

Université de Montréal

**Suivi bactériologique et cytologique post-traitement du  
liquide articulaire lors d'arthrite septique expérimentale  
chez le veau**

par

DAVID FRANCOZ

11615609

Département de sciences cliniques  
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)  
en sciences vétérinaires  
option sciences cliniques

Novembre 2004



© David Francoz, 2004

SF  
607  
U54  
2005  
v.011

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Suivi bactériologique et cytologique post-traitement du liquide articulaire lors d'arthrite  
septique expérimentale chez le veau.

présenté par :

DAVID FRANCOZ

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Sheila Laverty, présidente-rapporteuse

Dr André Desrochers, directeur de recherche

Drs Pascal Dubreuil et Gilles Fecteau, co-directeurs

Dr Serge Messier, membre du jury

## Résumé

Les objectifs de cette étude étaient de créer un modèle expérimental d'arthrite septique chez le veau et d'évaluer l'effet d'un traitement médical sur les paramètres cytologique, bactériologique et les concentrations des métalloprotéinases (MMP) du liquide synovial.

Les tarses droits de 7 veaux Holstein mâles en santé, âgés de 13 à 19 jours, ont été inoculés avec une souche d'*Escherichia coli pap* positive (Jour 1). Une antibiothérapie a été instaurée du Jour 2 au Jour 21 inclusivement (ceftiofur, 1 mg/kg, q 12 hrs, IV). Un lavage articulaire a été réalisé au Jour 2. Des échantillons de liquide synovial ont été prélevés stérilement chaque jour jusqu'au Jour 4, puis tous les 4 jours jusqu'au Jour 24. Les prélèvements ont été soumis à une analyse cytologique et bactériologique, la recherche du facteur *pap* par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et la détermination des niveaux des MMP-2 et -9. Un examen physique était effectué quotidiennement.

Tous les veaux présentaient des signes cliniques d'arthrites septiques du Jour 2 au Jour 9. Au Jour 2, toutes les cultures bactériennes étaient positives pour *E. coli*. Au Jour 8, elles étaient toutes négatives. Les résultats de PCR étaient toutes positives au Jour 2, et toutes négatives au Jour 8. Un veau est redevenu positif au Jour 24. Le comptage des cellules totales et des neutrophiles étaient significativement augmentés ( $P < 0,01$ ) aux jours 2, 3, 4. Les protéines totales l'étaient du Jour 2 à 24. Au Jour 1, la MMP-2 était détectable dans tous les liquides articulaires, aucune MMP-9 n'était détectée. L'activité relative (AR) de la forme monomère et dimère de la MMP-9 était significativement augmentée du Jour 2 à 16 et du Jour 2 à 12 respectivement. L'AR de la MMP-2 était significativement augmentée du Jour 3 à 20.

Ce modèle expérimental a réussi à induire une arthrite septique. Une guérison rapide peut être espérée si le traitement est initié tôt dans le processus de la maladie. La culture bactérienne est vite négative alors que les signes d'inflammation persistent longtemps.

**Mots-clés :** Veau, arthrite septique, modèle expérimental, *Escherichia coli*, liquide synovial, cytologie, bactériologie, réaction de polymérisation en chaîne, métalloprotéinase

## Abstract

The objectives of the study were to develop an experimental model of septic arthritis in calves and to evaluate the effect of a medical treatment on cytological, bacteriological and metalloproteinases (MMP) parameters in the synovial fluid.

The right tarsus of seven healthy Holstein bull calves (13 to 19 days of age) were inoculated with an *Escherichia coli pap* positive strain (Day 1). Antibiotics were administered on Day 2 for 20 days (ceftiofur, 1 mg/kg, q 12 hrs, IV). Joint lavage was performed on Day 2. Synovial fluid samples were collected aseptically each day until Day 4, then every 4 days until Day 24. Samples were submitted for cytological examination, bacterial culture, *pap* factor determination by polymerase chain reaction (PCR), and MMP-2 and -9 evaluation. Physical examination was performed daily.

All calves presented clinical signs of septic arthritis on Day 2 and remained until Day 9. On Day 2, bacterial culture was positive for *E. coli* in all calves and remained positive in 1 calf until Day 3 and 5 calves until Day 4. PCR was positive for all calves and remained positive for 6 calves until Day 3 and 1 calf until Day 4. One calf was positive again on Day 24. Synovial fluid WBC and neutrophils counts were significantly increased on Day 2, 3, 4. Total proteins were significantly increased throughout the experiment. On Day 1, MMP-2 was detected in all synovial fluids but no MMP-9 was detected. Relative activity value (RAV) of MMP-9 monomer and dimer were significantly increased on Day 2 to Day 16, and Day 2 to 12 respectively. MMP-2 RAV was significantly increased on Day 3 to 20.

This experimental model successfully induced acute septic arthritis. Rapid recovery can be expected within a week when an appropriate treatment is instituted early in the course of the disease. Bacterial culture was negative 8 days after inoculation but clinical signs of inflammation persisted until Day 20.

**Keywords** : Calf, septic arthritis, experimental model, *Escherichia coli*, synovial fluid, cytology, bacteriology, polymerase chain reaction, metalloproteinase.

# Table des matières

Introduction	2
--------------	---

## Partie 1. Recension de la littérature

---

I. Anatomie-physiologie des articulations synoviales	6
I.1. Le cartilage articulaire	7
I.1.1. Fonctions	7
I.1.2. Histologie	7
I.1.3. Composition	9
I.2. La capsule articulaire	10
I.2.1. La membrane synoviale	10
I.2.2. Couche fibreuse	11
I.3. Le liquide synovial	11
I.3.1. Définition et rôles	11
I.3.2. Composition et aspect du liquide synovial	12
II. Réponse de l'articulation à une infection bactérienne	13
II.1. Facteurs favorisants	13
II.2. Cercle vicieux de l'inflammation	14
II.3. Destruction et réparation du cartilage articulaire	16
II.4. Passage à la chronicité	17
III. Données épidémiologiques	19
III.1. Incidence	19
III.2. Classification des arthrites septiques	19
III.3. Maladies associées	21
III.4. Agents responsables	21

III.5. Articulations touchées	23
IV. Diagnostic	24
IV.1. Signes cliniques	24
IV.2. Bactériologie	25
IV.3. Aspiration du liquide synovial	27
IV.4. Radiographie	28
IV.5. Echographie	30
IV.5.1. Capsule articulaire	30
IV.5.2. Liquide articulaire	30
IV.5.3. Cartilage articulaire	30
IV.5.4. Évaluation des tissus péri-articulaires	31
IV.6. Arthroscopie	31
V. Traitement des arthrites septiques	33
V.1. Antibiothérapie	33
V.1.1. Choix de la molécule	33
V.1.2. Choix de la voie d'administration	35
V.1.3. Durée du traitement antibiotique	38
V.2. Anti-inflammatoires	39
V.2.1. Utilisation des anti-inflammatoires non-stéroïdiens	39
V.2.2. Utilisation des anti-inflammatoires stéroïdiens	39
V.3. Lavages articulaires	40
V.3.1. Buts du lavage articulaire	40
V.3.2. Réalisation du lavage articulaire	40
V.3.3. Liquide de lavage articulaire	42
V.3.4. Nombre de lavage articulaire et fréquence de réalisation	42
V.4. Arthrotomie	43
V.5. Arthroscopie	43
V.6. Immobilisation	44
V.7. Autres traitements	44

VI. Conclusions	45
VI.1. Conclusions – Hypothèses	45
VI.2. Buts et objectifs de l'étude	46
VI.3. Retombées anticipées	47

## Partie 2. Présentation des articles

---

Article 1	49
Article 2	75

## Partie 3. Discussion et conclusion

---

I. Réalisation du modèle expérimental	99
I.1. Signes cliniques	99
I.2. Examens complémentaires	99
I.3. Réponse au traitement	100
I.4. Apparition des phlébites	100
II. Évolution de la population bactérienne	101
II.1. Culture bactériologique standard	101
II.2. Recherche des facteurs de virulence par PCR	101
III. Analyse cytologique	102
III.1. Utilité diagnostique	102
III.2. Suivi thérapeutique	103
III.3. Persistance de signes d'inflammation	103
IV. Évolution des MMP-9 et -2	104
IV.1. Évolution de la MMP-9	104

IV.2.	Évolution de la MMP-2	104
IV.3.	Utilité diagnostic	105
V.	Traitement	106
V.1.	Efficacité du traitement médical	106
V.2.	Efficacité du lavage articulaire	106
V.3.	Rôle des anti-inflammatoires	106
V.4.	Durée de l'antibiothérapie	107
VI.	Conclusion générale	108

# LISTE DES TABLEAUX

---

## *Partie I*

---

<i>Tableau I.</i>	Lésions radiographiques et leur délai d'apparition radiographique lors d'arthrite septique.	28
-------------------	---	----

## *Partie II*

---

### **Article 1. Bacteriological and PCR detection, cytological synovial fluid changes in induced infectious arthritis in calves.**

<i>Tableau I.</i>	Lameness, pain and joint swelling grade scale used for calves clinical assessment.	71
-------------------	--	----

## LISTE DES FIGURES

---

### *Partie I*

---

<i>Figure 1.</i>	Représentation d'une articulation synoviale et de la vascularisation osseuse et péri-articulaire.	6
<i>Figure 2.</i>	Structure du cartilage articulaire.	8
<i>Figure 3.</i>	Aspect macroscopique du liquide synovial.	12
<i>Figure 4.</i>	Différentes étapes de la mise en place du cercle vicieux de l'inflammation.	15
<i>Figure 5.</i>	Lésions morphologiques visibles lors d'arthrite septique.	17
<i>Figure 6.</i>	Classification des arthrites septiques en fonction de la localisation de la lésion initiale.	20
<i>Figure 7.</i>	Radiographie carpe gauche, vue dorso-palmaire.	29
<i>Figure 8.</i>	Radiographie tarse droit, vue latéro-médiale.	29
<i>Figure 9.</i>	Arthroscopie grasset vache Holstein de 3 ans.	32
<i>Figure 10.</i>	Cathéter de polyuréthane implanté dans la veine céphalique pour le traitement d'une arthrite septique du carpe.	36
<i>Figure 11.</i>	Lavage articulaire.	41

### *Partie II*

---

#### **Article 1. Bacteriological and PCR detection, cytological synovial fluid changes in induced infectious arthritis in calves.**

<i>Figure 1.</i>	Synovial fluid Whole Blood Cell count evolution for each calf during the experiment.	73
------------------	--	----

<i>Figure 2.</i>	Synovial fluid neutrophil count evolution for each calf during the experiment.	73
<i>Figure 3.</i>	Synovial fluid neutrophil percentage evolution for each calf during the experiment.	74
<i>Figure 4.</i>	Synovial fluid total protein evolution for each calf during the experiment.	74

**Article 2. Secretion of MMP-2 and MMP-9 in synovial fluids from calves with experimentally induced septic arthritis.**

<i>Figure 1.</i>	Gelatine gel zymography. Synovial fluid MMP-2 and MMP-9 composition during all the experiment study. Gelatinase weights are shown on the right. Thin band of lower molecular weight are indicated by white arrows on the right.	95
<i>Figure 2.</i>	Evolution of mean MMP-9 monomer relative activity value of the 7 calves involved in the study during the experiment.	96
<i>Figure 3.</i>	Evolution of mean MMP-9 dimer relative activity value of the 7 calves involved in the study during the experiment.	96
<i>Figure 4.</i>	Evolution of mean MMP-2 relative activity value of the 7 calves involved in the study during the experiment.	97

## Liste des abréviations

---

**ADN:** Acide désoxyribonucléique

**AINS:** Anti-inflammatoires non-stéroïdiens

**AR:** Activité relative

**IL:** Interleukine

**MMP:** Métalloprotéinase de la matrice, « Matrix metalloproteinase »

**MT-MMP:** Métalloprotéinase membranaire, « Type-matrix metalloproteinase »

**NO:** Nitroxyde d'azote

**PCR:** Amplification de polymérisation en chaîne, « Polymerase chain reaction »

**PG:** Prostaglandine

**TIMP:** Inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases, « Tissue inhibitor of metalloproteinases »

**TMS:** Triméthoprime sulfadiazine

**TNF  $\alpha$ :** Facteur nécrotique tumoral  $\alpha$ , « Tumor Necrotic Factor  $\alpha$  »

*Je te loue Père, Seigneur de la Terre et du  
Ciel, d'avoir caché cela aux sages et aux  
intelligents et de l'avoir révélé aux tout-  
petits. (Luc, 10,21)*

*Si tu tapes ta tête contre une cruche et que ça  
sonne creux, n'en déduis pas forcément que  
c'est la cruche qui est vide (Proverbe  
Chinois)*

*Y a-t-il quelque chose de plus extraordinaire  
que des beignes ? (Homer Simpson)*

## Remerciements

Au Docteur Sheila Laverty, qui me fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de maîtrise.

Au Docteur Serge Messier, qui me fait l'honneur d'accepter de faire partie de mon jury de maîtrise, et de bien vouloir supporter et encadrer ma moitié quotidiennement.

Au Docteur André Desrochers, mon directeur de maîtrise, instigateur de la première heure de ce projet, qui a su, entre autre, me faire partager ses connaissances articulaires sans pareil, et accroître mes connaissances en littérature imagée.

Au Docteur Gilles Fecteau, mon co-directeur de maîtrise et mon directeur de résidence. Je ne saurai jamais assez te remercier, il y aurait tant à dire.

Au Docteur Pascal Dubreuil, mon co-directeur de maîtrise, qui a su me conseiller et parfois même «se mouiller» avec moi.

A tous les co-auteurs de mes articles, les Docteurs Mado Fortin, Jean Sébastien Latouche, Yves Saint-Pierre, et Nathalie Simard; sans oublier Clarisse Desautels que j'ai torturée à maintes reprises, et Guy Beauchamp. Sans eux, la réalisation de ce projet n'aurait pas été possible.

Aux Docteurs Babkine, dite Marie, et Couture, dit Le Doc, aux animaliers et techniciens de l'hôpital des bovins, aux internes, Karine, Mélanie, Sidonie, Antoine, Pierre-Yves, Sylvain, Annie, Anne Marie, et Isabelle, aux résidents ou futurs nouveaux résidents, Pierre-Yves (le même) et Sébastien, et bien sûr Cécilia, pour tous les bons moments partagés.

A ma famille et mon chiffre porte bonheur, 3170. Votre soutien quotidien est extraordinaire.

Milles mercis à tous.

# INTRODUCTION



Chez les bovins, les boiteries sont à l'origine de pertes économiques importantes, d'une part en raison de pertes de production liées à la diminution de production laitière mais aussi des réformes prématurées des animaux que ces boiteries peuvent engendrer (Cook *et al.*, 2003 ; Green *et al.*, 2002 ; Warnick *et al.*, 2001). D'autre part, d'importants frais sont occasionnés par les traitements nécessaires à la guérison des animaux.

Chez les bovins, la grande majorité des boiteries (95% des boiteries) proviennent d'affections localisées au pied (Russel *et al.*, 1982). Après les affections du pied, viennent les affections des articulations ou des ligaments. Ces affections peuvent être de nature non infectieuse, comme les malformations congénitales, l'ostéochondrose, les maladies dégénératives, les arthrites à médiation immunitaire et les traumatismes. Toutefois, elles sont le plus souvent de nature infectieuse : les arthrites septiques (Russel *et al.*, 1982). Les arthrites septiques se définissent comme une atteinte d'une articulation par un agent infectieux que cela soit une bactérie, un mycoplasme, un virus, ou encore un champignon. Elles peuvent être considérées comme la deuxième cause de boiterie chez les bovins (Russel *et al.*, 1982).

Il existe trois grands types d'articulations (Weaver, 1997): (1) les articulations synoviales, diarthrose; (2) les articulations fibreuses, synostoses; (3) les articulations cartilagineuses, synchondroses ou symphyses. Parmi elles, les articulations synoviales seront la cible d'infections.

L'infection d'une articulation peut se faire par trois grandes voies (van Pelt *et al.*, 1968). Tout d'abord, elle peut avoir lieu par voie hématogène et ce phénomène se rencontre principalement chez le jeune suite à une septicémie. Elle peut aussi se faire par continuité, à la suite d'une atteinte infectieuse dans le voisinage de l'articulation. Enfin, elle peut se faire par pénétration directe du germe dans l'articulation.

Suite à l'arrivée de la bactérie dans l'articulation, une importante réponse inflammatoire va se mettre en place avec un afflux de neutrophiles, libération de médiateurs de l'inflammation et activation de cellules présentes au sein de l'articulation (Bertone, 1996).

Tous ces phénomènes concourent à la mise en place d'un cercle vicieux auto-entretenant les dommages articulaires (Bertone, 1996).

La chronicité d'une arthrite septique pourrait être la conséquence de l'impossibilité d'éradiquer l'agent causal, la persistance de matériel de la paroi bactérienne, elle pourrait aussi laisser place à une arthrite inflammatoire ou à médiation immunitaire (Weisbrode *et al.*, 2001).

Le diagnostic clinique d'une arthrite septique est posé par la concordance de plusieurs examens que sont l'examen physique, l'analyse cytologique et bactériologique du liquide synovial, la radiographie et l'échographie (Bailey, 1985 ; Rohde *et al.*, 2000).

L'identification bactériologique est un point clé dans le diagnostic de certitude des arthrites septiques. Toutefois dans l'espèce bovine, elle n'est rapportée que positive dans seulement 60% des cas (Francoz *et al.*, 2002). Une identification bactériologique négative n'excluant pas une arthrite septique, l'analyse cytologique du liquide articulaire est d'une aide précieuse lors du diagnostic différentiel précoce des affections articulaires (Rohde *et al.*, 2000). En complément à l'analyse cytologique, différentes études explorent la possibilité d'utiliser des bio-marqueurs du métabolisme articulaire, comme les métalloprotéinases de la matrice (MMPs), pour le diagnostic précoce des atteintes articulaires (Arican *et al.*, 2000 ; Clegg *et al.*, 1997b ; Hegemann *et al.*, 2002 ; Jouglin *et al.*, 2000 ; Lu *et al.*, 2004;).

Le traitement des arthrites septiques est actuellement fondé sur l'association d'une antibiothérapie précoce et de longue durée, et de lavages articulaires (Desrochers *et al.*, 2001). Des anti-inflammatoires vont souvent être associés dans le but de diminuer la douleur (Weaver, 1997).

Les antibiotiques doivent être administrés de façon précoce et de longue durée (Weaver, 1997). Il est actuellement admis qu'il doit être d'au moins 2 semaines après rémission des symptômes, voire 3 semaines (Butson *et al.*, 1994). Bien souvent, ils vont être administrés avant même la connaissance de la bactérie impliquée.

La réalisation de lavage articulaire améliore de façon très nette la guérison des arthrites septiques (Jackson *et al.*, 1998). Il permet un nettoyage de l'articulation, une diminution des débris de fibrine et des produits de l'inflammation (Jackson *et al.*, 1998). La réalisation technique de ces lavages est un inconvénient majeur à leur application sur le terrain. Ce lavage doit se faire souvent 3 fois, 3 jours de suite, avec 1 à 2 litres de lactate de Ringer (Jackson *et al.*, 1998 ; Desrochers *et al.*, 2001).

Une brève revue de littérature permettra d'abord d'établir les généralités des arthrites septiques des bovins. Elle abordera dans un premier temps les conditions physiologiques et patho-physiologiques des articulations synoviales. Puis, quelques données épidémiologiques seront apportées avant d'aborder la question du diagnostic et du traitement des infections articulaires. Dans une deuxième partie, les résultats d'une étude sur l'évolution de la population bactérienne et cellulaire post-traitement du liquide articulaire lors d'arthrite septique expérimentale à *Escherichia coli* chez le veau seront présentés sous la forme de 2 articles. Puis, une discussion générale et conclusions seront données.

# PARTIE I

---

## RECENSION DE LA LITTERATURE LES ARTHRITES SEPTIQUES CHEZ LES BOVINS

## I. Anato-mo-physiologie des articulations synoviales

Une articulation synoviale est composée de trois entités différentes qui interagissent les unes avec les autres. Il s'agit (1) du cartilage articulaire, (2) de la capsule articulaire, (3) du liquide synovial (Figure 1).

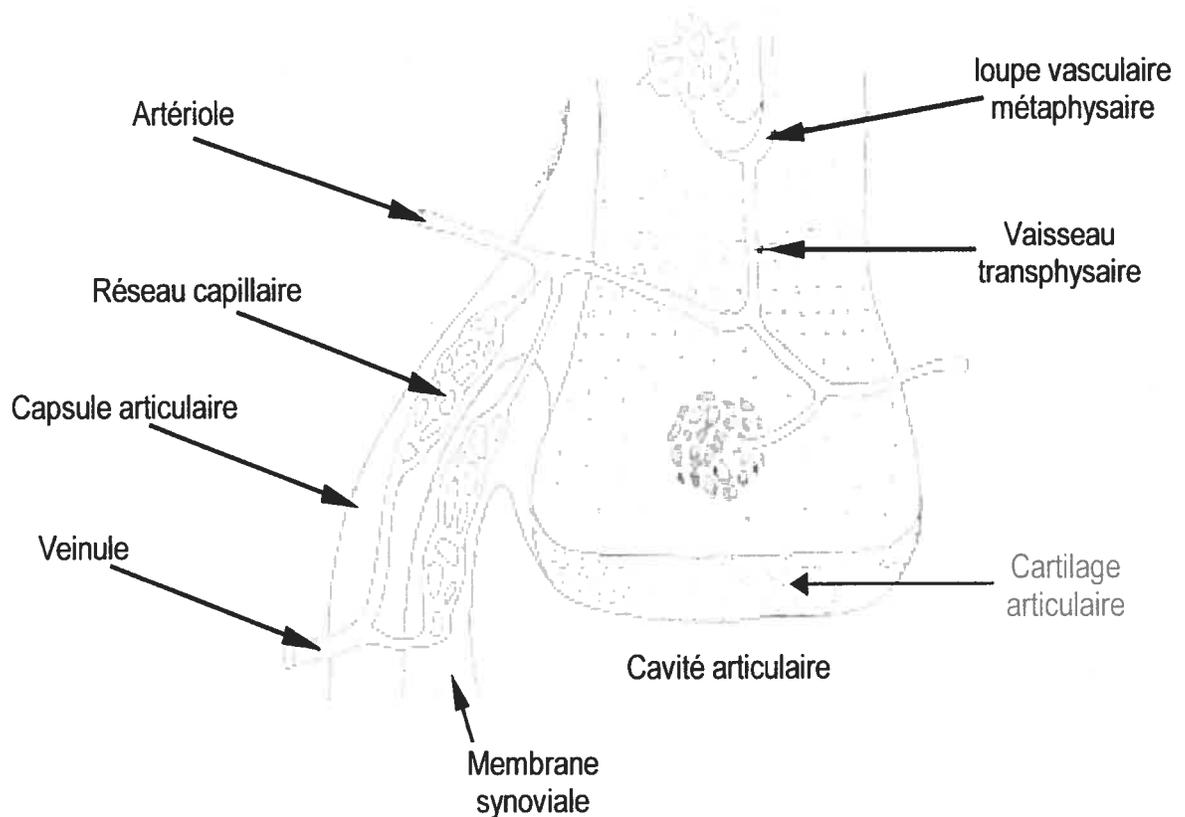


Figure 1. Représentation d'une articulation synoviale et de la vascularisation osseuse et péri-articulaire. D'après MARTENS R.J., AUER J.A., CARTER G.K. (Martens *et al.*, 1986)

## **I.1. Le cartilage articulaire**

Le cartilage articulaire est la structure qui recouvre l'épiphyse des os intervenant dans l'articulation.

### **I.1.1. Fonctions**

Le cartilage articulaire joue différents rôles au sein de l'articulation. Il va tout d'abord diminuer les forces de friction créées par le mouvement. Ensuite, il transmet les forces mécaniques à l'os sous-jacent et augmente les surfaces de contact de l'articulation sous charge (Weisbrode *et al.*, 2001). Ces fonctions vont être permises par les interactions entre les différents composants du cartilage articulaire.

### **I.1.2. Histologie**

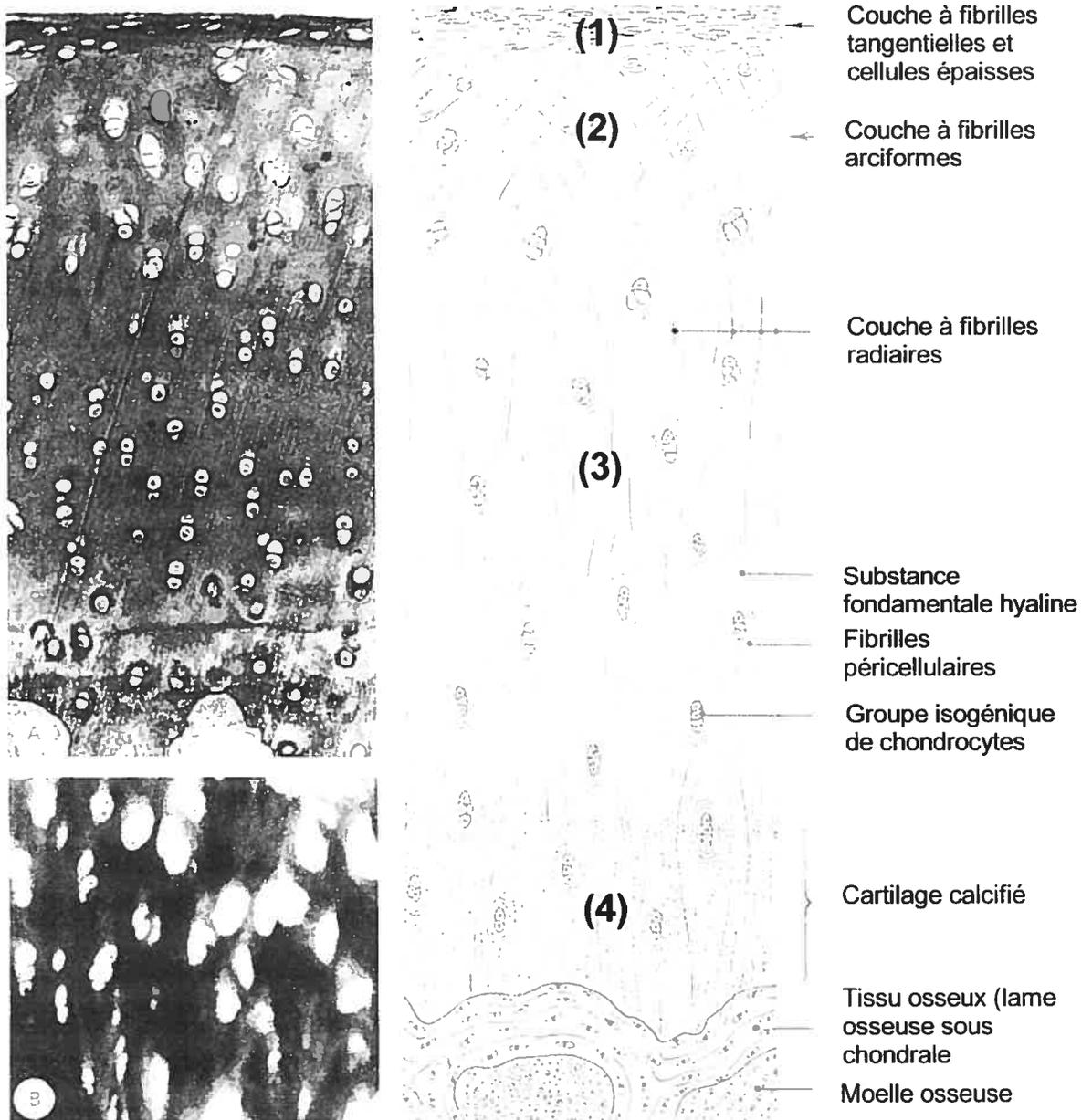
Le cartilage articulaire peut être divisé en 4 couches (Fessler, 1984) : (1) la couche superficielle, (2) la couche intermédiaire, (3) la couche profonde, (4) la couche calcifiée (Figure 2.). Une ligne étroite, mince couche de cartilage calcifié, unit solidement le cartilage articulaire à la couche minéralisée de l'os sous-chondral.

Le cartilage articulaire est dépourvu de nerf, de vaisseau sanguin et de vaisseau lymphatique. L'apport d'éléments nutritifs est assuré par le liquide synovial lors des mouvements de l'articulation (voir plus loin).

Des fosses synoviales sont macroscopiquement visibles dans le cartilage articulaire (Fessler, 1984 ; Wegener *et al.*, 1993). Ce sont des zones de dépressions physiologiques (Wegener *et al.*, 1993). Elles sont bilatérales et symétriques. Elles apparaissent tôt dans la vie post-natale et sont en rapport avec des zones de moindre appui du cartilage. Elles pourraient jouer un rôle dans la lubrification articulaire (Fessler, 1984).

En microscopie électronique, la surface du cartilage n'est pas lisse. Elle présente de nombreuses dépressions et villosités. Ces dernières pourraient avoir un rôle de réserve de liquide synovial (Fessler, 1984 ; Weisbrode *et al.*, 2001).

Figure 2. Structure du cartilage articulaire. (A) coupe totale du cartilage (Trochlée humérale de vache adulte : Glychémalun-Erythrosine ; Gr. : x 150), Schéma explicatif sur la moitié droite de la planche, (B) Faisceaux de fibres dans l'épaisseur du cartilage (Coloration Trichrome ; Gr. : x 180), (1) couche superficielle, (2) couche intermédiaire, (3) couche profonde, (4) couche calcifiée. D'après BARONE R. (Barone, 1990).



### **I.1.3. Composition**

Le cartilage articulaire est une structure très hydratée. Il est en effet composé d'environ 70% d'eau. Sa matière sèche est composée à 50% de collagène, 35% de protéoglycanes, 10% de glycoprotéines (inhibiteurs des protéases, lysozyme, fibronectine, chondronectine), 3% de minéraux, et 1% de lipides et de chondrocytes (Weaver, 1997).

#### **I.1.3.1 Chondrocytes**

Ils sont responsables de la production et du maintien du renouvellement des substances intercellulaires de la matrice (Fessler, 1984 ; Weisbrode *et al.*, 2001). Leur activité mitotique est minimale, même s'ils sont capables de produire des clones en réponse à la croissance, au remodelage, au traumatisme ou à la perte de matrice (Fessler, 1984). Ces phénomènes sont sous le contrôle d'enzymes, des protéases appelées métalloprotéinases (MMPs). Elles vont essentiellement avoir un rôle d'inhibition de l'activité mitotique.

#### **I.1.3.2 Fibres de collagènes**

Les fibres de collagène retrouvées dans les articulations sont de type II. Elles sont organisées en arcade, arcades de Benninghoff, avec une orientation tangentielle dans la couche superficielle et une orientation oblique dans la zone intermédiaire (Fessler, 1984 ; Weaver, 1997 ; Weisbrode *et al.*, 2001) (Figure 2).

#### **I.1.3.3 Agrégats de protéoglycanes**

Les agrégats de protéoglycanes sont constitués d'un core protéique auquel sont attachées des macromolécules de glycosaminoglycane. Il s'agit essentiellement de chondroïtine-6-sulfate et de kératosulfate (Fessler, 1984). Ces macromolécules de glycosaminoglycane

possèdent des propriétés électrochimiques qui vont être à l'origine d'un fort pouvoir de rétention d'eau. Ce sont elles qui vont conférer les propriétés de résistance à la compression. La taille de ces agrégats et le pourcentage d'eau retenue déterminent la viscoélasticité du tissu. C'est véritablement l'ancrage des protéoglycanes dans les fibres de collagène qui va être à l'origine du comportement en gel de la surface articulaire. Ils vont aussi être à l'origine des apports nutritifs pour les chondrocytes (Fessler, 1984 ; Weisbrode *et al.*, 2001).

## **I.2. La capsule articulaire**

La capsule articulaire se divise en deux parties, la membrane synoviale et la couche fibreuse.

### **I.2.1. La membrane synoviale**

La membrane synoviale est une membrane qui recouvre l'ensemble de la capsule articulaire, l'os intra-articulaire non recouvert par du cartilage, et les tendons ou ligaments intra-articulaires (Fessler, 1984 ; Weisbrode *et al.*, 2001). Elle est fine et présente de nombreuses villosités. Trois types cellulaires la composent (Weisbrode *et al.*, 2001):

- Cellules A ou synoviocytes. Ces cellules sont des cellules phagocytaires, qui appartiennent au « système réticulo-histiocytaire ». Elles produisent l'acide hyaluronique.
- Cellules B. Ces cellules sont des cellules de type fibroblastique qui produisent des glycoprotéines.
- Cellules C. Ces cellules sont des cellules mixtes qui ont à la fois des caractéristiques des cellules A et B.

La membrane synoviale possède des vaisseaux sanguins et des vaisseaux lymphatiques. Elle va donc permettre le drainage des structures intra-articulaires. Il va y avoir dialyse à

partir du plasma vers l'articulation de substances qui vont être enrichies en protéoglycane. Ces substances sont nécessaires à la nutrition et la lubrification des structures intra-articulaires (Weisbrode *et al.*, 2001). De toutes les membranes de l'organisme, elle fait partie de celles dont le rôle de barrière est le moins prononcé, elle est considérée comme la membrane la plus permissive au passage de molécules de l'organisme (Fessler, 1984).

### **I.2.2. Couche fibreuse**

La couche fibreuse recouvre la membrane synoviale pour former la « coque » de la capsule articulaire. Elle va assurer la stabilité et la fixation sur l'os au niveau des extrémités de l'articulation.

## **I.3. Le liquide synovial**

### **I.3.1. Définition et rôles**

Le liquide synovial peut être considéré comme un liquide de dialyse du plasma enrichi en protéoglycanes. Il a deux rôles principaux qui sont la nutrition et la lubrification des structures intra-articulaires (Weisbrode *et al.*, 2001).

Ce sont les mouvements de l'articulation qui vont permettre les mouvements de liquide synovial au sein de l'articulation et donc les mouvements des éléments nutritifs et des déchets. Au niveau du cartilage articulaire, ce sont les mouvements des molécules d'eau liées au protéoglycane qui sont à l'origine des échanges entre le cartilage articulaire et le liquide synovial. Lorsque le cartilage est soumis à une pression (lors de mouvements), les molécules d'eau vont fuir le cartilage articulaire, drainant les déchets du catabolisme articulaire vers le liquide synovial. Lorsque la pression cesse, les molécules d'eau

retournent dans le cartilage articulaire apportant les éléments nutritifs à partir du liquide synovial.

La lubrification de l'articulation dépend de quatre facteurs (Weisbrode *et al.*, 2001): (1) les inégalités microscopiques du cartilage articulaire, (2) l'élasticité du cartilage articulaire, (3) l'hydratation du cartilage articulaire, (4) la présence de mucine dans le liquide synovial. La mucine est composée de l'association d'acide hyaluronique et de glycoprotéines. L'acide hyaluronique et les glycoprotéines sont synthétisés par les cellules de la membrane synoviale. La lubricine est la glycoprotéine la plus importante pour la lubrification des articulation synoviales (Simkin, 2000).

### I.3.2. Composition et aspect du liquide synovial

Le liquide synovial est pratiquement dépourvu de cellules (moins de  $2 \times 10^9$  cellules par litre). La population cellulaire est composée à 50% de lymphocytes, 40% de monocytes et 10% de neutrophiles (Rohde *et al.*, 2000 ; van Pelt *et al.*, 1963a). La concentration en protéine du liquide synovial est relativement faible (Weaver ,1997) (moins de 18 g/L). Macroscopiquement, il s'agit d'un liquide clair, incolore et très visqueux (van Pelt *et al.*, 1963a ; van Pelt *et al.*, 1963b) (Figure 3).

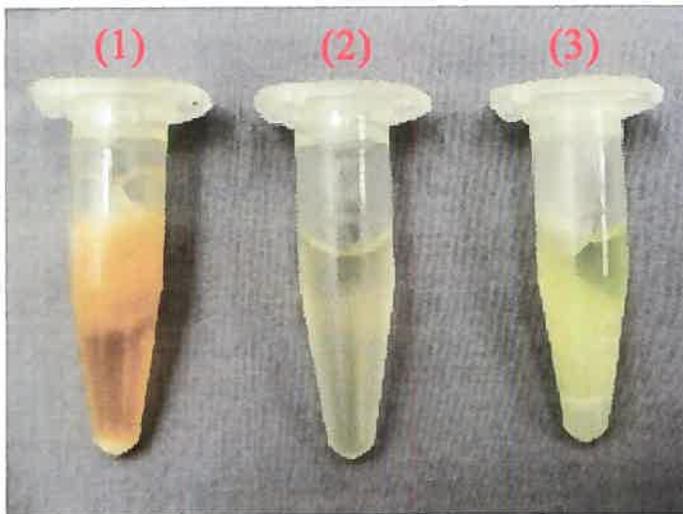


Figure 3. Aspect macroscopique du liquide synovial. (1) liquide synovial avec contamination sanguine, caillot de couleur rougeâtre, (2) liquide synovial normal, (3) liquide synovial lors d'arthrite septique, caillot de fibrine blanchâtre. (Cliché : Faculté de médecine vétérinaire, Saint-Hyacinthe, Québec).

## **II. Réponse de l'articulation à une infection bactérienne**

Les arthrites septiques peuvent être primaires, conséquences de l'introduction directe d'un microorganisme dans l'articulation, secondaires, lors d'extension d'un processus infectieux situé à la périphérie de l'articulation, ou tertiaires, lors de la propagation hémotogène d'une infection située ailleurs dans l'organisme. Quelle que soit la cause primaire, la lésion que subit l'articulation est à l'origine d'un processus inflammatoire au niveau des capillaires de la membrane synoviale. Il y a apparition d'une synovite, point de départ de l'arthrite septique (Bertone, 1996 ; Weisbrode *et al.*, 2001).

### **II.1. Facteurs favorisants**

La nature même de l'articulation peut expliquer pourquoi elle est le site préférentiel d'atteinte microbienne lors de septicémie. Tout d'abord, la présence d'un très fin réseau de capillaires au niveau de la capsule articulaire va permettre aux bactéries de se localiser en périphérie de l'articulation (Figure 1). Ce réseau se comporte en effet comme un véritable filtre qui va retenir les bactéries dans la capsule articulaire. De plus, selon certains auteurs, la membrane synoviale serait plus perméable aux micro-organismes que les autres membranes (Bailey, 1985 ; Fessler, 1984). Le passage des bactéries de la circulation sanguine vers l'articulation est donc favorisé par la structure de l'articulation synoviale.

Ensuite, la nature eutrophique du liquide synovial et le peu de défense de l'articulation contre les agressions, sont favorables à la multiplication bactérienne au sein de l'articulation (Prave, 1982).

## II.2. Cercle vicieux de l'inflammation

Le processus inflammatoire lié à l'infection est à l'origine de la libération de différentes substances entraînant la destruction du cartilage et la mise en place d'un cercle vicieux (Figure 4).

Suite à la synovite, il y a un afflux massif de cellules inflammatoires, en premier lieu des neutrophiles. Les neutrophiles, vont libérer des enzymes lysosomiales et des protéases capables de dégrader le protéoglycane ou le collagène.

De même, des MMPs présentes sous formes inactives dans la matrice vont être activées par les cellules inflammatoires (Bertone, 1996 ; Weisbrode *et al.*, 2001). Ces MMPs sont des protéinases dépendantes du calcium et du zinc (Beaudeau *et al.*, 2003). Elles jouent un rôle physiologique important dans la régénération de la matrice extracellulaire (Beaudeau *et al.*, 2003 ; Mengshol *et al.*, 2002). Leur expression peut être aberrante dans certains processus pathologiques, et elles entraînent alors une dégradation irréversible et une destruction subséquentes de l'articulation (Mengshol *et al.*, 2002). Les activités de la MMP-2 et la MMP-9, deux gélatinases, ont été rapportées comme élevées lors d'atteintes articulaires chez l'homme (Cawston *et al.*, 1989 ; Koolwijk *et al.*, 1995) et différentes espèces animales (Arican *et al.*, 2000 ; Clegg *et al.*, 1997b ; Coughlan *et al.*, 1995). Chez les bovins, l'activité de la MMP-9 serait augmentée lors d'arthrite septique, et l'activité de la MMP-2 le serait lors d'arthrite aseptique (Arican *et al.*, 2000). L'influx de neutrophiles lors d'arthrite septique pourrait être à l'origine de la libération de forme latente de MMP-9 et en conséquence d'une augmentation de son activité (Clegg *et al.*, 1997a ; Makowski *et al.*, 2003).

Enfin, la réaction inflammatoire est à l'origine d'une libération d'interleukine 1 (IL-1) et de Facteur Nérotique Tumoral  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) par les macrophages activés par les neutrophiles. L'IL-1 est à l'origine de la sécrétion de prostaglandines, de monoxyde d'azote et de protéases neutres par les fibroblastes de la membrane synoviale et les chondrocytes. Les prostaglandines et le monoxyde d'azote inhibent la synthèse de protéoglycane par la

membrane synoviale et les chondrocytes. L'ensemble de ces phénomènes résulte donc en une perte de protéoglycane du cartilage (Bertone, 1996).

Cette perte nuit à la bonne lubrification de l'articulation et donc conduit à des dommages mécaniques du cartilage articulaire. Ces dommages du cartilage articulaire vont eux aussi être à l'origine de la libération d'enzymes lysosomiales, de protéases et de l'activation de MMPs (Bertone, 1996). Le cercle vicieux est alors installé.

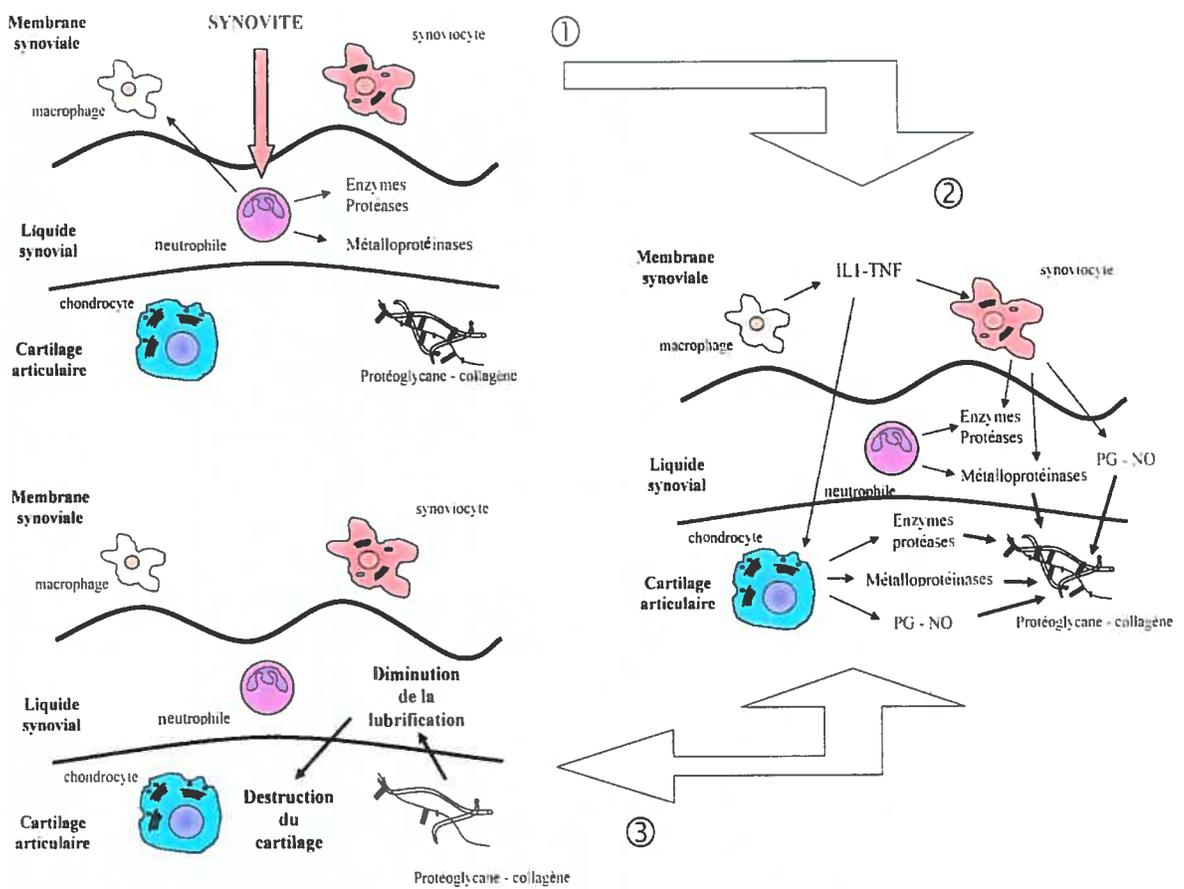


Figure 4. Différentes étapes de la mise en place du cercle vicieux de l'inflammation.

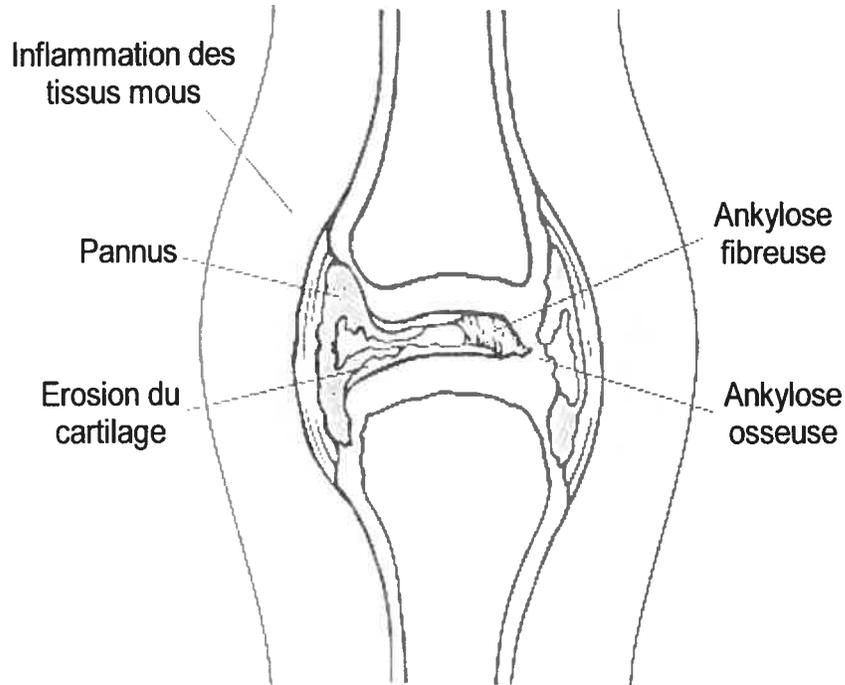
### II.3. Destruction et réparation du cartilage articulaire

Les traumatismes superficiels du cartilage articulaire vont rarement guérir du fait de la faible capacité mitotique des chondrocytes articulaires. Par contre, si la lyse s'étend jusqu'à l'os sous-chondral, la réparation va pouvoir se faire à partir des cellules pluripotentes de l'os sous-chondral (Fessler, 1984). Cette réparation aboutira à la formation d'un cartilage hyalin ou d'un fibrocartilage. L'orientation vers l'un ou l'autre de ces cartilages dépendra des forces exercées sur l'articulation lors de la réparation (Fessler, 1984).

L'étendue et les mécanismes de destruction du cartilage sont différents selon que l'arthrite est de type fibrineuse ou purulente (Weisbrode *et al.*, 2001), cette dernière représentant la grande majorité des cas des arthrites septiques chez les bovins. Lors d'arthrite fibrineuse, il va y avoir dépôt de fibrine sur la membrane synoviale et le cartilage articulaire. Il peut alors y avoir résolution précoce avec fibrinolyse et réparation sans séquelle, le cartilage n'étant pas endommagé. Si le dépôt de fibrine est important, il peut être remplacé par du tissu fibreux. Les mouvements articulaires seront alors réduits. Lors de passage à la chronicité, les villosités de la membrane synoviale s'hypertrophient, il y a formation d'un pannus et destruction du cartilage articulaire (Weisbrode *et al.*, 2001). Lors d'arthrite purulente, il y a une destruction progressive et extensive du cartilage, et ceci jusqu'à l'os sous-chondral. Il y a formation d'un pannus et hypertrophie des villosités synoviales (Figure 5). Ce genre d'arthrite est fréquemment rencontré lors d'atteinte à *Arcanobacterium pyogenes* (van Pelt, 1970 ; Weisbrode *et al.*, 2001).

Le pannus est à l'origine de la mise en place d'un tissu fibreux et de l'ankylose de l'articulation.

Figure 5. Lésions morphologiques visibles lors d'arthrite septique. D'après BURNS D.K., KUMAR V. (Burns et al., 1997).



#### II.4. Passage à la chronicité

Dans certaines circonstances, l'arthrite septique peut devenir chronique. Cette évolution vers la chronicité s'expliquerait par plusieurs phénomènes (Weisbrode *et al.*, 2001):

- (1) Impossibilité pour l'organisme d'éliminer l'agent causal. Cela peut être le cas lorsque la colonisation bactérienne dépasse la capacité de l'organisme à l'éliminer ou encore lorsque la bactérie arrive à échapper au système immunitaire soit par des mécanismes d'échappement qui lui sont propres ou en se localisant dans des endroits où les cellules du système immunitaire peuvent plus difficilement être efficaces (entre les microvillosités de l'articulation de la membrane synoviale par exemple).

(2) Persistance de matériel de la paroi bactérienne. Il n'y a plus de bactéries vivantes, mais les débris de leur paroi non éliminés par le système immunitaire sont à l'origine d'une stimulation répétée de ce dernier.

(3) Mise en place d'une arthrite à médiation immunitaire. Il a été spéculé que certains cas d'arthrites septiques chroniques pourraient s'expliquer par la mise en place d'une arthrite à médiation immunitaire suite à une réaction croisée entre des antigènes des produits de dégradation de la paroi bactérienne et des antigènes normaux de l'articulation. En médecine bovine, il n'existe pas encore de preuves du passage probable à la chronicité par réaction immunitaire.

(4) Traumas persistants et répétés de l'articulation. Même si cela semble peu probable, cela pourrait être le cas, par exemple, lorsque les lavages articulaires et les ponctions articulaires sont répétés de façon trop rapprochée et sur une trop longue période.

## **III. Données épidémiologiques**

### **III.1. Incidence**

Peu de données sont disponibles chez les bovins pour évaluer l'incidence des arthrites septiques. Une étude menée sur des vaches laitières de plus de 8 mois en Grande-Bretagne (Russel *et al.*, 1982) rapporte une prévalence des atteintes articulaires et ligamentaires de 5,5 % des boiteries, soit la deuxième cause de boiterie chez les bovins après les affections du pied.

### **III.2. Classification des arthrites septiques**

Les arthrites septiques peuvent être classées selon la nature du mécanisme pathologique à l'origine de l'infection de l'articulation. Comme cela a été vu précédemment, elles seront ainsi classées en arthrite primaire, secondaire ou tertiaire.

Elles peuvent aussi être classées en 3 types selon l'aspect lésionnel de l'arthrite. Cette classification est décrite chez le poulain pour lequel on décrit 3 types d'arthrites septiques (Firth, 1983) (Figure 6):

- Type S (synovial). Il y a uniquement une atteinte de la membrane synoviale de l'articulation, sans atteinte de la physe ou de l'épiphyse de l'os sous-jacent.
- Type P (physaire). Il y a atteinte de la physe de l'os sous-jacent, en plus de l'atteinte articulaire.
- Type E (épipysaire). Il y a atteinte de l'épiphyse en plus de l'atteinte articulaire.

Ces trois types peuvent se retrouver simultanément lors d'infection articulaire. Cette nomenclature est parfois utilisée chez les bovins (Firth *et al.*, 1987).

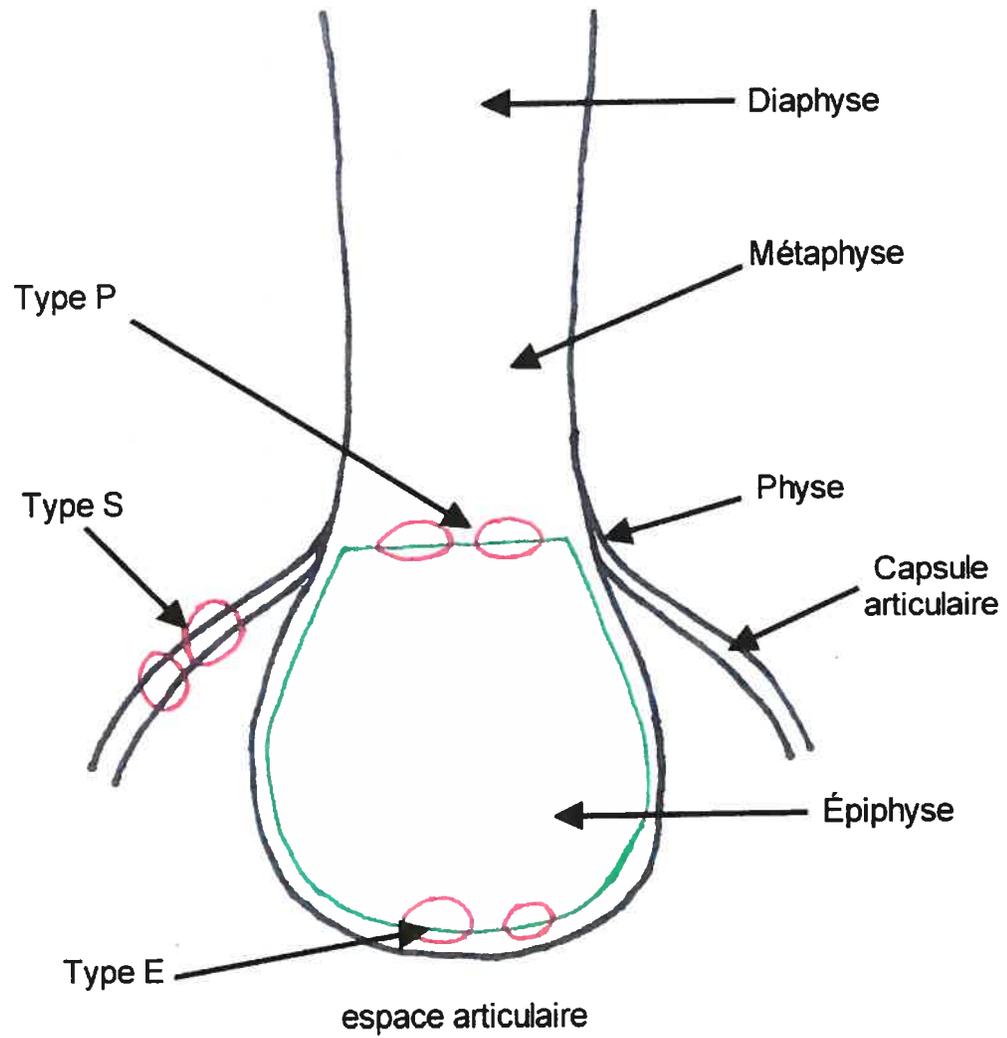


Figure 6. Classification des arthrites septiques en fonction de la localisation de la lésion initiale. D'après FIRTH E.C. (Firth, 1983).

### III.3. Maladies associées

L'âge des individus a une grande importance quant à la cause de l'arthrite septique. Les jeunes animaux ont des infections articulaires essentiellement suite à une septicémie. Ils développent majoritairement des arthrites tertiaires (Weaver, 1997). Les principales causes de septicémie chez le jeune bovin seront donc les causes primaires d'arthrites septiques chez ces animaux. Il s'agit principalement des infections ombilicales, des diarrhées néonatales, et des affections pulmonaires (Weaver, 1997). Les arthrites septiques pourront parfois être de type tertiaire chez l'adulte. Elles feront alors suite à des mammites, des réticulo-péritonites, des abcès hépatiques, ou encore des endocardites (van Pelt, 1972 ; Weaver, 1997). Les bactéries présentant les facteurs de virulence nécessaires pour leur passage dans la circulation sanguine à partir d'un foyer infectieux primaire, et donc capable d'induire une septicémie, seront naturellement plus susceptibles d'être à l'origine d'une arthrite septique de type tertiaire; c'est le cas par exemple des souches septicémiques d'*Escherichia coli*. Néanmoins, il demeure possible que des souches bactériennes ne possédant pas de tels facteurs puissent se retrouver dans la circulation sanguine si certaines conditions, comme une immunodéficience primaire ou secondaire ou encore une charge infectieuse très importante, sont réunies (Shirtliff *et al.*, 2002).

Chez l'adulte, les arthrites septiques seront plus fréquemment primaires ou secondaires (Weaver, 1997). Les arthrites primaires feront suite à un traumatisme direct à l'articulation ou à une cellulite à proximité regard de l'articulation. Les arthrites secondaires feront suite à une ostéomyélite, une ténosynovite, ou une périarthrite.

### III.4. Agents responsables

De nombreux organismes sont mis en cause lors d'arthrites septiques chez les bovins. Il s'agit essentiellement de bactéries. Parmi celles-ci, certaines sont bien connues pour posséder un tropisme particulier pour les articulations comme c'est le cas pour *Mycoplasma*

*bovis*, *Borrelia burgdorferi*, *Brucella* spp. (Weaver, 1997). D'autres bactéries peuvent être isolées lors d'arthrite septique comme *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Proteus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp, *Histophilus somni* et *Arcanobacterium pyogenes* (Firth *et al.*, 1987 ; Francoz *et al.*, 2002 ; van Pelt, 1972 ; Weaver, 1997). Toutes ces bactéries n'ont pas les mêmes facteurs de virulence et la même affinité pour la membrane synoviale. Par exemple, *S. aureus* et *Streptococcus* spp. ont une forte affinité pour la membrane synoviale, contrairement aux bactéries Gram négative comme *E. coli* (Shirtliff *et al.*, 2002). La charge infectieuse nécessaire diffère ainsi d'une espèce bactérienne à l'autre : chez le lapin l'injection intra-articulaire de  $10^5$  *S. aureus* induit des lésions articulaires sévères alors que la même dose de *S. epidermidis* ne provoque aucune lésion (Shirtliff *et al.*, 2002).

Du fait que la cause primaire diffère selon le groupe d'âge, certaines bactéries seront préférentiellement incriminées chez le jeune et d'autre chez les adultes. Les entérobactéries, les streptocoques et les mycoplasmes se retrouvent plus fréquemment chez le jeune (Francoz *et al.*, 2002 ; van Pelt *et al.*, 1966 ; Weaver, 1997). Les mycoplasmes étant des organismes à culture fastidieuse, ils n'ont pas été recherchés de façon systématique dans toutes les études, leur importance est donc certainement sous-évaluée. Les staphylocoques et les anaérobies se retrouvent plus souvent chez l'adulte (Francoz *et al.*, 2002). L'importance des bactéries anaérobies est certainement sous-estimée puisque la recherche d'anaérobie stricte n'est pas faite de façon systématique (Francoz *et al.*, 2002). *Arcanobacterium pyogenes* est néanmoins la bactérie la plus souvent isolée, puisqu'elle pourrait être isolée dans 40% des cas où la culture bactériologique de l'articulation est positive (Francoz *et al.*, 2002). Son rôle comme agent primaire ou secondaire d'arthrite septique n'est pas connu.

Le virus de la diarrhée virale bovine (BVD) a lui aussi était incriminé dans l'apparition d'arthrite septique (Madison *et al.*, 1989). De même, un syndrome a été décrit sous le nom d'arthrites idiopathiques. Les animaux présentent tous les signes cliniques et cytologiques d'une arthrite septique, mais aucune bactérie et aucun mycoplasme ne peuvent être cultivés,

et la coloration de Gram du liquide synovial est toujours négative (Madison *et al.*, 1989 ; van Pelt, 1970).

### **III.5. Articulations touchées**

Les principales articulations touchées lors d'arthrites septiques chez les bovins vont varier selon les études, néanmoins les principales articulations atteintes sont le carpe, le tarse, le boulet et le grasset (Francoz *et al.*, 2002 ; Verschooten *et al.*, 1974 ; Weaver, 1997)

Chez le jeune (moins de 6 mois) pour lequel l'infection se fait principalement par voie hémotogène, ce sont les articulations du carpe, du tarse et du grasset qui vont être le plus fréquemment atteintes (Jackson *et al.*, 1998 ; Francoz *et al.*, 2002 ; van Pelt *et al.*, 1966 ; Verschooten *et al.*, 1974). Du fait de l'importance du volume de ces articulations et de leurs culs-de-sac synoviaux, il est compréhensible que la colonisation bactérienne sera facilitée. Chez l'adulte, les articulations les plus souvent affectées sont le carpe, le tarse et le boulet (Francoz *et al.*, 2002 ; van Pelt *et al.*, 1966 ; Verschooten *et al.*, 1974 ; Weaver, 1997). Ces articulations sont régulièrement soumises à des traumatismes lors des mouvements, notamment lors du lever et du coucher de l'animal.

Une ou plusieurs articulations peuvent être impliquées chez un même animal. Chez le jeune, du fait que l'infection se fait par voie hémotogène, il y aura souvent plusieurs articulations touchées. Chez l'adulte, cela sera plus rare. On sera plus souvent confronté à des monoarthrites (Weaver, 1997).

## **IV. Diagnostic**

Le diagnostic définitif d'arthrite septique repose sur la concordance de différents examens que sont l'examen clinique, la bactériologie, la cytologie et la radiologie (Desrochers *et al.*, 2001). Tous ces examens ne sont pas effectués de façon routinière en clientèle bovine privée. La réalisation de ces examens dépend en effet du budget alloué par le propriétaire de l'animal, ainsi que des moyens à la disposition du médecin vétérinaire praticien. Néanmoins, ils sont effectués de façon routinière dans les centres de référence. Plus récemment, l'échographie et l'arthroscopie sont venus compléter ces examens.

### **IV.1. Signes cliniques**

Chez le veau, une boiterie sévère va apparaître de façon soudaine. L'animal présentera des signes généraux d'abattement, voire de décubitus, de la fièvre et de la douleur (van Pelt *et al.*, 1965). L'articulation ou les articulations atteintes seront chaudes et douloureuses. La distension articulaire n'apparaît que 24 heures après le début des signes cliniques (Weaver, 1997). Lorsque le médecin vétérinaire praticien est appelé, elle est donc déjà souvent présente. La distension est la conséquence de l'œdème périarticulaire et de l'augmentation de quantité de liquide synovial dans l'articulation (Weaver, 1997). La douleur est quant à elle une conséquence de la stimulation des terminaisons nerveuses situées dans la capsule articulaire, suite à la distension de cette dernière et aux mouvements de l'articulation (Weaver, 1997).

Chez l'adulte, les signes cliniques sont souvent moins sévères (Weaver, 1997). Il y aura une boiterie modérée à marquée, de la chaleur, de la douleur et une enflure de l'articulation palpables à la manipulation de l'articulation. La boiterie d'abord modérée, s'aggrave progressivement pour devenir sévère. Des signes généraux seront associés avec une fièvre

marginale, une diminution de l'appétit et de la production lactée, une perte de poids, et une augmentation des périodes de décubitus.

## IV.2. Bactériologie

La mise en évidence d'un agent infectieux au sein de l'articulation confirme le processus infectieux. A cette fin, lors de l'aspiration du liquide synovial, une partie du liquide est prélevé pour culture bactérienne. Pour éviter toute contamination du prélèvement et éviter l'introduction de germes dans l'articulation, le prélèvement sera effectué après une préparation stérile du site. Ce liquide doit être envoyé pour culture aérobie, anaérobie et recherche de mycoplasmes, afin que l'ensemble des germes pouvant être responsables d'arthrite septique soient recherchés (Francoz *et al.*, 2002).

La mise en évidence de bactérie est difficile à réaliser lors d'arthrite septique. La recherche d'agent bactérien n'est rapportée comme positive que dans 60% des cas (Francoz *et al.*, 2002). Plusieurs facteurs pourraient influencer la réussite de la culture bactériologique à partir d'un échantillon de l'articulation et la population bactérienne isolée. Parmi ces facteurs se trouvent la cause primaire et l'âge de l'animal (Moore *et al.*, 1992 ; Schneider *et al.*, 1992), la durée des signes cliniques avant le prélèvement (Bennett *et al.*, 1988 ; Schneider *et al.*, 1992), l'utilisation d'antibiotiques avant le prélèvement (Marchevesky *et al.*, 1999 ; Schneider *et al.*, 1992), la technique de prélèvement et de culture (Bennett *et al.*, 1988 ; Marchevesky *et al.*, 1999 ; Moore *et al.*, 1992 ; von Essen, 1997) et les types de culture demandées (aérobie, anaérobie, germes fastidieux comme les mycoplasmes) (Bennet *et al.*, 1988 ; Moore *et al.*, 1992 ; Schneider *et al.*, 1992). Il a aussi été avancé que les bactéries pourraient adhérer à la membrane synoviale, et donc qu'une simple aspiration de liquide synovial ne pourrait les mettre en évidence (Montgomery *et al.*, 1989, Shirliff *et al.*, 2002). Toutefois, la réalisation de biopsie de membrane synoviale n'augmente pas la réussite de la culture bactériologique (Madison *et al.*, 1991 ; Montgomery *et al.*, 1989 ; Nade, 2003). Enfin, les arthrites septiques pourraient être initiées par un processus infectieux rapidement contrôlé, mais auto-entretenu par l'inflammation et la destruction de protéoglycane, comme cela est fortement suspecté lors d'arthrite réactive

chez l'homme. *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis* ou encore des streptocoques  $\beta$ -hémolytiques ont en effet été impliqués comme agents étiologiques possibles de l'arthrite réactive (Taylor-Robinson *et al.*, 1999).

Différentes techniques de prélèvement ont été proposées pour améliorer l'isolement bactérien. Alors que la biopsie de membrane synoviale n'augmente pas la réussite de la culture bactérienne, l'utilisation d'une bouteille de culture diphasique avec polyanéthansulfonate de sodium (bouteille d'hémoculture) améliore l'isolement (Madison *et al.*, 1991 ; Montgomery *et al.*, 1989 ; von Essen, 1997). Le mécanisme exact qui favorise la culture bactérienne en utilisant les bouteilles d'hémoculture n'est pas connu, mais on sait que des facteurs endogènes antimicrobiens sont présents dans le liquide synovial lors d'arthrite septique, et que certaines bactéries plus fastidieuses à cultiver sont reconnues comme pouvant être la cause d'infection articulaire. Or, les principes de culture à l'aide de bouteilles d'hémoculture reposent sur : l'utilisation d'un milieu de culture riche, l'utilisation d'additifs qui éliminent les facteurs antimicrobiens endogènes ou exogènes, la réalisation d'une longue période d'incubation et enfin l'utilisation d'un plus grand inoculum pour diminuer l'effet lié à la faible densité microbienne du prélèvement (von Essen, 1997). Il est toutefois important de rappeler que les mycoplasmes ne peuvent être isolés à partir de bouteille d'hémoculture puisque leur croissance est inhibée par le polyanéthansulfonate de sodium, un anticoagulant que l'on retrouve dans la majorité des bouteilles d'hémoculture commerciales.

Le développement des méthodes de diagnostic par amplification en chaîne par polymérase (PCR) est aussi une bonne alternative à la recherche d'organismes dont la culture est difficile, comme les mycoplasmes, et permet l'obtention de résultat plus rapidement (Kempell *et al.*, 2000 ; Van der Heijden *et al.*, 1999). La mise en évidence de bactéries par PCR ne peut malgré tout pas remplacer la culture bactériologique classique qui demeure la méthode de référence (Jalava *et al.*, 2001; Shirliff *et al.*, 2002). En effet, la PCR peut être négative alors que la culture est positive (Jalava *et al.*, 2001) très certainement en raison de la présence de facteurs inhibiteurs (Cuchacovich *et al.*, 2003). De plus, la PCR ne permet

pas la détermination des sensibilités bactériennes de concentrations minimales inhibitrices utiles lors de la mise en place de traitement antibiotique.

### **IV.3. Aspiration du liquide synovial**

L'aspiration de liquide synovial est un examen complémentaire important dans le diagnostic d'une arthrite septique.

Macroscopiquement, le liquide synovial sera trouble, et il y aura une perte de viscosité. De la fibrine pourra également être visible (van Pelt *et al.*, 1968). Dans certains cas sévères, du fait de l'abondance de fibrine, l'aspiration de liquide synovial sera difficile à réaliser.

L'analyse cytologique du liquide doit être réalisée de façon systématique. Elle est d'une aide précieuse dans le diagnostic différentiel des atteintes articulaires, principalement lors de résultat bactériologique négatif (Rohde *et al.*, 2000). En l'absence de résultat bactériologique positif, toute cytologie présentant les caractères suivants devra être considérée comme celle d'une arthrite septique (Rohde *et al.*, 2000):

(1) La concentration en protéine totale sera supérieure à 45 g/L

(2) Le comptage cellulaire montrera :

Comptage cellulaire total > 25 000 cellules/ $\mu$ L

Comptage des neutrophiles > 20 000 cellules/ $\mu$ L

Pourcentage de neutrophiles > 80%

D'autres bio-marqueurs potentiellement présent dans le liquide articulaire, comme IL-1, TNF- $\alpha$  ou les MMPs, sont étudiés pour le diagnostic précoce des arthrites septiques. En médecine bovine, seules les MMPs ont fait l'objet d'une étude (Arican *et al.*, 2000).

## IV.4. Radiographie

La radiographie apporte peu de renseignements lors de la phase aiguë. Vingt-quatre heures après le début des signes cliniques, les seuls signes radiographiques visibles sont une enflure des tissus mous, avec parfois la présence de gaz et des signes d'une plaie ouverte, ou de la présence d'un abcès (Verschooten *et al.*, 2000). Quelques jours plus tard, il peut apparaître une érosion de l'os sous-chondral, un élargissement de l'espace articulaire et la formation d'os périostal et d'exostose. Suite à la disparition du cartilage articulaire, il y aura diminution de l'espace articulaire et apparition d'ostéomyélite et l'établissement d'un processus d'ankylose (Butler *et al.*, 2000). Toutes ces lésions vont se mettre en place de façon progressive, et deviennent évidentes radiographiquement lors de la deuxième semaine qui suit le début des signes cliniques. Ainsi, lors d'affection par voie hématogène, les lésions radiographiques ne sont pas visibles avant la deuxième semaine, les lésions d'ostéosclérose ne seront souvent visibles que vers la 4<sup>ème</sup> ou 5<sup>ème</sup> semaine (Butler *et al.*, 2000 ; Verschooten *et al.*, 1974) (Tableau 1).

Lésions radiographiques	Radiographiquement visible (intervalle de temps à partir du début de l'infection)
Enflure des tissus mous	à partir de quelques jours
Gaz dans les tissus mous	à partir d'une semaine
Élargissement de l'espace articulaire	à partir d'une semaine
Néoformation osseuse périarticulaire	à partir de 2 semaines
Périostéite intra et extra capsulaire	à partir de une à deux semaines
Ostéomyélite	à partir de une semaine (dès le début si cause primaire)
Collapse articulaire	à partir de une à deux semaines
Fracture et luxation pathologiques	à partir de une à deux semaines
Ostéosclérose	à partir de une à deux semaines

Tableau 1. Lésions radiographiques et leur délai d'apparition radiographique lors d'arthrite septique. D'après VERSCHOOTEN F, DeMOOR A. (Verschooten *et al.*, 1974).

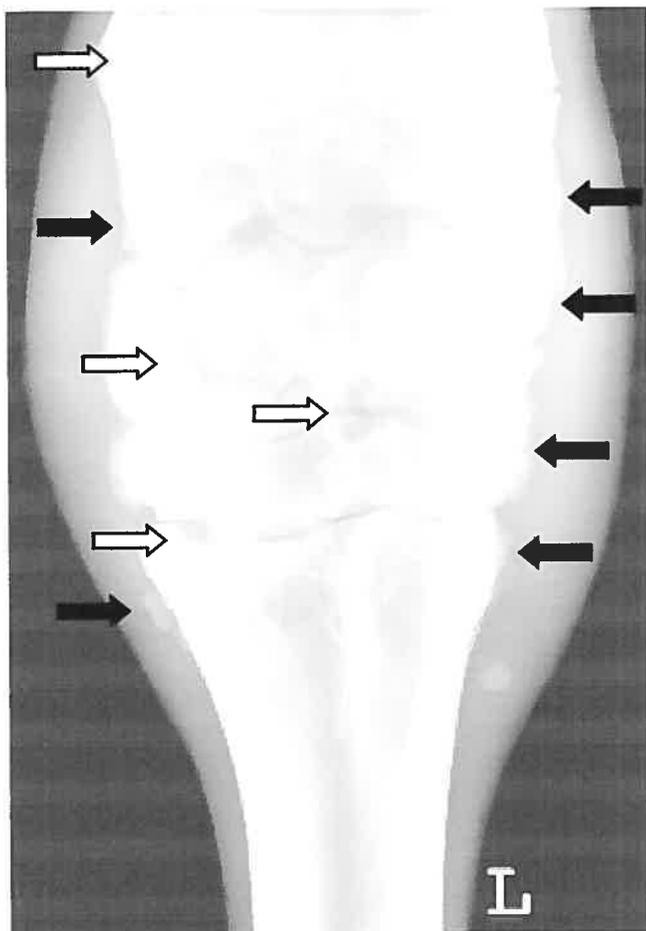
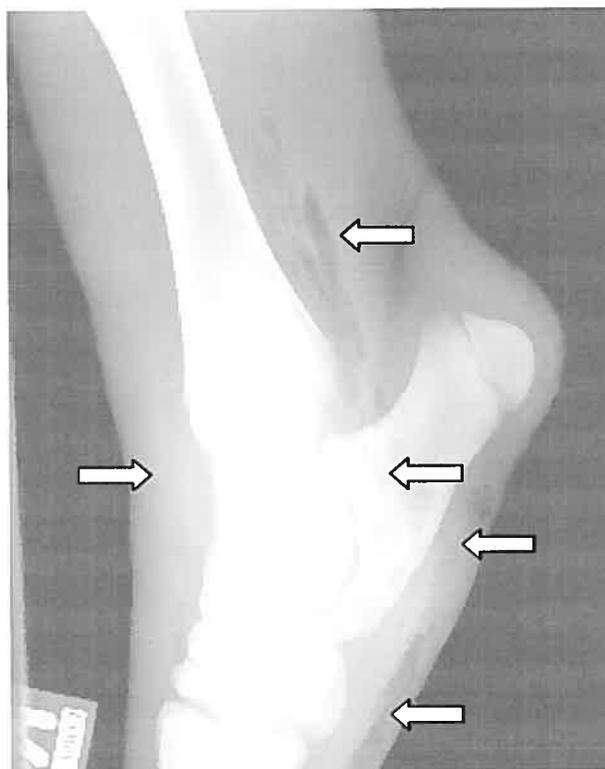


Figure 7. Radiographie carpe gauche, vue dorso-palmaire. Bovin Holstein de 15 mois. Arthrite septique du carpe gauche et ostéomyélite du métacarpe depuis 3 semaines. Flèches noires : prolifération osseuse. Flèches blanches : zone d'ostéolyse. Noter l'enflure des tissus mous et le collapsus articulaire. (Cliché : Faculté de médecine vétérinaire, Saint-Hyacinthe, Québec).

Figure 8. Radiographie tarse droit, vue latéro-médiale. Bovin Holstein de 10 jours. Arthrite septique du tarse droit depuis 5 jours. Flèches : blanches emphysèmes des tissus mous. Noter l'absence de lésion osseuse. (Cliché : Faculté de médecine vétérinaire, Saint-Hyacinthe, Québec).



## **IV.5. Echographie**

Bien qu'encore peu utilisée en médecine bovine, l'échographie articulaire peut apporter de précieux renseignements lors d'arthrite septique. Elle peut mettre en évidence des anomalies de la capsule articulaire, du liquide articulaire et du cartilage articulaire. L'échographie renseigne aussi sur l'atteinte des tissus avoisinants.

### **IV.5.1. Capsule articulaire**

Elle apparaît comme une masse échogénique dans les tissus mous (Kofler, 1997). Lors d'atteinte articulaire, un épaissement de la capsule sera visible.

### **IV.5.2. Liquide articulaire**

Il est normalement anéchoïde. Lors d'arthrite septique, il sera plus échogénique et il pourra y avoir présence de matériel intra-articulaire hyperéchoïde compatible avec des filaments de fibrine (Kofler, 1997).

### **IV.5.3. Cartilage articulaire**

Il est difficilement visible car souvent dissimulé par l'os sous-jacent qui va bloquer le passage des ultrasons, mais il peut former une petite couche hypoéchogénique à la surface de l'os. Il est normalement parfaitement lisse (Kofler, 1997). Lors d'atteinte articulaire, il pourra présenter un changement d'échogénicité et des irrégularités qui sont le signe de son érosion. Parfois même, ces érosions pourront être visibles à la surface de l'os sous-jacent.

#### IV.5.4. Évaluation des tissus péri-articulaires

Une observation attentive des tissus adjacents pourra mettre en évidence une téno-synovite par la présence de liquide avec des filaments hyperéchogéniques compatibles avec des amas de fibrine dans les gaines tendineuses, ou une cellulite.

Cette étape est nécessaire avant chaque prélèvement articulaire afin de ne pas traverser des tissus contaminés et ainsi infecter l'articulation (Nade, 2003), principalement si le statut de l'articulation, infectée ou non, n'est pas encore connu.

### IV.6. Arthroscopie

Etant donné son coût élevé, cet examen n'est que rarement réalisé chez les bovins. Il a l'avantage d'allier le diagnostic au traitement (Munroe *et al.*, 1994) (voir plus loin).

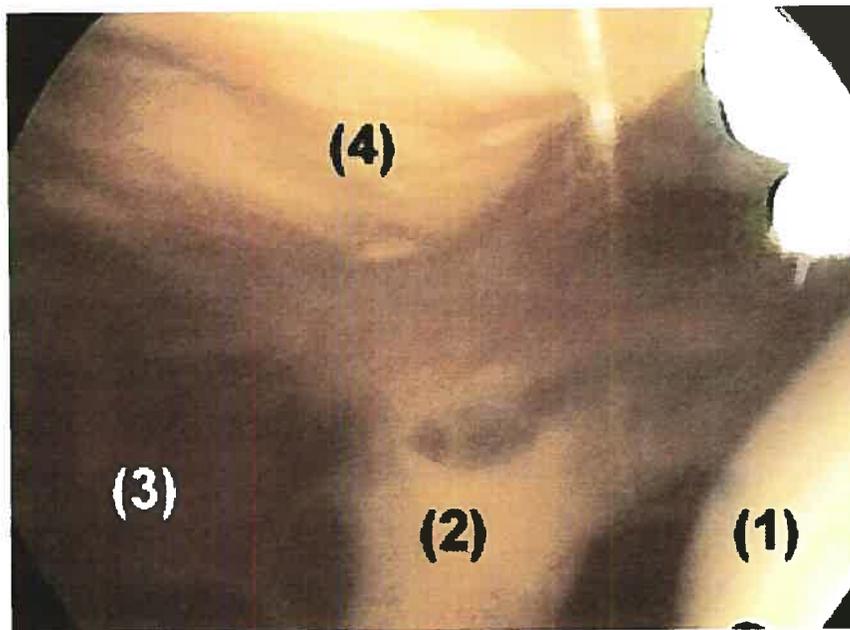
Elle permet l'investigation complète de certaines articulations, puisque que l'on peut voir directement les lésions. La membrane synoviale montre des signes d'inflammation, d'hémorragies, d'hyperplasie de ses villosités. Des dépôts de fibrine sont visibles sur le cartilage et la capsule articulaire (Figure 9). L'atteinte du cartilage peut être également bien évaluée. Lors de dommages sévères, l'os sous-chondral sera visible (Munroe *et al.*, 1994).

Figure 9. Arthroscopie grasset vache Holstein de 3 ans (1) Technique opératoire. (2) Visualisation du grasset sous arthroscopie. (1) Cartilage articulaire, (2) amas de fibrine, (3) cavité articulaire, (4) cartilage articulaire recouvert de fibrine. Cliché : Faculté de médecine vétérinaire Saint-Hyacinthe).

(1)



(2)



## **V. Traitement des arthrites septiques**

Le traitement des arthrites septiques repose sur deux points essentiels qui sont d'éliminer l'agent responsable de l'atteinte articulaire et de limiter la réaction inflammatoire à l'origine du cercle vicieux de destruction du cartilage. Ceci est réalisé par l'action conjointe d'antibiotiques, de lavages articulaires et d'anti-inflammatoires (Brown *et al.*, 1991 ; Desrochers *et al.*, 2001).

### **V.1. Antibiothérapie**

#### **V.1.1. Choix de la molécule**

Le choix d'un antibiotique est guidé par la sensibilité des bactéries pathogènes, les propriétés pharmacocinétiques de l'antibiotique et enfin par les limites réglementaires, temps d'attente et homologation, facteurs très importants dans la pratique bovine. Ainsi, dans certains pays comme les États-Unis, aucun antibiotique n'est approuvé par la « Food and Drug Administration » pour le traitement des arthrites septiques (Fajt *et al.*, 2001).

Du fait de la rapidité avec laquelle les lésions articulaires se mettent en place, il est important d'intervenir très tôt dans le traitement, il s'agit d'une urgence médicale. En médecine humaine, on considère que si le traitement antibiotique n'est pas instauré au moins dans les 4 premiers jours, des lésions irréversibles se mettent en place (Chen *et al.*, 2001), mais des lésions sévères apparaissent bien plus tôt (12 à 24 heures) lors de modèles expérimentaux chez le lapin (Goldenberg *et al.*, 1983). L'antibiothérapie doit donc être instaurée avant l'obtention des résultats de bactériologie et de l'antibiogramme. Il faut connaître les principales bactéries responsables d'arthrites septiques puisque le premier antibiotique sera toujours choisi de façon empirique.

Dans une articulation normale, la diffusion des antibiotiques est très bonne. Lors d'arthrite septique divers paramètres vont modifier considérablement cette diffusion et l'efficacité des antibiotiques dans l'articulation. Tout d'abord, le pH intra-articulaire est diminué et devient acide (Butson, 1994)(Trent *et al.*, 1991). Ensuite, l'inflammation de la membrane synoviale peut perturber les échanges, mais il est admis qu'une membrane inflammée est plus perméable. Enfin, la présence de débris tissulaires va diminuer fortement l'activité de certains antibiotiques. Des études sur des veaux atteints d'arthrites septiques ont montré une très bonne diffusion intra-articulaire de triméthoprime sulfadiazine (TMS) (Shoaf *et al.*, 1986), de pénicilline (Guard *et al.*, 1989) et d'oxytétracycline (Guard *et al.*, 1989). Pour l'ampicilline trihydrate, la présence d'une atteinte articulaire diminue sa pénétration intra-articulaire, mais la concentration intra-articulaire reste supérieure aux concentrations sériques et efficaces (Brown *et al.*, 1991).

Du fait du pH acide du liquide articulaire, les antibiotiques basiques comme la lincomycine et les macrolides vont être séquestrés sous leur forme ionisée dans le liquide articulaire.

De plus, la lincomycine est reconnue pour son grand pouvoir de pénétration dans les tissus nécrotiques et pénètre très bien dans les articulations infectées à une posologie de 10 mg/kg (Butson, 1994). L'ampicilline possède des propriétés similaires (Trent *et al.*, 1991). Inversement, la gentamicine, comme tous les aminoglycosides, est moins efficace dans les tissus nécrotiques et à pH acide (Trent *et al.*, 1991).

Les antibiotiques que l'on peut préconiser en première intention sont les  $\beta$ -lactames, les céphalosporines, les tétracyclines, le TMS, les lincosamides, et les macrolides (Bateman, 2000).

## V.1.2. Choix de la voie d'administration

Un antibiotique peut être administré par voie systémique, loco-régionale, ou intra-articulaire.

### V.1.2.1 Voie systémique

Elle est actuellement la voie d'administration la plus utilisée. Elle présente l'avantage d'être facilement réalisable. En médecine humaine, le traitement initial est toujours instauré par voie intraveineuse, puis les antibiotiques seront administrés *per os* (Nade, 2003). La durée optimale du traitement par voie intraveineuse avant le traitement *per os* n'est pas connue (Nade, 2003).

En médecine bovine, il est aussi recommandé d'administrer les premières doses par voie intraveineuse de façon à atteindre des concentrations sériques importantes rapidement. Le relais peut ensuite être pris par voie intramusculaire ou sous-cutanée (Trent *et al.*, 1991). La voie systémique a l'inconvénient de nécessiter des doses élevées et donc d'augmenter les coûts associés au traitement. De plus, les concentrations atteintes dans l'articulation ne sont pas toujours connues (Trent *et al.*, 1991).

### V.1.2.2 Loco-régionale ou intra-veineuse sous garrot

L'utilisation d'un garrot suivi de l'administration intra-veineuse d'un antibiotique permet d'obtenir des concentrations élevées en antibiotique localement avec des doses moins importantes (Trent *et al.*, 1991). Seules les articulations distales (interphalangienne, métacarpophalangienne, métatarsophalangienne, voire le carpe) peuvent facilement faire l'objet de la mise en place d'un garrot proximal. Le garrot est mis en place pendant 15-20 minutes (Figure 10). La dose d'antibiotique préconisée de façon empirique est le tiers de la dose systémique. Seules des études sur le cefazolin et le ceftiofur ont été réalisées. Une administration de 500 mg de ceftiofur HCl reconstitué à 250 mg/mL toutes les 8 heures

permet de conserver des concentrations locales efficaces (Gagnon *et al.*, 1994)(Navarre *et al.*, 1999).

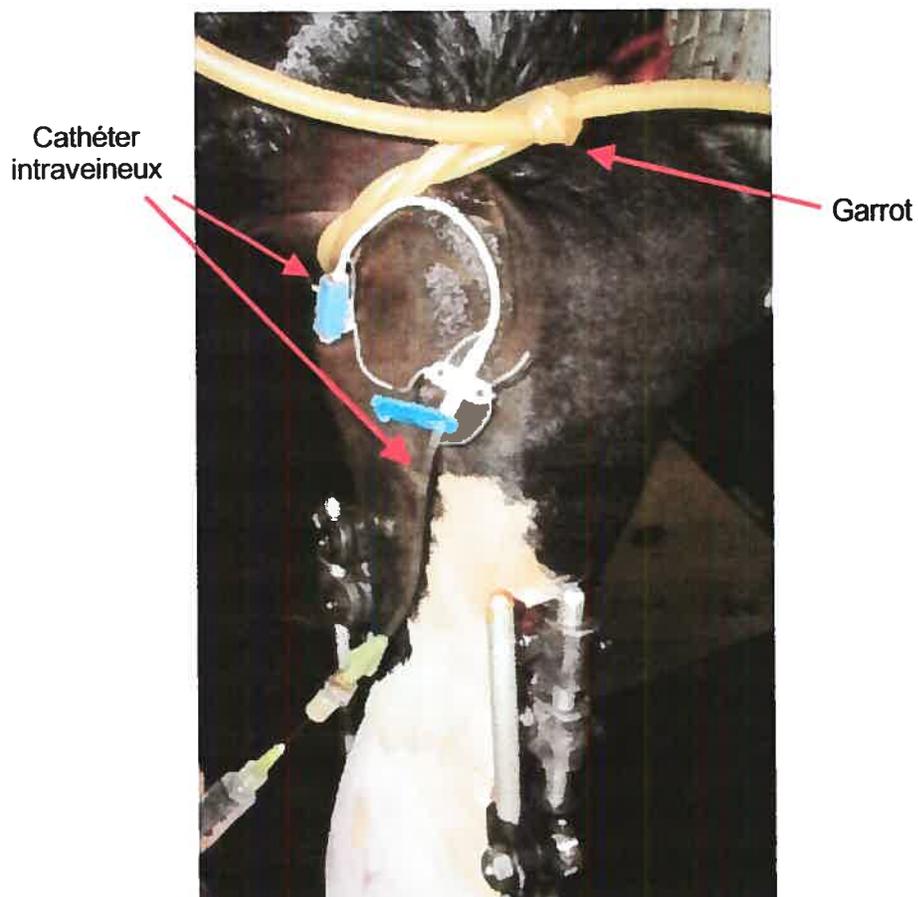


Figure 10. Cathéter de polyurethane (Central venous Catheterization Set with Blue Flexitip<sup>®</sup> catheter, Arrow<sup>®</sup> international Inc, Reading, PA, USA) implanté dans la veine céphalique pour le traitement d'une arthrite septique du carpe. Le garrot est placé proximalelement au cathéter (Cliché : Faculté de médecine vétérinaire, Saint-Hyacinthe, Québec).

### V.1.2.3 Intra-articulaire

L'utilisation d'antibiotique par voie intra-articulaire est très controversée. Certains antibiotiques sont à l'origine de synovite chimique alors que d'autres sont bien tolérés par l'articulation. Chez les bovins, la lincomycine, la pénicilline, la kanamycine et la gentamicine ne semblent pas être à l'origine d'arthrite chimique contrairement à l'oxytétracycline (Trent *et al.*, 1991).

Un équilibre rapide se produirait entre l'articulation et son environnement, les concentrations intra-articulaires d'antibiotiques ne seraient alors pas aussi élevées que souhaitées (Nade, 2003). L'utilisation d'antibiotique intra-articulaire reste encore controversée, même s'il a été montré que, chez le cheval, l'administration conjointe de gentamicine par voie systémique et intra-articulaire est à l'origine de concentrations de gentamicine dans l'articulation 10 à 100 fois supérieures aux concentrations lors d'administration par voie intra-veineuse seule (Lloyd *et al.*, 1990).

### V.1.2.4 Implants intra-articulaires imprégnés d'antibiotiques

Deux types d'implants sont utilisés chez les bovins. Les premiers à avoir été utilisés sont des billes de polyméthylméthacrylate imprégnées de gentamicine. Ces billes sont placées dans l'articulation, laissées en place pour une période de 14 jours, pour finalement être retirées si nécessaire lors d'une deuxième arthrotomie (Butson *et al.*, 1996). Le deuxième système décrit, est un système d'éponge de collagène imprégnée elle aussi de gentamicine (Hirshbrunner *et al.*, 1998). Ces billes présentent l'avantage de ne pas nécessiter de deuxième intervention pour leur retrait et elles seraient moins traumatiques pour l'articulation. La libération d'antibiotique serait aussi plus constante. Dans tous les cas, la détermination de temps d'attente reste un problème majeur lors de l'utilisation de tel système.

L'utilisation d'antibiotiques dits « temps dépendants », comme les  $\beta$ -lactames, à des concentrations plus élevées reste discutable (Fajt *et al.*, 2001). L'utilisation de systèmes d'administration locale, garrot, implant ou injection intra-articulaire dans le but

d'augmenter l'effet thérapeutique de l'antibiotique ne semble indiquée que pour des antibiotiques dits « doses-dépendants » comme la gentamicine ou les quinolones (Fajt *et al.*, 2001). Par contre, l'utilisation des antibiotiques « temps-dépendants » en administration locale reste intéressante, car elle diminue les doses utilisées et donc le coût et les effets toxiques qu'ils peuvent engendrer (Trent *et al.*, 1991).

### **V.1.3. Durée du traitement antibiotique**

La durée optimale de l'antibiothérapie n'est pas connue en médecine bovine, mais il est considéré de façon empirique que la durée du traitement antibiotique par voie systémique doit être longue, et d'au moins trois semaines. En effet, lors d'une étude menée chez le cheval, des bactéries ont été retrouvées dans l'articulation trois semaines après le début du traitement (Bertone *et al.*, 1987a). En médecine humaine, la durée de traitement préconisée varie de deux semaines à quatre mois selon les circonstances, mais en moyenne la durée de traitement est de deux à quatre semaines (Chen *et al.*, 2001). Il est donc généralement recommandé de continuer le traitement antibiotique au moins deux à trois semaines après l'amélioration des signes cliniques (Butson, 1994 ; Weaver, 1997). Cette durée de traitement est toutefois difficile à réaliser dans un contexte d'animaux de consommation.

L'antibiothérapie loco-régionale sera généralement effectuée pendant une durée de quelques jours à une semaine du fait de la difficulté d'entretien des cathéters intraveineux périphériques chez les bovins. Elle devra donc être suivie d'une antibiothérapie systémique pour que la durée totale du traitement antibiotique soit de 2 à 3 semaines après l'amélioration des signes cliniques. L'antibiothérapie par voie intra-articulaire se fera essentiellement suite au lavage articulaire (voir réalisation plus loin).

## **V.2. Anti-inflammatoires**

On peut s'interroger sur la nécessité de l'utilisation d'anti-inflammatoires en phase aiguë puisque la réaction inflammatoire est un mécanisme de défense normal de l'organisme contre l'agent pathogène. Toutefois, à la vue de la rapidité de mise en place des lésions et du cercle vicieux lié à l'inflammation, le médecin vétérinaire praticien arrive au moment où la réaction inflammatoire n'est plus bénéfique. Les anti-inflammatoires vont diminuer l'inflammation et la douleur de l'animal. Il pourra ainsi continuer à être ambulateur, ce qui diminuera les problèmes liés au décubitus et permettra à l'animal de continuer de s'alimenter normalement (Butson, 1994).

### **V.2.1. Utilisation des anti-inflammatoires non-stéroïdiens**

Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) diminuent la production de prostaglandines, thromboxanes et prostacyclines. Or, comme cela a été expliqué précédemment, les prostaglandines jouent un rôle important dans la mise en place du cercle vicieux de l'inflammation. Les principaux AINS utilisés sont la phénylbutazone, le kétoprofène et la flunixin. Chez le cheval, lors d'arthrite septique induite, la phénylbutazone semble plus efficace pour réduire la boiterie, diminuer la température de l'articulation, le volume du liquide synovial et la quantité de prostaglandines articulaires (Owens *et al.*, 1996). Aucune étude sur l'utilisation et les conséquences des anti-inflammatoires non-stéroïdiens dans le traitement des arthrites septiques chez les bovins n'a été publiée à notre connaissance.

### **V.2.2. Utilisation des anti-inflammatoires stéroïdiens**

Les corticoïdes bloquent l'activation du complément et la synthèse des prostaglandines, des thromboxanes, des prostacyclines, des leukotriènes, de l'histamine et de la kinine. Ils sembleraient donc plus intéressants à utiliser. À ces avantages s'ajoutent néanmoins leurs propriétés immunodépressives. Ils vont diminuer la migration des neutrophiles et des monocytes, diminuer la phagocytose, la présentation de l'antigène et supprimer l'immunité

cellulaire et humorale (Caron, 1999). De plus, ils sont atrophiques pour le cartilage et diminuent l'activité des chondrocytes et des ostéoblastes (Caron, 1999). Toutefois, à des doses réduites, les corticostéroïdes administrés par voie intra-articulaire conserveraient leur capacité anti-inflammatoire sans démontrer d'effet toxique sur le cartilage (Caron, 1999). Leur utilisation reste donc controversée lors d'arthrite septique aussi bien par voie systémique que locale, et ceci même si un bon traitement local a été instauré. Néanmoins, chez le lapin (Wysenbeek *et al.*, 1998), l'utilisation de corticostéroïdes intra-articulaire combinée à une antibiothérapie systémique diminue les dommages articulaires lors d'arthrite septique expérimentale. L'utilisation de corticoïdes par voie intra-articulaire à la fin de la période de lavage articulaire quand aucune bactérie ne peut être mise en évidence est rapportée avec succès chez le cheval et le bovin (Caron, 1999 ; Madison *et al.*, 1989 ; Meijer *et al.*, 2000).

### **V.3. Lavages articulaires**

#### **V.3.1. Buts du lavage articulaire**

Il est actuellement admis que, pour augmenter les chances de guérison lors d'arthrite septique, un lavage articulaire est nécessaire (Jackson *et al.*, 1998). Le but de ce lavage est double. Tout d'abord, il va permettre d'éliminer les débris de fibrine, de diminuer les concentrations des différents produits de l'inflammation et donc d'améliorer l'efficacité des antibiotiques utilisés et de diminuer les processus inflammatoires néfastes. D'autre part, il va soulager la douleur en diminuant la pression intra-articulaire par élimination d'une partie du liquide articulaire (Butson, 1994).

#### **V.3.2. Réalisation du lavage articulaire**

Deux principales techniques peuvent être utilisées (Butson, 1994). La première, injection/aspiration, consiste en l'injection de la solution de lavage dans l'articulation puis

en son aspiration et ceci à l'aide d'une aiguille montée sur une seringue. Elle présente plusieurs inconvénients. L'aspiration de tout le liquide injecté n'est pas toujours facile, et l'irrigation de l'articulation n'est pas de très bonne qualité du fait des faibles quantités de liquide pouvant être injectées.

La deuxième méthode consiste en la mise en place dans un premier temps de plusieurs aiguilles dans l'articulation. Puis, du liquide de lavage est injecté sous pression par l'intermédiaire d'une des aiguilles. Le liquide de lavage est alors éliminé passivement par les autres aiguilles (Figure 11). Le principal inconvénient de cette technique est la possibilité qu'un trajet direct se fasse d'une aiguille à l'autre sans le moindre drainage de l'articulation. Pour pallier ce problème, il est conseillé d'obstruer régulièrement les aiguilles pour distendre l'articulation avec la solution d'irrigation (Butson, 1994). Cette distension étant assez douloureuse, la contention et l'analgésie, à l'aide d'une anesthésie locale par exemple, de l'animal doivent donc être adéquates.

À la fin du lavage, un antibiotique peut être administré dans l'articulation.

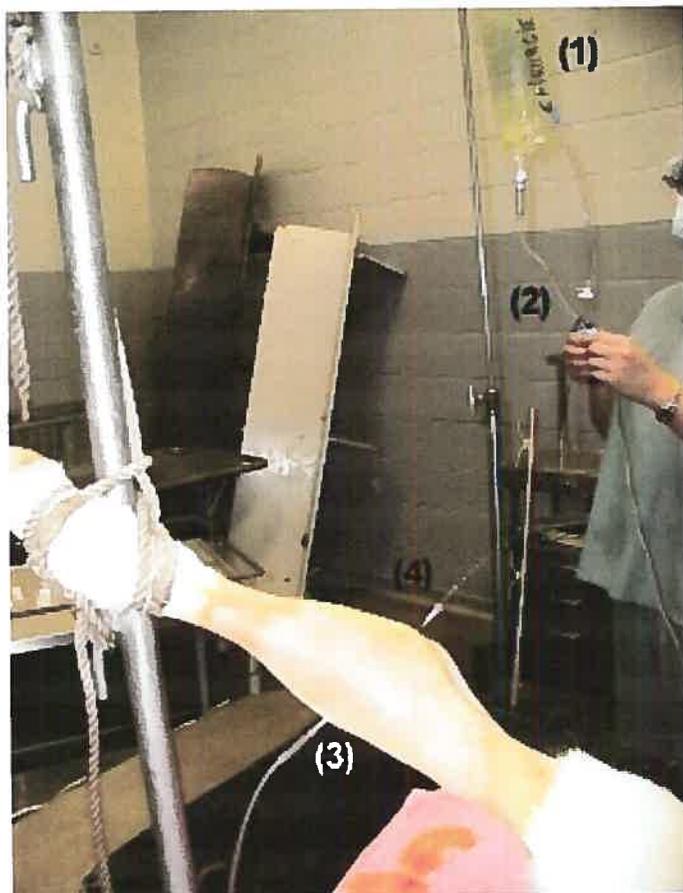


Figure 11. Lavage articulaire par injection d'une solution de lavage sous pression et élimination par des aiguilles, veau de 15 jours, arthrite septique du tarse droit. (1) liquide de lavage sous pression, (2) tubulure se rendant à l'aiguille d'entrée dans articulation, (3) aiguille d'entrée du liquide dans articulation, (4) aiguille de sortie du liquide de l'articulation. (Cliché : Faculté de médecine vétérinaire, Saint-Hyacinthe, Québec).

### **V.3.3. Liquide de lavage articulaire**

Le liquide de lavage idéal devrait être à la fois une solution isotonique polyionique, de pH neutre, non irritante pour l'articulation et bactéricide (Bailey, 1985).

La solution de Hartmann (pH= 7,4) serait la meilleure, mais il est possible d'utiliser une solution de lactate de Ringer (pH=6,7) ou de la solution saline isotonique (NaCl 0,9%) (pH=5,7) (Bailey, 1985). L'ajout d'antiseptique n'apporte aucune amélioration au traitement, voire même une diminution de l'efficacité, lorsqu'il s'agit de polyiodine (Butson, 1994). La chlorhexidine est à l'origine d'une destruction du cartilage articulaire (Bertone *et al.*, 1986). Lors de chaque lavage, l'instillation de la solution de lavage doit être faite jusqu'à ce que celle-ci ressorte claire de l'articulation. Un lavage articulaire est considéré comme réussi lorsque le comptage cellulaire du liquide articulaire est de 10 000 à 15 000 cellules/mL. Cela correspond souvent à une instillation de 1 à 2 litres de liquide de lavage (Bailey, 1985).

### **V.3.4. Nombre de lavage articulaire et fréquence de réalisation**

Trois lavages consécutifs, à 24 ou 48 heures d'intervalles, sont souvent nécessaires (Desrochers *et al.*, 2001). Il est important de ne pas auto-entretenir l'inflammation de l'articulation par des lavages trop fréquents et/ou trop nombreux (Jackson *et al.*, 1998) et, comme pour les traitements articulaires, diminuer les risques de contamination de l'articulation.

#### **V.4. Arthrotomie**

Lors d'atteinte chronique ou lors d'atteinte sévère, les dépôts de fibrine vont être tels que les lavages articulaires seront inefficaces (Bailey, 1985 ; Desrochers *et al.*, 2001; Trent *et al.*, 1991). De même, si 48 à 72 heures après l'instauration d'un traitement antibiotique, anti-inflammatoire et de lavages articulaires, aucune amélioration n'est notée, une arthrotomie doit être envisagée (Bailey, 1985 ; Desrochers *et al.*, 2001).

Le but de l'arthrotomie est de favoriser un meilleur drainage de l'articulation, d'éliminer les débris de fibrine plus facilement, et dans certains cas de favoriser une arthrodèse (Desrochers *et al.*, 2001). Cette dernière n'est réalisable que pour certaines articulations que sont le carpe, le boulet et les articulations phalangiennes. Un curetage de l'articulation sera alors effectué en plus des lavages et de l'élimination des amas de fibrine. L'articulation devra finalement être immobilisée, le plus souvent à l'aide d'une attelle (Desrochers *et al.*, 2001).

#### **V.5. Arthroscopie**

Elle consiste en l'introduction d'un fibroscope dans l'articulation. Elle présente les avantages d'assurer un bon lavage de l'articulation, une bonne élimination des amas de fibrine, et ajoute une méthode diagnostic et pronostic au traitement (Munroe *et al.*, 1994). Son utilisation est limitée par les coûts importants qu'elle entraîne en anesthésie et matériel, et par la technicité qu'elle requiert. Elle s'effectue généralement sous anesthésie générale (Munroe *et al.*, 1994). Il est néanmoins possible pour les membres postérieurs d'avoir recours à une anesthésie épidurale haute associée à une sédation et une bonne contention de l'animal.

## V.6. Immobilisation

Outre le traitement de l'infection et de l'inflammation, une part importante de la guérison va reposer sur l'importance de l'immobilisation apportée à l'articulation. D'un côté, le mouvement reste nécessaire, car il permet l'apport des nutriments et la prise en charge des déchets au sein de l'articulation et plus particulièrement au niveau du cartilage articulaire (Weisbrode *et al.*, 2001). D'un autre côté, le mouvement d'une articulation atteinte et donc mal lubrifiée entraîne des lésions du cartilage. De plus, le type de réparation du cartilage va diverger suivant l'immobilisation apportée (Fessler, 1984). Si l'articulation est complètement immobilisée, la réparation sera de nature fibreuse, et les mouvements ultérieurs pourront être réduits (Fessler, 1984).

Il est donc conseillé de restreindre les mouvements de l'animal, en l'isolant dans un box, et de ne pas immobiliser l'articulation, afin que de petits mouvements non excessifs puissent avoir lieu (Butson, 1994).

## V.7. Autres traitements

Très tôt dans l'approche thérapeutique des arthrites septiques, une tentative de restauration de la viscosité du liquide synovial a été effectuée à l'aide d'administration d'acide hyaluronique ou de glycosaminoglycane. Chez le cheval, Brusie (Brusie *et al.*, 1992) rapporte que l'injection d'acide hyaluronique après un lavage articulaire diminue de façon significative la boiterie, le diamètre de l'articulation, le comptage cellulaire du liquide synovial et la perte de protéoglycane par le cartilage articulaire. De même des injections de 1% de hyaluronate de sodium apporte une amélioration chez les vaches laitières atteintes d'arthrites septiques aiguës (Takahashi *et al.*, 1985).

La connaissance de plus en plus précise des molécules directement responsables de l'atteinte du cartilage et de la mise en place du cercle vicieux de sa destruction ouvrent des voies quant à des thérapies directement ciblées sur ces molécules. C'est ainsi le cas des possibilités d'action via les métalloprotéinases ou les interleukines. Malgré les espoirs fournis par les recherches *in vitro*, il ne semble pas y avoir encore des inhibiteurs

spécifiques et efficaces des métalloprotéinases pour un usage thérapeutique des affections articulaires (Mengshol *et al.*, 2002). De même, il n'y a pas encore de rapport d'utilisation thérapeutique avec des résultats concluants d'inhibiteurs spécifiques de cytokines dans le domaine vétérinaire.

## **VI. Conclusions**

### **VI.1. Conclusions – Hypothèses**

Suite à cette revue de littérature, plusieurs questions peuvent être posées quant aux mécanismes pathologiques, au diagnostic et au traitement des arthrites septiques.

Tout d'abord, la pathogénie des arthrites septiques repose sur l'association de phénomènes infectieux et inflammatoires. Néanmoins, l'importance relative de l'infection par rapport à l'inflammation n'est pas connue. Face au grand nombre de résultats bactériologiques négatifs, on peut se demander si les bactéries ne survivent finalement que peu de temps dans le liquide articulaire et si les processus inflammatoires qu'elles ont déclenchés sont responsables de la majorité des lésions observées.

Le diagnostic des arthrites septiques repose principalement sur les signes cliniques, les résultats de bactériologies classiques et l'analyse du liquide articulaire. En médecine bovine, il n'existe pas d'études rapportant l'utilisation de méthode de PCR pour augmenter la détection d'agents bactériens lors d'arthrite septique. Il pourrait donc être intéressant d'évaluer la faisabilité de cette technique dans cette espèce. Il en est de même pour les nombreux marqueurs de l'inflammation (IL, MMP) mis en cause dans la pathogénie des arthrites septiques.

On a également pu voir que le traitement communément admis repose sur une antibiothérapie de longue durée combinée à un lavage articulaire. Toutefois, il n'existe aucune étude évaluant la durée optimale du traitement antibiotique en médecine bovine.

Cette durée pourrait peut être plus courte et ainsi diminuer les coûts reliés à l'antibiothérapie. De plus, le rôle possible de l'inflammation dans la persistance des signes cliniques et le développement des lésions articulaires laisse une place plus importante à l'utilisation d'anti-inflammatoires ou de molécules plus spécifiques, anti-IL ou anti-MMP par exemples, dans le traitement d'arthrite septique.

Enfin, il est aussi très difficile d'effectuer une évaluation objective de la réponse au traitement. Encore une fois, les résultats de bactériologie classique sont souvent négatifs une fois le traitement mis en place, et il est difficile d'évaluer la persistance de la population bactérienne uniquement par cette méthode. Les techniques PCR pourraient être d'une aide précieuse pour le suivi de la population bactérienne après la mise en place d'un traitement. L'analyse cytologique du liquide articulaire est un outil diagnostique précieux lors d'arthrite septique, il est donc logique de penser qu'il pourra aussi être un outil important pour évaluer la réponse au traitement.

## **VI.2. Buts et objectifs de l'étude**

Les buts de notre étude étaient de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques des arthrites septiques chez les bovins et d'en améliorer le traitement. Pour cela nous avons voulu créer un modèle expérimental d'arthrite septique chez le veau. Puis, grâce à ce modèle, nous avons voulu suivre l'évolution de (1) la population bactérienne par des techniques de bactériologies classiques et PCR, (2) de la population cellulaire du liquide synovial et enfin (3) de 2 MMPs (MMP-2 et MMP-9) lors de la mise en place d'une antibiothérapie et d'un lavage articulaire.

### **VI.3. Retombées anticipées**

La durée de survie des bactéries et la durée du traitement antibiotique pourraient être ainsi connues. Les suivis de la population cellulaire et des MMPs pourraient mettre en évidence la persistance de signes d'inflammation malgré l'absence de bactéries viables et donc souligner l'importance de l'utilisation des anti-inflammatoires. Les techniques PCR et l'analyse cytologique pourraient se révéler des outils diagnostiques et de suivi thérapeutique très utiles lors d'arthrites septiques. Le rôle joué par les MMPs dans la pathogénie des arthrites septiques pourrait également ouvrir de nouvelles avenues diagnostiques mais aussi thérapeutiques.

# PARTIE II

---

## PRÉSENTATIONS DES ARTICLES

# Article I

*(Accepté Journal of Veterinary Internal Medicine)*

---

**Bacteriological and PCR detection,  
cytological synovial fluid changes  
in induced infectious arthritis in  
calves.**

Bacteriological and PCR detection, cytological synovial fluid changes in induced infectious arthritis in calves.

David Francoz DMV, André Desrochers DMV, MS, Gilles Fecteau DMV, Clarisse Desautels, Jean Sébastien Latouche DMV, Mado Fortin DMV.

Septic arthritis in calves

Département des Sciences Cliniques (Francoz, Desrochers, Fecteau) et Département de Pathologie et Microbiologie (Desautels, Latouche, Fortin), Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, CP 5000, Saint Hyacinthe, Québec, J2S 7C6.

Address correspondence and reprint requests to Dr David Francoz.

E mail: 

Acknowledgements

This work was supported by Le Fonds du Centenaire de l'Université de Montréal. The authors acknowledge Mr Guy Beauchamp for statistical analysis assistance.

**ABSTRACT**

The objective was to develop an experimental model of septic arthritis in calves and to evaluate the effect of treatment on cytological and bacteriological variables of synovial fluid. The right tarsi of 7 healthy Holstein bull calves were inoculated with  $10^8$  CFU of viable *Escherichia coli pap* positive strain (Day 1). On Day 2, joint lavage was performed and antibiotic treatment was instituted. Cytological examinations, bacterial cultures and pap factor determinations by PCR were performed on synovial fluid samples that were collected daily until Day 4, then every 4 days until Day 24. Physical examination, lameness and swelling were recorded. Clinical signs of septic arthritis appeared on Day 2 and persisted until Day 9 for all calves. Bacterial cultures from all calves were positive for *E. coli* on Day 2, and remained positive until Day 3 for 1 calf and until Day 4 for 5 calves. In addition, PCR results were positive for all calves, with 6 positive through Day 3 and 1 through Day 4, after which a positive result was again obtained on Day 24. Synovial fluid neutrophil counts and WBC were significantly increased on Days 2, 3, 4; however, synovial total protein concentrations were increased ( $P < 0.05$ ) throughout the experiment in comparison to Day 1. All bacterial cultures were negative on Day 8, though clinico-pathological signs of inflammation persisted until Day 20. This model successfully induced acute septic arthritis in calves. Rapid recovery occurred within a week when an appropriate treatment was instituted early in the course of the disease.

**KEY WORDS**

septic arthritis; cattle; *Escherichia coli*; bacterial culture; polymerase chain reaction.

Septic arthritis may occur by direct trauma or contamination of the joint, extension from periarticular infection, or hematogenously.<sup>1</sup> An acute inflammatory response occurs after bacterial contamination of the joint.<sup>2</sup> This reaction initiates a rapid influx of inflammatory cells, mostly neutrophils, as well as activation of synoviocytes and chondrocytes, release of many inflammatory mediators, and finally decreased proteoglycan synthesis.<sup>2</sup> This cascade of events ultimately leads to a reduction in joint lubrication and an increase in cartilage destruction, thus contributing to the process of joint disease.<sup>2</sup> Chronic septic arthritis may develop and may be attributed to persistent bacterial infection, presence of bacterial wall materials, or an immune mediated process.<sup>3</sup>

Diagnosis of septic arthritis is based on the combination of clinical signs, radiographic examination, bacterial culture and cytological analysis of synovial fluid.<sup>4</sup> A bacterium is isolated in only 60 % of cases of septic arthritis in bovine medicine.<sup>a</sup> Consequently, synovial fluid cytological analysis is very useful for the differentiation between infectious and non-infectious arthritis.<sup>4</sup> Treatment of septic arthritis in cattle is based on the early administration of antibiotics for a duration of 2 to 3 weeks combined with joint lavage.<sup>5,6</sup> Anti-inflammatory drugs are also recommended to reduce pain and swelling.<sup>7</sup>

Frequency of persistence of bacteria in the joint following infection and treatment is unknown in cattle. *Staphylococcus aureus* was isolated in up to 70 % of joints following 20 days of systemic antibiotic treatment in induced equine arthritis.<sup>8</sup> PCR analysis of human synovial samples reveals that bacterial DNA cannot be detected after 26 days of treatment,<sup>9</sup> although Gram stain and cultures usually become negative 3 days after the initiation of therapy. In a clinical report of a human patient with *S. aureus* septic arthritis, bacterial DNA could be detected up to 10 weeks after the initiation of an adequate antibiotic treatment.<sup>10</sup>

PCR techniques applying pathogen-specific primers<sup>10</sup> or broad-range 16S ribosomal RNA and subsequent DNA sequencing<sup>9</sup> are used for the diagnosis of septic arthritis in human medicine. The advantages of these techniques are their rapidity, their capacity to detect fastidious organisms and their capacity to detect bacteria during antibiotic treatment.<sup>11</sup>

The objectives of this study of induced septic arthritis in calves were to create a reproducible model of induced septic arthritis; to describe synovial fluid components before and after treatment; and to estimate the average survival time of bacteria after the initiation of an effective antibiotic treatment using standard bacterial culture and PCR techniques.

## MATERIALS AND METHODS

The experimental protocol was approved by the Université de Montréal Institutional Animal Care.

### **Calf selection**

Seven male Holstein calves taken from normal calvings and originating from one dairy herd were selected for the study. Within 2 hours of calving, calves were brought to the Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire de l'Université (CHUV) de Montréal and upon arrival, the umbilicus was disinfected with iodide tincture 5%. Each calf received 6 litres of pooled colostrum (60 mg/mL of IgG) within the first 24 hours of life. Bovine coronavirus and *Escherichia coli* antibodies<sup>b</sup> were administered orally within 6 hours of calving. A complete blood count and a biochemistry profile were performed for each calf at 2 days of age to evaluate adequate transfer of passive immunity (total proteins > 52 g/L) and general health status. At this time, Bovine Viral Diarrhea antigen detection was performed using an immunofluorescence technique on cellular culture.<sup>c</sup> A physical examination was performed daily until the beginning of the study. At the end of the study, all calves were kept in a farm near the CHUV where they were observed. After one year, the calves were slaughtered.

### **Infectious arthritis model**

The right tarsus of each calf was inoculated with  $10^8$  colony-forming units (CFU) of a viable *Escherichia coli* ECL 1018 O116:K?:H9 strain suspended in 1 ml of phosphate-buffered saline solution. Inocula were prepared just before inoculation by dilution of aliquots of  $10^{10}$  CFU.

The strain used in the inocula was collected from a septicemic calf with septic arthritis. The inoculum was prepared by harvesting bacteria after an overnight stay at 37°C with agitation in tryptic soy broth. The bacteria were suspended in tryptic soy broth with 30% glycerol. The inoculum was divided into 1-ml aliquots of  $10^{10}$  CFU and stored (-80 °C) until needed for inoculation.

Virulence factors of these strains were studied using methods previously described<sup>12</sup>, including *pap* genes. Organisms were susceptible to ceftiofur, with a minimal inhibitory concentration value of 0.25 µg/ml.

This bacterial inoculum was adapted from previously described septic arthritis models.<sup>13-15</sup> In a preliminary experiment in calves (n=2), the intra-articular dosage of 10<sup>8</sup> CFU induced clinical evidence of septic arthritis.

To reduce pain, a caudal epidural injection of 0.2 mg/kg of morphine sulphate<sup>d</sup> diluted in 5 ml of sterile physiological saline solution was performed just before inoculation. Five mg of butorphanol<sup>e</sup> were also administered IV every 4 hours beginning 12 hours after inoculation until pain was judged to be mild based on a pain clinical score. This clinical score was adapted from pain evaluation protocol used for large animals after orthopedic surgery.<sup>16</sup> Appetite, heart and respiratory rates modifications, as well as pain associated with leg manipulations were evaluated (Table 1). A pain score was determined 4 times a day during the first 6 days then once daily for the remaining study period.

#### **Synovial fluid sampling procedure.**

Calves were sedated with xylazine<sup>f</sup> (0.05 mg/kg) IV, and placed in left lateral recumbency. The right tarsocrural joint was prepared for aseptic surgery using standard procedures.<sup>17</sup> An 18 G needle was placed in the dorso-medial pouch of the tarsocrural joint and 5 ml of synovial fluid were obtained using a 5 ml syringe. Synovial fluid samples were collected on Day 1 (before inoculation), on Day 2 (before joint lavage), and on Day 3, 4, 8, 12, 16, 20 and 24 (3 days after the end of the antibiotic treatment).

#### **Inoculation procedure.**

All calves had their right tarsocrural joint inoculated on Day 1. At this time, a long term catheter<sup>g</sup> was placed into the left jugular vein after aseptic preparation of the area. The right tarsocrural joint was prepared for aseptic surgery.<sup>17</sup> One millilitre of the phosphate-buffered saline solution containing 10<sup>8</sup> CFU of *E. coli* was injected into the joint using a 18 G needle placed into the dorso-medial pouch of the tarsocrural joint.

**Treatment procedure.**

Treatment began 24 hours after bacterial inoculation. Ceftiofur<sup>h</sup> (1 mg/kg, IV, BID) was administered during 20 days (Day 2 to Day 21). This antibiotic regimen was based on ceftiofur MIC against this isolate and ceftiofur pharmacokinetic properties in calves.<sup>18</sup>

On Day 2, a through-and-through joint lavage was performed on all calves with 1 liter of lactated Ringer's solution.<sup>i</sup> After preparation of the joint for aseptic surgery,<sup>17</sup> an 18 G needle was placed in the dorso-medial pouch of the tarsocrural joint, and distension was achieved with a lactated Ringer's solution.<sup>i</sup> A second 18 G needle was placed into the plantar lateral pouch and a third one in the plantar medial pouch of the tarsocrural joint. A hand pumped pressure bag was used to keep a steady fluid flow into the joint. At the end of lavage, the needle in the dorso-medial pouch was removed, fluid was expressed manually from the joint, and the needles from the plantar lateral and medial pouch were then removed. The tarsus was not bandaged. The treatment regimen instituted in this study was based on commonly accepted recommendations for the treatment of septic arthritis.<sup>4,5</sup>

**Clinical assessment.**

Each calf was evaluated by the same investigator for joint heat, swelling, pain, and lameness 3 times per day for the first 6 days, then once daily until Day 24. A grading scale was used to classify calves (Table 1). Appetite was also monitored. Heart rate, respiratory rate and rectal temperature were measured four times a day for the first 6 days then twice daily until Day 24.

**Synovial fluid analysis**

One millilitre of the synovial fluid sample was placed into a 3 ml evacuated glass container containing EDTA.<sup>j</sup> All specimens were analyzed for total protein concentration (refractometer), WBC count and differential. Whole blood cell count was determined manually using Unopette<sup>k</sup> technique following manufacturer recommendations. Differential count was determined by the same clinical pathologist using a modified Wright Giemsa stain. All these procedures were performed within an hour of sampling.

**Bacteriological culture.**

Two millilitres of synovial fluid were inoculated into a blood culture bottle<sup>1</sup> immediately after collection. Blood culture bottles were incubated at 35°C and culture was performed according to manufacturer's recommendations.

**Polymerase Chain Reaction procedures.**

*Synovial fluid samples.* One ml of synovial fluid was placed aseptically into a 1 ml Eppendorf tube and stored at -25°C until assayed.

*DNA extraction and purification.* DNA was extracted from samples (200 µl of synovial fluid) with the QIAamp DNA Mini Kit<sup>m</sup> according to the manufacturer's recommendations. Since a small quantity of bacterial DNA was expected, a carrier (Polydeoxyadenylic acid) was added to the kit following the manufacturer's recommendations.

*Enzymatic amplification.* The primer used in the amplification DNA PCR was previously described.<sup>12</sup> PCR was done in a total volume of 50 µl containing 10 µl of the template DNA, 25 pM of *pap* primer, 5 µM of each deoxynucleoside triphosphates, 100 mM Tris HCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, and 0.4 U of AmpliTaq DNA polymerase.<sup>n</sup> PCR amplifications consisted of 2 minutes at 95°C, followed by 1 cycle of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 68°C, and 30 seconds at 72°C. Every cycle, the annealing temperature was lowered by 1°C, until the final annealing temperature of 63°C was reached. At this temperature, an additional 30 cycles were run, followed by 10 minutes at 72°C. All PCRs were carried out in a thermal cycler.<sup>o</sup>

*Detection of PCR product.* Fifteen microliters of the reaction mixture was analyzed by electrophoresis on a 2% agarose gel, and the reaction products were visualized by staining with ethidium bromide.

*Positive and negative controls.* Positive and negative controls were included in each experiment. Positive control consisted of an *E. coli* strain B carrying a *pap* operon, and negative control of sterile water. Determination of *pap* virulence factor was performed at least 2 times for each samples.

**Statistical analysis**

Mean values were calculated for WBC, neutrophil count, neutrophil percentage and total protein for each day. The repeated measures linear model was used to evaluate the influence of the day on WBC, neutrophil count, neutrophil percentage and total protein. For statistical analysis, neutrophil percentages were transformed by the square root of arcsine. Values obtained after inoculation (Day 2 and more) were compared to Day 1, using the Dunnett's post-hoc tests. The effect of "treatment stop" was evaluated by comparing the results of Day 20 and Day 24. Slopes between Day 2 and 3, as well as Day 3 and 4 were calculated for WBC, total protein and differential count for each calf in order to evaluate the effect of joint lavage. Comparisons were performed using the Wilcoxon's signed ranks test. Differences were considered statistically significant when  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### **Clinical signs**

Joint distension and periarticular soft tissue swelling were observed in all animals within 4 to 8 hours following inoculation.

On Day 2, 6 calves had a grade 3 lameness and 1 calf had a grade 4. Lameness improved rapidly and all calves became sound by Day 9. They remained normal until the end of the study. On Day 2, the pain score was grade 3 for 1 calf and grade 4 for 6 calves. Pain decreased rapidly to remain at grade 1 until Day 11 on all calves except one for which it remained until Day 16. On Day 2, a joint distension of grade 4 was observed on all calves. A grade 1 or 2 joint distension was noted for all calves on Day 6 and remained until Day 19 for 4 of the calves. One of the three other calves had a persistent grade 1 joint distension until Day 23. The final 2 calves had joint distension of grade 1 and 2 until the end of the experiment.

Five calves developed thrombophlebitis of the jugular vein. The diagnosis was based on high rectal temperature (39.8 °C to 40.9 °C), pain and swelling observed by palpation of the vein. The diagnosis was confirmed by ultrasound examination that revealed a thickened vessel wall. The thrombophlebitis was located at the insertion point of the long term catheter in all calves. They were first diagnosed on Day 4 for 1 calf, Day 15 for 2 calves, Day 18 for 1 calf, and Day 21 for 1 calf. In 2 out of 5 calves, thrombophlebitis was observed when the catheter was accidentally removed by the calf. One catheter was submitted for bacterial culture and was positive for *Arcanobacterium pyogenes*.

### **Synovial fluid cytology.**

The analysis of synovial components during the study for each calf are represented on Figure 1, 2, 3 and 4. Mean value of WBC and neutrophil count, neutrophil percentage, and total protein increased significantly on Day 2, and decreased progressively during the experiment. The decrease of WBC and neutrophil counts were inconsistent for each calf. Each of the measured parameters increased at least once between 2 consecutive samples for all calves. The repeated measures linear model indicated a significant effect of day on each

parameters ( $P < 0.0001$ ). The Dunnett's post-hoc tests revealed that WBC and neutrophil counts were significantly lower on Day 1 compared to Day 2, 3 and 4, and that neutrophil percentage and total protein were significantly lower on Day 1 compared to all other samples. No significant difference was observed between Day 21 and 24 for the 4 parameters studied. Slopes between Day 2 and 3, and Day 3 and 4 were only statistically different for total protein ( $P < 0.031$ ).

#### **Routine bacterial culture.**

On Day 1, all synovial fluid culture were negative, except for one calf for which a *Citrobacter* sp. was cultured and considered a contaminant. All synovial bacterial culture were positive on Day 2 for *E. coli*, and remained positive until Day 3 and Day 4 for 1 and 5 calves, respectively. No other synovial cultures were positive during the remaining of the experiment except on Day 8 and 20 when an *Enterobacter* sp was cultured and considered a contaminant.

#### **PCR results.**

On Day 1, all synovial fluid samples were negative for PCR. All synovial fluid samples were positive for PCR on Day 2 but only 6 were positive on Day 3 and 1 on Day 4. PCR samples remained negative from Day 8 to Day 20, and were positive for 1 calf on Day 24.

## DISCUSSION

Induced *E. coli* septic arthritis is a reliable and reproducible model of infectious synovitis in laboratory animals and horses.<sup>13-15</sup> In the present study, clinical signs of moderate to severe septic arthritis were observed in the early stages of infection which were consistent with those associated with naturally acquired infectious arthritis in cattle as well as those described in *E. coli*<sup>14</sup> or *S. aureus*<sup>8</sup> models of arthritis in horses. Improvement of clinical signs after initiation of treatment were similar to those observed in induced septic arthritis in horses. Lameness and joint pain improved rapidly whereas distension was observed throughout the study.<sup>8,14,19</sup>

On Day 1, all calves had normal synovial fluid and sterile tarsocrural joints. Cytological analysis of synovial fluid were considered normal.<sup>20</sup> Bacteriological cultures were considered negative since *Citrobacter* sp. is an opportunistic pathogen that can be isolated in animal feces and soil.<sup>21</sup> On Day 2, all cytological synovial fluid values were significantly different from Day 1 and all synovial fluid culture and PCR analysis were positive for *E. coli*. The experimental protocol used in this study produced a septic arthritis in 100 % of cases.

*E. coli* was not cultured after Day 4 from calves in this study. Synovial fluid bacterial culture is reported to become negative 3 days after the beginning of antibiotic treatment in humans.<sup>9</sup> In cases of human patients with treated septic arthritis synovial bacterial culture results could be negative despite presence of viable bacteria.<sup>22</sup> These negative results could be explained by low bacterial count, leucocyte activity or direct effect of antibiotics.<sup>22</sup> As previously recommended,<sup>22</sup> blood culture bottles were used in the current study to improve ability to isolate *E. coli*. Blood culture bottles enhance bacterial culture using a rich medium, additives to eliminate endogenous and exogenous antimicrobial factors, and a large inoculum to ensure against a low microbial density.<sup>22</sup>

At the end of the experiment all bacterial cultures of synovial fluid were negative despite termination of treatment 3 days earlier. Consequently, joints were considered sterile after Day 21, and the treatment instituted in this study appears effective in eliminating joint infections. In *S. aureus* induced equine septic arthritis models, most of synovial fluid

cultures remained positive for 21 days after the beginning of the experiments and 1 day after stopping an effective antibiotic treatment.<sup>8,19</sup> These results can be explained by virulence and tropism differences between *S. aureus* and *E. coli*. *S. aureus* has a higher tropism for synovium and can survive intracellularly.<sup>23</sup>

The use of PCR may be helpful in monitoring the presence of bacterial DNA in the synovial fluid during antibiotic treatment in addition to measuring the efficacy of this treatment. Polymerase chain reaction has already been used in human medicine for the detection of bacterial DNA in septic synovial fluid samples using pathogen-specific primers<sup>10</sup> or broad-range 16S ribosomal RNA.<sup>9</sup> In our study, pathogen-specific primers were used to estimate the average isolation time of bacterial DNA. The concordance between the PCR results and the bacteriological results on Day 1 and 2 indicated the reliability of the PCR.

Bacterial cultures were positive whereas synovial fluid PCR were negative on Day 3 and 4. Others have already reported positive synovial fluid bacterial cultures and negative synovial fluid PCR.<sup>24</sup> It appears very unlikely that the *E. coli* strain cultured on Day 3 and 4 was different from the initial strain, but it could have explained positive bacterial culture and negative PCR. Unfortunately, virulence factors were not evaluated to test this hypothesis of *E. coli* cultured on Day 3 and 4.

Despite presence of bacterial DNA in the specimen, negative PCR can be explained by the presence of inhibitor agents in synovial fluid samples, and a low inoculum of micro-organism in the sample.<sup>11</sup> Presence of inhibitor agents appears to be the most likely cause of negative PCR results. Substances (glycoproteins, polysaccharides, lipids) inhibit nucleic acid extraction or amplification in septic joints.<sup>25,26</sup> Polymerase chain reaction may also lack sensitivity when there is a low inoculum of bacteria in the sample. This may be exacerbated when only a very small specimen volume (i.e < 20  $\mu$ L) is available.<sup>11</sup> Centrifugation was used in previous reports to concentrate bacterial DNA in the specimen sample.<sup>10,24,25</sup> Primary reports in this study did not demonstrate any differences between centrifuged and non- centrifuged ones. These samples originated from only one site in the

joints, and consequently may not have cellular and bacterial components representative of the entire joint, thus explaining certain negative results.

Synovial fluid PCR was positive in one calf on Day 24 whereas synovial fluid bacterial culture was negative in all calves. Negative PCR results from synovial fluid or synovial tissues that became positive several days later have already been reported.<sup>9,10</sup> A decrease in concentration of inhibitory substances consecutive with decreased inflammation could explain why one synovial fluid PCR became positive again on Day 24. Antibiotic treatment was stopped between Day 20 and Day 24. It is very unlikely that antibiotic treatment interfered with PCR procedures. On Day 4, 2 calves had positive PCR results whereas they had received 2 days of antibiotic treatment. Ceftriaxone is not known to inhibit polymerases. It behaves like beta-lactam antibiotic by binding to and inactivating the penicillin-binding proteins.<sup>27</sup>

The significance of the presence of *E. coli* DNA for one calf on Day 24 is uncertain. Since the bacterial culture was negative, this result may indicate that non-viable bacteria were present in the synovial fluid. Since pathogen-specific primers were used in this study, and all PCR were performed twice, these positive PCR could not be interpreted as false positive. In humans, bacterial DNA has been found to be able to persist for a few weeks<sup>9</sup> and up to 10 weeks<sup>10</sup> after the initiation of antibiotic therapy. The presence of bacterial DNA can explain the persistence of cytological evidence of inflammation.

Synovial fluid analysis is important in the diagnosis of septic arthritis. Cytological reference values have been established for the differentiation of infectious and non-infectious arthritis.<sup>4</sup> Based on those values, all calves had cytological values consistent with infectious arthritis on Day 2 except for one calf where TP remained below 45 g/L. After Day 2, some calves had cytological values compatible with infectious arthritis but their synovial fluid bacterial culture and PCR were negative. Joints with synovial fluid modifications compatible with values previously reported<sup>4</sup> could be considered as septic or as convalescent joints.

Total protein concentration and neutrophil percentage were statistically different from Day 1 throughout the experiment. This reflects the inflammatory process occurring in the

joint. Repeated arthrocentesis alone could not explain the persistence of elevated TP and neutrophil percentage. In a previous study, TP and neutrophil percentage returned to normal 36 hours after arthrocentesis.<sup>28</sup> Signs of joint inflammation persisted throughout the current study despite absence of viable bacteria.

A decrease in synovial cell counts was not constant in all calves during the experiment. This phenomenon appears to be reliable and unrelated to technical errors. Nucleated cell counts can be determined either manually or automatically. Both techniques give similar results, except when a cell count is lower than the threshold level of electronic cell counters.<sup>29</sup> Whole blood cell count was performed manually in this study using an hemacytometer which can lead to error. It is reported that for a leucocyte count of 7,000 leucocyte/ $\mu$ L, the total inherent error is 21%.<sup>30</sup> Error in manual counting procedures can be minimized by adequate procedures and experience of the manipulator.<sup>30</sup> Another possible explanation is that the synovial fluid is not homogeneous and only a portion was evaluated at each sampling. Consequently, during the course of a septic arthritis treatment, an increase in synovial cytological values should not be misinterpreted as a non-response to treatment or a relapse.

Five calves developed jugular thrombophlebitis despite standard care of intravenous catheter.<sup>31</sup> One possible explanation for this high rate of thrombophlebitis is the important rate of catheter extravasation. Phlebitis could have also been a consequence of hematogenous spread of *E. coli* from the joint. Although in this study they were diagnosed an average of 2 weeks after initiation of antibiotic treatment and *E. coli* was not cultured from the jugular vein catheter. These phlebitis may have interfered with systemic signs of inflammation and minimal effects on local joint inflammation.

Treatment of septic arthritis is essentially based on long-term antibiotic treatment and joint lavage or arthrotomy. Long term systemic administration of antibiotics and joint lavage was effective in treating *E. coli* septic arthritis in calves in this study. Duration of antibiotic administration in acute septic arthritis remains empirical. Certain authors considered that it must be at least 3 weeks in cattle.<sup>7</sup> The duration of antibiotic treatment in humans<sup>32</sup> and horses<sup>8</sup> is usually 4 weeks. Results of this study were in favor of a short term

antibiotic therapy based on clinical sign improvement and negative bacterial culture soon after the induction of septic arthritis. Nevertheless, extrapolation to naturally acquired septic arthritis must be made cautiously. The treatment instituted in this study was based on pharmacological properties of ceftiofur<sup>18</sup> and *E. coli* susceptibilities. Moreover, it was instituted early in the course of the disease. Joint lavage and debridement are important steps in the treatment of septic arthritis in order to remove the potential deleterious enzymes and their cellular sources.<sup>2</sup> Despite no effect on cellular count, results of this study are in favour of the use of joint lavages since these significantly reduce protein levels. The persistence of cytological signs of inflammation, and joint distension were suggestive of an important persistent inflammatory process secondary to the infection. Therefore, anti-inflammatory drugs should always be considered in the treatment of septic arthritis as an adjunct to systemic antibiotics. Further studies are necessary to refine their use in clinical cases.

Cytological examination and bacterial culture of synovial fluids were very useful ancillary tests for the diagnosis of septic arthritis in this study, however they should be used with caution in the evaluation of response to treatment. Polymerase chain reaction techniques presented several limitations compared to bacterial culture, and further studies are needed to facilitate their utilisation and interpretation in clinical cases of septic arthritis in cattle.

## FOOTNOTES

- <sup>a</sup> Francoz D, Desrochers A, Fecteau G, et al. A retrospective study of joint bacterial culture in 172 cases of septic arthritis in cattle (abstr), in *Proceedings*. 20th Annu ACVIM Forum 2002;774.
- <sup>b</sup> First Defense<sup>®</sup>, Immunocell Corporation, Portland, ME, USA.
- <sup>c</sup> Institut Armand Frappier, Laval, Québec, Canada.
- <sup>d</sup> Morphine HP 25<sup>®</sup>, Sabex 2002 Inc, Boucherville, QC, Canada.
- <sup>e</sup> Torbugesic<sup>®</sup>, Wyeth Canada, Saint-Laurent, QC, Canada.
- <sup>f</sup> Rompun<sup>®</sup>, Bayer Santé Animale, Toronto, ON, Canada,
- <sup>g</sup> Central venous Catheterization Set with Blue Flextip<sup>®</sup> catheter, Arrow<sup>®</sup> international Inc, Reading, PA, USA.
- <sup>h</sup> Excenel<sup>®</sup>, Pharmacia Animal Health, Orangeville, ON, Canada.
- <sup>i</sup> Lactated Ringer's injection USP<sup>®</sup>, Baxter Corporation, Toronto, ON, Canada.
- <sup>j</sup> Blood collection tubes, BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, USA
- <sup>k</sup> Unopette, Becton-Dickinson, Rutherford, NJ, USA.
- <sup>l</sup> OXOID SIGNAL Blood Culture System, Oxoid Limited, Basingstoke, Hampshire, England.
- <sup>m</sup> QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA.
- <sup>n</sup> Amersham Biosciences Corp.
- <sup>o</sup> MJ Research PTC 200.

## REFERENCES

1. Van Pelt RW, Langham RF. Synovial fluid changes produced by infectious arthritis in cattle. *Am J Vet Res* 1968;29:507-516.
2. Bertone AL. Infectious arthritis. In: McIlwraith CW, Trotter GW, eds. *Joint disease in the horse*. 1st ed. Philadelphia, PA: W.B Saunders Company, 1996;397-409.
3. Weisbrode SE, Doige CE. Bone and Joints. In: McGavin MD, Carlton WW, Zachary JF, eds. *Thomson's Special veterinary pathology*. 3rd ed. St Louis: Mosby Inc, 2001;524-530.
4. Rohde C, Anderson DE, Desrochers A, et al. Synovial fluid analysis in cattle: a review of 130 cases. *Vet Surg* 2000;29:341-346.
5. Butson RJ. Bovine septic arthritis : A review of current and future treatment regimes. *Cattle Practice* 1994;2:315-321.
6. Desrochers A, Anderson DE, St-Jean G. Lameness examination in cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2001;17:39-51.
7. Weaver AD. Joint conditions. In: Greenough PR, Weaver AD, eds. *Lameness in cattle*. 3rd ed. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company, 1997;162-170.
8. Bertone AL, McIlwraith CW, Jones RL, et al. Comparison of various treatments for experimentally induced equine infectious arthritis. *Am J Vet Res* 1987;48:519-529
9. van der Heijden IM, Wilbrink B, Vije AE, et al. Detection of bacterial DNA in serial synovial samples obtained during antibiotic treatment from patients with septic arthritis. *Arthritis Rheum* 1999;42:2198-2203.
10. Canvin JM, Goutcher SC, Hagig M, et al. Persistence of *Staphylococcus aureus* as detected by polymerase chain reaction in the synovial fluid of a patient with septic arthritis. *Br J Rheumatol* 1997;36:203-206.
11. Cuchacovich R, Quinet S, Santos AM. Applications of polymerase chain reaction in rheumatology. *Rheum Dis Clin North Am* 2003;29:1-20.
12. Daigle F, Harel J, Fairbrother JM, et al. Expression and detection of pap-, sfa-, and afa-encoded fimbrial adhesin systems among uropathogenic *Escherichia coli*. *Can J Microbiol* 1994;40:286-291.

13. Goldenberg DL, Chisholm PL, Rice PA. Experimental models of bacterial arthritis: a microbiologic and histopathologic characterization of the arthritis after the intraarticular injections of *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus aureus*, group A streptococci, and *Escherichia coli*. *J Rheumatol* 1983;10:5-11.
14. Lloyd KC, Stover SM, Pascoe JR, et al. Synovial fluid pH, cytologic characteristics, and gentamicin concentration after intra-articular administration of the drug in an experimental model of infectious arthritis in horses. *Am J Vet Res* 1990;51:1363-1369.
15. Schurman DJ, Mirra J, Ding A, et al. Experimental *E. coli* arthritis in the rabbit. A model of infectious and post-infectious inflammatory synovitis. *J Rheumatol* 1977;4:118-128.
16. Stasiak KL, Maul D, French E, et al. Species-Specific assessment of Pain in Laboratory Animals. *Contemp Top Lab Anim Sci* 2003;42:13-20.
17. Bedard S, Desrochers A, Fecteau G, et al. Comparaison de quatre protocoles de préparation préopératoire chez le bovin. *Can Vet J* 2001;42:199-203.
18. Brown SA, Chester ST, Robb EJ. Effects of age on the pharmacokinetics of single dose ceftiofur sodium administered intramuscularly or intravenously to cattle. *J Vet Pharmacol Ther* 1996;19:32-38.
19. Bertone AL, McIlwraith CW, Jones RL, et al. Povidone-iodine lavage treatment of experimentally induced equine infectious arthritis. *Am J Vet Res* 1987;48:712-715.
20. Van Pelt RW, Conner GH. Synovial fluid from the normal bovine tarsus. I. Cellular constituents, volume, and gross appearance. *Am J Vet Res* 1963;24:112-121.
21. Quinn PJ, Carter ME, Markey BK et al. *Enterobacteriaceae*. In: Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR, eds. *Clinical Veterinary Microbiology*. London, UK: Mosby-Year Book Europe Limited 1994. 209-236.
22. von Essen R. Culture of joint specimens in bacterial arthritis. Impact of blood culture bottle utilization. *Scand J Rheumatol* 1997;26:293-300.
23. Shirtliff ME, Mader JT. Acute septic arthritis. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:527-544.

24. Jalava J, Skurnik M, Toivanen A. Bacterial PCR in the diagnosis of joint infection. *Ann Rheum Dis* 2001;60:287-289.
25. Kuipers JG, Nietfeld L, Dreses-Werringloer U, et al. Optimised sample preparation of synovial fluid for detection of *Chlamydia trachomatis* DNA by polymerase chain reaction. *Ann Rheum Dis* 1999;58:103-108.
26. Panasyuk A, Colantuoni G, Khatib AM, et al. Human synovium produces substances that inhibit DNA and stimulate proteoglycan and collagen synthesis by cultured human articular chondrocytes and synovial fibroblasts. *Scand J Rheumatol* 2003;32:240-6.
27. Donowitz GR, Mandell GL. Beta-lactam antibiotics. *N Engl J Med* 1988;318:419-426.
28. Wagner AE, McIlwraith CW, Martin GS. Effect of intra-articular injection of orpotein and saline solution on equine synovia. *Am J Vet Res* 1982;43:594-597.
29. Mahaffey EA. Synovial fluid. In: Cowell RL, Tyler RD, eds. *Diagnostic cytology and haematology of the horse*. 2<sup>nd</sup> ed. St Louis: Mosby Inc 2002;163-170.
30. Jain NC. Hematologic techniques. In: Jain NC ed. *Shalm's veterinary hematology*. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia, PA: Lea & Febiger, 1986;20-86.
31. Journeycake JM, Buchanan GR. Thrombotic complications of central venous catheters in children. *Curr Opin Hematol* 2003;10:369-374.
32. Nade S. Septic arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2003;17:183-200.
33. Madison JB, Tulleners EP, Ducharme NG, et al. Idiopathic gonitis in heifers: 34 cases (1976-1986). *J Am Vet Med Assoc* 1989;194:273-277.

Table 1. Lameness, pain and joint swelling grade scale used for calves clinical assessment.

Grade	Lameness <sup>33</sup>	Pain	Joint swelling
0	Normal	Normal	Normal
1	Mild lameness	Head movement during leg manipulation	Mild swelling compared to the normal joint
2	Easily detectable lameness without difficulty in ambulation	Withdrawal of the leg during leg manipulation	Easily detectable swelling
3	Moderate lameness making ambulation difficult	Head movement during joint palpation	Easily detectable swelling and joint capsule under tension
4	Severe lameness with reluctance to bear weight on the affected limb	Withdrawal of the leg during joint palpation	Grade 3 including edema

**FIGURE LEGENDS**

Figure 1. Synovial fluid Whole Blood Cell count evolution for each calf during the experiment.

\*Statistically different from Day 1.

Figure 2. Synovial fluid neutrophil count evolution for each calf during the experiment.

\*Statistically different from Day 1.

Figure 3. Synovial fluid neutrophil percentage evolution for each calf during the experiment.

\*Statistically different from Day 1.

Figure 4. Synovial fluid total protein evolution for each calf during the experiment.

\*Statistically different from Day 1.



Figure 3

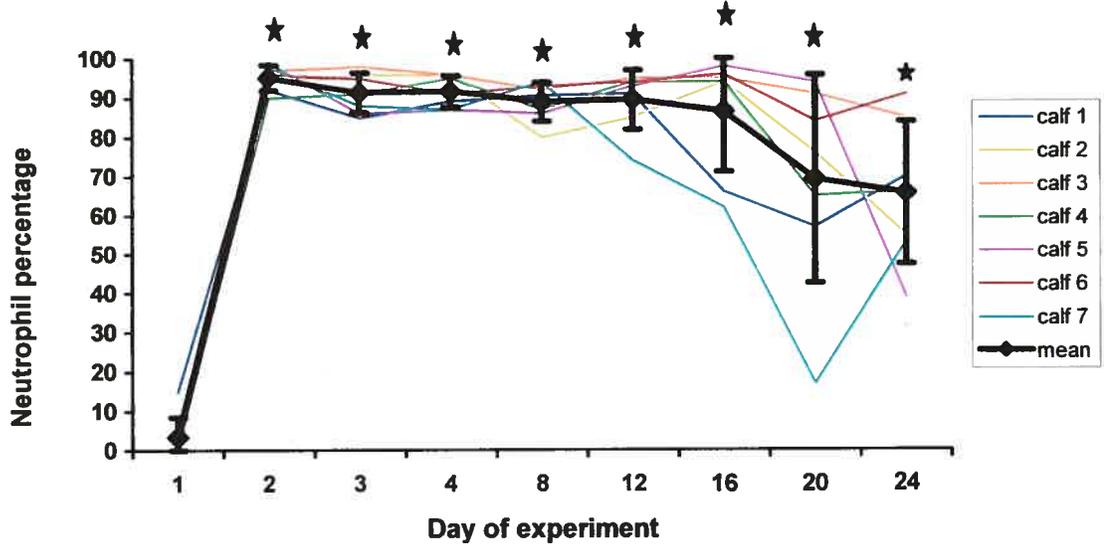
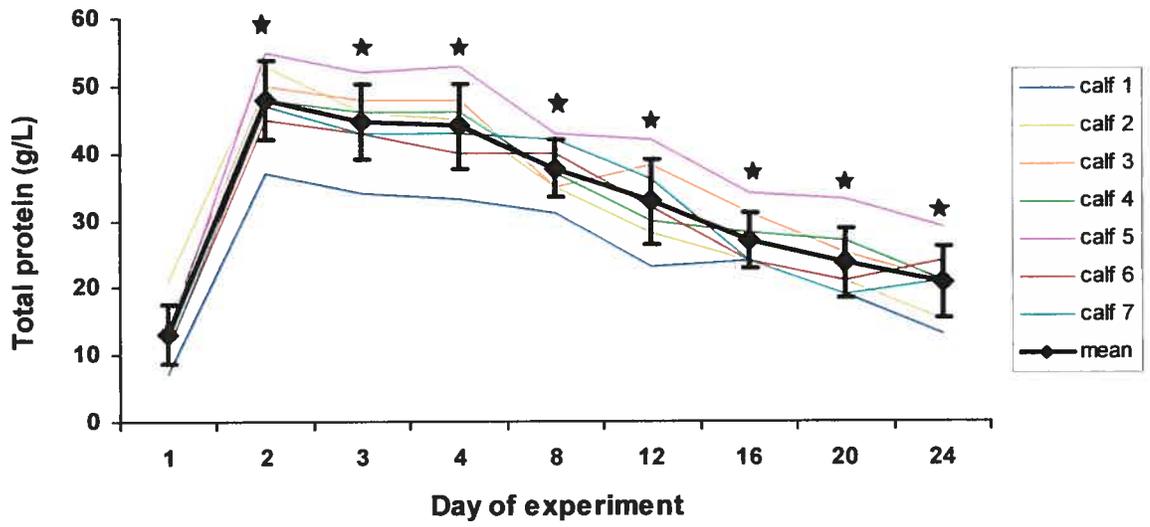


Figure 4



## Article II

---

**Secretion of MMP-2 and MMP-9 in  
synovial fluids from calves with  
experimentally induced septic  
arthritis.**

Secretion of MMP-2 and MMP-9 in synovial fluids from calves with experimentally induced septic arthritis.

David Francoz DVM, André Desrochers DVM, MS, Nathalie Simard, MSc, Yves Saint Pierre, PhD, Gilles Fecteau DVM, Jean Sébastien Latouche DVM, Mado Fortin DVM.

Département des Sciences Cliniques (Francoz, Desrochers, Fecteau) et Département de Pathologie et Microbiologie (Latouche, Fortin), Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, CP 5000, Saint Hyacinthe, Québec, J2S 7C6.

INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Boul. des Prairies, Laval, QC, Canada, H7V 1B7 (Simard, St-Pierre).

Address correspondence and reprint requests to Dr David Francoz.

E-Mail: 

#### Acknowledgements

This work was supported by Le Fonds du Centenaire de l'Université de Montréal and a studentship from the Canadian Arthritis Network (N.S.). Y.S.P. is a scholar from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. The authors thank Guy Beauchamp for his advice in statistical analysis and Edouard F. Potworowski for critical reading of the manuscript.

**ABSTRACT**

**OBJECTIVE:** To evaluate the evolution of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and -9 (MMP-9) levels in synovial fluid of calves with experimentally induced septic arthritis.

**PROCEDURE:** The right tarsus of seven healthy Holstein bull calves (13 to 19 days of age) was inoculated with  $10^8$  colony-forming units of viable *Escherichia coli* (Day 1). Antibiotic treatment was initiated on Day 2 for 20 days (ceftiofur, 1 mg/kg, q 12 hrs, IV). A joint lavage was also performed on Day 2. Synovial fluid samples were collected aseptically each day until Day 4, then every 4 days until Day 24. Samples were submitted for complete cytological examination, bacteriological culture, as well as determination of MMP-2 and MMP-9 levels using gel zymography.

**RESULTS:** All calves presented clinical signs of septic arthritis 4 to 8 hours following bacterial inoculation. On day 2, bacterial cultures were positive for *E. coli* in all calves and remained positive for 4 calves until Day 4 and for 1 calf until Day 3. On day 1, MMP-2 was detected in all synovial fluids but no MMP-9 was detected. Following joint infection, MMP-2, MMP-9 monomer and MMP-9 dimer forms were detected. Relative activity value (RAV) of MMP-9 monomer and dimer were significantly increased on Day 2 to Day 16, and Day 2 to 12 respectively. MMP-2 RAV was significantly increased on Day 3 to 20. There was a significant positive correlation between the RAV of MMP-9 monomer and dimer, as well as between neutrophil count and MMP-9 monomer and dimer RAV.

**CONCLUSIONS:** MMP-2 activity was detected in healthy joints, but higher MMP-2 and MMP-9 activity were associated with infection of the joint. This increase in MMP-2 and MMP-9 persisted for a long period following infection.

## INTRODUCTION

Lameness in cattle causes important economic loss because of decreased milk yield, treatment costs and culling of affected animals<sup>1,2,3</sup>. Joint diseases were reported to be the second most important cause of lameness in cattle<sup>4</sup>.

Septic arthritis may occur by direct trauma or by contamination of the joint, by extension from periarticular infection, or by hematogenous spread<sup>5</sup>. Following bacterial inoculation, an acute inflammatory response occurs<sup>6</sup>. This reaction initiates a rapid influx of inflammatory cells, mostly neutrophils, as well as an activation of synoviocytes and chondrocytes<sup>6</sup>. These cells release many inflammatory mediators and matrix metalloproteinases (MMPs) with subsequent decreased proteoglycan synthesis.

The matrix metalloproteinases are a group of calcium and zinc dependant proteinases that play a crucial physiological role in the turnover of the extracellular matrix. They can be divided into gelatinases, stromelysins, membrane-type MMPs, matrilysins, collagenases, and a metalloelastase<sup>7</sup>. Control of activity of MMPs is thought to occur at 3 levels: synthesis and secretion, activation as well as inhibition<sup>8</sup>. MMPs are synthesized as latent pro-forms that are activated by N-terminal proteolytic cleavage<sup>9</sup>. Inhibition of MMP activity can occur by local or systemic inhibitors such as tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) and  $\alpha$ 2-macroglobulin respectively.

MMP-2 and MMP-9 are gelatinase MMPs. Synovial fluid levels of these MMPs are reported to be elevated in various articular diseases of man<sup>10,11</sup>, dogs<sup>12</sup>, horses<sup>13</sup>, and cattle<sup>14</sup>. Numerous articular and inflammatory cells and tissues have been demonstrated to produce these MMPs in man and horses<sup>15</sup>. Nevertheless, the expression of MMP-9 is strongly stimulated by inflammatory cytokines (inducible MMP) whereas MMP-2 is constitutively expressed by joint cells<sup>16</sup>. The precise role of MMP-2 and -9 in arthritic diseases is not fully understood. They cleave denatured collagen, basement membrane type 4 collagen, and laminin<sup>16</sup>. They have also been reported to synergistically potentiate the action of interstitial collagenases<sup>17</sup> and to play an important role in the control of TIMPs<sup>18</sup>. These MMPs have been proposed as markers of arthritic disease in horses<sup>13</sup> and dogs<sup>12</sup>. They are also potential therapeutic targets for the treatment of arthritic diseases in man<sup>16,19</sup>.

The purpose of this study was to evaluate the evolution of MMP-2 and MMP- 9 levels in synovial fluid of calves with experimentally induced septic arthritis using gelatin zymography. This evaluation could help in determining the potential use of these markers as a diagnostic and prognostic tool after treatment of septic arthritis, and in understanding septic arthritis pathophysiology.

## MATERIALS AND METHODS

The experimental protocol was approved by the Institutional Animal Care Committee of Université de Montréal.

### **Calf selection**

Seven Holstein male calves born without assistance and originating from a dairy herd, were selected for the study. Within 2 hours after calving, calves were brought to the Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire de l'Université de Montréal. The umbilicus was disinfected with 5% tincture of iodide. Each calf received 6 litres of the same pooled colostrum within the first 24 hours of life. Bovine antibodies to coronavirus and *Escherichia coli*<sup>a</sup> were administered orally. A complete blood count and a biochemistry profile were submitted for each calf at 2 days of age, in order to evaluate adequate passive transfer of immunity and general health status. At the same time, detection of Bovine Viral Diarrhea antigen was performed using an immunofluorescence technique on cellular culture<sup>b</sup>. Calves were examined daily until the beginning of the study.

### **Infectious arthritis model**

The right tarsus of each calf was inoculated with  $10^8$  colony-forming units (CFU) of a viable *Escherichia coli* ECL 1018 O116:K?:H9 strain suspended in 1 ml of phosphate-buffered saline solution (PBS). Inocula were prepared just before inoculation by dilution of aliquots of  $10^{10}$  CFU.

The strain used in the inocula was collected from a septicemic calf with septic arthritis. The inoculum was prepared by harvesting bacteria from an overnight incubation at 37°C with agitation in Tryptic Soy Broth (TSB). The bacteria were suspended in TSB with 30 % glycerol. The inoculum was divided into 1ml aliquots of  $10^{10}$  CFU and stored at -80 °C until required for joint infection.

Virulence factors of this strains were studied using methods previously described<sup>20</sup>. They included pap and aerobactin genes. Organisms were susceptible to ceftiofur, with minimal inhibitory concentration value of 0.25 µg/ml.

This dosage of the bacterial inoculum was based on previously described infectious arthritis models<sup>21,22,23</sup> and a preliminary experiment in calves (n=2) where intra-articular dosage of  $10^8$  CFU consistently induced clinical evidence of septic arthritis.

A caudal epidural analgesia was obtained by injecting 0.2 mg/kg of morphine sulfate<sup>e</sup> diluted in 5 ml of sterile physiological saline just before inoculation. Five milligrams of butorphenol<sup>d</sup> were administered IV every 4 hours beginning 12 hours after inoculation until pain was evaluated as slight using a pain clinical score. This clinical score was adapted from a pain evaluation protocol used for large animals after orthopedic surgery<sup>24</sup>. Appetite, heart and respiratory rate modifications, and pain associated with leg manipulations were evaluated. The scoring was performed 4 times a day during the first 5 days, then once daily for the rest of the study.

#### **Synovial fluid sampling procedure.**

Calves were sedated with intravenously administered xylazine<sup>e</sup> (0.05 mg/kg), and placed in left lateral recumbency. The right tarsocrural joint was prepared for aseptic surgery using standard procedures<sup>25</sup>. An 18 G needle was introduced into the dorso-medial pouch of the tarsocrural joint and 5 ml of synovial fluid were obtained using a 5 ml syringe. Synovial fluid samples were collected on Day 1 (before inoculation), on Day 2 (before joint lavage), and on Day 3, 4, 8, 12, 16, 20 and 24, (3 days after the end of the antibiotic treatment).

#### **Inoculation procedure.**

All calves had their right tarsocrural joint inoculated on Day 1. At that time, a long term catheter<sup>f</sup> was placed into the left jugular vein. The right tarsocrural joint was surgically prepared. One millilitre of the PBS containing  $10^8$  CFU of *E. coli* was injected into the joint using an 18 G needle introduced into the dorso-medial pouch of the tarsocrural joint.

**Treatment procedure.**

Treatment began 24 hours after bacterial inoculation. Ceftiofur<sup>g</sup> (1 mg/kg, IV, BID) was administered for 20 days [Day 2 to 21]). This antibiotic treatment regimen was based on ceftiofur MIC against this isolate and ceftiofur pharmacokinetic properties in calves<sup>26</sup>.

A through and through joint lavage was performed on Day 2. After preparation for aseptic surgery<sup>25</sup>, an 18 G needle was introduced into the dorso-medial pouch of the tarsocrural joint, and the joint was distended with 1 liter of a lactated Ringer's solution<sup>h</sup>. A second 18 G needle was introduced into the plantar lateral pouch and a third one into the plantar medial pouch of the tarsocrural joint. A hand-pumped pressure bag was used to keep a steady fluid flow into the joint. At the end of lavage, the needle in the dorso-medial pouch was removed, fluid was expressed manually from the joint, and the needles from the plantar lateral and medial pouch were then removed. The tarsus was left unbandaged.

**Clinical assessment.**

Each calf was evaluated by the same person for joint heat, swelling, pain, and lameness 3 times per day for the first 6 days, then once daily until Day 24. A grading scale from 0 (normal) to 4 was used to classify lameness severity<sup>27</sup>, pain (grade 1, head movement during leg manipulation; grade 2, shrinkage of the leg during leg manipulation; grade 3, head movement during joint palpation; grade 4, shrinkage of the leg during joint palpation) and joint swelling (grade 1, mild swelling compared to the normal joint; grade 2, easily detectable swelling; grade 3, easily detectable swelling and joint capsule under tension; grade 4, grade 3 and oedema). Appetite was also monitored. Heart rate, respiratory rate and rectal temperature were monitored four times per day for the first 6 days then twice daily until Day 24.

**Bacterial culture**

Two millilitres of synovial fluid were inoculated into a blood culture bottle<sup>i</sup> immediately after collection. Blood culture bottles were incubated at 35°C and culture was performed according to the manufacturer's recommendations.

**Synovial fluid analysis**

One millilitre of the synovial fluid was placed into a 3 ml EDTA Vacutainer tube to prevent coagulation. All specimens were analyzed for WBC count and differential count. White blood cell count was determined manually by Unopette<sup>j</sup> test following manufacturer recommendations. Differential counts were performed by the same clinical pathologist using a modified Wright Giemsa stain. All these procedures were performed within an hour following sampling.

**Gelatin zymography**

Synovial samples were placed into 1 ml sterile Eppendorf tube and were centrifuged immediately after collection at 5000 x g for 5 min. Supernatants were stored in aliquots at -70°C until assayed.

Zymography was performed in 8 % polyacrylamide gels that had been cast in the presence of gelatin as previously described<sup>28</sup>. Briefly, samples (5 µl) were diluted 1:10 in loading buffer without prior denaturation, and were run on a 8% SDS-polyacrylamide gel containing 0.1 mg/ml of gelatin. After electrophoresis, gels were washed to remove SDS and incubated for 18 h at 37°C in a renaturing buffer (50 mM Tris, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% NaN<sub>3</sub>, 1% Triton X-100). Gels were subsequently stained with Coomassie brilliant blue G-250 and de-stained in 30% methanol/ 10% acetic acid (v/v) to detect gelatinase secretion.

Computer assisted image analysis was used to quantify enzyme activities on the zymography gels. Gels images were captured using a video camera linked to a Macintosh computer with the appropriate software (NIH image 1.61). For each enzyme band, the area of substrate clearing and the mean intensity of the enzyme band were calculated. The activity value of the band was determined by multiplying the band area by its intensity. To allow comparison between gels, this value was divided by the activity of a standard (HT 1080, human pro-MMP9 and pro MMP2) which was applied to each gel, to give a relative activity value (RAV).

**Statistical analysis**

Mean neutrophil count, MMP-9 monomer and dimer forms RAV, as well as MMP-2 RAV were calculated for each days of sampling. The linear model for repeated measures was used to evaluate the influence of day of sampling on MMP RAV. Each day was compared to Day 1, which was considered as reference, using the Dunnett's post-hoc tests.

The mixed linear model analysis, with calf as random factor, was used to evaluate the correlation between MMP RAV and neutrophil count, as well as between MMP-9 monomer and dimer RAV.

Effect of joint lavage on MMP-9 monomer RAV was evaluated by comparing the slopes between Day 2 and 3, and Day 3 and 4 using the Wilcoxon's signed ranks test.

Differences were considered statistically significant at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### **Clinical signs**

All calves presented clinical signs of septic arthritis 4 to 8 hours following bacterial inoculation. These clinical signs remained until Day 9, even if slight joint distension persisted until Day 19 for all calves and Day 23 and Day 24 for 1 and 2 calves respectively.

### **Bacterial culture**

On Day 1, all synovial fluid cultures were negative. All synovial bacterial cultures were positive on Day 2 for *E. coli*, and remained positive until Day 3 and Day 4 for 1 and 5 calves respectively.

### **Neutrophil count**

Mean neutrophil count was  $0.006 \times 10^9$  cells/L (range: none- $0.017 \times 10^9$  cells/L; md= $0.003 \times 10^9$  cells/L) on Day 1 and increased considerably on Day 2, reaching values of  $109.63 \times 10^9$  cells/L (range: 58.90- $195.94 \times 10^9$  cells/L; md:  $88.42 \times 10^9$  cells/L). It decreased consistently during all the experiment to reach a mean value  $3.82 \times 10^9$  cells/L (range: 0.23- $11.55 \times 10^9$  cells/L; md:  $1.42 \times 10^9$  cells/L on Day 24).

### **MMP-2 and MMP-9**

*MMP-2 and MMP-9 forms* (Figure 1). On day 1, latent pro-MMP-2 (72 kDa) was detected in all synovial fluids but no pro-MMP-9 (98 kDa) was detected. After the joints were infected, latent pro-MMP-2 (72 kDa) with additional partially proteolyzed activated lower molecular weight form was detected, as well as pro-MMP-9 monomer (98 kDa) with additional partially proteolyzed activated lower molecular weight form, and MMP-9 dimer form (225 kDa).

*Relative activity value (RAV)*. MMP-9 monomer (Figure 2) and dimer RAV (Figure 3) were at their highest concentration on Day 2 and decreased consistently through the experimentation. MMP-9 monomer RAV were significantly higher on Day 2 to Day 16

compared to Day 1. No significant differences of RAV were found between Day 1, Day 20 and 24. MMP-9 dimer RAV was significantly lower on Day 1 than Day 2 to 12, but not different from Day 16, 20 and 24. There was a strong, positive, and significant correlation between MMP-9 monomer and dimer RAV ( $P < 0.0001$ ). MMP-2 RAV (Figure 4) increased until Day 8 and decreased consistently until Day 24. MMP-2 RAV was significantly lower on Day 1 than Day 3 to 20, but there was no significant difference between Day 1, 2 and 24.

*Neutrophil correlation.* The mixed linear model analysis demonstrated a strong, positive, and significant correlation between neutrophil count and MMP-9 monomer and dimer RAV ( $P < 0.0001$ ).

*Effect of joint lavage.* The Wilcoxon's signed ranks test demonstrated that the MMP-9 monomer RAV slope between Day 2 and 3 was significantly greater than the slope between Day 3 and 4 ( $P = 0.047$ ).

## DISCUSSION

To our knowledge, this is the first report of MMP-2 and 9 expressions in an experimental model of septic arthritis and their evolution following treatment. As previously reported in cattle<sup>14</sup>, horses<sup>13</sup> and dogs<sup>12</sup>, no MMP-9 activity was detected in normal SF. In contrast, 3 gelatinolytic bands (86 kDa, 98 kDa, and 225 kDa) were observed on the day following infection. Extrapolating from other species<sup>12,13,15</sup> and humans<sup>29</sup>, the 98 and 225 kDa bands were considered to represent the monomer and the dimer forms of bovine MMP-9. The strong positive correlation between RAVs of these forms was in favour of this hypothesis. The thin band of gelatinase activity observed at approximately 86 kDa could be considered as an active MMP-9. Additional partially proteolyzed “activated” lower molecular weight forms have also been reported in SF of infected joints in horses<sup>15</sup> and humans<sup>30</sup>.

In human<sup>31</sup> and horses<sup>15</sup> MMP-9 are stored within neutrophils. Moreover, levels of MMP-9 activity in SF of septic joints correlates with SF neutrophil count<sup>13,30</sup>. In this study, the strong correlation between MMP-9 monomer and dimer RAVs suggested that MMP-9 originated from the infiltrating neutrophils. The dimerisation occurred when MMP-9 was present in excess, relative to TIMP<sup>18</sup>. Since the dimer form can be activated by stromelysin whereas the monomer MMP-9/TIMP cannot, dimerisation may be important in the control of MMP-9 activation<sup>18</sup>.

As previously reported in cattle<sup>14</sup> and other species<sup>12,13</sup>, a single gelatinolytic band (72 kDa) was observed in normal SF. This band may represent MMP-2 constitutive expression in SF. Following infection, the additional band noted at approximately 62 kDa can be related to active MMP-2<sup>15</sup>.

MMP-2 RAV was also increased in septic joint diseases of horses<sup>13,32</sup>. Matrix metalloproteinases (MMP-1 and MMP-7) and membrane-type MMPs (MT1-MMP and MT3-MMP) have been reported to be involved in the activation of MMP-2<sup>9</sup>. A defective regulation or expression of the main MMP-2 inhibitor, TIMP-2 could also be of importance in the MMP-2 overactivity, but the exact mechanism remains to be elucidated<sup>32</sup>. The reasons for the delay of MMP-2 over-activity (2 days following infection) compared to MMP-9 activity remain unclear, but this delay could be the reflection of a cascade of

events. Active MMP-9 forms originated from circulating neutrophils and could have been liberated in large amounts in SF in the initial phase of infection, whereas MMP-2 originated from joint cells (chondrocytes, osteoblasts) that require activation.

Joint lavage and debridement are an important step in the treatment of septic arthritis in order to remove the potential deleterious enzymes and their cellular source<sup>6</sup>. This is supported once again by the results of the present work. Levels of MMP-9 were greatly increased the day after experimental infection and these levels were significantly reduced after joint lavage.

In human, MMP-9 levels have already been reported to correlate with local clinical signs of arthritis and to be the reflection of joint inflammation<sup>11</sup>. In the present study, high levels of MMP-9 were observed in the acute phase of infection when local clinical signs were the most obvious. As well as clinical signs, these levels declined rapidly until Day 8. Such correlations were not observed with MMP-2 levels.

The role of MMP-2 and MMP-9 in the pathogenesis of joint disease is not completely understood. These enzymes have a high affinity for denatured collagen; they potentiate the action of interstitial collagenase<sup>17</sup> and play a role in the control of TIMP<sup>18</sup>. Persistence of MMP-2 and MMP-9 secondary to infection has already been reported in human<sup>30</sup>. In the present study, MMP-2 and MMP-9 over-activity persisted several days post-infection despite negative bacterial cultures. These results could demonstrate that specific MMPs inhibitors could be indicated in conjunction with antibiotics treatment in the case of septic arthritis.

## CONCLUSION

Results of this experimental study demonstrate that MMP-9 and MMP-2 levels were increased in SF of septic joints in cattle. High levels of these enzymes remained for some period post-infection. Further investigations should be performed to confirm the potential use of MMP in the diagnosis of joint diseases and the possible use of specific MMP inhibitors in the treatment of septic arthritis.

## FOOTNOTES

- <sup>a</sup> First Defense<sup>®</sup>, Immunocell Corporation, Portland, ME, USA.
- <sup>b</sup> Institut Armand Frappier, Laval, Québec, Canada.
- <sup>c</sup> Morphine HP 25<sup>®</sup>, Sabex 2002 Inc, Boucherville, QC, Canada.
- <sup>d</sup> Torbugesic<sup>®</sup>, Wyeth Canada, Saint-Laurent, QC, Canada.
- <sup>e</sup> Rompun<sup>®</sup>, Bayer Santé Animale, Toronto, ON, Canada,
- <sup>f</sup> Central venous Catheterization Set with Blue Flextip<sup>®</sup> catheter, Arrow<sup>®</sup> international Inc, Reading, PA, USA.
- <sup>g</sup> Excenel<sup>®</sup>, Pharmacia Animal Health, Orangeville, ON, Canada.
- <sup>h</sup> Lactated Ringer's injection USP<sup>®</sup>, Baxter Corporation, Toronto, ON, Canada.
- <sup>i</sup> OXOID SIGNAL Blood Culture System, Oxoid Limited, Basingstoke, Hampshire, England.
- <sup>j</sup> Becton-Dickinson, Rutherford, New Jersey, USA.

## REFERENCES

1. Cook NB. Prevalence of lameness among dairy cattle in Wisconsin as a function of housing type and stall surface. *J Am Vet Med Assoc* 2003;223:1324-1328.
2. Green LE, Hedges VJ, Schukken YH, et al. The impact of clinical lameness on the milk yield of dairy cows. *J Dairy Sci* 2002;85:2250-2256.
3. Warnick LD, Janssen D, Guard CL, et al. The effect of lameness on milk production in dairy cows. *J Dairy Sci* 2001;84:1988-1997.
4. Russel AM, Rowlands GJ, Shaw SR, et al. Survey of lameness in British dairy cattle. *Vet Rec* 1982;111:155-160.
5. Van Pelt RW, Langham RF. Synovial fluid changes produced by infectious arthritis in cattle. *Am J Vet Res* 1968;29:507-516.
6. Bertone AL. Infectious arthritis. In: *Joint disease in the horse*. 1st ed. Philadelphia, W.B Saunders Company, 1996, 397-409.
7. Beaudeau JL, Giral P, Bruckert E, Foglietti MJ, Chapman MJ. Métalloprotéases matricielles et athérosclérose. Perspectives thérapeutiques. *Ann Biol Clin* 2003;61:147-58.
8. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4:197-250.
9. Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997;378:151-160.
10. Cawston TE, Weaver L, Coughlan RJ, Kyle MV, Hazleman BL. Synovial fluids from infected joints contain active metalloproteinases and no inhibitory activity. *Br J Rheumatol* 1989;28:386-92
11. Koolwijk P, Miltenburg AM, van Erck MG, Oudshoorn M, Niedbala MJ, Breedveld FC, van Hinsbergh VW. Activated gelatinase-B (MMP-9) and urokinase-type plasminogen activator in synovial fluids of patients with arthritis. Correlation with clinical and experimental variables of inflammation. *J Rheumatol* 1995;22:385-93.

12. Coughlan AR, Robertson DH, Bennett D, May C, Beynon RJ, Carter SD. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in canine rheumatoid arthritis. *Vet Rec* 1998;143:219-23.
13. Clegg PD, Coughlan AR, Riggs CM, Carter SD. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in equine synovial fluids. *Equine Vet J* 1997;29:343-8.
14. Arican M, Coughlan AR, Clegg PD, Carter SD. Matrix metalloproteinases 2 and 9 activity in bovine synovial fluids. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2000;47:449-56.
15. Clegg PD, Burke RM, Coughlan AR, Riggs CM, Carter SD. Characterisation of equine matrix metalloproteinase 2 and 9; and identification of the cellular sources of these enzymes in joints. *Equine Vet J* 1997;29:335-42.
16. Mengshol JA, Mix KS, Brinckerhoff CE. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in arthritic diseases: bull's-eye or missing the mark? *Arthritis Rheum* 2002;46:13-20.
17. Murphy G, Docherty AJ. The matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992;7:120-5.
18. Goldberg GI, Marmer BL, Grant GA, Eisen AZ, Wilhelm S, He CS. Human 72-kilodalton type IV collagenase forms a complex with a tissue inhibitor of metalloproteases designated TIMP-2. *Proc Natl Acad Sci* 1989;86:8207-11.
19. Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinase inhibition. From the Jurassic to the third millennium. *Ann N Y Acad Sci* 1999;878:388-403.
20. Daigle F, Harel J, Fairbrother JM, et al. Expression and detection of pap-, sfa-, and afa-encoded fimbrial adhesin systems among uropathogenic *Escherichia coli*. *Can J Microbiol* 1994;40:286-291
21. Goldenberg DL, Chisholm PL, Rice PA. Experimental models of bacterial arthritis: a microbiologic and histopathologic characterization of the arthritis after the intraarticular injections of *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus aureus*, group A streptococci, and *Escherichia coli*. *J Rheumatol* 1983;10:5-11.
22. Lloyd KC, Stover SM, Pascoe JR, Adams P. Synovial fluid pH, cytologic characteristics, and gentamicin concentration after intra-articular administration of

- the drug in an experimental model of infectious arthritis in horses. *Am J Vet Res* 1990;51:1363-9.
23. Schurman DJ, Mirra J, Ding A, et al. Experimental *E. coli* arthritis in the rabbit. A model of infectious and post-infectious inflammatory synovitis. *J Rheumatol* 1977;4:118-128.
  24. Stasiak KL, Maul D, French E, et al. Species-Specific assessment of Pain in Laboratory Animals. *Contemporary Topics* 2003;42:13-20.
  25. Bedard S, Desrochers A, Fecteau G, et al. Comparaison de quatre protocoles de préparation préopératoire chez le bovin. *Can Vet J* 2001;42:199-203.
  26. Brown SA, Chester ST, Robb EJ. Effects of age on the pharmacokinetics of single dose ceftiofur sodium administered intramuscularly or intravenously to cattle. *J Vet Pharmacol Ther* 1996;19:32-38.
  27. Madison JB, Tulleners EP, Ducharme NG, et al. Idiopathic gonitis in heifers: 34 cases (1976-1986). *J Am Vet Med Assoc* 1989;194:273-277.
  28. Esteve PO, Tremblay P, Houde M, St-Pierre Y, Mandeville R. In vitro expression of MMP-2 and MMP-9 in glioma cells following exposure to inflammatory mediators. *Biochim Biophys Acta* 1998;1403:85-96.
  29. Hibbs MS, Hasty KA, Seyer JM, Kang AH, Mainardi CL. Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem* 1985;260:2493-500.
  30. Makowski GS, Ramsby ML. Zymographic analysis of latent and activated forms of matrix metalloproteinase -2 and -9 ins synovial fluid: correlation to polymorphonuclear leukocyte infiltration and in response to infection. *Clin Chim Acta* 2003;329:77-81.
  31. Hibbs MS, Bainton DF. Human neutrophil gelatinase is a component of specific granules. *J Clin Invest* 1989;84:1395-402.
  32. Jouglin M, Robert C, Valette JP, Gavard F, Quintin-Colonna F, Denoix JM. Metalloproteinases and tumor necrosis factor-alpha activities in synovial fluids of horses: correlation with articular cartilage alterations. *Vet Res* 2000;31:507-15.

## FIGURE LEGENDS

Figure 1. Gelatine gel zymography. Synovial fluid MMP-2 and MMP-9 composition during all the experiment study. Gelatinase weights are shown on the right. Thin band of lower molecular weight are indicated by white arrows on the right. H: HT 1080

Figure 2. Evolution of mean MMP-9 monomer relative activity value of the 7 calves involved in the study during the experiment.

Figure 3. Evolution of mean MMP-9 dimer relative activity value of the 7 calves involved in the study during the experiment.

Figure 4. Evolution of mean MMP-2 relative activity value of the 7 calves involved in the study during the experiment.

Figure 1.

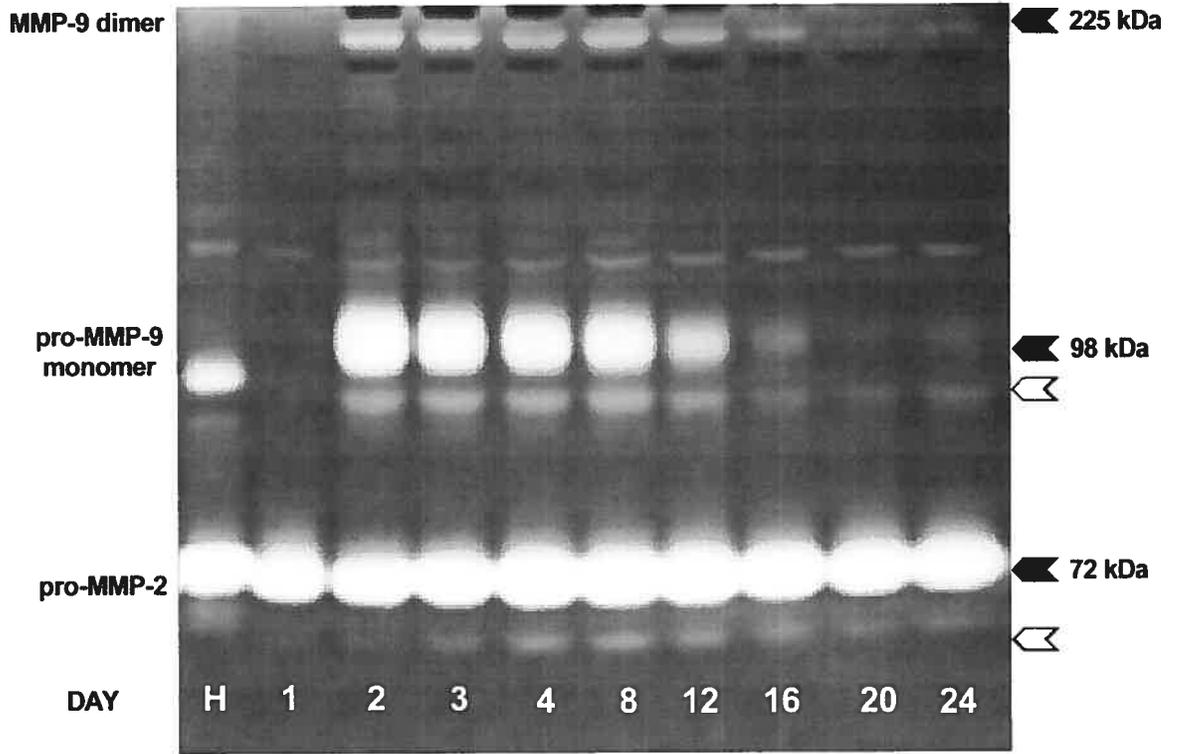


Figure 2

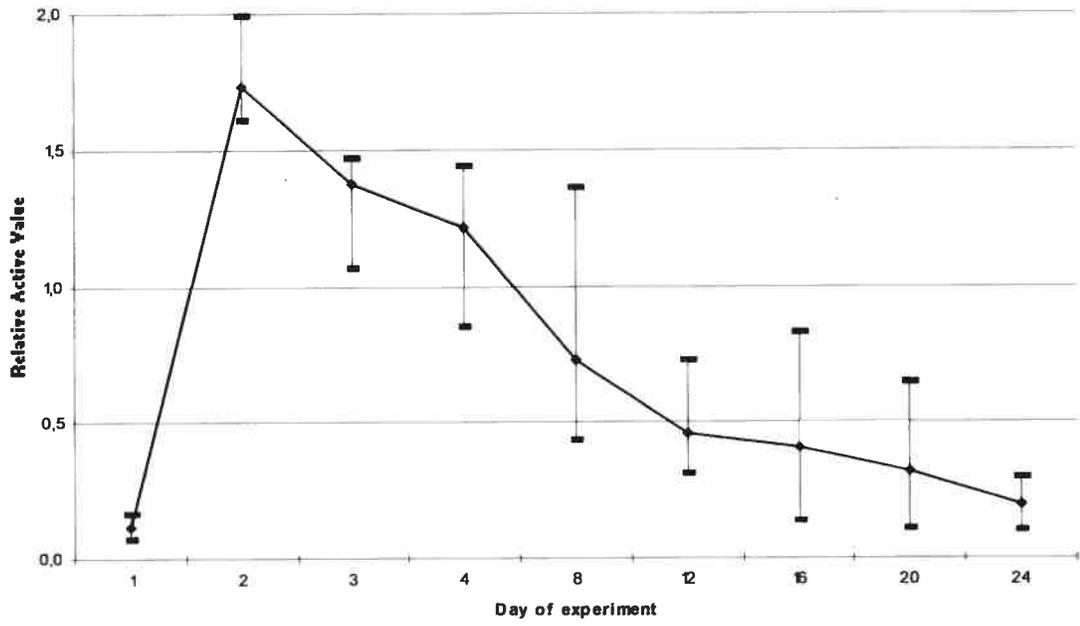


Figure 3

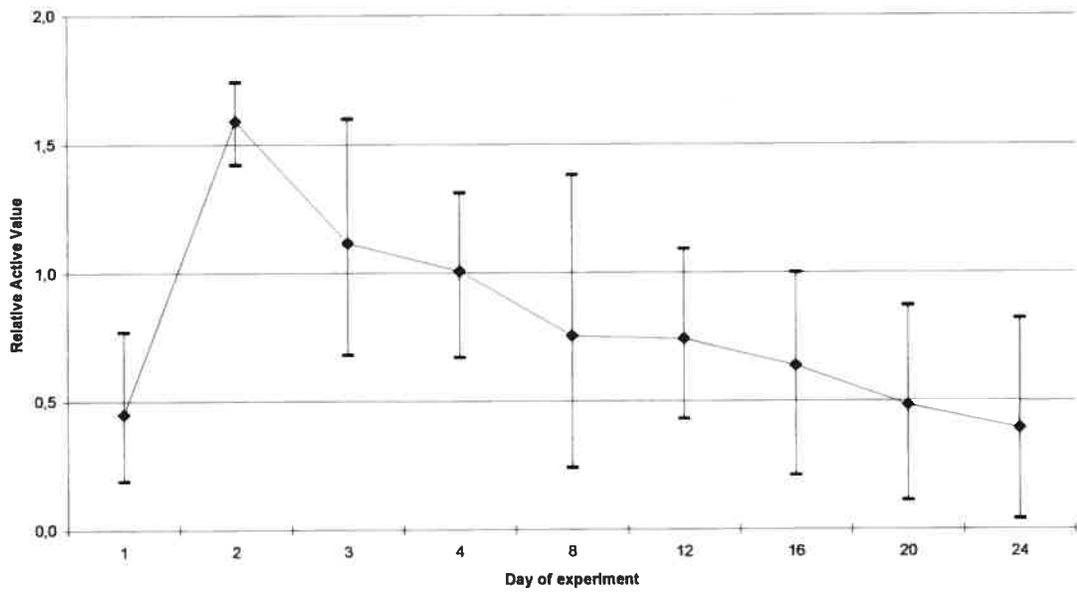
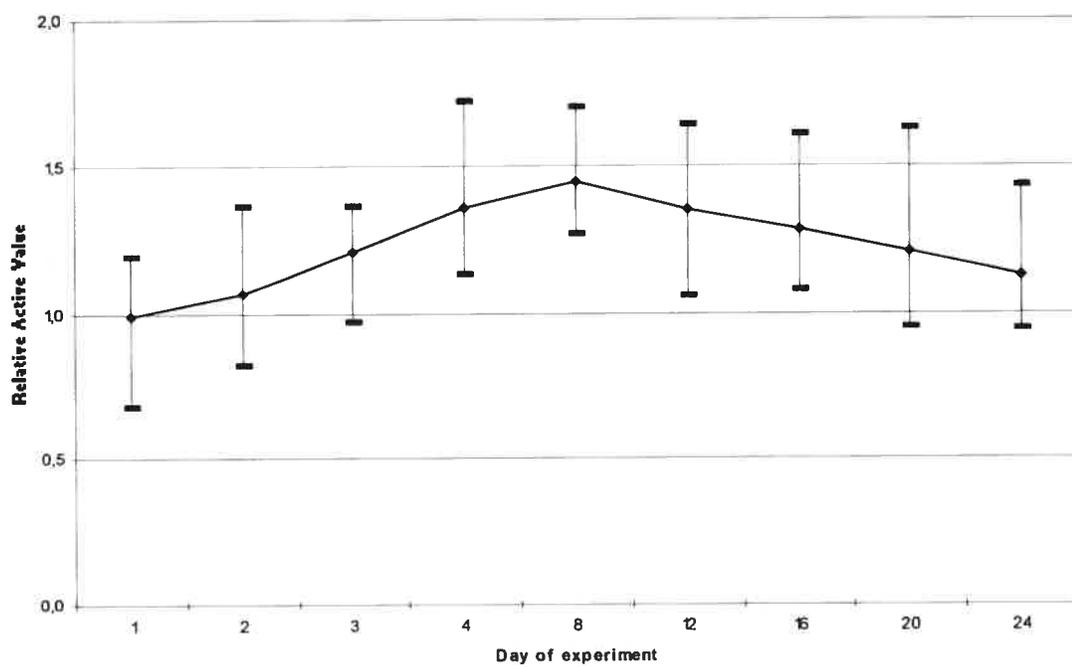


Figure 4



# PARTIE III

---

DISCUSSION GÉNÉRALE  
CONCLUSIONS

## I. Réalisation du modèle expérimental

### I.1. Signes cliniques

Le modèle expérimental créé lors de cette étude a parfaitement réussi à reproduire les signes cliniques d'arthrite septique: boiterie, enflure, chaleur et douleur de l'articulation (Weaver, 1997). Les signes cliniques observés ont été de la même ampleur sur l'ensemble des veaux de l'étude et correspondaient à des signes cliniques sévères d'arthrite septique. Ils sont similaires à ceux observés précédemment lors d'induction expérimentale d'arthrite septique avec des souches de *E. coli* (Lloyd *et al.*, 1990) ou de *S. aureus* chez le cheval (Bertone *et al.*, 1987a ; Bertone *et al.*, 1987b) ou des animaux de laboratoires (Goldenberg *et al.*, 1983 ; Shurman *et al.*, 1977).

Les signes cliniques sont apparus plus rapidement après l'inoculation de l'articulation (4 à 8 heures) que ce qui est rapporté en médecine équine (12 heures) (Bertone *et al.*, 1987a ; Bertone *et al.*, 1987b ; Lloyd *et al.*, 1990). Cette différence pourrait s'expliquer par le fait dans les modèles équins des animaux adultes étaient utilisés et non de jeunes animaux. Par contre, la durée de la boiterie et de l'enflure après la mise en place de l'antibiothérapie a été similaire (Bertone *et al.*, 1987a ; Bertone *et al.*, 1987b).

### I.2. Examens complémentaires

L'infection de l'articulation a réussi dans tous les cas. En effet, au Jour 1 de l'étude, le liquide synovial de chaque veau a pu être considéré comme stérile alors qu'au Jour 2, *E. coli* a pu être isolée chez tous les veaux. L'analyse cytologique du liquide articulaire était en accord avec les valeurs de références (van Pelt *et al.*, 1963a) pour un liquide articulaire normal au Jour 1, et un liquide articulaire d'arthrite septique pour le Jour 2 (Rohde *et al.*, 2000 ; van Pelt *et al.*, 1968).

### **I.3. Réponse au traitement**

Les 7 veaux étaient normaux à la fin de l'étude, sauf un veau pour lequel une légère enflure de l'articulation persistait. A l'arrêt de l'étude, jour 24, il n'y a eu aucune croissance bactérienne, contrairement aux modèles expérimentaux à *S. aureus* (Bertone *et al.*, 1987a ; Bertone *et al.*, 1987b). Des facteurs de virulence différents, la capacité de survie intracellulaire et la plus grande affinité de *S. aureus* pour la membrane synoviale peuvent expliquer ces résultats (Shirtliff *et al.*, 2002).

### **I.4. Apparition des phlébites**

Dans cette étude, 5 veaux sur 7 ont développés des phlébites de la veine jugulaire cathétérisée. Dans 2 cas, une cause (extravasation du cathéter) a pu être clairement identifiée. La présence d'un foyer inflammatoire sévère a été rapportée comme un facteur de risques de développement de thrombophlébite (Rouleau *et al.*, 2003). La culture des cathéters intra-veineux n'a été réalisée que dans un cas, et était positive à *A. pyogenes*. Il n'a donc pas été possible de démontrer si le développement de phlébites pouvait être la conséquence des propriétés septicémiques de la souche de *E. coli* utilisée. Toutefois les thrombophlébites sont apparus en moyenne 15 jours après le début de l'expérience, alors que les signes cliniques minimes et que les isollements bactériens étaient négatifs.

En médecine humaine, il est recommandé que le traitement antibiotique instauré lors du traitement des arthrites septiques soit administré par voie intraveineuse (Nade, 2003). Toutefois, il a récemment été démontré qu'un relais par voie *per os* pouvait être rapidement pris (Jaberi *et al.*, 2002 ; Kim *et al.*, 2000). Afin d'éviter les problèmes liés à l'entretien des cathéters intraveineux et au développement de phlébites, le ceftiofur pourrait être administré par voie intraveineuse pour les premiers jours de l'étude, puis par voie intramusculaire.

## II. Évolution de la population bactérienne

### II.1. Culture bactériologique standard

En médecine humaine, la culture bactériologique des liquides articulaires infectés restent positives jusqu'à 3 jours après la mise en place de l'antibiothérapie (van der Heijden *et al.*, 1999). Les résultats sont similaires dans cette étude. Toutefois, il n'est pas possible de savoir si les cultures bactériologiques de 5 veaux sont devenues négatives au Jour 5, 6, ou 7 puisque aucun prélèvement n'a été effectué lors de cette période. Il pourrait donc être intéressant d'effectuer des prélèvements durant cette période. Dans la présente étude, aucun prélèvement n'a été effectué pendant les Jours 5,6 et 7 afin de ne pas induire une inflammation articulaire suite à des ponctions répétées (au 24 heures sur plus de 3 jours) (Wagner *et al.*, 1982).

L'utilisation de bouteille d'hémoculture a également dû contribuer l'isolation bactérienne comme cela a déjà été rapporté (Madison *et al.*, 1991 ; Montgomery *et al.*, 1989 ; von Essen, 1997).

Il aurait été aussi intéressant d'effectuer la recherche des facteurs de virulence des souches de *E. coli* afin de pouvoir certifier hors de tout doute que la présence de culture positive simultanément à celle de PCR négatives ne sont pas le résultat d'une perte ou d'une modification des facteurs de virulence de la souche de *E. coli* utilisée.

### II.2. Recherche des facteurs de virulence par PCR

La technique de recherche des facteurs de virulence par PCR utilisée dans cette étude est fiable puisque les liquides articulaires étaient tous négatifs au Jour 1 et positifs au Jour 2. Toutefois, il est surprenant de voir que la recherche par PCR était négative alors que la bactériologie de routine était positive. La présence de facteurs inhibiteurs en quantité importante dans le liquide articulaire suite à l'infection (glycoprotéines, phospholipides) est à l'origine de faux négatifs lors de détection d'ADN bactérien par PCR dans les liquides synoviaux (Kuipers *et al.*, 1999 ; Panasyuk *et al.*, 2003). Dans cette étude, l'impact des

facteurs inhibiteurs n'a pas pu être évalué, mais ils sont la cause la plus probable de cultures bactériologiques positives parallèlement à des recherches négatives par PCR. Une façon de prouver le rôle de ces facteurs inhibiteurs dans l'apparition de résultats négatifs aurait été de rechercher la présence de fragment d'ADN qui se retrouve de façon constitutive dans le liquide articulaire. Ainsi en médecine humaine, la recherche du gène humain codant pour la  $\beta$ -globine peut être réalisée comme deuxième témoin positif (Jalava *et al.*, 2001). L'absence de mise en évidence d'un tel fragment signerait un problème lors de la procédure d'amplification de l'ADN.

Il est difficile de tirer des conclusions à partir du veau positif par PCR et négatif par bactériologie de routine au Jour 24. Du fait que chaque PCR était refaite au moins 2 fois et qu'un facteur de virulence spécifique était recherché, il est peu probable qu'il s'agisse d'un résultat faux positif. Une recherche par PCR signifie la simple présence de la portion d'ADN recherchée. Du fait que la culture bactérienne standard était négative et qu'un effet post-antibiotique est très peu probable, ce résultat positif montre la persistance d'ADN bactérien dans le liquide articulaire sans persistance de bactérie viable. Cet ADN devait déjà être présent dans les prélèvements précédents, mais la présence de facteurs inhibiteurs empêchait son amplification. La diminution de la concentration des facteurs inhibiteurs a du permettre l'amplification d'ADN lors du dernier prélèvement.

### **III. Analyse cytologique**

#### **III.1. Utilité diagnostique**

Au Jour 2, l'ensemble des liquides articulaires présentaient des modifications cytologiques compatibles avec un diagnostic d'arthrite septique selon les valeurs de référence de Rohde (Rohde *et al.*, 2000). Les modifications cytologiques étaient encore compatibles avec une arthrite septique alors que les résultats bactériologiques étaient négatifs jusqu'aux Jours 20 et 24 pour certains veaux. Les valeurs seuils données par Rohde (Rohde *et al.*, 2000)

peuvent donc être considérés comme compatibles avec le diagnostic d'une arthrite septique ou post septique.

### **III.2. Suivi thérapeutique**

Contrairement à l'évolution des signes cliniques, l'amélioration des différents paramètres cytologiques étudiés n'a pas été constante pour l'ensemble des veaux. Une des explications qui pourrait être avancée pour expliquer ces résultats serait que seule une portion du liquide synovial est prélevé à chaque fois. Cette portion pourrait ne pas être représentative de l'ensemble du liquide articulaire présent dans l'articulation. Il est probable que le liquide articulaire ne soit pas homogène au sein d'une articulation infectée. Il est aussi probable qu'un phénomène de concentration se produise lors de la guérison par diminution du volume articulaire ce qui augmenterait faussement les concentrations des différents paramètres cytologiques évalués.

Il est donc difficile de se fier sur la détérioration des résultats cytologiques entre 2 prélèvements pour évaluer la réponse ou non au traitement.

### **III.3. Persistance de signes d'inflammation**

Les résultats du pourcentage de neutrophiles et de protéine totale sont toujours restés significativement différents comparés au Jour 1. Au Jour 24, des signes d'inflammation persistent donc alors que le liquide articulaire est stérile. La réalisation de ponction articulaire tous les 4 jours ne doit avoir que peu d'impact sur la persistance d'inflammation puisque lors de 2 ponctions articulaires réalisées à 24 heures d'intervalle, le pourcentage de neutrophiles et les protéines totales du liquide articulaire retournent à la normale après 36 heures (Wagner *et al.*, 1982).

## IV. Évolution des MMP-9 et -2

### IV.1. Évolution de la MMP-9

Les résultats de cette étude confirment qu'aucune activité de la MMP-9 ne peut être détectée dans un liquide synovial normal (Arican *et al.*, 2000). Par contre suite à l'infection, 3 bandes gélatinolytiques, correspondant à la forme active de MMP-9 (86 kDa), la forme latente de MMP-9 (98 kDa) et la forme dimère de MMP-9 (225 kDa), sont visibles.

Les leucocytes, l'activation des cellules épithéliales ou endothéliales, les chondrocytes, les synoviocytes et les fibroblastes peuvent être la source de MMP-9 (Opdenakker *et al.*, 2001). La forte corrélation existante entre le comptage de neutrophiles et l'activité relative de la MMP-9 laissent croire que l'activité de la MMP-9 dans le liquide synovial origine des neutrophiles infiltrés en réponse à l'infection. La forme latente de la MMP-9 est stockée dans les granules des neutrophiles à partir desquels elle est relâchée (Clegg *et al.*, 1997a ; Hibbs *et al.*, 1989 ; Lakritz *et al.*, 2004). L'apparition d'une forme dimère, pourrait s'expliquer par un déséquilibre dans le rapport entre la MMP-9 et le TIMP-1. En effet, la dimérisation de la MMP-9 s'effectue principalement lorsque la MMP-9 se trouve en excès par rapport à son inhibiteur, TIMP-1 (Goldberg *et al.*, 1989), lequel n'est pas exprimé par les neutrophiles (Opdenakker *et al.*, 2001). Lors d'arthrite septique, il a une arrivée massive de neutrophiles et donc de forme latente de la MMP-9 en absence de TIMP-1. Il y a donc un création d'un déséquilibre et dimérisation de la MMP-9.

### IV.2. Évolution de la MMP-2

Comme cela a déjà été rapporté (Arican *et al.*, 2000 ; Clegg *et al.*, 1997b ; Coughlan *et al.*, 1998), une bande gélatinolytique représentant la forme latente de MMP-2 a pu être observée de façon constitutive dans le liquide synovial au Jour 1. Suite à l'infection, l'activité relative de la MMP-2 a augmenté pour revenir à des valeurs normales. Cette augmentation est également décrite lors d'arthrite septique chez le cheval (Clegg *et al.*, 1997b ; Jouglin *et al.*, 2000) et l'Homme (Makowski *et al.*, 2003).

L'activation de la MMP-2 peut être induite par d'autres MMPs (MMP-1, MMP-7, MT1-MMP et MT3-MMP)(Nagase, 1997) ou par un défaut de régulation ou d'expression de son principal inhibiteur (TIMP-2)(Jouglin *et al.*, 2002). Le mécanisme exact d'activation de la MMP-2 ainsi que la raison du délai observé avant son activation n'ont pu être établis dans cette étude. Toutefois, ils peuvent être le reflet d'une cascade d'événements initiés par l'infection qui serait à l'origine de la libération de la MMP-2 par des cellules de l'articulation et son activation.

### **IV.3. Utilité diagnostique**

Les MMP-2 et -9 peuvent être utilisés comme bio-marqueurs lors d'atteinte articulaire (Arıcan *et al.*, 2000 ; Clegg *et al.*, 1997a ; Coughlan *et al.*, 1998). Dans l'espèce bovine, la MMP-9 est significativement augmentée lors d'atteinte articulaire septique alors qu'il n'y a pas d'augmentation lors d'atteinte aseptique (Arıcan *et al.*, 2000). Inversement, la MMP-2 est augmentée significativement lors d'atteinte aseptique (Arıcan *et al.*, 2000). Les résultats de cette étude montrent qu'une augmentation de l'activité de la MMP-2 peut aussi être considérée comme post-septique dans l'espèce bovine. La différenciation entre une arthropathie aseptique et post-septique ne peut être réalisée en s'appuyant uniquement sur l'évaluation de la MMP-2 et -9.

De plus, de récents résultats montrent que la réalisation de ponction articulaire à intervalle régulier et rapproché pourrait augmenter artificiellement l'activité des MMP (van den Boom *et al.*, 2004). L'effet de la ponction articulaire et du lavage articulaire n'ont pas été évalués dans cette étude. Il serait intéressant de réaliser le même protocole de prélèvement et de lavage articulaire sur des articulations saines afin de quantifier l'impact de la ponction articulaire et de le comparer à celui du processus infectieux et inflammatoire.

## **V. Traitement**

### **V.1. Efficacité du traitement médical**

Le traitement médical mis en place dans cette étude est conforme au traitement préconisé lors d'arthrite septique. Il était également optimal quant au moment de sa mise en place et au choix de l'antibiotique. Le délai entre l'apparition des signes cliniques et la mise en place du traitement est importante pour la guérison (Chen *et al.*, 2001 ; Shirtliff *et al.*, 2002). Dans le cas présent, le traitement a été instauré moins de 24 heures après l'apparition des premiers signes cliniques. La rapidité d'intervention dans cette étude a été un élément déterminant dans la guérison. De plus, la sensibilité aux antibiotiques de la souche de *E. coli* utilisée était connue. Compte tenu des résultats *in vitro*, l'antibiothérapie pouvait être considérée efficace *in vivo*.

### **V.2. Efficacité du lavage articulaire**

Le lavage articulaire a eu un effet significatif sur les protéines totales et l'activité relative de la MMP-9. Ces résultats viennent renforcer l'importance de la réalisation d'un lavage articulaire dans le traitement des arthrites septiques rapportée précédemment (Jackson *et al.*, 1998). Le rôle primordial du lavage articulaire montre l'importance de la lutte contre les produits de l'inflammation lors du traitement des arthrites septiques.

### **V.3. Rôle des anti-inflammatoires**

Dans cette étude, aucune drogue anti-inflammatoire n'a été utilisée. En médecine bovine, les anti-inflammatoires non-stéroïdiens sont recommandés principalement pour leurs propriétés analgésiques (Weaver, 1997). Toutefois, l'administration de corticostéroïdes par voie intra-articulaire, même si controversée, est préconisée par certains auteurs (Caron, 1999 ; Madison *et al.*, 1989 ; Meijer *et al.*, 2000) pour le contrôle de l'inflammation lors d'arthrite septique. La persistance de signes d'inflammation ainsi que l'impact du lavage

articulaire sur l'analyse cytologique sont en faveur d'une plus grande utilisation des drogues anti-inflammatoires dans le traitement des arthrites septiques.

Comme en médecine humaine (Makowski *et al.*, 2002), les activités relatives des MMP-2 et -9 ont persisté suite à l'infection malgré des résultats bactériologiques négatifs. Même si leur rôle exact dans la pathogénie des arthrites septiques n'est pas encore complètement connu, l'utilisation de molécules spécifiques, comme des inhibiteurs spécifiques des MMPs peut être envisagée dans le traitement des arthrites septiques.

#### **V.4. Durée de l'antibiothérapie**

La durée optimale du traitement antibiotique instauré lors d'arthrites septiques n'est pas connue en médecine bovine, mais 2 à 3 semaines de traitement antibiotique sont recommandées (Butson *et al.*, 1994). Dans cette étude, plus aucune bactérie n'a pu être mise en évidence que cela soit par techniques de culture classique ou par PCR 4 jours après l'infection. Malheureusement, le moment exact où les bactéries ont réellement disparu du liquide articulaire n'a pu être déterminé avec certitude. Il est néanmoins très probable qu'une antibiothérapie de plus courte durée aurait pu être utilisée dans notre étude. Ces résultats ne devraient pas être extrapolés à des cas chroniques d'arthrite septique où la cinétique des processus inflammatoires et infectieux doit être différente.

## VI. Conclusion générale

Le modèle expérimental créé dans cette étude est adéquat puisque (1) les signes cliniques observés sont similaires à ceux de cas cliniques naturels, (2) il est répétable, et (3) le traitement instauré est efficace.

Malheureusement, la persistance de la population bactérienne suite au traitement n'a pu être déterminée de façon précise. Toutefois, les résultats de cette étude justifieraient de réduire la durée du traitement antibiotique et d'accorder aux drogues anti-inflammatoires une place plus importante dans le traitement des arthrites septiques. La persistance de l'activation des MMP-2 et 9 suite à l'infection et ceci malgré des résultats bactériologiques négatifs laisse entrevoir un rôle possible des inhibiteurs des MMPs dans le traitement des arthrites septiques.

La cytologie et la bactériologie ont montré toute leur importance dans le diagnostic des arthrites septiques. Toutefois, ces procédures démontrent certaines limites pour réaliser un suivi adéquat de la réponse au traitement. Même si l'utilisation de technique PCR semble prometteuse dans l'avenir pour améliorer le suivi thérapeutique, il reste encore beaucoup à faire afin que la PCR soit un outil fiable dans les cas d'arthrites septiques chez les bovins.

Bien plus que d'apporter des réponses, ce projet de maîtrise suscite de nombreuses interrogations qui ouvrent la porte à de nouveaux projets de recherche. A l'aide de ce modèle expérimental, il serait maintenant intéressant d'évaluer et de comparer certains traitements dont l'utilisation de médicaments anti-inflammatoires qu'ils soient stéroïdiens ou non stéroïdiens. Il serait également intéressant d'effectuer un suivi bactériologique du liquide articulaire lors de la période critique des 4 à 7 jours suivant l'initiation du traitement. D'autres médiateurs de l'inflammation ou indicateurs de dommage articulaire de même que certains TIMP pourraient également être mesurés. Des études semblent nécessaires afin d'identifier les inhibiteurs présents dans le liquide articulaire suppuratif et de résoudre les problèmes qu'ils occasionnent lors de l'amplification d'ADN.

## Bibliographie

1. ARICAN M., COUGHLAN A.R., CLEGG P.D., et al. Matrix metalloproteinases 2 and 9 activity in bovine synovial fluids. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2000;**47**. 449-456.
2. BAILEY J.V. Bovine arthritides. Classification, diagnosis, prognosis, and treatment. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1985;**1**. 39-51.
3. BARONE R. Anatomie comparée des mammifères domestiques Tome 2 Arthrologie et myologie. 2nd ed, Paris, Vigot, 1990. 12.
4. BATEMAN K.G. Antimicrobial drug use in cattle. In *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. 3rd ed. Ames, Iowa State University Press, 2000. 576-590.
5. BENNETT D., TAYLOR D.J. Bacterial infective arthritis in the dog. *J Small Anim Pract* 1988;**29**. 207-230.
6. BERTONE A.L. Infectious arthritis. In *Joint disease in the horse*. 1st ed. Philadelphia, W.B Saunders Company, 1996. 397-409.
7. BERTONE A.L., McILWRAITH C.W., JONES R.L., et al. Comparison of various treatments for experimentally induced equine infectious arthritis. *Am J Vet Res* 1987;**48**. 519-29.
8. BERTONE A.L., MCILWRAITH C.W., JONES R.L., et al. Povidone-iodine lavage treatment of experimentally induced equine infectious arthritis. *Am J Vet Res* 1987;**48**. 712-715.
9. BERTONE A.L., McILWRAITH C.W., POWERS B.E., et al. Effect of four antimicrobial lavage solutions on the tarsocrural joint of horses. *Vet Surg* 1986;**15**. 305-315.
10. BROWN M.P., MAYO M.B., GRONWALL R.R. Serum and synovial fluid concentrations of ampicillin trihydrate in calves with suppurative arthritis. *Cornell Vet* 1991;**81**. 137-143.

11. BRUSIE R.W., SULLINS K.E., WHITE N.A., et al. Evaluation of sodium hyaluronate therapy in induced septic arthritis in the horse. *Equine Vet J* 1992;11(suppl). 18-23.
12. BURNS D.K., KUMAR V. The musculoskeletal system. In *Basic pathology*. 6th ed. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1997. 683.
13. BUTLER J.A., COLLES C.M., DYSON S.J., et al. General principles. In *Clinical radiology of the horse*. 2nd ed. Malden, Blackwell Science Ltd, 2000. 23-24.
14. BUTSON R.J. Bovine septic arthritis : A review of current and future treatment regimes. *Cattle Practice*. 1994;2. 315-321.
15. BUTSON R.J., SCHRAMME M.C., GARLICK M.H., et al. Treatment of intrasynovial infection with gentamicin-impregnated polymethylmethacrylate beads. *Vet Rec* 1996;138. 460-464.
16. CARON J.P. Principles of treatment of joint disease. In *Equine surgery*. 2nd ed. Philadelphia, W.B.Saunders Company, 1999. 687-688.
17. CHEN C.-E, KO J.-Y., LI C.-J. Acute septic arthritis of the hip in children. *Arch Orthop Trauma Surg* 2001;121. 521-526.
18. CLEGG P.D., BURKE R.M., COUGHLAN A.R., et al. Characterisation of equine matrix metalloproteinase 2 and 9; and identification of the cellular sources of these enzymes in joints. *Equine Vet J* 1997a;29. 335-42.
19. CLEGG P.D., COUGHLAN A.R., RIGGS C.M., et al. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in equine synovial fluids. *Equine Vet J* 1997b;29. 343-348.
20. COOK N.B. Prevalence of lameness among dairy cattle in Wisconsin as a function of housing type and stall surface. *J Am Vet Med Assoc* 2003;223. 1324-1328.
21. COUGHLAN A.R., ROBERTSON D.H., BENNETT D., et al. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in canine rheumatoid arthritis. *Vet Rec* 1998;143. 219-223.
22. CUCHACOVICH R., QUINET S., SANTOS A.M. Applications of polymerase chain reaction in rheumatology. *Rheum Dis Clin North Am* 2003;29. 1-20.
23. DESROCHERS A., ANDERSON D.E., St JEAN G. Surgical treatment of lameness. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2001;17. 143-158.

24. DESROCHERS A., St JEAN G., ANDERSON D.E. Use of facilitated ankylosis in the treatment of septic arthritis of the distal interphalangeal joint in cattle: 12 cases (1987-92). *J Am Vet Med Assoc*, 1995;**206**. 1923-1927.
25. FAJT V.R., APLEY M.D. Antimicrobial issues in bovine lameness. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2001;**17**.159-173.
26. FESSLER J.F. The musculoskeletal system. Functional anatomy and physiology of diarthrodial joints. In *The practice of large animal surgery*, vol 2. 1st ed, Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1984. 687-715.
27. FIRTH E.C. Current concepts of infectious polyarthritis in foals. *Equine Vet J* 1983;**15**. 5-9.
28. FIRTH E.C., KERSJES A.W., DIK K.J., et al. Haematogenous osteomyelitis in cattle. *Vet Rec* 1987;**120**. 148-152.
29. FRANCOZ D, DESROCHERS A, FECTEAU G, et al. A retrospective study of joint bacterial culture in 172 cases of septic arthritis in cattle (abstr), in *Proceedings. 20th Annu ACVIM Forum* 2002. 774.
30. GAGNON H., FERGUSON J.G., PAPICH M.G., et al. Single-dose pharmacokinetics of cefazolin in bovine synovial fluid after intravenous regional injection. *J Vet Pharmacol Ther* 1994;**17**. 31-7.
31. GOLDBERG G.I., MARMER B.L., GRANT G.A., et al. Human 72-kilodalton type IV collagenase forms a complex with a tissue inhibitor of metalloproteases designated TIMP-2. *Proc Natl Acad Sci* 1989;**86**. 8207-8211.
32. GOLDENBERG D.L., CHISHOLM P.L., RICE P.A. Experimental models of bacterial arthritis: a microbiologic and histopathologic characterization of the arthritis after the intraarticular injections of *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus aureus*, group A streptococci, and *Escherichia coli*. *J Rheumatol* 1983;**10**. 5-11.
33. GREEN L.E., HEDGES V.J., SCHUKKEN Y.H., et al. The impact of clinical lameness on the milk yield of dairy cows. *J Dairy Sci* 2002;**85**. 2250-2256.
34. GUARD C.L., BYMAN K.W., SCHWARK W.S. Effect of experimental synovitis on disposition of penicillin and oxytetracycline in neonatal calves. *Cornell Vet* 1989;**79**. 161-71.

35. HEGEMANN N., KOHN B., BRUNNENBERG L., et al. Biomarkers of joint tissue metabolism in canine osteoarthritis and arthritic joint disorders. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;**10**. 714-721.
36. HIBBS M.S., BAINTON D.F. Human neutrophil gelatinase is a component of specific granules. *J Clin Invest* 1989;**84**. 1395-402.
37. HIRSBRUNNER G., STEINER A. Treatment of infectious arthritis of the radiocarpal joint of cattle with gentamicin-impregnated collagen sponges. *Vet Rec* 1998;**142**. 399-402.
38. JABERI F.M., SHAHCHERAGHI G.H., AHADZADEH M. Short-term Intravenous Antibiotic Treatment of Acute Hematogenous Bone and Joint Infection In Children: A Prospective Randomized Trial. *J Pediatr Orthop* 2002;**22**. 317-320.
39. JACKSON P.G.G., STRACHAN W.D., TUCKER A.W., et al. Treatment of septic arthritis in calves by joint lavage- A study of 20 cases. *Cattle Practice* 1998;**6**. 335-339.
40. JALAVA J., SKURNIK M., TOIVANEN A. Bacterial PCR in the diagnosis of joint infection. *Ann Rheum Dis* 2001;**60**. 287-289.
41. JOUGLIN M., ROBERT C., VALETTE J.P., et al. Metalloproteinases and tumor necrosis factor-alpha activities in synovial fluids of horses: correlation with articular cartilage alterations. *Vet Res* 2000;**31**. 507-515.
42. KIM H.K.W., ALMAN B., COLE W.G. A shortened course of parenteral antibiotic therapy in the management of acute septic arthritis of the hip. *J Pediatr Orthop* 2000;**20**. 44-47
43. KEMPSELL K.E, COX C.J., HURLE M., et al. Reverse transcriptase-PCR analysis of bacterial rRNA for detection and characterization of bacterial species in arthritis synovial tissue. *Infect Immun* 2000;**68**. 6012-26.
44. KOFLER J. Ultraschalluntersuchung am Bewegungsapparat. In *Atla und Lehrbuch der Ultraschall-diagnostik beim Rind*. 1st ed. Berlin, Parey, 1997. 258-262.
45. LU K.-H., YANG S.-F., CHU S.-C., et al. The significance of altered gelatinase expression in the synovium of patient with arthritic effusions. *Clin Rheumatol* 2003;**23**. 21-26.

46. LAKRITZ J., MARSH A.E., COCKRELL M., et al. Characterization of gelatinases in bronchoalveolar lavage and gelatinases produced by alveolar macrophages isolated from healthy calves. *Am J Vet Res* 2004;**65**. 163-172.
47. LLOYD K.C., STOVER S.M., PASCOE J.R., et al. Synovial fluid pH, cytologic characteristics, and gentamicin concentration after intra-articular administration of the drug in an experimental model of infectious arthritis in horses. *Am J Vet Res* 1990;**51**. 1363-1369.
48. MADISON J.B., SOMMER M., SPENCER P.A. Relations among synovial membrane histologic findings, synovial fluid cytologic findings, and bacterial culture results in horses with suspected infectious arthritis: 64 cases (1979-1987). *J Am Vet Med Assoc* 1991;**198**. 1655-1661.
49. MADISON J.B., TULLENERS E.P., DUCHARME N.G., et al. Idiopathic gonitis in heifer: 34 cases (1976-1986). *J Am Vet Med Assoc* 1989;**194**. 273-277.
50. MAKOWSKI G.S., RAMSBY M.L. Zymographic analysis of latent and activated forms of matrix metalloproteinase -2 and -9 ins synovial fluid: correlation to polymorphonuclear leukocyte infiltration and in response to infection. *Clin Chim Acta* 2003;**329**. 77-81.
51. MARCHEVESKY A.M., READ R.A. Bacterial septic arthritis in 19 dogs. *Aus Vet J* 1999;**77**. 233-237.
52. MARTENS R.J., AUER J.A., CARTER G.K. Equine pediatrics : Septic arthrities and osteomyelitis. *J Am Vet Med Assoc* 1986;**188**. 582-585.
53. MEIJER M.C., Van WEEREN P.R., RIJKENHUIZEN A.B.M. Clinical experiences of treating septic arthritis in the equine by repeated joint lavage : a serie of 39 cases. *J Vet Med A* 2000;**47**. 351-365.
54. MENGSHOL J.A., MIX K.S., BRINCKERHOFF C.E. Matrix metalloproteinase as therapeutic targets in arthritic diseases. Bull'eye or missing the mark? *Arthritis Rheum* 2002;**46**. 13-20.
55. MONTGOMERY R.D., LONG I.R., MILTON J.L., et al. Comparison of aerobic culturette, synovial membrane biopsy, and blood culture medium in detection of canine bacterial arthritis. *Vet Surg* 1989;**18**. 300-303.

56. MOORE R.M., SCHNEIDER R.K., KOWALSKI J., et al. Antimicrobial susceptibility of bacterial isolates from 233 horses with musculoskeletal infection during 1979-1989. *Equine Vet J* 1992;**24**. 450-456.
57. MUNROE G.A., CAUVIN E.R. The use of arthroscopy in the treatment of septic arthritis in two Highland calves. *Br Vet J* 1994;**150**. 439-449.
58. NADE S. Septic arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2003;**17**. 183-200.
59. NAGASE H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997;**378**. 151-160.
60. NAVARRE C.B., ZHANG L., SUNKARA G., et al. Ceftiofur distribution in plasma and joint fluid following regional limb injection in cattle. *J Vet Pharmacol Ther* 1999;**22**. 13-9.
61. OPDENAKKER G., VAN DEN STEEN P.E., DUBOIS B., et al. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol* 2001;**69**. 851-859.
62. OWENS J.G., KAMERLING S.G., STANTON S.R., et al. Effects of pretreatment with ketoprofen and phenylbutazone on experimentally induced synovitis in horses. *Am J Vet Res* 1996;**57**. 866-874.
63. PRAVE M. Pathologie infectieuse articulaire chez les bovins. *Bulletin des Groupements Techniques Veterinaires*. 1982;**20**. 23-37.
64. ROHDE C., ANDERSON D.E., DESROCHERS A., et al. Synovial fluid analysis in cattle: A review of 130 cases. *Vet Surg* 2000;**29**. 341-346.
65. ROULEAU G., BAKINE M., DUBREUIL P. Factors influencing the development of jugular thrombophlebitis in cattle and comparison of 2 types of catheter. *Can Vet J* 2003;**44**. 399-404.
66. RUSSEL A.M., ROWLANDS G.J., SHAW S.R., et al. Survey of lameness in British dairy cattle. *Vet Rec* 1982;**111**. 155-160.
67. SCHNEIDER R.K., BRAMLAGE L.R., MOORE R.M., et al. A retrospective study of 192 horses affected with septic arthritis/tenosynovitis. *Equine Vet J* 1992;**24**. 436-442.

68. SHIRTLIFF M.E., MADER J.T. Acute septic arthritis. *Clin Microbiol Rev* 2002;**15**. 527-544.
69. SHOAF S.E., SCHWARK W.S., GUARD C.L., et al. Pharmacokinetics of trimethoprim/sulfadiazine in neonatal calves: influence of synovitis. *J Vet Pharmacol Ther* 1986;**9**. 446-454.
70. SCHURMAN D.J., MIRRA J., DING A., et al. Experimental *E. coli* arthritis in the rabbit. A model of infectious and post-infectious inflammatory synovitis. *J Rheumatol* 1977;**4**. 118-128.
71. SIMKIN PA. Friction and lubrication in synovial joints. *J Rheumatol*;**27**. 567-568.
72. TAKAHASHI K., OBOSHI K., HONMA Y., et al. Therapeutic effect of sodium polymolecular hyaluronate (SPH) on arthritis in dairy cattle. *J Jap Vet Med Assoc* 1985;**38**. 782-787.
73. TAYLOR-ROBISON D., KEAT A. Septic and aseptic arthritis: a continuum? *Clin Rheum* 1999;**13**. 179-192.
74. TRENT A.M., PLUMB D. Treatment of infectious arthritis and osteomyelitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1991;**7**. 747-78.
75. van den BOOM R., BRAMA P.A., KIERS G.H., et al. The influence of repeated arthrocentesis and exercise on matrix metalloproteinase and tumor necrosis factor alpha activities in normal equine joints. *Equine Vet J* 2004;**36**. 155-159
76. Van der HEIJDEN I.M., WILBRINK B., VIJE A.E., et al. Detection of bacterial DNA in serial synovial samples obtained during antibiotic treatment from patients with septic arthritis. *Arthritis Rheum* 1999;**42**. 2198-2203.
77. Van PELT R.W. Aseptic tenosynovitis in cattle. *J Am Vet Med Assoc* 1970;**15**. 178-189.
78. Van PELT R.W. Idiopathic septic arthritis in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* 1972;**161**. 278-284
79. Van PELT R.W. Infectious arthritis in cattle caused by *Corynebacterium pyogenes*. *J Am Vet Med Assoc* 1970;**156**. 457-465.

80. Van PELT R.W., CONNER G.H. Synovial fluid from the normal bovine tarsus. II. Relative viscosity and quality of mucopolysaccharide. *Am J Vet Res* 1963;**100**. 537-544.
81. Van PELT R.W., CONNER G.H. Synovial fluid from the normal bovine tarsus. I. Cellular constituents, volume, and gross appearance. *Am J Vet Res* 1963;**98**. 112-121.
82. Van PELT R.W., LANGHAM R.F. Synovial fluid changes produced by infectious arthritis in cattle. *Am J Vet Res*, 1968;**29**. 507-516.
83. Van PELT R.W., LANGHAM R.F., SLEIGHT S.D. Lesions of infectious arthritis in calves. *J Am Vet Med Assoc* 1966;**149**. 303-311.
84. VERSCHOOTEN F., DeMOOR A. Infectious arthritis in cattle : a radiographic study. *J Am Vet Radio Soc.* 1974;**15**. 60-69.
85. VERSCHOOTEN F., VERMEIREN D., DEVRIESE L. Bone infection in the bovine appendicular skeleton: a clinical, radiographic, and experimental study. *Vet Radiol Ultrasound* 2000;**41**. 250-60.
86. Von ESSEN R. Culture of joint specimens in bacterial arthritis Impact of blood culture bottle utilization. *Scand J Rheumatol* 1997;**26**. 293-300.
87. WARNICK L.D., JANSSEN D., GUARD C.L., et al. The effect of lameness on milk production in dairy cows. *J Dairy Sci* 2001;**84**. 1988-1997.
88. WAGNER A.E., MCILWRAITH C.W., MARTIN G.S. Effect of intra-articular injection of orgotein and saline solution on equine synovia. *Am J Vet Res* 1982;**43**. 594-597.
89. WEAVER A.D. Joint conditions. In *Lameness in cattle*. 3rd ed, Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1997. 162-170.
90. WEGENER K.M., HEJE N.I., AARESTRUP F.M., et al. The morphology of synovial grooves (Fossae synoviales) in joints of cattle of different age groups. *Zentralbl Veterinarmed A* 1993;**40**. 359-70.
91. WEISBRODE S.E., DOIGE C.E. Bone and Joints. In *Thomson's Special veterinary pathology*. 3rd ed. St Louis, Mosby, 2001. 524-530

92. WYSENBEEK A.J., VOLCHEK J., AMIT M., et al. Treatment of staphylococcal septic arthritis in rabbits by systemic antibiotics and intra-articular corticosteroids. *Ann Rheum Dis* 1998;**57**. 687-690.



# ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE<sup>1</sup>

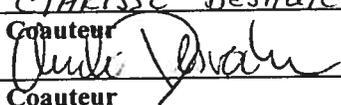
## IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

Nom de l'étudiant David Francoz		Code permanent
Sigle du programme M.Sc.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Sciences Cliniques

## DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs Bacteriological and cytological synovial fluid modifications in experimentally induced infectious arthritis in calves	
Titre David Francoz, André Desrochers, Gilles Fecteau, Clarisse Desautels, Jean Sébastien Latouche, Mado Fortin	
Revue Journal of Veterinary Internal Medicine	Date de publication

## DÉCLARATION DES COAUTEURS

<b>Déclaration</b> <i>À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que (nom de l'étudiant) inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre (titre du mémoire).</i>		
Coauteur JEAN SEBASTIEN LATOUCHE		Date 1 Nov. 2004
Coauteur Madelaine Fortin		Date 2004/11/01
Coauteur CLARISSE DESAUTELS		Date 2 Nov 2004
Coauteur 		Date 2 NOV 2004
Coauteur GILLES FELTEAU		Date 02/11/2004
Coauteur		Signature
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date

Envoyé à la FÉS le

<sup>1</sup>Annexe II du Guide de présentation et d'évaluation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat, mars 2001

# ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE<sup>1</sup>

## IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

<b>Nom de l'étudiant</b> David Francoz		<b>Code permanent</b>
<b>Sigle du programme</b> M.Sc.	<b>Titre du programme</b> Sciences vétérinaires	<b>Option</b> Sciences Cliniques

## DESCRIPTION DE L'ARTICLE

<b>Auteurs</b> David Francoz, André Desrochers, Nathalie Simard, Yves Saint Pierre, Gilles Fecteau, Jean Sébastien Latouche, Mado Fortin.	
<b>Titre</b> Secretion of MMP-2 and MMP-9 in synovial fluids from calves with experimentally induced septic arthritis.	
<b>Revue</b> American Journal of Veterinary Research	<b>Date de publication</b>

## DÉCLARATION DES COAUTEURS

<b>Déclaration</b> <i>À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que (nom de l'étudiant) inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre (titre du mémoire).</i>		
<b>Coauteur</b> JEAN-SEBASTIEN LATOUCHE		<b>Date</b> 1 NOV. 2004
<b>Coauteur</b> Madeleine Fortin		<b>Date</b> 2004/11/01
<b>Coauteur</b> André Desrochers		<b>Date</b> 07/11/2004
<b>Coauteur</b> GILLES FECTEAU		<b>Date</b> 02/11/2004
<b>Coauteur</b>		<b>Date</b>
<b>Coauteur</b>	<b>Signature</b>	<b>Date</b>
<b>Coauteur</b>	<b>Signature</b>	<b>Date</b>
<b>Coauteur</b>	<b>Signature</b>	<b>Date</b>

Envoyé à la FÉS le

<sup>1</sup>Annexe II du Guide de présentation et d'évaluation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat, mars 2001

# ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE<sup>1</sup>

## IDENTIFICATION DE L'ETUDIANT

Nom de l'étudiant David Francoz		Code permanent
Sigle du programme M.Sc.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Sciences Cliniques

## DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs David Francoz, André Desrochers, Nathalie Simard, Yves Saint Pierre, Gilles Fecteau, Jean Sébastien Latouche, Mado Fortin.	
Titre Secretion of MMP-2 and MMP-9 in synovial fluids from calves with experimentally induced septic arthritis.	
Revue American Journal of Veterinary Research	Date de publication

## DECLARATION DES COAUTEURS

<b>Déclaration:</b> <i>À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que (nom de l'étudiant) inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre (titre du mémoire).</i>		
Coauteur Nathalie Simard		Date 2004-11-02
Coauteur		Date
Coauteur	Signature	Date

Envoyé à la FES le

# ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE<sup>1</sup>

## IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

<b>Nom de l'étudiant</b> David Francoz		<b>Code permanent</b>
<b>Sigle du programme</b> M.Sc.	<b>Titre du programme</b> Sciences vétérinaires	<b>Option</b> Sciences Cliniques

## DESCRIPTION DE L'ARTICLE

<b>Auteurs</b> David Francoz, André Desrochers, Nathalie Simard, Yves Saint Pierre, Gilles Fecteau, Jean Sébastien Latouche, Mado Fortin.	
<b>Titre</b> Secretion of MMP-2 and MMP-9 in synovial fluids from calves with experimentally induced septic arthritis.	
<b>Revue</b> American Journal of Veterinary Research	<b>Date de publication</b>

## DÉCLARATION DES COAUTEURS

<b>Déclaration</b> À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que (nom de l'étudiant) inclut cet article dans <i>maîtrise qui a pour titre (titre du mémoire).</i>		
<b>Coauteur</b> YVES ST-PIERRE		<b>Date</b> 1 Avril 2004
<b>Coauteur</b>		<b>Date</b>
<b>Coauteur</b>	<b>Signature</b>	<b>Date</b>

Envoyé à la FES le:

<sup>1</sup>Annexe II du Guide de présentation et d'évaluation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat, mars 2001

02001 06