

DIU « Prévention et prise en charge des infections ostéo-articulaires »

MODELES ANIMAUX EXPERIMENTAUX D'INFECTIONS OSTEO-ARTICULAIRES

24 novembre 2020



Cédric Jacqueline, UPRES EA 3826

Thérapeutiques Cliniques et Expérimentales des Infections

www.ea3826.univ-nantes.fr



EA 3826, Thérapeutiques Cliniques et Expérimentales des infections
IRS2 NANTES-BIOTECH, 22 Bd Benoni Goullin, Nantes
Directeur : Pr Antoine Roquilly



Host Pathogen Interactions, Inflammation and Mucosal Immunity

Under the leadership of Pr Antoine Roquilly, the laboratory activities focus on host/pathogen interactions, the characterisation of the immunological scar following inflammation observed after trauma, sepsis, and major surgeries ; and its short and long-term consequences during secondary infections. Our translational research program cross clinicians and scientists expertise to foster excellence and innovation and provide best clinical care with centred patients outcomes. **more...**

The laboratory at a glance

EA3826 lab, it's:

- 14 scientists (PhD, MD)
- 5 technicians and 3 PhD students
- 166 publications since 2015
- 7 patents
- 1 CRO from the laboratory: www.atlangram.com



- 1 joint lab: www.olgram.com



- 1 H2O2O European Project: www.HAP2-project.com



CONTACT

Laboratory EA3826

Director: Pr Antoine Roquilly, MD, PhD

Secretary Office

Thierry Picou

Phone. +33 (0)2 53 00 91 81 / Email. thierry.picou@univ-nantes.fr

Address:

IRS2 - Nantes Biotech EA3826 - Room 201
22 Boulevard Benoni Goullin 44200 NANTES

[Locate us](#)

MODELES ANIMAUX EXPERIMENTAUX D'INFECTIONS OSTEO-ARTICULAIRES



An Experiment on a Bird in an Air Pump by Joseph Wright of Derby

- Etudes cliniques chez l'Homme rares et difficiles à mener.
- Difficultés évidentes pour tester nouveaux matériaux ou nouveaux antibiotiques.
- Variabilité interindividuelle +++ et caractère multifactoriel des résultats.

Précocité de la prise en charge.

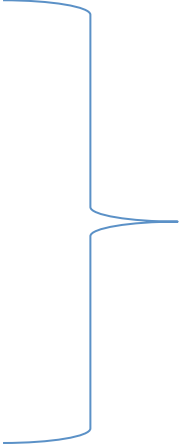
Génétique de la souche bactérienne.

Virulence de la souche bactérienne.

Génétique de l'hôte – réponse immunitaire appropriée

Comorbidités

Antibiothérapie adaptée



Variabilité +++

Rendant difficile la prise en compte de tous ces paramètres dans des études cliniques

Activité *in vitro* vs *in vivo*

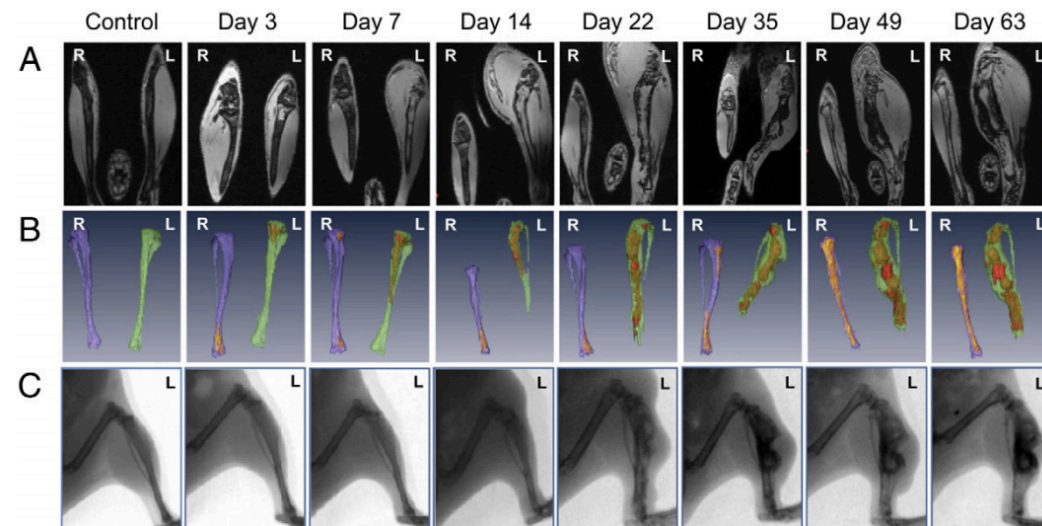
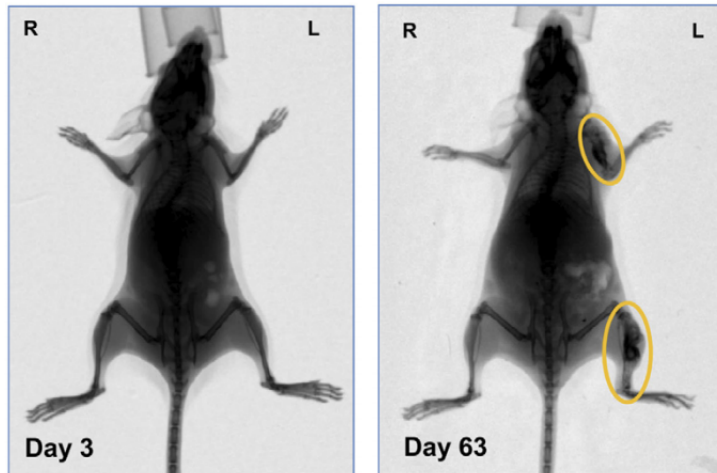
	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
Etat de la bactérie	Phase de croissance	Phase stationnaire
Nature du milieu	Standardisé	Variable
Liaison protéïque	Nulle	± élevée
Concentration de l'antibiotique	Constante	Variable

Bactérie in vivo $\neq$ bactérie in vitro

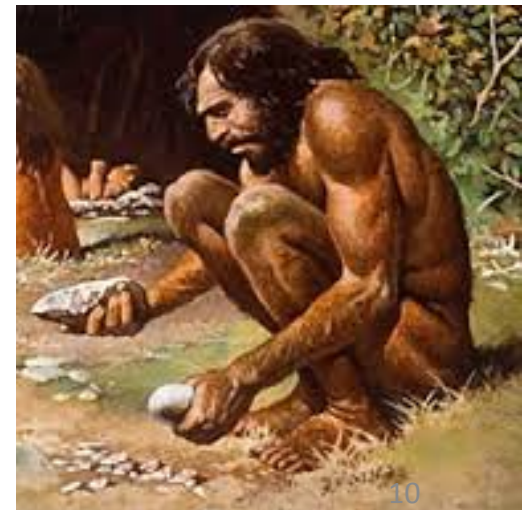
- Vérification de la prédictivité des tests in vitro (posologie, mode d'administration).
- Améliorer la pertinence des choix thérapeutiques locaux et systémiques.
- Etude des associations.
- Tester des nouvelles options thérapeutiques.

Intérêt des modèles animaux expérimentaux

- Faible nombre d'essais cliniques dans le domaine des infections ostéo-articulaires
- Différents modèles animaux expérimentaux existent dans le domaine des IOA :
 - Souris, rat, lapin, poulet...
 - Aigüe / sub-aigüe / chronique
 - Avec / sans matériel



- Rodet A, 1885. Lexer 1894.....Dubos 1938
- **Injections intraveineuses ou *in situ* de Staphylocoque doré chez le lapin :**
 - Mais mortalité +++
 - Faible reproductibilité.
 - Pas de progressivité des lésions
 - Pas d'homologie avec les ostéomyélites humaines



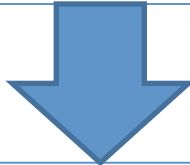
Premier modèle d'ostéomyélite chronique : 1941



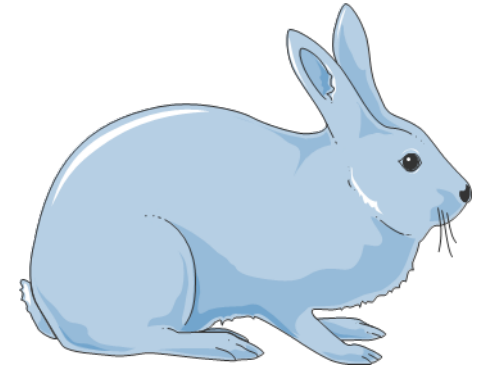
Morrhuate de Na⁺ + *S. aureus*



Métaphyse tibiale



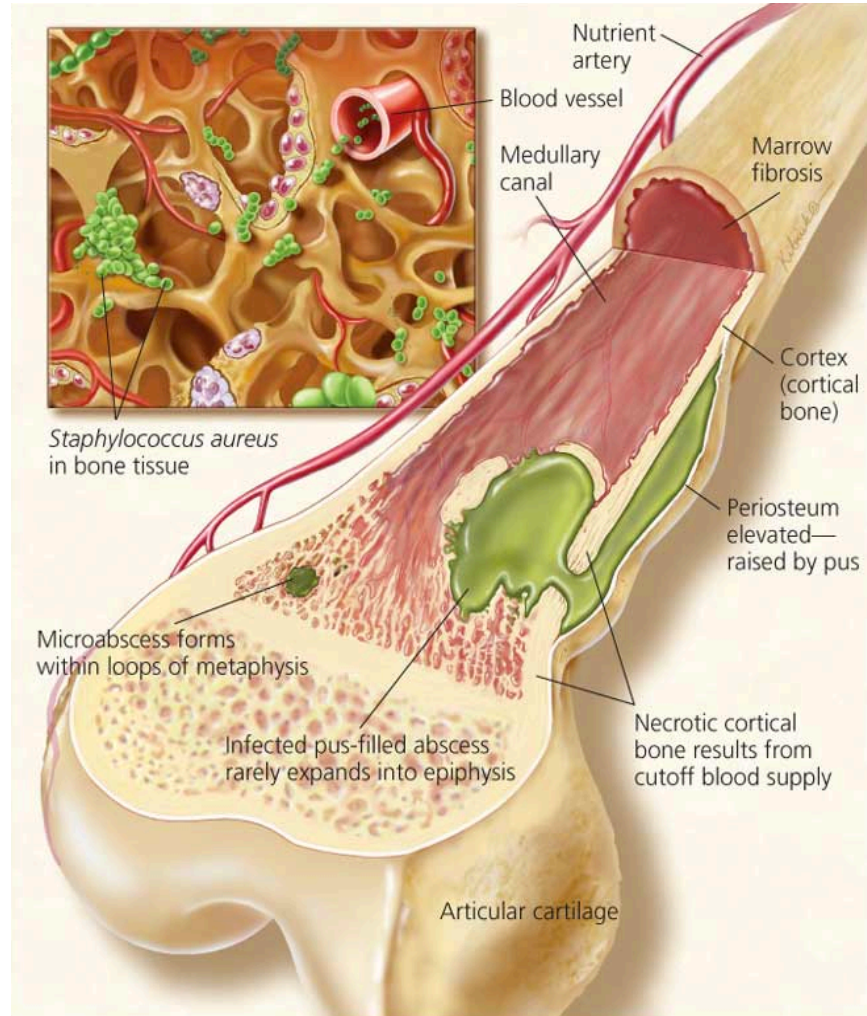
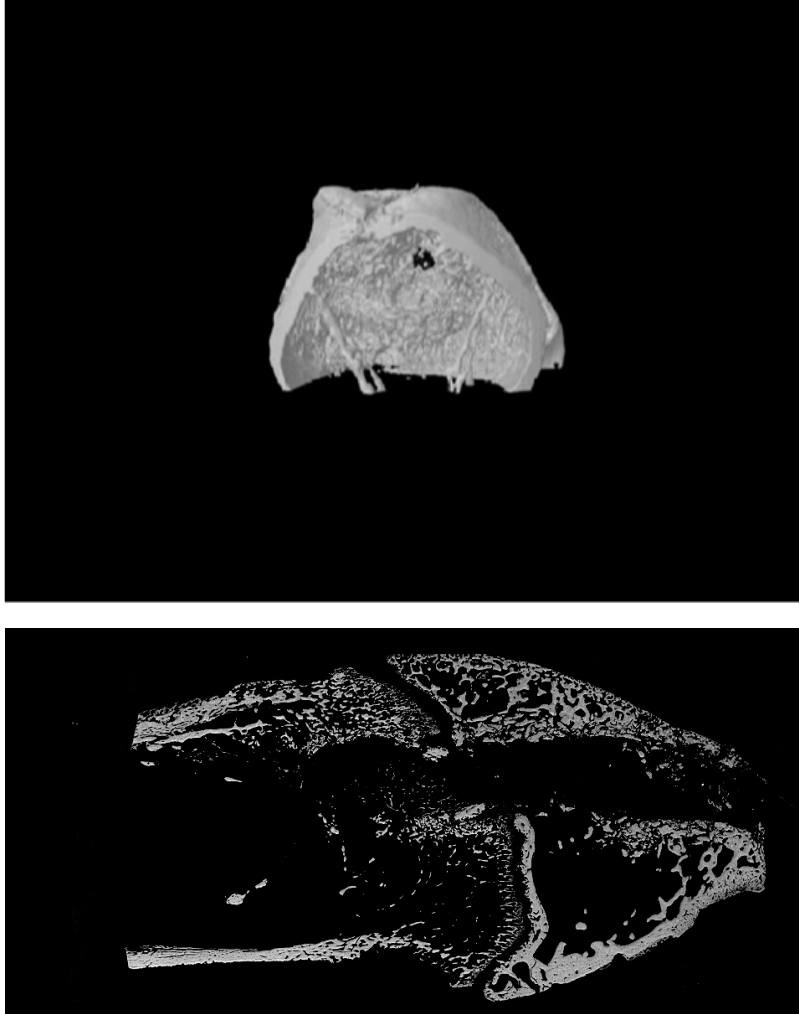
**Nécrose osseuse
et ostéomyélite d'évolution progressive**



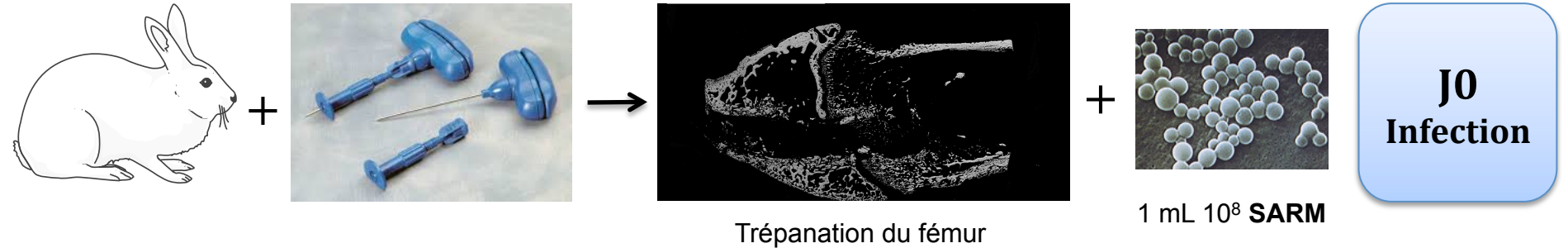
Scheman L *et al.* JAMA 1941

**Bases des modèles animaux :
Utilisation d'un agent sclérosant ou d'un corps étranger
pour permettre l'infection.**

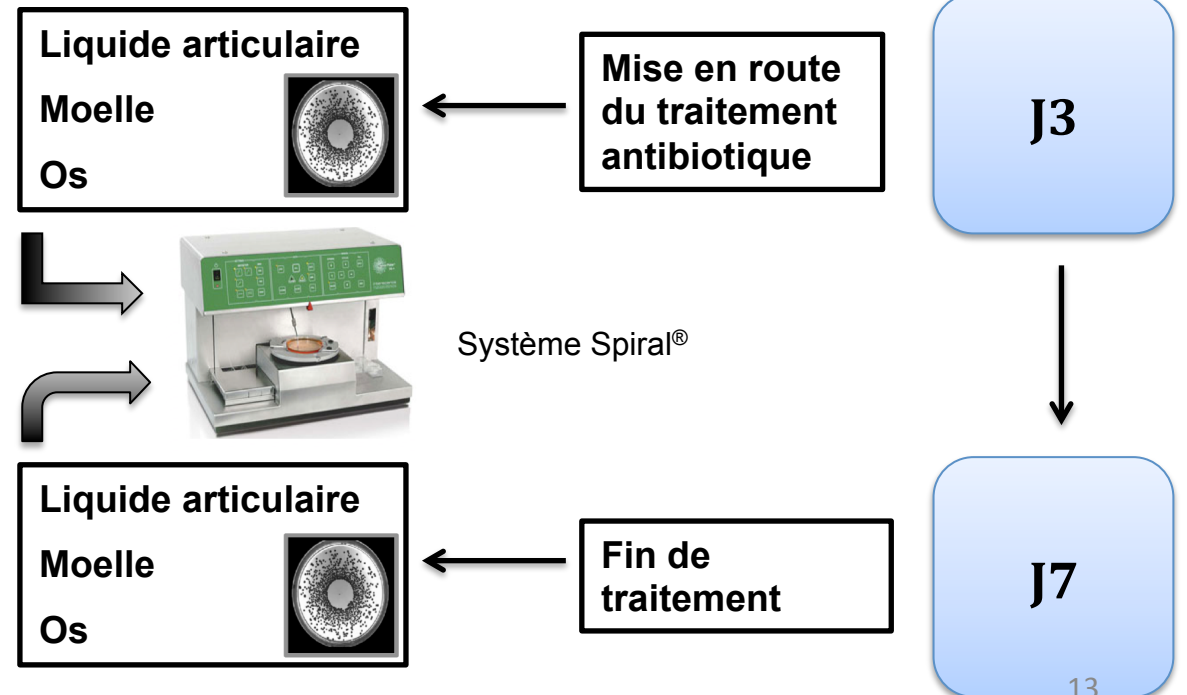
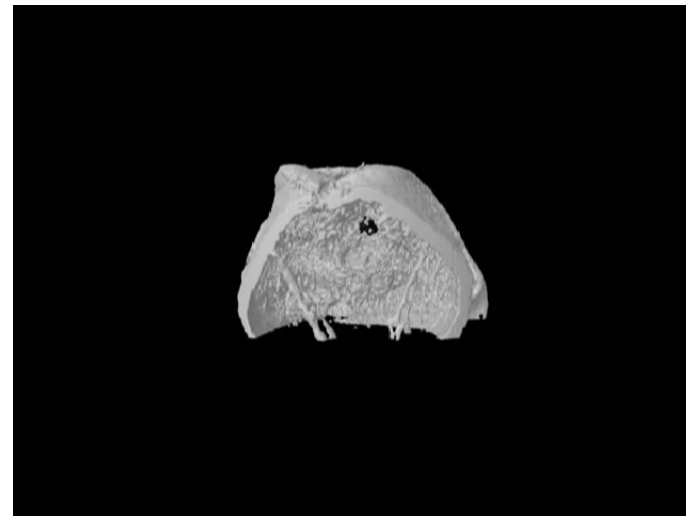
Modèle expérimental d'ostéomyélite à SARM



Modèle expérimental d'ostéomyélite à SARM

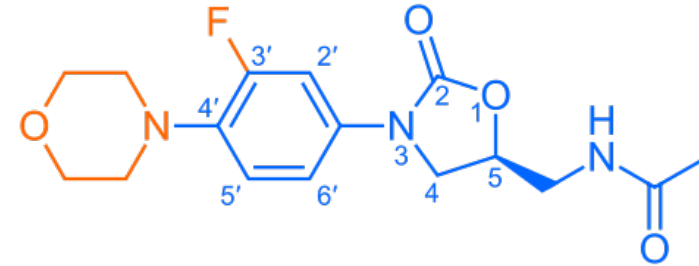
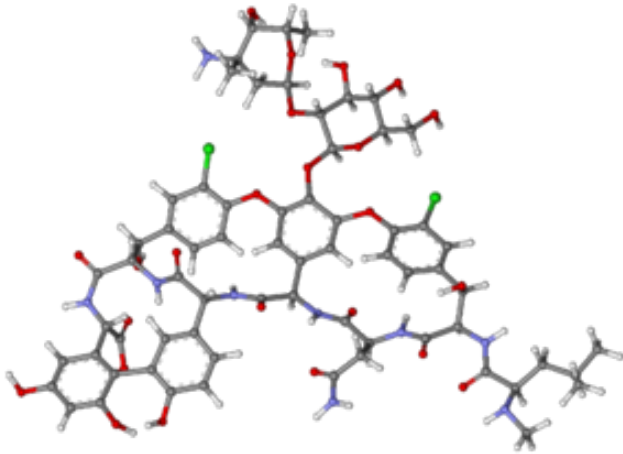


L'efficacité est mesurée en comparant la charge bactérienne avant (J3) et après le traitement (J7).



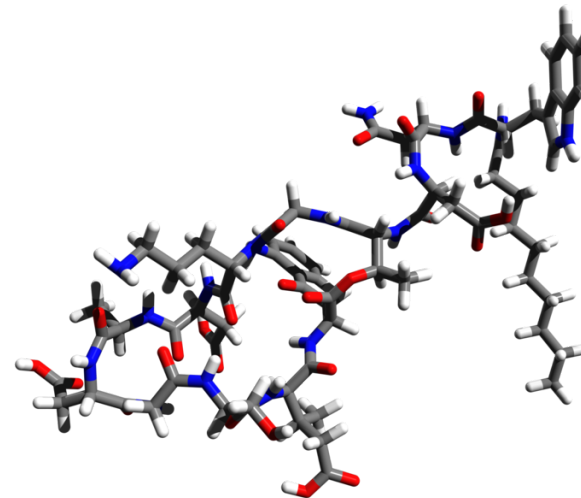
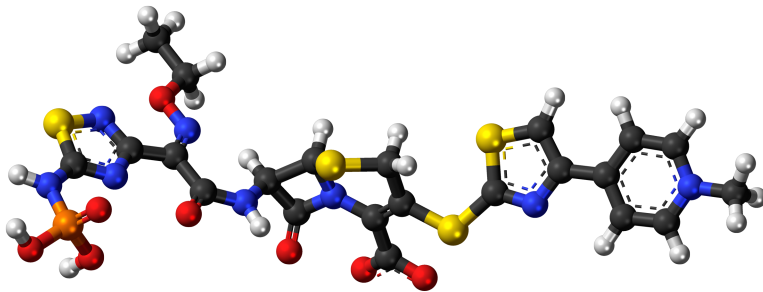
Evaluation de molécules antistaphylococques

VANCOMYCINE



LINEZOLIDE

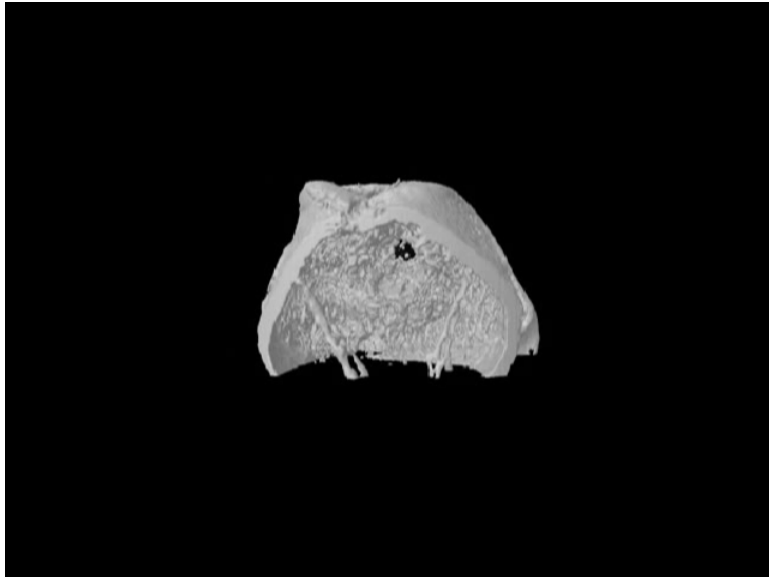
CEFTAROLINE



DAPTOMYCINE

Evaluation de molécules antistaphylococquiques

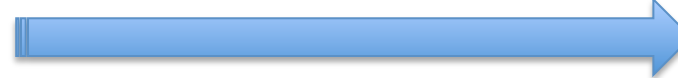
Trépanation fémorale et inoculation intra-articulaire de 10^8 UFC



Reconstruction 3D du condyle fémoral

Les bactéries survivantes sont dénombrées dans le liquide articulaire infecté, la moelle et l'os (J7)

3 jours



La charge bactérienne est déterminée dans le liquide articulaire infecté, la moelle et l'os (J3)

débridement chirurgical + lavage



CEFTAROLINE
HD 10 mg/kg q12hr

LINEZOLIDE
HD 10 mg/kg q12hr

VANCOMYCINE
Perfusion continue

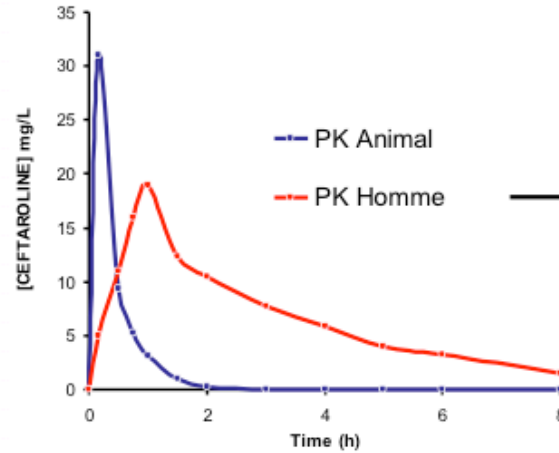
DAPTOMYCINE
HD 6 mg/kg q24hr

Traitement de 4 jours





PK spontanée

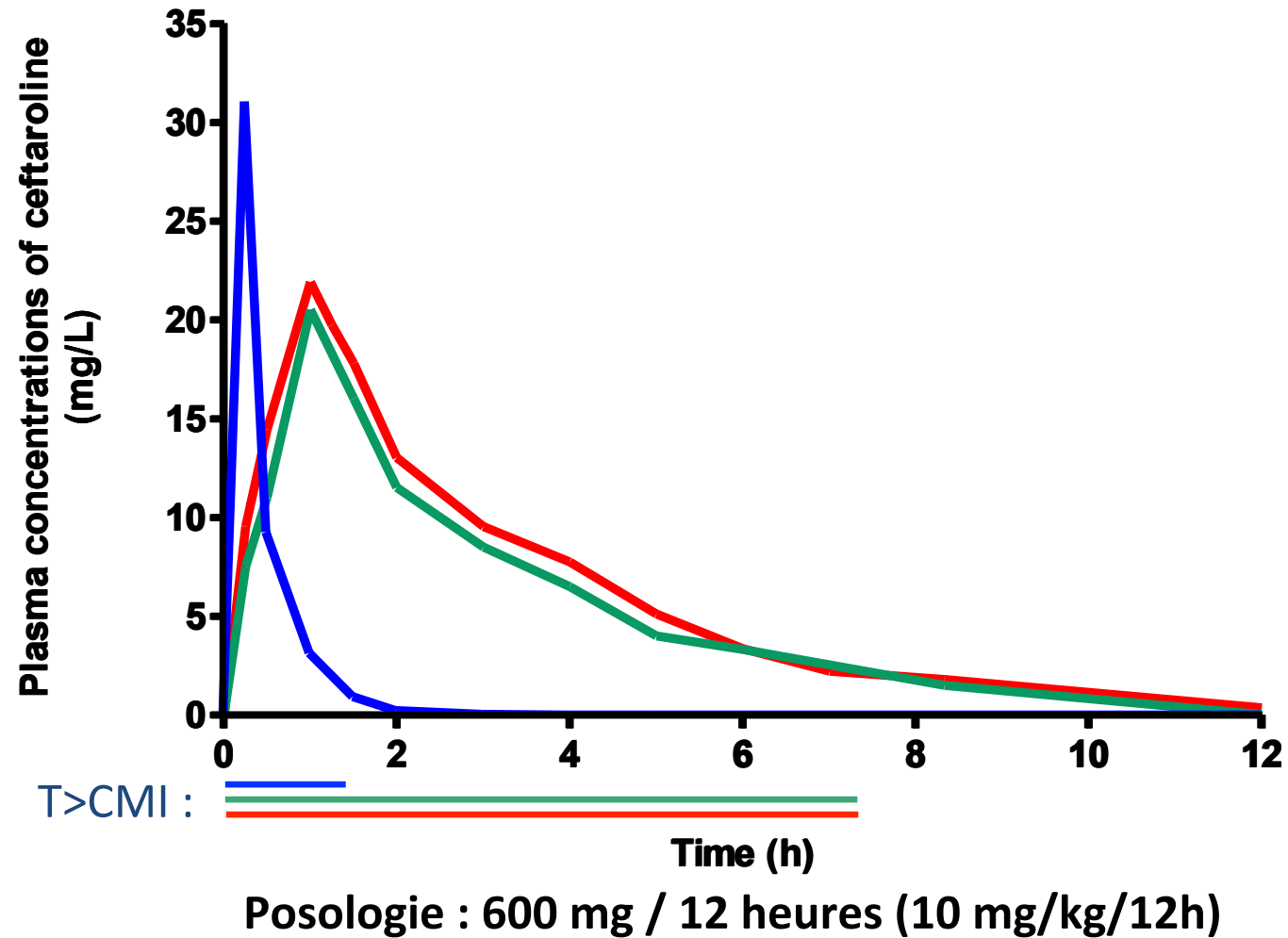


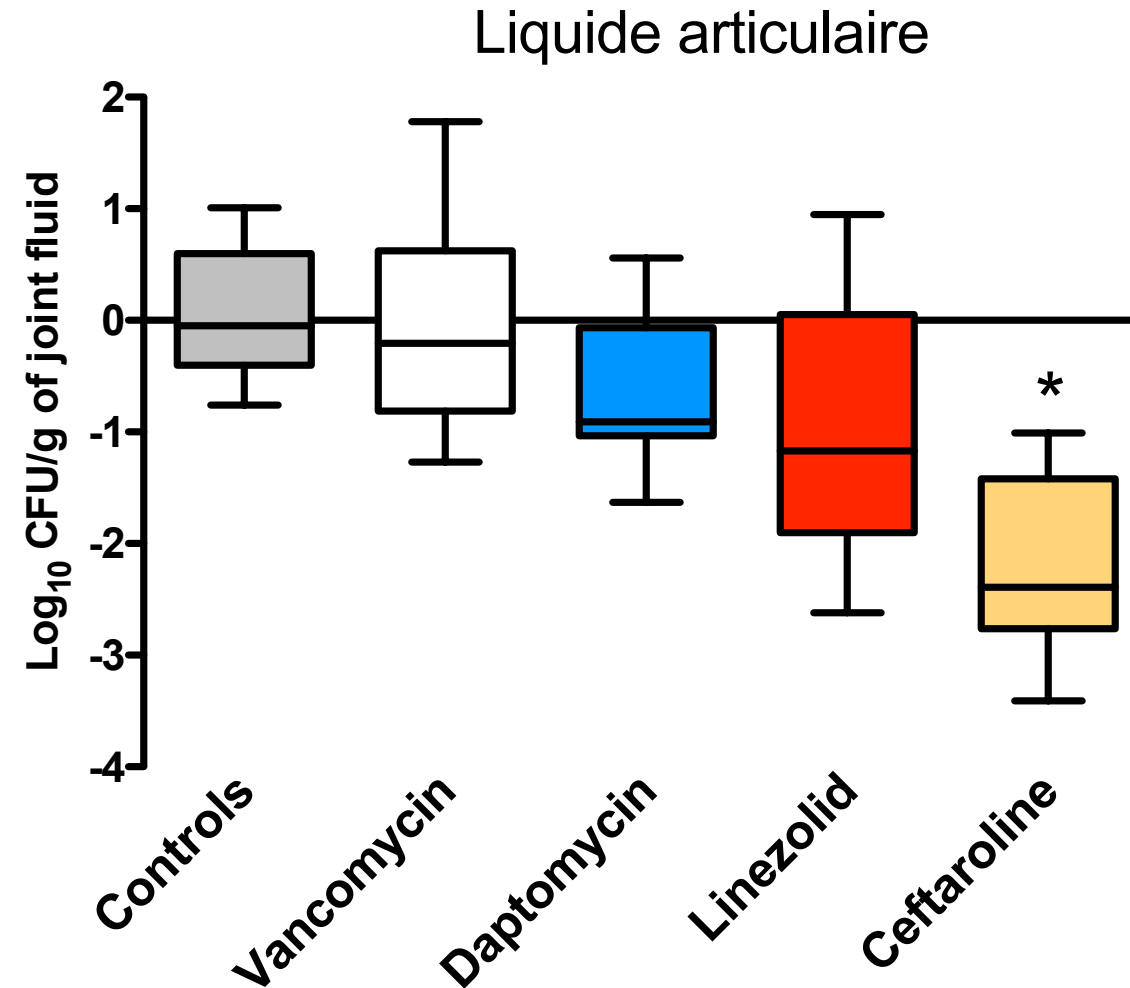
Comparaison des
paramètres PK
homme / animal

Simulation de la
PK humaine chez
l'animal

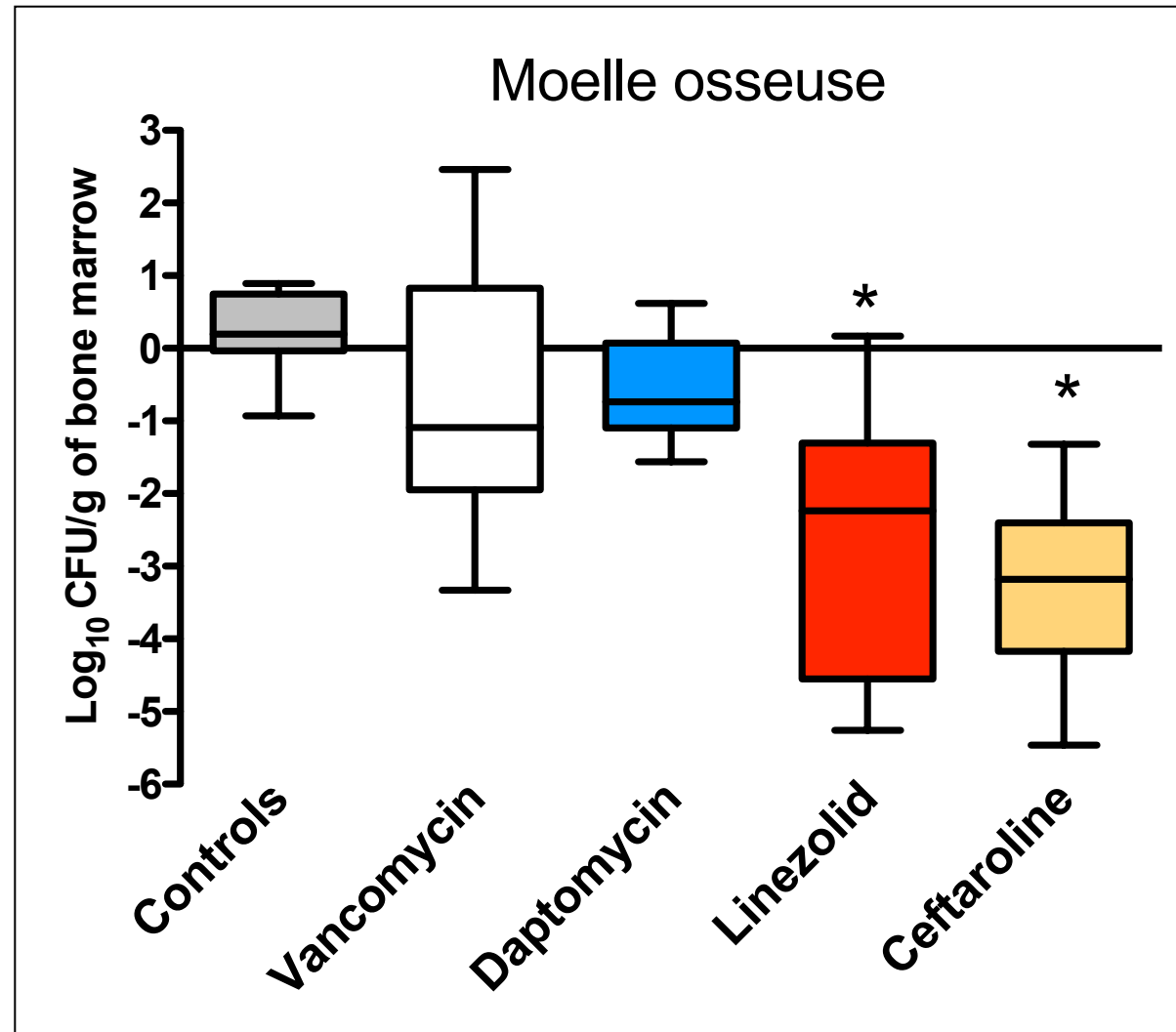
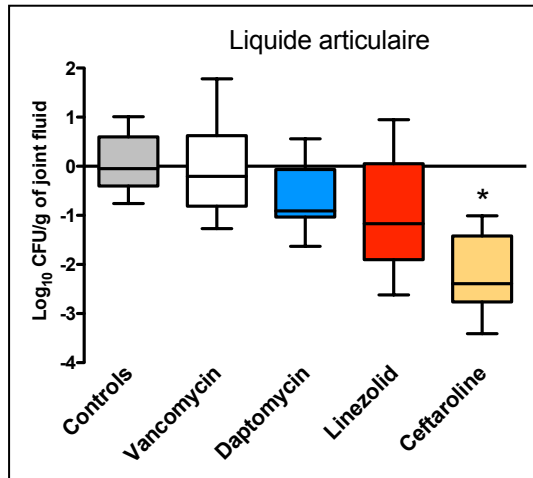


Perfusion assistée par ordinateur



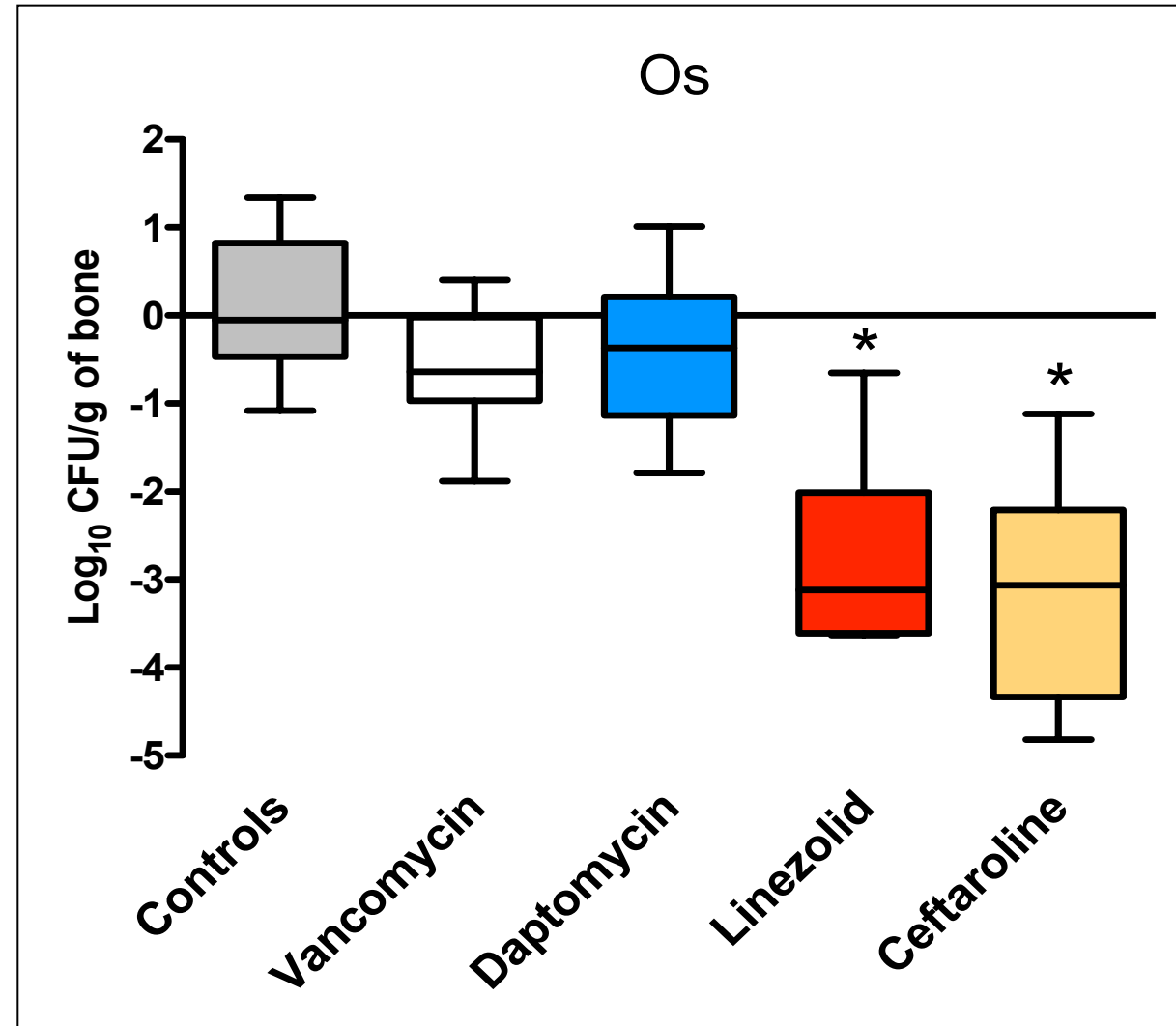
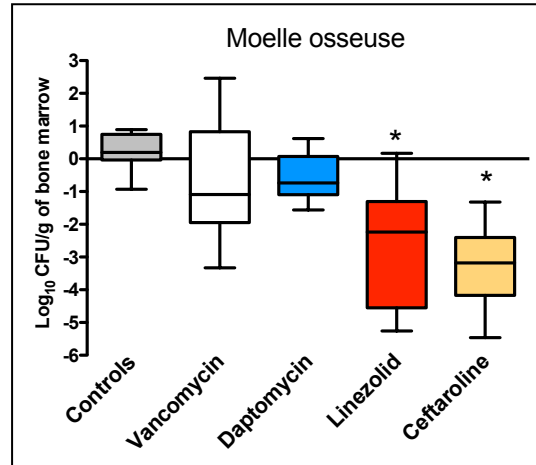
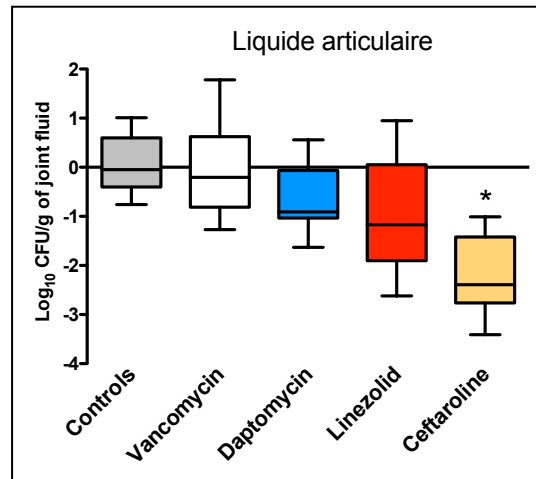


Evaluation de molécules antistaphylococquiques



Jacqueline C et al. Efficacy of the new cephalosporin ceftaroline in the treatment of experimental methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* acute osteomyelitis. J Antimicrob Chemother 2010; 65(8):1749-52.

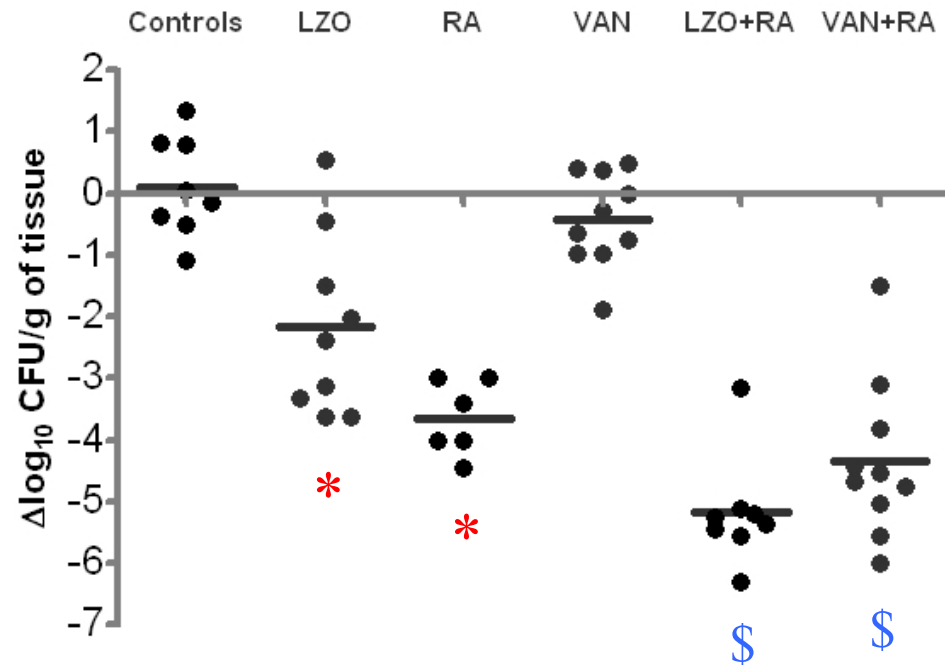
Evaluation de molécules antistaphylococquiques



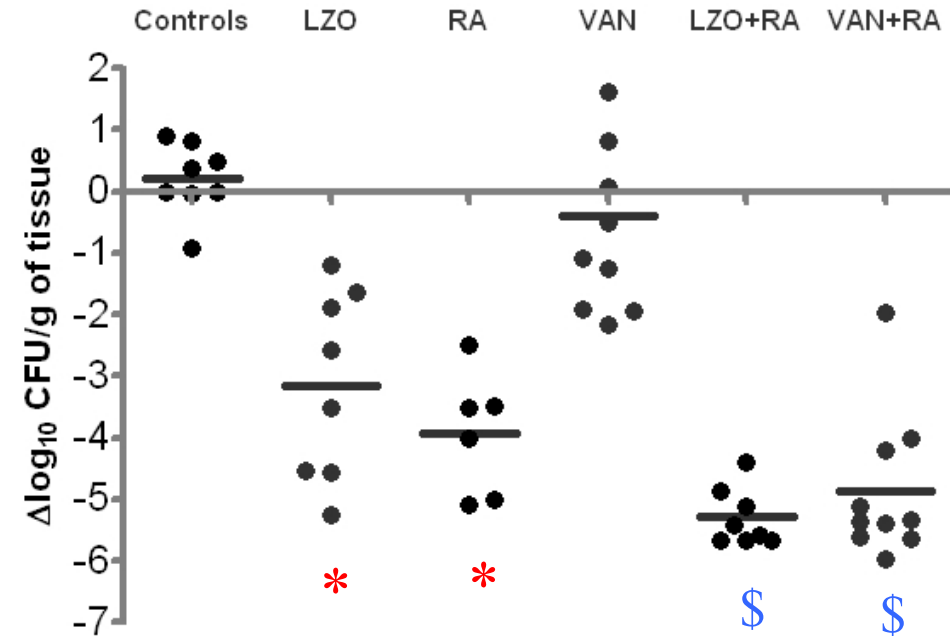
Jacqueline C et al. Efficacy of the new cephalosporin ceftaroline in the treatment of experimental methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* acute osteomyelitis. J Antimicrob Chemother 2010; 65(8):1749-52.

**Associations : linézolide-
rifampicine vs vancomycine-
rifampicine**

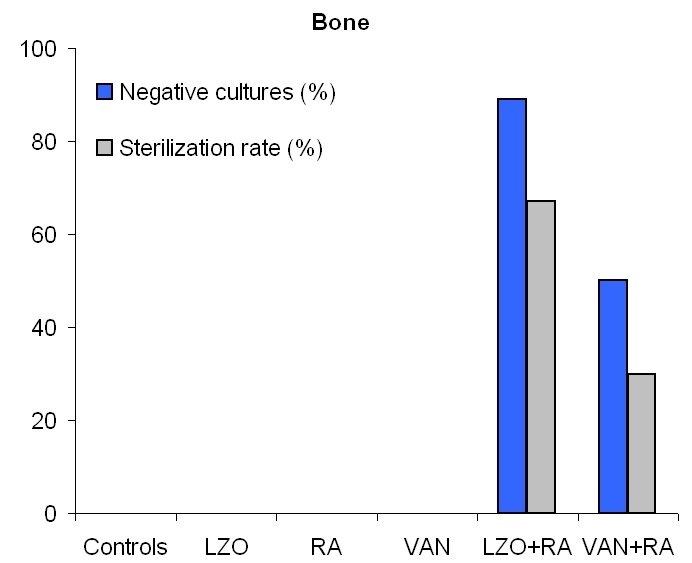
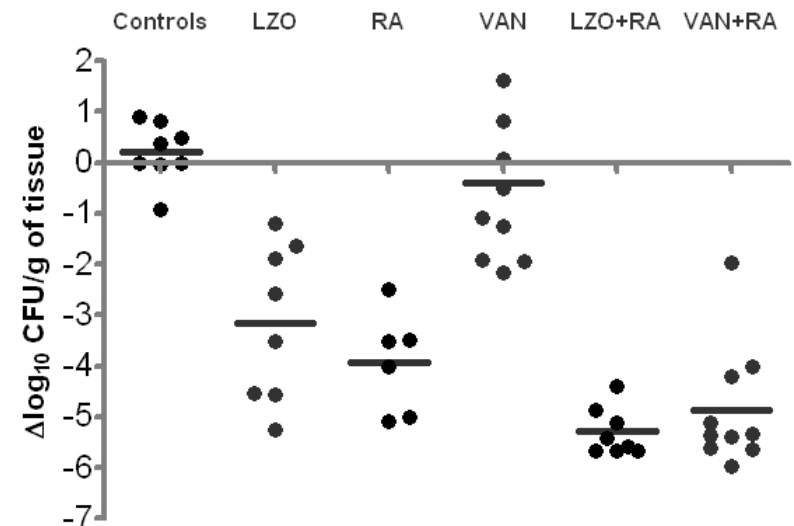
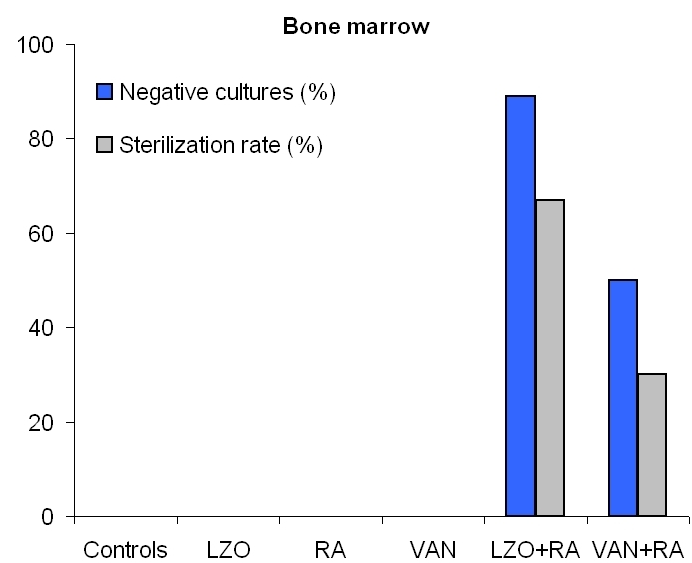
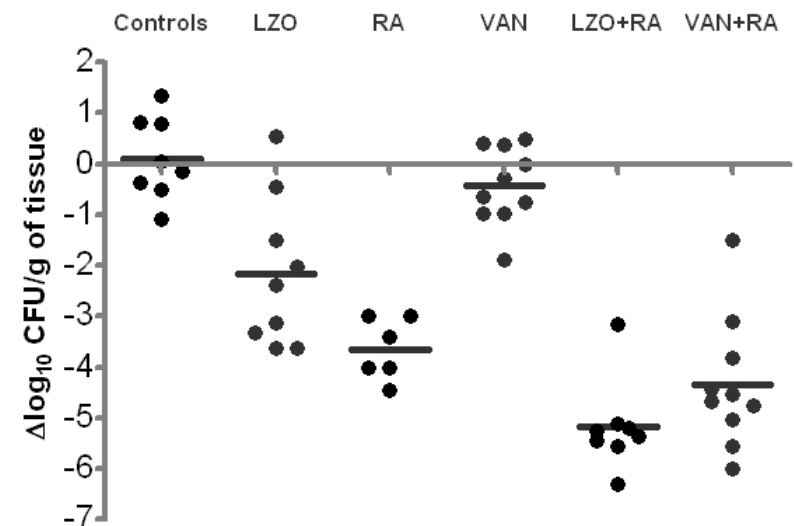
Moelle osseuse



Os



Associations : linézolide-rifampicine vs vancomycine-rifampicine



Evaluation d'une nouvelle molécule

Debio 1450 (AFABICIN) – Inhibiteur de FabI

Nouvelle classe thérapeutique

Inhibiteur de FabI

Spectre limité à *S. aureus*

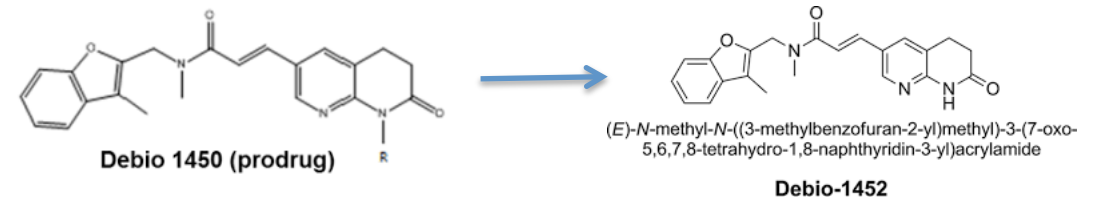
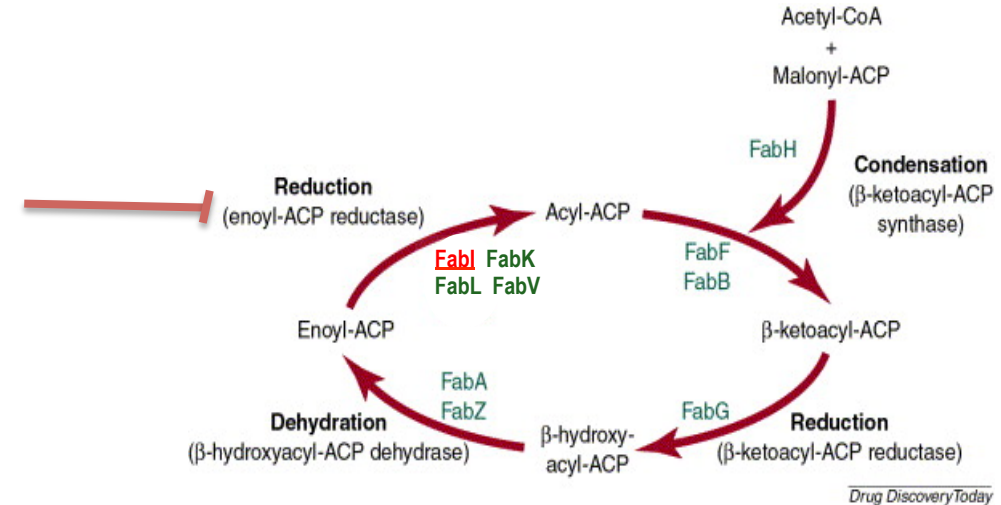
Phase II (Janvier 2017)

PO / IV

Debio 1452 MIC (mg/L):

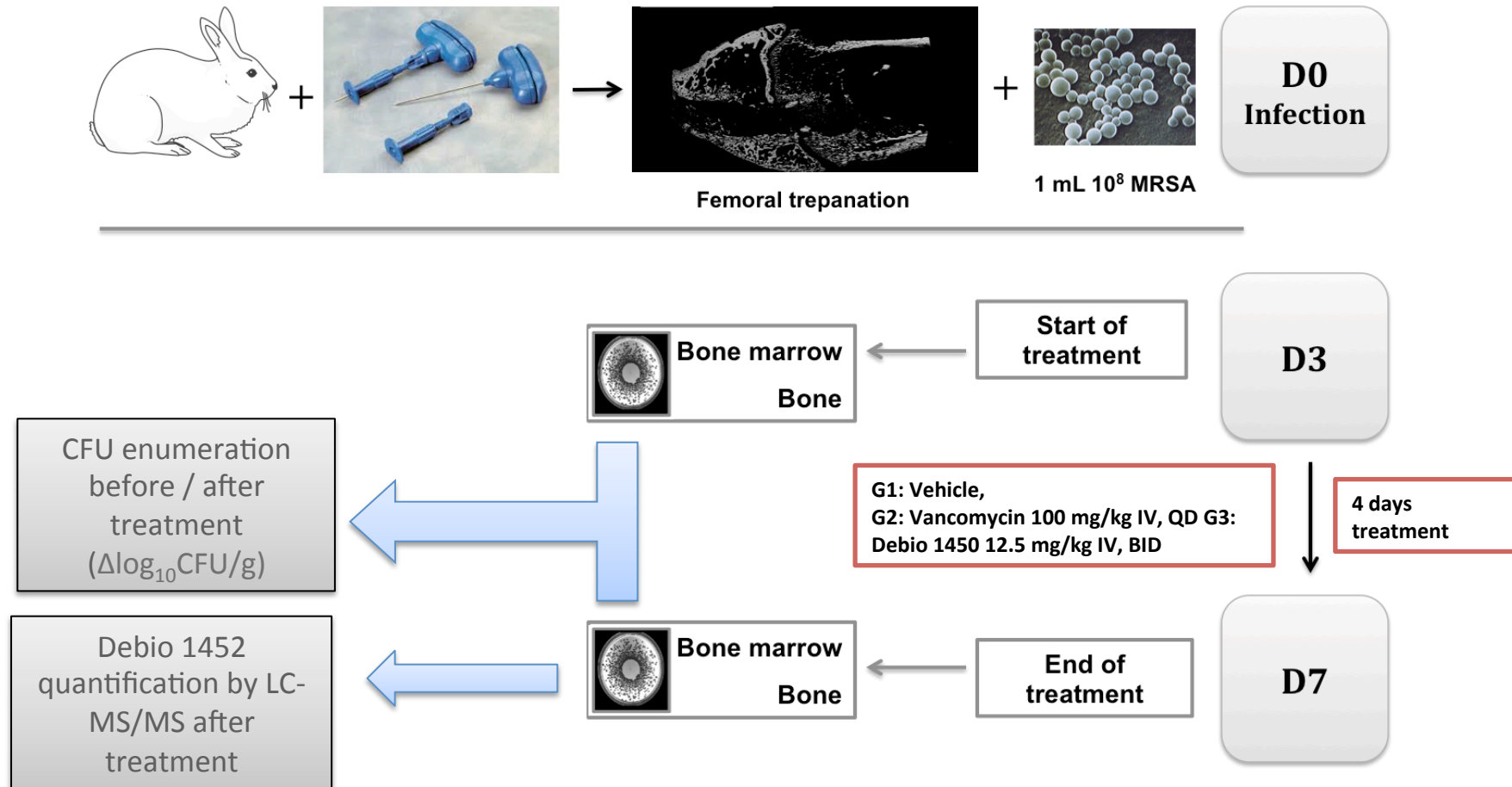
Organism	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Min	Max
<i>S. aureus</i> (660)	0.004	0.008	≤ 0.001	0.25
MRSA (402)	0.004	0.008	≤ 0.001	0.25
MSSA (258)	0.008	0.015	0.002	0.25
<i>S. epidermidis</i> (95)	0.015	0.03	0.008	0.5
Other staphylococci (66)	0.015	0.06	0.004	0.5

Conclusion. Debio 1452 exhibited excellent *in vitro* activity against all clinical isolates tested in the study. In the present study, Debio 1452 exhibited superior activity as compared with other agents and no cross resistance to other antimicrobials was observed, consistent with historical data. Further studies are warranted in support of clinical development of Debio 1450 for staphylococcal infections.



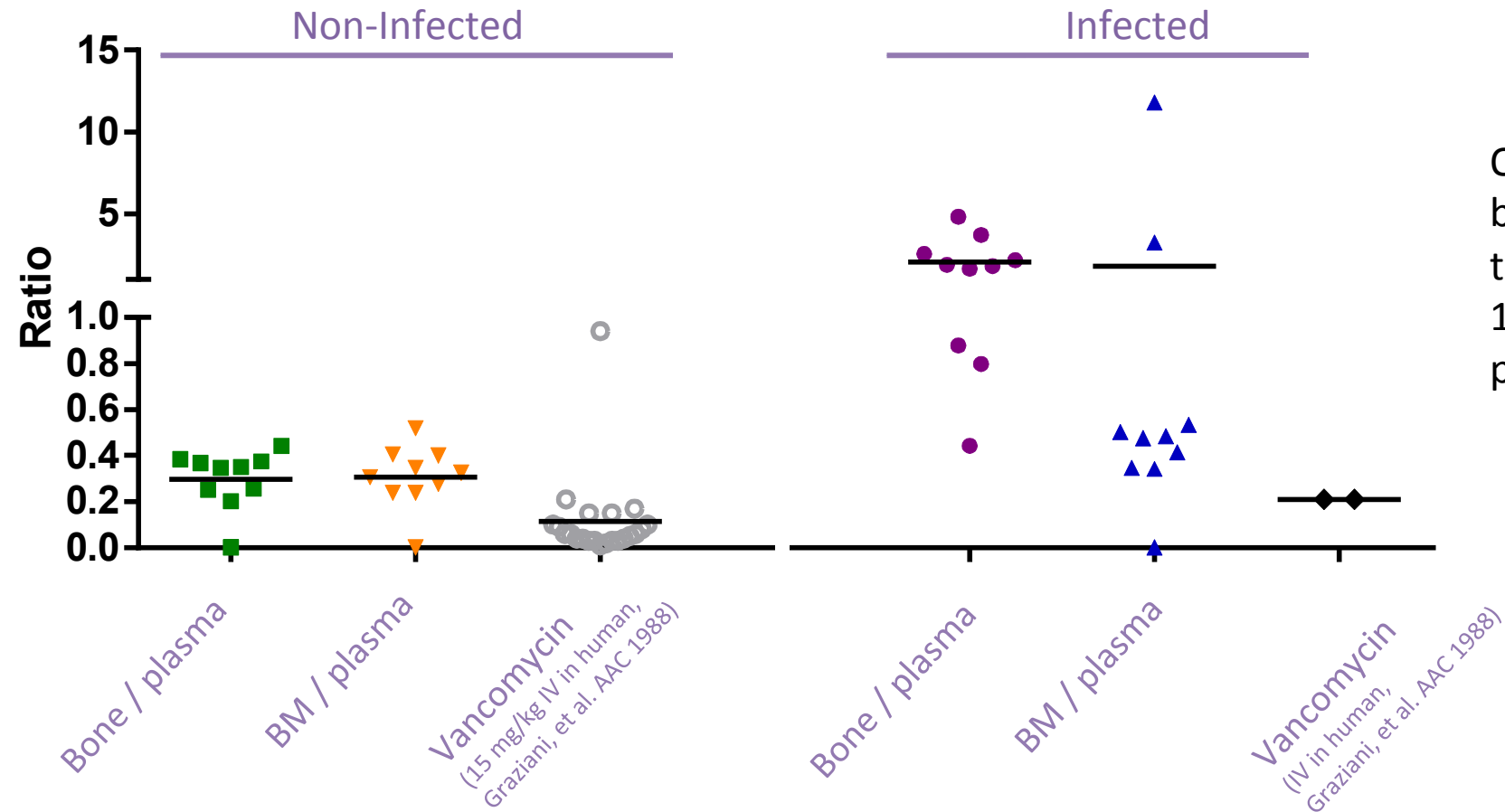
Evaluation d'une nouvelle molécule

Debio 1450 – Inhibiteur de FabI



Evaluation d'une nouvelle molécule

Debio 1450 – Inhibiteur de FabI

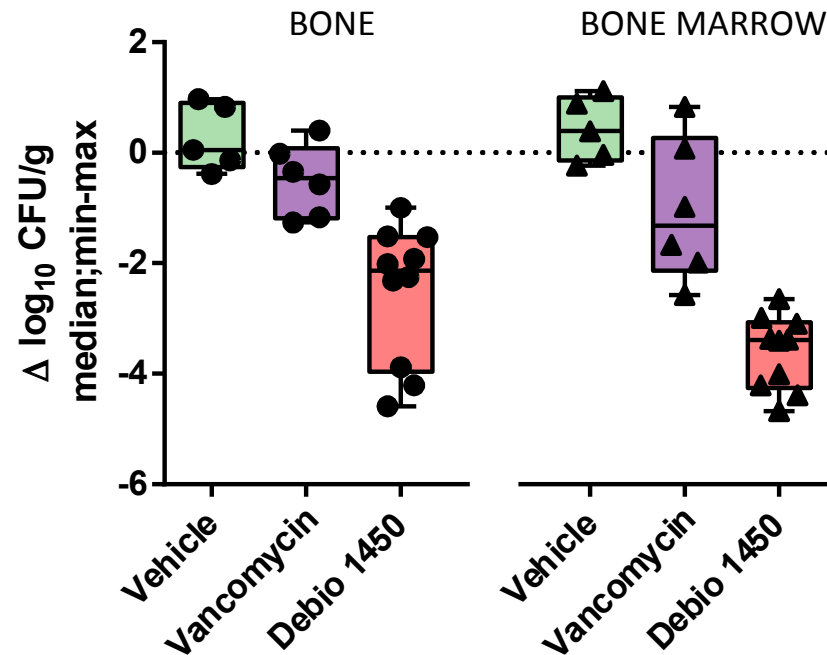


Quantification of Debio 1452 by LC-MS/MS after 4 days of treatment with Debio 1450 12.5 mg/kg BID (12 hours post last dose)

Evaluation d'une nouvelle molécule

Debio 1450 – Inhibiteur de FabI

4 days IV treatment with vehicle (BID), Vancomycin (100 mg/kg QD) and Debio 1450 (12.5 mg/kg BID)



* p<0.001 vs. vehicle and vancomycin
(analysis of variance followed by
Student-Newman Keuls test)

Table 1. Bacterial titres in MRSA-infected tissues after 4 days of treatment

Treatment (number of animals)	Mean ± SD Δlog ₁₀ CFU / g of tissue (day 3 - day 7)	
	Bone marrow	Epiphyseal bone
Vehicle (Dextrose 5%) bid iv (5)	0.43 ± 0.58	0.27 ± 0.60
Debio 1450 12.5 mg/kg bid iv (10)	-3.62 ± 0.67 ^a	-2.52 ± 1.25 ^a
Debio 1450 25 mg/kg bid iv (5)	-2.46 ± 1.07 ^b	-1.44 ± 0.79 ^b
Debio 1450 50 mg/kg bid iv (4)	-2.82 ± 0.62 ^b	-1.89 ± 0.62 ^b
Debio 1450 100 mg/kg bid iv (6)	-2.48 ± 1.13 ^b	-1.40 ± 0.53 ^b
Vancomycin 100 mg/kg qd iv (6)	-1.05 ± 1.30	-0.49 ± 0.65

^a p<0.001 vs vehicle and vancomycin animals

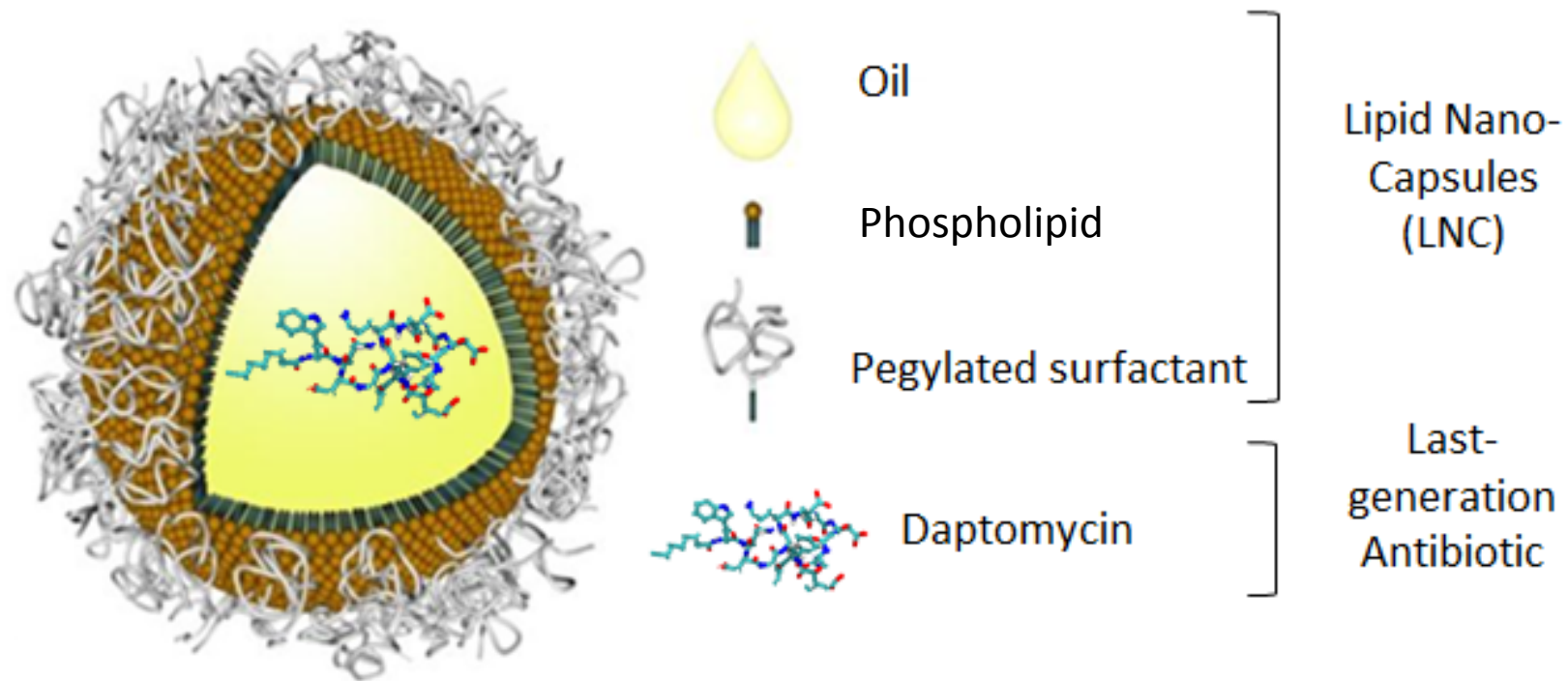
^b p<0.001 vs vehicle animals

(analysis of variance followed by a Student-Newman-Keuls test)

Améliorer le traitement des IOA par l'administration locale d'un antibiotique ?

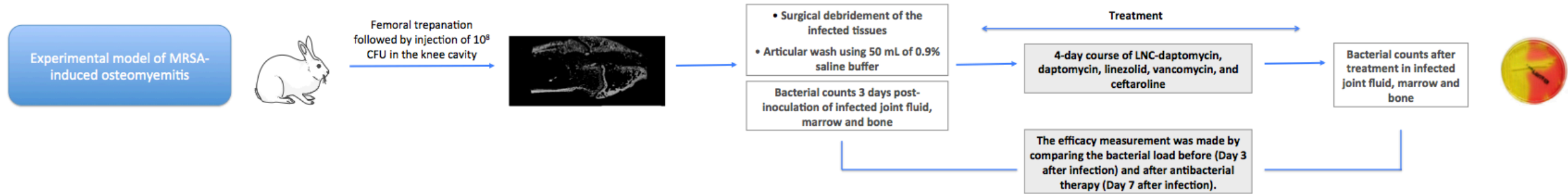
Objectif : Evaluer l'apport d'un biomatériau en tant que matrice à libération prolongée d'un antibiotique dans le traitement de l'ostéomyélite aiguë.

NANTIBIOTICS-DAPTOMYCIN (NBT-DPT)



Evaluation d'un traitement local par des nanoparticules chargées en antibiotique (daptomycine)

Améliorer le traitement des IOA par l'administration locale d'un antibiotique ?



Therapeutic regimens:

- Local administration of LNC-daptomycin (low (LD) and high (HD) doses).
- IV linezolid (human-equivalent dose of 600mg q12hr).
- IV vancomycin (continuous infusion to reach a serum steady-state concentration of 20x the MIC (mimicking the human dose of 30 mg/kg given once daily)).
- IV ceftaroline (human-equivalent dose of 600mg q12hr).
- IV daptomycin (human-equivalent dose of 6mg/kg).

Améliorer le traitement des IOA par l'administration locale d'un antibiotique ?

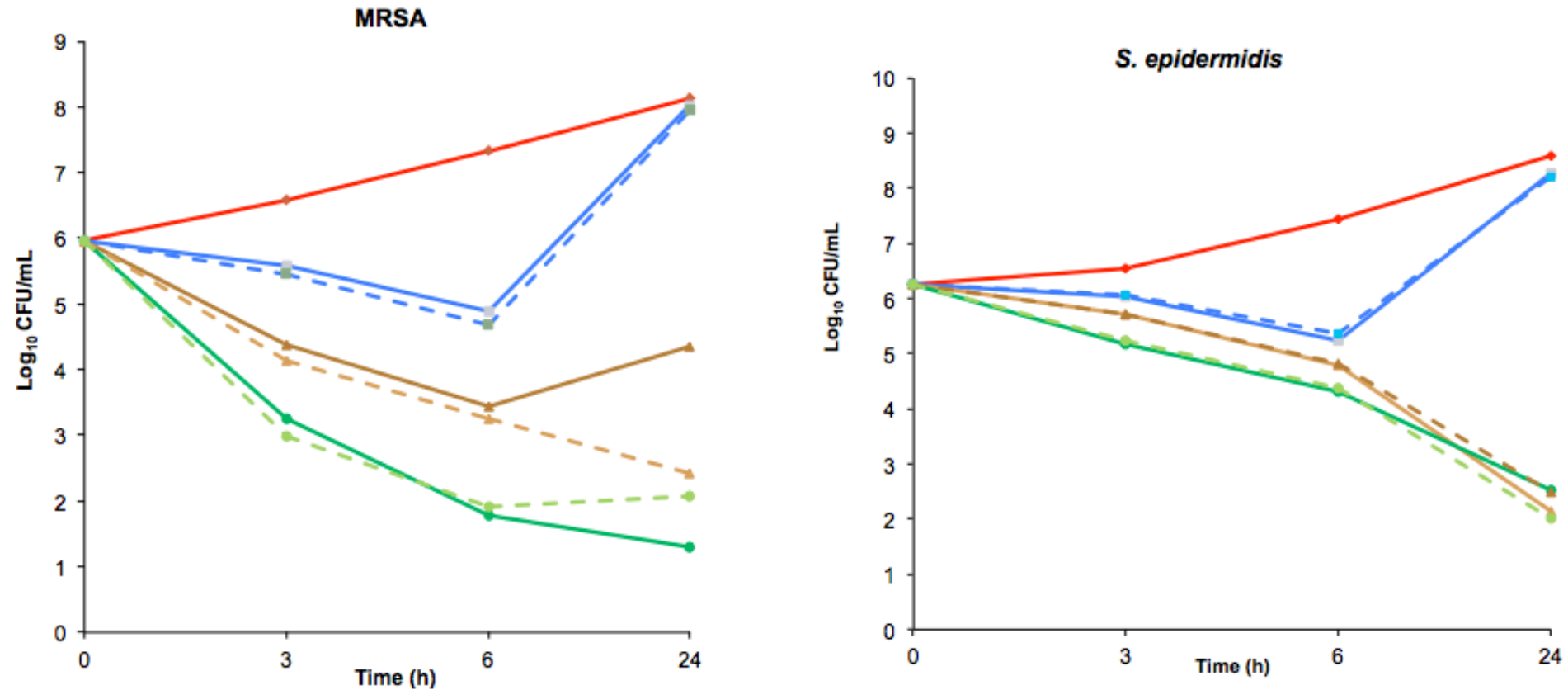


Figure 1. Time-kill curves of daptomycin and LNC-daptomycin against methicillin-resistant *S. aureus* and *S. epidermidis*. Daptomycin, solid lines; LNC-daptomycin, dashed lines.

Améliorer le traitement des IOA par l'administration locale d'un antibiotique ?

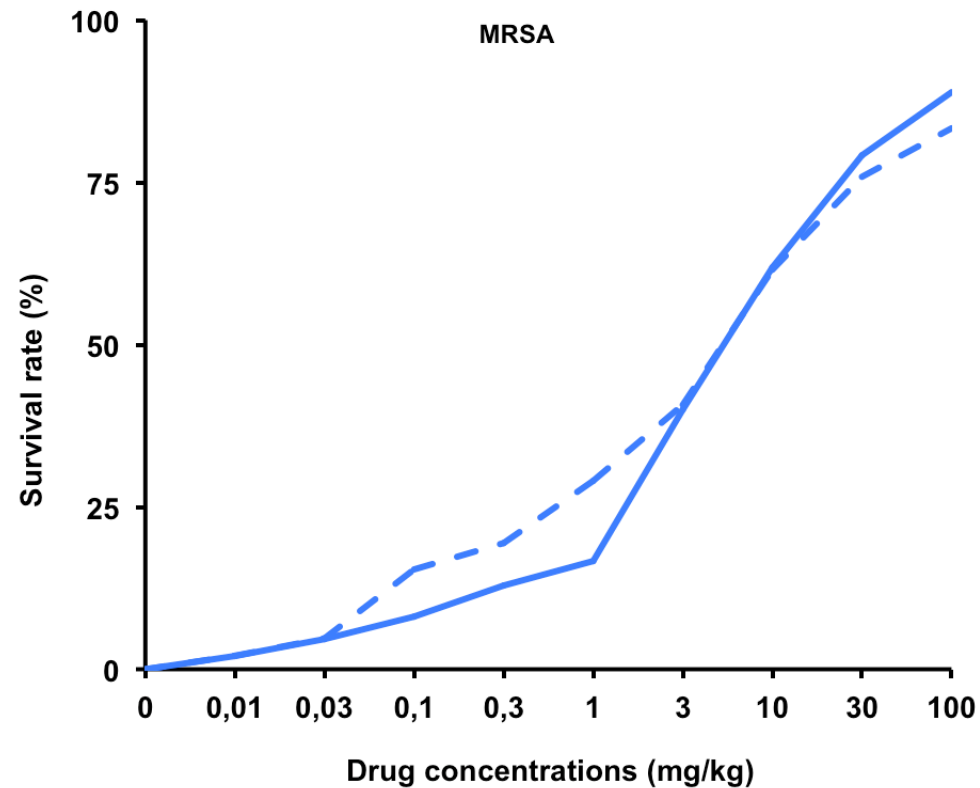


Figure 2. Mice model of MRSA-induced sepsis; determination of ED50 values. Daptomycin, solid lines; LNC-daptomycin, dashed lines.

Améliorer le traitement des IOA par l'administration locale d'un antibiotique ?

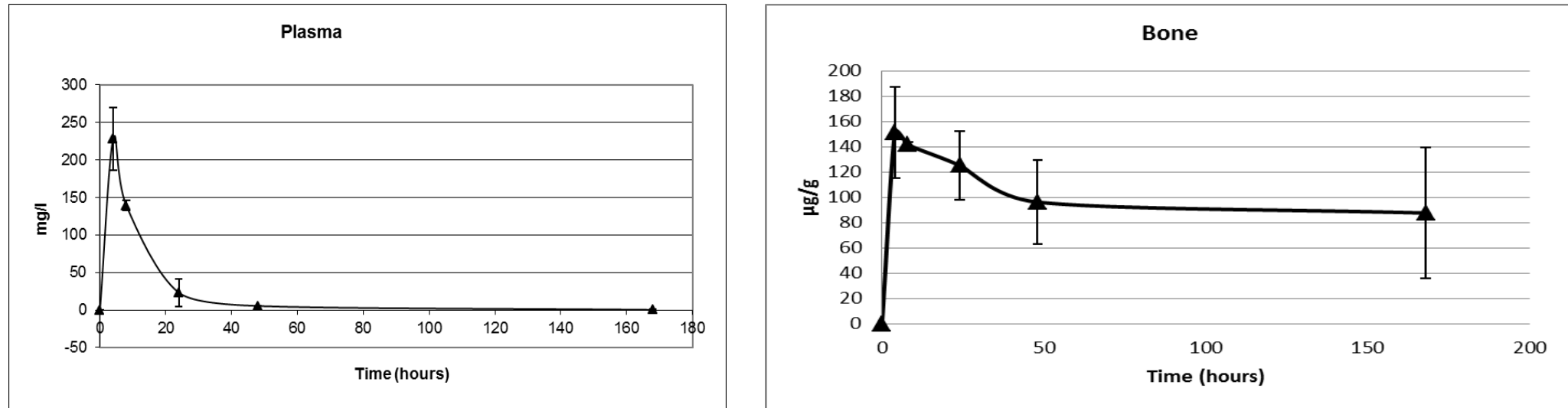


Figure 3. Pharmacokinetics of daptomycin in plasma and bone after a local administration of LNC-daptomycin.

Améliorer le traitement des IOA par l'administration locale d'un antibiotique ?

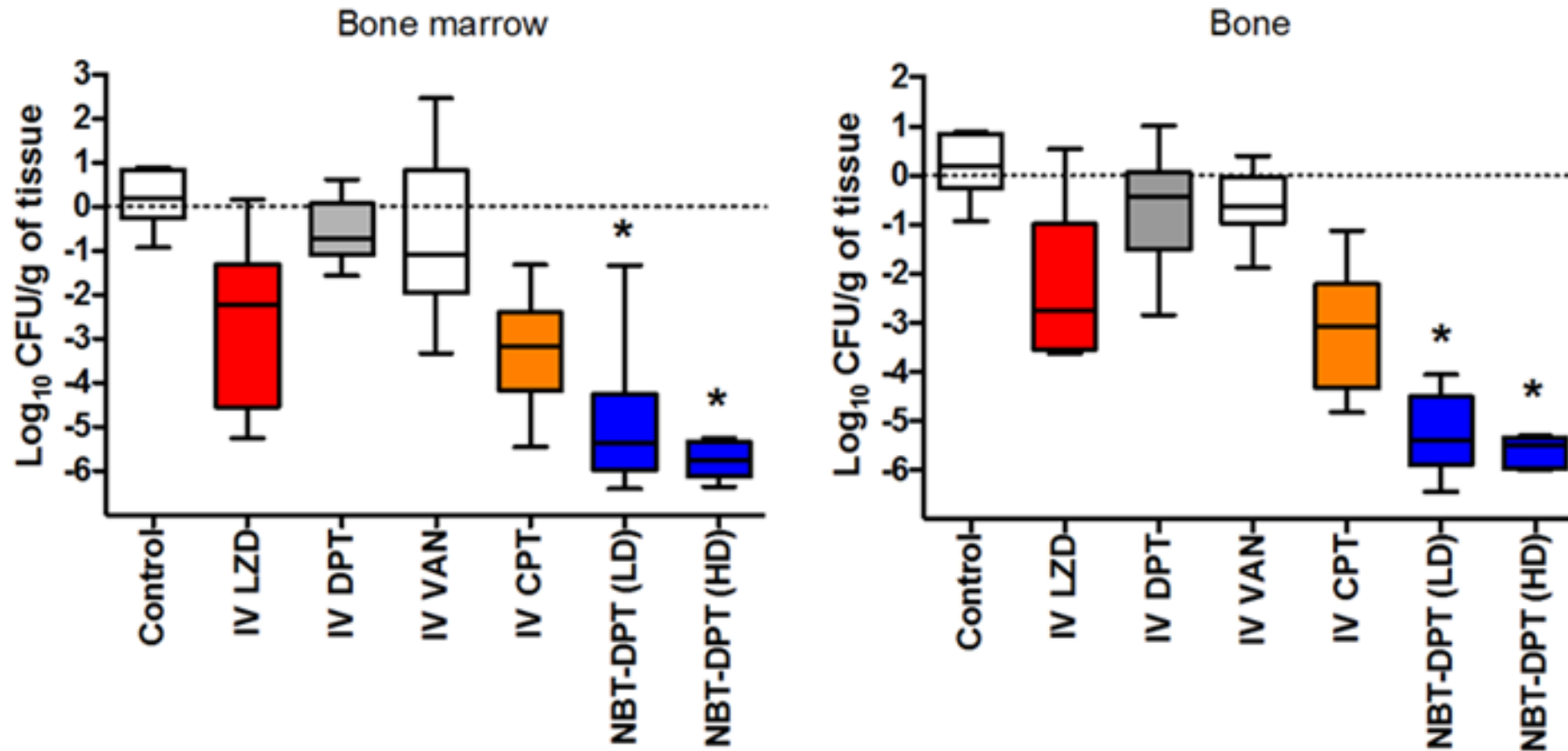
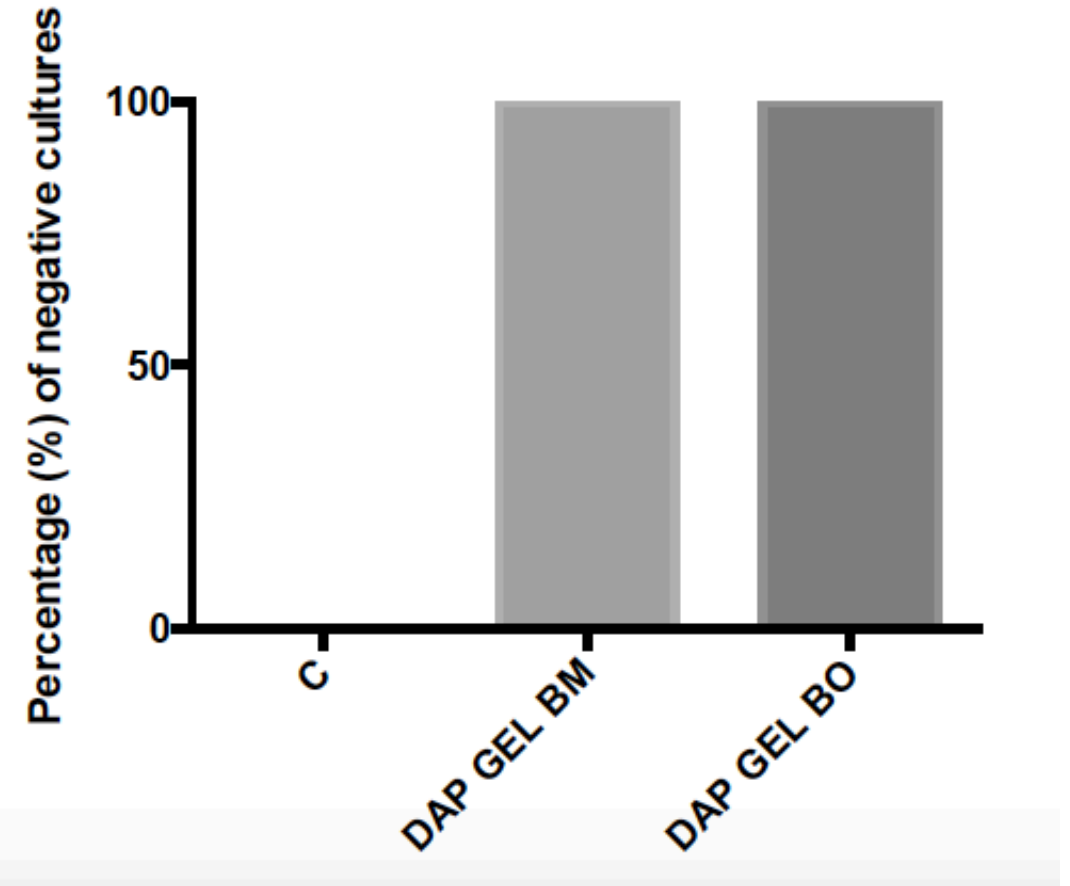
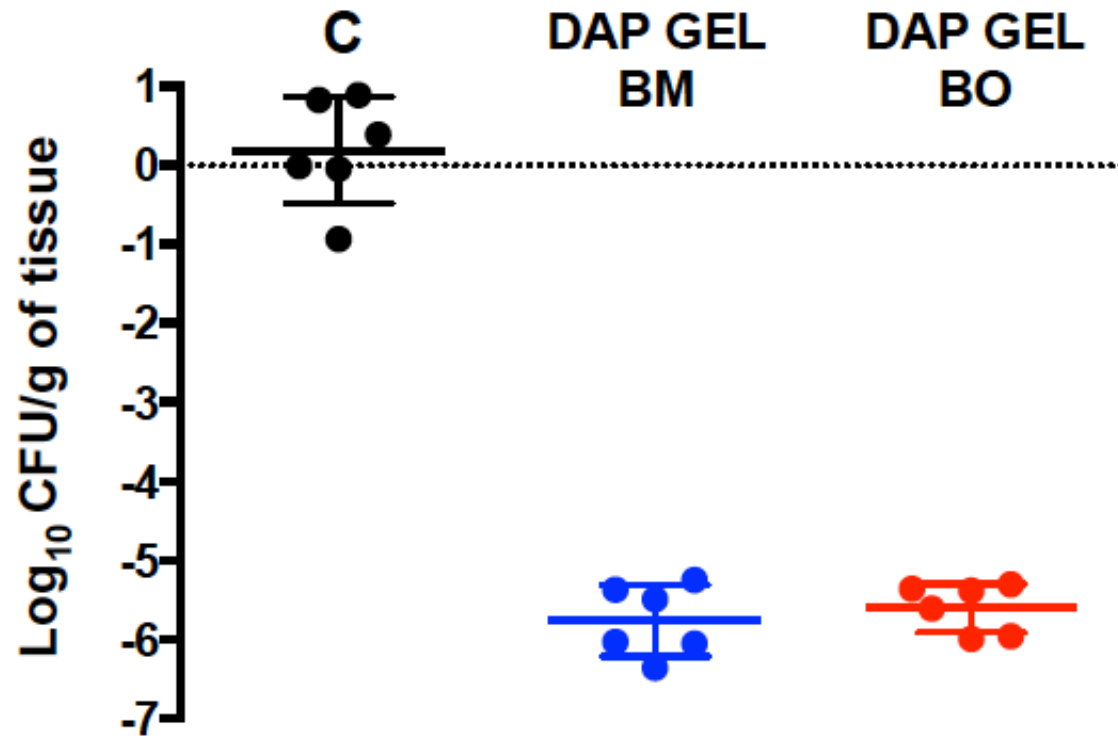


Figure 4. In vivo antibacterial efficacy of LNC-daptomycin (LD, low dose and HD, high dose) and comparators (linezolid, daptomycin, vancomycin, and ceftaroline) after 4 days of treatment for osteomyelitis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

Améliorer le traitement des IOA par l'administration locale d'un antibiotique ?

NBT-DPT – HIGH DOSE



Améliorer le traitement des IOA par l'administration locale d'un antibiotique ?

- A gel with lipid nano-encapsulated daptomycin (LNC-DAP) showed significant *in vivo* activity after one topic application in comparison with majors anti-staphylococcal drugs administered by IV route for 4 days in a MRSA osteomyelitis rabbit model.
- The use of LNCs for local delivery of antibiotics is a promising approach to revive old antibiotics or to develop new antibacterial agents with solubility issues for example.

- Avantages :
 - Dociles
 - Os suffisamment gros pour manipulations et thérapeutiques locales
 - Thérapeutiques systémiques intraveineuses : simulations pharmacologiques.
- Inconvénients :
 - Relativement chers
 - Tolérance limitée aux traitements antibiotiques prolongées (colites)
 - Pas d'outils immunologiques

Cellular Microbiology (2016)

doi:10.1111/cmi.12582

Adaptive processes of *Staphylococcus aureus* isolates during the progression from acute to chronic bone and joint infections in patients

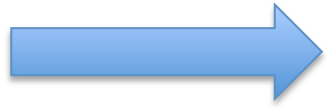
**Sophie Trouillet-Assant,^{1,2*,†} Lucie Lelièvre,^{1,†}
Patrícia Martins-Simões,^{1,2} Luiz Gonzaga,³
Jason Tasse,^{1,2} Florent Valour,^{1,4}
Jean-Philippe Rasigade,^{1,2,5} François Vandenesch,^{1,2,5}
Rafael Lucas Muniz Guedes,³
Ana Tereza Ribeiro de Vasconcelos,³
Jocelyne Caillon,⁶ Sebastien Lustig,⁷ Tristan Ferry,^{1,4}
Cédric Jacqueline,^{6,‡} Guilherme Loss de Moraes^{3,‡} and
Frédéric Laurent^{1,2,5,‡}**



Comparer *in vivo* dans un modèle murin expérimental 2 souches de *S. aureus* (GM1/GM2)

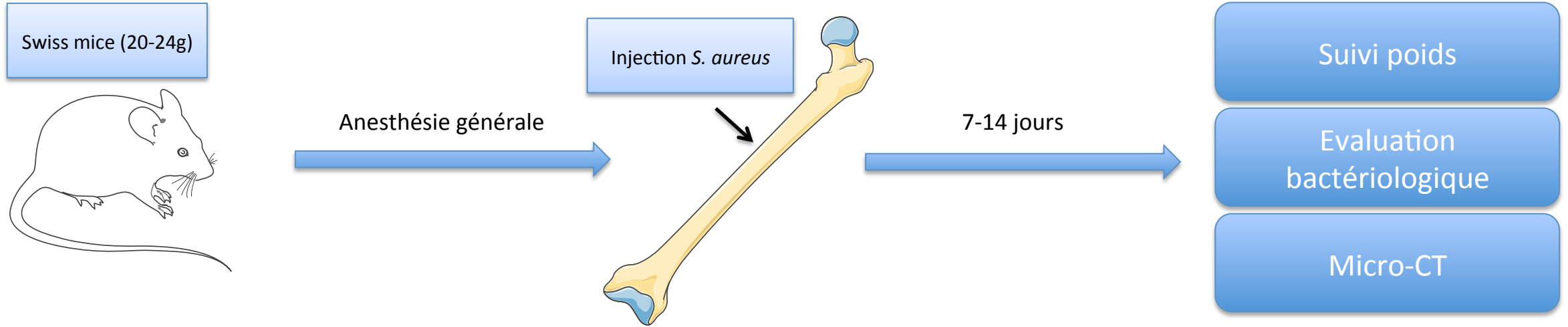
GM1 : infection initiale

GM2 : infection chronique (récidive)



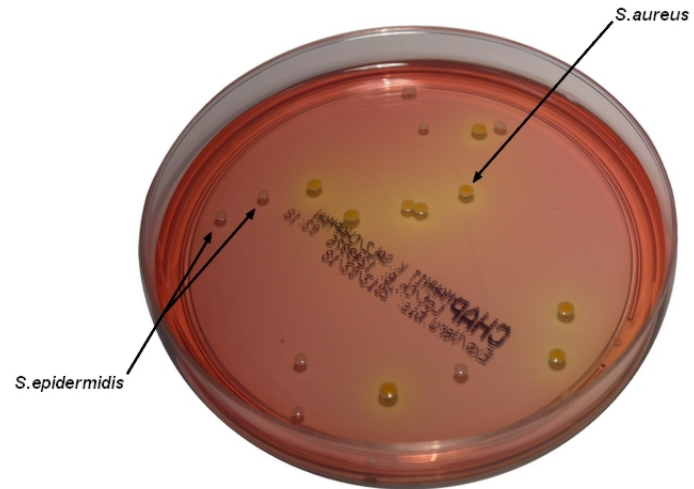
Mise au point modèle : stabilité infection ?

Modèle murin d'ostéomyélite expérimentale



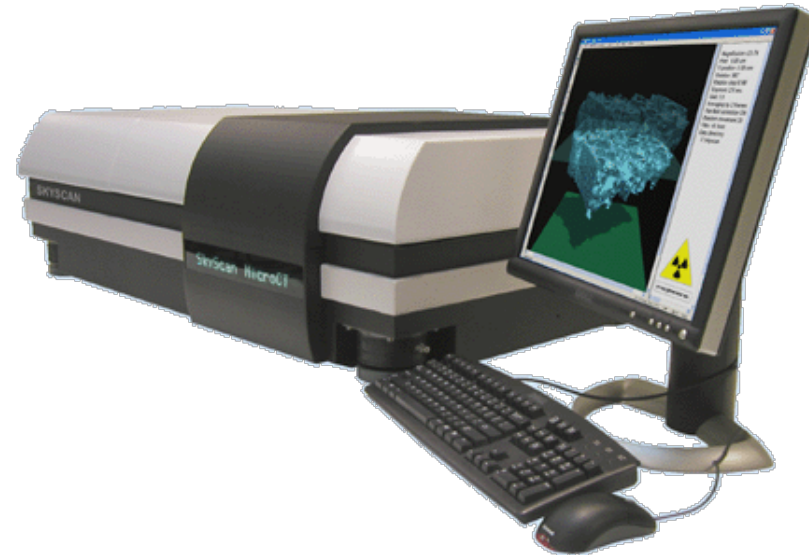
www.microbiologyinpictures.com

©

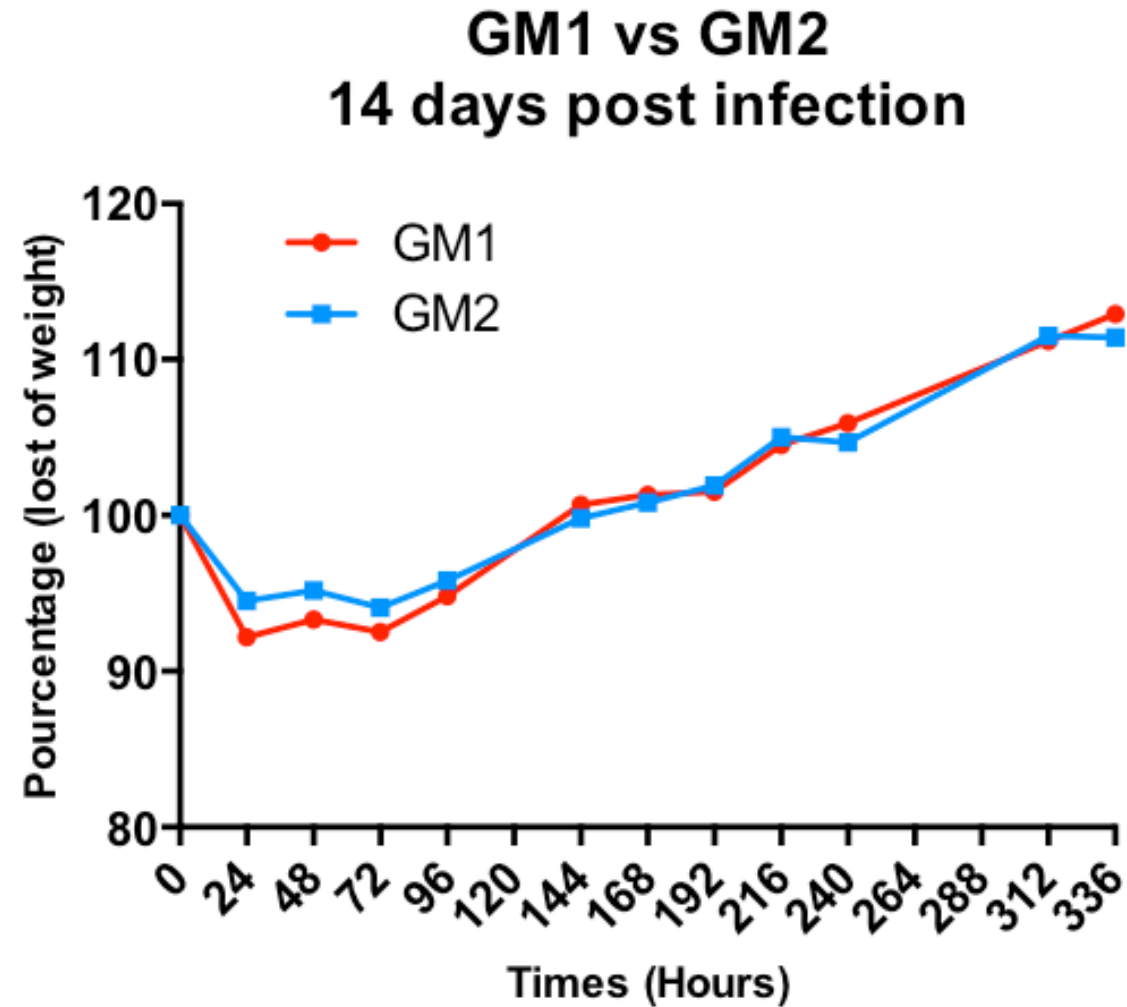


Han et al.

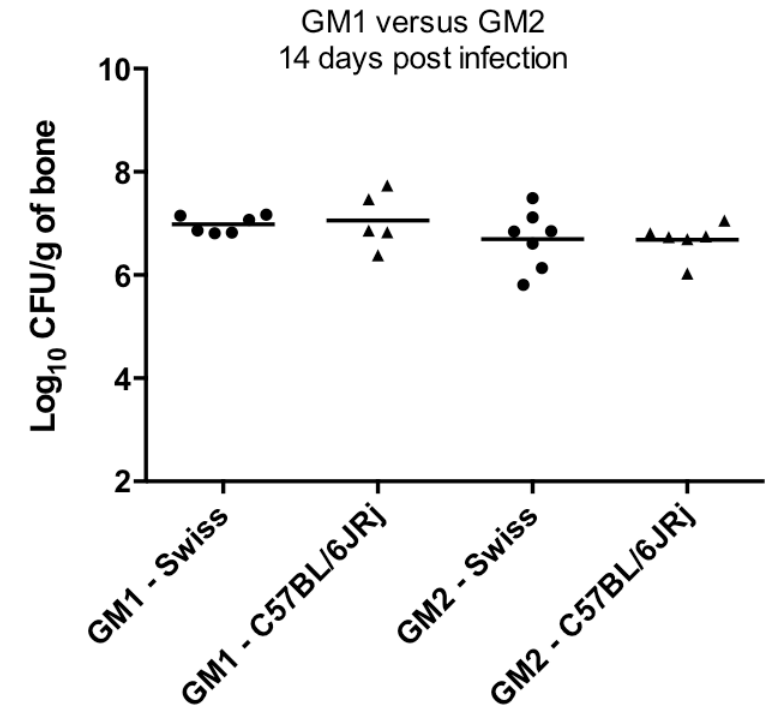
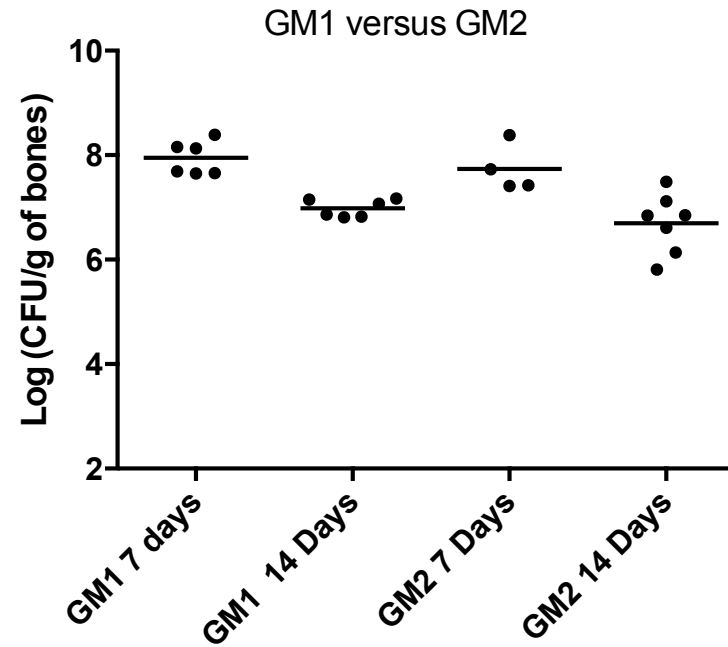
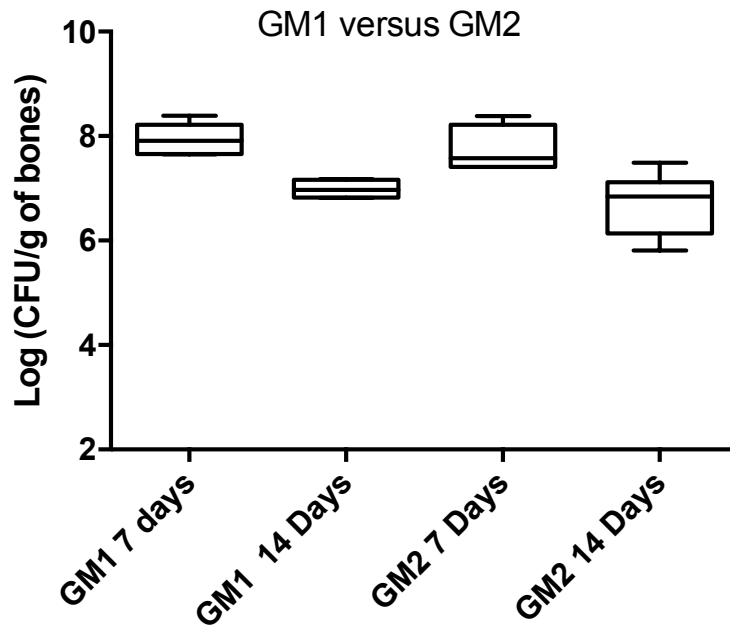
Mannitol Salt Agar



1. BODY WEIGHT CHANGE



2. QUANTITATIVE BACTERIOLOGY

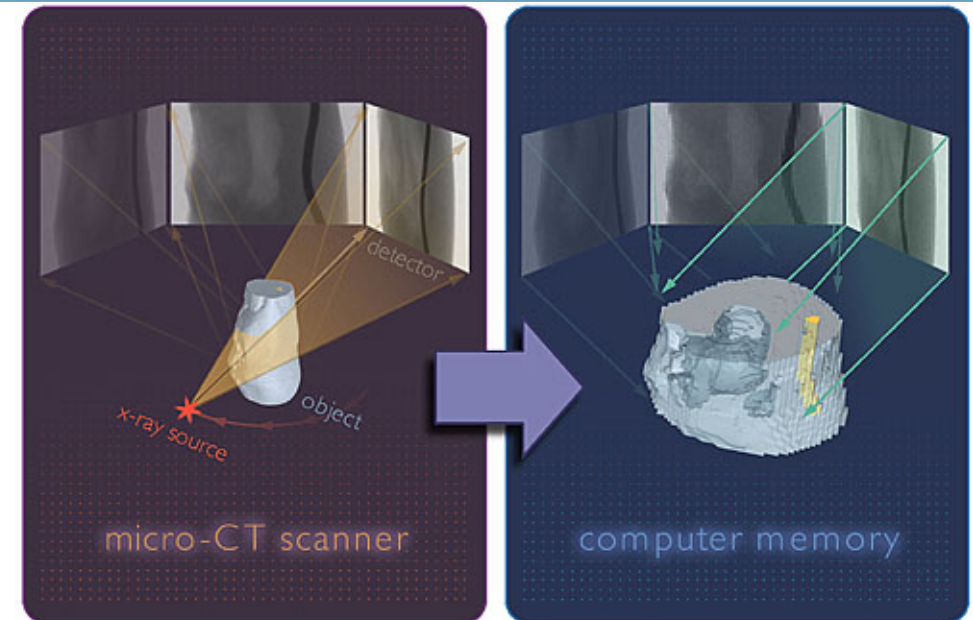


Microtomographie à rayons X (Micro-CT)

Microscopie non-invasive radiographique tridimensionnelle

La tomographie micro-informatisée est une imagerie radiographique tridimensionnelle, qui fait appel à la même méthode que celle des examens TDM à l'hôpital, mais sur une petite échelle et avec une résolution considérablement accrue. Il s'agit en fait d'une microscopie tridimensionnelle qui représente la structure interne d'objets sous la forme d'images non-destructives et à très petite échelle.

La microtomographie est disponible sous la forme d'instruments de bureau qui sont d'un emploi simple et qui produisent des images tridimensionnelles de la morphologie et de la microstructure interne de votre échantillon avec une résolution qui peut descendre à moins d'un micron.



0.00 mm

Scene

0.00 mm

Scene

0.28 mm

Scene

PBS
(Contrôle)



-0.42 mm

Scene 0.00 mm

Scene 0.31 mm

Scene

GM1



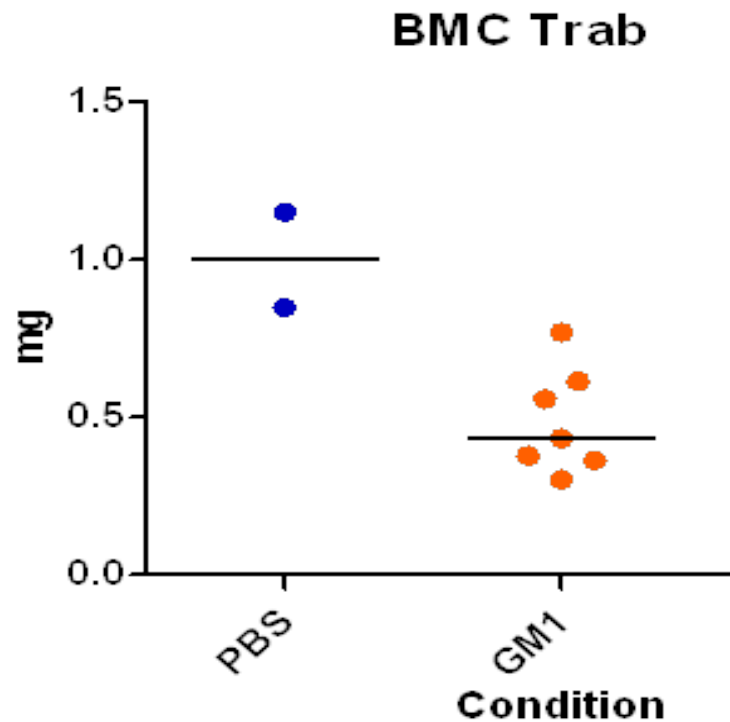
0.9 mm



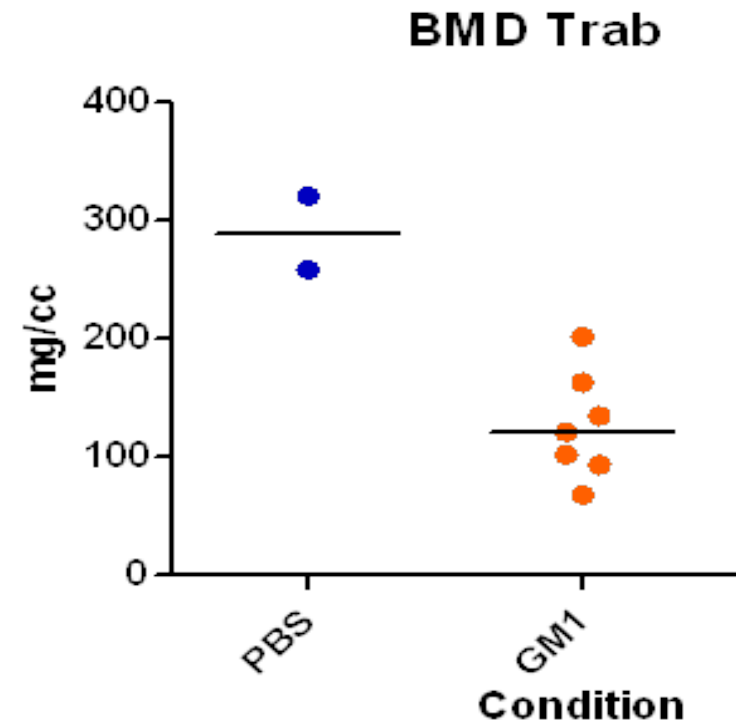
0.55 mm

44

Forte baisse post-infection de la densité minérale osseuse =
Impact de l'infection sur le remodelage osseux .

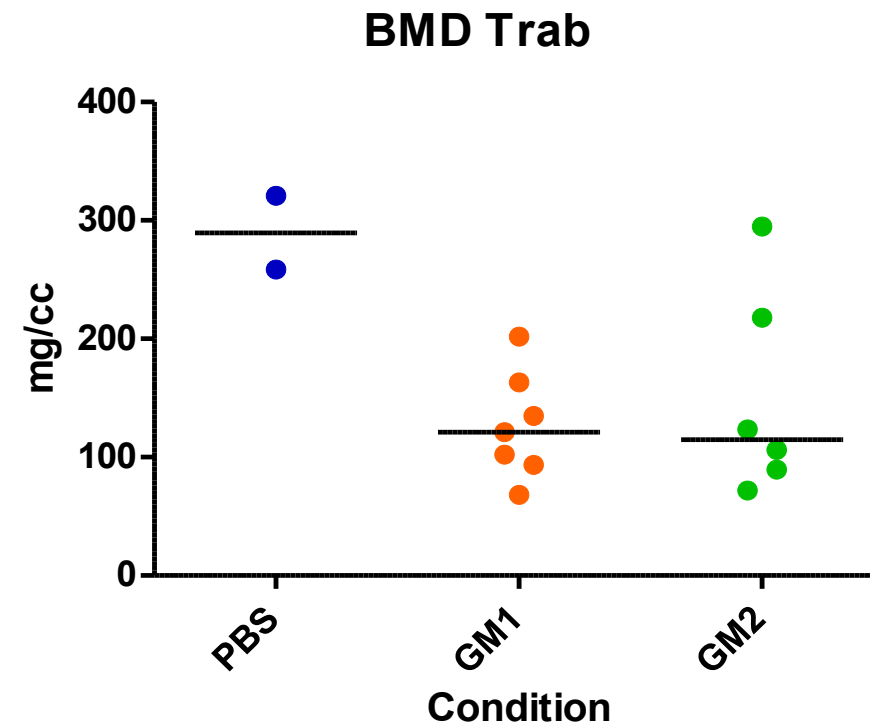
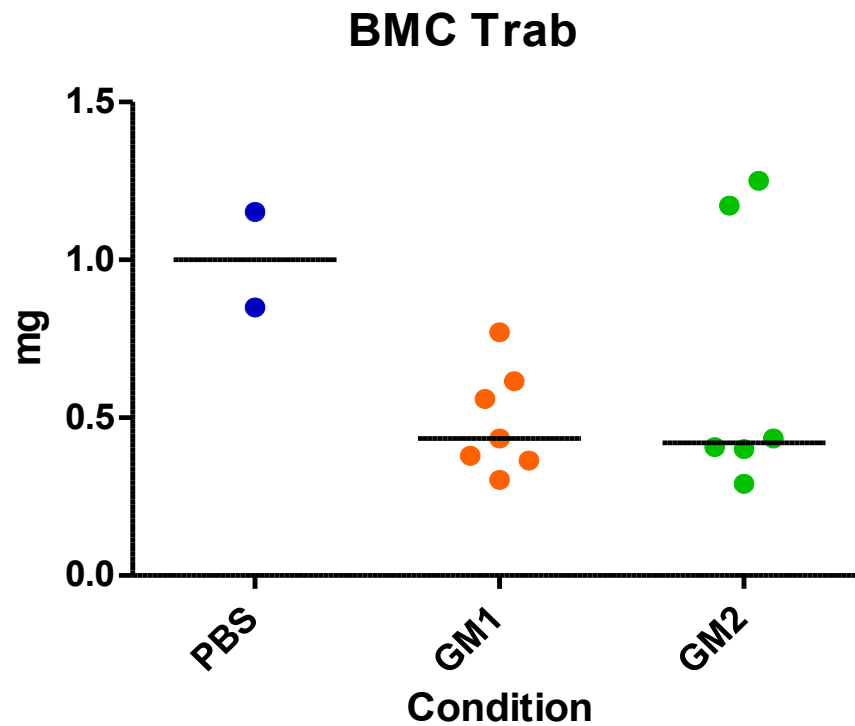


BMC = Contenu minéral de l'os
(calcium et phosphate)



BMD = Densité minérale osseuse
Masse minérale par volume d'os

Baisse similaire post infection de la densité minérale osseuse entre GM1 et GM2 =
**Impact de l'infection sur le remodelage osseux , pas de différence entre souche
initiale et souche chronique**



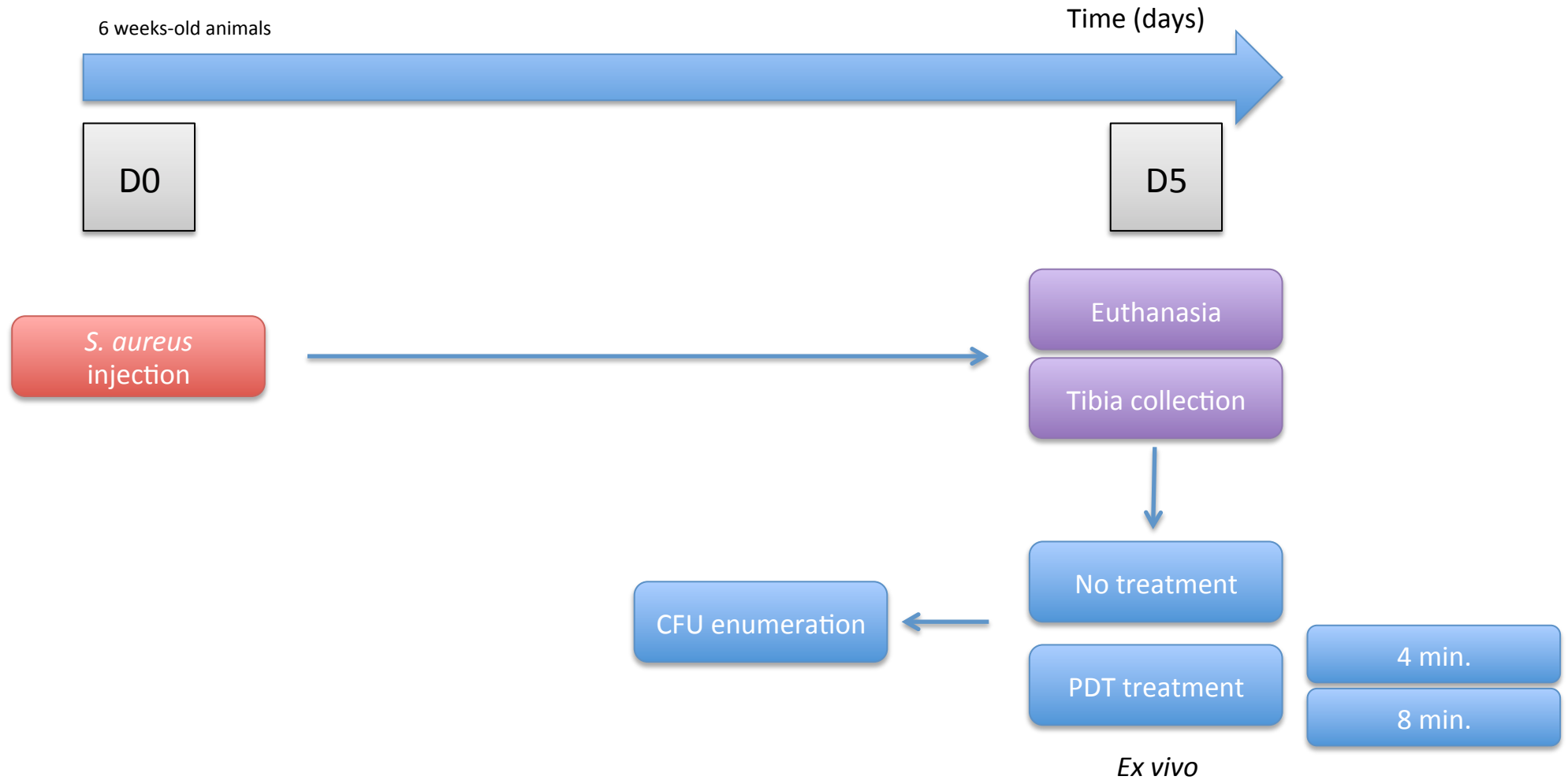
- On observe un **réel impact de l'infection sur l'os**
- **Pas de différence** significative sur le remodelage osseux **entre GM1 et GM2**
- Poursuite d'analyse sur les **marqueurs sériques** du remodelage et de l'inflammation à partir des sérums des souris.
 - Collagène Type I
 - RANKL
 - OPG
 - Ostéocalcine
 - Ostéopontine
 - IL6
 - TNF α

- Existe depuis plusieurs années en médecine bucco-dentaire dans le traitement des parodontopathies bactériennes.
- Le mécanisme d'action repose sur la création de radicaux libres par l'excitation de l'oxygène.
- Cette réaction est liée à l'énergie photonique libéré par le rayonnement d'un laser sur un **photosensibilisant**. Il en résulte une **bactéricidie** qui est au final une réaction cytotoxique photochimique.

Hypothèse : l'utilisation de la photothérapie dynamique antimicrobienne avec l'eau oxygénée est bactéricide *in vivo* dans un modèle d'infection osseuse à *S. aureus*.

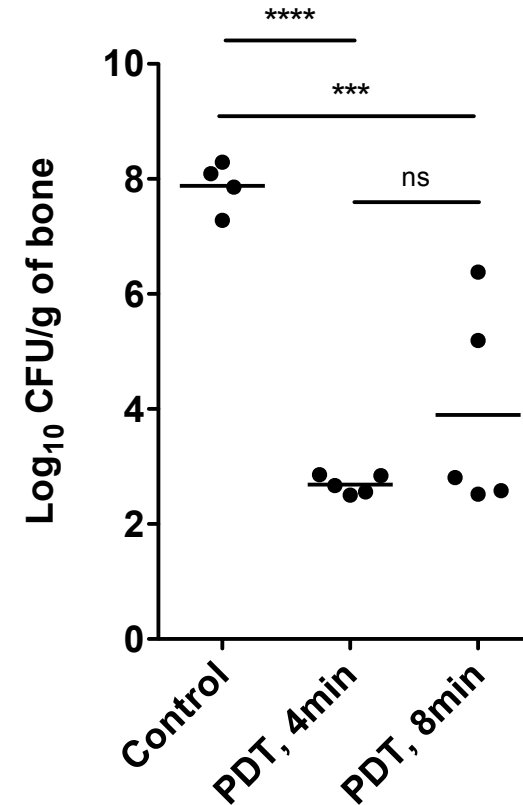
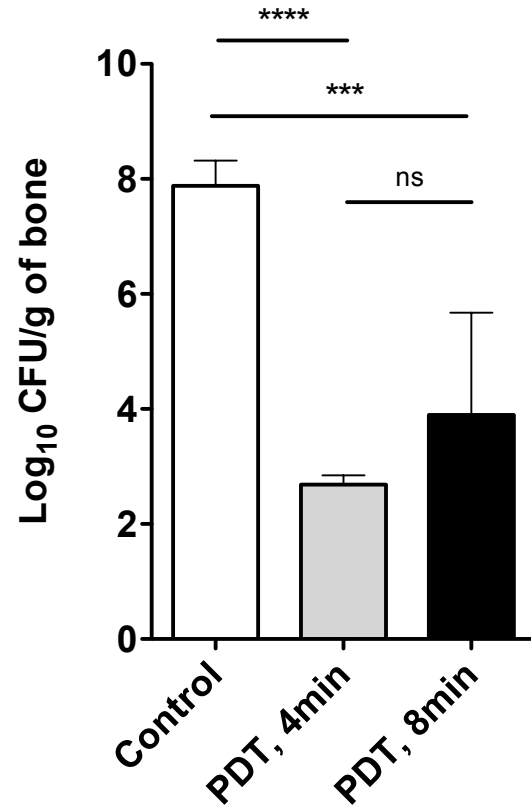


Photothérapie dynamique anti-bactérienne : une alternative ?



RESULTS (DAY5, UNTREATED VS PDT TREATMENT, 4 & 8 minutes)

Column bar graph, bone bacterial counts



Petits animaux

Avantages :

- Peu chers
- Faciles à manipuler
- Faciles à « loger »
- Effectifs nombreux possibles

Inconvénients :

- Simulations pharmacologiques et chirurgicales difficiles
- Peu tolérants aux traitements prolongés et manipulations multiples

Grands animaux

Avantages :

- Résistants
- Simulations pharmacologiques et chirurgicales aisées

Inconvénients :

- Chers
- Faibles effectifs
- Animaleries et équipements de grandes tailles
- Agressivité potentielle

- Toutes les bactéries ne greffent pas : fonction de la virulence entre autres facteur +++
- Difficultés d'étudier des bactéries autres que *S. aureus* (notamment staphylocoques blancs +++)

Etudes pilotes +++ :

- Capacités de greffe bactérienne
- Inoculum suffisant pour obtenir la reproductibilité, mais pas la létalité
- Stabilité de la greffe bactérienne

- Formation à l'analgésie des animaux.
- Limiter les procédures en nombres et en durée.
- **Dépôt de saisines avant toute procédure expérimentale pour passage devant comités d'éthique de l'expérimentation animale.**

- Une souris ou un lapin, ce n'est pas un homme.
- Les modèles expérimentaux sont simplistes.
- **Mais ils permettent l'exploration rapide et simple d'une piste physiopathologique ou thérapeutique ≠ recherche clinique.**
- Réserve : tout n'est pas réalisable et reproductible (peu de modèles hors *S. aureus*)

DIU « Prévention et prise en charge des infections ostéo-articulaires »

MODELES ANIMAUX EXPERIMENTAUX D'INFECTIONS OSTEO-ARTICULAIRES

24 novembre 2020

cedric.jacqueline@univ-nantes.fr



Cédric Jacqueline, UPRES EA 3826

Thérapeutiques Cliniques et Expérimentales des Infections

www.ea3826.univ-nantes.fr

