

Université de Montréal

**Évaluation d'un implant résorbable à base d'amidon réticulé
contenant de la ciprofloxacine pour la prévention et le traitement
d'une ostéomyélite expérimentale chez le chien**

Par

Louis M. Huneault

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

Avril 2004

© Louis M. Huneault, 2004



SF

607

U54

2004

V. 015



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 :

**Évaluation d'un implant résorbable à base d'amidon réticulé
contenant de la ciprofloxacine pour la prévention et le traitement
d'une ostéomyélite expérimentale chez le chien**

Présenté par :

Louis M. Huneault

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jean Sirois :	Président-rapporteur
Dr Bertrand Lussier :	Directeur de recherche
Dr Pascal Dubreuil :	Codirecteur de recherche
Dr Cyril Désévaux :	Codirecteur de recherche
Dre Sophie Morisset :	Membre du Jury

RÉSUMÉ

Le traitement de l'ostéomyélite peut être difficile suite à la faible pénétration antibiotique dans les tissus dévascularisés présents au site d'infection. Aussi, le biofilm qui se forme en surface d'un mode de fixation infecté protège les bactéries de l'action des antibiotiques et des anticorps. Les systèmes à libération contrôlée, comme l'implant à base d'amidon réticulé à teneur élevée en amylose (ARTEA), permettent d'atteindre des concentrations antibiotiques locales élevées et soutenues et ainsi une pénétration des tissus dévascularisés et biofilms. Les efficacités préventive et curative d'implants ARTEA chargés en ciprofloxacine (CFX) ont été évaluées sur un modèle canin d'ostéomyélite expérimentale. Trente-deux chiens ont été répartis en quatre groupes de traitement : A) implant ARTEA-CFX préventif, B) témoin positif, C) CFX orale curative et D) implant ARTEA-CFX curatif. Au temps 0, une vis a été inoculée de *S. aureus* puis implantée dans le fémur gauche de chacun des chiens des groupes A, B, C et D. Les chiens du groupe A ont simultanément reçu des implants ARTEA-CFX, permettant ainsi d'évaluer leur efficacité dans la prévention du développement d'ostéomyélite. À la semaine 4, les chiens des groupes B, C et D sont retournés en chirurgie : une ostéomyélite a été diagnostiquée chez tous ces chiens par cultures bactériologiques, radiographies et évaluations macroscopiques. Ces chiens ont ensuite été traités comme suit: B) débridement chirurgical seul, C) débridement + CFX orale, D) débridement + implants ARTEA-CFX. À la semaine 10, aucun signe d'ostéomyélite n'a été décelé chez les chiens du groupe A. Une réduction significative des comptes bactériens a été notée dans les groupes B, C et D. Les lésions radiographiques ont diminué de sévérité dans les groupes C et D. Les infiltrations neutrophilique et lymphoplasmocytaire étaient absentes dans le groupe A et inférieures dans les groupes C et D vs B. L'implant ARTEA-CFX semble être une alternative de choix pour prévenir et traiter l'ostéomyélite. Une utilisation appropriée en situation de risque pourrait réduire les taux d'infection. Aussi, le traitement d'une ostéomyélite établie pourrait être facilité grâce à une implantation lors du débridement chirurgical.

Mots clés: antibiothérapie locale, biofilm, débridement chirurgical, infection, orthopédie, système à libération contrôlée.

SUMMARY

Osteomyelitis treatment can be difficult because of limited penetration of antibiotics into the devascularized tissues present at the infection site. Also, the formation of biofilms on the surface of infected fixation devices protects bacteria from the action of antibiotics and antibodies. Drug delivery systems like crosslinked high amylose starch (CLHAS) allow high and sustained local drug concentrations, which allows penetration of devascularized tissues and biofilms. In this study, the preventive and curative efficacies of CLHAS implants containing ciprofloxacin (CFX) were evaluated in a canine experimental osteomyelitis model. Thirty-two dogs were assigned to four groups: A) preventive CFX-CLHAS implants, B) positive control, C) curative oral CFX and D) curative CFX-CLHAS implants. Initially, all animals of groups A, B, C and D underwent the femoral implantation of a screw inoculated with *S. aureus*. Dogs from group A simultaneously received CFX-CLHAS implants to evaluate their efficacy for the prevention of osteomyelitis development. At week 4, dogs of groups B, C and D were re-operated: an osteomyelitis was diagnosed in all dogs with bacterial cultures, radiographs and macroscopic evaluations. Dogs were then treated as follow: B) debridement only, C) debridement + oral CFX and D) debridement + CFX-CLHAS implants. At week 10, no sign of osteomyelitis was observed in group A. A significant reduction of bacterial counts was observed in groups B, C and D. Radiographic lesions scores were significantly reduced in both CFX treatment groups from week 4 to 10. Periosteal and marrow neutrophilic and lymphoplasmocytic infiltration were absent in group A and significantly lower in groups C and D vs group B. CFX-loaded CLHAS implants were a safe and efficient alternative for the prevention and treatment of osteomyelitis. The judicious use of these implants in infection prone situations such as open fractures may reduce infection rates. Also, the treatment of established infections could be attained with implantation performed at the time of debridement.

Key words: biofilm, drug delivery system, infection, local antibiotherapy, orthopedics, surgical debridement.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé (Français)	iii
Summary (Anglais)	v
Table des matières	vii
Liste des tableaux	xiv
Liste des figures.....	xv
Liste des sigles et abréviations	xviii
Remerciements	xx

Introduction	1
---------------------------	----------

Chapitre premier: Recension de la littérature

I. Description de l'ostéomyélite	5
---	----------

1. Définitions	5
2. Généralités	5
3. Classification de Cierny et Mader.....	7
3.1. Cierny et Mader Stade 1 (Médullaire)	8
3.2. Cierny et Mader Stade 2 (Superficielle).....	9
3.3. Cierny et Mader Stades 3 et 4 (Localisée ou diffuse).....	9

II. Pathophysiologie de l'ostéomyélite post-traumatique	11
--	-----------

1. Agents infectieux.....	11
---------------------------	----

2. Établissement de l'infection.....	12
2.1. Stabilité des segments osseux.....	13
2.2. Biofilm	13
3. Réponse de l'hôte.....	15
4. Persistance de l'infection.....	18
III. Diagnostic de l'ostéomyélite post-traumatique	19
1. Signes cliniques.....	19
2. Radiographie	20
3. Bactériologie	22
4. Histopathologie	22
5. Autres méthodes.....	23
IV. Traitement de l'ostéomyélite post-traumatique	25
1. Débridement et autres aspects chirurgicaux	25
2. Antibiothérapie systémique	27
3. Systèmes à libération locale contrôlée	30
3.1. Non-résorbables.....	31
3.2. Résorbables	34
4. À propos de la résistance bactérienne	37
V. Prévention de l'ostéomyélite post-traumatique	39
VI. Amidon réticulé à teneur élevée en amylose.....	41
1. Biocompatibilité.....	42
2. Propriétés d'éluion	43

VII. Objectifs et hypothèses de recherche	46
--	-----------

Chapitre deuxième: Méthodologie

I. Production et utilisation d'un modèle canin d'ostéomyélite fémorale	48
---	-----------

1. Souche bactérienne.....	48
2. Implants ARTEA-CFX.....	48
3. Procédures chirurgicales et groupes de traitement.....	48

II. Méthodes d'évaluation.....	53
---------------------------------------	-----------

1. Suivi clinique	53
2. Radiographie	53
3. Évaluation macroscopique.....	54
4. Bactériologie	54
5. Histopathologie	54
6. Pharmacocinétique	55
7. Concentration osseuse en CFX	55

III. Analyses statistiques	56
---	-----------

Chapitre troisième: Étude expérimentale

Prevention and treatment of experimental osteomyelitis in dogs with ciprofloxacin-loaded crosslinked high amylose starch implants.

Louis M. Huneault, DMV ; Bertrand Lussier, DMV, MSc, Dipl. ACVS; Pascal Dubreuil, DMV, MSc, PhD; Luc Chouinard, DMV, DES, Dipl. ACVP; Cyril Désévaux, DMV, MSc, PhD.

Sous presse au *Journal of Orthopaedic Research*, avril 2004

I. Abstract	59
II. Introduction	60
III. Materials and methods	62
1. Bacterial isolate.....	62
2. Crosslinked high amylose starch implants	62
3. Canine osteomyelitis model.....	62
4. Evaluation methods.....	64
4.1. Radiographs.....	64
4.2. Macroscopic evaluations.....	64
4.3. Bacterial cultures	65
4.4. Histopathological examinations	65
5. Statistical analysis	65
IV. Results	66

1. Week 4.....	66
1.1. Radiographs.....	66
1.2. Macroscopic evaluations.....	66
1.3. Bacterial cultures	67
2. Week 10.....	67
2.1 Radiographs.....	67
2.2 Macroscopic evaluations.....	67
2.3 Bacterial cultures	67
2.4 Histopathological examinations	68
V. Discussion	68
VI. Acknowledgements	73
VII. References	74
VIII. Figure legends.....	79

Chapitre quatrième: Autres résultats

I. Résultats non publiés.....	85
1. Pharmacocinétique	85
2. Concentration osseuse en CFX	85

Chapitre cinquième: Discussion et conclusion

I. Discussion	87
1. Modèle d'ostéomyélite	87
2. Prophylaxie avec les implants ARTEA-CFX	89
3. Effet du débridement chirurgical	91
4. Bactériologie	92
5. Traitement curatif avec les implants ARTEA-CFX.....	94
6. Avantages/désavantages des SLC	95
7. L'ARTEA comme biomatériau.....	96
8. Particularités diagnostiques	98
9. Toxicité des quinolones sur le cartilage	99
10. Différences entre les sites proximal et distal	99
11. Résistance bactérienne.....	100
12. Suivi préliminaire de cas cliniques.....	101
13. Voies futures	102
II. Conclusion	104
Bibliographie	105
Annexes	xxi
Annexe 1. Résumé et schématisation du protocole de recherche.....	xxi
Annexe 2. Échelle de douleur.....	xxii
Annexe 3. Liste des critères d'euthanasie	xxiii

Annexe 4. Liste des critères d'évaluation radiographique xxiv

Annexe 5. Liste des critères d'évaluation macroscopique xxv

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre premier

Tableau I.	Systeme de classification de Cierny and Mader	7
-------------------	---	---

LISTE DES FIGURES

Chapitre premier

Figure 1.	Localisation de 77 lésions chez 67 chiens atteints d'ostéomyélite post-traumatique	5
Figure 2.	Vascularisation métaphysaire chez le chien immature.....	9
Figure 3.	Formation d'un biofilm en surface d'un implant chirurgical.....	14
Figure 4.	Progression d'un exsudat à travers l'os compact	16
Figure 5.	Exemples radiographiques d'ostéolyse et de réaction périostée d'ostéomyélites post-traumatiques	21
Figure 6.	Scintigraphie au technetium ^{99m} d'une zone d'activité métabolique anormale causée par une ostéomyélite.....	24
Figure 7.	Technique de la fenêtre ovale pour le débridement médullaire	26
Figure 8.	Billes de PMMA imprégnées de gentamicine.....	33
Figure 9.	Implants d'amidon réticulé à teneur élevée en amylose avec 0,5% HVO et 20% CFX	42
Figure 10.	Relâche cumulative de CFX (moy. ± S.D., n=5) d'implants d'amidon contenant 2,5; 5,0 et 7,5% de CFX avec 1% HVO	44

Figure 11.	Concentrations osseuses de CFX (moy. \pm S.E.) après implantation de différentes combinaisons d'implants d'amidon.....	45
-------------------	--	----

Chapitre deuxième

Figure 12.	Représentation schématique des séquences de manipulations fémorales à la semaine 4 et à la semaine 10.....	51
-------------------	--	----

Chapitre troisième

Figure 13.	FIG. 1. Schematic representation of femoral manipulations at week 4 and week 10	80
Figure 14.	FIG. 2. Radiographic comparison of groups B and D at week 10.....	81
Figure 15.	FIG. 3. Means (\pm S.E.) cfu of <i>S. aureus</i> in cultured bone specimen and percentage of negative sites for dogs in groups A, B, C, and D at weeks 4 and 10.....	82
Figure 16.	FIG.4. Undecalcified histopathological transverse femur section of a dog treated with ciprofloxacin-CLHAS implants.....	83

Chapitre quatrième

Figure 17	Pharmacocinétique sérique de CFX vs temps après inoculation et mise en place de huit implants ARTEA-CFX chez huit chiens du groupe A.....	85
------------------	---	----

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

°C	<i>Celsius degrees, degrés Celcius</i>
%	<i>percent, pour cent</i>
>	<i>greater than, plus grand que</i>
<	<i>lesser than, plus petit que</i>
±	<i>plus or minus, plus ou moins</i>
ARTEA	<i>amidon réticulé à teneur élevée en amylose</i>
ATCC	<i>american type culture collection</i>
BMP	<i>bone morphogenic protein, protéine osseuse morphogénique</i>
C_{max}	<i>maximum serum concentration, concentration sérique maximale</i>
cfu	<i>colony forming unit, unité formant une colonie</i>
CFX	<i>ciprofloxacin, ciprofloxacine</i>
CLHAS	<i>crosslinked high amylose starch</i>
cm	<i>centimeter, centimètre</i>
CMB	<i>concentration minimale bactéricide</i>
CMI	<i>concentration minimale inhibitrice</i>
DDS	<i>drug delivery system</i>
g	<i>gram, gramme</i>
HPMC	<i>hydroxypropylmethylcellulose, hydroxypropylméthylcellulose</i>
HVO	<i>hydrogenated vegetable oil, huile végétale hydrogénée</i>
IgG	<i>immunoglobulin G, immunoglobuline G</i>
IGF-I	<i>insulin-like growth factor-I, facteur de croissance insulinoimmétique I</i>
IM	<i>intramuscular, intramusculaire</i>
IV	<i>intravenous, intraveineux</i>
kD	<i>kilo Dalton, kilo Dalton</i>
kg	<i>kilogram, kilogramme</i>
µg	<i>microgram, microgramme</i>
µm	<i>micrometer, micromètre</i>

mg	<i>milligram, milligramme</i>
MIC	<i>minimum inhibitory concentration</i>
mL	<i>milliliter, millilitre</i>
mm	<i>millimeter, millimètre</i>
PGA	<i>poly(glycolic acid), poly(acide glycolique)</i>
PLA	<i>poly(lactic acid), poly(acide lactique)</i>
PLGA	<i>poly(lactic acid-co-glycolic acid), poly(acide lactique-co-acide glycolique)</i>
PMMA	<i>polymethylmethacrylate, poly(méthacrylate de méthyle)</i>
SARM	<i>S. aureus résistant à la méthicilline</i>
SD	<i>standard deviation, écart-type</i>
SE	<i>standard error, erreur-type</i>
SEM	<i>standard error of the mean, erreur-type de moyenne</i>
SLC	<i>système à libération contrôlée</i>

REMERCIEMENTS

Au Dr Bertrand Lussier, mon directeur de maîtrise et de DES, pour sa grande disponibilité, sa participation active, sa bonne humeur et son équilibre.

Au Dr Cyril Désévaux, plus qu'étroit collaborateur, pour sa rigueur scientifique, son perfectionnisme, sa participation active, sa patience et sa bonne tutelle.

Au Dr Pascal Dubreuil, mon codirecteur de maîtrise, pour sa rigueur scientifique, son exigence, sa participation active et ses mots d'encouragement.

Au Dr Serge Messier, collaborateur «à l'interne», pour son aide dans la section bactériologique.

Au Dr Luc Chouinard, collaborateur «à l'externe», pour sa participation à la section histopathologique.

À Nancy Rodrigue, future vétérinaire, pour son aide tout au long de l'été-automne 2001. Sans ton aide pendant cette période, je ne « rejoignais » pas les deux bouts!

Au Dr Laurent Blond, avant tout un ami, mais aussi collaborateur lors des journées chirurgicales, pour sa disponibilité, son humour et ses photos voilées...

Au personnel du complexe de bioévaluation, pour les bons soins portés aux chiens et leur bonne collaboration pendant la période expérimentale.

À Labopharm Inc., Laval, Qc, pour avoir financé ce projet avec confiance.

INTRODUCTION

Le développement d'une ostéomyélite post-traumatique est une complication rare, mais tout de même trop fréquente d'affections traumatiques de l'os lorsque l'on considère sa gravité et la difficulté de la traiter. Elle peut faire suite à une chirurgie orthopédique élective, mais on la rencontre plus fréquemment suite à des fractures ouvertes avec traumatisme tissulaire plus ou moins important.^{44,106} Même si de grands progrès ont été accomplis dans la gestion de ces infections au cours des dernières années, le traitement de cette condition peut être frustrant et demeure un défi de taille pour le chirurgien orthopédique. La présence de tissus mous et osseux nécrotiques et dévascularisés au site impliqué diminue le pouvoir pénétrant des antibiotiques administrés de façon systémique et explique en partie le comportement réfractaire de ces infections. De plus, plusieurs bactéries sont capables de produire une membrane de polysaccharides et d'ions, appelée biofilm, à la surface des implants chirurgicaux utilisés pour la stabilisation des segments osseux affectés. Ce biofilm protège les bactéries de l'action des anticorps et des antibiotiques.^{24,28,52,60,91,106}

Les bases du traitement actuellement préconisé reposent sur un débridement chirurgical, une antibiothérapie de longue durée, un recouvrement tissulaire adéquat et le retrait ou le changement du matériel de fixation orthopédique sans négliger la stabilité des segments osseux impliqués.^{2,43,70,72,79,103,113} La réponse à cette approche thérapeutique est encore souvent insatisfaisante, avec des taux d'échec rapportés allant jusqu'à 20% en médecine humaine et vétérinaire.^{28,52,103,106,110} L'ostéomyélite est aussi redoutable pour sa tendance vers la récurrence, et ce après des années de latence. Il a déjà été question que le terme « guérison » ne soit pas utilisé pour décrire l'issue positive d'un traitement, mais que plutôt le terme « contrôle » soit employé.⁶⁷ Chez l'humain, les conséquences sont très débilitantes pour le patient et se mesurent non seulement à un niveau physique, mais aussi à un niveau émotionnel. Les patients peuvent vivre des frustrations et inquiétudes face à leurs capacités motrices réduites et douloureuses, face

au besoin possible de procédures chirurgicales répétées et voire même face à la capacité limitée de la médecine à leur venir en aide.

Plusieurs efforts ont donc été portés dans les dernières années à la recherche et au développement de systèmes à libération contrôlée (SLC). Ces systèmes permettent de libérer localement un antibiotique à des concentrations allant jusqu'à 200 fois celles obtenues par un traitement parentéral tout en minimisant le potentiel de toxicité systémique.^{3,27,28,45,56,101} Ces concentrations locales élevées, et soutenues sur des périodes de temps variables selon la matrice de libération, permettent la pénétration des biofilms et des tissus habituellement inaccessibles par voie vasculaire. Le poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA) est le SLC le plus étudié et le plus utilisé pour l'antibiothérapie locale.^{2,16,45,92,99,101} Même s'il a fait ses preuves en tant que libérateur d'antibiotiques, le PMMA n'est pas un implant idéal. Il n'est pas résorbable, peut mener à des réactions d'incompatibilité tissulaires, et peut servir de support pour la croissance bactérienne.^{23,46,72,86,107} Pour ces raisons, les efforts les plus récents ont été dirigés vers le développement de SLC résorbables comme le plâtre de Paris, les cylindres de poly(acide lactique), l'hydroxyapatite de calcium, le sulfate de calcium, les billes de poly(acide glycolique), les produits dérivés de la fibrine, le collagène et les barres de chitosan.^{2,6,17,27,28,43,49,52,55,72,78,79,81,82,99,101} Leur avantage majeur est d'éviter une deuxième chirurgie pour leur retrait, diminuant ainsi la morbidité et les lésions supplémentaires à la délicate vascularisation locale. Par contre, un désavantage de ces nouveaux SLC est que leur coût de revient est fréquemment trop élevé pour permettre leur utilisation régulière, même si elle est justifiée, notamment en médecine vétérinaire.^{27,74}

L'amidon réticulé à teneur élevée en amylose (ARTEA) est un polymère insoluble dans l'eau, utilisé pour fabriquer des matrices hydrophiles. L'ARTEA a initialement été développé pour la préparation de formes galéniques solides pour la voie orale, permettant une libération contrôlée d'un principe actif sur 12-24 heures.^{62,63} Il a récemment été démontré que l'implantation sous-cutanée et intramusculaire d'implants

à base d'ARTEA était très bien tolérée et que ces implants avaient des propriétés de libération contrôlée.^{31,32} Les quinolones sont des antibiotiques présentement utilisés pour traiter plusieurs infections orthopédiques incluant des cas d'ostéomyélite.^{28,55,65,70,88,111} Elles ont l'avantage de pénétrer le tissu osseux à des concentrations suffisantes pour inhiber la plupart des membres de la famille des Enterobacteriaceae, et un grand pourcentage des souches de *Pseudomonas* spp. et de *Staphylococcus (S.)* spp..^{65,88,111} Même si la performance de la ciprofloxacine (CFX) dans le traitement de cas cliniques d'ostéomyélite post-traumatique a récemment été remise en question,⁷⁴ plusieurs études révèlent que la CFX est l'un des agents les plus actifs contre les biofilms de *S. aureus* et de *P. Aeruginosa*,^{25,85,97} et que cet antibiotique est un choix judicieux pour le traitement de l'ostéomyélite.^{65,88,111} Après la mise en place péri-fémorale d'implants ARTEA-CFX chez des lapins, les concentrations locales musculaires et osseuses en CFX ont été détectées largement au dessus de la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour *S. aureus*, pendant au moins 28 jours.³³

Dans la continuité de l'évaluation de l'ARTEA en tant que SLC, cette étude présentait comme objectif d'évaluer les efficacités préventive et curative des implants ARTEA-CFX dans un modèle d'ostéomyélite expérimentale canine. Les résultats obtenus à travers cette étude nous permettront d'évaluer si la prévention et le traitement d'infections osseuses assistés de ce nouveau SLC se comparent favorablement à une prophylaxie ou traitement par voie orale en situation *in vivo*. Si tel est le cas, une étude clinique multicentrique pourrait ensuite être planifiée afin d'investiguer davantage son potentiel en situation *in vivo* non-expérimentale.

Chapitre premier

RECENSION DE LA LITTÉRATURE

I. Description de l'ostéomyélite

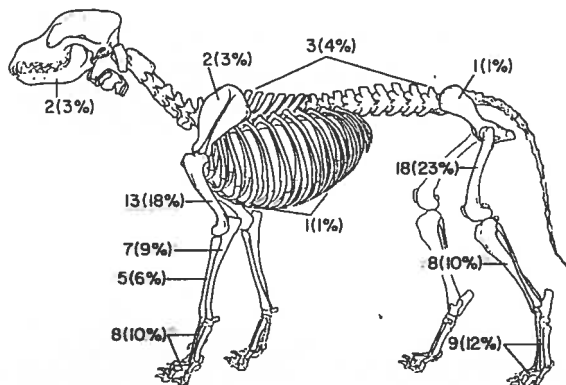
1. Définitions:

L'ostéomyélite se définit comme une inflammation de la moelle osseuse, du cortex osseux et éventuellement de son périoste causée par un organisme infectieux. L'ostéomyélite post-traumatique, dont il sera question dans ce mémoire, est une ostéomyélite qui fait suite à un trauma osseux accidentel ou chirurgical.

2. Généralités:

L'ostéomyélite post-traumatique est une condition qui n'a pas de distribution particulière en fonction de la race ou de l'âge chez le chien. La prévalence est plus élevée chez le mâle que chez la femelle (64% vs 36%, respectivement),¹⁹ ce qui coïncide avec la distribution des fractures en fonction du sexe (62% mâle vs 38% femelle) rapportée par une autre étude.⁹

Figure 1. Localisation de 77 lésions chez 67 chiens atteints d'ostéomyélite post-traumatique (d'après Caywood DD et coll¹⁹)



Le squelette appendiculaire est impliqué dans près de 90% des cas d'ostéomyélites post-traumatiques chez le chien (Figure 1, page 5). Cette forte proportion s'explique par la plus grande incidence de fracture, de morsure et le pauvre recouvrement musculaire à ces endroits.¹⁹ À l'exception des lésions impliquant les métarpes, les métatarses et les phalanges, la grande majorité des patients n'ont qu'un seul os affecté. Au niveau des extrémités distales des membres, les fractures sont souvent accompagnées de plaies superficielles ou ponctiformes. Étant donné la proximité des nombreuses structures osseuses de la région, l'infection des tissus mous et d'un os peut mener à la propagation de l'ostéomyélite vers un autre os voisin.

En ce qui concerne la nomenclature, une certaine confusion est perceptible dans la littérature face aux nombreux termes qui caractérisent l'ostéomyélite. Les descriptions telles que « aiguë », « chronique », « post-traumatique », « hémotogène » et même « infection de plaie » sont trop souvent utilisées de façon interchangeable pour désigner ces infections osseuses.¹⁰ L'ostéomyélite peut être classée selon la durée (aiguë, chronique), selon sa pathophysiologie (hémotogène, à foyer contigu, post-traumatique), selon le site affecté (tibia, fémur, vertèbres, phalanges, mandibule), selon son étendue (localisée ou diffuse) et selon le type de patient (hôte normal, hôte immunosupprimé, hôte immature).⁶⁹ Le premier système de classification clinique des ostéomyélites a été développé par Waldvogel en 1970. Ce système incluait trois catégories basées sur l'étiologie (hémotogène, à foyer contigu ou associée à une insuffisance vasculaire locale), ne permettant pas de guider un médecin traitant dans son diagnostic ni dans son traitement chirurgical et antibiotique.^{68,71} Depuis, plusieurs modifications ont été apportées et ultimement un système de classification alternatif a été développé par Cierny et Mader. À titre informatif et afin de bien comprendre où se situe l'ostéomyélite post-traumatique, ce système de classification générale sera brièvement décrit, sans toutefois diverger vers les différences thérapeutiques associées à chacun de ces stades.

3. Classification de Cierny et Mader

Le système de classification de Cierny et Mader se base sur l'anatomie de l'infection osseuse et sur la physiologie de l'hôte (Tableau I).^{68,69,71} Avant de décrire plus en détail chacun des stades, quelques points doivent être soulignés concernant ce système de classement. La détermination d'un stade se fait sans considérer l'étiologie, le site ou la durée du processus pathologique. On remarque toutefois qu'il existe cliniquement une grande corrélation entre les étiologies et le stade anatomique attribué. Ce système permet la caractérisation de l'ostéomyélite surtout au niveau des os longs, et doit être modifié pour décrire une ostéomyélite pédiestre d'un patient diabétique ou une affection vertébrale.⁶⁹ Enfin, les termes « aigu » et « chronique » ne sont pas utilisés pour attribuer les stades parce que toutes les zones macroscopiquement nécrotiques doivent, de toute façon, être débridées chirurgicalement, peu importe la chronicité de la lésion. Les stades sont dynamiques et peuvent changer selon la pathophysiologie de la maladie et l'évolution de la guérison. Après avoir attribué un stade à l'ostéomyélite,

Tableau I. Système de classification de Cierny et Mader (d'après Mader JT et coll⁶⁹)

Système de Classification de l'Ostéomyélite de Cierny-Mader

Type anatomique

Stage 1: ostéomyélite médullaire
 Stage 2: ostéomyélite superficielle
 Stage 3: ostéomyélite localisée
 Stage 4: ostéomyélite diffuse

Classe physiologique

Hôte A: bon état de santé générale
 Hôte B:
 Bs: compromis systémique
 Bl: compromis local
 Bls: compromis local et systémique
 Hôte C: traitement pire que la maladie

Facteurs affectant l'immunité, le métabolisme et la vascularisation locale

- Facteurs systémiques (Bs): malnutrition, insuffisance rénale ou hépatique, diabète mellitus, hypoxie chronique, maladie auto-immunitaire, extrêmes d'âge, immunosuppression ou déficience immunitaire
 - Facteurs locaux (Bl): lymphoedème chronique, stase veineuse, compromis de vaisseau sanguin majeur, artérite, cicatrisation extensive, fibrose de radiation, neuropathie, abus de tabac

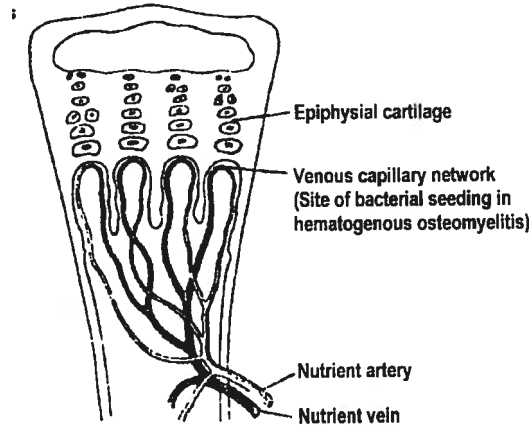
le patient est aussi désigné par une classe physiologique allant de A à C (Tableau I, page 7). Un hôte A représente un patient avec un statut métabolique, physiologique et immunologique normal. L'hôte B est atteint par un désordre systémique et/ou local. Quand la morbidité du traitement est pire que celle de la maladie, l'hôte est placé dans la catégorie C. L'avantage du système réside dans l'organisation des stratégies diagnostique et thérapeutique en fonction des stades et classes du processus pathologique et de l'hôte.

3.1. Stade 1 (Médullaire)

Le stade 1, ou l'ostéomyélite médullaire, dénote une infection confinée aux surfaces intramédullaires de l'os. Les origines les plus fréquentes de ce stade 1 sont les voies hématogènes et la contamination de tiges orthopédiques intramédullaires. Les cas d'ostéomyélite hématogène comptent pour environ 19% des cas chez l'humain et environ 10% chez le chien.²⁸ Les enfants ou animaux immatures sont plus fréquemment atteints que les adultes, surtout au niveau de la métaphyse des os longs. L'anatomie vasculaire des métaphyses semble expliquer cette localisation clinique. Des anses capillaires provenant de l'artère nourricière viennent frôler la plaque de croissance sans s'y anastomoser avant de se retourner à 180 degrés vers la diaphyse pour entrer dans un système de sinusoides veineux où le sang devient plus turbulent (Figure 2, page 9). La formation de petits hématomes et de microthrombi suite à des traumatismes mineurs et à des embolies bactériennes peut obstruer la lumière des anses vasculaires et causer une nécrose ischémique localisée. La susceptibilité aux infections est ensuite augmentée pendant de simples bactériémies transitoires.^{42,69} Les phagocytes y sont aussi moins actifs selon certains auteurs.⁷² Chez les animaux immatures, les plaques de croissance sont avasculaires, empêchant ainsi l'infection de traverser du côté épiphysaire.

Figure 2. Vascularisation métaphysaire chez le chien immature (d'après Fetter ^{source}

web : <http://www.kcom.edu/faculty/chamberlain/Website/lectures/tritzid/osteomy.htm>)



3.2. Stade 2 (Superficielle)

Le stade 2, ou ostéomyélite superficielle, est aussi désignée par foyer contigu. Le cortex superficiel de l'os se retrouve infecté par une plaie septique adjacente. Un exemple est le développement d'une ostéomyélite superficielle suite à une plaie de décubitus. La majorité de ces patients ont des facteurs prédisposants locaux tels une vasculopathie, neuropathie ou déficit de recouvrement de l'os par des tissus mous (Tableau I, page 7).

3.3. Stades 3 et 4 (Localisée ou diffuse)

Les stades 3 et 4, représentés respectivement par l'ostéomyélite localisée et diffuse, sont aussi très fréquemment désignés par ostéomyélite post-traumatique. Elle fait suite à des traumatismes tels les accidents de la voie publique et les procédures chirurgicales. Les réductions de fractures ouvertes, de fractures par balle, de fractures simples fermées, les morsures de l'avant-bras, la mise en place de prothèses totales de hanche ou d'allogreffes corticales sont tous des exemples de situation à risque pour le

développement de ce type d'ostéomyélite. Une technique chirurgicale inadéquate a déjà été dénoncée comme étant la cause principale de ces infections.^{10,28} Les dénominateurs communs sont la présence d'os nécrotique et d'organismes infectieux.^{10,28,52,68,69,71,72,92,103,106} Le stade 3 est habituellement caractérisé par une séquestration au niveau de l'os cortical dans sa quasi épaisseur qui peut être retirée chirurgicalement sans affecter la stabilité de l'os. Le stade 4 est par contre plus débilisant, demandant parfois des résections segmentaires afin d'éliminer le nid infectieux. La présence de ce tissu osseux dévascularisé et des traumatismes encaissés par les tissus mous environnants rendent la condition très réfractaire aux traitements conventionnels. C'est ce type d'ostéomyélite qui est concerné par ce projet de maîtrise.

II. Pathophysiologie de l'ostéomyélite post-traumatique

Trois facteurs sont nécessaires au développement d'une ostéomyélite post-traumatique. La première composante est une plaie infectée. L'infection d'une plaie résulte d'une contamination bactérienne suffisante ($>10^5$ cfu) qui a bénéficié d'une période de temps assez longue pour se reproduire à un rythme exponentiel. Cette contamination provient de l'environnement ou d'une source externe nosocomiale suite à l'exposition de la plaie. La deuxième composante est une portion osseuse avasculaire. En étant dépourvu d'apport vasculaire, cette portion de l'os est isolée des mécanismes de défense de l'hôte et de la diffusion des antibiotiques.^{10,28,52,68,69,71,101,106} La troisième composante est un milieu de croissance favorable. La plupart des bactéries n'ont besoin que d'un environnement « acceptable » pour rester stables et en vie, mais elles n'y sont pas aptes à se multiplier. L'environnement doit être « favorable » pour permettre leur multiplication. Les tissus mous nécrotiques ou hématomes forment un bon exemple d'environnement favorable qui procure ce dont les bactéries ont besoin afin de promouvoir leur multiplication, pendant qu'une surface osseuse saine n'est que suffisante à supporter le maintien stable d'une colonie.

1. Agents infectieux

La grande majorité des infections osseuses chez l'humain, le chien et le chat sont d'origine bactérienne. Chez l'humain, les cas d'ostéomyélite hématogène (stade 1 de Cierny et Mader) sont principalement causés par un seul agent infectieux, tandis que les cas post-traumatiques (stades 3 et 4 de Cierny et Mader) sont plus fréquemment des infections mixtes à plusieurs bactéries, où *S. aureus* est rencontré le plus fréquemment.^{53,55,69,70,103,106,111} Chez le chien, on isole un organisme unique dans la majorité des cas de tous les stades. Pour ce qui est de l'ostéomyélite post-traumatique, un seul organisme est isolé dans 52% des cas, deux organismes dans 33% des cas et trois bactéries distinctes dans 15% des cas. Les bactéries gram-positives sont le plus fréquemment isolées, avec 45 à 61% des cas étant causés par *Staphylococcus*

spp.^{10,11,12,28,52,76} Chez le chien, *S. intermedius* se rencontre plus fréquemment que *S. aureus*, étant donné une différence de la flore bactérienne cutanée par rapport à l'humain. La deuxième bactérie en importance est *Streptococcus* spp, puis viennent ensuite *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp, *Proteus* spp et *Klebsiella* spp.^{10,28,37,41,52,101} Finalement, il est très rare de rencontrer une infection simple par un agent anaérobie. Par contre, des bactéries anaérobies ont déjà été isolées dans près de 70% des cas d'infections osseuses polymicrobiennes, lorsque les échantillons étaient prélevés, transportés et incubés de manière appropriée.^{52,76} Les cas reliés à des morsures risquent particulièrement de présenter de telles souches en culture, avec *Pasteurella multocida* étant la plus prévalente, suivie d'*Actinomyces* spp, *Clostridium* spp, *Peptostreptococcus* spp, *Fusobacterium* spp et *Bacteroides* spp.

2. Établissement de l'infection

Comme mentionné précédemment, la présence de bactéries dans une plaie n'est pas suffisante pour causer une infection. Approximativement 60 à 70% des fractures ouvertes sont contaminées, mais un pourcentage beaucoup plus faible progresse vers l'établissement d'une infection clinique.¹⁰⁶ Après leur entrée dans une plaie, les bactéries responsables d'une infection doivent s'adhérer aux tissus de l'hôte avant d'y causer des dommages. Les tissus normaux ne sont pas propices à l'adhérence bactérienne. En effet, les modèles expérimentaux d'ostéomyélite demandent invariablement un trauma osseux mécanique, chimique ou l'insertion d'un corps étranger afin d'établir une infection.^{10,17,40,43,72,79,106} Lors d'un traumatisme des tissus mous et osseux, il y a exposition de collagène qui est un site de liaison potentielle pour certaines bactéries. *Staphylococcus aureus* et certaines autres bactéries gram-positives possèdent plusieurs récepteurs pour différentes protéines de l'hôte dont le collagène et la fibronectine, cette dernière recouvrant rapidement les tissus exposés après un trauma.⁵¹ Suite à cette adhérence tissulaire, les bactéries peuvent proliférer si les conditions du milieu sont favorables. De plus, les modes de fixation orthopédique interne tels que les plaques et vis doivent être fréquemment utilisés pour stabiliser les

segments osseux impliqués dans une fracture, servant ainsi de foyer additionnel pour la colonisation bactérienne. De la même façon, les tissus mous et osseux avasculaires agissent aussi comme des corps étrangers dans une telle situation. Même s'il est préférable d'éviter les corps étrangers au site infecté, il est encore plus important de maintenir les segments principaux d'une fracture stables puisque l'instabilité est un facteur de risque qui augmente le taux et la sévérité des infections.^{106,113}

2.1. Stabilité des segments osseux

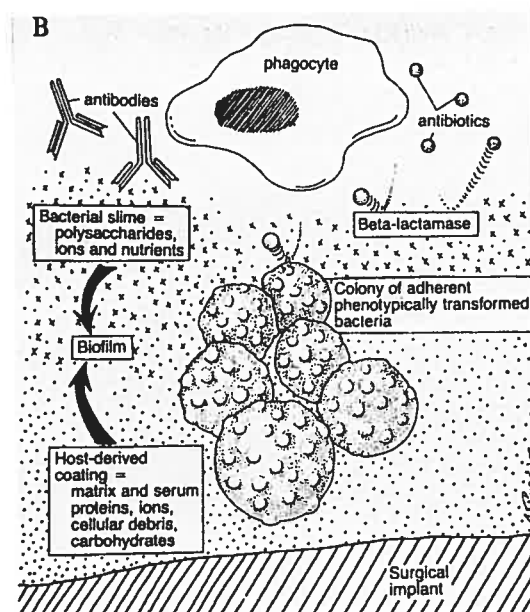
Le développement d'ostéomyélite post-traumatique est favorisé par la présence d'instabilité osseuse et s'exacerbe si une instabilité se développe pendant une infection active. Le micromouvement continu entrave le processus de revascularisation présent entre les segments osseux, ce qui maintient la présence de tissu nécrotique au site affecté et empêche les mécanismes de défense de l'hôte d'atteindre certaines zones du nid infectieux. La fixation rigide de segments osseux consécutifs à une fracture diminue l'espace mort et la chance de formation d'hématome, en plus de permettre une microperfusion améliorée au site de fracture.^{41,95,106,113} Une étude expérimentale de Worlock rapporte un taux de développement d'ostéomyélite deux fois moindre dans un groupe où une fracture tibiale ouverte et contaminée était stabilisée par rapport à un groupe où elle était laissée instable.¹¹³ Aussi, une augmentation de la dose infectante a mené à une incidence plus importante d'ostéomyélite dans le groupe instable, alors qu'elle n'a eu aucun effet dans le groupe stabilisé adéquatement.

2.2. Biofilm

L'adhérence bactérienne aux tissus mous se manifeste aussi à la surface d'implants chirurgicaux orthopédiques. La majorité des biomatériaux ne sont pas totalement inertes et modulent une séquence d'événements moléculaires qui ne sont pas dépourvus de conséquences. Rapidement après la mise en place de ces implants, leur surface est recouverte de protéines sériques, de fibronectine, de différents ions, de débris

cellulaires et de glucides.^{52,91,106,107} *Staphylococcus aureus* et d'autres bactéries gram-positives possédant les récepteurs membranaires appropriés adhèrent donc à leur surface, débutant ainsi la formation d'un biofilm (Figure 3). Les bactéries anaérobies et gram-négatives s'attachent un peu moins fermement par des *pili* et *fimbrae* qui possèdent aussi des affinités particulières pour certaines protéines et glycolipides déposées en surface des implants orthopédiques.⁵² Suite à cette première étape, un limon est produit par les bactéries. Ce limon consiste en une couche protectrice constituée d'exopolysaccharides, d'ions et d'autres nutriments.^{52,91,106} Le limon bactérien accélère l'agrégation des bactéries, consolide leur adhésion et permet l'accumulation de multiples couches de micro-organismes. La combinaison de la membrane déposée sur l'implant par l'hôte et du limon produit par les bactéries est appelée biofilm (Figure 3). Ce biofilm protège les bactéries de l'action des antibiotiques, inhibe la phagocytose, empêche l'entrée des anticorps et altère la fonction des lymphocytes T et B.^{26,52,85,91,96,97,106,107}

Figure 3. Formation d'un biofilm en surface d'un implant chirurgical A) adhérence bactérienne B) dépôt du limon bactérien (d'après Johnson KA⁵²)



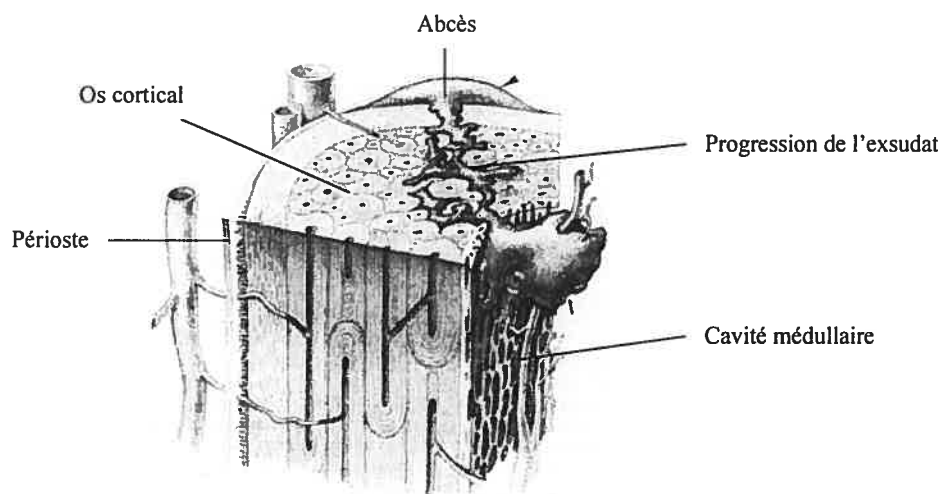
Les bactéries retrouvées dans le biofilm se présentent en deux sous populations: la forme sessile qui est en latence et ancrée dans l'épaisseur même du biofilm puis la forme planctonique qui est active en surface du biofilm. La présence de ces sous populations permet le phénomène de variation de phase; un terme générique qui désigne un groupe de mécanismes génétiques où l'expression d'un gène varie assez rapidement de façon réversible de génération en génération. La sous population sessile subit ainsi des variations phénotypiques qui lui permet d'envoyer à la surface des sous populations planctoniques de plus en plus virulentes qui sont résistantes aux antibiotiques, aux phagocytes et aux anticorps.^{52,91} La forme planctonique d'un implant colonisé peut causer des signes d'infection clinique chez l'hôte, tandis que la forme sessile survit sélectivement pendant les traitements antibiotiques et induit des infections indolentes chroniques. Il est important de souligner que le développement de biofilm s'applique autant aux tissus mous et osseux avasculaires qu'aux implants orthopédiques puisqu'ils agissent aussi comme des corps étrangers lors d'ostéomyélite.

3. Réponse de l'hôte

La réponse initiale de l'hôte à une contamination est une réaction inflammatoire aiguë. La présence de bactéries et de traumatismes tissulaires initie l'activation de la cascade du complément qui mène à une vasodilatation locale, une augmentation de la perméabilité vasculaire, un oedème tissulaire, la migration de leucocytes au site de blessure et une capacité accrue des polymorphonucléaires et des macrophages à phagocyter les bactéries. Même si le but premier de la réponse inflammatoire est de limiter l'expansion de l'infection, elle participe aussi malheureusement à causer des dommages aux tissus environnants par l'action protéolytique des enzymes relâchées par les phagocytes. Les macrophages produisent des cytokines qui dirigent les réponses subséquentes de l'hôte. Par exemple l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- α amplifient la réaction inflammatoire; l'IL-2, l'INF- γ et l'IL-12 stimulent les lymphocytes T; l'IL-4 et l'IL-6 activent les lymphocytes B.¹⁰⁶ Suite à la réaction inflammatoire aiguë, l'hôte réagit en essayant d'encapsuler l'infection et de former un abcès chronique. Le matériel purulent

devient théoriquement entouré par une capsule fibreuse et un tissu de granulation qui le séparent des tissus normaux. L'accumulation progressive et constante d'exsudat purulent peut souligner une réponse immunitaire inadéquate, qui est en partie causée par la présence de tissus nécrotiques telle que discutée précédemment. L'exsudat s'accumule, augmente la pression locale et entre ensuite dans l'os cortical à travers les chemins de moindre résistance comme les canaux haversiens et de Volkmann (Figure 4). La porosité corticale augmentée secondairement à la réaction inflammatoire et l'activité ostéoclasique amplifiée par les signaux provenant des macrophages participent à la dissémination de l'infection. Dans les cas post-traumatiques (stades 3 et 4 de Cierny et Mader), cette dissémination de l'infection se fait à partir de plusieurs foyers au site du trauma, accélérant ainsi le développement des lésions. Si l'infection origine d'un foyer contigu (stade 2 de Cierny et Mader), elle se propage du périoste vers le cortex, sans toutefois atteindre la cavité médullaire. Pour les cas d'origine hématogène (stade 1 de Cierny et Mader), tout débute dans la cavité médullaire pour ensuite lentement se diriger vers le cortex et le périoste.

Figure 4. Progression d'un exsudat à travers l'os compact (d'après Slatter DA⁹⁵)



La formation d'abcès sous-périostés est plus commune chez les patients immatures puisque le périoste est moins solidement adhérent au cortex que chez l'adulte. Chez ce dernier, le périoste se déchire et permet la formation d'une fistule de drainage qui se faufile jusqu'au niveau de la peau. Peu importe l'origine de l'exudat et la formation ou non d'abcès sous-périosté ou de fistule, un exudat qui sépare le périoste du cortex compromet davantage la vascularisation locale et peut participer à la formation de séquestre. Un séquestre est un fragment d'os avasculaire entouré d'exsudat purulent qui se fait éventuellement isoler par du tissu fibreux et de la néoformation osseuse provenant du périoste. La plupart des séquestres font suite à des fractures ouvertes où des fragments contaminés se sont infectés puis isolés. Le nouvel os qui entoure le séquestre est très richement vascularisé et est appelé *involucrum*.⁹⁵ Même si l'*involucrum* isole l'infection, il empêche le système immunitaire et les antibiotiques d'atteindre le séquestre, lui permettant de devenir un nid infectieux responsable de l'ostéomyélite chronique et de la réinfection intermittente.

En plus de la formation possible d'un *involucrum*, le périoste peut réagir fortement à la cascade inflammatoire stimulée par la présence bactérienne. Une infiltration neutrophilique du périoste se produit dans les premiers jours suivant la contamination pour ensuite laisser place à une infiltration lymphoplasmocytaire, toutes deux causant un épaissement important de la zone périostée atteinte. Cette réaction du périoste n'est toutefois pas observée dans tous les cas d'ostéomyélite. Les cas les plus légers ont tendance à causer une prolifération superficielle du périoste alors que les cas les plus sévères ont tendance à être plus lytiques au niveau des couches corticales plus profondes. La résorption osseuse causée par le processus d'ostéomyélite peut mener à des fractures pathologiques. Si la fracture est déjà présente, la résorption osseuse peut retarder ou empêcher la guérison. Certains produits dérivés des bactéries comme les lipopolysaccharides des bactéries gram-négatives et certaines protéines de surface de *S. aureus* stimulent la résorption osseuse.¹⁰⁶ Cette dernière est causée principalement par des ostéoclastes activés, mais aussi d'autres cellules de l'hôte comme les neutrophiles, monocytes et macrophages. Les cytokines proinflammatoires IL-1 β , IL-6 et TNF- α sont

les principaux médiateurs activant l'ostéoclasie. Certaines prostaglandines participent aussi à ce phénomène, mais en moindre importance.

4. Persistance de l'infection

Malgré les progrès de l'antibiothérapie et des techniques chirurgicales au cours des dernières années, le traitement d'environ une infection sur cinq est voué à l'échec.^{28,52,103,106,110} Le dommage et la perte osseuse suivant le trauma, la fibrose des tissus mous aussi traumatisés et la difficulté de recouvrement cutané des sites affectés participent au caractère persistant de ces infections. Ces sites sont généralement peu vasculaires, diminuant la réponse humorale et la diffusion d'antibiotiques administrés de façon systémique. L'instabilité osseuse et la présence de biofilm participent aussi de manière importante à l'échec thérapeutique. L'écosystème formé dans le biofilm peut persister pendant plusieurs années en phase latente avant de connaître une recrudescence d'activité lorsque les conditions locales sont favorables.^{91,106} La pénétration antibiotique réduite dans le biofilm ne semble pas être la principale cause de la persistance du biofilm. Cette dernière serait plutôt reliée au ralentissement métabolique des bactéries et à leurs changements phénotypiques par variation de phase.

III. Diagnostic de l'ostéomyélite post-traumatique

La plupart des cas d'ostéomyélite sont diagnostiqués à partir de l'anamnèse, des signes cliniques, des techniques d'imagerie médicale et des résultats de culture bactériologique. L'isolement bactérien est le test définitif.^{13,69} Il est essentiel pour identifier le ou les micro-organisme(s) impliqué(s) dans l'infection ainsi que le spectre de leur(s) sensibilité(s) *in vitro* par rapport à plusieurs antibiotiques (antibiogramme). En situation clinique, la différenciation est parfois difficile entre une guérison osseuse très active avec réaction périostée et une réaction du périoste secondaire à une infection, ou encore entre une culture positive provenant d'une contamination (artefact) et une infection réelle.⁶⁹ Des échelles de pointage combinés ont été développées utilisant plusieurs modes d'évaluation, mais sont toutes aussi difficiles à interpréter et ne sont donc pas ou peu utilisées.^{22,69} L'expérience du clinicien sera ainsi toujours essentielle pour synthétiser et analyser les informations recueillies à travers les divers examens.¹³ Dans le cas de l'ostéomyélite, aucune méthode diagnostique ne présente une sensibilité suffisamment élevée pour être utilisée seule.^{10,13,28,69,71} C'est donc sur la combinaison de plusieurs données, incluant une interprétation du clinicien, que le diagnostic final doit être posé.

1. Signes cliniques

Les signes cliniques dépendent du stade de la maladie. L'ostéomyélite post-traumatique chronique cause rarement des signes d'atteinte systémique, mais cause plutôt des signes locaux qui sont d'apparition lente. L'anorexie partielle, la léthargie, la fièvre et les changements hématologiques sont généralement reliés aux cas d'origine hémotogène ou aux cas post-traumatiques en phase très aiguë. Les signes cliniques locaux reliés aux cas post-traumatiques incluent la douleur à la palpation, l'enflure des tissus mous pendant plusieurs semaines après le trauma, l'atrophie musculaire suite à une boiterie souvent légère à modérée, la fibrose et la contracture musculaire et finalement les trajets fistulaires qui évacuent des sécrétions séro-sanguines à muco-

purulentes. Ces trajets fistulaires sont le signe clinique le plus fréquemment observé lors d'ostéomyélite chronique.^{10,28,52,69} L'écoulement fistulaire est généralement résolu par une antibiothérapie systémique, mais réapparaît invariablement suite à l'arrêt du traitement.^{28,52} Si la présence d'une fistule de drainage n'est pas observée à l'examen physique, il devient important de questionner le propriétaire lors de l'anamnèse. En effet, ces fistules ont tendance à se refermer (même sans traitement antibiotique) pour ensuite se réactiver quelques semaines plus tard.

2. Radiographie

Les signes radiographiques reflètent la situation pathologique avec un retard de 2 à 3 semaines par rapport à l'état réel de l'ostéomyélite.^{41,95} Les changements radiographiques rencontrés régulièrement incluent la lyse osseuse et la prolifération périostée plus ou moins spiculée, avec ou sans enflure des tissus mous (Figure 5, page 21).^{10,28,52,68,69,103} La présence de séquestre et d'*involucrum*, très caractéristique de l'ostéomyélite chronique, n'est pas toujours observée sur les clichés radiographiques standards. Lorsque présent, un séquestre osseux est identifiable parce qu'il est partiellement dissocié des autres structures osseuses, tout en étant particulièrement radio-opaque. Il est parfois difficile de différencier une réaction périostée de guérison osseuse par rapport à celle d'un processus infectieux. La présence de lyse osseuse devient alors un indice important. Il faut toutefois être prudent avec la zone de dépérissement terminal (*die-back*) causée par la perte de vascularisation temporaire de part et d'autre d'une fracture. Le dépérissement terminal est un processus où une perte de densité osseuse se produit sur une distance de quelques millimètres de chaque côté du trait de fracture. Les radiographies révisées en série à quelques semaines d'intervalle peuvent aider à préciser la nature de certaines lésions douteuses. Une réaction périostée et une lyse osseuse croissantes dans le temps sont plus suggestives d'ostéomyélite que de guérison osseuse. Si un trajet fistulaire est présent, une étude de contraste positive peut aider à localiser l'origine du drainage et ainsi permettre au chirurgien de planifier adéquatement la procédure de débridement. Un auteur rapporte que la radiographie

utilisée seule a une sensibilité de 62,5% et une spécificité de 57,1% dans le diagnostic de l'ostéomyélite.¹³ Lorsque les lésions radiographiques sont très subtiles ou leur évolution est très lente, la scintigraphie peut aider à confirmer la présence d'activité métabolique excessive douteuse du tissu osseux. Au delà de son utilité diagnostique, la radiographie est aussi importante dans la planification de la chirurgie, permettant d'évaluer les modes de fixation qui seront nécessaires afin d'éviter des fractures suite au débridement. Enfin, la radiographie est utilisée pour effectuer un suivi clinique non invasif tout en appliquant le délai précédemment mentionné entre la situation réelle et les signes radiographiques.

Figure 5. Exemples radiographiques A) d'ostéolyse (d'après Huneault L^{cas clinique}) et B) de réaction périostée (d'après Huneault L^{cas projet de recherche}) d'ostéomyélites post-traumatiques

A)



B)



3. Bactériologie

La culture bactérienne est la technique la plus sensible pour diagnostiquer l'ostéomyélite.^{10,13,28,52,69} Il est préférable d'éviter l'administration d'antibiotiques pendant les 24 heures précédant l'échantillonnage. Il faut toujours s'assurer de bien connaître la source de l'échantillon lorsqu'on analyse les résultats d'une culture. L'utilisation de méthodes de transport adéquates a déjà aussi été soulignée afin d'augmenter l'efficacité de la détection d'anaérobies au site infecté.⁷⁶ L'échantillonnage est effectué de préférence directement au site infecté puisque les écouvillons de trajet fistulaire sont souvent contaminés d'organismes opportunistes secondaires. Des tissus nécrotiques, séquestres ou autre matériel retirés lors d'un débridement chirurgical forment d'excellents échantillons. De façon moins invasive, l'aspiration profonde à l'aiguille hypodermique est une technique facile qui élimine le problème de contamination externe. Le site est préparé de façon aseptique et une aiguille 20-gauge est utilisée avec une seringue de 12 mL pour aspirer les sécrétions du site éventuellement infecté. L'injection d'un millilitre de saline peut aider à la récolte d'un matériel plus abondant. Une étude rapporte 86% de cultures positives en utilisant cette technique dans des cas où le diagnostic était confirmé par la radiographie, l'histopathologie et des cultures répétées.^{19,28} Il faut donc être prudent avec l'interprétation de cultures négatives et ainsi toujours considérer l'ensemble des données cliniques et des données de laboratoire afin de confirmer ou infirmer un diagnostic d'ostéomyélite. L'antibiogramme permet finalement de sélectionner un antibiotique en se basant sur des sensibilités confirmées de la bactérie.

4. Histopathologie

L'histopathologie permet l'identification morphologique de bactéries au niveau du périoste, dans l'os cortical ou dans la cavité médullaire. Ces bactéries sont présentes, phagocytées ou non, au milieu d'une grande quantité de neutrophiles ou de lymphocytes et plasmocytes en fonction de la chronicité des lésions. Cliniquement,

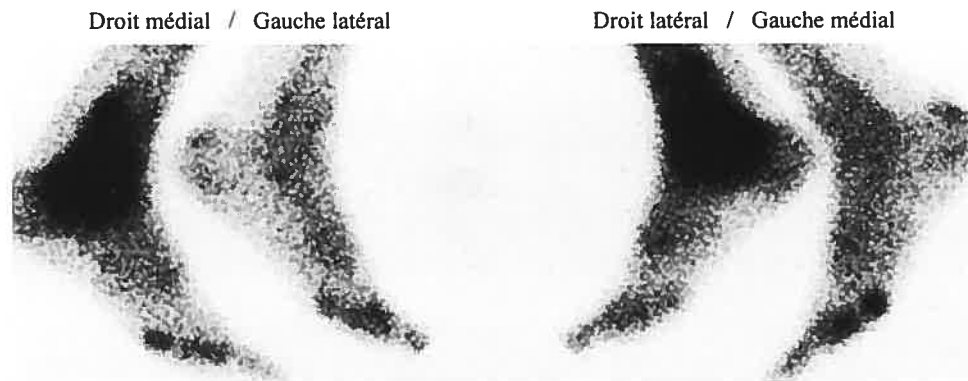
l'histopathologie est peu utilisée pour diagnostiquer l'ostéomyélite puisqu'elle est invasive et sa sensibilité est basse avec 33,3% d'efficacité.^{10,13,28} Par contre, un morceau d'os avasculaire ou autre tissu nécrotique peut facilement être prélevé lors du traitement d'une plaie ou lors du débridement chirurgical d'une ostéomyélite, pour ensuite être soumis pour interprétation. Avec un résultat négatif, la possibilité d'ostéomyélite n'est pas éliminée étant donnée la faible sensibilité de l'évaluation. Par contre, avec sa grande spécificité à 86,3%, un résultat positif peut confirmer la condition.¹³

5. Autres méthodes

D'autres méthodes peuvent aussi être utilisées lors de cas particuliers afin de préciser le diagnostic d'ostéomyélite ou de déterminer l'extension des lésions dans l'os en préparation pré-opératoire. C'est ainsi qu'on utilise la résonance magnétique et la tomодensitométrie afin de caractériser le plus précisément possible l'invasion corticale et des tissus mous environnants.^{69,103} Les cas d'ostéomyélite exclusivement médullaire sont très bien imagés par résonance magnétique. La différenciation entre un processus infectieux et un processus néoplasique peut toutefois être difficile avec la résonance magnétique, demandant une confirmation radiographique, histopathologique et bactériologique. Les marges de résection et l'approche chirurgicale peuvent être déterminées par résonance magnétique et tomодensitométrie. Ces techniques permettent donc surtout d'orienter les chirurgiens dans leur préparation pré-chirurgicale, afin de s'assurer de minimiser les insultes vasculaires accidentelles qui ralentissent la guérison et de maximiser l'efficacité du débridement.

La scintigraphie au technetium^{99m} est très peu spécifique, mais peut parfois être utile afin de confirmer une zone d'activité métabolique anormalement élevée (Figure 6, page 24). Elle peut d'ailleurs être utile lorsque des implants métalliques sont impliqués, empêchant ainsi l'utilisation de la résonance magnétique et de la tomодensitométrie. Le technetium^{99m} méthylidiphosphonate permet une accumulation importante d'isotopes

Figure 6. Scintigraphie au technetium^{99m} d'une zone d'activité métabolique anormale au niveau d'une cheville causée par une ostéomyélite (d'après Carek PJ source web : <http://www.aafp.org/afp/20010615/2413.html>)



aux endroits de vascularisation élevée et de nouvelle production osseuse. Il reste tout de même difficile de commenter la cause de cette augmentation d'activité locale, renforçant la nécessité de travailler en concert avec les informations recueillies à travers d'autres procédures diagnostiques.

Finalement, la mesure des taux d'immunoglobulines G (IgG) à *S. aureus* a déjà été utilisée comme indice d'ostéomyélite causée par cet agent.^{50,90} Dans une de ces études, les changements de titre IgG à *S. aureus* suivaient les changements radiographiques et histopathologiques de la condition.⁹⁰ L'utilité clinique de cette méthode est encore très peu répandue et serait éventuellement intéressante pour suivre l'efficacité d'un traitement.

IV. Traitement de l'ostéomyélite post-traumatique

Le traitement de l'ostéomyélite post-traumatique est multimodal, avec une emphase importante mise l'aspect chirurgical obligatoire. Un traitement optimal comprend un drainage adéquat des sécrétions, un débridement agressif de tous les tissus nécrotiques, une oblitération des espaces morts, un traitement de plaie par deuxième intention au besoin et une couverture antibiotique appropriée.^{2,10,28,43,52,69,70,72,79,103,113} Le but général de la chirurgie est d'améliorer l'environnement infecté de l'hôte pour permettre une meilleure diffusion des antibiotiques et ainsi limiter la colonisation bactérienne. Pour la majorité des cas d'ostéomyélite chronique post-traumatique, un traitement médical seul mènera à une récurrence des signes cliniques. Il est aussi important de corriger les déficits physiologiques de l'hôte afin de lui permettre de participer à la guérison le plus efficacement possible.

1. Débridement et autres aspects chirurgicaux

Le débridement d'une ostéomyélite peut être très exigeant du point de vue technique. L'anatomie locale est souvent modifiée par le traumatisme et les chirurgies précédentes. Les tissus mous environnants peuvent être fibrosés et le risque de complications de plaie est très élevé.¹⁰³ Il est donc très important de suivre méticuleusement les principes de chirurgie suivants:

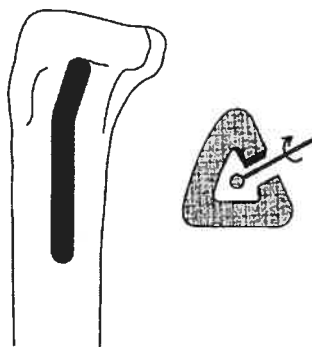
- planification pré-opératoire attentive
- attention au détail
- approche atraumatique
- manipulation délicate des tissus mous.

L'échec d'un traitement est plus souvent causé par un débridement inadéquat plutôt qu'une antibiothérapie suboptimale. La qualité du débridement chirurgical est le facteur le plus important dans le traitement de l'ostéomyélite post-traumatique.^{41,49,95,103,106}

Une approche chirurgicale la plus atraumatique possible est donc réalisée au site

infecté pour permettre d'exciser le matériel purulent, les tissus mous nécrotiques, les fragments osseux avasculaires et les tissus fibrosés. Le périoste n'est soulevé qu'au minimum pour limiter la dévascularisation du cortex. La réaction périostée ne doit pas obligatoirement être totalement excisée puisqu'elle est encore pourvue d'un apport vasculaire.¹⁰³ Un séquestre doit obligatoirement être excisé, par contre l'*involucrum* peut être cureté et conservé.¹⁰³ Les techniques d'imagerie pré-opératoires et l'apparence punctiforme de saignements provenant de l'os, parfois appelée le signe du paprika, permettent d'établir les limites osseuses du débridement. Une longue fenêtre ovale forme la porte d'entrée idéale pour accéder à une cavité médullaire qui doit être débridée, permettant de minimiser les conséquences biomécaniques sur l'os (Figure 7).¹⁰³ Le besoin de stabiliser l'os après un débridement chirurgical est parfois difficile à évaluer. Comme règle générale, le risque de fracture reste bas lorsque 70% ou plus du volume cortical initial est préservé, et une stabilisation n'est alors pas nécessaire.¹⁰³

Figure 7. Technique de fenêtre ovale pour le débridement médullaire (d'après Tetsworth K et Cierny G 3rd¹⁰³)



Si une fracture est déjà présente, alors une stabilisation devient essentielle. Les fixateurs externes de type linéaires (e.g. Kirschner), circulaires (e.g. Ilizarov) ou hybrides sont les méthodes préférées puisqu'elles minimisent les lésions vasculaires locales sans promouvoir la formation de biofilm grâce à l'utilisation de tiges distantes du site infecté. Si les tissus mous semblent sains et que le site a été débridé de façon agressive, des modes de fixation interne peuvent alors être utilisés et retirés lorsque la

guérison est complétée.⁹⁵ Après le débridement et la stabilisation de l'os au besoin, la plaie est abondamment irriguée avec de la saline physiologique tiède ou une solution à 0,05% de chlorhexidine. Une greffe d'os spongieux peut finalement être déposée dans un déficit osseux pour accélérer la guérison. Pendant la fermeture, une attention particulière est portée à la réduction des espaces morts, limitant ainsi l'accumulation d'hématomes ou d'autres sécrétions pouvant supporter la croissance bactérienne. Des transpositions musculaires ou musculocutanées peuvent donc être planifiées au besoin afin de réduire cet espace mort et améliorer l'apport vasculaire local.¹⁰³ Des drains actifs peuvent finalement être très utiles pour limiter l'accumulation sous-cutanée de liquides inflammatoires. Il est sage de prévenir dès le départ un échec au traitement et de préparer une approche alternative en cas de besoin.

2. Antibiothérapie systémique

Le choix d'un antibiotique doit idéalement être basé sur l'évaluation de la sensibilité de la souche responsable de l'infection à l'aide d'un antibiogramme et parfois de la détermination de sa concentration minimale inhibitrice (CMI). Avant d'obtenir les résultats de culture, ou si les résultats s'avèrent négatifs, le(s) antibiotique(s) est(sont) choisi(s) de façon arbitraire en se basant sur les organismes les plus fréquemment rencontrés et sur le pouvoir de pénétration osseuse de l'agent antibactérien (qui lui permet d'atteindre des concentrations tissulaires satisfaisantes). En situation particulière d'hospitalisation, les souches nosocomiales avec leurs patrons de résistance doivent aussi être considérées, en plus de la possibilité d'effets secondaires et du coût de l'antibiotique.

Les pénicillines, céphalosporines, tétracyclines, aminoglycosides, quinolones et macrolides traversent suffisamment la membrane capillaire pour atteindre des taux interstitiels permettant de combattre des infections osseuses. Ces principes actifs atteignent des concentrations tissulaires maximales environ 25 à 45 minutes après leur administration intraveineuse.⁵² Associée au traitement chirurgical, une administration

d'antibiotiques sur 6 à 8 semaines est généralement recommandée.^{26,28,52,65,70,88,111} Certaines situations comme les complications de fracture, la reconstruction extensive avec nécrose tissulaire ou les cas d'immuno-incompétence de l'hôte nécessitent une administration prolongée sur plusieurs mois. Pour la plupart des infections à *Staphylococcus* spp, la cloxacilline, les céphalosporines, la clindamycine, les quinolones ou l'amoxicilline/acide clavulanique sont efficaces par voie orale.^{11,12,26,52,65,70,88,111}

Les céphalosporines de première génération comme la céphalothine et la céfazoline sont aussi efficaces contre *E. Coli*, *Klebsiella* spp et la majorité des *Streptococcus* spp, mais ont une activité limitée sur l'ensemble des bactéries gram-négatives. Ce sont des antibiotiques à large spectre, bactéricides, très économiques et forment le premier choix de traitement empirique en attendant les résultats de culture. Les deuxième et troisième générations de céphalosporines comprennent entre autres la céfoxitine, la céfuroxime, la céfotaxime et la ceftazidime. Le spectre d'activité de ces générations est élargi vers les bactéries gram-négatives et anaérobies, et elles deviennent particulièrement intéressantes pour leur action sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacteriodes fragilis*.⁷⁰

L'amoxicilline/acide clavulanique est fréquemment employé en médecine vétérinaire et forme aussi un excellent choix d'antibiothérapie de première ligne. Leur spectre d'action est très large, et inclue la majorité des anaérobies. Il y a tout de même approximativement 20% de *Bacteriodes* spp qui y sont résistants.^{52,70} Leur inhibition des β -lactamases améliore leur couverture des bactéries gram-positives et des gram-négatives.

La clindamycine et le métronidazole sont les deux antibactériens de choix lorsque des anaérobies sont mises en cause.^{11,12,28,52,69,70} La clindamycine est aussi efficace contre *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. epidermidis* et les *Streptococcus* spp. Ces deux antibiotiques pénètrent très bien l'os et les capsules fibreuses autour des abcès. Ils sont

fréquemment utilisés en combinaison avec les céphalosporines ou les quinolones pour assurer une couverture complète des infections mixtes multi bactériennes.

Les aminoglycosides sont efficaces contre la plupart des bactéries gram-négatives, mais ont une faible activité contre les bactéries gram-positives.⁷⁰ La gentamicine a souvent été utilisée pour traiter des infections à *S. aureus* qui devient cependant rapidement résistant. La grande qualité des aminoglycosides réside dans leur efficacité contre les *Enterobacteriaceae* et *Pseudomonas aeruginosa*.^{40,53,70,99,104} Aussi, la formulation de gentamicine en poudre incorporée au PMMA en fait encore aujourd'hui un antibiotique fréquemment utilisé dans le traitement local d'ostéomyélites à bactéries gram-négatives et dans la prévention d'infection de ciment utilisé pour les remplacements prothétiques de hanche.^{16,28,53,54,56,83,99,101,104} Les effets secondaires des aminoglycosides doivent être considérés puisqu'ils sont fréquemment rencontrés et incluent la néphrotoxicité et l'ototoxicité. L'amikacine présente moins de sites disponibles pour l'inactivation enzymatique, d'où un développement de résistance plus rare.⁷⁰ De plus, l'amikacine entraîne moins d'effets secondaires que les autres aminoglycosides, ce qui en fait maintenant le candidat le plus utilisé de sa catégorie en administration parentérale.

Les quatre générations de quinolones sont actuellement très utilisées pour traiter les patients atteints d'ostéomyélite.^{65,68,70,88,111} Ces antibiotiques présentent de nombreux avantages: ils sont très peu toxiques, pénètrent l'os de manière très efficace et s'administrent *per os*.^{37,65,70,88} Le traitement oral avec les fluoroquinolones a déjà permis de diminuer le temps et le coût d'hospitalisation d'un groupe de patients lorsque comparé avec un traitement injectable.^{65,70} Les membres de la deuxième génération tels que la CFX et l'ofloxacin sont très efficaces contre les bactéries gram-négatives comme les *Enterobacteriaceae* et *Pseudomonas* spp, et présentent une activité modérée contre les souches de *Staphylococcus* spp. Par contre, leur activité est pauvre contre les *Streptococcus* spp et les anaérobies. La résistance des souches de *Staphylococcus* spp est à la hausse envers cette deuxième génération et dicte la prudence dans la sélection de cette catégorie antibiotique.^{65,70} Cette résistance est majoritairement associée à la

présence d'un corps étranger et de son biofilm. Malgré ce fait, plusieurs études *in vitro* rapportent que la CFX est l'un des agents les plus actifs contre les biofilms de *S. aureus* et de *P. Aeruginosa*.^{26,85,97} D'excellents résultats ont été obtenus dans le traitement de *S. aureus* résistants à la méthicilline en présence d'un corps étranger avec la combinaison CFX-rifampin.⁶⁵ Cette combinaison est d'ailleurs à ce jour reconnue comme étant la plus efficace dans le traitement de prothèses infectées.

La description des antibiotiques et de leurs particularités pourrait faire l'objet d'une discussion beaucoup plus longue et détaillée, ce qui nous éloignerait de notre sujet principal. Nous nous arrêterons ici en rappelant plusieurs points importants sur le traitement de l'ostéomyélite post-traumatique:

- l'obtention de cultures et sensibilités en début de traitement
- l'évaluation des facteurs de l'hôte et de l'environnement
- la nécessité de procéder à un traitement chirurgical
- la planification de cultures en série pendant le suivi du patient permettant d'évaluer en cours de traitement si le choix antibiotique est toujours valable.

3. Systèmes à libération locale contrôlée

Malgré une approche conventionnelle rigoureuse, les taux de succès du traitement varient entre 80 et 90%.^{28,52,95,103,106,110} Le traitement définitif de cas sévères d'ostéomyélite par débridement chirurgical et administration systémique d'antibiotiques est limité par la difficulté d'obtenir des concentrations antibiotiques suffisantes dans l'os. C'est pourquoi de nouvelles méthodes de traitement ont été développées et évaluées afin d'améliorer le pronostic de ces cas réfractaires au traitement conventionnel. L'idée d'un SLC pour permettre l'élution d'antibiotiques localement appartient à Buchholz et Engelbrecht qui ont créé les billes de PMMA pour la première fois en 1970.^{28,53,56,101,104} Les SLC ont l'avantage de fournir des concentrations locales d'antibiotiques très élevées et soutenues, allant jusqu'à 200 fois

celles obtenues avec un traitement parentéral, tout en minimisant les risques de toxicité systémique.^{17,24,28,49,56,79,101} Les concentrations locales très élevées permettent la diffusion d'antibiotiques à travers les tissus dévascularisés et les biofilms, tous deux étant reliés au caractère réfractaire de l'ostéomyélite post-traumatique vis-à-vis les traitements standards. Avec ces concentrations très élevées localement, même les organismes démontrant une résistance lors de l'évaluation usuelle *in vitro* sont souvent maîtrisés. On attribue aussi aux SLC les avantages d'une meilleure observance thérapeutique chez le patient, une diminution de la quantité totale d'antibiotique nécessaire à un traitement, une efficacité accrue du traitement et la protection de molécules autrement rapidement dégradées.^{2,27,28,31,32,43,45,55,56,60,72,73,87,92,99,101}

Les SLC peuvent être divisés en trois grandes classes: les implants non-résorbables et résorbables, les pompes implantables et une classe atypique. Nous nous intéresserons seulement à la première classe, soient les implants non-résorbables ou résorbables, qui sont les plus fréquemment rencontrés sous forme d'implants matriciels. Il y a deux conditions essentielles au bon fonctionnement d'un SLC: il doit être le plus biocompatible possible et doit avoir des bonnes propriétés de libération de l'antibiotique *in vivo*. La cinétique de la libération d'un principe actif depuis une matrice est influencée d'une part par la concentration, la solubilité et le coefficient de diffusion du principe actif dans cette matrice, et d'autre part par la géométrie, la porosité et la vitesse de dégradation de la matrice. Par exemple, une même quantité d'antibiotique sera relâchée plus vite par une matrice si elle est sous forme de bille (grand ratio surface/volume), que si elle est sous forme parallélépipédique.

3.1. Non-résorbables

Le matériau le plus étudié et utilisé pour fabriquer des implants matriciels non-résorbables est le PMMA.^{2,16,40,45,56,73,83,92,95,99,101,104,110} C'est un ciment osseux qui est obtenu à partir de la polymérisation exothermique d'une poudre polymère au contact d'un liquide monomère. Les antibiotiques qui y sont incorporés doivent d'ailleurs être

stables jusqu'à des températures pouvant atteindre 100 °C. Des billes de PMMA imprégnées d'un antibiotique peuvent être formées et disposées sur un cerclage orthopédique ou un fil de suture non-résorbable, afin d'en faire un chapelet qui est plus facilement manipulable (Figure 8, page 33). Le profil de libération d'antibiotiques à partir du PMMA est biphasique. Il existe d'abord une libération rapide dans les premières 24 heures suite à l'implantation suivie d'une libération continue qui peut durer de trois semaines jusqu'à quelques années.^{16,45,73,101,104,110} De la CFX a déjà été incorporée au PMMA, testée *in vitro*, et comparée à d'autres antibiotiques; les taux d'antibiotiques mesurés ont été supérieurs pour la tobramycine et la céfazoline par rapport à la CFX sur une période de 28 jours.¹⁰¹ La gentamicine, la tobramycine, la vancomycine et les céphalosporines sont les antibiotiques les plus utilisés en combinaison avec le PMMA en raison de leur spectre d'action, de leur thermostabilité et de leurs propriétés de libération à partir de cette matrice.

Deux semaines après l'implantation péri-fémorale de PMMA imprégné de gentamicine chez le chien, les concentrations moyennes de gentamicine étaient de 9,1 µg/g dans les tissus mous adjacents, 6,7 µg/g dans l'os médullaire et 2,8 µg/g dans l'os cortical, ce qui est largement supérieur à la CMI de *S. aureus* (0,5 µg/g) dans tous les cas.¹¹⁰ Dans une autre étude menée par le même auteur toujours chez le chien, des concentrations de 9,3 µg/g et de 4,5 µg/g de gentamicine ont été détectées dans les tissus mous adjacents et dans l'os médullaire, respectivement, 6 mois après la mise en place des implants PMMA, alors que 70% de la gentamicine initialement incorporée dans les billes avait déjà été libérée.¹¹⁰ Dans une étude chez des lapins, une ostéomyélite a été créée en inoculant un segment avasculaire de radius avec une souche de *S. aureus*.³⁹ Après un traitement par débridement seul, débridement + PMMA sans antibiotiques, débridement + PMMA imprégné de gentamicine, ceftriaxone intraveineux et ceftriaxone intraveineux + PMMA imprégné de gentamicine, les taux de succès ont été de 43, 27, 79, 92 et 100%, respectivement.^{39,110}

Figure 8. Billes de PMMA imprégnées de gentamicine (Septopal[®])



Les réponses cliniques et radiographiques ont été évaluées chez 18 chiens implantés avec des billes de PMMA imprégnées de vancomycine ou de tobramycine pour traiter des infections sévères faisant suite à la mise en place d'allogreffes corticales de radius dans le traitement d'ostéosarcomes appendiculaires.²⁹ Une pléiade de bactéries aérobies et anaérobies avait été isolée, et de nombreux traitements antibiotiques systémiques n'avaient pas réussi à contrôler l'infection avant d'implanter les billes de PMMA. Dans 12 des 18 (67%) chiens implantés, les signes cliniques se sont résolus après une médiane de 4 semaines. Trois de ces chiens ont eu des récurrences à une médiane de 17 semaines post-implantation, étant donné la présence d'implants métalliques et de biofilms.^{28,29} Plusieurs autres articles rapportent différentes efficacités curatives de PMMA imprégné d'antibiotiques.^{14,15,16,20,22,28,36,39,47,84,93,102}

Même si ses propriétés de libération sont bien démontrées, le PMMA n'est pas la matrice idéale. Tout d'abord, ce matériau n'est pas résorbable, obligeant une deuxième procédure chirurgicale pour son retrait. La croissance de tissu fibreux en périphérie des implants peut compliquer ce retrait et ainsi causer un traumatisme tissulaire et un espace mort qui devraient idéalement être évités. Ensuite, il induit certaines réactions d'histoincompatibilité et peut supporter la croissance bactérienne à sa surface, apparemment en diminuant l'immunité locale.^{23,28,46,72,86,107,110}

3.2. Résorbables

Les désavantages et complications potentielles associés à l'utilisation du PMMA ont justifié le développement et l'investigation de plusieurs SLC résorbables contenant divers antibiotiques. Le plâtre de Paris, le poly(acide lactique)(PLA) et poly(acide glycolique)(PGA), l'hydroxyapatite de calcium, les produits dérivés de la fibrine, le collagène et le chitosan ont tous été étudiés afin d'évaluer leur potentiel dans le traitement de l'ostéomyélite post-traumatique.^{2,6,17,27,28,43,52,55,56,72,79,81,82,90,92,99,101} L'avantage majeur de ces SLC est d'éliminer une deuxième procédure chirurgicale destinée au retrait des implants, évitant ainsi des lésions supplémentaires à la délicate vascularisation locale qui est d'importance capitale à la guérison. Un autre avantage potentiel de ces systèmes est de permettre la libération complète des antibiotiques qui y sont incorporés. Une brève description de chacun de ces systèmes suivra afin de relever leurs forces et faiblesses respectives, et ainsi de comprendre l'intérêt du travail porté à l'élaboration de nouveaux systèmes.

Les formulations de PLA et de PGA sont très biocompatibles et présentent des propriétés de libération soutenues sur plusieurs semaines. Le PLA peut être préparé avec ou sans PGA, et un changement du ratio des deux polymères (50:50 versus 90:10) et/ou de leurs poids moléculaires peut prolonger le temps d'éluion des antibiotiques et diminuer l'amplitude de la libération biphasique.^{17,43,56,87,101} Les implantations de billes de PMMA et de poly(acide lactique-co-acide glycolique)(PLGA) imprégnées de gentamicine ont présenté des efficacités similaires dans l'éradication d'ostéomyélite expérimentale canine.¹¹⁰ Dans une autre étude, des implants de PLGA imprégnés de vancomycine se sont révélés plus efficaces que le traitement parentéral à la vancomycine pour traiter une ostéomyélite tibiale expérimentale chez des lapins.¹⁷ Un autre dérivé du PLA, le poly(diacide D,L-lactique), a déjà libéré de la CFX et de la pefloxacin pendant 50 à 350 jours *in vitro*.⁵⁷ Ce même système chargé de pefloxacin a ensuite permis une réduction de 99,9% des comptes bactériens au jour 12 post-implantation et une éradication complète au jour 33 d'une ostéomyélite expérimentale à

S. aureus résistant à la méthicilline chez des lapins. La pefloxacine a été libérée lentement avec une concentration locale maximale obtenue au jour 15 et qui était 100 fois supérieure à la CMI de l'agent pathogène utilisé.⁵⁵ Parmi les SLC résorbables, celui-ci permet l'élution d'antibiotiques la plus longue et aux concentrations les plus élevées.^{56,87} La CFX a effectivement déjà été mesurée jusqu'à 350 jours post-implantation *in vivo* à partir d'une matrice de PLA à poids moléculaire de 100 kD⁵⁶ et jusqu'à 35-42 jours post-implantation *in vivo* d'une matrice de PLGA (50:50).⁸⁷ Malgré les avantages reconnus de ce SLC, son utilisation sur une base régulière n'est toujours pas possible parce que le ratio coût/bénéfice est encore trop élevé pour la médecine vétérinaire.²⁷

L'hydroxyapatite de calcium est un autre SLC prometteur. Il est résorbable tout en possédant de bonnes propriétés d'élution. De plus, ce matériau permet l'ostéoconduction dans une guérison osseuse. Ce SLC peut être moulé dans un déficit osseux pour participer au support mécanique de l'os et diminuer l'espace mort, sans inhiber le remodelage osseux qui se produit pendant le processus de guérison.^{24,90,92,99} Le collagène a aussi été utilisé avec cet objectif mais n'offrait que 4 jours d'élution antibiotique, ce qui est trop court pour une utilisation clinique.^{56,92,101} Plusieurs études démontrent des efficacités de l'hydroxyapatite de calcium similaires au PMMA dans l'éradication d'ostéomyélites expérimentales localisées chez des rats et des lapins lorsque ces matrices sont utilisées avec de la gentamicine ou de la vancomycine.^{24,28,59,92,99,101} Dans une étude récente, une formulation d'hydroxyapatite a permis une libération locale de CFX au dessus de la CMI des principaux agents responsables d'ostéomyélite pendant approximativement 28 jours.¹⁸ De plus, les implants utilisés dans cette étude ont été très bien tolérés et ont permis l'induction d'une néoformation osseuse.¹⁸ Les études concernant ce SLC sont donc très encourageantes quant à une éventuelle utilité clinique. Par contre, son ratio coût/bénéfice reste encore élevé et devra être amélioré pour permettre une utilisation plus régulière.

Les dérivés de la fibrine forment aussi une catégorie de SLC résorbable qui peut participer au support mécanique de déficits osseux tout en permettant à la néoformation osseuse de remplacer graduellement le matériel implanté.^{28,49,52,72} La fibrine est présente de façon naturelle dans les tissus donc les réactions envers ce corps étranger sont presque absentes. Les études initiales concernant des caillots de fibrine ne rapportaient que 72 à 96 heures de temps d'éluion antibiotique.^{28,49,52,72} Par la suite, l'éluion *in vitro* d'arbakacine a été détectée jusqu'à 18 jours à partir d'un implant de fibrine lyophilisé.⁴⁹ De la CFX a déjà été libérée pendant 10 jours au dessus de la CMI des pathogènes les plus communs lors d'ostéomyélite à partir d'un composé de fibrine¹⁰⁵, mais aucune étude d'efficacité curative n'a été menée sur un modèle d'ostéomyélite expérimentale. Par contre, une récente étude a évalué l'efficacité d'un scellant à base de fibrine chargé de tobramycine dans le traitement d'une ostéomyélite expérimentale chez des lapins. Cette combinaison était aussi efficace que le PMMA chargé aussi de tobramycine pour un traitement local associé à un débridement.⁷² Tout comme l'hydroxyapatite de calcium, ce système semble très prometteur mais d'autres études sont nécessaires avant d'affirmer qu'il pourra être employé cliniquement.

Le plâtre de Paris est un sulfate de calcium qui est actuellement utilisé comme SLC chez les équins.^{28,101} Cependant, ce matériau a une vitesse de résorption très lente, et les temps de libération sont généralement très courts. Une étude *in vitro* a démontré que 80% de la gentamicine placée dans l'implant était relâchée dans les premières 48 heures, mais que des concentrations bactéricides avaient tout de même été maintenues pour 14 jours.¹⁰¹ On rapporte aussi la libération de céphalosporines pour une durée de 3 jours.⁷⁵ Une étude rapporte que la libération de ciprofloxacine, benzylpénicilline, flucloxacilline, amoxicilline, amoxicilline/acide clavulanique, imipénème, et de gentamicine se compare favorablement, quoique de plus courte durée, à la libération des mêmes antibiotiques par le PMMA, avec une libération totale antibiotique 4 fois supérieure à partir des implants de plâtre de Paris.⁸ Pour augmenter le temps de libération de vancomycine à partir de plâtre de Paris, des implants ont été enrobés de PLA-PLG, ce qui a mené à la présence locale de taux de vancomycine thérapeutiques

pendant au moins 28 jours.⁶ Le grand avantage du plâtre de Paris est son côté économique. Ses temps d'élution courts lorsqu'utilisé seul en font un outil plus intéressant en mode préventif qu'en mode curatif.

Le chitosan est un aminopolysaccharide résorbable et biocompatible.^{2,81,82} Cet aminopolysaccharide induit la migration de polymorphonucléaires au site d'implantation, mais n'affecte en rien le rythme de guérison des plaies dans lesquelles il est placé.⁸¹ Des propriétés antibiotiques et immunologiques ont aussi été attribuées à ce biomatériau sans qu'il ne soit chargé en antibiotique.² Des concentrations tissulaires supérieures à la CMI pour *S. aureus* ont été détectées pendant 8 semaines suite à l'implantation de chitosan imprégné de gentamicine, ce qui rencontre les exigences normalement fixées pour le traitement d'une ostéomyélite post-traumatique chronique.² L'efficacité curative de ces implants a aussi été démontrée dans un modèle d'ostéomyélite à *S. aureus* sur des lapins.²¹ Les propriétés résorbables, économiques et de libération de ce SLC sont très intéressantes et méritent certainement une investigation plus approfondie.

Pour terminer, d'autres SLC ont déjà été étudiés en combinaison avec de la CFX, et ils ne seront qu'énumérés étant donné la profondeur de ce sujet. Du monostéarate de glycéryle a permis une libération de CFX et de céfazoline de courte durée, soit sur 3 jours, et n'a pas été étudié davantage suite à ses propriétés limitées de libération.¹⁰¹ Des polyuréthanes ont mené à une libération de 5 jours de CFX, aussi trop courte pour devenir un biomatériau utile au traitement de l'ostéomyélite.⁵⁶ Enfin, des composés à base de caprolactone ont aussi été étudiés avec la CFX, soient le poly(caprolactone)-co-1,6-hexane de diisocyanate et le poly (epsilon-caprolactone).^{77,112}

4. À propos de la résistance bactérienne

Toute antibiothérapie comporte un certain risque quant au développement de souches bactériennes résistantes. Les concentrations sériques d'antibiotique obtenues avec les

SLC sont habituellement très inférieures à la CMI des différentes souches bactériennes. Ces basses concentrations soutenues sont théoriquement capables d'exercer une pression en faveur de la sélection des souches résistantes. Cette problématique n'a toutefois pas été étudiée clairement, et très peu d'auteurs s'aventurent dans cette discussion. Pendant que le traitement avec ces SLC n'est pas encore perçu comme un problème, un changement de susceptibilité de certaines souches de *Staphylococcus* a été remarqué à l'Ohio State University College of Medicine.¹¹⁰ Un lien direct entre l'utilisation de SLC et l'émergence de ces souches résistantes est par contre difficile à établir puisque ces systèmes sont utilisés sporadiquement, seulement pour des cas sévères où les lésions tissulaires sont extensives. Un autre auteur rapporte le recouvrement de variantes de *S. aureus* en surface des implants suite à l'implantation de PMMA imprégné de gentamicine.¹⁰⁹ La sélection des antibiotiques à incorporer dans les SLC devrait donc être évaluée avec attention selon la susceptibilité des souches à combattre. Pour limiter la progression des phénomènes de résistance, l'utilisation des SLC devrait se faire de manière responsable, tout comme l'administration des antibiotiques par voie systémique.

V. Prévention de l'ostéomyélite post-traumatique

Les problèmes associés au traitement de l'ostéomyélite post-traumatique se posent aussi pour la prévention. Que ce soit la présence d'un traumatisme extensif aux tissus mous lors d'une fracture ouverte ou la mise en place d'un corps étranger permanent lors d'une installation de prothèse totale de hanche cimentée, ce sont des situations où le risque d'infection osseuse est augmenté. Dans le cas de mise en place de prothèses permanentes, ces infections sont littéralement dramatiques et mènent fréquemment à une explantation et une boiterie permanente du membre.^{40,53,54,83,104} La prévention de ces infections se fait donc à l'aide de techniques chirurgicales rigoureusement aseptiques, de débridement agressif lorsque justifié et d'antibiothérapie/prophylaxie systémique ou locale.

Une étude expérimentale rapporte la prévention du développement d'ostéomyélite à *S. aureus* dans 9 chiens sur 10 avec l'utilisation de PMMA imprégné de gentamicine en présence d'un corps étranger.⁴⁰ Suite à ces résultats intéressants, des séries de cas cliniques ont été effectuées, menant à des résultats divers. Une étude prospective, multicentrique, contrôlée, sur 10 ans, à propos de 1688 cas de prothèse totale de hanche chez l'humain n'a rapporté aucune différence dans les taux d'infection (1,6 vs 1,1%) ou de décèlement aseptique (55 vs 50%) lorsque du PMMA imprégné de gentamicine était utilisé en prophylaxie versus des pénicillines ou céphalosporines systémiques, respectivement.⁵⁴ Les mêmes auteurs avaient publié un rapport préliminaire de la même série de cas cliniques à mi-terme de l'étude, soit à 5 ans, avec un contraste de résultats intéressant. Une différence significative des taux d'infection (1,9 vs 0,8%) était présente entre les groupes de traitement local versus systémique à ce moment.⁵³ La réduction et/ou l'arrêt d'élution antibiotique à partir du PMMA dans le temps ainsi que le développement d'infections par voie hématogène et le diagnostic de cas d'infections latentes pourraient expliquer ce changement de résultats entre 5 et 10 ans. Dans une autre étude rétrospective sur 1085 cas consécutifs de fractures multiples ouvertes, les taux d'infections étaient significativement inférieurs dans le groupe

implanté avec un composé PMMA-gentamicine par rapport au groupe recevant une antibioprophylaxie systémique (3,7 vs 12%). Cette différence était encore plus marquée (6,5 vs 20,6%) chez les patients avec des lésions sévères aux tissus mous et des dommages vasculaires.⁸⁴ Une différence dans les approches chirurgicales des déficits tissulaires, dans les protocoles d'antibioprophylaxie et l'absence de distribution aléatoire des cas ont toutefois été reconnus par les auteurs.

Considérant ces résultats, il est raisonnable d'assumer que la prophylaxie assurée par un SLC est supérieure à celle obtenue par administration systémique d'antibiotiques. Une étude prospective distribuée de façon aléatoire serait nécessaire afin de confirmer hors de tout doute cette supposition, mais avec les bas taux d'infection qui sont actuellement atteints suite à l'amélioration des techniques chirurgicales, une telle étude demanderait un nombre extrêmement élevé de patients afin de démontrer une différence significative entre les stratégies de prophylaxie.^{104,110}

VI. Amidon réticulé à teneur élevée en amylose

Une étude a démontré que l'amidon réticulé à teneur élevée en amylose (ARTEA) possède des caractéristiques uniques qui en font un bon excipient pour les formes orales solides vouées à une libération contrôlée de médicaments.⁶² Les formes orales solides obtenues sont caractérisées par une libération à vitesse constante (ordre-quasi-zéro) de principes actifs sur une période de 12-24 heures.^{30,31,32,33,62,63} Le passage d'un traitement oral à un traitement local assisté de composés d'amidon a tout d'abord été appuyé par d'autres utilisations locales de dérivés de l'amidon. Chez l'homme, des microsphères d'amidon ont déjà été utilisées en association avec un agent anticancéreux pour provoquer une embolie sélective et transitoire de certains lobes hépatiques atteints d'une tumeur, qui devenait ainsi exposée plus longuement au principe actif.²⁵ L'obstruction était temporaire puisque les microsphères étaient dégradées par l'amylase sérique. Une autre étude rapporte que des microsphères d'amidon sont biocompatibles et ne causent pas de changements histopathologiques sérieux suite à leur administration intra-nasale chez des lapins.⁷ L'ARTEA a donc été envisagé comme SLC (Figure 9, page 42), menant à des études de biocompatibilité, de propriétés d'élution et finalement à ce projet de recherche.

L'ARTEA est un polymère insoluble dans l'eau. Sous la forme de poudre initialement, il forme une matrice solide par compression directe. Après immersion, cette matrice très hydrophile se gonfle rapidement pour former une masse gélifiée.^{30,31,32,33} Cependant, le gonflement reste limité, tout comme l'érosion d'ailleurs, ce qui lui permet d'offrir de bonnes propriétés de libération contrôlée du principe actif en évitant un délitement trop rapide de la masse polymère. Cet amidon modifié a été étudié avec différentes proportions d'excipients (huile végétale hydrogénée (HVO) et hydroxypropylméthylcellulose (HPMC)) ainsi qu'avec différentes charges de CFX afin d'identifier la formulation présentant les meilleures propriétés de libération locale contrôlée.^{30,31,32,33} Avant même d'évaluer les capacités de ce système en tant que libérateur contrôlé d'antibiotiques, on peut déjà lui donner comme qualités d'être

résorbable, économique à produire, accessible via une technologie de production industrielle et de pouvoir être chargé d'une grande concentration d'agent actif.^{32,63}

Figure 9. Implants d'amidon réticulé à teneur élevée en amylose avec 0,5% HVO et 20% CFX (diamètre de 7,1 mm et épaisseur de 4,8 mm)



1. Biocompatibilité

Une excellente biocompatibilité de l'ARTEA a premièrement été démontrée chez des souris.³² Avec des implants de 3 mm de diamètre, un oedème de quelques millimètres a été observé près du site d'implantation sous-cutanée pendant la première semaine post-opératoire. Aucun autre signe clinique d'inflammation n'était remarqué pendant cette période. Une réaction inflammatoire aiguë neutrophilique suivie d'une réaction chronique, de la formation de tissu de granulation et finalement de fibrose font habituellement suite à l'implantation d'un corps étranger. La faible intensité de cette cascade observée chez ces souris a démontré la biocompatibilité des implants d'amidon suite à leur implantation sous-cutanée. Au jour 3 post-implantation, la réaction inflammatoire était plus sévère autour de l'incision cutanée qu'autour de l'implant.³² Une néovascularisation et de fins *septa* fibreux infiltrent éventuellement les implants qui sont ensuite progressivement phagocytés par des macrophages. Les macrophages

forment une composante clé de la réponse de l'hôte à l'implantation de ce composé amidonné.^{31,32,33,35} Dans une étude sur des souris, les macrophages étaient le type de cellule inflammatoire principal observé du jour 7 au jour 180 avec une accumulation marquée mais localisée autour des implants. Des cytoplasmes spumeux de macrophages ont été associés à la présence intracellulaire de matériel positif à l'acide périodique Schiff (PAS) pouvant être de l'implant d'ARTEA phagocyté. Toutefois, l'amidon n'a aucun effet sur les propriétés de défense non-spécifique des macrophages comme par exemple son activité cytotoxique.⁴ Une seconde étude sur des rats a évalué les réactions de l'hôte suite à l'implantation sous-cutanée et intramusculaire d'implants d'ARTEA.³¹ Les résultats de cette étude sont compatibles avec ce qui a été remarqué chez les souris. Elle a aussi permis de démontrer que les implants d'amidon sont résorbables lorsqu'implantés en régions sous-cutané et intramusculaire.³¹

2. Propriétés d'éluion

L'éluion de CFX à partir de différentes formulations d'implants d'amidon a été évaluée premièrement *in vitro* et ensuite *in vivo* chez des lapins.^{30,33} L'étude *in vitro* a permis de déterminer que la meilleure formulation d'implants, parmi celles testées, était celle à 1% de lubrifiant HVO et à 7,5% de CFX (Figure 10, page 44).³⁰ Les propriétés de libération de CFX étaient plus propices à une utilisation *in vivo* lorsque le HPMC n'était pas inclus dans la formulation de l'implant. L'augmentation de la charge en CFX a résulté en une libération plus graduelle de l'antibiotique en effet plateau, minimisant le pic de libération en phase initiale souvent rencontré avec d'autres systèmes matriciels.^{27,30,33,60,87,101,110} La transformation rapide de l'implant en une forme de gel est considérée comme un élément clé au contrôle de ce pic de libération en phase initiale.³⁰

Dans l'étude *in vivo*, la présence importante de macrophages et la fragmentation des implants avec infiltration vasculaire et fibreuse ont été remarquées comme dans les études de biocompatibilité.³³ Suivant les résultats des études *in vitro*, les implants

utilisés ont été complétés de 0,5% de HVO, exempts de HPMC et chargés de différentes concentrations de CFX (2,5; 7,5; 15 et 20%). Les concentrations sériques de CFX sont restées sous la CMI pour *S. aureus* en tout temps, rendant quasi impossible le risque de toxicité systémique.³³ En accord avec les résultats de l'étude *in vitro*, le pic de libération en phase initiale a été mieux contrôlé en augmentant la concentration de CFX. Cette tendance était aussi maintenue lorsque la charge passait de 15% à 20% de CFX. Les concentrations de CFX étaient toujours plus élevées dans le muscle que dans l'os, dépassant la CMI pour *S. aureus* au moins jusqu'à 28 jours dans ces deux tissus avec les charges de 15% et 20% en CFX (Figure 11, page 45).³³ Les concentrations osseuses de tous les groupes étaient inférieures à ce qui a été rapporté dans une autre étude sur des implants CFX-PLGA 50:50.⁸⁷ Ceci s'explique par le fait que dans cette dernière étude, la dose d'antibiotique administrée était 2,5 fois supérieure et les implants étaient placés dans l'os.⁸⁷ Considérant les propriétés d'élution obtenues dans cette étude *in vivo*, la formulation d'implants avec 0,5% de HVO et 20% de CFX était prometteuse et justifiait une expérimentation supplémentaire en présence d'une ostéomyélite établie où des concentrations locales élevées et soutenues sont désirées afin de pénétrer les tissus avasculaires.

Figure 10. Relâche cumulative de CFX (moy. \pm S.D., n=5) d'implants d'amidon contenant 2,5; 5,0 et 7,5% de CFX avec 1%-HVO (d'après Désévaux C et coll³⁰)

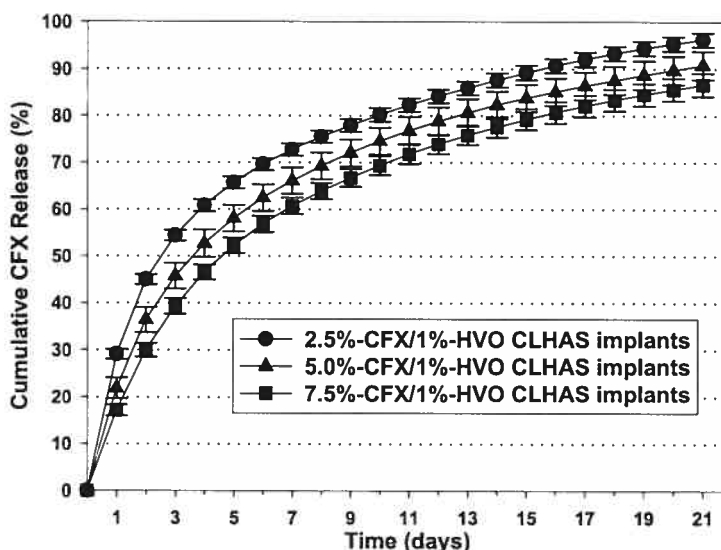
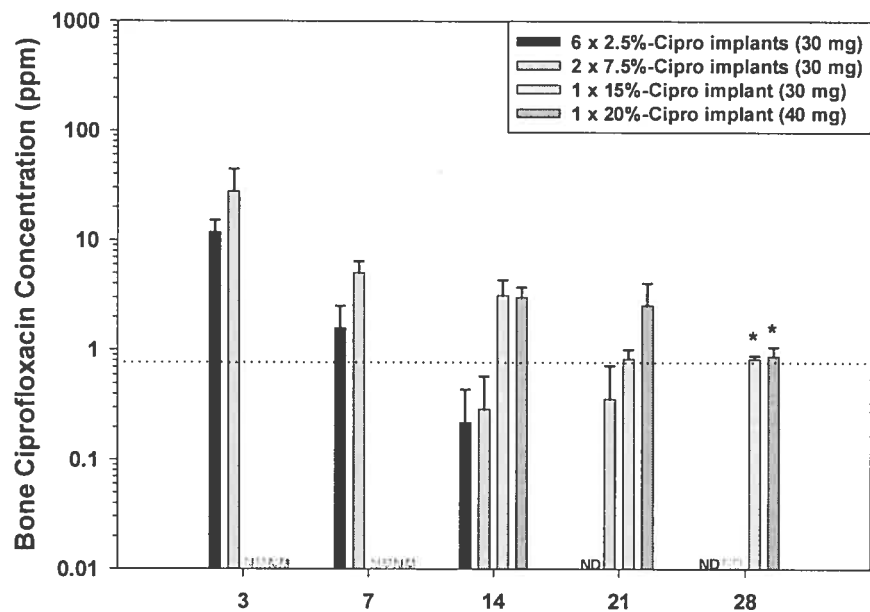


Figure 11. Concentrations osseuses de CFX (moy. \pm S.E.) après implantation de différentes combinaisons d'implants d'amidon (*, $p < 0,05$ entre les groupes à ce temps). CMI pour *S. aureus* en ligne pointillée; n=4 animaux par colonne; NM, non mesuré; ND non détecté. (d'après Désévaux C et coll³³)



VII. Objectifs et hypothèses de recherche

Les avantages des SLC dans la prévention et le traitement de l'ostéomyélite sont bien connus. Pour cette raison, des efforts sont constamment portés à l'élaboration et l'évaluation de différents nouveaux SLC résorbables avec comme objectif ultime de pouvoir les utiliser couramment afin d'améliorer le pronostic de patients atteints de cette condition tenace. Tous ces systèmes sont présentement au stade expérimental, et certains semblent prometteurs à un développement industriel qui les rendraient disponibles aux chirurgiens orthopédiques. Parmi ces SLC prometteurs se liste l'ARTEA qui a démontré d'excellentes propriétés de biocompatibilité et d'éluion à un coût acceptable. Dans la continuité de l'évaluation de ce composé en tant que SLC, une étude expérimentale contrôlée est donc devenue nécessaire afin de déterminer si le système réagit bien en situation pathologique *in vivo*.

L'objectif de cette étude est donc d'évaluer les efficacités préventives et curatives d'implants d'ARTEA chargés de CFX dans un modèle expérimental d'ostéomyélite fémorale chronique chez le chien. Nos deux hypothèses étaient que 1) l'utilisation des implants ARTEA-CFX prévient le développement d'ostéomyélite dans ce modèle et que 2) l'utilisation des implants ARTEA-CFX est égale à la CFX orale dans le traitement de l'ostéomyélite du même modèle expérimental.

Chapitre deuxième

MÉTHODOLOGIE

I. Production et utilisation d'un modèle canin d'ostéomyélite fémorale

1. Souche bactérienne

La souche de *S. aureus* utilisée dans ce modèle expérimental, identifiée comme ATCC 29213, est préservée par le département de microbiologie de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal. Cette souche a démontré une sensibilité au CFX et à la méthicilline *in vitro*. La CMI de la CFX pour cette souche était de 0,5 µg/mL. Une suspension de $3-4 \times 10^8$ cfu par mL a été préparée pour les fins de cette étude.

2. Implants ARTEA-CFX

Des implants d'amylose réticulé à teneur élevée en amylose (Contramid®; Labopharm Inc., Laval, Qc, Canada) de 200 mg, chacun contenant 40 mg (20%) d'hydrochlorure de CFX (Betachem inc., Upper Saddle River, NJ, USA) et 0,5% HVÒ (Penwest inc., Patterson, NY, USA), ont été préparés par compression directe comme décrit dans une étude précédente.³³ Cette formulation avait démontré les meilleures propriétés d'élution dans cette étude *in vivo*.³³ Les implants avaient un diamètre de 7,1 mm et une épaisseur de 4,8 mm.

3. Procédures chirurgicales et groupes de traitement

Trente-deux chiens de race Beagle, 16 mâles et 16 femelles âgés de 1 à 2 ans, ont été utilisés pour la création d'un modèle d'ostéomyélite chronique fémorale. Les chiens ont été séparés en quatre groupes de traitement A, B, C et D avec n=8 par groupe. Les chiens ont été entretenus et traités selon des lignes directives fournies par le Conseil Canadien de Protection des Animaux. Le protocole de recherche a été approuvé et supervisé par le Comité Institutionnel Éthique de l'Université de Montréal.

À la semaine 0 (jour 0), chaque chien a été prémédiqué avec une injection IM d'hydromorphone à 0,15 mg/kg (Sabex Inc., Boucherville, Qc, Canada), acepromazine à 0,05 mg/kg (Atravet[®], Ayerst Inc., Guelph, Ont., Canada) et glycopyrrolate à 0,01 mg/kg (Sabex Inc., Boucherville, Qc, Canada) dans la musculature épaxiale. L'anesthésie générale était ensuite induite avec une injection IV de thiopental à 10-15 mg/kg (Pentotal[®], Abbott Laboratories Ltd, Montreal, Qc, Canada). Après intubation endotrachéale, les chiens ont été maintenus sous anesthésie avec 2-3% d'isoflurane (AErrane[®], Baxter Corporation, Toronto, Ont., Canada) et un débit approximatif de 1L d'oxygène dans un système semi-fermé. Une épidurale de morphine à 0,2 mg/kg (Sabex Inc., Boucherville, Qc, Canada) diluée dans 1,5 mL de saline 0,9% a aussi été réalisée avant chacune des interventions chirurgicales tout au long du projet.

Le membre pelvien gauche de chacun des sujets a été rasé et préparé pour chirurgie aseptique avec un brossage de 5 minutes à la chlorhexidine 5% et 3 séries de passages à l'alcool isopropylique et chlorhexidine 2%. Quatre serviettes à champ et un drap fenestré ont été utilisés pour isoler le membre stérile afin de travailler avec un risque minimal de contamination externe. Une incision de 10 cm a été réalisée à l'aspect latéral du fémur, puis le *biceps femoris* a été rétracté caudalement et le *vastus lateralis* cranialement pour permettre d'isoler la diaphyse fémorale. Un trou de 1,5 mm a ensuite été foré dans le cis-cortex de la mi-diaphyse et préparé par un filetage de 2,0 mm. Un volume de 0,02 mL de l'*inoculum* a été versé directement sur une vis 2,0 mm corticale (Synthes Canada Ltd, Mississauga, Ont., Canada) par un assistant en utilisant une micropipette stérile. Cette vis inoculée était alors insérée à travers le cis-cortex et son extrémité reposait dans la cavité médullaire de la diaphyse mi-fémorale. Le fascia et les tissus sous-cutanés ont été refermés avec un patron simple continu de polyglyconate 3-0 (Maxon[®], Tyco Inc., Ville St-Laurent, Qc, Canada) et la peau avec un patron matelas en X de Nylon 3-0 (Monosof[®], Tyco Inc., Ville St-Laurent, Qc, Canada). De l'hydromorphone à 0,15 mg/kg (Sabex Inc., Boucherville, Qc, Canada) et du ketoprofène à 1 mg/kg (Anafen[®], Merial Inc., Baie d'Urfé, Qc, Canada) ont été administrés IM au niveau épaxial à tous les sujets pendant leur réveil.

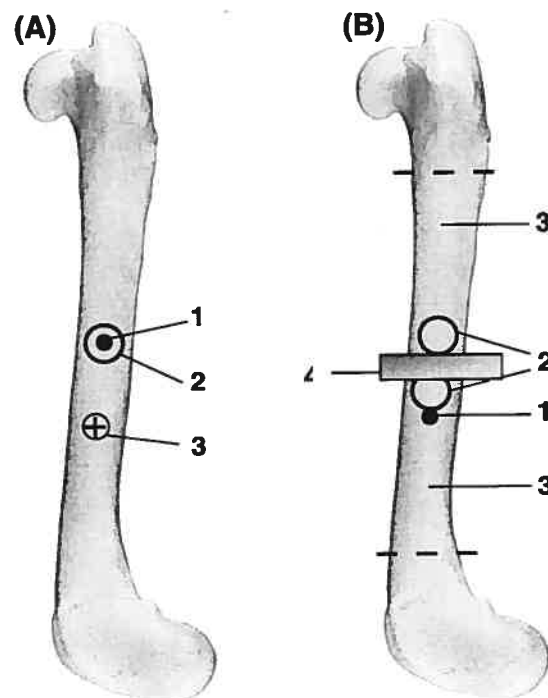
Simultanément à l'inoculation bactérienne à la semaine 0, les chiens du groupe A ont reçu huit implants ARTEA-CFX (pour une dose totale de 320 mg de CFX) placés directement en contact avec la diaphyse fémorale avant la fermeture du *fascia lata*. Ce groupe de chiens n'a donc pas été réopéré à la semaine 4 comme ce qui sera bientôt décrit pour les autres groupes, et a permis d'évaluer l'efficacité préventive des implants ARTEA-CFX (Voir l'Annexe 1 pour un résumé et une schématisation des protocoles respectifs aux groupes A, B, C et D de la semaine 0 à la semaine 10).

Quatre semaines après l'inoculation (semaine 4), les chiens des groupes B, C et D ont été réopérés. Le même protocole d'anesthésie, d'analgésie et d'aseptie ainsi que la même approche chirurgicale ont été utilisés aux semaines 0 et 4. Après exposition de la diaphyse fémorale, la vis était d'abord retirée pour permettre la prise d'un échantillon pour bactériologie centré sur le trou avec une tréphine de Michele de 5 mm (Instrumentarium, Terrebonne, Qc, Canada) (Figure 12, page 51). Le déficit créé par la tréphine a pu ensuite être évalué à la semaine 10 pour des signes de guérison osseuse. Le site était ensuite débridé avec un élévateur de Freer et une nouvelle vis était insérée 1,5 cm distalement, encore à l'intérieur de la zone affectée, afin de maintenir la présence *in situ* d'un corps étranger métallique comme ce qui serait rencontré dans une situation clinique afin de stabiliser des segments osseux.

Un plan de traitement a ensuite été adopté selon le groupe auquel le sujet avait été distribué (Annexe 1). Les chiens du groupe B n'ont reçu aucun traitement supplémentaire jusqu'à la fin du projet servant ainsi de contrôle positif. Les chiens du groupe C ont été traités avec 28 jours de CFX orale à raison de 10 mg/kg BID (Cipro[®], Bayer Inc., Etobicoke, Ont., Canada) et ont permis d'évaluer l'efficacité curative de la CFX orale. La durée de 28 jours a été choisie pour être équivalente à la durée de libération de CFX par les implants.³³ Finalement, les chiens du groupe D ont été traités avec huit implants ARTEA-CFX (pour une dose totale de 320 mg de CFX) placés directement en contact avec la diaphyse fémorale avant la fermeture du *fascia lata*, permettant ainsi l'évaluation de l'efficacité curative des implants ARTEA-CFX.

Dix semaines après l'inoculation, tous les chiens ont été euthanasiés à l'aide d'une surdose de barbituriques et préparés pour la récolte stérile des derniers échantillons (Figure 12). Après le retrait de la vis distale, deux échantillons pour bactériologie ont été pris adjacents aux sites proximal et distal avec l'aide de la tréphine de Michele 5 mm.

Figure 12. Représentation schématique des séquences de manipulations fémorales à: (A) Semaine 4; 1) retrait de la vis, 2) échantillonnage bactériologie et 3) insertion de la nouvelle vis, (B) Semaine 10; 1) retrait de la vis distale, 2) échantillonnage bactériologie 3) sections de la diaphyse pour l'histopathologie et 4) rondelle pour concentration osseuse en CFX.



Puisqu'il n'y a pas eu de chirurgie afin d'insérer une vis distale dans les chiens du groupe A à la semaine 4, un échantillon a été pris seulement qu'adjacent au site original. Le fémur a ensuite été disséqué, puis sectionné en cylindres qui ont été envoyés en histopathologie. Une mince rondelle située entre le site proximal et le site

distal était aussi récoltée pour déterminer la concentration osseuse en CFX (Figure 12, page 51). Enfin le fémur controlatéral a aussi été disséqué pour permettre de scier une rondelle vouée à la mesure de la concentration osseuse de CFX. Le site de prélèvement fémoral était le même qu'au niveau du fémur expérimental.

II. Méthodes d'évaluation

1. Suivi clinique

Les chiens étaient nourris deux fois par jour avec de l'eau à volonté. Une échelle de douleur basée sur la fréquence cardiaque, la fréquence respiratoire, la vocalisation, l'agitation et la réponse à la palpation a été utilisée pour attribuer des scores quantitatifs de douleur et administrer de l'analgésie au besoin (Annexe 2). La prise de température corporelle, l'évaluation qualitative de l'oedème du membre et du degré de boiterie complétaient le suivi clinique. De l'ampicilline IM à 25 mg/kg TID (Novopharm Ltd, Toronto, Ont., Canada) était planifiée pour les chiens qui démontraient des signes de septicémie, drainage de la plaie, fistules ou oedème modéré à sévère du membre opéré. Une liste de critères d'euthanasie a été proposée au Comité Institutionnel Éthique de l'Université de Montréal et adoptée avant le début de la phase expérimentale afin de s'assurer d'une utilisation éthique des chiens en cas de réaction aux chirurgies (Annexe 3). Les critères étaient basés sur la condition générale, l'appétit, la douleur, la température corporelle, le système musculosquelettique, le système cardiovasculaire et l'évaluation de signes systémiques.

2. Radiographie (semaines 0, 4 et 10)

Tous les chiens ont été radiographiés aux semaines 0, 4 et 10 en utilisant un système de traitement d'images radiographiques digital (ADC Solo, AGFA-Gaevaert N.V., Mortsel, Belgium). Les critères radiographiques de réaction périostée, de lyse osseuse, de sclérose médullaire et de guérison osseuse ont été gradés de 0 à 2 en utilisant une échelle qualitative/semi-quantitative (Annexe 4). Toutes les radiographies ont été révisées par le même investigateur à l'aveugle.

3. Évaluations macroscopiques (semaines 4 et 10)

Un rapport de chirurgie a été produit à chacune des interventions chirurgicales. Après l'exposition de la diaphyse fémorale aux semaines 4 et 10, une échelle semi-quantitative était utilisée pour évaluer la sévérité de la réaction périostée, la mobilité de la vis, les adhérences des tissus mous et l'importance de la guérison osseuse lorsqu'applicable (Annexe 5). Toutes les procédures chirurgicales et les évaluations macroscopiques étaient effectuées par le même investigateur à l'aveugle.

4. Bactériologie (semaines 4 et 10)

Tous les échantillons ont été broyés en petits morceaux, pesés et homogénéisés (Vortex, Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA) dans une solution stérile. Des dilutions en série de cette suspension ont été inoculées sur des géloses 5% de sang supplémentées de 5% de sang de mouton. Après incubation à 35°C pour 24 heures, les comptes bactériens étaient faits et exprimés en cfu/g de tissu osseux. L'identité des colonies isolées était confirmée par caractérisation phénotypique afin d'éliminer la possibilité de faux-positif relié à une contamination externe. La limite de détection de cfu/g d'os a été calculée à 1×10^4 . Un enrichissement en bouillon BHI (brain heart infusion) a été fait avec chacun des échantillons afin de s'assurer que les échantillons positifs avec faible compte bactérien étaient détectés.

5. Histopathologie (semaine 10)

Les cylindres osseux sciés à la récolte finale des échantillons de la semaine 10 ont été manipulés différemment selon leur origine. Les échantillons distaux étaient décalcifiés dans l'acide formique, coulés dans la paraffine, coupés en tranches de 5 µm d'épaisseur et colorés avec de l'hématoxyline et éosine. Les échantillons proximaux n'étaient pas décalcifiés, fixés dans du formaldéhyde, coulés dans du méthylméthacrylate, coupés avec un microtome motorisé en tranches de 5 µm d'épaisseur et colorés avec le

trichrome de Goldner. Toutes les lames ont été examinées de façon semi-quantitative par le même pathologiste pour la présence de prolifération périostée, de remodelage cortical, de prolifération endostée, d'inflammation neutrophilique du périoste, d'inflammation lymphoplasmocytaire du périoste, d'inflammation lymphoplasmocytaire de la moelle osseuse, de séquestre et de bactéries. La présence ou absence de macrophages vacuolés a aussi été notée pour les chiens des groupes A et D en réponse à la présence des implants d'amidon.

6. Pharmacocinétique (jours 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14 et 28)

Des échantillons sanguins ont été récoltés chez les 8 chiens du groupe A pour évaluer les taux systémiques de CFX atteints par l'utilisation seule des implants ARTEA-CFX. Les échantillons ont été congelés à -70°C en attendant une analyse de groupe. Un profil pharmacocinétique a donc été réalisé aux jours 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14 et 28, puis a été exprimé en $\mu\text{g/mL}$. Les analyses ont été effectuées par un procédé de chromatographie liquide à haute performance développé par Cirion Biopharma Research (Laval, Qc, Canada) utilisant une colonne à phase renversée C-18 et une élution à deux phases mobiles avec 5% et acétonitrile-méthanol (80:20, volume/volume), respectivement.

7. Concentration osseuse en CFX (semaine 10)

Tous les échantillons ont été envoyés à un collaborateur externe. L'expression de la concentration osseuse de CFX était planifiée en $\mu\text{g/g}$ de tissu osseux pour les membres opérés et controlatéraux. Les analyses ont été effectuées par le même procédé de chromatographie liquide à haute performance que la pharmacocinétique.

III. Analyses statistiques

Les comparaisons des scores entre les groupes de traitement à la semaine 4, et ensuite à la semaine 10 ont été faites avec un test G d'indépendance suivi de comparaisons multiples entre les traitements.⁹⁸ Lorsque l'effet d'un traitement était évalué à l'intérieur d'un groupe de la semaine 4 à la semaine 10, un test de Cochran-Mantel-Haenszel pour mesures répétées était appliqué.¹⁰⁰ Un test de Kruskal-Wallis était utilisé pour évaluer les différences de comptes bactériens entre les groupes de traitement à chacune des semaines 4 et 10. Lorsque des différences entre les comptes survenaient, les comparaisons multiples entre les groupes de traitement se faisaient à partir des différences entre les rangs moyens.⁹⁴ Les différences entre les comptes bactériens du site proximal, transformés de façon logarythmique, entre la semaine 4 et la semaine 10 ont été testées par une analyse de variance répétée. Les données du suivi clinique ont été traitées par analyse de variance pour mesures répétées, pour des variables continues (température) ou catégoriques (boiterie, oedème ou scores de douleur), avec le temps et le groupe de traitement étant le facteur répété et le facteur inter-sujet, respectivement. Pour toutes les analyses, le niveau de différence statistique a été fixé à $p < 0,05$.

Chapitre troisième

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

Sous presse au
Journal of Orthopaedic Research
Avril 2004

**Prevention and treatment of experimental
osteomyelitis in dogs with ciprofloxacin-loaded
crosslinked high amylose starch implants**

Louis M. Huneault, DMV, DES*; **Bertrand Lussier, DMV, MSc, Dipl. ACVS*;**
Pascal Dubreuil, DMV, MSc, PhD*; **Luc Chouinard, DMV, DES, Dipl. ACVP**,**
Cyril Désévaux, DMV, MSc, PhD*

*Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, St-Hyacinthe, Qc, Canada.

**Clinical Trials in Biological Research, Senneville, Qc, Canada.


Send correspondence to:

Louis M. Huneault

Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal

3200 rue Sicotte, C.P. 5000, St-Hyacinthe, Qc, Canada, J2S 7C6

Phone (450) 778-8111, Fax (450) 778-8110



Running title : Prevention and treatment of osteomyelitis

ABSTRACT

Crosslinked high amylose starch (CLHAS) matrix was used as a biodegradable drug delivery implant for the prevention and treatment of osteomyelitis. Thirty-two dogs underwent the femoral insertion of a screw inoculated with *Staphylococcus aureus* and were then randomly assigned to four groups: A) Prevention with ciprofloxacin-CLHAS implants, B) Surgical debridement (Positive control), C) Surgical debridement and oral ciprofloxacin treatment and D) Surgical debridement and treatment with ciprofloxacin-CLHAS implants. At week 4 the osteomyelitis was confirmed, the infected site debrided and respective treatments initiated for groups B, C and D. Radiographs, macroscopic evaluations, bacterial cultures and histopathological examinations were used to evaluate the femora at week 10. Femora from preventive group A were almost normal. Dogs of both ciprofloxacin treatment groups C and D showed better bone healing, less periosteal reaction and less screw mobility than dogs from group B. Eradication of infection was observed at proximal/distal sites in B: 25%/12%, C: 37%/62% and D: 62%/75%. Both ciprofloxacin treated groups improved radiographically from week 4 to week 10. Periosteal and marrow neutrophilic and lymphoplasmocytic infiltration were less severe in groups C and D vs group B. These data suggest that biodegradable ciprofloxacin-CLHAS implants are a safe and efficient modality for the prevention and treatment of osteomyelitis.

KEYWORDS: Osteomyelitis, local delivery system, biodegradable implants, starch, ciprofloxacin.

INTRODUCTION

Musculoskeletal infections can be difficult to treat with systemic antimicrobials because of their limited penetration into the devascularized tissues and biofilms that may be present at the infection site [5,8,15,16,19,28,38,40]. The current regimen of therapy for such infections includes an aggressive surgical debridement, soft tissue coverage, long term systemic antibiotic therapy and the removal or change of fixation devices without impairing bone stability [2,6,14,25,29,42]. The success rate with this approach varies between 80 and 90% [8,16,39-41]. To improve this treatment response, antimicrobial drug delivery systems (DDS) have been developed, allowing sustained high local drug concentrations with minimal potential of systemic toxicity. Furthermore, the preventive use of such systems has decreased infection rates in total hip arthroplasties and open fractures [4,31,41]. In past years, many efforts have been oriented towards the evaluation of various biodegradable DDS such as plaster of Paris, poly (D,L-lactide) and/or polyglycolide, calcium hydroxyapatite, calcium sulfate, collagen, chitosan and others [2,5,6,8,14,18,25,27,29,37,38]. Their major advantage over polymethylmethacrylate (PMMA) is to avoid the drawbacks of a second surgery for removal. However, one limitation of these newly developed DDS is the fact that their cost/benefit ratio is often too high and precludes their use on a regular basis [7,27].

Crosslinked high amylose starch (CLHAS) was first developed as a controlled release solid oral dosage form with a quasi-zero order drug release over 12-24 hours [20,21]. It has been recently demonstrated that CLHAS is a biodegradable material characterized by an excellent biocompatibility and controlled local delivery properties after

subcutaneous and intramuscular implantations [10,11]. Following perifemoral placement of ciprofloxacin-loaded CLHAS implants in rabbits, local muscle and bone ciprofloxacin concentrations were measured over 100 times in excess of the minimum inhibitory concentration (MIC) for a strain of *S. aureus*, over at least 28 days [12]. Moreover, CLHAS implants are easily manufactured, which would be an advantage over most other degradable DDS [9]. Fluoroquinolones such as ciprofloxacin can penetrate bone at sufficient concentrations to inhibit most members of the family of Enterobacteriaceae, and a large percentage of *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus* spp. strains [23,34]. Although the performance of ciprofloxacin in treating experimental infections has been questioned [24,27,30], it has been reported that this agent is very active against the biofilm of *S. aureus* and *P. Aeruginosa* [33,36], and that it may be a judicious option for antibiotic therapy of osteomyelitis [23,34]. Consequently, CLHAS implants containing ciprofloxacin may have a potential as a controlled DDS for prevention and treatment of musculoskeletal infections.

The objective of this study was to evaluate the preventive and curative efficacies of CLHAS implants loaded with ciprofloxacin in a canine experimental model of chronic femoral osteomyelitis. Our hypotheses were that the use of ciprofloxacin-CLHAS implants 1) prevents the development of osteomyelitis and 2) is equivalent to oral ciprofloxacin for the treatment of osteomyelitis in this canine experimental model.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Isolate

The strain of *S. aureus* used in this experimental model, identified as american type culture collection (ATCC) 29213, was shown to be sensitive to ciprofloxacin and methicillin in vitro. The MIC of ciprofloxacin for this strain was 0.5 μ g/mL. A suspension of $3-4 \times 10^8$ colony forming units (cfu) per mL was prepared for the purpose of the study.

Crosslinked High Amylose Starch Implants

Crosslinked high amylose starch implants (Contramid[®]; Labopharm Inc., Laval, Qc, Canada) of 200 mg, each containing 40 mg (20 %) of ciprofloxacin hydrochloride (Betachem inc., Upper Saddle River, NJ, USA), were prepared by direct compression as previously described [12]. This formulation provided the best delivery profile in vivo [12]. The implants were 7.1 mm in diameter and 4.8 mm thick.

Canine Osteomyelitis Model

Thirty-two 1 to 2 year old Beagle dogs (16 males and 16 females, 8.5 to 14.5 kg) were used for the creation of a chronic osteomyelitis model. Dogs were randomly assigned to four treatment groups (n=8) (A, B, C and D). The protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Montreal. At week 0, each dog was premedicated with an intramuscular injection of hydromorphone (Sabex Inc., Boucherville, Qc, Canada), induced under general anesthesia with intravenous thiopental (Pentotal[®], Abbott Laboratories Ltd, Montreal, Qc, Canada) and maintained

with isoflurane (AErrane[®], Baxter Corporation, Toronto, Ont., Canada). A morphine (Sabex Inc., Boucherville, Qc, Canada) epidural was performed prior to every surgical procedure. The left hind limb was prepared for aseptic surgery. After lateral femoral exposure, a total dose of 0.6 to 0.8×10^6 cfu of the inoculum (0.02 mL) was directly dropped on a 2.0 mm cortical screw (Synthes Canada Ltd, Mississauga, Ont., Canada) using a sterile micropipette. The screw was inserted in a hole drilled through the cis-cortex at mid-diaphysis and its end rested in the medullary cavity. The fascia and subcutaneous tissues were sutured with 3-0 polyglyconate (Maxon[®], Tyco Inc., Ville St-Laurent, Qc, Canada) and skin with 3-0 nylon (Monosof[®], Tyco Inc., Ville St-Laurent, Qc, Canada). Post-operative hydromorphone and ketoprofen (Anafen[®], Merial Inc., Baie d'Urfé, Qc, Canada) were administered intramuscular to all animals. Dogs from group A simultaneously received eight ciprofloxacin-CLHAS implants directly on the lateral aspect of their femur before closure. This group has served after 10 weeks to evaluate the efficacy of preventive implantation.

Four weeks after inoculation, dogs from groups B, C and D were re-operated. The screw was removed to allow bacterial sampling centered over the empty hole, using a 5 mm Michele trephine (Instrumentarium, Terrebonne, Qc, Canada) (Fig. 1A). The site was thoroughly debrided and a new 2.0 mm cortical screw was inserted 1.5 cm distally to maintain a foreign body within the infected site as would be encountered in the clinical setting (Fig. 1A). The same surgeon performed all debridements and was blinded to the treatment groups. Afterwards, the treatment plan was adopted depending on which group the dog was previously assigned to: dogs from group B did not receive any further treatment until the end the project and served as a positive control; dogs from group C

were treated for 28 consecutive days with ciprofloxacin (10 mg/kg, PO, q12 h) (Cipro[®], Bayer Inc., Etobicoke, Ont., Canada) and allowed the evaluation of oral antibiotic curative efficacy at week 10 and dogs from group D were treated with eight ciprofloxacin-CLHAS implants and allowed the evaluation of ciprofloxacin-CLHAS implant curative efficacy at week 10.

Ten weeks after inoculation, all dogs were euthanatized and prepared for sterile harvesting. After removal of the distal screw, two bone samples were taken adjacent to the proximal and distal sites for bacterial evaluations (Fig. 1B). Since no distal screw was placed in group A at week 4, a sample was taken only beside the original hole. Sections of the diaphysis were then made to obtain cylindrical bone samples for histopathological examination (Fig. 1B).

Evaluation methods

1) Radiographs: all dogs were radiographed at weeks 0, 4 and 10 using digitalized images (ADC Solo, AGFA-Gaevaert N.V., Mortsel, Belgium). Radiographic criteria of periosteal reaction, osteolysis, medullary sclerosis and proximal defect healing were graded as absent, mild, moderate or severe. All radiographs were reviewed by the same investigator who was blinded to the treatment groups.

2) Macroscopic evaluations: after femoral exposure, a semi-quantitative scoring system was used to evaluate the severity of periosteal reaction, screw mobility, soft tissue adhesions and the importance of bone healing when appropriate. All surgical procedures and macroscopic evaluations were performed by the same surgeon who was blinded to the treatment groups.

3) Bacterial cultures: all bone samples were crushed into pieces, weighed and homogenized (Vortex, Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA) in a sterile saline solution. Serial dilutions of this suspension were inoculated on 5% blood agar supplemented with 5% sheep blood. After incubation at 35C° for 24 hours, the counts were performed. Bacterial growth was expressed as cfu/g of bone tissue, and the limit of detection of cfu/g was calculated at 1×10^4 . Enrichment in a BHI broth was always performed to make sure that positive cultures with lower counts were not missed.

4) Histopathological examinations: The distal samples were decalcified in formic acid, embedded in paraffin, cut and stained with hematoxylin and eosin. The proximal samples were not decalcified, embedded in methylnmethacrylate, cut with a motorized microtome into 5 μ m sections and stained with Goldner's trichrome. All slides were examined semi-quantitatively by the same pathologist who was blinded to the treatment groups for periosteal proliferation, cortex remodelling, endosteal proliferation, periosteal neutrophilic inflammation, periosteal lymphoplasmocytic inflammation, marrow lymphoplasmocytic inflammation, sequestrum and bacteria. The presence of vacuolated macrophages was also recorded and graded for group A and D specimens.

Statistical analysis

Comparisons of scores between treatment groups at week 4 and at week 10 were made with a G-test for independence followed by multiple comparisons between treatments. When the effect of a treatment was evaluated within a group from week 4 to week 10, a Cochran-Mantel-Haenszel test for repeated measures was performed.

Differences in log-transformed bacterial counts at the proximal site between the two time

periods were tested with a repeated analysis of variance. The Kruskal-Wallis test was used to test for differences among treatments in bacterial counts at each time period. When significant differences occurred, multiple comparisons relied on differences between mean ranks. The level of statistical significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Week 4

1) Radiographs: all animals from groups B, C and D demonstrated mild to moderate signs of osteomyelitis. Periosteal reaction and bone lysis were lower ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively) for dogs in the preventive group A compared to animals of other groups. No significant differences were observed in the severity of lesions between groups B, C and D.

2) Macroscopic evaluations: mild to moderate signs of osteomyelitis were observed in all dogs from groups B, C and D. Adhesions of the *vastus lateralis* were mild in every case, with occasional purulent material accumulation adjacent to bone. Periosteal reaction was scored as mild to moderate in all dogs, extending up to three cm away from the screw insertion site. Approximately 80% (20/24) of the screws were mobile when tested, with four of them that could be extracted with a minimal linear extraction force. Adhesions, periosteal reaction and screw mobility were not statistically different between the groups.

3) Bacterial cultures: all sampled animals had a positive culture. Bacterial counts were not significantly different between groups B, C and D. These counts averaged in B:166, C:126 and D:7983 X 10⁵ (SEM 2 X 10⁵) cfu/g of bone.

Week 10

1) Radiographs: The absence of periosteal reaction and bone lysis was outlined in group A, with the only finding being mild medullary sclerosis that was significantly less ($p<0.01$) than in the other groups. Bone lysis was less severe ($p<0.01$), and cortical remodeling of the proximal defect was greater ($p<0.01$) in both ciprofloxacin treated groups C and D vs group B (Fig. 2). Periosteal reaction was significantly lower ($p<0.05$) in group D vs group B, but no differences could be found between groups C and B. A reduction in the severity of bone lysis was observed ($p<0.05$) between week 4 and week 10 in groups C and D.

2) Macroscopic evaluations: bone healing of the proximal defect created at week 4 by bacterial sampling was greater ($p<0.01$) in both groups C and D vs group B. Periosteal reaction was significantly different ($p<0.01$) between groups, with increasing severity of $A<C=D<B$, being absent in the preventive group A. All screws were mobile in group B whereas they were all firmly fixated in group A. The screw mobility was different ($p<0.01$) between groups, with an increasing order of $A<C=D<B$. Soft tissue adhesions were higher ($p<0.01$) in dogs of group B compared to all other three groups at week 10. In all CLHAS-implanted dogs, a complete resorption of the implants was observed.

3) Bacterial cultures (Fig. 3): Bone cultures of proximal/distal sites were negative in A: 87%/-%, B: 25%/12%, C: 37%/62% and D: 62%/75%. The percentage of negative

culture/total was significantly higher ($p<0.01$) in group D vs group B at the distal site. Bacterial counts averaged in positive dogs A:0.3, B:25, C:3 and D:5 X 10⁵ (SEM 2 X 10⁵) cfu/g of bone. Counts in groups A and C (distal site) were significantly lower ($p<0.05$) than in group B. Bacterial counts decreased ($p<0.01$) from week 4 to week 10 in all three groups.

4) Histopathological examination: No suggestive lesions of osteomyelitis were seen in any animals of group A. The mild bone reaction noted in this group was considered compatible with normal bone healing after implantation of a metallic screw in the diaphysis of a long bone. A moderate osteomyelitis was noted in all group B dogs. Both curative ciprofloxacin treatments had a reduced incidence of periosteal neutrophilic inflammation and lymphoplasmocytic infiltration vs group B. Similarly, more endosteal bone proliferation was noted in groups C and D dogs (Fig. 4). At the distal site, periosteal proliferation was milder in the implant versus the oral treated dogs. Vacuolated macrophages accumulation was noted in 3/8 and 9/16 specimens from groups A and D, respectively.

DISCUSSION

This canine experimental model of chronic femoral osteomyelitis was elaborated to maintain a foreign body within the infected site at all times, as it is often necessary clinically to stabilize bone fragments. The model produced macroscopic, radiographic and bacteriologic evidences of osteomyelitis in all animals of groups B, C and D at week 4. The similarity of lesions between the groups indicates a good reproducibility of the model and a

good reliability for the comparison of curative treatment protocols. Moreover, the reliability of the positive control at week 4 and week 10 was helpful to assess the preventive efficacy of the starch implants. However, this model may not approximate clinical situations with compromised vascularization or extensive soft tissue damage.

In this study, the preventive efficacy of the ciprofloxacin-CLHAS implants was clearly demonstrated with the absence of any radiographic, macroscopic or histological sign of inflammatory reaction of bone and surrounding soft tissues. Surprisingly, one dog from the preventive group A was found positive on bacterial culture at week 10. However, the bacterial count was low and no corresponding signs of osteomyelitis were observed on microscopic examination. A small number of bacteria may have been present at the bone/screw interface, and osteomyelitis may have developed if given enough time. Similar results have been observed with preventive implantation in another study about gentamicin-impregnated PMMA, where 9 out of 10 tibiae exposed to *S. aureus* in presence of a foreign body were free of osteomyelitis at the end of the project [13]. In series of clinical cases, prophylaxis with antibiotic-loaded PMMA used in various surgical interventions has led to different infection rates. A ten-year prospective multicenter controlled study of 1688 cases of hip arthroplasty reported no difference in deep infection rates (1.6 vs 1.1%) or aseptic prosthetic loosening (55 vs 50%) when gentamicin-impregnated PMMA was used for prophylaxis versus systemic penicillins or cephalosporins [17]. In another study reviewing 1085 consecutive cases of open compound limb fractures, the overall infection rate was significantly lower in the group receiving gentamicin beads versus systemic antibiotics only (3.7 vs 12%), and the differences were greatest (6.5 vs 20.6%) among patients with initial severe soft tissue damage or impaired

vascularity [32]. Given these different results, it is reasonable to assume that prophylaxis with antibiotic-loaded implants is superior to prophylaxis with systemic antibiotics only, but randomised prospective studies would be necessary to confirm this assumption.

The present study also demonstrated that in the presence of established osteomyelitis, oral ciprofloxacin and ciprofloxacin-CLHAS implants had an equivalent curative efficacy. Similar results in the treatment of *S. aureus* osteomyelitis were reported with calcium hydroxyapatite and D,L-lactide:glycolide [29,35]. In the latter study, a significant difference was not found between the vancomycin-loaded calcium hydroxyapatite and the systemic vancomycin treated groups. In contrast, efficacy between systemic and antibiotic DDS treatments was significantly different in several experimental models [5,25,27,37]. Further studies would be needed to evaluate antibiotic-CLHAS implants and systemic antibiotics in presence of a more severe osteomyelitis where their efficacies may differ because of increased devascularized tissues. Since the severity of the osteomyelitis induced in this study was moderate, it is effectively unclear whether a significant avascular local tissue component was present or not.

An excellent biocompatibility of CLHAS has been shown in rodents [10,11]. On day three after subcutaneous implantation in mice, the inflammatory response was reported to be less severe around the implants than around the skin incision [11]. In the present study, the difference in periosteal proliferation between the implant and the oral treatment groups outlines a good biocompatibility of these implants in dogs. Also, the ciprofloxacin-CLHAS implants allowed bone healing in a similar manner than the oral use of ciprofloxacin. Other advantages of this new excipient include biodegradability, readily accessible industrial manufacturing technology, high active ingredient loading and very

good cost-effectiveness [11,21]. In order to target the clinical strain responsible for an infection, elution properties of other antibiotics from the CLHAS matrix could also be evaluated. Increasing antibiotic loading in these implants results in a steady delivery over time characterized by a plateau serum profile, minimizing the initial burst and/or the bimodal delivery profile as reported in many systems [7,12,38,41]. The rapid gelification of CLHAS is believed to be a key parameter in controlling the initial burst [9].

Neovascularization and fibrous septae eventually subdivide CLHAS implants which are then progressively phagocytosed by macrophages [11]. It is known that macrophages are a key component of the response to implanted CLHAS [10-12], and that starch has no effect on macrophage nonspecific defense response such as cytotoxic activity [3]. The vacuolated macrophages detected in groups A and D are consistent with phagocytosis of the starch implants.

The reduction of bacterial counts and number of positive sites from week 4 to week 10 for the positive control can be primarily explained by an effective surgical debridement. This finding is in agreement with the theory that the quality of surgical debridement remains the most critical factor in the successful management of chronic orthopaedic infections [35,39,40]. Adequate debridement can lower the number of bacteria and facilitate clearance by the immune system [35,39,40]. In concert with the results and recommendations of many other authors, our results support once more the importance of aggressive surgical debridement in the treatment of chronic osteomyelitis [15,16,19,25,27,28,35,39,40].

After oral administration of ciprofloxacin at 10 mg/kg q12h in dogs, the C_{\max} is reported to be 1.55 mg/L [1]. This regimen in dogs corresponds to a conventional oral dose

of 500 mg q12h ($C_{max} = 1.5 - 2.8$ mg/L) used in humans [22]. With a similar efficacy of ciprofloxacin-CLHAS implants and oral ciprofloxacin in dogs, it can be assumed that CLHAS implants would be a viable DDS in humans. The site-specific antibiotic delivery allows the elimination of peaks and troughs of drug concentrations associated with conventional multiple high dose systemic administrations [4,18,19,26,38]. Thereby, not only the possible toxicity and side effects are minimized by lowering the systemic drug levels, but the efficacy of treatment may be enhanced due to higher sustained concentrations at the surgery site. Also, patients can not be non compliant to medical treatment and miss doses, as it frequently happens when on prolonged oral therapy. Moreover, hospitalization time and costs related to the treatment may be reduced [2,4,8,10,14,18,19,27,35,37].

In the present study, *S. aureus* was chosen to produce a reliable and reproducible model of osteomyelitis because it has been previously used as a standard [13-15,27-29,33,35,37]. Nevertheless, quinolone resistance has become a concern among clinical isolates of *S. aureus* [24,27,30]. The strain used in our study was purposely selected to be sensitive to ciprofloxacin, in order to allow a reliable evaluation of CLHAS matrix implant efficacy for the prevention and treatment of osteomyelitis. As in conventional systemic antibiotic therapy, the development of resistance with drug delivery implants can be suspected. However, it seems more likely that resistance could develop in distant floras following implantation of an antimicrobial DDS because resulting systemic antibiotic concentrations remain below MIC over an extended period of time. Unfortunately, studies on bacterial sensitivity evolution with antimicrobial implant usage are lacking. Accordingly it would be very helpful to further investigate bacterial sensitivity patterns from a pathogen

agent in bone and from distant floras (e.g. nasal, oral, rectal and cutaneous) during long term implant versus oral antibiotic therapy, in order to evaluate the risk/benefit ratio of antimicrobial DDS usage in clinical situations.

The use of ciprofloxacin-CLHAS implants has been determined as a safe and efficient modality for the prevention and treatment of the osteomyelitis developed in this experimental model. The judicious use of these implants in infection prone situations such as open fractures may help to reduce infection rates. Also, the treatment of established infections could be achieved with implantation performed at the time of surgical debridement, without the need of a second surgery for antibiotic implant removal.

ACKNOWLEDGMENT:

This study was funded by Labopharm Inc., Laval, Qc, Canada. The authors thank Dr Serge Messier, Mr Guy Beauchamp and Mr Maxim Moreau for their assistance in this study and in manuscript preparation.

REFERENCES

- [1] Abadia AR, Aramayona JJ, Munoz MJ et al: Ciprofloxacin pharmacokinetics in dogs following oral administration. *Zentralbl Veterinarmed A* 42(8):505-11, 1995.
- [2] Aimin C, Chunlin H, Juliang B et al : Antibiotic loaded chitosan bar. An in vitro, in vivo study of a possible treatment for osteomyelitis. *Clin Orthop* 366:239-247, 1999.
- [3] Artursson P, Edman P, Ericsson JL : Macrophage stimulation with some structurally related polysaccharides. *Scand J Immunol* 25:245-254, 1987.
- [4] Calhoun JH, Mader JT : Antibiotic beads in the management of surgical infections. *Am J Surg* 157:443-449, 1989.
- [5] Calhoun JH, Mader JT : Treatment of osteomyelitis with a biodegradable antibiotic implant. *Clin Orthop* 341:206-214, 1997.
- [6] Cornell CN, Tyndall D, Waller S et al : Treatment of experimental osteomyelitis with antibiotic-impregnated bone graft substitute. *J Orthop Res* 11:619-626, 1993.
- [7] Dash AK, Cudworth GC II : Therapeutic applications of implantable drug delivery systems. *J Pharmacol Toxicol Methods* 40:1-12, 1998.
- [8] Dernell WS : Treatment of severe orthopedic infections : *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 29:1261-1274, 1999.
- [9] Désévaux C, Dubreuil P, Lenaerts V : Characterization of crosslinked high amylose starch matrix implants. 1. In vitro release of ciprofloxacin. *J Control Release* 82:83-93, 2002.

- [10] Désévaux C, Dubreuil P, Lenaerts V, Girard C : Tissue reaction and biodegradation of implanted cross-linked high amylose starch in rats. *J Biomed Mater Res* 63:772-779, 2002.
- [11] Désévaux C, Girard C, Lenaerts V, Dubreuil P : Characterization of subcutaneous Contramid implantation: host response and delivery of a potent analog of the growth hormone-releasing factor. *Int J Pharm* 232:119-129, 2002.
- [12] Désévaux C, Lenaerts V, Girard C, Dubreuil P : Characterization of crosslinked high amylose starch matrix implants. 2. In vivo release of ciprofloxacin. *J Control Release* 82:95-103, 2002.
- [13] Fitzgerald RH Jr : Experimental osteomyelitis: description of a canine model and the role of depot administration of antibiotics in the prevention and treatment of sepsis. *J Bone Joint Surg Am* 65:371-380, 1983.
- [14] Garvin KL, Miyano JA, Robinson D et al : Polylactide/polyglycolide antibiotic implants in the treatment of osteomyelitis. A canine model. *J Bone Joint Surg Am* 76:1500-1506, 1994.
- [15] Itokazu M, Yamamoto K, Yang WY et al : The sustained release of antibiotic from freeze-dried fibrin-antibiotic compound and efficacies in a rat model of osteomyelitis. *Infection* 25:359-363, 1997.
- [16] Johnson KA. Osteomyelitis in dogs and cats : *J Am Vet Med Assoc* 204:1882-1887, 1994.
- [17] Josefsson G, Kolmert L : Prophylaxis with systematic antibiotics versus gentamicin bone cement in total hip arthroplasty. A ten-year survey of 1,688 hips. *Clin Orthop* 292:210-214, 1993.

- [18] Kanellakopoulou K, Galanakis N, Giamarellos-Bourboulis EJ et al : Treatment of experimental osteomyelitis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a biodegradable system of lactic acid polymer releasing pefloxacin. J Antimicrob Chemother 46:311-314, 2000.
- [19] Kanellakopoulou K, Giamarellos-Bourboulis EJ : Carrier systems for the local delivery of antibiotics in bone infections. Drugs 59:1223-1232, 2000.
- [20] Lenaerts V, Dumoulin Y, Mateescu MA : Controlled release of theophylline from cross-linked amylose tablets. J Control Release 15:39-46, 1991.
- [21] Lenaerts V, Moussa I, Dumoulin Y et al : Cross-linked high amylose starch for controlled release of drugs: recent advances. J Control Release 53:225-234, 1998.
- [22] Lettieri JT, Rogge MC, Kaiser L et al: Pharmacokinetic profiles of ciprofloxacin after single intravenous and oral doses. Antimicrob Agents Chemother 36(5):993-6, 1992.
- [23] Lew DP, Waldvogel FA : Use of quinolones in osteomyelitis and infected orthopaedic prosthesis. Drugs 58:85-91, 1999.
- [24] Limoncu MH, Ermertcan S, Cetin CB et al: Emergence of phenotypic resistance to ciprofloxacin and levofloxacin in methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* strains. Int J Antimicrob Agents 21(5):420-4, 2003.
- [25] Mader JT, Stevens CM, Stevens JH et al : Treatment of experimental osteomyelitis with a fibrin sealant antibiotic implant. Clin Orthop 403:58-72, 2002.
- [26] Miclau T, Dahners LE, Lindsey RW : In vitro pharmacokinetics of antibiotic release from locally implantable materials. J Orthop Res 11:627-632, 1993.

- [27] Monzon M, Garcia-Alvarez F, Laclériga A et al : A simple infection model using pre-colonized implants to reproduce rat chronic *Staphylococcus aureus* osteomyelitis and study antibiotic treatment. J Orthop Res 19:820-826, 2001.
- [28] Nelson CL, McLaren SG, Skinner RA et al : The treatment of experimental osteomyelitis by surgical debridement and the implantation of calcium sulfate tobramycin pellets. J Orthop Res 20:643-647, 2002.
- [29] Nie L, Nicolau DP, Tessier PR et al : Use of a bioabsorbable polymer for the delivery of ofloxacin during experimental osteomyelitis treatment. J Orthop Res 16:76-79, 1998.
- [30] Nimmo GR, Bell JM, Mitchell D et al: Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* in Australian teaching hospitals, 1989-1999. Microb Drug Resist 9(2):155-60, 2003.
- [31] Olmstead ML, Hohn RB, Turner TM : A five-year study of 221 total hip replacements in the dog. J Am Vet Med Assoc 183:191-194, 1983.
- [32] Ostermann PA, Seligson D, Henry SL : Local antibiotic therapy for severe open fractures. A review of 1085 consecutive cases. J Bone Joint Surg Br 77:93-97, 1995.
- [33] Owusu-Ababio G, Rogers J, Anwar H : Effectiveness of ciprofloxacin microspheres in eradicating bacterial biofilm. J Control Release 57:151-159, 1999.
- [34] Rissing JP : Antimicrobial therapy for chronic osteomyelitis in adults: role of the quinolones. Clin Infect Dis 25:1327-1333, 1997.
- [35] Shirtliff ME, Calhoun JH, Mader JT : Experimental osteomyelitis treatment with antibiotic-impregnated hydroxyapatite. Clin Orthop 401:239-247, 2002.

- [36] Soboh F, Khoury AE, Zamboni AC et al : Effects of ciprofloxacin and protamine sulfate combinations against catheter-associated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 39:1281-1286, 1995.
- [37] Solberg BD, Gutow AP, Baumgaertner MR : Efficacy of gentamycin-impregnated resorbable hydroxyapatite cement in treating osteomyelitis in a rat model. *J Orthop Trauma* 13:102-106, 1999.
- [38] Streppa HK, Singer MJ, Budsberg SC : Applications of local antimicrobial delivery systems in veterinary medicine. *J Am Vet Med Assoc* 219:40-48, 2001.
- [39] Tetsworth K, Cierny G : Osteomyelitis debridement techniques. *Clin Orthop* 360:87-96, 1999.
- [40] Tsukayama DT : Pathophysiology of posttraumatic osteomyelitis. *Clin Orthop* 360:22-29, 1999.
- [41] Wininger DA, Fass RJ : Antibiotic-impregnated cement and beads for orthopedic infections. *Antimicrob Agents Chemother* 40:2675-2679, 1996.
- [42] Worlock P, Slack R, Harvey L, Mawhinney R : The prevention of infection in open fractures: an experimental study of the effect of fracture stability. *Injury* 25:31-38, 1994.

FIG. 1.

(A) Manipulations at week 4 were sequenced: 1) first screw removal, 2) bacterial sampling and 3) second screw insertion. (B) Manipulations at week 10 were sequenced: 1) distal screw removal, 2) bacterial sampling and 3) sections of the diaphysis for histopathological examination.

FIG. 2.

(A) Group B: bone lysis and periosteal proliferation were scored as grade 2 and the proximal defect created at week 4 is still present. (B) Group D: bone lysis and periosteal proliferation were scored as grade 1 and the proximal defect is filled with remodeling new bone.

FIG. 3.

Means (+S.E.) cfu of *S. aureus* in dogs with positive cultures and percentages of negative culture/total.

FIG. 4.

Undecalcified histopathological transverse femur section of a dog treated with ciprofloxacin-CLHAS implants. Note the endocortical bone formation with the presence of trabecular bone and osteoid substance in the medullary cavity, the mild cortical remodeling with Havers channels enlargement and the absence of inflammatory infiltrate (Goldner's trichrome; original magnification X 1).

Figure 13. (Voir légende page 79)

(FIG. 1.) Schematic representation of femoral manipulations at week 4 and week 10.

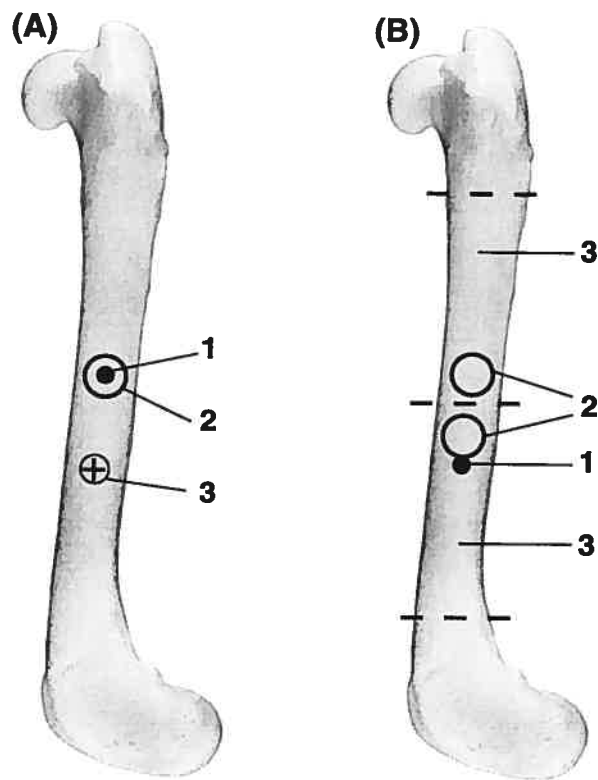


Figure 14. (Voir légende page 79)

(FIG. 2.) Radiographic comparison of groups B and D at week 10.

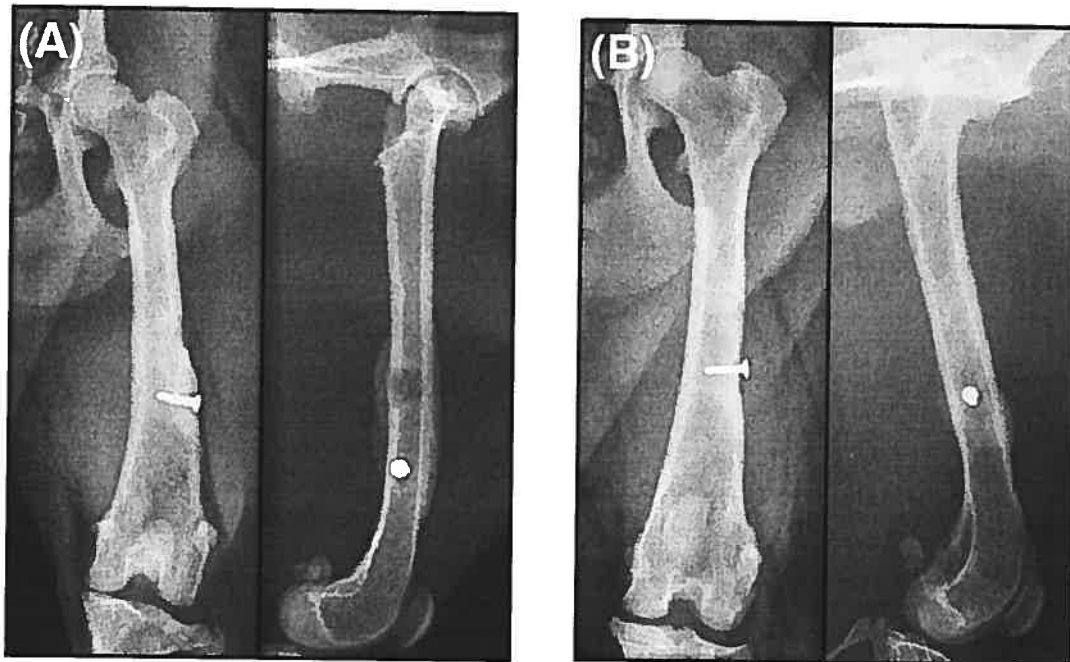
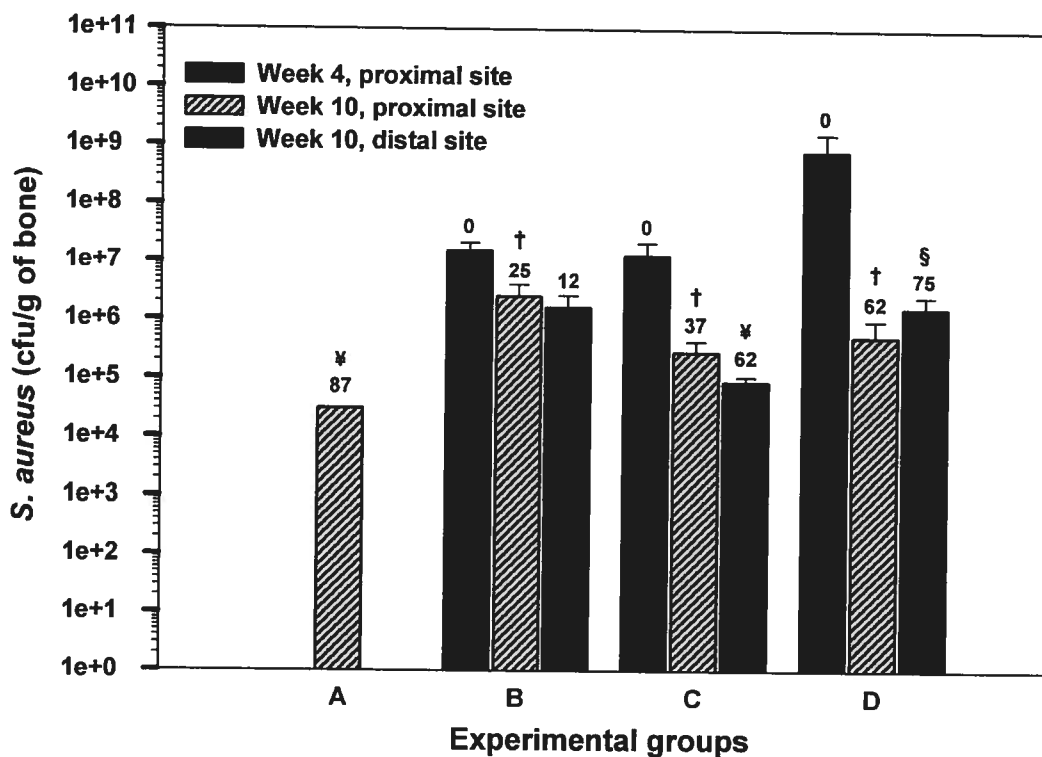


Figure 15. (Voir légende page 79)

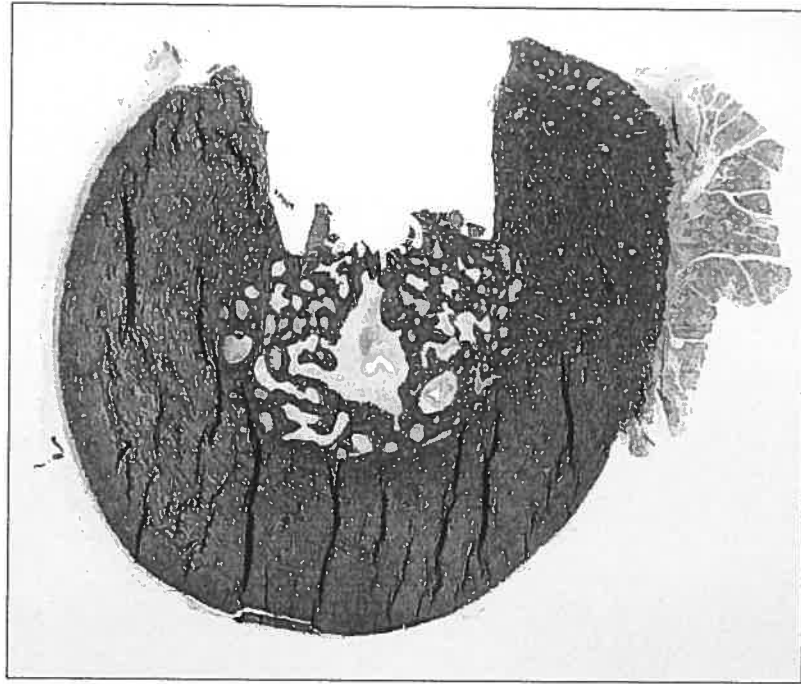
(FIG. 3.) Means (\pm S.E.) cfu of *S. aureus* in cultured bone specimen and percentage of negative sites for dogs in groups A, B, C, and D at weeks 4 and 10.



Numbers above columns indicate percentages of negative culture/total (n=8)
 † Counts significantly different from week 4 to week 10 in a given group
 ¥ Counts significantly different from group B at this time and site
 § Percentage of negative culture/total (n=8) significantly different from group B at this time and site

Figure 16. (Voir légende page 79)

(FIG.4.) Undecalcified histopathological transverse femur section of a dog treated with ciprofloxacin-CLHAS implants.



Chapitre quatrième

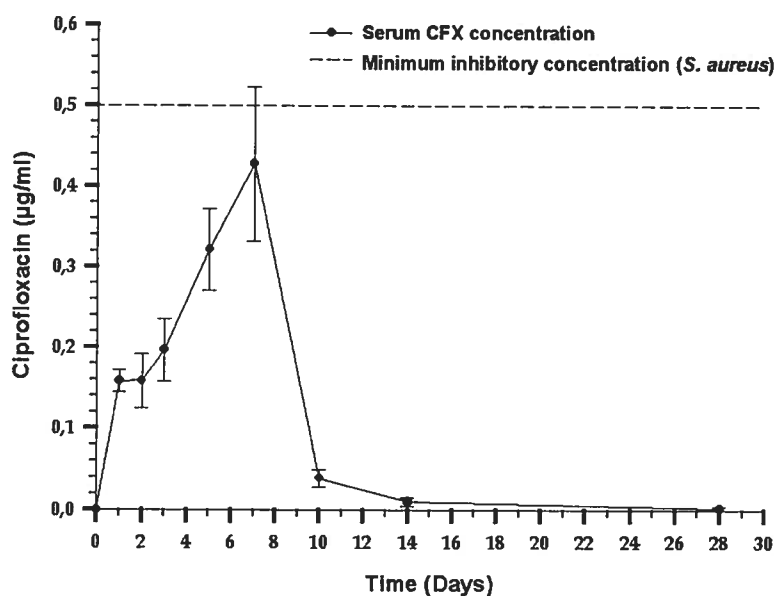
AUTRES RÉSULTATS

I. Résultats non publiés

1. Pharmacocinétique

La concentration sérique moyenne maximale de CFX a été atteinte au jour 7 à 0,428 $\mu\text{g}/\text{mL}$ après l'implantation chez les chiens du group A. Ensuite, les concentrations sont rapidement descendues à $0,038 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{mL}$ au jour 10. Un effet quadratique était présent ($p < 0,01$) démontrant une forme de U inversée sur un graphique de Concentration vs Temps (Figure 17).

Figure 17. Pharmacocinétique sérique de CFX vs temps après inoculation et mise en place de huit implants ARTEA-CFX chez huit chiens du groupe A.



2. Concentration osseuse en CFX

Les concentrations osseuses en CFX étaient sous le seuil de détection pour toutes les analyses à la semaine 10.

Chapitre cinquième

DISCUSSION ET CONCLUSION

I. Discussion

1. Modèle d'ostéomyélite

Au cours de ce projet, un modèle d'ostéomyélite expérimentale a été développé avec succès chez le Beagle. Ce modèle d'ostéomyélite fémorale chronique a été élaboré de façon à refléter une situation clinique. Un corps étranger a été maintenu *in situ* en tout temps, avec la mise en place d'une deuxième vis suite au débridement, comme il est souvent nécessaire cliniquement afin de stabiliser les segments osseux générés par une fracture. Des évidences macroscopiques, radiographiques et bactériologiques d'ostéomyélite ont été observées chez tous les chiens des groupes B, C et D à la semaine 4.

L'intensité équivalente des lésions chez tous les animaux des différents groupes a démontré une bonne reproductibilité du modèle développé dans ce projet. Ainsi, ce modèle a permis d'évaluer les implants ARTEA-CFX. En effet, à la semaine 4, les groupes B, C et D ont pu jouer le rôle de témoin avec une bonne fiabilité pour l'évaluation du traitement préventif des implants ARTEA-CFX du groupe A. De façon similaire, la comparaison entre les différents traitements curatifs (groupes B, C et D) a pu être établie de manière fiable à la semaine 10. De plus, le modèle expérimental mis au point dans ce projet pourra servir dans le futur à évaluer d'autres médicaments ou protocoles de traitement de l'ostéomyélite.

Par contre, le modèle ne peut pas reproduire les situations cliniques qui présentent un compromis vasculaire ou un dommage extensif aux tissus mous comme c'est le cas lors de fractures ouvertes. Puisqu'un dommage aux tissus mous est difficile à reproduire en conditions expérimentales, notre modèle a plutôt été réalisé avec un dommage cortical standard (généralisé par le forage) et la présence d'un corps étranger métallique afin d'établir une infection. Des cas cliniques sont présentement suivis après traitement avec des implants ARTEA-CFX afin de les évaluer dans ces situations où la

vascularisation anormale et les traumatismes aux tissus mous pourraient changer leur efficacité.

La présence de bactéries en périphérie de l'os n'est pas suffisante pour causer une infection. Les bactéries doivent adhérer aux tissus de l'hôte afin de pouvoir causer des dommages, or un tissu normal fournit très peu de sites possibles pour cette adhérence.¹⁰⁶ C'est pourquoi les modèles animaux demandent invariablement une forme de dommage à l'os, soit mécanique (fracture, fenêtre, fraise rotatoire dans la cavité médullaire), chimique (agent sclérosant), ou l'insertion d'un corps étranger (aiguille, cerclage, vis, PMMA) afin d'établir de manière répétable une ostéomyélite.¹⁰⁶ Notre modèle se compare favorablement à d'autres modèles où diverses stratégies ont été utilisées: aiguilles 16-gauge pré-colonisées avant implantation,⁷⁴ trauma métaphysaire à la fraise rotatoire et cerclage 30-gauge,⁹⁹ utilisation de morrhuate de sodium 5% comme agent sclérosant,²⁴ et trauma métaphysaire à la fraise rotatoire et cylindre de PMMA.⁴³ Pour chacun des modèles, incluant le nôtre, le taux d'induction d'ostéomyélite était de 100%, sauf pour celui de Cornell et coll qui rapportent une induction réussie chez 39 chiens sans rapporter le nombre de cas initialement inoculés.^{24,43,74,99} L'utilisation de corps étrangers pré-colonisés comme l'ont fait Monzon et coll présente l'avantage de standardiser la formation de biofilms en surface des corps étrangers avant de les utiliser comme *inoculum* dans un modèle d'ostéomyélite.⁷⁴ Le morrhuate de sodium a longtemps été utilisé comme agent sclérosant, entre autres dans le modèle de Norden et ses modifications, afin d'augmenter l'importance du compartiment avasculaire et ainsi augmenter les chances de développement de lésions osseuses.²⁴ Le manque de ressemblance à la réalité clinique a été reproché aux modèles utilisant cet agent sclérosant,²⁴ expliquant pourquoi nous avons décidé de le laisser de côté lors de l'élaboration de notre modèle.

Dans le cas où ce modèle devrait être reproduit, il serait peut-être préférable d'en augmenter légèrement la sévérité. Une augmentation de la quantité de bactéries présentes dans l'*inoculum* et l'utilisation d'une vis de plus grand diamètre devraient

être considérées. Étant donné la sévérité légère à modérée des lésions induites dans le modèle actuel, il est effectivement incertain qu'un compartiment avasculaire ait vraiment été présent. Il faut par contre être prudent avec une augmentation de sévérité d'un tel modèle. Une perte de reproductibilité du modèle et des effets secondaires trop importants pour les sujets peuvent en découler. Lors d'un projet pilote chez des chiens Beagle, un modèle de fenêtre osseuse fémorale avec mise en place d'une vis corticale a été développé, avec un *inoculum* de 1×10^8 cfu de *S. aureus*.³⁴ Des complications telles que fracture de fémur, œdème excessif du membre et septicémie ont été rencontrées chez certains patients.³⁴ La création d'une fracture, stabilisée ou non, entraîne des lésions vasculaires au niveau de la cavité médullaire et du périoste qui sont plus importantes que le simple forage d'un trou, et contribue à augmenter la sévérité des lésions causées par le processus infectieux. Outre une augmentation de la sévérité du modèle, une augmentation de la surface disponible à la formation d'un biofilm par mise en place d'une petite plaque vissée pourrait aussi être envisagée afin de ressembler davantage à l'ostéosynthèse de fractures instables rencontrées cliniquement.

2. Prophylaxie avec les implants ARTEA-CFX

Dans notre étude, l'absence de signes radiographiques, macroscopiques ou histologiques d'inflammation de l'os ou des tissus mous environnants chez tous les chiens du groupe A (traitement préventif) a significativement démontré l'efficacité préventive des implants ARTEA-CFX. Les adhérences des tissus mous remarquées à la semaine 10 étaient minimales, significativement inférieures à celles des autres groupes, et ont été attribuées aux conséquences de la procédure chirurgicale à ce site. Étonnamment, une culture positive a été recensée chez un chien du groupe A à la semaine 10. Par contre, le compte bactérien était bas et des signes correspondants d'ostéomyélite n'ont pas été observés à l'histopathologie. Un petit nombre de bactéries pourrait avoir été présent à l'interface vis/os, et une ostéomyélite aurait pu s'y développer si plus de temps avait été accordé avant la nécropsie. La raison pour laquelle il n'y avait pas de signes correspondants d'ostéomyélite à l'examen

microscopique pourrait aussi s'expliquer par la faible sensibilité de l'histopathologie dans l'évaluation de cette condition.¹³ L'histopathologie est par contre très spécifique, justifiant tout de même son utilisation. Une légère réaction endostée et/ou périostée très localisée pourrait avoir été manquée si elle avait été débridée lors de la prise de l'échantillon de bactériologie ou si les sections osseuses de 5 µm choisies lors de la préparation des lames n'étaient pas affectées.

Peu d'études expérimentales ont évalué l'efficacité préventive d'un SLC, alors qu'ils sont en fait souvent utilisés pour remplir cette fonction. Nos résultats expérimentaux se comparent à l'étude de Fitzgerald.⁴⁰ En utilisant du PMMA imprégné de gentamicine, 9 tibias sur 10 exposés à une souche de *S. aureus* en présence d'un corps étranger étaient exempts d'ostéomyélite à la fin du projet.⁴⁰ Dans une revue sur le PMMA écrite par Wininger et Fass, on rapporte que des billes de PMMA imprégnées de gentamicine ont aussi déjà permis de prévenir des infections expérimentales à *S. aureus*, *Streptococcus* spp. et certaines gram-négatives dans des tibias de rats.^{38,110} Wininger et Fass rapportent aussi les résultats d'une autre étude expérimentale où la prévention d'infections à *S. aureus* et *Escherichia Coli* dans des fémurs de lapins s'est effectuée avec succès.^{89,110} Malgré l'efficacité préventive expérimentale des implants ARTEA-CFX, il reste à les soumettre à une série prospective de cas cliniques en comparaison avec une prophylaxie systémique afin de confirmer leur utilité clinique.

Des résultats variables ont été obtenus au cours des dernières années lors de comparaisons de stratégies cliniques de prophylaxie (locale vs systémique vs combinée), préservant ainsi le doute quant à la supériorité d'une des stratégies. Une étude clinique prospective, multicentrique, contrôlée sur 10 ans concernant 1688 cas de prothèse totale de hanche chez l'homme, n'a rapporté aucune différence dans les taux d'infection (1,6 vs 1,1%) ou de descellement aseptique (55 vs 50%) lorsque du PMMA imprégné de gentamicine était utilisé en prophylaxie versus des pénicillines ou céphalosporines par voie systémique, respectivement.⁵⁴ Les mêmes auteurs avaient publié un rapport préliminaire de la même série de cas cliniques à mi-terme de l'étude,

soit à 5 ans, avec un contraste de résultats intéressant: une différence significative des taux d'infection (1,9 vs 0,8%) était présente entre les groupes de traitement local versus systémique à ce moment.⁵³ La réduction et/ou l'arrêt d'élution antibiotique à partir du PMMA dans le temps ainsi que le développement d'infections par voie hématogène et le diagnostic de cas d'infections latentes pourraient expliquer ce changement de résultats entre 5 et 10 ans. Dans une autre étude rétrospective sur 1085 cas de fractures multiples ouvertes, les taux d'infections étaient significativement inférieurs dans le groupe implanté avec un composé PMMA-gentamicine par rapport au groupe recevant une antibioprophylaxie systémique (3,7 vs 12%). Cette différence était encore plus marquée (6,5 vs 20,6%) chez les patients avec des lésions sévères aux tissus mous et compromis vasculaires.⁸⁴ Une différence dans les approches chirurgicales des déficits tissulaires, dans les protocoles d'antibioprophylaxie systémiques et l'absence de distribution aléatoire des cas ont toutefois été reconnues par les auteurs. Suite à ces résultats, il serait raisonnable d'assumer que l'antibioprophylaxie par voie locale avec un SLC est supérieure à celle par voie systémique, mais une étude prospective distribuée de façon aléatoire serait nécessaire afin de confirmer hors de tout doute cette hypothèse. Par contre, considérant les bas taux d'infection qui sont actuellement rapportés suite à l'amélioration des techniques chirurgicales, une telle étude demanderait un nombre extrêmement élevé de patients afin d'atteindre une différence significative entre les stratégies de prophylaxie.^{104,110}

3. Effet du débridement chirurgical

La réduction des comptes bactériens de la semaine 4 à la semaine 10 chez les chiens du groupe B témoin positif s'explique principalement par un débridement chirurgical efficace. Cette observation rejoint la théorie soutenant que la qualité du débridement chirurgical est le facteur le plus critique au succès du traitement de l'ostéomyélite chronique.^{103,106} Un débridement chirurgical adéquat peut diminuer le compte bactérien présent dans l'os et faciliter la clairance par le système immunitaire.^{83,92,97} Les prélèvements d'échantillons de bactériologie à l'aide de la tréphine de Michele et

L'utilisation de l'élévateur de Freer ont permis de retirer une grande proportion de la zone macroscopiquement affectée à la semaine 4. Le débridement était toujours débuté avec la tréphine de Michele servant à l'échantillonnage bactériologique, laissant ainsi un déficit standard reproductible de 8 mm dans le cis-cortex et la diaphyse fémorale, correspondant au diamètre externe de la tréphine. L'élévateur de Freer était ensuite utilisé pour s'assurer qu'aucun tissu avasculaire ne persistait au site infecté avant la fermeture. Un effet de réduction des comptes bactériens par la simple utilisation du débridement a déjà été rapporté, entre autres par Itokazu et coll.⁴⁹ De concert avec cette étude et avec les recommandations de plusieurs autres auteurs^{16,22,28,49,52,56,69,72,92}, nos résultats supportent donc une fois de plus l'importance d'un débridement chirurgical agressif dans le traitement de l'ostéomyélite chronique.

4. Bactériologie

À première vue, la diminution des comptes bactériens dans tous les groupes de la semaine 4 à la semaine 10 masque un effet significatif des deux traitements avec la CFX. Le débridement ayant diminué les comptes bactériens chez le groupe témoin positif, il a sûrement aussi participé à la diminution des comptes chez les groupes C et D. Par contre, les différences significatives entre les groupes C et D vs B (témoin) aux évaluations macroscopiques (guérison osseuse, réaction périostée, adhérences et mobilité de la vis), radiographiques (lyse et guérison osseuses) et histopathologiques (infiltrations neutrophiliques et lymphoplasmocytiques du périoste et de la cavité médullaire) nous confirment qu'il y a bel et bien un effet des traitements dans ces groupes C et D.

En analysant le graphique des résultats de bactériologie (Figure 15, page 82), il ne faut pas oublier que les moyennes des comptes bactériens ont été calculées à partir des animaux positifs seulement étant donné le petit nombre de chiens par groupe. Il faut donc aussi tenir compte du pourcentage d'éradication de l'infection de chacun des

sites/traitements (qui est inscrit au dessus de chacune des colonnes du graphique) afin d'analyser la totalité des données du graphique renseignant sur l'effet des traitements.

Pour les comptes bactériens, voici les informations à ressortir de ce graphique:

- Les comptes ont significativement diminués dans les groupes B, C, et D de la semaine 4 à la semaine 10 (voir effet du débridement).
- À la semaine 10, les comptes du groupe A et du groupe C au site distal étaient significativement inférieurs au groupe B. Ceci supporte un effet traitement des groupes A et C.
- Même si la réduction des comptes étaient équivalente pour les groupes B, C et D de la semaine 4 à la semaine 10, une tendance ($p=0,12$) vers une réduction plus importante des comptes a été notée pour les groupes C et D.
- Sans atteindre de signification statistique, on remarque que les comptes du groupe D étaient plus élevés que dans les groupes B et C à la semaine 4, pour terminer à égalité à la semaine 10.

Pour les pourcentages d'éradication de l'infection par site, voici les informations à ressortir de ce graphique:

- Pour les infections osseuses du groupe témoin, 2/8 (25%) sites proximaux et 1/8 (12%) sites distaux ont été éradiquées (voir effet du débridement).
- Un pourcentage de 75% d'éradication de l'infection a été observé au site distal du groupe D, atteignant une différence significative avec le groupe B témoin. Ceci supporte un effet traitement du groupe D.
- Sans atteindre de signification statistique, ni de p suffisant pour être appelé une tendance, on remarque tout de même des patrons d'éradication différents pour chacun des groupes: B (25/12%), C (37/62%) et D (62/75%). Un plus grand nombre de sujets par groupe aurait pu aider à clarifier la signification de cette observation.

5. Traitement curatif avec les implants ARTEA-CFX

En présence d'une ostéomyélite établie, il a donc été démontré dans cette étude que les implants ARTEA-CFX et la CFX orale ont une efficacité curative similaire. Après l'administration orale de CFX à raison de 10 mg/kg q12h chez le chien, la C_{max} rapportée est de 1,55 mg/L.¹ Ce régime de traitement canin utilisé dans notre étude correspond à la dose conventionnelle de 500 mg q12h ($C_{max} = 1,5 - 2,8$ mg/L) utilisée chez l'homme.⁶⁴ Avec une efficacité similaire des implants ARTEA-CFX et de la CFX orale dans notre modèle canin, il est raisonnable d'assumer que les implants d'ARTEA pourraient être un SLC efficace chez l'humain.

Des résultats équivalents sont rapportés entre autres avec l'hydroxyapatite et le PLA-PLG dans le traitement d'ostéomyélites expérimentales à *S. aureus*.^{79,92} Dans l'une de ces études, aucune différence significative n'a été trouvée entre les groupes traités par vancomycine systémique vs hydroxyapatite calcique chargée de vancomycine.⁹² Par contre, l'échantillonnage limité (n=8/groupe) pourrait avoir limité l'obtention de différence significative, tout comme dans notre étude. À l'opposé, plusieurs autres études expérimentales prouvent qu'une différence de l'efficacité curative existe entre un traitement systémique et un traitement local.^{17,72,99} D'autres études seraient donc nécessaires en présence d'ostéomyélite plus sévère afin de comparer un traitement avec implants ARTEA chargés d'antibiotiques à un traitement systémique. En effet, leurs efficacités pourraient se différencier suite à la présence accrue de tissus et de compartiments avasculaires.

Même si les avantages des SLC sont bien reconnus, les approches thérapeutiques cliniques combinent souvent un SLC et une antibiothérapie systémique,⁷² cette combinaison ayant déjà été rapportée comme étant supérieure à une voie unique d'administration par certains auteurs.^{20,39,84,110} L'addition d'un groupe recevant un traitement local et systémique aurait donc pu être planifiée dans notre étude afin de vérifier l'efficacité de cette approche encore utilisée cliniquement.

6. Avantages/désavantages des SLC

Par rapport au traitement par voie systémique, le traitement par implant apporte une meilleure tolérance au traitement. Lors d'un traitement oral à long terme, il arrive fréquemment que des comprimés ne soient pas administrés soit par oubli du propriétaire, soit par manque de coopération de l'animal. Ce problème est évité avec l'utilisation d'un SLC.

De plus, les coûts de traitement peuvent être réduits avec l'utilisation d'un SLC (selon le coût du SLC). Ceci est relié à la quantité d'antibiotique nécessaire à un traitement. Dans le groupe D de notre étude, une dose totale de 320 mg de CFX a été administrée localement en comparaison avec 7000 mg administrés par voie orale chez les chiens du groupe C.

La libération contrôlée d'antibiotiques permet d'éviter les pics et creux des concentrations sériques associées à l'administration conventionnelle de doses orales répétées.^{3,16,27,45,55,56,73,101} Avec une distribution locale, la toxicité et les effets secondaires possibles sont minimisés en diminuant les concentrations sériques en antibiotiques et l'efficacité du traitement peut être améliorée suite à l'obtention de concentrations locales très élevées et soutenues.^{2,27,28,31,32,43,45,55,56,60,72,87,92,99,101} Certains systèmes comme l'hydroxyapatite et le sulfate de calcium offrent aussi des propriétés d'ostéoconduction/induction.

Les désavantages des SLC biorésorbables sont souvent reliés aux coûts de leur production qui les rend peu accessibles à une utilisation régulière, particulièrement en milieu vétérinaire. Aussi, même si la majorité de ces SLC sont minimalement réactifs, certains peuvent causer de légères réactions inflammatoires et affecter des composantes de la réponse immunitaire (protéines de la cascade du complément, lymphocytes périphériques, fonction cellulaire des polymorphonucléaires).^{45,101} Par contre, ces effets sont nominaux et n'ont jamais présenté de conséquences cliniques.^{45,101}

Finalement, la possibilité de décharge excessive de composé actif suite à un bris d'implants est une complication possible de l'utilisation des SLC.²⁷ Lorsque le ratio surface/volume des implants est subitement multiplié par une fragmentation accidentelle, une libération accrue de composé actif peut mener à des taux plasmatiques dépassant les taux maximaux sécuritaires, et ainsi résulter en effets secondaires toxiques respectifs au composé libéré.²⁷

7. L'ARTEA comme biomatériau

Une excellente biocompatibilité de l'ARTEA a été démontrée chez des rats et souris.^{31,32} Au jour 3 après une implantation sous-cutanée chez des souris, la réponse inflammatoire était moins sévère autour des implants qu'autour de l'incision cutanée.³² La réponse inflammatoire tissulaire est restée très focale et était semblable dans tous les tissus implantés.³¹ Dans la présente étude, la similitude de réaction périostée entre les groupes de traitement oral et par implant souligne une bonne biocompatibilité des implants ARTEA chez le chien. D'autres avantages de ce nouvel excipient incluent un coût abordable, sa biodégradabilité, une technologie de production industrielle déjà accessible et une concentration élevée possible de l'agent actif dans la matrice.^{32,63} Cette dernière caractéristique permet la production de petits implants, ce qui est utile dans l'approche de patients vétérinaires comme les espèces canines et félines. Aussi, une augmentation de la concentration de CFX dans les implants résulte en une libération graduelle de l'antibiotique dans le temps³³, minimisant ainsi l'amplitude du pic de relâche initial qui mène à une libération bimodale dans plusieurs systèmes.^{27,60,87,101,110} La transformation rapide de l'implant en un gel semble être un paramètre clé dans le contrôle du pic initial de relâche.³⁰ Ces implants à base d'amidon sont aussi caractérisés par une érosion et un gonflement minimaux.³⁰ En comparant avec d'autres biomatériaux comme l'hydroxyapatite et le sulfate de calcium, l'ARTEA a par contre le désavantage de ne pas fournir de propriétés d'ostéoconduction et de soutien mécanique participants à la guérison d'une fracture.

Une néovascularisation et de fins *septa* fibreux subdivisent éventuellement les implants d'ARTEA qui sont ensuite progressivement phagocytés par des macrophages.³² Les macrophages forment une composante majeure de la réponse de l'hôte à une implantation d'ARTEA.^{31,32,33,35} De plus, une étude expérimentale a démontré que la présence de leucocytes polymorphonucléaires joue un rôle important dans le contrôle de la phase initiale d'infections à *S. aureus*.^{106,108} D'autres études seraient donc intéressantes pour déterminer si la forte concentration locale de macrophages qui fait suite à l'implantation d'ARTEA a un effet ou non sur le contrôle de la phase initiale d'une contamination à *S. aureus*.

Dans notre étude, la concentration maximale sérique moyenne atteinte a été de $0,428 \pm 0,96 \mu\text{g/mL}$ au jour 7 après implantation chez les chiens du groupe A, ce qui est largement inférieur au $1,55 \text{ mg/mL}$ rapporté par Abadia et coll¹ suite à une administration orale de CFX chez le chien. Ensuite, les concentrations sont rapidement descendues à $0,038 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$ au jour 10 et elles sont restées largement sous la CMI de la souche de *S. aureus* utilisée jusqu'à la fin du projet. La question du développement de résistance suite à la présence de taux sous-CMI peut alors se poser, et un paragraphe à ce sujet suivra à la fin de cette discussion.

La concentration osseuse de CFX à la semaine 10 était sous le seuil de détection dans tous les échantillons. Ce résultat élimine la possibilité d'une action rémanente de la CFX dans les échantillons osseux soumis en analyse bactériologique. Étant donné l'absence de CFX dans l'os à la semaine 10, il est donc très peu probable que le compte bactérien n'ait été faussement diminué pendant les jours suivants l'échantillonnage lors des manipulations de l'échantillon. Comme mentionné précédemment, les concentrations osseuses de CFX ont déjà été mesurées en excès de la CMI pour *S. aureus* pendant au moins 28 jours avec des implants à 20% de CFX chez des lapins.³³ Dans notre étude, les fémurs ont été récoltés 42 jours après le traitement avec les implants. Il est donc probable que les concentrations osseuses en CFX soient lentement descendues sous le seuil mesurable entre le jour 28 et le jour 42.

Le temps d'élution de la CFX à partir de l'ARTEA se compare bien aux temps d'élution du même antibiotique à partir d'autres matrices prometteuses comme l'hydroxyapatite et le PLGA. Des concentrations osseuses de CFX supérieures à la CMI de la majorité des agents responsables d'ostéomyélite ont été détectées pendant 4 semaines avec un composé d'hydroxyapatite.¹⁸ Une formulation de PLGA 50:50 a permis d'atteindre des taux osseux de CFX supérieurs à la CMI de *S.aureus* pour une durée de 5 à 6 semaines.⁸⁷ Par contre, il est important de mentionner que ces implants PLGA 50:50 étaient placés intra-osseux vs péri-osseux pour les implants d'ARTEA, et qu'aucun *inoculum* bactérien n'était utilisé.

8. Particularités diagnostiques

Les sensibilité et spécificité de la radiographie et de l'histopathologie ont déjà été évaluées à 62,5/57,1% et 33,3/86,3%, respectivement, dans le diagnostic d'une ostéomyélite expérimentale lorsque des isollements bactériens positifs étaient utilisés comme méthode standard.¹³ Une des limites de cette étude se trouvait dans le petit nombre de patients par groupe, ce qui dicte une certaine prudence dans l'interprétation des résultats. Aussi, une autre étude rapporte des taux de cultures positives variables lors de cas cliniques confirmés d'ostéomyélite, questionnant ainsi la précision de la bactériologie comme méthode standard.²⁸ Les limites inhérentes à chacune des méthodes d'évaluation témoignent de l'impossibilité d'utiliser une technique diagnostique unique dans l'investigation d'ostéomyélite. Pour tenter de réduire la possibilité d'erreur et pour respecter l'approche clinique, nos diagnostics de guérison ou de changement de sévérité des ostéomyélites ont été faits par un clinicien avec les résultats combinés des évaluations macroscopiques, radiographiques, bactériologiques et histopathologiques. L'utilisation de scores quantitatifs combinés est peu applicable aux situations cliniques suite aux nombreuses présentations possibles de cette condition. Un clinicien sera donc toujours nécessaire, pouvant mettre en perspective l'ensemble des résultats, afin de poser un diagnostic ajusté.

Des mesures des titres d'IgG pour *S. aureus* ont déjà aussi été étudiées comme indices pour évaluer la présence ou progression d'ostéomyélites causées par cet agent.^{50,90} Dans une de ces études, les changements des titres d'IgG pour *S. aureus* ont clairement suivi le cours des observations macroscopiques, radiographiques et histopathologiques des cas étudiés.⁹⁰ Ces titres n'ont pas été mesurés dans notre étude, mais constituent une autre méthode efficace et non invasive aidant au diagnostic et au suivi d'infections osseuses à *S. aureus*.

9. Toxicité des quinolones sur le cartilage

L'effet toxique des fluoroquinolones sur le cartilage articulaire, comme la mort des chondrocytes et la dégénérescence de la matrice, a été décrit dans un certain nombre d'études récentes.^{5,58,61} Il a déjà été prouvé que des concentrations sériques thérapeutiques de CFX inhibent la guérison de fractures expérimentales minimalement instables, mais seulement lors des trois premières semaines de guérison où il y a formation d'un cal cartilagineux.⁴⁸ Il est évident que le contrôle des infections est important afin de permettre la guérison osseuse, et il est admis que ce contrôle sur l'infection l'emporte sur le désavantage d'une interférence transitoire avec la guérison par cal cartilagineux causée par l'utilisation de la CFX.⁴⁸ Dans notre étude, les implants d'amidon chargés de CFX ont permis une guérison osseuse au moins équivalente à l'administration systémique de CFX.

10. Différences entre les sites proximal et distal

La réaction périostée et la neutrophilie légèrement plus importantes au site distal vs proximal, indépendamment du groupe de traitement, pourrait être expliquée par la présence de la vis métallique et de son biofilm. Même si le traitement local ou systémique de CFX a été débuté au même moment où cette vis distale a été insérée, la formation d'un biofilm à la surface de cette vis est très probable. Une étude *in vivo* a évalué la formation de biofilm à la surface de billes de PMMA imprégnées de

gentamicine.¹⁰⁷ Un biofilm s'est formé en surface de toutes les billes de PMMA, avec un maximum de colonies retrouvé entre 24 et 30 heures post implantation, malgré la relâche d'antibiotiques. L'établissement rapide d'un biofilm pourrait aussi participer à l'explication d'un site de culture positif dans le groupe A préventif. Par contre dans ce cas particulier, aucun signe microscopique d'inflammation n'a pu être mis en évidence. Une étude histopathologique de biofilm aurait donc été intéressante afin de compléter l'étude de ce site distal.

11. Résistance bactérienne

La résistance bactérienne est un sujet sans fin entourant l'utilisation locale et systémique d'antibiotiques. Dans notre étude, *S. aureus* a été choisi pour produire un modèle d'ostéomyélite fiable et reproductible parce que cette bactérie a été utilisée comme standard dans plusieurs études.^{40,43,49,74,78,79,85,92,99} Néanmoins, la résistance aux quinolones est devenue inquiétante parmi les souches cliniques de *S. aureus* aux États-Unis et dans plusieurs autres pays.^{66,74,80} La souche utilisée dans notre étude a donc été sélectionnée sensible à la CFX afin de permettre une évaluation fiable des implants à base d'ARTEA dans la prévention et le traitement d'une ostéomyélite expérimentale. Ensuite, une question se pose en ce qui concerne le patron de résistance d'une souche responsable d'une infection lors d'un traitement avec un SLC : est-ce qu'une souche caractérisée résistante suite à un test de diffusion sur gélose l'est vraiment lorsqu'en présence de concentrations antibiotiques extrêmement élevées atteintes avec un traitement local? Des mesures de concentrations minimales bactéricides (CMB) en plus des CMI pourraient aider à répondre à cette question. Aussi, d'autres antibiotiques pourraient éventuellement être intégrés et évalués dans la matrice d'ARTEA afin de permettre le traitement ciblé de souches cliniques responsables d'ostéomyélite.

Comme lors de traitement systémique aux antibiotiques, le développement de résistance avec l'utilisation de SLC peut aussi être suspecté. Nous n'avons pas évalué

la sensibilité et résistance des souches bactériennes récupérées dans notre étude car cela dépassait nos objectifs. Par contre, il semble peu probable que la résistance puisse se développer localement étant donné la présence d'une concentration élevée et soutenue d'antibiotique qui permet la pénétration de tissus dévascularisés et de biofilms. Il semble plus probable qu'une résistance puisse se développer dans des flores distantes au site traité avec un SLC, puisque les concentrations sériques ainsi engendrées restent sous les CMI pendant une période de temps prolongée. Par contre, il est encore incertain si ces concentrations sériques largement inférieures à la CMI d'une bactérie engendrent ou non le développement de résistance. Malheureusement, des études concernant l'évolution de la sensibilité/résistance de souches bactériennes suite à l'utilisation de SLC manquent à la littérature scientifique. Ainsi, il serait très utile de planifier une étude visant à évaluer l'évolution de la sensibilité/résistance de souches bactériennes pathogènes causant une infection osseuse et de souches bactériennes faisant partie de flores normales distantes (nasale, orale, rectale, cutanée) pendant des traitements antibiotiques à long terme par voie orale et avec SLC. L'acquisition de telles informations pourrait nous aider à évaluer le ratio risque/bénéfice de l'utilisation des SLC en situation clinique.

12. Suivi préliminaire de cas cliniques

Deux chiens atteints d'ostéomyélite ont été débridés chirurgicalement, traités avec des implants ARTEA-CFX, et ont été suivis sur une période minimale de 6 mois. Le premier patient était atteint d'une ostéomyélite faisant suite à une fracture ouverte du radius distal qui avait été stabilisée avec un fixateur externe bilatéral uniplanaire. Deux mois après la stabilisation chirurgicale de la fracture, une infection mixte par un *Enterococcus*, un *Peptostreptococcus* et une souche de *S. aureus* résistante à la (SARM) a été diagnostiquée d'un séquestre osseux retiré lors du débridement chirurgical. De ces trois bactéries, seul le SARM était sensible à la CFX. Suite au débridement, une greffe d'os spongieux a été placée dans le déficit laissé par le débridement, 11 implants ARTEA-CFX ont été placés autour de la zone affectée, et

l'appareil de fixation externe a été modifié en un hybride Ilizarov et bilatéral uniplanaire. Deux mois et demi après ce traitement, l'appareil de fixation a été retiré suite à une guérison quasi complète de la fracture. Plus d'un an après le retrait du fixateur externe hybride, ce patient ne présente aucune boiterie et mène une vie normale. La contribution des implants ARTEA-CFX à la guérison reste toutefois difficile à définir. En effet, on peut se demander qu'est-ce qui a le plus participé à la guérison entre la greffe d'os spongieux massive, l'antibiothérapie systémique appropriée (triméthoprim/sulfa et métronidazole) ou les implants amidonnés chargés de CFX.

Le deuxième patient présentait une ostéomyélite de l'ulna distal reliée à une morsure. Une souche de *Corynebacterium* et une bactérie anaérobie stricte gram-négative non identifiable, mais différente de *Bacteroides fragilis*, ont été isolées d'une réaction périostée excessive débridée chirurgicalement. Le *Corynebacterium* était sensible à la CFX. Dix-huit implants ARTEA-CFX ont été placés autour de l'ulna avant la fermeture, et aucune stabilisation chirurgicale n'a été jugée nécessaire étant donné un radius intact. Une antibiothérapie systémique de métronidazole a aussi été instaurée afin de traiter l'anaérobie. Un drainage de plaie dans les jours suivants la chirurgie a subjectivement laissé sortir une certaine concentration de CFX, mais ce drainage a été de très courte durée. Six mois après cette chirurgie, ce patient était exempt de boiterie et d'autres signes d'ostéomyélite.

13. Voies futures

La matrice d'ARTEA pourrait éventuellement être étudiée avec d'autres antibiotiques afin de permettre au vétérinaire ou médecin traitant de s'ajuster à la sensibilité de la souche bactérienne responsable de l'infection à traiter. Aussi, d'autres principes actifs pourraient être intégrés à l'ARTEA pour atteindre des objectifs différents. Un analogue du facteur de relâche humain de l'hormone de croissance a déjà été intégré dans l'ARTEA et a permis de faire augmenter de façon significative les taux de

facteur de croissance insulino-mimétique I (IGF-I) chez des porcs.³² Cette augmentation des taux de IGF-I a déjà été associée à une meilleure qualité de carcasse chez des animaux de consommation.³² Ensuite, des protéines osseuses morphogéniques (BMP) comme la BMP-2 et la BMP-7 pourraient être libérées localement en périphérie de fractures ou d'autres déficits osseux afin d'en accélérer la guérison. Une telle utilisation des implants ARTEA pourrait remplacer la traditionnelle greffe d'os spongieux, qui est morbide chez l'humain, si elle s'avérait efficace. Dans la même lignée de pensée, des agents chimiothérapeutiques pourraient être inclus dans la matrice afin de permettre un traitement local de certains cancers et de limiter les effets adverses associés à ces agents. Aussi, de l'érythropoïétine ou de l'insuline en libération graduelle et soutenue pourrait permettre d'éviter des injections répétées chez des patients insuffisants rénaux ou diabétiques.

II. Conclusion

En conclusion, l'utilisation des implants ARTEA-CFX a été une alternative sécuritaire et efficace pour la prévention et le traitement de l'ostéomyélite développée dans notre modèle expérimental. L'utilisation judicieuse de ces implants en situation de risque comme lors de la réduction de fractures ouvertes, lors de la mise en place de remplacements prothétiques ou lors de l'utilisation d'allogreffes corticales pourrait aider à réduire les taux d'infection. Aussi, le traitement d'ostéomyélites déjà établies pourrait se faire avec une implantation faite au moment du débridement chirurgical nécessaire au traitement de l'ostéomyélite chronique post-traumatique, sans ensuite avoir besoin de procéder à une deuxième procédure chirurgicale pour le retrait des implants.

BIBLIOGRAPHIE

1. Abadia AR, Aramayona JJ, Munoz MJ et coll: Ciprofloxacin pharmacokinetics in dogs following oral administration. *Zentralbl Veterinarmed A* 42(8):505-11, 1995.
2. Aimin C, Chunlin H, Juliang B et coll: Antibiotic loaded chitosan bar. An *in vitro, in vivo* study of a possible treatment for osteomyelitis. *Clin Orthop* 366:239-247, 1999.
3. Allababidi S, Shah JC : Efficacy and pharmacokinetics of site-specific cefazolin delivery using biodegradable implants in the prevention of post-operative wound infections. *Pharm Res* 15:325-333, 1998.
4. Artursson P, Edman P, Ericsson JL : Macrophage stimulation with some structurally related polysaccharides. *Scand J Immunol* 25:245-254, 1987.
5. Bendele AM, Hulman JF, Harvey AK et coll: Passive role of articular chondrocytes in quinolone-induced arthropathy in guinea pigs. *Toxicol Pathol* 18:304-312, 1990.
6. Benoit MA, Mousset B, Delloye C et coll: Antibiotic-loaded plaster of Paris implants coated with poly lactide-co-glycolide as a controlled release delivery system for the treatment of bone infections. *Int Orthop* 21:403-408, 1997.
7. Björk E, Bjurström S, Edman P : Morphologic examination of rabbit nasal mucosa after nasal administration of degradable starch microspheres. *Int J Pharm* 75:73-79, 1991.

8. Bowyer GW, Cumberland N: Antibiotic release from impregnated pellets and beads. *J Trauma* 36(3):331-335, 1994.
9. Braden TD : Fracture documentation. *Dans Proceedings of the Veterinary Orthopedic Society Meeting*, 1987.
10. Braden TD: Post-traumatic osteomyelitis. *Vet Clinics of North America* 21, No.4:781-811, 1991.
11. Braden TD, Johnson CA, Gabel CL et coll: Posologic evaluation of clindamycin, using a canine model of posttraumatic osteomyelitis. *AJVR* 48:1101-1105, 1987.
12. Braden TD, Johnson CA, Wakenell P et coll: Efficacy of clindamycin in the treatment of *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in dogs. *JAVMA* 192, No.12:1721-1725, 1988.
13. Braden TD, Tvedten HW, Mostosky UVM et coll: The sensitivity and specificity of radiology and histopathology in the diagnosis of posttraumatic osteomyelitis. *Vet Comp Orthop Traumatol* 3:98-103, 1989.
14. Brown A, Bennett D : Gentamicin-impregnated polymethylmethacrylate beads for the treatment of septic arthritis. *Vet Rec* 123 :625-626, 1988.
15. Butson RJ, Shramme MC, Smith RKS et coll : The use of gentamicin impregnated beads in small tarsal joint infection (abstract). *Vet Surg* 26 :259, 1997.
16. Calhoun JH, Mader JT : Antibiotic beads in the management of surgical infections. *Am J Surg* 157:443-449, 1989.

17. Calhoun JH, Mader JT : Treatment of osteomyelitis with a biodegradable antibiotic implant. *Clin Orthop* 341:206-214, 1997.
18. Castro C, Sánchez E, Delgado A et coll.: Ciprofloxacin implants for bone infection. *In vitro–in vivo* characterization. *J Control Release* 93 :341-354, 2003.
19. Caywood DD, Wallace LV, Braden TD : Osteomyelitis in the dog : A review of 67 cases. *JAVMA* 172 :943-946, 1978.
20. Chen NT, Hong HZ, Hooper DC et coll : The effect of systemic antibiotic and antibiotic-impregnated polymethylmethacrylate beads on the bacterial clearance in wounds containing contaminated dead bone. *Plast Reconstr Surg* 92:1305-1313, 1993.
21. Chunlin H, Aimin C : Experimental study of chitosan in preventing bone infection. *Chin J Rep Reconstruct Surg* 10 : 176-179, 1996.
22. Cierny GI, Mader JT : Management of adult osteomyelitis. *Dans* Evarts CM (ed). *Surgery of the Musculoskeletal System*. Vol 4. New York, Churchill Livingstone 10:15-35, 1983.
23. Coe MR, Fechner RE, Jeffrey JJ et coll : Characterization of tissue from the bone-polymethylmethacrylate interface in a rat experimental model. Demonstration of collagen-degrading activity and bone-resorbing potential. *J Bone Joint Surg Am* 71:863-874, 1989.
24. Cornell CN, Tyndall D, Waller S et coll: Treatment of experimental osteomyelitis with antibiotic-impregnated bone graft substitute. *J Orthop Res* 11:619-626, 1993.

25. Dakhil S, Ensminger W, Cho K et coll : Improved regional selectivity of hepatic arterial BCNU with degradable microspheres. *Cancer* 50:631-635, 1982.
26. Dasgupta MK, Shishido H, Salama S et coll : The effects of macrolide and quinolone antibiotics in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm growth. *Adv Perit Dial* 13:214-217, 1997.
27. Dash AK, Cudworth GC II: Therapeutic applications of implantable drug delivery systems. *J Pharmacol Toxicol Methods* 40:1-12, 1998.
28. Dernell WS. Treatment of severe orthopedic infections : *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 29:1261-1274, 1999.
29. Dernell WS, Withrow SJ, Straw RC et coll. : Clinical response to antibiotic impregnated polymethylmethacrylate bead implantation of dogs with severe infections after limb sparing with allograft replacement-18 cases (1994-1996). *Vet Comp Orthop Traumatol* 11 :94-99, 1998.
30. Désévaux C, Dubreuil P, Lenaerts V : Characterization of crosslinked high amylose starch matrix implants. 1. *In vitro* release of ciprofloxacin. *J Control Release* 82:83-93, 2002.
31. Désévaux C, Dubreuil P, Lenaerts V et coll : Tissue reaction and biodegradation of implanted cross-linked high amylose starch in rats. *J Biomed Mater Res* 63:772-779, 2002.
32. Désévaux C, Girard C, Lenaerts V et coll: Characterization of subcutaneous Contramid implantation: host response and delivery of a potent analog of the growth hormone-releasing factor. *Int J Pharm* 232:119-129, 2002.

33. Désévaux C, Lenaerts V, Girard C et coll: Characterization of crosslinked high amylose starch matrix implants. 2. *In vivo* release of ciprofloxacin. *J Control Release* 82:95-103, 2002.
34. Désévaux C, Lussier B, Lenaerts V et coll: Contramid implants loaded with ciprofloxacin as a local therapy for experimental osteomyelitis in dogs. Affiche présentée au 29ème symposium de « controlled release of bioactive materials » du « controlled release society ». Séoul, Corée, 2002.
35. Desmangles RJ, Flipo D, Fournier M et coll: Fast separation of macrophages by retention on cross-linked amylose and release by enzymatic amyolysis of the chromatographic material. *J Chromatogr* 584:121-127, 1992.
36. Devitt CD, Dernell WS, Withrow SJ et coll: Treatment of severe orthopedic infections with antibiotic impregnated polymethylmethacrylate beads (abstract). *Dans Proceedings of the Veterinary Orthopedic Society Meeting*, p10, 1996.
37. Duval JM, Budsberg SC : Cortical bone concentrations of enrofloxacin in dogs. *Am J Vet Res* 56:188-192, 1995.
38. Elson RA, Jephcott D, McGeachie DB et coll : Bacterial infection and acrylic cement in the rat. *J Bone Joint Surg* 59 :452-457, 1977.
39. Evans RP, Nelson CL : Gentamicin-impregnated polymethylmethacrylate beads compared with systemic antibiotic therapy in the treatment of chronic osteomyelitis. *Clin Orthop* 295:37-42, 1993.
40. Fitzgerald RH Jr : Experimental osteomyelitis: description of a canine model and the role of depot administration of antibiotics in the prevention and treatment of sepsis. *J Bone Joint Surg Am* 65:371-380, 1983.

41. Fossum TW. *Dans* Small Animal Surgery. 2^{ème} édition, Mosby, 2002.
42. Frame EM, Sullivan M, Norris RJ et coll: Metaphyseal osteomyelitis in a Labrador retriever. Vet Rec 144:562-563, 1999.
43. Garvin KL, Miyano JA, Robinson D et coll : Polylactide/polyglycolide antibiotic implants in the treatment of osteomyelitis. A canine model. J Bone Joint Surg Am 76:1500-1506, 1994.
44. Gustilo RB, Anderson JT : Prevention of infection in the treatment of one thousand and twenty-five open fractures of long bones : Retrospective and prospective analyses. J Bone Joint Surg 58A :453-458, 1976.
45. Henry SL, Seligson D, Mangino P et coll: Antibiotic-impregnated beads. Part I: Bead implantation versus systemic therapy. Orthop Rev 20:242-247, 1991.
46. Herman JH, Sowder WG, Anderson D et coll: Polymethylmethacrylate-induced release of bone-resorbing factors. J Bone Joint Surg Am 71:1530-1541, 1989.
47. Holcombe SH, Schneider RK, Bramlage LR et coll. : The use of antibiotic impregnated polymethylmethacrylate in open and infected fractures and arthrodeses (abstract). *Dans* Proceedings of the Veterinary Orthopedic Society Meeting, p13, 1996.
48. Huddleston PM, Steckelberg JM, Hanssen AD et coll : Ciprofloxacin inhibition of experimental fracture healing. J Bone Joint Surg Am 82:161-173, 2000.

49. Itokazu M, Yamamoto K, Yang WY et coll : The sustained release of antibiotic from freeze-dried fibrin-antibiotic compound and efficacies in a rat model of osteomyelitis. *Infection* 25:359-363, 1997.
50. Jacob E, Arendt DM, Brook I et coll : Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Staphylococcus aureus* cell walls in experimental osteomyelitis. *J Clin Microbiol* 22:547-552, 1985.
51. Johansson A, Flock JI, Svensson O: Collagen and fibronectin binding in experimental staphylococcal osteomyelitis. *Clin Orth Rel Res* 382:241-246, 2001.
52. Johnson KA. Osteomyelitis in dogs and cats : *J Am Vet Med Assoc* 204:1882-1887, 1994.
53. Josefsson G, Gudmundsson G, Kolmert L et coll: Prophylaxis with systemic antibiotics versus gentamicin bone cement in total hip arthroplasty. A five-year survey of 1688 hips. *Clin Orthop* 253:173-178, 1990.
54. Josefsson G, Kolmert L : Prophylaxis with systematic antibiotics versus gentamicin bone cement in total hip arthroplasty. A ten-year survey of 1,688 hips. *Clin Orthop* 292:210-214, 1993.
55. Kanellakopoulou K, Galanakis N, Giamarellos-Bourboulis EJ et coll : Treatment of experimental osteomyelitis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a biodegradable system of lactic acid polymer releasing pefloxacin. *J Antimicrob Chemother* 46:311-314, 2000.
56. Kanellakopoulou K, Giamarellos-Bourboulis EJ : Carrier systems for the local delivery of antibiotics in bone infections. *Drugs* 59:1223-1232, 2000.

57. Kanellakopoulou K, Kolia M, Anastassiadis A et coll: Lactic acid polymers as biodegradable carriers of fluoroquinolones : an *in vitro* study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43 :714-716, 1999.
58. Kato M, Onodera T : Morphological investigation of cavity formation in articular cartilage induced by ofloxacin in rats. *Fund and Appl Toxicol* 11:110-119, 1988.
59. Korkusuz F, Atsumasa U, Yoshitaka S et coll: Experimental implant related osteomyelitis treated by antibiotic-calcium hydroxyapatite ceramic composites. *J Bone Joint Surg* 75B :111-114, 1993.
60. Kwok CS, Wan C, Hendricks S et coll: Design of infection-resistant antibiotic-releasing polymers: I. Fabrication and formulation. *J Control Release* 62:289-299, 1999.
61. Lawrence JW, Claire DC, Weissig V et coll: Delayed cytotoxicity and cleavage of mitochondrial DNA in ciprofloxacin-treated mammalian cells. *Molec Pharmacol* 50:1178-1188, 1996.
62. Lenaerts V, Dumoulin Y, Mateescu MA : Controlled release of theophylline from cross-linked amylose tablets. *J Control Release* 15:39-46, 1991.
63. Lenaerts V, Moussa I, Dumoulin Y et coll : Cross-linked high amylose starch for controlled release of drugs: recent advances. *J Control Release* 53:225-234, 1998.
64. Lettieri JT, Rogge MC, Kaiser L et coll: Pharmacokinetic profiles of ciprofloxacin after single intravenous and oral doses. *Antimicrob Agents Chemother* 36(5):993-6, 1992.

65. Lew DP, Waldvogel FA : Use of quinolones in osteomyelitis and infected orthopaedic prosthesis. *Drugs* 58:85-91, 1999.
66. Limoncu MH, Ermertcan S, Cetin CB et coll: Emergence of phenotypic resistance to ciprofloxacin and levofloxacin in methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* strains. *Int J Antimicrob Agents* 21(5):420-4, 2003.
67. Mader JT, Calhoun J : Long bone osteomyelitis : Diagnosis and management. *Hosp Pract* 30 :71-86, 1994.
68. Mader JT, Cripps MW, Calhoun JH: Adult posttraumatic osteomyelitis of the tibia. *Clin Orth Rel Res* 14, No.360, 1999.
69. Mader JT, Ortiz M, Calhoun JH : Update on the diagnosis and management of osteomyelitis. *Clin Podiatr Med Surg* 13:701-724, 1996.
70. Mader JT, Shirliff ME, Bergquist SC et coll: Antimicrobial treatment of chronic osteomyelitis. *Clin Orthop* 360:47-65, 1999.
71. Mader JT, Shirliff M, Calhoun JH: Staging and staging application in osteomyelitis. *Clin Inf Dis* 25:1303-1309, 1997.
72. Mader JT, Stevens CM, Stevens JH et coll : Treatment of experimental osteomyelitis with a fibrin sealant antibiotic implant. *Clin Orthop* 403:58-72, 2002.
73. Miclau T, Dahners LE, Lindsey RW : *In vitro* pharmacokinetics of antibiotic release from locally implantable materials. *J Orthop Res* 11:627-632, 1993.

74. Monzon M, Garcia-Alvarez F, Laclériga A et coll : A simple infection model using pre-colonized implants to reproduce rat chronic *Staphylococcus aureus* osteomyelitis and study antibiotic treatment. J Orthop Res 19:820-826, 2001.
75. Mousset B, Benoit M-A, Delloye C et coll: Biodegradable implants for potential use in bone infection. Int Orthop 19 :157-161, 1995.
76. Muir P, Johnson KA: Anaerobic bacteria isolated from osteomyelitis in dogs and cats. Vet Surg 21, No.6:463-466, 1992.
77. Nagaraju R, Udupa N, Mathew J et coll. : Biodegradable dental implants of ciprofloxacin beta-cyclodextrin inclusion complex in the treatment of periodontitis. Indian J Exp Biol. 37(3):305-7, 1999.
78. Nelson CL, McLaren SG, Skinner RA et coll : The treatment of experimental osteomyelitis by surgical debridement and the implantation of calcium sulfate tobramycin pellets. J Orthop Res 20:643-647, 2002
79. Nie L, Nicolau DP, Tessier PR et coll : Use of a bioabsorbable polymer for the delivery of ofloxacin during experimental osteomyelitis treatment. J Orthop Res 16:76-79, 1998.
80. Nimmo GR, Bell JM, Mitchell D et coll: Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* in Australian teaching hospitals, 1989-1999. Microb Drug Resist 9(2):155-60, 2003.
81. Okamoto Y, Shibasaki K, Minami S et coll : Evaluation of chitin and chitosan on open wound healing in dogs. J Vet Med Sci 57:851-854, 1995.

82. Okamoto Y, Tomita T, Minami S et coll : Effects of chitosan on experimental abscess with *Staphylococcus aureus* in dogs. J Vet Med Sci 57:765-767, 1995.
83. Olmstead ML, Hohn RB, Turner TM : A five-year study of 221 total hip replacements in the dog. J Am Vet Med Assoc 183:191-194, 1983.
84. Ostermann PA, Seligson D, Henry SL : Local antibiotic therapy for severe open fractures. A review of 1085 consecutive cases. J Bone Joint Surg Br 77:93-97, 1995.
85. Owusu-Ababio G, Rogers J, Anwar H : Effectiveness of ciprofloxacin microspheres in eradicating bacterial biofilm. J Control Release 57:151-159, 1999.
86. Petty W : The effect of methylmethacrylate on bacterial phagocytosis and killing by human polymorphonuclear leukocytes. J Bone Joint Surg Am 60:752-757, 1978.
87. Ramchandani M, Robinson D : *In vitro* and *in vivo* release of ciprofloxacin from PLGA 50:50 implants. J Control Release 54:167-175, 1998.
88. Rissing JP : Antimicrobial therapy for chronic osteomyelitis in adults: role of the quinolones. Clin Infect Dis 25:1327-1333, 1997.
89. Rodeheaver GT, Rukstalis D, Bono M et coll: A new model of bone infection used to evaluate the efficacy of antibiotic impregnated polymethylmethacrylate cement. Clin Orth 178 :303-311, 1983.
90. Sasaki S, Ishii Y : Apatite cement containing antibiotics: efficacy in treating experimental osteomyelitis. J Orthop Sci 4:361-369, 1999.

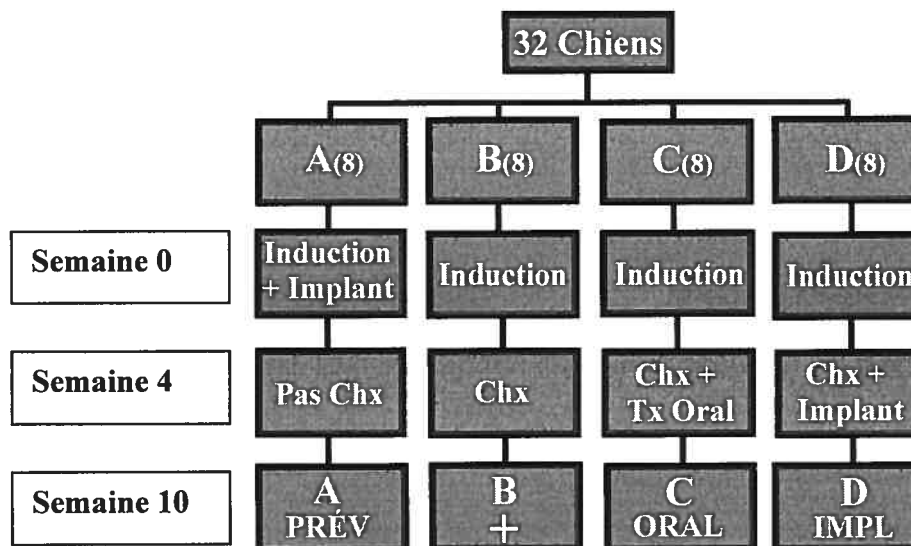
91. Schierholz JM, Beuth J : Implant infections: a haven for opportunistic bacteria. *J Hosp Infect* 49:87-93, 2001.
92. Shirtliff ME, Calhoun JH, Mader JT : Experimental osteomyelitis treatment with antibiotic-impregnated hydroxyapatite. *Clin Orthop* 401:239-247, 2002.
93. Schneider RK, Andrea R, Barnes HG : The use of antibiotic impregnated polymethylmethacrylate for treatment of an open radial fracture in a horse. *JAVMA* 207 :1454-1457, 1995.
94. Siegel S, Castellan NJ : Nonparametric statistics for the behavioral sciences. Boston, McGraw-Hill, 1988
95. Slatter DA. *Dans* Textbook of Small Animal Surgery. 3^{ème} édition, Saunders, 2003.
96. Smith MM, Vasseur PB, Saunders HM: Bacterial growth associated with metallic implants in dogs. *JAVMA* 195, No.6: 765-767, 1989.
97. Soboh F, Khoury AE, Zamboni AC et coll: Effects of ciprofloxacin and protamine sulfate combinations against catheter-associated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 39:1281-1286, 1995.
98. Sokal RR, Rohlf FJ : Biometry : the principles and practice of statistics in biological research. New York, WH Freeman, 1995.
99. Solberg BD, Gutow AP, Baumgaertner MR : Efficacy of gentamicin-impregnated resorbable hydroxyapatite cement in treating osteomyelitis in a rat model. *J Orthop Trauma* 13:102-106, 1999.

100. Stokes ME, Davis CS, Koch GG. Categorical data analysis using the SAS system, second edition. Cary, SAS publications, 2002.
101. Streppa HK, Singer MJ, Budsberg SC : Applications of local antimicrobial delivery systems in veterinary medicine. J Am Vet Med Assoc 219:40-48, 2001.
102. Swalec-Tobias KM, Schneider RK, Besser TE : Use of antimicrobial-impregnated polymethyl methacrylate. JAVMA 208 :841-845, 1996.
103. Tetsworth K, Cierny G 3rd : Osteomyelitis debridement techniques. Clin Orthop 360:87-96, 1999.
104. Trippel SB : Antibiotic-impregnated cement in total joint arthroplasty. J Bone Joint Surg Am 68:1297-1302, 1986.
105. Tsourvakas S, Hatzigrigoris P, Tsibinos A et coll. : Pharmacokinetic study of fibrin clot-ciprofloxacin complex: an *in vitro* and *in vivo* experimental investigation. Arch Orthop Trauma Surg.114(5):295-297,1995.
106. Tsukayama DT : Pathophysiology of posttraumatic osteomyelitis. Clin Orthop 360:22-29, 1999.
107. van de Belt H, Neut D, Schenk W et coll: *Staphylococcus aureus* biofilm formation on different gentamicin-loaded polymethylmethacrylate bone cements. Biomaterials 22:1607-1611, 2001.
108. Verdrengh M, Tarkowski A : Role of neutrophils in experimental septicemia and septic arthritis induced by *Staphylococcus aureus*. Infect Immun 65:2517-2521, 1997.

109. von Eiff C, Bettin D, Proctor RA et coll: Recovery of small colony variants of *Staphylococcus aureus* following gentamicin bead placement for osteomyelitis. Clin Infect Dis 25 (5) :1250-1, 1997.
110. Wininger DA, Fass RJ : Antibiotic-impregnated cement and beads for orthopedic infections. Antimicrob Agents Chemother 40:2675-2679, 1996.
111. Wispelwey B, Scheld WM : Ciprofloxacin in the treatment of *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. A review. Diagn Microbiol Infect Dis 13:169-171, 1990.
112. Woo GL, Mittelman MW, Santerre JP. Synthesis and characterization of a novel biodegradable antimicrobial polymer. Biomaterials 21(12):1235-46, 2000.
113. Worlock P, Slack R, Harvey L et coll: The prevention of infection in open fractures: an experimental study of the effect of fracture stability. Injury 25:31-38, 1994.

ANNEXE 1

Résumé et schématisation du protocole de recherche



- Groupe A :**
- Évaluation de l'efficacité préventive des implants ARTEA-CFX
 - Induction de l'ostéomyélite et mise en place de 8 implants ARTEA-CFX à la semaine 0
 - Pas de chirurgie à la semaine 4
 - Euthanasie à la semaine 10 pour récolte finale des échantillons
- Groupe B :**
- Contrôle positif
 - Induction de l'ostéomyélite à la semaine 0
 - Chirurgie à la semaine 4 pour retrait de la vis, échantillonnage bactériologique, insertion de la 2ème vis et débridement
 - Aucun traitement supplémentaire
 - Euthanasie à la semaine 10 pour récolte finale des échantillons
- Groupe C :**
- Évaluation de l'efficacité curative de la ciprofloxacine orale
 - Induction de l'ostéomyélite à la semaine 0
 - Chirurgie à la semaine 4 pour retrait de la vis, échantillonnage bactériologique, insertion de la 2ème vis et débridement
 - Ciprofloxacine orale (10 mg/kg BID) pour 28 jours
 - Euthanasie à la semaine 10 pour récolte finale des échantillons
- Groupe D :**
- Évaluation de l'efficacité curative des implants ARTEA-CFX
 - Induction de l'ostéomyélite à la semaine 0.
 - Chirurgie à la semaine 4 pour retrait de la vis, échantillonnage bactériologique, insertion de la 2ème vis et débridement
 - Mise en place de 8 implants ARTEA-CFX
 - Euthanasie à la semaine 10 pour récolte finale des échantillons

ANNEXE 2

Échelle de douleur acceptée par le Comité Institutionnel Éthique de l'Université de Montréal.

1. Fréquence cardiaque

Moins de 10% d'augmentation par rapport à la valeur pré-opératoire	0
10-30% d'augmentation par rapport à la valeur pré-opératoire	1
31-50% d'augmentation par rapport à la valeur pré-opératoire	2
Plus de 50% d'augmentation par rapport à la valeur pré-opératoire	3

2. Respiration

Normale	0
Légère assistance abdominale	1
Assistance abdominale marquée	2

3. Vocalisation

Pas de vocalisation	0
Vocalisation qui cesse avec le réconfort de la voix ou des caresses	1
Vocalisation qui ne cesse pas avec le réconfort	2

4. Agitation

Patient endormi ou calme, peu de mouvements, manifeste contentement	0
Agitation légère, fréquents changements de position	1
Animal abattu, sans réaction	2
Agitation modérée, mouvements très fréquents	3
Agitation sévère, mouvements brusques et violents	4

5. Palpation de la plaie chirurgicale

(Cette palpation-pressure doit être effectuée de façon modérée à plusieurs endroits autour de la plaie. À la suite de cette palpation, le membre est mobilisé avec une amplitude modérée.)

Aucune réponse	0
Réponse minimale, essaye de se soustraire	1
Tourne la tête vers la palpation, légère vocalisation	2
Tourne brusquement la tête vers la palpation, vocalise plus fort	3
Tourne la tête avec l'intention de mordre, hurle	4

NOTE TOTALE

0 = aucune douleur, 1-5 = douleur légère, 6-9 = douleur modérée, 10-15 = douleur sévère

ANNEXE 3

Liste des critères d'euthanasie acceptée par le Comité Institutionnel Éthique de l'Université de Montréal.

1.État général

_Animal abattu, ne répondant peu ou pas à la voix et aux pressions manuelles pour plus de 24 heures, considérant qu'il n'y a plus d'effet résiduel de l'anesthésie.

2.Appétit

_Anorexie complète pour plus de 48 heures.

3.Douleur

_Degré de douleur demeurant au dessus de 9 pour plus de 24 heures malgré une analgésie adéquate (voir l'annexe 1 pour la grille d'évaluation de la douleur).

4.Température

_Maintien d'une température au dessus de 40,5°C pour plus de 72 heures malgré un support antibiotique et anti-inflammatoire adéquat.

5.Problème myoarthrosquelettique

_Présence d'une fracture de fémur avec déplacement identifiée par radiographie.

_Non-appui complet d'un membre pour plus de 5 jours.

_Présence d'une fistule avec drainage demeurant active pour plus de 48 heures malgré un support antibiotique adéquat.

6.Problème cardiovasculaire

_Fréquence cardiaque maintenue au dessus de 150 pour plus de 24 heures malgré une analgésie adéquate.

7.Autres problèmes systémiques

_Présence de signes cliniques reflétant une maladie systémique nécessitant un traitement médical ou chirurgical pouvant interférer avec les buts de la présente étude.

L'euthanasie sera demandée à la rencontre d'un des critères mentionnés ci-haut ou lorsque l'animal aura complété la durée du projet. La procédure se fera dans chacun des cas avec une solution d'euthanasie injectée par voie intraveineuse.

ANNEXE 4

Liste des critères utilisés pour la différenciation de scores 0, 1 et 2 de sclérose médullaire, de réaction périostée, de lyse osseuse et de guérison osseuse à l'interprétation des clichés radiographiques

<u>Sclérose médullaire:</u>	0 Absence d'opacification de la cavité médullaire 1 Opacification légère ou localisée de la cavité médullaire 2 Opacification importante ou diffuse de la cavité médullaire
<u>Réaction périostée:</u>	0 Absence de réaction périostée 1 Légère réaction (< 4 mm épais et 2 cm long) 2 Sévère réaction (> 4 mm épais et 2 cm long)
<u>Lyse osseuse:</u>	0 Absence de lyse osseuse. 1 Radiotransparence < 2 mm autour de la vis, pas ou légère extension dans le cortex adjacent 2 Radiotransparence > 2 mm autour de la vis, extension dans le cortex adjacent
<u>Guérison osseuse</u>	0 Absence de remodelage cortical au déficit proximal, pas d'opacification du déficit proximal 1 Légère remodelage cortical et remplissage du déficit proximal, mais encore facile à délimiter 2 Remodelage cortical et remplissage du déficit proximal modéré à important, difficile de délimiter le déficit

ANNEXE 5

Liste des critères utilisés pour la différenciation de scores 0, 1 et 2 de guérison osseuse, de réaction périostée, de mobilité de la vis et d'adhérences aux évaluations macroscopiques.

<u>Guérison osseuse</u>	0	Absence de tout signe de guérison, déficit entièrement visible
	1	Léger remplissage du déficit, diamètre diminué mais communication encore présente avec la cavité médullaire
	2	Remplissage important du déficit, aucune communication avec la cavité médullaire
<u>Réaction périostée:</u>	0	Aucune réaction périostée
	1	Légère réaction périostée (< 4 mm épais et 2 cm long)
	2	Réaction sévère (> 4 mm épais et 2 cm long)
<u>Mobilité de la vis:</u>	0	Aucun mouvement.
	1	Plus de _ tour pour serrer la vis. Même si la vis ne peut être serrée, impossible de la retirer sans le tournevis
	2	Vis peut être enlevée sans tournevis
<u>Adhérences:</u>	0	Absence d'adhérences
	1	Légères adhérences entre le <i>biceps femoris</i> et le <i>vastus lateralis</i> . Dissection mousse suffisante pour exposer le fémur
	2	Adhérences modérées à sévère entre le <i>biceps femoris</i> et le <i>vastus lateralis</i> . Dissection au ciseau nécessaire afin d'exposer le fémur

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE¹

IDENTIFICATION DE L'ETUDIANT

Nom de l'étudiant Louis Martel Huneault		Code permanent [REDACTED]
Sigle du programme M.Sc.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Sciences Cliniques

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs Huneault, Louis ; Lussier, Bertrand ; Dubreuil, Pascal ; Chouinard Luc ; Désévaux, Cyril.	
Titre Prevention and treatment of experimental osteomyelitis in dogs with ciprofloxacin-loaded crosslinked high amylose starch implants.	
Revue Journal of Orthopaedic Research	Date de publication

DECLARATION DES COAUTEURS

Déclaration		
<i>À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que Louis M. Huneault inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre « Prévention et traitement d'une ostéomyélite expérimentale canine avec un implant biorésorbable à base d'amidon chargé de ciprofloxacin ».</i>		
Coauteur Bertrand Lussier	[REDACTED]	Date 11 nov. 03
Coauteur Pascal Dubreuil	[REDACTED]	Date 11 nov. 03
Coauteur Luc Chouinard	[REDACTED]	Date 11 nov. 03
Coauteur Cyril Désévaux	[REDACTED]	Date 11 nov. 03
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date

Envoyé à la FÉS le

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