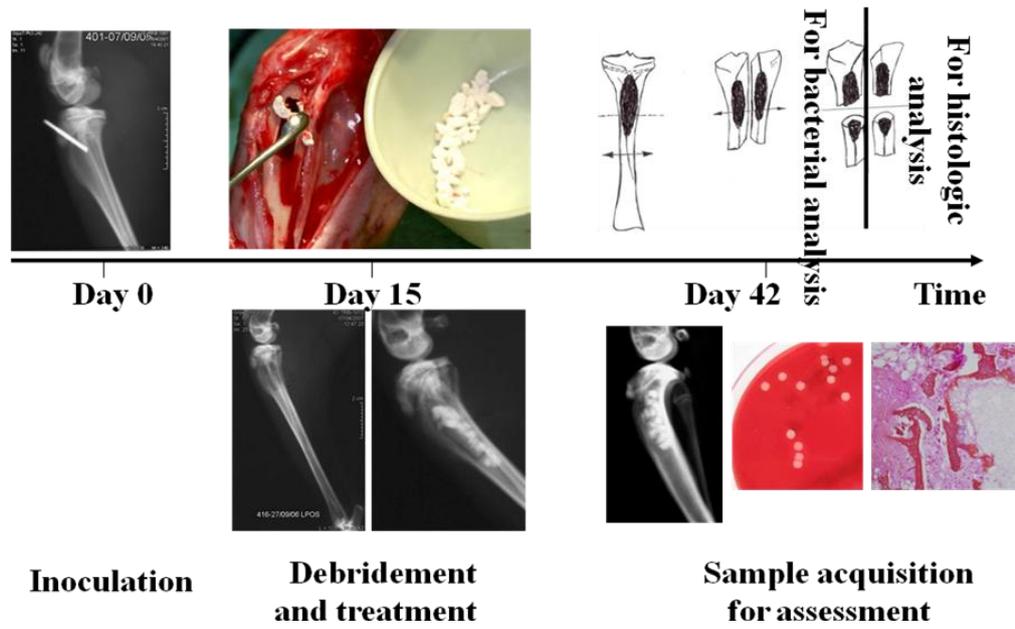


Figure 1

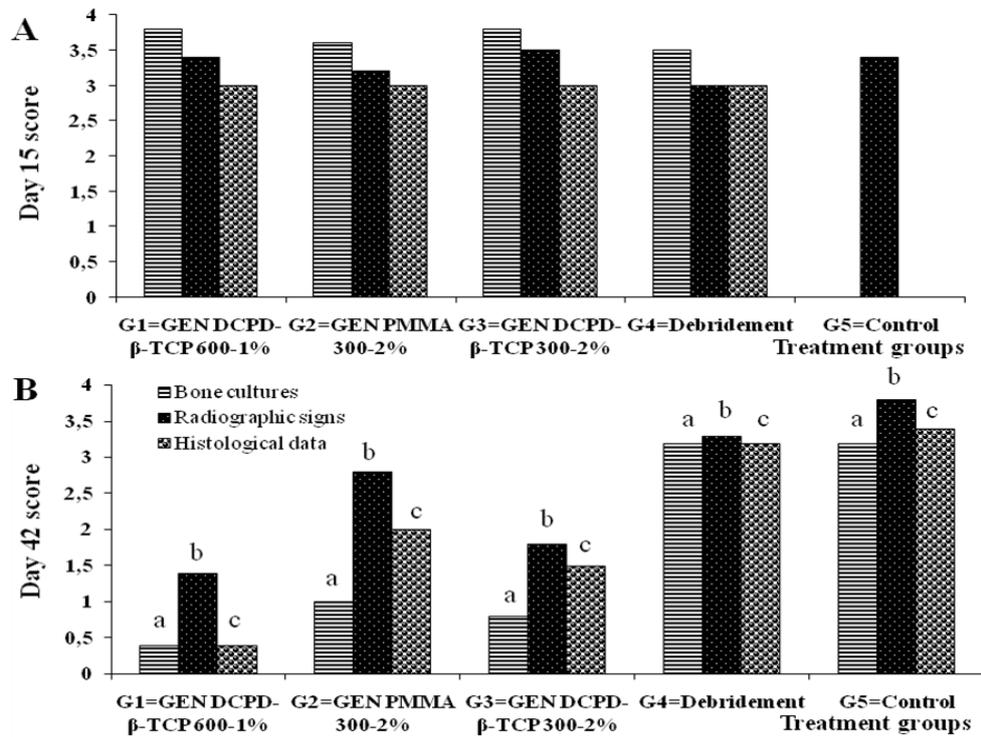


Figure 2

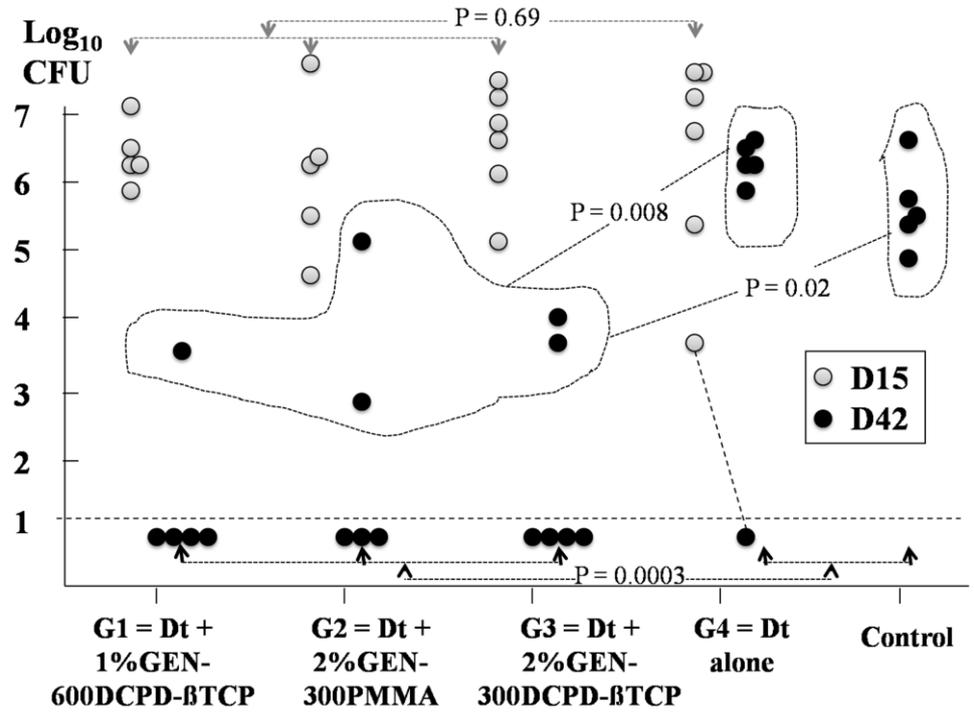


Figure 3



Figure 4

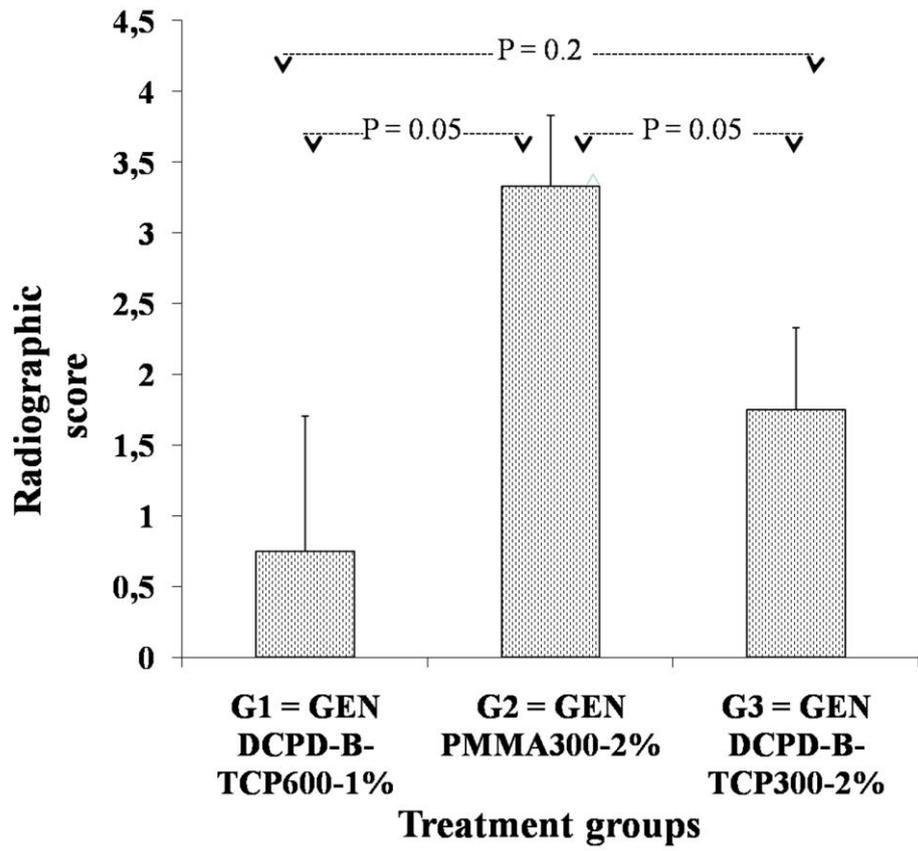


Figure 5

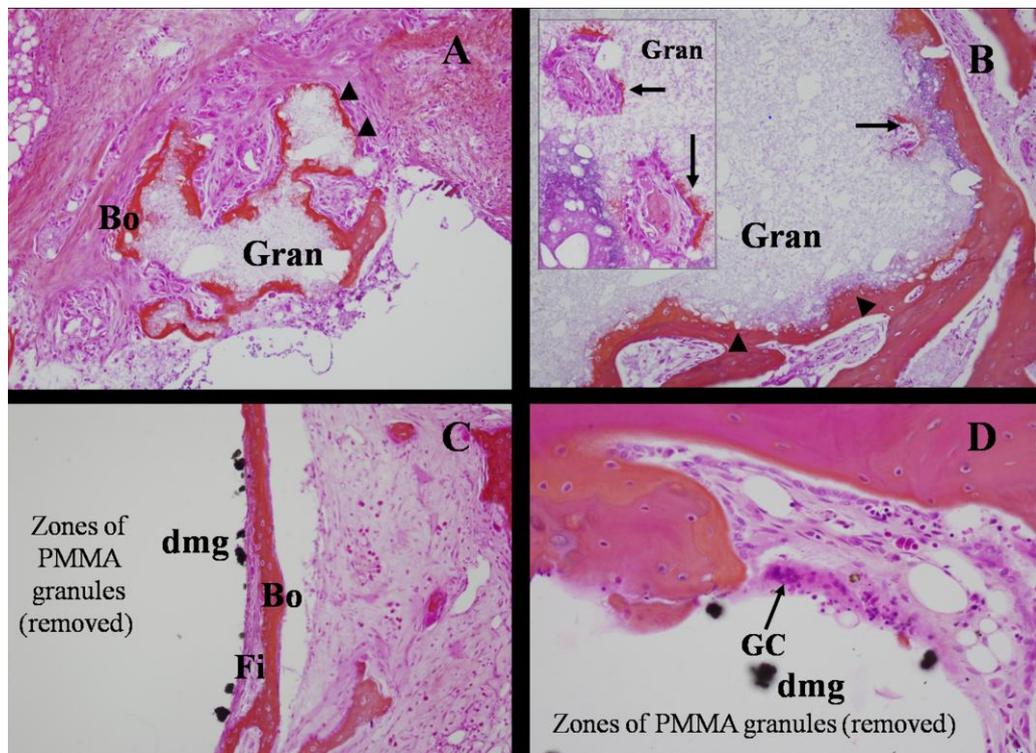


Figure 6

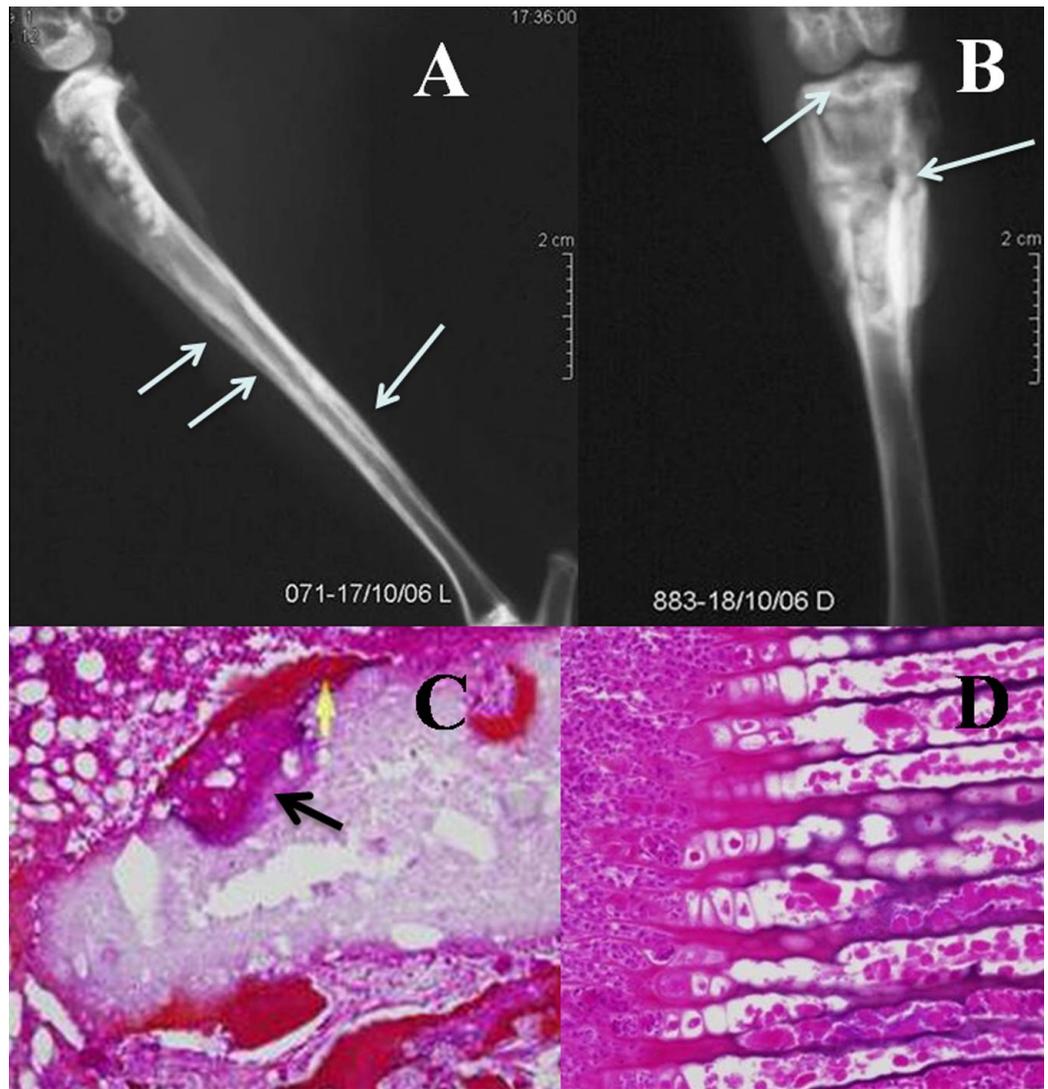


Figure 7

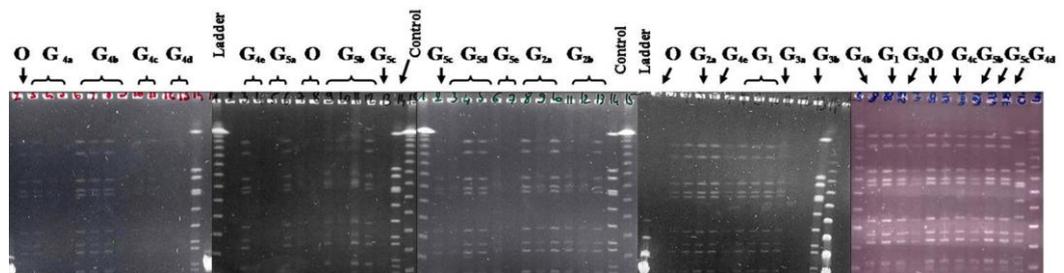


Figure 8

## Z. Discussion de la 3<sup>ème</sup> partie

La reproduction du modèle d'ostéite locale finalisée nous a permis à ce stade de nos recherches de tester les granules biocompatibles et ostéoconducteurs de DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine afin d'évaluer leur efficacité à traiter l'infection osseuse expérimentale. La comparaison qui s'imposait était celle avec le biomatériau vecteur d'antibiotique "standard", le PMMA-gentamicine.

Nous avons utilisé le modèle de Norden modifié avec un inoculum de  $6,2 \pm 0,1 \log_{10}$  UFC d'une souche de *S. aureus* méthicilline sensible provenant d'un patient porteur d'ostéite chronique. L'évaluation radiologique à J15 a permis de randomiser les lapins ayant une infection significative dans des groupes équilibrés.

Nous avons évalué l'efficacité, dans le traitement de l'ostéite expérimentale, du lot 600 mg de granules de DCPD- $\beta$ -TCP chargés de 1% de gentamicine, comparé au lot 300 mg de granules de PMMA chargés de 2% (afin de répondre à la fois à l'exigence d'utiliser un PMMA-gentamicine proche de celui utilisé chez l'Homme -2 à 2,5% de gentamicine- et à celle d'apporter localement chez les groupes d'animaux à comparer la même quantité de gentamicine, 6 mg). Aussi, nous avons, chez un troisième groupe de lapins, implanté après le curetage 300 mg de granules de DCPD- $\beta$ -TCP chargés de 2% de gentamicine. Deux autres groupes servaient de groupes témoins avec un groupe traité par curetage-lavage seul et l'autre groupe laissé sans aucun traitement jusqu'à la fin de l'expérimentation à J42. Les différents groupes de lapins ont été évalués par la radiographie (scores de Mader *et al.*, 2002), la bactériologie (comptes bactériens en log UFC/g d'os pulvérisé) et l'histopathologie (scores de Smeltzer *et al.*, 1997). Nous avons évalué la guérison bactériologique (définie par un compte bactérien égal à 0), la qualité de la reconstruction radiologique. Sur le plan histologique, nous nous sommes intéressés à l'évolution des signes d'infection et d'inflammation et à la qualité de la néo-ostéogenèse. Secondairement, nous avons évalué la qualité de la reconstruction osseuse obtenue avec les deux types de comblement (de la cavité osseuse laissée par le curetage) lâche ou serré, en comparant les reconstructions obtenues dans les groupes 300 mg de DCPD- $\beta$ -TCP-2% gentamicine et 600 mg de DCPD- $\beta$ -TCP-1% gentamicine.

Le traitement par 600 mg de DCPD- $\beta$ -TCP-1% gentamicine a permis de guérir bactériologiquement 4 lapins sur 5. Le 300 mg PMMA-2% gentamicine a permis de guérir 3 lapins sur 5. Le traitement par 300 mg de DCPD- $\beta$ -TCP-2% gentamicine a permis de guérir 4 lapins sur 6. La reconstruction radiologique et la néo-ostéogenèse ont été meilleures avec les granules phosphocalciques de DCPD- $\beta$ -TCP qu'avec le PMMA.

Le comblement serré a donné des meilleures reconstructions osseuses (radiologiques et histologiques) que le comblement lâche.

Le traitement local de l'ostéite expérimentale, par des granules de DCPD- $\beta$ -TCP chargés de faibles doses de gentamicine, a montré son efficacité dans notre modèle chez le lapin. Même si la différence de cette efficacité sur le plan bactériologique, comparée à celle du PMMA-gentamicine testé dans les mêmes conditions, n'est pas statistiquement significative, l'ostéconduction du DCPD- $\beta$ -TCP et sa meilleure biocompatibilité par rapport au PMMA semblent des avantages indéniables comme l'ont montré les qualités de la reconstruction radiologique et histologique obtenues. La résorbabilité du DCPD- $\beta$ -TCP paraît être partielle et nécessite une évaluation avec un plus long recul.

# **DISCUSSION GENERALE**

Nos travaux s'inscrivent dans la thématique des vecteurs d'antibiothérapie locale (« Local Antibiotic Delivery System » ou LADS) pour le traitement des ostéites et ostéomyélites. L'objectif de nos recherches était de tester -afin de le proposer comme alternative au PMMA- un biomatériau vecteur d'antibiotique ostéoconducteur et résorbable capable de traiter l'infection et -en même temps- de favoriser la reconstruction osseuse.

Tous les biomatériaux résorbables, partiellement ou totalement, sont candidats à jouer ce rôle s'ils sont biocompatibles avec le tissu osseux. La faible biocompatibilité des polymères [Bostman *et al.*, 1998; Santavirta *et al.*, 1990; Weiler *et al.*, 2000], les a fait éliminer de notre choix. Les céramiques phosphocalciques sont biocompatibles et excellents ostéoconducteurs [Daculci *et al.*, 1992], mais la difficulté de leur associer l'antibiotique à "la source", conséquence de leur fabrication à très hautes températures (de l'ordre de 1100°C) compromet leur chance de jouer le rôle de vecteur efficace d'antibiotiques. Aussi, la rapide résorption du sulfate de calcium constitue pour nous un obstacle à l'utilisation efficace de ce biomatériau, par ailleurs biocompatible, comme vecteur d'antibiotique. Notre choix s'est porté sur les ciments phosphocalciques (CPCs). En effet, les CPCs sont biocompatibles et ont déjà été utilisés chez l'Homme sous forme de pâte durcissant *in situ* en chirurgie micro-invasive radioguidée. Ils apportent un soutien mécanique dans les fractures sur os ostéoporotique (Calcaneus, radius, tassements vertébraux) [Theiss 2005; Kopylov 2002; Libicher 2006]. Le durcissement de la pâte se fait à 43°C et n'altérerait pas un mélange – d'usage et de reproduction facile – avec l'antibiotique à la fabrication. La résorption de la forme massive du CPC reste cependant superficielle et les échanges se font avec la couche superficielle du ciment sur 2 à 3 mm de profondeur [Livernaux 2003]. Le ratio idéal de la résorption au bon moment n'est pas encore trouvé, mais nous avons pensé que la fabrication du biomatériau LADS sous forme de granules de 2 à 3 mm de diamètre pourrait favoriser cette résorption et par la même occasion favoriser la libération de l'antibiotique et les échanges avec le tissu hôte par l'augmentation de la surface d'échange.

Nous avons choisi le Dicalcium Phosphate Dihydrate- $\beta$ -Tricalcium Phosphate (DCPD- $\beta$ -TCP) sous forme de granules de 2 à 3 mm, et nous lui avons associé la gentamicine. En effet, cet antibiotique, qui couvre les bactéries à *gram positif* (dont le *staphylocoque aureus*,) et les bactéries à *gram négatif*, a fait ses preuves en tant que traitement local lorsqu'il était associé avec d'autres biomatériaux vecteurs dont le PMMA [Adams *et al.*, 1992; Baro *et al.*, 2002; Bertazoni *et al.*, 2004; Buchholz *et al.*, 1981; Calhoun et Mader, 1989; Dahners et Funderburk, 1987; Jenny et Taglang, 1979; Klemm, 1988; Mendel *et al.*, 2005; Nelson *et al.*, 1993; Schneiders *et al.*, 2006; Stallmann *et al.*, 2004; Sulo, 1993; Wahlig *et al.*, 1984;

Walenkamp *et al.*, 1998]. La toxicité de la gentamicine est principalement rénale, liée à la persistance de concentrations supérieures à un seuil et/ou à un effet cumulatif de l'antibiotique. Une ototoxicité peut également apparaître pour des expositions élevées. Ainsi, en utilisation systémique, le schéma optimal d'administration des aminosides repose sur des doses unitaires élevées, administrées avec un intervalle permettant une élimination suffisante. Le traitement est en général de 7 jours pour limiter le risque d'accumulation. L'éluion de fortes concentrations initiales de gentamicine par le DCPD- $\beta$ -TCP telle que nous l'avons montré *in vitro* (Table 1, Article 1) nous a ramené à nous poser la question de la toxicité de l'effet cumulatif local qu'aurait la gentamicine sur les cellules osseuses – décrit avec d'autres aminosides – et de son éventuelle toxicité générale par diffusion systémique. Les études préliminaires aux essais thérapeutiques expérimentaux nous ont permis, en plus de la confirmation de la biocompatibilité et de l'ostéoconduction du DCPD- $\beta$ -TCP chargé de gentamicine, de répondre à ces questions: la gentamicine n'était pas toxique localement et les passages sanguins étaient faibles et brefs. Mais, s'agit-il d'un LADS efficace (pour traiter l'infection) malgré une faible charge initiale en antibiotique? La réponse était oui, puisque l'antibiotique élué *in vitro* n'a pas perdu son efficacité (activité antistaphylococcique conservée sur gélose au sang) et les résultats *in vivo* chez l'animal confirmaient cette efficacité à éradiquer l'ostéite expérimentale à *S. aureus*, au moins de façon égale à celle du PMMA-gentamicine. De plus, les concentrations de charge -du biomatériau en antibiotique- que nous avons testé dans nos expérimentations sont équivalentes à celles utilisées habituellement dans l'association du composé PMMA-gentamicine commercialisé (Septopal®). Ces concentrations avaient fait la preuve de leur efficacité en clinique, confirmant le bien fondé de l'utilisation de l'antibiothérapie locale comme stratégie thérapeutique [Wahlig et Dingledein, 1980; Walenkamp *et al.*,]. L'utilisation du PMMA chargé de gentamicine ou de tobramycine pendant près de 40 ans après son avènement par Buchholz (1970) démontre bien la "judiciosité" de ce choix [Buchholz 1976; Wahlig 1980; Klemm 1988; Ostermann 1995 Walenkamp 1998- Nijhof 2001; Jiranek 2006; McLaren 2008, Crawford 2006, Sterling 2003)]. Ce choix stratégique est confirmé ici par nos expérimentations *in vitro* et *in vivo*. Les expérimentations de deux lots *in vitro* et *in vivo* de 300 et 600 mg de granules ont permis de démontrer que 600 mg de granules de DCPD- $\beta$ TCP chargés de 1 % de gentamicine éluait plus d'antibiotique (du 6<sup>ème</sup> au 42<sup>ème</sup> de l'expérimentation) que 600 mg de granules de DCPD- $\beta$ TCP chargés de 2 % et de 3 % de gentamicine. Ce résultat, pouvant sembler paradoxal, a été confirmé à plusieurs reprises. Aussi, 600 mg de granules de DCPD- $\beta$ TCP chargés de 1 % de gentamicine éluait plus d'antibiotique que 300 mg de granules de DCPD- $\beta$ -TCP chargés de 2

% de gentamicine et ce dès la douzième heure (Table 1, Article 1), alors que la charge initiale en antibiotique est la même pour les deux lots (6 mg). C'est vraisemblablement l'effet de l'augmentation de la surface d'échange qui explique ce phénomène, mais aussi d'autres phénomènes physico-chimiques d'effet seuil, tel que rapporté par Bohner *et al.* (1997). Au-delà d'une certaine concentration, les liaisons antibiotique-biomatériau sont irréversibles et l'élution se fait moins avec les fortes concentrations qu'avec les faibles concentrations en antibiotique. Cet effet, utile pour l'augmentation de l'efficacité anti-infectieuse, va se révéler être efficace pour la reconstruction osseuse et pour l'inocuité du biomatériau vecteur. En effet, le comblement des cavités osseuses *in vivo* dit "serré" a montré une meilleure reconstruction osseuse par ostéoconduction que le comblement "lâche". Le faible dosage en gentamicine DCPD-β-TCP-1% qui éluait *in vitro* moins d'antibiotique aux premières heures que les dosages 2 % et 3 % (Table 1, Article 1) serait le moins toxique. En effet, la gentamicine est détectée *in vivo* uniquement à ces premières heures (de relargage massif de l'antibiotique) (Tableaux E et F). La cinétique de relargage de gentamicine, observée lors de nos expérimentations, paraît être plus favorable que celle rapportée dans d'autres travaux avec d'autres aminosides [Ambrose *et al.*, 2003; Naraharietti *et al.*, 2006]. La forte élution initiale de l'antibiotique retrouvée *in vitro* pendant les 7 premiers, avec des concentrations supérieures à 10×CMI du germe visé pour le DCPD-βTCP 600-1 %, a été confirmée indirectement par l'efficacité antibactérienne *in vivo*, même si elle n'a pas pu être dosée directement *in vivo*. En effet, le dosage local *in vivo*, réalisé chez le cochon par une technique dite de microdialyse, reste peu reproductible chez l'animal et ne peut être actuellement utilisée chez l'Homme [Stolle *et al.*, 2003]. L'élution locale de gentamicine, dans un espace restreint et relativement clos "cavité ostéitique après curetage", s'accompagne de concentrations localement très élevées et qui persisteront probablement pendant un temps assez long du fait d'une élimination lente (faible irrigation du tissu scléreux de l'ostéite qui est à l'origine de l'inefficacité du traitement systémique). En revanche, la faible diffusion systémique, de l'antibiotique administré localement, confirmée *in vivo*, limite considérablement les risques de toxicité rénale ou auditive.

Après le choix, par l'étude *in vitro*, du DCPD-βTCP 600-1 %, et après la validation de la biocompatibilité, de l'ostéoconduction et de l'absence de toxicité *in vivo* du DCPD-βTCP-gentamicine, nous avons pu valider, avant de tester l'efficacité thérapeutique de notre biomatériau vecteur, un modèle d'ostéite localisée en accord avec les affirmations de An *et al.* (2006) et avec les données de la littérature. L'inoculum optimal était de optimal de 6 Log<sub>10</sub> UFC pour *S. aureus* [Ambrose *et al.*, 2004; Gürsel *et al.*, 2001; Mader *et al.*, 2002; Rutledge

*et al.*, 2003]. La souche bactérienne provenait d'un patient porteur d'ostéite chronique. L'intervalle de temps optimal de la période inoculation-diagnostic et traitement était de 2 semaines [Calhoun et Mader 1997; Dahners et Funderburk, 1987; Mader et al., 2002; Rutledge, 2003; Shirliff *et al.*, 2002; Sasaki et Ishii, 1999]. Au bout de ce délai, nous avons obtenu une infection nette radiologiquement et plus fiable bactériologiquement. L'infection était localisée dans 3 cas sur 4 au tibia proximal. La caractérisation histopatologique de l'infection obtenue nous a révélé une constance de la présence de lésion aigüe centrale constituée par un abcès, entouré en périphérie de lésions subaigües, puis chroniques lymphoplasmocytaires. Ces lésions périphériques étaient une réaction à la présence du produit sclérosant destiné à optimiser le modèle, par la création de nécrose tissulaire faisant le lit de l'infection expérimentale. La prolongation de la période inoculation-diagnostic et traitement à 6 semaines n'aboutit pas forcément à une ostéite chronique exclusive. Sur le plan morphologique, nous avons affiné la classification radiologique de Mader *et al.* (2002) pour proposer une classification radiologique ne retenant que l'ostéite localisée, plus adaptée aux essais des traitements locaux.

Enfin, une fois notre modèle validé, nous l'avons reproduit à nouveau pour tester notre nouveau biomatériau DCPD- $\beta$ TCP-gentamicine, que nous avons comparé au classique PMMA-gentamicine. Même s'il n'y avait pas de supériorité statistiquement significative, sur le plan strictement bactériologique, du DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine 1 % par rapport au PMMA-gentamicine 2% à traiter l'infection osseuse expérimentale, l'évolution clinique, radiologique et histologique faisait pencher la balance du côté du DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine. La forme granule du DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine 1%, qui présente une cinétique d'éluion de l'antibiotique *in vitro* meilleure que celle du CPC testé sous forme de cylindre [Stalman *et al.*, 2003], a prouvé aussi son efficacité anti-infectieuse. Cette efficacité semblait se faire par contact direct des granules avec les niches bactériennes qui caractérisent l'infection avec fibrose et séquestres. Le curetage "carcinologique" des cavités infectées, puis leur comblement adéquat, permis par la forme granule, assure un effacement des espaces morts qui contribue à un contrôle optimal de l'infection et à une reconstruction osseuse de bonne qualité. En effet, la réalisation d'un véritable plombage de la cavité à traiter (comblement serré) -par un biomatériau chargé d'antibiotique et utilisé sous forme de granules- permet de traiter l'infection tout en améliorant l'ostéoconduction. Les interstices entre les granules se comportant comme des macropores; permettent d'améliorer la reconstruction de la lyse osseuse associée à l'infection. Le comblement des cavités osseuses, même étendues, serait alors possible sans la crainte d'une éventuelle toxicité générale de l'antibiotique apporté

localement. Nous avons montré à plusieurs étapes de nos expérimentations que le passage systémique de la gentamicine, implanté en tissu osseux (portée par les granules de DCPD- $\beta$ -TCP), était non significatif.

Restera à prouver pour le DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine sa résorbabilité et sa tolérance à long terme, et l'absence de récurrence infectieuse. Ceci n'est possible que par la réalisation d'études expérimentales animales au plus long recul. Ces études sont possibles, mais nécessitent un investissement important, non seulement en Hommes et en matériel, mais aussi en passant par une motivation et une valorisation des chercheurs. Ceci étant dit, nous pensons que même si la résorption de ce biomatériau n'est pas totale, ses propriétés de biocompatibilité et d'ostéoconduction lui permettent d'être ostéo-intégrable et de jouer parfaitement son rôle de vecteur d'antibiotique pouvant être laissé *in situ*.

Au total, le DCPD- $\beta$ -TCP, faiblement chargé de gentamicine (1%) et utilisé sous forme de granules, est un biomatériau vecteur qui a montré son efficacité à traiter localement l'infection osseuse expérimentale à *S. aureus* chez le lapin. Son utilisation dans des essais cliniques chez l'Homme nous paraît justifiée.

# **CONCLUSION FINALE ET PERSPECTIVES D'AVENIR**

Les granules de DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine 1% pourraient donc être utilisés en clinique pour traiter les infections osseuses associées à des pertes de substance osseuse.

Les avantages attendus seraient de constituer une alternative au PMMA-gentamicine. Le nouveau biomatériau étant phosphocalcique, proche de la constitution chimique du minéral osseux et donc biocompatible et bioactif. Ce sont ces qualités qui lui permettront une bonne ostéointégration au tissu osseux chez l'Homme. De plus, sa résorbabilité progressive lui permettrait de délivrer son principe actif, tout en permettant, ou en facilitant, par son effet ostéconducteur, la régénération osseuse.

Si l'efficacité et la tolérance à long terme du DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine se confirmaient, les conséquences attendues, avec son utilisation dans la prise en charge de l'ostéite et de l'ostéomyélite sont considérables :

- Eradication d'une infection, habituellement difficile à traiter par l'antibiothérapie systémique en raison de la mauvaise diffusion de celle-ci dans le tissu osseux scléreux.
- Prévention de la résistance bactérienne par un traitement antibiotique agissant localement, d'emblée efficace et de relative courte durée. Ceci sous entend un curetage efficace, avec excision des séquestres, suivi d'un apport des granules chargés d'antibiotiques au contact direct des "niches" de l'infection.
- Possibilité de comblement des pertes de substance osseuse, liées à l'infection et/ou secondaires au curetage des lésions, aussi larges que possible, par un biomatériau phosphocalcique, vecteur d'antibiotique en même temps que facilitateur de la cicatrisation osseuse, sans crainte de toxicité locale ou systémique.
- Economie d'une deuxième intervention et probablement à terme, si l'efficacité de l'antibiothérapie locale seule est prouvée, économie d'une antibiothérapie systémique (ou au moins raccourcissement de sa durée).
- Des économies substantielles peuvent également être réalisées par le raccourcissement de la durée d'alitement et des hospitalisations, par la réduction d'utilisation du consommable lié à l'antibiothérapie systémique (perfusions, cathéters, antibiotiques injectables...), sans oublier le gain psycho-social pour le patient et son entourage.

Ces premiers résultats obtenus dans cette étude expérimentale sont encourageants et incitent à tester ce vecteur d'antibiothérapie locale dans certaines indications chez l'Homme, notamment celles concernant le traitement curatif des ostéites et ostéomyélites localisées.

# **BIBLIOGRAPHIE GLOBALE**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Adams K, Couch L, Cierny G, Calhoun J, Mader JT. *In vitro* and *in vivo* evaluation of antibiotic diffusion from antibiotic impregnated polymethylmetacrylate beads. *Clin Orthop* 1992;278:244-52.
2. Agrawal AC, Jain S, Jain RR, Raza HKT. Pathogenic bacteria in orthopaedic hospital in India. *J Infect Developing Countries* 2008;2:120-3.
3. Ambrose CG, Clyburn TA, Loudon K, Joseph J, Wright J, Gulati P, Gogola GR, Mikos AG. Effective treatment of osteomyelitis with biodegradable microspheres in a rabbit model. *Clin Orthop Relat Res* 2004; 421:293-9.
4. An YH, Friedman RJ. Prevention of sepsis in total joint arthroplasty. *J Hosp Infect* 1996;33:93-108.
5. An YH, Stuart GW, McDowell S, McDaniel S, Kang Q, Friedman RJ. Prevention of bacterial adherence to implant surfaces with a cross-linked albumin coating *in vitro*. *J Orthop Res* 1996;14:846-9.
6. An YH, Friedman RJ. Animal models of orthopaedic implant infection. *J Invest Surg* 1998;11:139-46.
7. An YH, Kang QK, Arciola CR. Animal Models of OM. *Int J Artif Organs*. 2006;29:407-20.
8. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother* 2001;48,suppl 1:5-16.
9. Andriole VT, Nagel DA, and Southwick WO. Chronic staphylococcal osteomyelitis: An experimental model. *Yale J Biol Med* 1973;1:33-39.
10. Apelt D, Theiss F, El-Warrak AO, Zlinszky K, Bettschart-Wolfisberger, Bohner M, Matter S, Auer JA, Von Rechenberg B. *In Vivo* behaviour of three different injectable hydraulic calcium phosphate cements. *Biomaterials* 2004;25:1439-51.
11. Archdeacon MT, Messerschmitt P. Modern Papineau technique with vacuum-assisted closure. *J Orthop Trauma* 2006;20:134-7.
12. Arens S, Schlegel U, Printzen G, Ziegler WJ, Perren SM, Hansis M. Influence of materials for fixation implants on local infection. An experimental study of steel versus titanium DCP in rabbits. *J Bone Joint Surg Br* 1996;78:647-51.
13. Arnold SR, Elias D, Buckingham SC, Thomas ED, Novias E, Arkader A, Howard C. Changing patterns of acute hematogenous osteomyelitis and septic arthritis: emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Pediatr Orthop* 2006;26:703-8.
14. Atkins B, Gottlieb T. Fusidic acid in bone and joint infections. *Int J Antimicrob Agents* 1999;12 suppl2:S79-93.
15. Aubry DA, Jenkins NJ, Morgan WP, et al. The use of gentamicin-PMMA chains in abdominal surgery: A pilot study of prophylaxis against wound infection. *Pharmatherapeutica* 1986;4:536-40.
16. Bajpai PK., Benghuzzi HA. Ceramic systems for long-term delivery of chemicals and biologicals. *J Biomed Mater Res* 1988; 22:1245-66.
17. Baker AS, Greenham LW. Release of gentamicin from acrylic bone cement. *J Bone joint Surg Am* 1988;70:1551.
18. Baro M., Sanchez E. et al. In Vitro-in vivo characterization of gentamicin bone implants. *J. Controlled Release* 2002; 83:353-64.
19. Barroug A, Glimcher M J. Hydroxyapatite crystals as a local delivery system for cisplatin: adsorption and release of cisplatin in vitro. *J Orthop Res* 2002;20:274-80.
20. Basle MF, Chappard D, Grizon F, Filmon R, Delecric J, Daculsi G, Rebel A. Osteoclastic resorption of Ca-P biomaterials implanted in rabbit bone. *Calcif Tissue Int* 1993;53:348-56.
21. Beaman FD, Bancroft LW, Peterson JJ, Kransdorf MJ. Bone graft materials and synthetic substitutes. *Radiol Clin North Am*. 2006;44:451-61.
22. Belmatoug N, Cremieux AC, Bleton R, Volk A, Saleh-Mghir A, Grossin M, Garry L and Carbon C. A new model of experimental prosthetic joint infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A microbiologic, histopathologic, and magnetic resonance Imaging characterization. *J Infect Dis* 1996;174:414-7.
23. Benjamin J, Engh G, Parsley B, Donaldson T, Coon T. Morselized bone grafting of defects in revision total knee arthroplasty. *Clin Orthop* 2001;392:62-7.
24. Benoît MA., Mousset B., Delloye C., Bouillet R., Gillard J. Antibiotic-loaded plaster of Paris implants coated with polylactide-coglycolide as a controlled release delivery system for treatment of bone infections. *Int Orthop* 1997;21:403-8.

25. Berbari EF, Hanssen AD, Duffy MC, Steckelberg JM, Ilstrup DM, Harmsen WS, Osmon DR. Risk factors for prosthetic joint infection: Case-control study. *Clin Infect Dis* 1998;27:1247-54.
26. Bertazoni Minelli E, Benini A, Magnan B, Bartolozzi P. Release of gentamicin and vancomycin from temporary human hip spacers in two-stage revision of infected arthroplasty. *J Antimicrob Chemother* 2004;53:329-34.
27. Besnier JM. Modes de contamination et techniques de prevention. In *Prévention des infections en chirurgie orthopédique et traumatologique. Guide Tirésias*. Ed. 2001, Paris;1:35-40.
28. Besnier JM. Critères pour le diagnostic d'une infection sur prothèse. In *Diagnostic de l'infection sur prothèse articulaire. Guide Tirésias*. Ed. 2002, Paris;2:47-52.
29. Blomgren G. Hematogenous infection of total joint replacement. *Acta Orthop Scand* 1981;52-suppl 187:7-64.
30. Bohner M, Le maître J, Van landuy TP. et al. Gentamicin-loaded hydraulic calcium phosphate bone cement as antibiotic delivery System. *J. Pharm. Sci* 1997; 86:565-72.
31. Bohner M, Le maître J, Merkle HP, Gander B. Control of gentamicin release from calcium phosphate cement by admixed poly(acrylic acid). *J. Pharm. Sci* 2000;89:1262-70.
32. Bohner M, Lemaitre J. Can bioactivity be tested *in vitro* with SBF solution? *Biomaterials* 2009;30:2175-9.
33. Boone DW. Complications of iliac crest graft and bone grafting alternatives in foot and ankle surgery. *Foot Ankle Clin* 2003;8:1-14.
34. Böstman O et al. Osteolytic changes accompanying degradation of absorbable fracture fixation implants *J Bone Joint Surg Br* 1991;73:679-82.
35. Böstman O et al. Osteoarthritis of the ankle after foreign-body reaction to absorbable pins and screws. Three to nine follow up study. *J Bone Joint Surg Br* 1998;80:333-8.
36. Bouillet R, Bouillet B, Kadima N. Traitement de l'ostéomyélite chronique en milieu Africain par implants de plâtre imprégnés d'antibiotiques. *Acta Orthop Belg* 1989;55:1-11.
37. Bourne RB. Prohyalactic use of antibiotic bone cement. An Emerging standard-The affirmative. *J Arthroplasty* 2004;19:suppl 1:69-72.
38. Bowen TR, Widmaier JC. Host classification predicts infection after open fracture. *Clin Orthop Relat Res* 2005;433:205-11
39. Boyde A, Corsi A, Quarto R, Cancedda R, and Bianco P. Osteoconduction in large macroporous hydroxyapatite ceramic Implants: Evidence for complementary integration and disintegration mechanism. *Bone* 1999;24:579-89.
40. Brady RA, Leid JG, Camper AK, Costerton JW, Shirtliff ME. Identification of *staphylococcus aureus* protein recognized by the antibody-mediated immune response to biofilm infection. *Infect Imm* 2006;74:3415-26.
41. Bransu D, Roux F, Loty B, Laccourreye H. Le corail: un nouveau procédé de reconstruction craniofaciale. *Ann Oto-Laryng* 1988;105:431-33.
42. Brouard S, Lelan J, Lancien G, Thomazeau H et Langlais F. Phosphate tricalcique, vecteur d'antibiotique : gentamicine et vancomycine. Caractérisation physicochimique *in vitro*, étude de la porosité du biomatériau et du relargage de la gentamicine et de la vancomycine. *Chirurgie* 1997;122:397-403.
43. Buchholz HW, and Engelbrecht H. Über die depotwirkung einiger antibiotica bei vermischung mit dem kunstharz Palacos. *Chirurg* 1970;41:511-15.
44. Buchholz HW, and Gartmann HD. Infektionsprophylaxe und operative behandlung der schleichenden tiefen infektion bei der totalen endoprothese. *Chirurg* 1972;43:446-53.
45. Buchholz HW, Elson RA, Engelbrecht E, Lodenkamper H, Rottger J, and Siegle A. Management of deep infection of total hip replacement. *J Bone Joint Surg Br.* 1981;63:342-53.
46. Buranapanitkit B., Srinilta V. et al. The efficacy of a hydroxyapatite composite as a biodegradable antibiotic delivery system. *Clin Orthop* 2004;424:244-52.
47. Buret A, Ward KH, Olsen ME, Costerton JW. An *in vivo* model to study the pathobiology of infectious biofilms on biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res.* 1991;25:865-74.
48. Cafferkey MT, Hone R, Falkiner FR, Keane CT, Pomeroy H. Gentamicin and methicillin resistant staphylococcus aureus in Dublin hospitals. Clinical and Laboratory studies. *J Med Microbiol* 1983;16:117-27.

49. Calhoun JH, Mader JT. Antibiotic beads in the management of surgical infections. *Am J Surg* 1989;157:443-9.
50. Calhoun JH, and Mader JT. Treatment of osteomyelitis with biodegradable antibiotic implant. *Clin Orthop Relat Res* 1997;341:206-14.
51. Campoccia D, Montanaro L, Arciola CR. The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. *Biomaterials* 2006;27:2331-9.
52. Caron F, Humbert G. Aminoglycosides. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale Maladies Infectieuses (Paris)*;1992;8208-A10: 9 pages.
53. Carroll JD, Pomeroy HM, Russell RJ, Arbuthnott JP, Keane CT, McCormick OM, Coleman DC. A new methiciline -and gentamicin- resistant *staphylococcus aureus* in Dublin: Molecular genetic analysis. *J Med Microbiol* 1989;28: 15-23.
54. Cevher E, Orhan Z, Mülazimoglu L, Sensoy D, Alper M, Yildiz A, Özsoy Y. Characterization of biodegradable chitosan microspheres containing vancomycin and treatment of experimental osteomyelitis caused by methicillin-resistant *S. aureus* with prepared microspheres. *Int J Pharm* 2006;371:127-35.
55. Cheattle MD. The effect of chronic orthopedic infection on quality of live. *Orthop Clin North Am* 1991;22:539-47.
56. Cheng H, Jiang W. Osteogenic activity of fourteen types of Human Bone Morphogenetic Proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am* 2003;85:1544-52.
57. Chiu FY, Chen CM, Lin CF, Lo WH. Cefuroxime-impregnated cement in primary total knee arthroplasty: a prospective randomized study of three hundred and forty knees. *J Bone Joint Surg Am.* 2002;84:759-62.
58. Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beacheyand EH. Experimental infections in mice challenged with slime-producing staphylococcus epidermidis. *Infect Immun* 1983;40:407-10.
59. Cierny G, Mader JT, Penninck JJ. A clinical staging system for adult osteomyelitis. *Contemp Orthop* 1985; 10 (5): 17– 37.
60. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. 2005. Concentrations, diamètres critiques et règles de lecture interprétative pour le *Staphylococcus* spp. 33-35. Société Française de Microbiologie. Créteil. – <http://www.sfm.asso.fr/>.
61. Compaoré NI. L'infection osseuse. A propos de 154 cas. Thèse de Médecine. Marrakech 2009; n°44: 99 pages.
62. Coombs RR. Fusidic acid in staphylococcal bone and joint infection. *J Antimicrob Chemother* 1990;25 supplB:53-60.
63. Cornell CN, Tyndall D, Waller S, et al. Treatment of experimental osteomyelitis with antibiotic-impregnated bone graft substitute. *J Orthop Res* 1993;11:619-626.
64. Court-Brown CM, Wheelwright EF, Christie J, McQueen. External fixations for type III open tibial fractures. *J Bone Joint Surg Br* 1990;72:801-4.
65. Crane LR, Kapdi CC, Wolfe JN, Silberberg BK, Lemer AM. Xeroradiographic, bacteriologic, and pathologic studies in experimental *Staphylococcus* osteomyelitis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1977; 156:303-14.
66. Dacquet V, Varlet A, Tandogan RH, Tahon M, Fournier L, Jehl F, Monteil H, Bascoulegue G. Antibiotic-impregnated plaster of Paris beads. Trials with teicoplanin. *Clin Orthop* 1992;282:241-9.
67. Daculsi G. Physico-chemical and ultrastructural analysis of bone bioactive ceramics interface. *Biomat Tissue Int* 1992;10:299-304.
68. Dahnert LE, Funderburk CH. Gentamicin-loaded Plaster of Paris as a Treatment of Experimental Osteomyelitis in Rabbits. *Clin Orthop.* 1987; 219: 278–82.
69. Darouiche RO. Treatment of infections associated with surgical implants. *N Eng J Med.* 2004;350:1422-29.
70. Delacambe B, Duquesnoy B. Mycoses osseuses et articulaires. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale. Appareil Locomoteur (Paris)*;1985;14020-A10: 7 pages.
71. Delecrin J, Aguado E, Nguyen GM, Pyr  D, Royer G, Passuti N. Influence of local environnement on incorporation of ceramic for lumbar fusion. *Spine* 1997;22:1683-9.
72. Delecrin J., Takahashi S. Et al. A synthetic Ceramic as a Bone Graft Substitutie in the Surgical Management of Scoliosis. A Prospective, Randomised Study. *Spine* 2000; 25, 5: 563 – 569.

73. Dellamonica P, Lortat-Jacob A. In: Tirésias Volume 2. Diagnostic de l'infection sur prothèse articulaire: Imagerie 2002;3:25-37.
74. Delloye C, Sedel L. Matériaux d'origine biologique. In: Biomatériaux de substitution de l'os et du cartilage. Passuti N. Cah Enseig SOFCOT 1997;57:25-36.
75. De Peretti F. Utilisation du corail en chirurgie orthopédique In: Biomatériaux de substitution de l'os et du cartilage. Passuti N. Cah Enseig SOFCOT 1997;57:37-41.
76. Desplaces N. Antibio prophylaxie en chirurgie osseuse. In Prévention des infections en chirurgie orthopédique et traumatologique. Guide Tirésias. Ed. 2001, Paris;1:41-54.
77. Dich VQ, Nelson JD, Haltalin AK, Osteomyelitis in infants and children: a review of 163 cas. Am J Dis Child 1975;129:1273-8.
78. DiCicco M, Duong T, Chu A, Jansen A. Tobramycin and gentamycin elution analysis between two in situ polymerizable orthopedic composites. J Biomed Mater Res Part B: Applied Biomater 2003;65:137-49.
79. Diefenbeck M, Mükley T, Hofmann G. Prophylaxis and treatment of implant-related infections by local application of antibiotics. Injury. 2006;37:S95-S104
80. Doadrio JC, Arcos D, Cabanas M, Vallet-Regi M. Calcium sulphate-based cements containing cephalexin. Biomaterials 2004;25:2629-35.
81. Dombrowski JC, Winston LG. Clinical failures of appropriately-treated methicillin-resistant *staphylococcus aureus* infections. J Infect 2008;57:110-15.
82. Doury P. Manifestations osseuses et articulaires des affections parasitaires. Encyclopédie Médico-Chirurgicale. Appareil Locomoteur (Paris);1985;14021-A10: 9 pages.
83. Eitenmuller J, Schmidt, KH, Peters G, Gellissen G, Weltin R, Reichmann W. Experimental and preliminary clinical experience with absorbable calcium phosphate granules containing an antibiotic or antiseptic for the local treatment of osteomyelitis. J Hosp Infect 1985;6(suppl):S177-84.
84. El Asri MO, Thomas JR, Skinner RA, Blevins JS, Beenken KE, Nelson CL, Smeltzer MS. Staphylococcus aureus collagen adhesion contributes to the pathogenesis of osteomyelitis. Bone 2002;30:275-80.
85. EMIT® 2000 Gentamicin Plus Assay. 2004. Actualized informations. Dad Behring Inc. Melton Keynes :1-4.
86. Emslie KR, Ozanne NR, Nade SM. Acute hematogenous osteomyelitis: an experimental model. J Pathol 1983;141:157-6.
87. Engesaeter LB, Lie SA, Espehaug B, Furnes O, Vollset SE, Havelin LI. Antibiotic prophylaxis in total hip arthroplasty: effects of antibiotic prophylaxis systemically and in bone cement on the revision rate of 22170 primary hip replacements followed 0-14 years in the Norwegian Arthroplasty Register. Acta Orthop Scand 2003;74:644-51.
88. Epersen F, Wilkinson BJ, Gahrn-Hansen B, Rosdahl VT, Skinhoj P. Experimental foreign body infection in mice. J Antimicrob Chemother 1993;31-suppl D:103-11.
89. Ethell MT, Bennett A, Brown MP, Meritt K, Davidson JS and Tran T. In vitro elution of gentamicin, amikacin and ceftiofur from polymethylmetacrylate and hydroxyapatite cement. Veterinary Surg 2000. 29:375-82.
90. Faber C, Stallmann HP, Lyaruu DM, Joosten U, Von Eiff C, Amerongen AVN, Wuisman PIJM. Comparable efficacies of the antimicrobial peptide human lactoferrin 1-11 and gentamicin in a chronic methicillin-resistant *staphylococcus aureus* osteomyelitis model. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:2438-44.
91. Fang YH, Hsueh PR, Hu JJ, Lee PI, Chen JM, Lee CY, Huang LM. Community- acquired methicillin-resistant *staphylococcus aureus* in children in northern Taiwan. J Microbiol Immunol Infect 2004;37:29-34.
92. Ferraz MP, Mateus AY, Sousa JC, Monteiro FJ. Nanohydroxyapatite microspheres as delivery system for antibiotics: release kinetics, antimicrobial activity, and interaction with osteoblasts. J Biomed Mater Res A 2007;81:994-1004.
93. Fitzgerald RH Jr. Experimental osteomyelitis: description of canine model and the role of depot administration of antibiotics in the prevention and treatment of sepsis. J Bone Joint Surg Am 1983;65:371-80.
94. Fitzgerald RH Jr, Ruttle PE, Arnold PG, Kelly PJ, Irons GB. Local muscle flaps in the treatment of chronic osteomyelitis. J Bone Joint Surg Am. 1985;67:175-85.

95. Frayssinet P, Gineste L, Conte P, Fages J, Roupuet N. Short-term implantation effects of a DCPD-based calcium phosphate cement. *Biomaterials* 1998;19:971-977.
96. Friedlaender GE. Bone allograft: the biological consequences of immunological events. *J Bone Joint Surg Am* 1991;73:1119-22.
97. Frykman GK, Leung VC. Free vascularized flaps for lower extremity reconstruction. *Orthopedics* 1986;9:841-8.
98. Fujimura S, Sato T, Kikuchi T, Zaini J, Gomi K, and Watanabe A. Efficacy of clarithromycin plus vancomycin in mice with implant-related infection caused by biofilm-forming *Staphylococcus aureus*. *J Orthop Sci* 2009;14:658-61.
99. Fukushima N, Yokoyama K, Sasahara T, Dabashi Y, Itoman M. Establishment of a rat model of acute staphylococcal OM: relationship between inoculation dose and development of OM. *Arch Orthop Trauma Surg* 2005;125:169-76.
100. Gallimore B, Gagnon RF, Subang R, Richards GK. Natural history of chronic staphylococcus epidermidis foreign body infection in a mouse model. *J Infect Dis* 1991;164:1220-3.
101. Garvin KL, Miyano JA, Robinson D, Giger D, Novak J and Radio S. Polylactide/polyglycolide antibiotic implants in treatment of osteomyelitis. A canine model. *J Bone Joint Surg Am* 1994;76:1500-6.
102. Giavaresi G, Borsari V, Fini M, Giardino R, Sambri V, Gaibani P, Soffiatti R. Preliminary Investigations on a New Gentamicin and Vancomycin-Coated PMMA Nail for the Treatment of Bone and Intramedullary Infections: An Experimental Study in the Rabbit. *J Orthop Res* 2008:785 – 92.
103. Gie GA, Linder L, Ling RSM, Simon JP, Sloof TJJH, Timperly AJ. Impacted cancellous allograft and cement for revision total hip arthroplasty, *J Bone Joint Surg Br* 1993;75:14-21.
104. Ginebra MP, Traykova T, Planell JA. Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: A review. *J Control Release* 2006;113:102-10.
105. Gitelis S, Brebach CT. The treatment of chronic osteomyelitis with a biodegradable antibiotic-impregnated implant. *J Orthop Surg* 2002;10:53-60.
106. Graber CJ, Wong MK, Carleton HA, Perdreau-Remington F, Haller BL, Chambers HF. Intermediate vanco susceptibility in a community-associated MRSA clone. *Emerging Infectious Diseases* 2007;13:491-93 ([www.cdc.gov/eid](http://www.cdc.gov/eid). Vol 13 n°3 March 2007 - consulté le 10/07/2010).
107. Grammatico L, Baron S, Rusch E, Lepage B, Surer N, Desenclos JC, Besnier JM. Epidemiology of vertebral osteomyelitis (VO) in France: analysis of hospital-discharge data 2002–2008. *Epidemiol Infect* 2008;136:653–60.
108. Graig WA. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis* 1998;26:1-12.
109. Green SA. Osteomyelitis. The Ilizarov perspective. *Orthop Clin North Am.* 1991;22:515-21.
110. Gristina AG, Oga M, Webb LX, Hobgood CD. Adherent bacterial colonization in the pathogenesis of osteomyelitis. *Science* 1985;228:990-3
111. Gristina AG. Implant failure and the immune-incompetent fibro-inflammatory zone. *Clin Orthop* 1994;298:106-18.
112. Grzybowski J, Kolodziej W, Trafny EA, Struzyna J. A new anti-infective collagen dressing containing antibiotics. *J Biomed Mater Res* 1997;36:163-6.
113. Gupta MC., Maitra S. Bone grafts and bone morphogenetic proteins in spine fusion. *Cell and Tissue Banking* 2003; 3, 4: 255-67.
114. Gürsel I, Korkusuz F, Türesin F, Alaeddinoglu G, Hasirci V. *In vivo* application of biodegradable controlled antibiotic release systems for the treatment of implant-related osteomyelitis. *Biomaterials* 2001;22:73-80.
115. Gustilo RB, Merkow RL, Templeman D. Current concepts review. The management of open fractures. *J Bone Joint Surg Am* 1990;72:299-304.
116. Haddad FS, Masri BA, Campbell D, McGraw RW, Beauchamp CP, Duncan CP. The Prostalac functional spacer in two-stage revision for infected knee replacements. Prosthesis of antibiotic-loaded acrylic cement. *J Bone Joint Surg Br* 2000;82:807-12.
117. Hanel DP. Vascularized tissue transfert. An adjunct to the treatment of osteomyelitis. *Orthop Rev* 1989;18:595-608.

118. Hanssen AD, Rand JA. Evaluation and treatment of infection at the site of a total hip or knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 1998;80:910-22.
119. Hanssen AD. Prophylactic use of antibiotic bone cement. An Emerging standard-In opposition. *J Arthroplasty* 2004;19,4:suppl 1:73-7.
120. Hanssen AD, Session IV: Local antibiotic delivery systems. Local antibiotic delivery vehicles in the treatment of musculoskeletal infection. *Clin Orthop Relat Res* 2005;437:91-6.
121. Harik NS, Smeltzer MS. Management of acute hematogenous osteomyelitis in children. Special Focus: Pediatric Infections – Review. Expert review of anti-infective therapy 2010;8:175-81, DOI 10.1586/eri.09.130.
122. Harrell LJ, Evans JB. Anaerobic resistance of clinical isolates of *staphylococcus aureus* to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 1978;9:27-9.
123. Harris LG, Richards RG. Staphylococci and implant surfaces: a review. *Injury* 2006;37:S3-S14.
124. Hasegawa M, Sudo A, Komlev VS, et al. High release of antibiotic from a novel hydroxyapatite with bimodal pore size distribution. *Appl Biomater* 2004;70:332-9.
125. Hashmi MA, Norman P, Saleh M. The management of chronic osteomyelitis using the lautenbach method. *J Bone Joint Surg (Br)* 2004;86:269-75.
126. Hendriks JGE, Neut D; Van Horn JR, Van der Mei HC, Busscher HJ. The release of gentamicin from acrylic bone cements in simulated prosthesis-related interfacial gap. *J Biomater Res B: Appl Biomater* 2003;64:1-5.
127. Henry SL, Galloway LP. 1995. Drug Delivery System: Local antibacterial therapy for management of orthopaedic infections. Pharmacokinetic considerations. *Clin Pharmacokinet* 29:36-45.
128. Herbert CK, Williams RS, Levy RS, Barrack RL. Cost of treating total knee replacement. *Clin Orthop* 1996;331:140-5.
129. Higgins TF, Dodds SD., Wolf SW. A biomechanical analysis of fixation of intra-articular distal radial fractures with calcium-phosphate bone cement. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84:1579-86.
130. Hill C, Flamant R, Mazas F, Evrard J. Prophylactic cefazolin versus placebo in total hip replacement. *Lancet* 1981;1:795-6.
131. Hoff SF, Fitzgerald RH, Kelly PJ. The depot administration of penicillin G and gentamicin in acrylic bone cement. *J Bone Joint Surg Am* 1981;63:798-804.
132. Horn J, Schlegel U, Krettek C, Ito K. Infection resistance of unreamed solid, hollow slotted and cannulated intramedullary nails: An *in vivo* experimental comparison. *J Orthop Res* 2005;23:810-5.
133. Hovis WD., Watson JT. Et Bucholz RW. Biochemical and Biomechanical properties of bioabsorbable implants used in fractures fixation. *Tech Orthop* 1998;13:123-9.
134. Isiklar ZU, Landon GC, Daruiche R, Fernau R, Musher D. Penetration of vancomycin into biofilm. An *in vivo* orthopedic implant infection model. *Trans Orthop Res Soc* 1993;18:458.
135. Itokazu M, Matsunaga T, Kumazawa S, Wenyi Y. A novel drug delivery system for osteomyelitis using porous hydroxyapatite blocks loaded by centrifugation. *J Appl Biomater* 1995;6:167-9.
136. Jabra-Rizk, MA, Meiller TF, James CE, and Shirliff ME. Effects of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and antimicrobial susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;40:1463-9.
137. Jarcho M. Calcium phosphate ceramic as hard tissue prosthetics. *Clin Orthop Relat Res* 1981;157:259-78.
138. Jenny G, Taglang G. Le traitement local de l'infection osseuse par billes du ciment acrylique à la gentamicine. A propos de 134 cas. *Acta Orthop Belg.* 1979;45:57-68.
139. Jiranek WA, Hanssen AD, Greenwald AS. Antibiotic-loaded bone cement for infection prophylaxis in total joint replacement. *J Bone Joint Surg Am* 2006;88:2487-500.
140. Johansson A, Svensson O, Blomgren G, Eliasson G, and Nord CE. Anaerobic osteomyelitis. A new experimental rabbit model. *Clin Orthop Relat Res* 1991;265:297-301.
141. Johnson AP, Henwood C, Mushtaq S, et al. Susceptibility of Gram-positive bacteria from ICU patients in UK hospitals to antimicrobial agents. *J Hosp Infect* 2003;54:179-87.
142. Joosten U, Joist A, Frebel T, Brandt B, Diederichs S, Von Eiff C. Evaluation of an *in situ* setting injectable calcium phosphate as a new carrier material for gentamicin in the treatment of chronic osteomyelitis: studies *in vitro* and *in vivo*. *Biomaterials* 2004;25: 4287-95.
143. Jorge LS, Chuerie AG, Rossit ARB. Osteomyelitis: a current challenge. *Braz J Infect Dis* 2010;14:310-5.

144. Josefsson G, Gudmundsson G, Kolmert L, Wijkstrom. Prophylaxis with systemic antibiotics versus gentamicin bone cement in total hip arthroplasty: a five-year survey of 1688 hips. *Clin Orthop Relat Res* 1990;253:173-178.
145. Josefsson G, Kolmert L. Prophylaxis with systemic antibiotics versus gentamicin bone cement in total hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 1993;292:210-4.
146. Jupiter JB, First K, Gallico GG 3rd, May JW. The role of external fixation in the treatment of posttraumatic osteomyelitis. *J Orthop trauma* 1988;2:79-93.
147. Kaarsemaker S, Walenkamp GHM, Bogaard AEJ. New model for chronic osteomyelitis with *Staphylococcus aureus* in sheep. *Clin Orthop Relat Res* 1997;339:246-52.
148. Kadono Y, Yasunaga H, Horiguchi H, Hashimoto H, Matsuda S, Tanaka S, Nakamura K. Statistics for orthopedic surgery 2006-2007: data from the Japanese: Diagnosis procedure. *J Orthop Sci* 2010;15:162-70.
149. Kanellakopoulou K, Kolia M, Anastassiadis A, Korakis T, Giamarellos-Bourboulis EJ, Andreopoulos A et al. Lactic acid polymers as biodegradable carriers of fluoroquinolones: an *in vitro* study. *Antimicrob Agents and Chemother* 1999;43:714-6.
150. Kanellakopoulou K, Galanakis N, Giamarellos-Bourboulis EJ, Rifiotis C, Papakostas K, Andreopoulos A, Dounis E, Karagianakos P, Giamarellou H. Treatment of experimental osteomyelitis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a biodegradable system of lactic acid polymer releasing pefloxacin. *J Antimicrobial Chemotherapy*; 2000, 46: 311-14.
151. Kawashima M, Torisu T, Kamo Y *et al.* The treatment of pyogenic bone and joint infections by closed irrigation-suction. *Clin Orthop* 1980;148:240-4.
152. Kayser FH., Eberle H. Bacteriological aspects of chronic posttraumatic osteomyelitis. In: Local antibiotic treatment in osteomyelitis and soft-tissue infections. In: Van Rens TJG, Kayser FH, editors. Local antibiotic treatment in osteomyelitis and soft-tissue infections. International Congress Series. Amsterdam : Expecta Medica, 1981;556.
153. Keating JF., Hajduccka CL., Harper J. Minimal internal fixation and calcium-phosphate cement in the treatment of fractures of the tibial plateau. A Pilot Study. *J bone Joint Surg Br* 2003;85:68-73.
154. Kenesi C, Voisin MC, Dhém A. Ostéotomie tibiale d'addition interne calée par un coin de corail. *Chirurgie* 1997;122:379-82.
155. Kent ME, Rapp RP, Smith KM. 2006. Antibiotic beads and osteomyelitis: Here today, what's coming tomorrow? *Orthopedics* 29:599-603.
156. Kilgus DJ, Howe DJ, Strang A. Results of periprosthetic hip and knee infections caused by resistant bacteria. *Clin Orthop Relat Res* 2002;404:116-24.
157. Klemm KW. Treatment of chronic bone infection with Gentamicin-PMMA chains and beads. *Acc Surg* 1976;1:20.
158. Klemm KW. Gentamicin-PMMA chains (Septopal chains) for the local antibiotic treatment of chronic osteomyelitis. *Reconstr Surg Traumatol* 1988;20:11-35.
159. Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity? *Biomaterials* 2006;27:2907-15.
160. Kopylov P, Adalberth K, Jonsson K, Aspenberg P. Norian SRS versus functional treatment in redisplaced distal radial fractures: a randomized study in 20 patients. *J Hand Surg Br* 2002;26:4383-94.
161. Korkusuz F, Korkusuz P, Ekşioğlu F, Gürsel I, Hasirci V. *In vivo* response to biodegradable controlled antibiotic release systems. *J Biomed Mater Res* 2001;55:217-28.
162. Kurashina K, Kurita H, Hirano M, Kotani A, Klein CPAT, de Groot K. *In vivo* study of calcium phosphate cements: implantation of an  $\alpha$ -tricalcium phosphate/dicalcium phosphate dibasic/tetracalcium phosphate monoxide cement paste. *Biomaterials* 1997;18:539-43.
163. Kwok CS, Wan Ch, Hendricks S, Bryers JD, Horbett TA, Ratner BD. Design of infection-resistant antibiotic-releasing polymers: I. Fabrication and formulation. *J Controlled Release* 1999;62:289-99.
164. Kwon B., Goertzen D. J., O'Brien P. J. et al. Biomechanical evaluation of proximal humeral fracture fixation supplemented with calcium phosphate cement. *J Bone Joint Surg Am* 2002;85:951-61.
165. Labbé JL, Peres O, Leclair O, Goulon R, Scemama P, Jourdel F, Menager C, Duparc B, Lacassin F. Acute osteomyelitis in children: the pathogenesis revisited? *Orthop Traumatol Surg Res* 2010;96:268-75.
166. Lacey RW, Mitchell AAB. Gentamicin-resistant *staphylococcus aureus*. *Lancet* 1969;1425-26.

167. Lambe DW, Ferguson KP, Mayberry-Carson KJ, Tober-Meyer B, and Costerton W. Foreign-body-associated experimental osteomyelitis induced with *Bacteroides fragilis* and *Staphylococcus epidermidis* in rabbits. *Clin Orthop Relat Res* 1991;266:285-94.
168. Lambotte JC, Thomazeau H, Cathelineau G, Lancien G, Minet J, Langlais F. Phosphate tricalcique vecteur d'antibiotique: étude sur foyer d'ostéomyélite expérimentale chez le lapin. *Chirurgie* 1998;123:572-9.
169. Lamghari M, Almeida MJ, Berland S, Huet H, Laurent A, Milet C, Lopez E. Stimulation of bone marrow and bone formation by nacre: *In vivo* and *in vitro* studies. *Bone* 1999; 25 (suppl):S91-4.
170. Langlais F, Bunetel L, Segui A, Sassi N, et Cormier M. Ciments orthopédiques aux antibiotiques. Pharmacocinétique et taux osseux. *Rev Chir Orthop* 1988;74:493-503.
171. Lattar SM, Tuchscher L PN, Caccuri R L, Centro D, Becker Km, Alonso CA, Barberis C, Miranda G, Buzzola FR, von Eiff C, 2 and Sordelli DO. Capsule Expression and Genotypic Differences among *Staphylococcus aureus* Isolates from Patients with Chronic or Acute Osteomyelitis. *Infect Immun* 2009;77:1968-75.
172. Lazaretos J, Efstathopoulos N, Papagelopoulos PJ, Savvidou OD, Kanellakopoulou K, Giamarellou H, Giamarellos-Bourboulis EJ, Nikolaou V, Kapranou A, Papalois A, Papachristou G. A bioresorbable calcium phosphate delivery system with teicoplanin for treating MRSA osteomyelitis. *Clin Orthop* 2004;423:253-8.
173. Lazzarini L, Mader JT and Calhoun JH. Osteomyelitis in long bones. *J Bone Joint Surg* 2004;86-A:2305-18.
174. Lee K, Goodman SB. Current state and future of joint replacements in the hip and knee. *Expert Rev. Med. Devices* 2008;5:383-93.
175. Leekha S, Sampathkumar P, Berry DJ, Thompson RL. Should national standards for reporting surgical site infections distinguish between primary and revision orthopedic surgeries? *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010;31:503-8
176. Lentino JR. Infections associated with prosthetic knee and prosthetic hip. *Curr Infect Dis Rep* 2004;6:388-92.
177. Letsch R, Rosentha E, Joka T. Local antibiotic application in the treatment of osteomyelitis. A comparative study of two different carriers. *Akt traumatol* 1993;23:324-9.
178. Lew DP, Waldvogel FA. Osteomyelitis. *Lancet* 2004;364:369-79.
179. Libicher M, Hillmeir J, Liegibel U, Sommer U, Pyerin W, Vetter M, Meinzer HP, Grafe I, Meeder P, Noldge G, Nawroth P and Kasperrk C. Osseous integration of calcium phosphate in osteoporotic vertebral fractures after kyphoplasty: initial results from a clinical and experimental pilot study. *Osteoporos Int* 2006;17:1208-15.
180. Lidwell OM, Lowbury EJJ, Whyte W, Blowers R, Stanley SJ, Lowe D. Effect of ultraclean air in operating rooms on deep sepsis in the joint after total hip or knee replacement: a randomized study. *Br Med J* 1982;285:10-4.
181. Liverneaux P. Traitement de la dysplasie fibreuse avec du ciment phosphocalcique. A propos d'un cas. *Rev Chir Orthop Repatrice App Mot* 2003;89:532-6.
182. Liverneaux P, Khallouk R. Calcium phosphate cement in wrist arthrodesis: three cases. *J Orthop Sci* 2006; 11: 289-93.
183. Lombardi AV, Karnes JM, and Berend KR. A motion maintaining antibiotic delivery system. *J Arthroplasty* 2007;22, suppl. 1:50-5.
184. Lortat-Jacob A. Prothèses de genou infectées. *Encycl Méd Chir (Elsevier Paris). Techniques chirurgicales – Orthopédie-traumatologie*, 44-852;1997:13p.
185. Lortat-Jacob A. Prothèses de hanche infectées. In *Conférences d'enseignement*. 1998. Cahiers d'enseignement de la SOFCOT. Paris. Expansion Scientifique Française. 1998;61-81.
186. Loty B, Rous FX, George B, Courpied JP, Postel M. Utilisation du corail en chirurgie osseuse. Résultats après 4 ans d'utilisation. *Int Orthop* 1990;14:255-9.
187. Lucke M, Wildemann B, Sadoni S, Surke C, Shiller R, Sremberger A, Raschke M, Haas NP, Schmidmaier G. Systemic versus local application of gentamicin in prophylaxis of implant-related osteomyelitis in a rat model. *Bone* 2005;36:770-8.
188. Lucas-Girot, Verdier MC, Tribut O, Sanglboeuf JC, allain H, Oudadesse H. Gentamicin-loaded calcium carbonate materials: comparison of two drug-loading modes. *J Biomed Mater Res B: Appl Biomater* 2005;73:164-71.

189. MacGowan AP, Wise R. Establishing MIC breakpoints and the interpretation of *in vitro* susceptibility tests. *J Antimicrob Chemother* 2001;48, Suppl 1:17-28.
190. Mackey D, Varlet A and Debeaumont D. Antibiotic loaded plaster of paris pellets: An *in vitro* study of a possible method of local antibiotic therapy in bone infection. *Clin Orthop* 1982;167:263-8.
191. Mackowiack PA, Jones SR, Smith JW. Diagnosis value of sinus-tract cultures in chronic osteomyelitis. *JAMA* 1978;239:2772-5.
192. Mader JT, Brown GL, Guckian JC, Wells CH, Reinartz JA. A mechanism for the amelioration by hyperbaric oxygen of experimental staphylococcal osteomyelitis in rabbits. *J Infect Dis* 1980;142:915-22.
193. Mader JT., Morrisson LT, Adams KR. Comparative evaluation of A-56619, A56620, and nafcillin in the treatment of experimental *staphylococcus aureus* osteomyelitis. *Antimicrob Agents Chemother* 1987;31:251-63.
194. Mader JT, Calhoun J, Cobos J. *In vitro* evaluation of antibiotic diffusion from antibiotic-impregnated biodegradable beads and polymethylmethacrylate beads. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:415-8.
195. Mader JT, Shirliff ME. The rabbit model of bacterial osteomyelitis of the tibia. In: *Handbook of Animal Models of Infection*. Zak O, Sande MA, Ed, Academic Press, New York 1999;68:581-91.
196. Mader JT, Stevens CM, Stevens JH, Ruble R, Lathrop JT, Calhoun JH. Treatment of experimental osteomyelitis with a fibrin sealant antibiotic implant. *Clin Orthop Relat Res* 2002;403:58-72.
197. Magnan B, Regis D, Biscaglia R and Bartolozzi P. Preformed acrylic spacer loaded with antibiotics. Use of two-stage procedure in 10 patients because of infected hips after total replacement. *Acta Orthop Scand* 2001;72:591-4.
198. Mäkinen TJ, Veiranto M, Knuuti J, Jalava J, Törmälä P, Aro HT. Efficacy of a bioabsorbable antibiotic containing bone screw in the prevention of biomaterial-related infection due to *Staphylococcus aureus*. *Bone* 2005;36:292-9.
199. Malchau H, Herberts P, Ahnfelt L. Prognosis of total hip replacement in Sweden. Follow-up of 92675 operations performed 1978-1990. *Acta Orthop Scand* 1993;64:497-506.
200. Masri BA, Duncan CP, Beauchamp CP, et al. The effect of varying surface patterns on antibiotic elution from antibiotic loaded bone cement. *J Arthroplasty* 1995;10:453.
201. Mayberry-Carson KJ, Tober-Meyer B, Gill LR, Lambe DW Jr, Costerton JW. Osteomyelitis experimentally induced with *Bacteroides thetaiotaomicron* and *staphylococcus epidermidis*. Influence of a foreign body implant. *Clin Orthop* 1992;280:289-99.
202. Mayberry-Carson KJ, Tober-Meyer B, Smith JK, Lambe DW Jr, Costerton JW. Bacterial adherence and glycocalyx formation in osteomyelitis experimentally induced with *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. 1984;43:825-33.
203. McKee MD, Wild LM, Schemitsch EH, Waddell JP. McKee. The use of antibiotic-impregnated, osteoconductive, bioabsorbable bone substitute in the treatment of infected long bone defect: Early results of prospective trial. *J Orthop Trauma* 2002;19:622-7.
204. McQueen M, Littlejohn A, Hugues SP. A comparison of systemic cefuroxime and cefuroxime loaded bone cement in the prevention of early infection after total joint replacement. *Int Orthop* 1987;11:241-3.
205. Melcher GA, Claudi B, Schlegel U, Perren SM, Printzen G, Munzinger J. 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* 1994;76:955-9.
206. Mendel V, Simanowski HJ, Scholz HC, Heymann H. Therapy with gentamicin-PMMA beads, gentamicin-collagen sponge and cefazoline for experimental osteomyelitis due to staphylococcus aureus in rats. *Arch Orthop Trauma Surg* 2005;125:363-8.
207. Mghir AS, Crémieux AC, Bleton R, et al. Efficacy of teicoplanin and autoradiographic diffusion pattern of [<sup>14</sup>C]teicoplanin in experimental staphylococcus aureus infection of joint prostheses. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:2830-5.
208. Miclau T, Dahners LE, and Lindsey RW. *In vitro* pharmacokinetics of antibiotic release from locally implantable materials. *J Orthop Res* 1993;11:627-32.
209. Miclau T, Edin ML, Lester GE, et al. Bone toxicity of locally applied aminoglycosides. *J Orthop Trauma* 1995;9:401-6.
210. Minami A, Kasashima T, Iwasaki, N, Kato H, Kaneda K. Vascularised fibular grafts. An experience of 102 patients. *J Bone Joint Surg (Br)* 2000;82-B:1022-5.
211. Modai J. Les Aminosides, Journées de l'Hôpital Claude Bernard 1982.

212. Morrissy RT, Haynes DW. Acute hematogenous osteomyelitis: a model with trauma as an etiology. *J Pediatr Orthop* 1989;9:447–56.
213. Morscher E, Herzog R, Babst R, Zimmerli W. Management of infected hip arthroplasty. *Orthopaedics Internat* 1995;3:343-51.
214. Mousset et al. Biodegradable implants for potential use in bone infection. An *in vitro* study of antibiotic-loaded calcium sulfate. *Int Orthop* 1995;19:157–61.
215. Munting M. The contributions and limitations of hydroxyapatite coating to implants fixations. A histomorphometric study of load bearing implants in dog. *Int Orthop* 1996;20:1–6.
216. Murase K., Hirose H., Mori Y., et al. Graft-preserving treatment for vascular graft infected with *Staphylococcus aureus* with antibiotic-releasing porous apatite ceramic in the rabbit. *J Vasc Surg* 2003;38:368–73.
217. Nakamoto DA, Haaga JR, Bove P, Merritt K, Rowland DY. Use of birinolytic agents to coat wire implants to decrease infection. An animal model. *Invest Radiol*. 1995;30:341-4.
218. Narahariseti PK, Lee HCG, Fu Y, Lee D, Wang C. *In vitro* and *in vivo* release of gentamicin from biodegradable discs. *Appl Biomater* 2006;77:329-37.
219. National committee for Clinical Laboratory Standards. 2004. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *In* NCCLS standard M100-S14 NCCLS, Wayne, PA USA.
220. Nelson CL, Evans RP, Blaha JD, Calhoun J, Henry SL, Patzakis MJ. A comparison of gentamicin-impregnated polymethylmethacrylate beads implantation to conventional parenteral antibiotic therapy in infected total hip and knee arthroplasty. *Clin Orthop* 1993; 295:96-101.
221. Nelson CL, Hickmon S, and Skinner RA. Treatment of experimental osteomyelitis by surgical debridement and the implantation of bioerodable polyanhydride-gentamicin beads. *J Orthop Res* 1997;15:249-55.
222. Nelson CL, McLaren SG, Skinner RA, et al. The treatment of experimental osteomyelitis by surgical debridement and the implantation of calcium sulphate tobramycin pellets. *J Orthop Res* 2002;20:643-7.
223. Nemzek JA, Arnoczky SP, Swensen CL. Retroviral transmission in bone allotransplantation. The effects of tissue processing. *Clin Orthop Relat Res* 1996; 324:275-82.
224. Neut D, Van de Belt H, Stokroos I, et al. Biomaterial-associated infection of gentamicin-loaded PMMA beads in orthopaedic revision surgery. *J Antimicrob Chemother* 2001;47:885-91.
225. Neut D, Van de Belt H, Van Horn JR, Van der Mei HC, and Busscher HJ. The effect of mixing on gentamicin release from polymethylmethacrylate bone cements. *Acta Orthop* 2003;74:670–6.
226. Ngoi SS, Satku K, Pho RW, Kumar VP. Local muscle flaps in the treatment of chronic of chronic osteomyelitis- The introduction of new vasculature. *Injury* 1987;18:350-3.
227. Nijhof MW, Fleer A, Hardus K, Vogely HC, Schouls LM, Verbout AJ, Dhert WJ. Tobramycin-containing bone cement and systemic cefazolin in one-stage revision treatment of infection in a rabbit model. *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)* 2001;58:747-53.
228. Norden CW, Kennedy E. Experimental osteomyelitis. A description of the model. *J Infect Dis* 1970;122:410-8.
229. Norden CW, Myerowitz RL, Keleti E, Experimental osteomyelitis due to *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa*: A radiographic-pathological correlative analysis. *Br J Exp Pathol* 1980;61:451-60.
230. Norden CW, Schaffer M. Treatment of experimental chronic osteomyelitis due to *Staphylococcus aureus* with vancomycin and rifampin: A description of the model. *J Infect dis* 1983;147:352–7.
231. Norden CW. Lessons learned from animal models of osteomyelitis. *Reviews of infectious diseases*. 1988;10:103-10.
232. Norden CW, Budinsky A. Treatment of experimental chronic osteomyelitis due to *Staphylococcus aureus* with ampicillin/sulbactam. *J Infect Dis* 1990;161:52–3.
233. Norden CW. Acute and chronic osteomyelitis. In: Armstrong D, Cohen J, editors. *Infectious Diseases*. London: Mosby. 1999. p.1-43.
234. Oguachuba HN. Use of instillation-suction technique in treatment of chronic osteomyelitis. *Acta Orthop Scand* 1983;54:452-8.
235. Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res* 2002;66:86-92.

236. Ooms EM, Wolke JGC, Van de Heuvel MT, Jeschke B, Jansen JA. Histological evaluation of the bone response to calcium phosphate cement implanted in cortical bone. *Biomaterials* 2003; 24:989-1000.
237. Oonishi H, Iwaki Y, Kin N, Kushitani S, Murata N, Wakitani S, Imoto K. Hydroxyapatite in revision of total hip replacements with massive acetabular defects: 4 to 10 year clinical results. *J Bone Joint Surg Br* 1997;79:87-92.
238. Oonishi H, Hench LL, Wilson J, Sugihara F, Tsuji E, Matsuura M, Kin S, Yamamoto T, Mizokawa S. Quantitative comparison of bone growth behavior in granules of Bioglass®, A-W glass-ceramic, and hydroxyapatite. *J Biomed Mater* 2000;51:37-46.
239. Ostermann PW, Seligson D, Henry SL. Local antibiotic therapy for severe open fractures. *J Bone Joint Surg Br* 1995;77:93-7.
240. Overgaard S, Lind M, Glerup H, Grundvig S, Bünger C, Soballe K. Hydroxyapatite and fluorapatite coatings for fixation of weight loaded implants. *Clin Orthop Relat Res* 1997;336:286-96.
241. Ozaki T, Yoshitaka T. et al. Vancomycin-impregnated polymethacrylate beads for methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA) infection: report of two cases. *Journal of Orthopaedic Science*; 1998; 3:163-8.
242. Papineau LJ, Alfigeme A, Dalcourt JP, Pilon L. [Chronic osteomyelitis: open excision and grafting after saucerization (author's transl)]. *Int Orthop* 1979;3:165-76. French.
243. Parsons B, Strauss E. Surgical management of chronic osteomyelitis. *Am J Surg* 2004;188:57-66.
244. Passl R, Müller C, Zielinski CC, Eibl MM. A model of experimental post-traumatic osteomyelitis in guinea pigs. *J trauma* 1984;24:323-6.
245. Pederson AB, Svendsson J, Johnsen SP, Riis A, Overgaard S. Risk factors for revision due to infection after primary total hip arthroplasty. A population-based study of 80576 primary procedures in the Danish hip arthroplasty registry. *Acta Orthop* 2010;81:542-7.
246. Penner MJ, Masri BA, Duncun CP. Elutions characteristics of vancomycin and tobramycine combined in acrylic bone cements. *J Arthroplasty* 1996;11:939-44.
247. Perry CR, Davenport K, Vossen MK. Local delivery of antibiotics via an implantable pump in the treatment of osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res* 1988;226:222-30.
248. Pertuiset E. Tuberculose osseuse et articulaire des membres. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale. Appareil Locomoteur (Paris)*;2004;14-185-A10: 16 pages.
249. Petty W, Spanier S, Shuster JJ, Silverthorne C. The influence of skeletal implants on incidence of infection. Experiments in a canine model. *J Bone Joint Surg Am* 1985;67:1236-44.
250. Petty W, Spanier S, Shuster JJ. Prevention of infection after total joint replacement. Experiments with a canine model. *J Bone Joint Surg Am* 1988;70:536-9.
251. Pfister A, Oshsner PE. Experiences with closed irrigation-suction drainage and simultaneous administration of an antiseptic. *Unfallchirurg* 1993;96:332-40.
252. Pollak AN, Jones AL, Castillo RC, Bosse MJ, MacKenzie EJ, and the LEAP study group. The relationship between time to surgical debridement and incidence of infection after open high-energy lower extremity trauma. *J Bone joint Surg Am*. 2010;92:7-15.
253. Price JS, Tencer AF, Arm DM, Bohach GA. Controlled release of antibiotics from coated orthopedic implants. *J Biomed Mater Res* 1996;30:281-6.
254. Proctor RA, Kahl B, Von Eiff C, Vaudaux PE, Lew DP, and Peters G. Staphylococcal Small Colony Variants Have Novel Mechanisms for Antibiotic Resistance. *Clin Infect Dis* 1998;27(Suppl 1):S68-74.
255. Radin S, Campbell JT, Ducheyne P et al. Calcium phosphate ceramic coating as carriers of vancomycin. *Biomaterials* 1997;18:777-82.
256. Ragel W., Vallet-Regi M. *In vitro* bioactivity and gentamicin release from glass-polymer-antibiotic composites. *J Biomed Mater Res* 2000;51:424-9.
257. Ramchandani M, Robinson D. *In vitro* and *in vivo* release of ciprofloxacin from PLGA 50:50 implants. *J Control Rel* 1998;54:167-75.
258. Ransford AO, Morley T et al. Synthetic porous ceramic compared with autograft in scoliosis surgery. A prospective, randomised study of 341 patients. *J Bone Joint Surg Am* 1998; 80B:13-8.
259. Ratier A, Gibson IR. Setting characteristics and mechanical behaviour of a calcium phosphate bone cement containing tetracycline. *Biomaterials* 2001;22:897-901.
260. Regner L, Carlsson L, Kärrholm J, Herberts P. Ceramic coating tibial component fixation in total knee arthroplasty. *J Arthroplasty* 1998;13:882-9.

261. Rice DAK, Mendez-Vigo L. Daptomycin in bone and joints infections: a review of the literature. *Arch Orthop Trauma Surg* 2009;129:1495-1504.
262. Riegels-Nielsen P, Espersen F, Hölmich LR, and Frimodt-Møller N. Collagen with gentamicin for prophylaxis of postoperative infection. *Staphylococcus aureus* osteomyelitis studied in rabbits. *Acta Orthop Scand* 1995;66:69-72.
263. Rissing JP, Buxton TB, Weinstein RS, and Shockley RK. Model of experimental chronic osteomyelitis in Rats. *Infect Immun* 1985;47:581-6.
264. Rissing JP. Animal models of osteomyelitis. *Infect Dis Clin North Am* 1991;4:229-39.
265. Rossi S, Azghani AO, and Omri A. Antimicrobial efficacy of a new antibiotic-loaded poly(hydroxybutyric-co-hydroxyvaleric acid) controlled release system. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:1013-8.
266. Rutledge B, Huyette D, Day D and Anglen J. Treatment of osteomyelitis with local antibiotics delivered via bioabsorbable polymer. *Clin Orthop Relat Res* 2003;411:280-7.
267. Saikia KC, Bhattacharya TD, Bhuyan SK, Talukdar DJ, Saikia SP, Jitesh P. Calcium phosphate ceramics as bone graft substitutes in filling bone tumor defects, *Indian J Orthop*. 2008;42:169-72.
268. Sanden B, Olerud C, Petren-Mallmin M, Larsson S. Hydroxyapatite coating improves fixation of pedicle screws. *J Bone Joint Surg Br* 2002;84:387-91.
269. Santavirta S, Konttinen YT, Saito T, Grönblad M, Partion E, Kemppinen P, Rokkanen P. Immune response to polyglycolic acid implants, *J. Bone Joint Surg Br* 1990;72:597-600.
270. Sasaki S, Ishii Y. Apatite cement containing antibiotics: efficacy in treating experimental osteomyelitis. *J Orthop Sci* 1999;4:361-9.
271. Scharfenberger A, Clark M, Lavoie G, O'Connor G, Masson E, Beaupre L. Treatment of an infected total hip replacement with the prostalac system. Part I: Infection resolution. *J Can Chir* 2007;50:24-8.
272. Scheman L, Janota M, Lewin P. The production of experimental osteomyelitis. *JAMA* 1941;117:1525-9.
273. Schliephake H, Kage T. Enhancement of bone regeneration using resorbable ceramics and a polymer-ceramic composite material. *J Biomed Mater Res* 2001;56:128-36.
274. Schmidmaier G, Luke M, Wildemann B, Haas NP, Raschke M. Prophylaxis and treatment of implant-related infections by antibiotic-coated implants: A review. *Injury* 2006;37suppl2:s105-12
275. Schneiders J, Gbureck U, Thull R, Kissel Th. Controlled release of gentamicin from calcium phosphate-poly(lactic acid-co-glycolic acid) composite bone cement. *Biomaterials* 2006;27:4239-49.
276. Schulz S, Steinhart H, Mutters R. Chronic osteomyelitis in a new rabbit model. *J Invest Surg* 2001;14:121-31.
277. Scott CP, Higham PA, Dumbleton JH. Effectiveness of bone cement containing tobramycin. An in vitro susceptibility study of 99 organisms found in infected joint arthroplasty. *J Bone joint Surg Br* 1999;81:440-3.
278. Sendi P, Rohrbach M, Graber P, Frei R, Ochsner PE, and Zimmerli W. *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants in Prosthetic Joint Infection. *CID* 2006;43: 961-7.
279. Shirliff ME, Calhoun JH, Mader JT. Experimental osteomyelitis treatment with antibiotic-impregnated hydroxyapatite. *Clin Orthop Relat Res* 2002; 401:239-47.
280. Silber JS, Anderson DG, Daffner SD, Brislin BT, Leland JM, Hilibrand AS, Vaccaro AR, and Albert TJ. Donor site morbidity after anterior iliac crest bone harvest for single-level anterior cervical discectomy and fusion. *Spine* 2003;28:134-9.
281. Silverman LD, Lukashova L, Herman OT, Lane JM, Boskey AL. Release of gentamicin from a tricalcium phosphate bone implant. *J Orthop Res* 2007;25:23-9.
282. Simon JA, Ricci JL, Di Cesare P. Bioresorbable fracture fixation in orthopedics: A comprehensive review. Part I. Basic science and preclinical studies. *Am J Orthop* 1997;10:665-70.
283. Simon JA, Ricci JL, Di Cesare P. Bioresorbable fracture fixation in orthopedics: A comprehensive review. Part II. Clinical studies. *Am J Orthop* 1997;11:754-62.
284. Smeltzer MS, Thomas JR, Hickmon SG, Skinner RA, Nelson CL, Griffith D, Parr TR, Evans RP. Characterization of rabbit model of staphylococcal osteomyelitis. *J Orthop Res* 1997;15:414-21.
285. Smith MM, Vasseur PB, Saunders HM. Bacterial growth associated with metallic implants in dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 1989;195:765-7.

286. Société Française de Microbiologie (SFM). Examen bactériologique des suppurations osseuses et articulaires. In REMIC: Vivactis Plus Ed; 2007:81-4.
287. Southwood RT, Rice JL, McDonald PJ, Hakendorf PH, Rozenbils MA. Infection in experimental hip arthroplasties. *J Bone Joint Surg Br* 1985;67:229-31.
288. Spagnolo N, Greco F, Rossi Am Ciolli L, Teti A, and Posteraro P. Chronic staphylococcal osteomyelitis: A new experimental rat model. *Infect Immun* 1993;61:5225-30.
289. Speers DJ, Nade SML. Ultrastructural studies of adherence of *Staphylococcus aureus* experimental acute hematogenous osteomyelitis. *Infect Immun* 1985;49:443-6.
290. Spence RAJ, Anderson JR, Parks TG. The use of gentamicin-PMMA chains in colorectal surgery. *Br J Clin Pract* 1984;38:252-4.
291. Stallmann HP, de Roo R, Faber C, et al. *In vivo* release of antimicrobial peptide hLF1-11 from calcium phosphate cement. *J Orthop Res* 2008;26:531-8.
292. Stallmann HP, Faber C, Slotema E, et al. Continuous-release or burst-release of the antimicrobial peptide human lactoferrin 1-11 (hLF1-11) from calcium bone substitutes. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:853-5.
293. Stallmann HP, Faber Ch, Bronckers AL, Amerongen AVN and Wuisman P. Osteomyelitis prevention in rabbits using antimicrobial peptide hLF1-11- or gentamicin-containing calcium phosphate cement. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 472 – 476.
294. Stevens CM, Testworth KD, Calhoun JH, Mader JT. An articulated antibiotic spacer used for infected total knee arthroplasty: a comparative *in vitro* elution study of simplex® and Palacos® bone cements. *J Orthop Res* 2005;23:27-33.
295. Stolle LB, Arpi M, Jorgensen PH, Riegels-Nielsen, Keller J. *In situ* gentamicin concentrations in cortical bone. An experimental study using microdialysis in bone. *Acta Orthop Scand* 2003; 74:611-6.
296. Strachan CJ. The prevention of orthopaedic implant and vascular graft infections. *J Hosp Infect* 1995;30(Suppl.):54-63.
297. Sulo I. Granules de plâtre à la gentalline dans le traitement de l'infection osseuse. *Rev Chir Orthop* 1993;79:299-305.
298. Suzuki A, Terai H, Toyoda H, et al. A biodegradable delivery system for antibiotics and recombinant human bone morphogenetic protein-2: A potential treatment for infected bone defects. *J Orthop Res* 2006;24:327-32.
299. Theiss F, Apelt D, Brand B, Kutter A, Zlinsky K, Bohner M, Matter S, Frei C, Auer JA, and Von Rechenberg B. Biocompatibility and resorption of a burshite calcium phosphate cement. *Biomaterials* 2005;26:4383-94.
300. Thomazeau H, Langlais F. Relargage d'antibiotiques par implantation osseuse de phosphate tricalcique. Pharmacocinétique *in vitro* et *in vivo* de formes galéniques différentes. *Chirurgie* 1996;121:663-6.
301. Thordarson DB, Hedman TP, Yetkinler DN, Eskander E, Lawrence TN, Poser RD. Superior compressive strength of a calcaneal fracture construct augmented with remodelable cancellous bone cement. *J Bone Joint Surg* 1999;81:239-46.
302. Tonino AJ, Therin M, Doyle C. Hydroxyapatite coated femoral stems. Histology and histomorphometry around five components retrieved at post mortem. *J Bone Joint Surg Br* 1999;81:148-54.
303. Turner TM, Urban RM, Hall DJ, Chye PC, Segreti J, Gitelis S. Local and systemic levels of tobramycin delivered from calcium sulphate bone graft substitute pellets. *Clin Orthop Relat Res* 2005;437:97-104.
304. Uchida A, Araki N, Shinto Y, Yoshikawa H, Kurisaki E, Ono K. The use of calcium hydroxyapatite ceramic in bone tumor surgery. *J Bone Joint Surg Br* 1990;72:298-302.
305. Van de Belt H, Neut D, Van Horn JR, et al. Antibiotic resistance. To treat or not to treat? *Nat Med* 1999;5:358-9.
306. Van de Belt H, Neut D, Uges DR, Schenk W, Van Horn JR, Van der Mei HC, and Busscher HJ. Surface roughness, porosity and wettability of gentamicin-loaded bone cements and their antibiotic release. *Biomaterials* 2000; 21:1981-7.
307. Van der Mee-Marquet, N., A. S. Domelier, N. Girard, R. Quentin. Epidemiology and typing of staphylococcus aureus strains isolated from bloodstream infections. *J Clin. Microbiol* 2004;42:5650-7.
308. Van Raaij TM, Visser LE, Vulto AG, Verhaar AN. 2002. Acute renal failure after local gentamicin treatment in an infected total knee arthroplasty. *J Arthroplasty* 17:948-950.

- 309.** Vecsei V. Long term results in the treatment of septic bone and soft tissue diseases with gentamicin-PMMA chains and beads. In: Van Rens TJG, Kayser FH, editors. Local antibiotic treatment in osteomyelitis and soft tissue infections. International Congress Series. Amsterdam: Expecta Medica, 1981;556:50-9.
- 310.** Verhelle N, Van Zele D, Liboutton L, Heymans O. How to deal with bone exposure and osteomyelitis: an overview. *Acta Orthop Belg* 2003;69:481-94.
- 311.** Vicens JL, Metges PJ, Doury P. Tréponématoses. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale. Appareil Locomoteur* (Paris);1985;14018-C20:5 pages.
- 312.** Volk A, Cremieux AC, Belmatoug N. Evaluation of a rabbit model for osteomyelitis by high field, high resolution imaging using the chemical-shift-specific-slice-selection technique. *Mag Res Imag* 1994;12:1039-46.
- 313.** Von Eiff C, Bettin D, Proctor RA, Rolauffs B, Lindner N, Winkelmann W, and Peters G. Recovery of Small Colony Variants of *Staphylococcus aureus* Following Gentamicin Bead Placement for Osteomyelitis. *Clin Infect Dis* 1997;25:1250-1.
- 314.** Von Eiff C, Becker K. Small-colony variants (SCVs) of staphylococci: a role in foreign body-associated infections. *Int J Artif Organs* 2007;30:778-85.
- 315.** Von Eiff C. Review. *Staphylococcus aureus* small colony variants: a challenge to microbiologists and clinicians. *J Antimicrob Chemother* 2009;63:977-81.
- 316.** Vuong C, Otto M. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes Infect* 2002;4:481-9.
- 317.** Wahlig H, Dingledein E, Bergman R, and Reuss K. The release of gentamicine from polymethylmethacrylate beads. An Experimental and Pharmacokinetic Study. *J Bone Joint Surg Br* 1978;60:270-5.
- 318.** Wahlig H, Dingledein E. Antibiotics and bone cements. Experimental and clinical long-term observations. *Acta Orthop Scand* 1980;51:49.
- 319.** Wahlig H. Gentamicin-PMMA beads, a drug delivery system ; basic results. In: Van Rens TJG, Kayser FH, editors. Local antibiotic treatment in osteomyelitis and soft-tissue infections. International Congress Series. Amsterdam: Expecta Medica, 1981;556:9-17.
- 320.** Wahlig H, Dingledein E, Buchholz HW, Buchholz M, Bachmann F. Pharmacokinetic study of gentamicin-loaded cement in total hip replacements. Comparative effects of varying dosage. *J Bone Joint Surg Br* 1984;66:175-9.
- 321.** Waldvogel FA, Medoff G, Swartz MN. Osteomyelitis: a review of clinical features, therapeutic considerations and unusual aspects. *N Engl J Med.* 1970;282:198-206, 260-6, 316-22.
- 322.** Walenkamp GHIM, Vree TB, Van Rens TJG. Gentamicin-PMMA beads: pharmacokinetic and nephrotoxicological study. *Clin Orthop Relat Res* 1986;205:171-83.
- 323.** Walenkamp GHIM, Kleijn LLA, Leeuw M. Osteomyelitis treated with gentamicin-PMMA beads: 100 patients followed for 1-12 years. *Acta Orthop Scand* 1998; 69:518-22.
- 324.** Wang GH, Liu SJ, Ueng SW, Chan EC. The release of cefazolin and gentamicin from biodegradable PLA/PGA beads. *Int J Pharmaceutics* 2004;273:203-12.
- 325.** Wei G., Kotoura Y., Oka M. et al. A bioresorbable delivery system for antibiotic treatment of osteomyelitis. The use of lactic acid oligomer as a carrier. *J Bone Joint Surg Br* 1991;73:246-52.
- 326.** Weiler, F.G.R. Hoffmann, A.C. Stählen, H.J. Helling, N.P. Südkamp, Biodegradable implants in sports medicine: The biological base, *Arthroscopy* 2000;16:305-21.
- 327.** Wernet E, Ekkernkamp A, Jellestad H, and Muhr G. Callagenous sponge containing antibiotics in osteitis therapy. *Unfall Chirurg* 1992;95:259-64.
- 328.** Wertheimer LG, Martin IV. Chronic experimental osteomyelitis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1964;6,4:142-9.
- 329.** Widel JD. Salvage of infected total knee fusion: the last option. *Clin Orthop Relat Res* 2002;404:139-42.
- 330.** Wilkins J, Patzakis MJ, Choice and duration of antibiotics in open fractures. *Orthop Clin North Am* 1991;22:433-7.
- 331.** Winger DA, Fass RJ. Antibiotic-Impregnated Cement and Beads for Orthopaedic Infections. Minireview. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:2675-9.
- 332.** Worlock P, Slack R, Harvey L, Mawhinney R. An experimental model of post-traumatic osteomyelitis in rabbits. *Br J Exp Path* 1988;69:235-44.

333. Wright JA, Nair SP. Interaction of staphylococci with bone. Mini-Review. *Int J Med Microbiol* (2009), doi: 10.1016/j.ijmm.2009.10.003.
334. Wu P, Grainger DW. Drug/device combinations for local drug therapies and infection prophylaxis. *Biomaterials* 2006;27:2450–67.
335. Yamamoto Y, Onga T et al. Use of hydroxyapatite to fill cavities after excision of benign bone tumours. *J Bone Joint Surg Br* 2000;82-B:1117-20.
336. Yamamuro T. Utilisation du vitrocérame A-W (Cerabone Aw®) comme substitut osseux. In: *Biomatériaux de substitution de l'os et du cartilage*. Passuti N. Cah Enseig SOFCOT 1997;57:12-9.
337. Yamashita Y, Uchida A et al. Treatment of chronic osteomyelitis using calcium hydroxyapatite ceramic implants impregnated with antibiotic. *Orthop Int* 1998; 22: 247.
338. Yenice I, Calis S et al. Biodegradable implantable teicoplanin beads for the treatment of bone infections. *International Journal of Pharmaceutics* 2002;242:271–5.
339. Younger AS, Duncun CP, Masri BA. Treatment of infection associated with segmental bone loss in the proximal part of the femur in two stages with use of an antibiotic-loaded interval prosthesis. *J Bone Joint Surg Am.* 1998;80:60-9.
340. Yu D, Wong Jm Matsuda Y, Fox JL, Higuchi WI. Self-setting hydroxyapatite cement. A novel skeletal drug delivery system for antibiotics. *J Phar Sci* 1992; 81:529-31.
341. Zak O, Zak F, and Rich R. Program Abstr Intersc Conf Antimicrob Agents Chemother 21<sup>st</sup>, Chicago, III, abstr n° 530, 1981.
342. Zhao J, Zhang Z, wang S, Sun X, Zhang X, Chen J. Apatite-coated silk fibroin scaffolds to healing mandibular border defects in canines. *Bone* 2009;45:517-27.
343. Zimmerli W, Waldvogel FA, Vaudaux P, Nydegger UEN. Pathogenesis of foreign body infection: description and characteristics of an animal model. *J Infect Dis* 1982;46:487-97.
344. Zimmerli W. Experimental models in the investigation of device-related infections. *J Antimicrob Chemother* 1993;31-suppl D: 97-102.
345. Zimmerli W, Oschsner PE. Management of infection associated with prosthetic joints. Review. *Infection* 2003;31:99-108.

# **ANNEXES**

## Antibioprophylaxie \*

Acte chirurgical	Produit	Posologie	Durée
Prothèse articulaire	Céfazoline	2 g préop (réinjection de 1 g si durée > 4 h ou saignement abondant > 1 litre) puis 1 g / 8 h	Limitée à la période opératoire (24 h maximum)
	Allergie : vancomycine*	15 mg / kg préop (1h avant incision) puis 30 mg/kg/24 h en perfusion continue	Limitée à la période opératoire (24 h maximum)
Chirurgie orthopédique avec mise en place de matériel, greffe osseuse, ligamentoplastie, fracture fermée	Céfazoline	2 g préop	Dose unique (réinjection de 1 g si durée > 4 h)
	Allergie : vancomycine*	15 mg / kg préop (1h avant incision)	Dose unique
Chirurgie orthopédique autre et arthroscopie diagnostique	Pas d'ABP		
Fracture fermée, fracture ouverte grade I de Cauchoix, plaie articulaire	Céfazoline	2 g préop	Dose unique (réinjection de 1 g si durée > 4 h)
	Allergie : vancomycine*	15 mg / kg préop (1h avant incision)	Dose unique
Fracture ouverte (Grade I et II de Gustilo et Anderson) et large plaie souillée des parties molles	Amoxi-clavulanate	2 g préop (réinjection de 1 g toutes les 2 h durant l'intervention)	48 h maximum
	Allergie : clindamycine +	600 mg (réinjection de 600 mg si durée > 4 h) puis 600 mg / 6 h	48 h max. Relais per os dès que possible
	Gentamicine	5 mg/kg/24 h	48 h maximum

\* Indications de la vancomycine :

- Allergie aux bêta-lactamines,
- Colonisation suspectée ou prouvée par du staphylocoque méticilline-résistant, ré intervention chez un malade hospitalisé dans une unité avec une écologie à staphylocoque méticilline-résistant, antibiothérapie antérieure,...

\* Réf: livret du CRIOGO septembre 2010.

## Propositions d'antibiothérapie en fonction du micro-organisme identifié\*

		Absence d'allergie à la pénicilline	Allergie à la pénicilline
Staphylocoques sensibles à la méticilline	Antibiothérapie initiale IV	(OX ou céfazoline) + (GEN <sup>5</sup> ou RA)	L <sup>1</sup> ou VA/TEC + GEN <sup>5</sup> ou RA Ou VA/TE + FA
	Relais oral	RA + OFX ou RA + FA <sup>2</sup> ou FA + L <sup>1</sup> ou OFX + FA ou SXT + RA	
Staphylocoques résistants à la méticilline	Antibiothérapie initiale IV	VA/TEC + (RA <sup>3</sup> ou FA <sup>3</sup> ou FOS ou doxycycline) ou L <sup>1</sup> + GEN <sup>5</sup> puis L + RA <sup>4</sup>	
	Relais oral	RA + (FA <sup>2</sup> ou L <sup>1,4</sup> ou SXT ou doxycycline ou linézolide <sup>6</sup> )	
Streptocoques	Antibiothérapie initiale IV	AMC + GEN <sup>5</sup>	L <sup>1</sup> + GEN <sup>5</sup> ou céfazoline + GEN <sup>5</sup> ou ceftriaxone + GEN <sup>5</sup>
	Relais oral	AMC ou L <sup>1</sup>	
Entérocoques	Antibiothérapie initiale IV	AMC + GEN <sup>5</sup> puis AM +/- RIF	VA/TEC + GEN <sup>5</sup> puis VA/TEC + RA
	Relais oral	AMC +/- RIF	
Anaérobies à Gram +		AMC ou céfazoline ou ceftriaxone	L <sup>1</sup>
Anaérobies à Gram -		L ou métronidazole ou AMX	L ou métronidazole
Bacilles à Gram négatif (hors <i>Pseudomonas</i> )	Antibiothérapie initiale IV	Ceftriaxone + OFX ou IMP + GEN <sup>5</sup>	
	Relais oral	OFX	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Antibiothérapie initiale IV	(CAZ ou IMP) + (AN ou CIP ou FOS) Association 3 semaines	
	Relais oral	CIP	

AMC = Amoxicilline + Ac. Clavulanique, AMX = Amoxicilline, AN = Amikacine, CAZ = Ceftazidime, CIP = Ciprofloxacine, FA = Acide fusidique, FOS = Fosfomycine, GEN = Gentamicine, IMP = Imipénème, L = Lincomycine = Clindamycine, OFX = Ofloxacine, OX = Oxacilline, RA = Rifampicine, SXT = Cotrimoxazole Triméthoprime + Sulfaméthoxazol, TEC = Teicoplanine, VA = Vancomycine.

- 1 : si souche érythromycine sensible
- 2 : cette association nécessite une surveillance régulière de la biologie hépatique
- 3 : différer la prescription de rifampicine et d'acide fusidique de 2 à 5 jours en cas de prescription conjointe avec des glycopeptides
- 4 : existence d'une interaction entre la clindamycine et la rifampicine (intérêt d'un dosage de la clindamycine car risque de sous dosage)
- 5 : durée du traitement par aminosides inférieure à 5 jours
- 6 : le linézolide n'a pas d'AMM dans cette indication. Prescription limitée à 28 jours sous surveillance clinique et biologique rapprochée.
- 7 : sous réserve de la sensibilité de l'entérocoque à l'amoxicilline.

## Posologies, voies d'administration des antibiotiques dans les infections ostéo-articulaires\*

Antibiotiques	Posologie / 24 h	Rythme et voie d'administration
Amoxicilline	100 – 200 mg / kg	4-6 injections IVL 3-4 prises orales
Cloxacilline Oxacilline	100 – 200 mg / kg (posologies majorées par rapport au Vidal – Avis d'expert)	4-6 injections IVL
Amoxicilline – acide clavulanique	100 mg / kg	4-6 injections IVL 3-4 prises orales
Céfazoline	50 – 80 mg / kg	4-6 injections IVL ou IVSE <sup>1</sup>
Céfotaxime	100 – 150 mg / kg	3 injections IVL
Ceftriaxone	30 – 35 mg / kg	1-2 injection(s) IVL
Ceftazidime	100 mg / kg	IVSE <sup>1</sup> ou 3-4 injections IVL
Imipénème	2 à 3 g	3-4 administrations IV ou IM
Méropénem	3 à 6 g	3 administrations IV
Vancomycine <sup>2</sup>	40-60 mg / kg	IVSE <sup>1</sup>
Teicoplanine <sup>2</sup>	12 mg / kg / 12 h pendant 3-5 jours puis 12 mg / kg	IVL / IM ou SC
Gentamicine	3-4 mg / kg	1 administration IV 30 minutes
Amikacine	15 mg / kg	1 administration IV 30 minutes
Ofloxacine	400 – 600 mg	2-3 prises orales
Lévofloxacine (hors AMM)	500-750 mg	1 prise orale 1 injection IVL
Ciprofloxacine	1500 – 2250 mg 800 – 1200 mg	2-3 prises orales 2-3 injections IVL
Clindamycine	1800 – 2400 mg	3-4 injections IVL 3 prises orales
Rifampicine	10 à 20 mg / kg	2-3 prises orales
Acide fusidique	1500 mg	2-3 prises orales
Fosfomycine	150 – 200 mg / kg	3-4 administrations 120 minutes
Cotrimoxazole	3200 mg / 640 mg	2 prises orales
Minocycline Doxycycline	200 mg	2 prises orales
Linézolide (Hors AMM)	1200 mg	2 prises orales 2 injections IVL

1 – IVSE : débiter par une dose de charge (1/4 ou 1/3 de la dose par 24 heures) à passer en 1 heure pour la vancomycine ou en IVL pour la céfazoline ou la ceftazidime, puis brancher la perfusion continue immédiatement après.

2 – Dosage des glycopeptides : il sera réalisé au bout de 72 heures pour la vancomycine et après la 6<sup>e</sup> perfusion de teicoplanine (juste avant la perfusion), puis une fois / semaine pendant la durée du traitement. Les taux sériques attendus doivent être compris entre 30 et 40 µg / ml pour la vancomycine en perfusion continue et en résiduel (Cmin) pour la teicoplanine.

\* Réf: livret du CRIOGO septembre 2010.

## Modalités de prise en charge antibiotique en fonction des situations cliniques \*

Situations cliniques	Antibiothérapie probabiliste après prélèvements (en l'absence de documentation préalable) à adapter secondairement (Cf. § Propositions d'antibiothérapie en fonction du micro-organisme identifié)	Durée de l'antibiothérapie
Spondylodiscite	-Primitive : oxacilline 2 g / 4 h IV + gentamicine 4 mg/kg en 1 injection -secondaire : C3G + vancomycine	6 semaines à 3 mois en attendant les données définitives du protocole « Durée de Traitement des Spondylodiscites » (DTS)
Arthrite septique	Oxacilline ou Cloxacilline 2 g / 4 h IV +/- gentamicine 4 mg/kg/j en 1 inj. pendant 48 h en cas de sepsis sévère ou bactériémie	4 semaines
Infection sur prothèse précoce ou hémotogène avec lavage chirurgical	Vancomycine + uréïdopénicilline/inhibiteur bêtalactamase  OU  Vancomycine + C3G  A adapter en fonction de l'écologie de chaque établissement	6 semaines
Infection sur prothèse avec changement 1 temps		
Infection sur prothèse changement 2 temps court		Antibiothérapie prolongée jusqu'au 2 <sup>e</sup> temps (4 à 6 sem.) Arrêt à J15 du 2 <sup>nd</sup> temps si cultures négatives. Si cultures positives : 6 sem.
Infection sur prothèse en 2 temps long		6 semaines minimum. Prolongation à discuter en RCP.  Arrêt à J15 du 2 <sup>nd</sup> temps si cultures négatives. Si cultures positives : 6 sem.
Infection sur prothèse avec ablation sans repose		6 semaines
Ostéite chronique et infection sur matériel non prothétique ôté lors de la prise en charge		6 semaines
Infection sur matériel non prothétique laissé en place		12 semaines

\*Réf: livret du CRIOGO septembre 2010.

**Tableau 1 de l'Annexe** : Caractéristiques intrinsèques des différentes classes de ciments phosphocalciques utilisés dans le domaine biomédical.

Orthophosphates de Calcium	Formule Chimique	Abréviation	Rapport Ca/P
<b>Phosphate monocalcique</b>			
<i>anhydre</i>	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	MCPA	0,50
<i>monohydraté</i>	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	MPCM	0,50
<b>Phosphate dicalcique</b>			
<i>anhydre (monéтите)</i>	$\text{CaHPO}_4$	DCPA	1,00
<i>dihydraté (brushite)</i>	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	DCPD	1,00
<b>Phosphate octocalcique</b>			
<i>triclinique</i>	$\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_4(\text{HPO}_4)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	OCPt	1,33
<i>apatitique</i>	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2 \cdot 5(\text{PO}_4)_3 \cdot 5(\text{OH})_{0,5}$	OCPa	1,33
<i>amorphe</i>	$\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_4(\text{HPO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	OCPam	1,33
<b>Phosphate tricalcique</b>			
<i>a ou b</i>	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	TCP(a,b)	1,50
<i>apatitique</i>	$\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_5(\text{HPO}_4)(\text{OH})$	TCPa	1,50
<i>amorphe</i>	$\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	ACP	1,50
<b>Hydroxyapatite phosphocalcique*</b>			
<i>stœchiométrique</i>	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	HAP	1,67
<i>non-stœchiométrique</i>	$(\text{Ca}_{10-x})(\text{PO}_4)_6-x(\text{HPO}_4)_x((\text{OH})_{2-xx})$	PCA	1,33-1,67
<b>Phosphate tétracalcique</b>			
	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	TTCP	2,00

**Tableau 2 de l'Annexe** : Evaluation clinique et suivi des lapins, associée à l'évaluation macroscopique des pièces osseuses pour attester de la biocompatibilité des granules de DCPD- $\beta$ -TCP chargés de gentamicine en site fémoral distal et tibial proximal chez le lapin.

Lapin	Clinique	Fistules	Aspect macroscopique des pièces à J45	Aspect macroscopique des pièces à J90
O1	Prélèvement sanguin et urinaire.	-		
O2	Prélèvement sanguin et urinaire	-	TIBIA: pas de signes de rejet: ni d'écouement, ni d'encapsulation fibreuse	
O3	Prélèvement sanguin et urinaire	-	FEMUR: pas d'écouement, pas d'encapsulation fibreuse	
O4	Décès à J0			
O5	Prélèvement sanguin et urinaire.	-	FEMUR: pas de signes d'intolérance des granules	Ostéointégration avancée
O6	Prélèvement sanguin et urinaire. Décès à J2			

**Tableau 3 de l'Annexe** : Evaluation radiographique de la résorption des granules de DCPD- $\beta$ -TCP chargés de gentamicine en site fémoral distal et tibial proximal chez le lapin.

Lapin	Radiographie à J0	Radiographie à J21	Radiographie à J45	Radiographie à J90
O2	Pré et post-implantation – TIBIA proximal*	Diminution de la taille des granules - résorption	Stagnation apparente de la résorption des granules	
O3	Pré et post-implantation – FEMUR distal*	Diminution de la taille des granules, avec résorption périphérique	Continuation de la résorption des granules, mais faible	
O5	Pré et post-implantation – FEMUR distal*	Diminution de la taille des granules, avec résorption périphérique	Continuation de la résorption des granules avec diminution de leurs tailles individuelles	Cal osseux d'une fracture**. Continuation de la résorption des granules, mais surtout "ostéo-intégration"

\*Les sites témoins fémoraux et tibiaux laissés vides n'ont pas montré de comblement osseux spontané aux temps étudiés.

\*\*Fracture n'existant pas sur la radiographie de J45.

**Tableau 4 de l'Annexe:** Gentamicine ( $\mu\text{g/mL}$ ) retrouvée dans le sang des lapins non infectés implantés – au niveau fémoral distal ou tibial proximal – de granules de DCPD- $\beta$ -TCP chargés de gentamicine (G300-1%). Les prélèvements ont été réalisés arbitrairement avant l'inoculation (H0), à 1 et 4 heures (H1 et H4) et 24h (J1), 48h (J2) et 5 jours (J5) de l'intervention d'implantation des granules.

	H0	H1	H4	J1	J2	J5
LAPIN O1		<0,25	0,13	<0,25	<0,25	<0,25
LAPIN O2	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25
LAPIN O3	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	0
LAPIN O5		<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25
LAPIN O6		<0,25	0	<0,25	<0,25	Décès

**Tableau 5 de l'Annexe :** Gentamicine ( $\mu\text{g/mL}$ ) retrouvée dans les urines de 24 heures des lapins non infectés implantés – au niveau fémoral distal ou tibial proximal – de granules de DCPD- $\beta$ -TCP chargés de gentamicine (G300-1%). Les prélèvements ont été réalisés arbitrairement à 24h (J1), 48h (J2) et 5 jours (J5) de l'intervention d'implantation des granules.

	J1	J2	J5	Remarque
LAPIN O1	4,07	0,51	0,77	
LAPIN O2	0,89	0,59	0,25	
LAPIN O3	6,58	0,98	0,17	
LAPIN O5	0,34	0,68	0,27	
LAPIN O6	5,43	–	–	Décès à J2



Dr Saïd Zayane  
EA 3854 Microbiologie  
CHU Bretonneau  
bld Tonnellé  
37000 Tours

Tours, le 25 octobre 2006

Objet : Document de Saisine CL2006-019

Dr Zayane,

Le Comité Régional d'Ethique pour l'Expérimentation Animale a examiné vos documents de saisine intitulés "**Traitement local de l'infection osseuse par un biomatériau phosphocalcique résorbable, ostéoconducteur et vecteur d'antibiotique**"

Le protocole soumis est un protocole visant à étudier l'intérêt d'un traitement local de l'infection osseuse par un biomatériau phosphocalcique chargé d'antibiotique et apporté localement après curetage chirurgical des lésions d'ostéite (modèle à Staphylococcus aureus).

Espèce : Lapins

Nombre : 74

Procédures :

- 1- Prélèvements de tissus après anesthésie et avant euthanasie
- 2- Prélèvements de tissus après euthanasie
- 3- Induction d'une maladie par inoculation d'agents infectieux
- 4- Ostéotomie fémorale ou tibiale

Votre travail ne soulève pas de problèmes majeurs d'éthique. C'est un protocole toutefois assez complexe d'induction d'ostéite puis de son traitement par implants phosphocalciques chargés d'antibiotique(s). Durant le protocole, la surveillance des animaux sera accrue et des précautions suffisantes seront prises pour éviter au maximum la douleur (moyens mécanique et anesthésique). Les conditions d'hébergement, de surveillance des animaux et d'euthanasie sont en adéquation avec les recommandations en vigueur.

En conséquence, le Comité Régional d'Ethique pour l'Expérimentation Animale émet un avis favorable à la réalisation de ce protocole expérimental.

Durée de validité : du 10/05/2006 au 26/10/2006

Cordialement,

**Jacques Goré**

Vice-Président du Comité Régional d'Ethique  
Pour l'Expérimentation Animale

## Résumé en anglais

Local antibiotic treatment of osteomyelitis is based on the use of gentamicin- (or tobramycin-) loaded polymethylmethacrylate (PMMA). These two aminoglycosides are effective against most cultured orthopedic microorganisms, including *Staphylococcus aureus*, the most frequent cause of infection. The extensive use of PMMA as a Local Antibiotic Delivery System (LADS) has various disadvantages. Firstly, only a small proportion (about 5 to 17%) of the antibiotic is released by the cement (trapping effect). Secondly, the most significant problem is that PMMA is not resorbable and presents a physical obstacle to osteogenesis. A second surgical operation is therefore always required to remove the PMMA and to fill the cavity caused by bone loss with a bone graft or a synthetic substitute. Several absorbable synthetic substitutes, such as calcium phosphate ceramics, calcium sulfate, and polymers of polylactic-polyglycolic acids, have been investigated as antibiotic carriers. These synthetic substitutes are largely underused as LADS in clinical practice. Polymers are not perfectly biocompatible, and ceramics provide a burst release of antibiotics as a consequence of their manufacturing techniques (Antibiotic adsorption onto the carrier, after sintering of the carrier at high temperature, 1000-1200°C). We have developed a possible alternative to gentamicin loaded-PMMA for local treatment of osteomyelitis in the form of novel calcium phosphate cement (CPC): dicalcium phosphate dihydrate- $\beta$ -tricalcium phosphate (DCPD- $\beta$ -TCP). The biocompatibility of such a cement has been demonstrated experimentally and has been clinically confirmed for the treatment of burst fractures and for filling bone cavities in osteoporotic fractures. DCPD- $\beta$ -TCP is made in granules from 2 to 3 mm in diameter to avoid the superficial "creeping substitution" observed when DCPD- $\beta$ -TCP is used as a cement block.

We first tested six preparations *in vitro*: 2 quantities of granules (300 mg and 600 mg), each loaded with 3 concentrations of gentamicin (1% (10 mg/g), 2% (20 mg/g) and 3% (30mg/g)) to select the preparation for testing in the *in vivo* experiments. We evaluated the pharmacokinetics of antibiotic release from these preparations, and the antimicrobial activity of the gentamicin released by testing it against *S. aureus* ATCC 25923. The aim was to establish whether the antibiotic released, originally mixed with DCPD- $\beta$ -TCP powder, with an exothermic reaction of about 43°C, effectively conserved its normal antibacterial activity. Secondly, we explored the biocompatibility and the osteoconduction properties of our LADS when implanted in rabbit tibia. Gentamicin concentrations were measured in the serum and urine to check systemic exposure. During these stages of the necessary preliminary tests, we developed our tibial osteomyelitis model according to Norden's model, preparing the experimental animal trial to test our local antibiotic treatment. In the third stage, in a reliable model of osteomyelitis, we tested the gentamicin-loaded DCPD- $\beta$ -TCP granules, and we compared them to similar (in terms of the form and antibiotic dosage) gentamicin-loaded PMMA granules.

The 600 mg DCPD- $\beta$ -TCP 1% GEN formulation (600 mg DCPD- $\beta$ -TCP granules 1% gentamicin loaded, 10 mg/g) exhibited the best release kinetics of gentamicin. It released GEN at at least 1 $\mu$ g/ml/24H ( $\geq$  MIC of *S. aureus* for gentamicin) over 42 days, and more than 10 times the MIC of *S. aureus* for gentamicin for the first seven days. The 600 mg DCPD- $\beta$ -TCP 1% GEN formulation (containing 6 mg of gentamicin) released gentamicin concentrations higher than those released from the 600 mg DCPD- $\beta$ -TCP 2% GEN (12 mg of gentamicin) and 3% GEN (18 mg of gentamicin) formulations, from the sixth day onwards. Gentamicin mixed with, and released from, DCPD- $\beta$ -TCP effectively conserved its normal antibacterial activity in all the formulations tested and the 600 mg DCPD- $\beta$ -TCP 1% GEN formulation was chosen for use in animal trials for local treatment of experimental osteomyelitis.

The preliminary *in vivo* tests confirmed the biocompatibility and osteoconduction properties of DCPD- $\beta$ -TCP and the absence of gentamicin toxicity. Our rabbit osteomyelitis model in the upper tibia showed that the osteomyelitis was acute, even after six weeks of natural evolution. Chronic histopathologic lesions were found at the edge of a central abscess, produced by the bone tissue reaction to the sclerosing agent. We suggest a new radiological scale of localized osteomyelitis for testing local antibiotic treatment, making it possible to achieve accurate randomization by eliminating diffuse osteomyelitis grades. Certain technical precautions should achieve a high rate of localized osteomyelitis, and thus avoid the need to use a large number of animals for such experiments.

No bacteriological difference was found when comparing groups of rabbits treated locally with gentamicin. Infection was cured (Bacterial count = 0) in 4 of 5 rabbits in group 1 (treated with 600 mg DCPD- $\beta$ -TCP 1% GEN) and in 3 of 5 rabbits in group 2 (treated with 300 mg PMMA 2% GEN). These results significantly different ( $P=0.0003$ ) from those for group 4 (1 of 6 rabbits cured), treated with debridement alone and group 5 (0 of 5 rabbits cured), the infected but untreated control group. Clinical (fistula), radiographic and histology scores showed that DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicin was more biocompatible than PMMA-gentamicine (fistulae:  $P=0.025$ ; radiographic lucent border:  $P=0.05$ ).

Taken together, our findings suggest that gentamicin-loaded DCPD- $\beta$ -TCP is effective for treating localized osteomyelitis. The direct contact of the antibiotic, loaded onto the LADS, with the quiescent bacteria in sclerosing tissue of chronic osteomyelitis, which are the greatest obstacle to systemic antibiotic therapy, will allow eradication of osteomyelitis. The 1% gentamicin-loaded DCPD- $\beta$ -TCP granules might constitute an optimal alternative to gentamicin-loaded PMMA, particularly as a curative antibiotic delivery system. Although the long term resorbability of DCPD- $\beta$ -TCP requires checking, its biocompatibility and osteoconduction properties, and its phosphate calcium composition which is similar to that of bone mineral components, allowing its integration in bone-tissue, will warrant its use in humans, firstly in clinical trials. The low dose 1% gentamicin-loaded DCPD- $\beta$ -TCP granules should allow its use to treat osteomyelitis, without antibiotic toxicity, even in large cavities caused by bone loss after debridement.

Keys-words: Osteomyelitis, Local antibiotic therapy, Phosphate calcium biomaterials, Granules.

### Résumé

Le traitement antibiotique local de l'infection osseuse par le polyméthacrylate de méthyle (PMMA), chargé de gentamicine ou de tobramycine, montre actuellement des limites. Ses inconvénients sont liés à la non résorbabilité du PMMA et à la rétention d'une grande partie de l'antibiotique intégré au PMMA. L'association fréquente à l'infection de pertes de substance osseuse a favorisé la recherche de vecteurs d'antibiothérapie locale, alternative au PMMA, parmi les substituts de comblement osseux résorbables et ostéoconducteurs. Les ciments phosphocalciques (CPC) pourraient devenir parmi les plus performants dans cette utilisation. Ils sont biocompatibles et offrent avec le Dicalcium Phosphate- $\beta$ -Tricalcium Phosphate (DCPD- $\beta$ -TCP), un CPC, la possibilité d'obtention d'un mélange DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine à une température de 43°C n'altérant pas l'antibiotique, contrairement aux céramiques phosphocalciques qui sont fabriquées par frittage à très haute température. Le but de notre travail était de tester *in vitro* (élué d'antibiotique) et *in vivo* (essai de traitement d'ostéite expérimentale) le DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine comme alternative possible au PMMA-gentamicine.

L'élué *in vitro* de gentamicine par 6 échantillons de granules de 2 à 3 mm de DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine [2 quantités - 300 et 600 mg granules - issues de 3 pates de ciment de concentrations 1% (10 mg de gentamicine / g de DCPD- $\beta$ -TCP), 2% (20 mg/g) et 3% (30 mg/g)] a été évaluée. Le but était de choisir, pour l'expérimentation *in vivo*, la ou les préparations présentant la meilleure cinétique de relargage de la gentamicine. Nous avons également vérifié la non-altération de la gentamicine, élue *in vitro*, par le mélange initial avec le DCPD- $\beta$ -TCP, en testant son activité antibactérienne vis-à-vis d'une souche de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. La biocompatibilité et l'ostéoconduction du DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine ont été vérifiées chez le lapin, d'abord en site osseux tibial non infecté, puis en site osseux infecté à *S. aureus* méthicilline-sensible. La toxicité, par passage systémique important éventuel de la gentamicine implantée localement, a été vérifiée. Pendant cette phase d'essais préliminaires – indispensables – nous avons développé notre modèle d'ostéite, inspiré de celui de Norden, afin de le valider pour les expérimentations suivantes. Nous avons enfin réalisé notre essai thérapeutique expérimental sur un modèle d'infection validé, avec ses caractéristiques cliniques, radiologiques, bactériologiques et histopathologiques. Le DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine a été comparé au PMMA-gentamicine.

Le meilleur profil de cinétique de relargage *in vitro* a été obtenu avec le DCPD- $\beta$ -TCP- 600 -1% (600 mg de granules de DCPD- $\beta$ -TCP chargés de 1% de gentamicine). Cette préparation a élué des concentrations de gentamicine supérieures à la CMI (de gentamicine vis-à-vis du *S. aureus*, 1  $\mu$ g/ml) pendant 42 jours et supérieures à 10 fois la CMI pendant les 7 premiers jours. A partir du 6<sup>ème</sup> jour, le DCPD- $\beta$ -TCP- 600 -1% (chargé de 6 mg de gentamicine) éluait des quantités de gentamicine plus élevées que celles éluées par le DCPD- $\beta$ -TCP- 600 -2% (600 mg de granules de DCPD- $\beta$ -TCP, chargés de 2% de gentamicine, 12 mg) et par le DCPD- $\beta$ -TCP- 600 -3% (600 mg de granules de DCPD- $\beta$ -TCP, chargés de 3% de gentamicine, 18 mg). La conservation de l'activité antibactérienne de la gentamicine élue a été confirmée. Le DCPD- $\beta$ -TCP- 600 -1% a été choisi pour être testé *in vivo*. Les tests préliminaires *in vivo* ont confirmé la biocompatibilité et l'ostéoconduction du DCPD- $\beta$ -TCP-gentamicine et l'absence de toxicité locale ou générale de la gentamicine. La validation du modèle nous a permis de vérifier que, sur le plan histopathologique, l'infection créée était toujours aiguë, même après six semaines d'évolution naturelle. Des lésions chroniques – réaction au produit sclérosant utilisé pour la création du modèle – ont été retrouvées en périphérie de la lésion centrale constituée par un abcès. La nécessité d'obtenir une infection localisée, adaptée pour tester un traitement local, nous a conduits à proposer une nouvelle classification radiologique améliorant celle de Mader. Elle devrait permettre d'éliminer les pandiaphysites au moment de la randomisation. La parfaite maîtrise des détails de l'induction de l'infection osseuse expérimentale devrait permettre de restreindre le nombre d'animaux à utiliser. La comparaison du DCPD- $\beta$ -TCP- 600 -1% et du PMMA-300-2% (300 mg de granules de PMMA, chargés de 2% de gentamicine) a montré une guérison bactériologique comparable de l'ostéite expérimentale pour les 2 biomatériaux (dans l'ordre 4 lapins 5 vs. 3 lapins sur 5;  $p > 0,5$ ), mais nettement supérieure au curetage-lavage-débridement seul et au contrôle ( $P = 0,0003$ ). La constatation clinique et l'évaluation radiologique ont mis en évidence une meilleure tolérance du DCPD- $\beta$ -TCP par rapport au PMMA ( $p = 0,05$ ) et une meilleure reconstruction osseuse obtenue avec le premier qu'avec le second biomatériau ( $P = 0.025$ ). Ces résultats ont été confirmés par l'anatomopathologie.

L'ensemble de ces données suggère que le DCPD- $\beta$ -TCP- 600 -1% est efficace pour traiter une infection localisée par contact direct avec les niches bactériennes propres à l'ostéite chronique. Ces niches constituent le principal obstacle à la pénétration de l'antibiothérapie systémique dans le tissu osseux. Le DCPD- $\beta$ -TCP- 600 -1% offrirait une véritable alternative au PMMA-gentamicine, en particulier dans les indications de traitement par antibiothérapie locale curative. La résorbabilité à long terme du DCPD- $\beta$ -TCP nécessite d'être vérifiée par une étude avec un plus long recul. Cependant, la biocompatibilité du DCPD- $\beta$ -TCP, sa résorption partielle, ses propriétés ostéoconductrices – mais aussi sa constitution phosphocalcique proche de celle du minéral osseux – lui permettant d'être intégré dans le tissu osseux devraient l'autoriser à être utilisé dans des essais cliniques. L'efficacité du faible dosage DCPD- $\beta$ -TCP- 600 – gentamicine 1% *in vitro* et son efficacité *in vivo* pourrait permettre de traiter des infections osseuses même étendues, après un curetage carcinologique des séquestres, sans la crainte de toxicité.

Mots-clés: osteomyélite, *S. aureus*, traitement antibiotique local, ciment phosphocalcique, granules.