UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE 2012 N° 056

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu devant le jury interrégional
Le 8 octobre 2012
Par Anne-Sophie COGNEE

Conformément aux dispositions de l'arrêté
Du 6 mai 1987 tient lieu de :

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

ÉVALUATION DE L'INTÉRÊT DE LA PCR16S DANS LES INFECTIONS OSTÉO-ARTICULAIRES SUR PROTHÈSES
68 PATIENTS DU CHU DE POITIERS

Composition du jury :

Président : M. Alain Reynaud, Professeur de Bactériologie - Pharmacie - Nantes

Membres du jury : M. Christophe Burucoa, Professeur de Bactériologie - Médecine - Poitiers
M. Louis-Etienne Gayet, Professeur de Chirurgie orthopédique - Poitiers
M. Gwenaël Le Moal, Praticien hospitalier en Infectiologie - Poitiers
M. Stéphane Corvec, Maître de Conférences de Bactériologie - Nantes

Directeur : Mme. Chloé Plouzeau-Jayle, Praticien hospitalier en Bactériologie - Poitiers

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléotidique.
AMM : Autorisation de mise sur le marché.
ARN : Acide ribonucléotidique.
ASA : American Society of Anesthesiologist.
ATB : Antibiotiques.
BMR : Bactérie multi-résistante.
CASFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.
CMI : Concentration minimale inhibitrice.
CRIOGO : Centre de Référence des Infections Ostéo-articulaires du Grand Ouest.
CRP : Protéine-C-réactive.
Ct : Cycle seuil.
dNTP : Désoxyribonucléotides tri-phosphate.
ddNTP : Didéoxynucléotide tri-phosphate.
Eau PPI : Eau pour préparation injectable.
HACEK :*Haemophilus, Actinobacillus, Cardiobacterium, Eikenella, Kingella*.
HDP-Tc99m : Hydroxy-Diphosphonate marqué au Technetium 99.
HMPAO-Tc-99m : Hexa-Méthyl-Propylène-Amine-Oxime marquée au Technetium 99.
IFN-γ : Interféron-γ.
IL-1 ou IL-6 : Interleukine-1 ou Interleukine-6.
IMC : Indice de masse corporelle.
IPOA : Infections sur prothèses ostéo-articulaires.
IRM : Image par résonance magnétique.
ISO : Infections du site opératoire.
MHS : Mueller-Hinton au sang.
NNISS : National Nocosomial Infections Survey System.
PCR : Polymerase Chain Reaction.
PHRC : Programme Hospitalier de Recherche Clinique.
PSM : Poste de sécurité microbiologique.
PTE : Prothèse d'épaule.
PTG : Prothèse de genou.
PTH : Prothèse de hanche.
RAISIN :Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales.
RCP : Réunions de concertation pluridisciplinaires.
SARM :*Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline.
SASM :*Staphylococcus aureus* sensibles à la méticilline.
SERM :*Staphylococcus epidermidis* résistants à la méticilline.
SESM :*Staphylococcus epidermidis* sensibles à la méticilline.
SCN : Staphylocoques coagulase négative.
SCV : Small colony variants.
SOFCOT : Société française de chirurgie orthopédique et traumatologique.
SPILF : Société de pathologie infectieuse de langue française.
Tm : Température de fusion.
TNF-α : Tumor necrosis factor-α.
UFC : Unités formant colonies.
VPC : Vancomycine en perfusion continue.
VRE : Entérocoques résistants à la vancomycine.
VS : Vitesse de sédimentation.

SOMMAIRE

1 - INTRODUCTION 7

2 – LES INFECTIONS SUR PROTHÈSES OSTÉO-ARTICULAIRES 9

2.1 Classification des différents types d'infections 9
2.2 Epidémiologie 10
2.3 Facteurs de risque 11
2.3.1 Facteurs de risque pré-opératoires 11
2.3.2 Facteurs de risque opératoires 12
2.3.3 Facteurs de risque post-opératoires 12
2.4 Physiopathologie 13
2.4.1 Les modèles animaux 13
2.4.2 Phénomènes post-opératoires habituels après la pose de prothèse 13
2.4.3 Mécanismes physiopathologiques de l'infection sur prothèse 13
2.5 Diagnostic pré-opératoire 15
2.5.1 Critères cliniques 15
2.5.2 Critères biologiques 15
2.5.3 Critères radiologiques 17
2.6 Diagnostic bactériologique 19
2.6.1 Réalisation des prélèvements au bloc opératoire 20
2.6.2 Prétraitement des prélèvements osseux 20
2.6.3 Culture bactériologique 22
2.6.4 Les germes en cause 24
2.7 Arguments définissant le diagnostic d'infection 25
2.8 Diagnostic histopathologique 26
2.9 Traitement 27
2.9.1 Traitement chirurgical 29
2.9.2 Traitement antibiotique 34

3 – LA PCR 16S DITE « UNIVERSELLE » 43

3.1 Historique 43
3.2 Structure de l'ADN ribosomal 16S 43
3.3 Aspects techniques de la PCR 16S 45
3.3.1 Extraction de l'ADN bactérien 45
3.3.2 L'amplification 46
3.3.3 La détection du produit amplifié 48
3.3.4 Le séquençage 49
3.3.5 Interprétation des résultats 49
3.4 Applications de la PCR 16S 52
3.4.1 Identification de souches à croissance difficile 52
3.4.2 Identification de nouveaux genres ou espèces bactériennes 53
3.4.3 Diagnostic des infections à culture négative 53
3.5 PCR 16S et infections ostéo-articulaires 54
3.6 Limites de la méthode de la PCR16S - séquençage 55

4 – LE PROTOCOLE « MICROBIOS » 57

4.1 Le CRIOGO et ses objectifs 57
4.2 Le groupe des microbiologistes du CRIOGO 59
4.3 Description du protocole 60

5 – MATÉRIEL ET MÉTHODES 62
5.1 Patients 62
5.1.1 Critères d'inclusion 62
5.1.2 Critères d'exclusion 62
5.2 Méthodologie 62
5.2.1 Consentement du patient 62
5.2.2 Prélèvements opératoires 63
5.2.3 Pré-traitement des prélèvements à visée microbiologique 64
5.2.4 Mise en culture des prélèvements à visée microbiologique 64
5.2.5 Conservation des broyats 64
5.2.6 Suivi des cultures microbiologiques 64
5.2.7 Biologie moléculaire 65
5.2.8 Anatomopathologie 70
5.3 Recueil des données 71
6 – RÉSULTATS 71
6.1 Caractéristiques générales 71
6.1.1 Répartition des patients selon le type de prothèse 74
6.1.2 Répartition des cas selon le type d'infection 75
6.1.3 Antibiothérapie préalable à l'intervention chirurgicale 76
6.1.4 Prise en charge chirurgicale 77
6.2 Résultats des cultures bactériennes 78
6.2.1 Germes isolés en culture 79
6.2.2 Particularités des cultures bactériologiques de prélèvements osseux 83
6.2.3 Ponction pré-opératoire 84
6.2.4 Culture négative 84
6.2.5 Incidence de l'antibiothérapie 85
6.2.6 Résultats bactériologiques en fonction des différents milieux de culture 86
6.2.7 Illustration de quelques cas particuliers en culture 88
6.3 Résultats de la PCR 16S 92
6.3.1 Résultats par prélèvement et par patient 92
6.3.2 Germes mis en évidence par PCR 93
6.3.3 Pourcentage d'homologie des séquences 95
6.3.4 Cycles seuils 96
6.4 Concordance des différentes techniques 96
6.4.1 Concordance PCR/culture 96
6.4.2 Concordance PCR/ « gold standard » 102
6.5 Nombre de prélèvements positifs en PCR par patient 104
6.6 Sensibilité et spécificité de la PCR 105
6.7 Evaluation de la PCR en fonction du type d'infection (aiguë, chronique ou hématogène) 106
6.8 Résultats de l'anatomopathologie 107
7- DISCUSSION 109
8- CONCLUSION 118

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Biofilm de *Staphylococcus epidermidis* sur un matériel étranger en microscopie électronique (échelle 10 micromètres).....***17***
Figure 2 : Prothèse de hanche infectée.....***20***
Figure 3 : ScintigraphieHMPAO-Tc-99m chez un patient avec suspicion d'infection de la prothèse de hanche gauche : activité péri-prothétique visible.....***22***
Figure 4 : Vibro-broyeur automatisé à billes MM 400 Retsch® et pots à billes.....***23***
Figure 5 : Sonication d'implants.....***24***
Figure 6 : Colonies de *Staphylococcus aureus* issues du même clone d'origine,après 48 heures d'incubation sur gélose au sang.....***26***
Figure 7 : Micro-colonies de *Staphylococcus aureus* auxotrophes à l'hémine.....***26***
Figure 8 : Différentes stratégies thérapeutiques des infections sur prothèses ostéo-articulaires.....***31***
Figure 9 : Algorithme de décision pour le traitement des infections sur prothèses précoces ou hématogènes.....***33***
Figure 10 : Algorithme de décision pour le traitement des patients présentantdes infections sur prothèses ne permettant pas la conservation de celle-ci.....***35***
Figure 11 : Représentation schématique de l'opéron *rrn*.....***47***
Figure 12 : Représentation schématique de l'ARN 16S.....***47***
Figure 13 : Les différentes étapes de l'amplification par PCR.....***50***
Figure 14 : Courbe de dénaturation d'un amplicon d'une séquence del'ADNr 16S d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa*.....***51***
Figure 15 : Page internet de BIBI.....***54***
Figure 16 : Dendrogramme montrant les relations phylogénétiques entre27 espèces de Staphylocoques à partir de l'analyse de séquences de 500 paires de bases du gène *rrs*.....***55***
Figure 17 : Centres de référence interrégionaux des infections ostéo-articulaires.....***60***
Figure 18 : Schéma synthétisant les grandes étapes du protocole MICROBIOS.....***63***
Figure 19 : Bon de prescription spécifique pour les infections ostéo-articulaires.....***66***
Figure 20 : Thermocycleur ou appareil PCR temps réel Cepheid®.....***70***
Figure 21 : Courbes d'amplification par PCR 16S des témoins négatifs et positifs.....***70***
Figure 22 : Répartition du volume du broyat.....***71***
Figure 23 : Les différentes étapes dans le résultat de la PCR 16S sur un prélèvement.....***73***
Figure 24 : a) Type de prothèse suspecte d'infection et ayant nécessitéune intervention chirurgicale chez les cas b) Type de prothèse posée en1ère intention chez les témoins.....***78***
Figure 25 : Classement des cas par type d'infection.....***79***
Figure 26 : Classes d'antibiotiques administréesaux 15 cas avant l'opération.....***80***
Figure 27 : Classement des cas en fonction des résultats des cultures.....***81***
Figure 28 : Répartition (exprimée en %) des différents germes isolés en culturechez les 61 cas.....***82***
Figure 29 : Répartition des infections monobactériennes à Staphylocoques.....***83***
Figure 30 : Répartition (exprimée en %) des différents germes isolés en cultureen fonction du type de prothèse concerné.....***84***
Figure 31 : Germes retrouvés (exprimés en %) en fonction du type d'infection.....***85***
Figure 32 : Présence de colonies de tailles différentes de *Staphylococcus simulans*.....***86***
Figure 33 : Colonies d'aspect différent de *Propionibacterium acnes*.....***86***
Figure 34 : Répartition des patients à culture négative.....***87***
Figure 35 : Patient n°25, effet des antibiotiques.....***89***
Figure 36 : Détection des germes aéro-anaérobies facultatifs dans les différentsmilieux de culture utilisés.....***90***

Figure 37 : Détection des germes anaérobies dans les différents milieux de cultureutilisés..***91***
Figure 38 : Patient n°5, aspect des géloses à J7……...***91***
Figure 39 : Patient n°5, repiquage des Schaedler et des hémocultures……***92***
Figure 40 : Patient n°5, résultats des cultures……..***93***
Figure 41 : Patient n°26, résultats des cultures……***94***
Figure 42 : Patient n°35, résultats des cultures……***95***
Figure 43 : Répartition des différents germes mis en évidence par PCR……***97***
Figure 44 : Patient n°14, faible pourcentage de similitude (90%)……...***98***
Figure 45 : Organigramme de décision envisageable d'après les résultats de l'étude……...***119***

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Taux d'incidence des infections sur prothèses en fonction du score NNISS.....***13***
Tableau 2 : Score de *l'American Society of Anesthesiologist*.....***15***
Tableau 3 : Germes retrouvés dans les infections sur prothèses ostéo-articulaires.....***27***
Tableau 4 : Propositions d'antibiothérapie pour les infections à *Staphylococcus aureus* sensibles à la méticilline.....***42***
Tableau 5 : Propositions d'antibiothérapie en cas d'infection à *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline.....***43***
Tableau 6 : Propositions d'antibiothérapie en cas d'infections à streptocoques, entérocoques, anaérobies.....***44***
Tableau 7 : Propositions d'antibiothérapie en cas d'infection à bacilles Gram négatif.....***45***
Tableau 8 : Principaux « primers » utilisés en PCR 16S.....***51***
Tableau 9 : Caractéristiques de 3 banques de données différentes.....***54***
Tableau 10 : Caractéristiques générales des patients inclus dans l'étude.....***75***
Tableau 11 : Caractéristiques des 61 patients cas.....***76***
Tableau 12 : Caractéristiques des 7 patients témoins.....***78***
Tableau 13 : Prise en charge thérapeutique chirurgicale des 61 cas.....***80***
Tableau 14 : Concordance des résultats bactériologiques entre la ponction pré-opératoire et les prélèvements per-opératoires.....***87***
Tableau 15 : Résultats des PCR 16S.....***96***
Tableau 16: Nombre d'échantillons classés par pourcentage d'homologie selon BIBI et BLAST……..***98***
Tableau 17 : Récapitulatif des résultats des cultures et des PCR pour les 61 patients-cas....***100***
Tableau 18 : Concordance culture/PCR par prélèvement pour les 61 patients-cas…….....***101***
Tableau 19 : Pourcentage de faux négatifs en fonction de la bactérie……...***102***
Tableau 20 : Résultats des PCR 16S pour les prélèvements polybactériens en culture…....***103***
Tableau 21 : Récapitulatif des résultats des cultures et des PCR pour les 7 témoins……***103***
Tableau 22 : Concordance culture/PCR par prélèvement pour les 7 témoins……...***104***
Tableau 23 : Concordance culture/PCR par patient……..***104***
Tableau 24 : Classement des patients selon le « gold standard »……..***105***
Tableau 25 : Pourcentages de documentation de la culture et de la PCR en fonction du degré de certitude de l'infection……..***107***
Tableau 26 : Classement des échantillons en vrais positifs, faux positifs, vrais négatifs et faux négatifs pour la PCR par rapport au gold standard..……...***108***
Tableau 27 : Classement des échantillons en fonction du type d'infection……..***109***
Tableau 28 : Tableau 28 : Pourcentages de documentation en culture et en PCR en fonction du type d'infection ……..……...***109***
Tableau 29 : Résultats anatomopathologiques……***110***
Tableau 30 : Concordance culture/résultats anatomopathologiques……***110***

1 - INTRODUCTION

La pose de prothèse ostéo-articulaire est en constante progression depuis ces dernières années ; en France, elle a ainsi augmenté de 6,7% en 5 ans pour les prothèses de hanche, et de 23,7% pour les prothèses de genou. Plus de 147000 arthroplasties de hanche et 80000 de genou ont été réalisées en 2010[1]. Diverses complications en découlent, telles que les descellements aseptiques, les luxations, les fractures péri-prothétiques et les infections,dont la prise en charge estaujourd'hui un enjeu majeur de santé publique. C'est dans ce contexte qu'interviennent les centres de référence du CRIOGO (Centre de Référence des Infections Ostéo-articulaires du Grand Ouest), dans le but d'améliorer la prise en charge des infections ostéo-articulaires complexes, dont les infections sur prothèses.

La principale difficulté attribuée aux infections sur prothèses ostéo-articulaires concerneleur diagnostic,qui demeure très difficile malgré les divers outils biologiques et radiologiques existants. Lors du passage à la chronicité de l'infection, les bactéries se développent dans une matrice que l'on nomme « biofilm »qui les enferme et les protège des agents extérieurs. Dans ce biofilm, les bactéries « quiescentes » s'adaptent à l'environnement de la prothèse et sont donc difficilement mises en évidence par les techniques de bactériologie classiques. En cas de suspicion d'infection, une intervention chirurgicale est nécessaire.De multiples prélèvements sont alors réalisés, permettantd'augmenter les chances d'isoler le pathogène en cause et de les différencier des contaminantsde la flore commensale cutanée. La mise en évidence du pathogène est primordiale, conjointement au traitement chirurgical afin d'adapter l'antibiothérapie à long-terme et d'obtenir un traitement efficace pour éradiquer totalement l'infection.

Devant le développement majeur des techniques de biologie moléculaire au cours de ces dix dernières années, le groupe de microbiologistes du CRIOGO a décidé d'évaluer les performances de la PCR universelle 16S dans le diagnostic des infections sur prothèses ostéo-articulaires. Les résultats présentés dans ce travail concernent les 68 patients inclus au CHU de Poitiers entre novembre 2010 et janvier 2012 au cours du protocole MICROBIOS (Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC) interrégional). En plus de l'évaluation de la PCR 16S, les objectifs secondaires de ce protocole étaient d'une part de faire un point sur l'épidémiologie régionale des infections sur prothèses et, d'autre part,

d’évaluer l’apport des différents milieux de culture, en particulier l’ensemencement d’un flacon d’hémoculture avec le broyat du prélèvement.

2 – LES INFECTIONS SUR PROTHÈSESOSTÉO-ARTICULAIRES

2.1 Classification des différents types d'infections

Afin d'uniformiser et de définir des protocoles thérapeutiques clairs et applicables à toutes les situations, de nombreuses classifications des infections sur prothèses ostéo-articulaires ont vu le jour. Les critères à l'origine de ces classifications sont nombreux : la durée de l'évolution de l'infection, l'étiologie, la localisation, les micro-organismes en cause… Cependant, aucun de ces critères n'est assez pertinent pour qu'une classification soit parfaitement adaptée à toutes les situations, et puisse être universelle.

Suite à des études réalisées sur des prothèses de hanche et de genou, Tsukayama a proposé de séparer les infections sur prothèses en 4 catégories [2, 3]:

- infections post-opératoires précoces (<1 mois).
- infections tardives chroniques (>1 mois).
- infections d'origine hématogène.
- infections définies par l'existence de prélèvements bactériologiques positifs lors d'un remplacement de prothèse présumée aseptique.

En 2002, Mac Pherson proposait une classification des infections sur prothèses de hanche tenant compte du type d'infection, de l'état de santé et de l'immunité du patient, et de l'état de la plaie[4].

La classification la plus récente et la plus fréquemment utilisée dans la littérature, se base sur le délai de survenue de l'infection, qui reste indéniablement le facteur primordial à prendre en compte, puisqu'il conditionne la thérapeutique à mettre en œuvre afin d'optimiser les chances de guérison. On distingue donc les infections précoces (qui surviennent moins de 3 mois après l'intervention), les infections retardées (entre 3 mois et 2 ans) et enfin les infections tardives (plus de 2 ans après la chirurgie) [5].

On considère que les infections précoces ou retardées sont le plus souvent acquises durant l'intervention de pose de prothèse, alors que les infections tardives résultent d'une contamination hématogène. Les principales sources de bactériémies entraînant une infection tardive de la prothèse sont : infections cutanées, respiratoires, dentaires et urinaires[6].

2.2 Epidémiologie

Il n'existe pas de systèmede surveillance idéal des infections ; en effet, comme le montre Manian, aucun système n'a fait la preuve de sa supériorité sur les autres[7]. En France, la méthodologie la plus employée est celle proposée par le Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales (RAISIN). Elle nécessite une organisation complexe mais apparaît assez peu réactive et peu adaptée aux infections sur matériel ; en effet, la surveillance concerne les infections du site opératoire (ISO) en fonction du score NNISS (National Nocosomial Infections Survey System), mais ce suivi n'est réalisé que pendant le premier mois post-chirurgie. L'index NNISS est calculé à partir de 3 indicateurs que sont : l'état pré-opératoire du patient (mesuré par le scorede la classification de *l'American Society of Anesthesiologist*ou score ASA), la durée de l'intervention et le degré de contamination du site opératoire (classe de contamination d'Altemeier). En ce qui nous concerne, il ne permet donc de détecter que les infections aiguës. Le tableau 1 rassemble les données du groupe RAISIN de 2006 à 2010 [8].

Type d'intervention	Incidence pour les interventions NNISS=0	Incidence pour les interventions NNISS=1	Incidence pour les interventions NNISS > 1 (2 ou 3)	Incidence globale
Prothèse totale de hanche (PTH)	0,3%	0,7%	1%	0,4%
Prothèses articulaires de hanche (hors PTH)	0,7%	1,7%	6,3%	1,3%
Prothèses articulaires de genou	0,3%	0,5%	1,8%	0,4%
Autres prothèses articulaires	0,5%	1%	0%	0,6%

Tableau 1 : Taux d'incidence des infections sur prothèses en fonction du score NNISS[8].

Les données françaises sur les infections du site opératoire sur matériel en chirurgie orthopédique concernent principalement les prothèses articulaires de hanche et de genou. L'incidence des ISO en fonction du score NNISS est similaire aux autres données

internationales : une revue systématique de la littérature sur les infections profondes du site opératoire après arthroplastie primaire totale de hanche, a rapporté un taux d'incidence estimé avant la sortie de 0,2 % et des taux d'incidence allant de 0,2 % à 0,9 % dans les 90 jours post-opératoires [9].La plupart des surveillances épidémiologiques des ISO retiennent des définitions d'infection incluant des critères microbiologiques. Il existe cependant des infections sur matériel sans documentation, notamment en cas d'antibiothérapie préalable ; ceci sous-estime donc le nombre d'ISO.

Pour pallier à ce manque de recueil de données épidémiologiques, le registre français des PTH a été créé le 1er Janvier 2006. Il est hébergé par la Société française de chirurgie orthopédique et traumatologique (SOFCOT). Tous les chirurgiens orthopédistes français poseurs de PTH, membres de la SOFCOT ou non, peuvent avoir accès au registre sur le site de la SOFCOT. Il recueille des données simples, et permet en outre de comptabiliser les reprises de prothèse de hanche pour infection. Ce registre existe depuis trop peu de temps pour permettre une réelle estimation du taux d'infection sur prothèse de hanche, puisque le rapport de 2011 compte seulement 81 révisions déclarées de prothèses déjà inscrites au registre. Le taux de reprise pour descellement aseptique et infection chronique était alors de 2,5% et celui pour infection aiguë profonde 11,1%[10].

2.3Facteurs de risque

Afin de minimiser les infections sur prothèses ostéo-articulaires, les différents facteurs de risques ont été recherchés lors d'études cas-témoins ou d'études de cohorte[11, 12].On distingue ainsi les facteurs pré-opératoires, des facteurs opératoires et post-opératoires.

2.3.1 Facteurs de risque pré-opératoires

Les principales comorbidités retenues sont :

- l'obésité. Il a été démontré qu'un indice de masse corporel (IMC) égal ou supérieur à 35 est associé à un risque plus élevé de prélèvement per-opératoire positif lors d'une pose de prothèse de hanche. Le risque d'infection précoce qui en résulte passe de 3 à 20 % lorsque l'IMC est supérieur à 35[13],
- le diabète sucré,
- la polyarthrite rhumatoïde,
- des antécédents de tumeurs,
- une reprise d'arthroplastie préalable.

2.3.2 Facteurs de risque opératoires

Les facteurs de risque opératoire sont :

- un score > 2 dans la classification de *l'American Society of Anesthesiologist* (le « score ASA », décrit dans le tableau 2, est utilisé en pratique quotidienne presque partout dans le monde pour décrire l'état général d'un patient devant bénéficier d'une anesthésie),
- une chirurgie bilatérale simultanée,
- une arthroplastie située au genou,
- la durée opératoire.

Score 1	Patient sain, en bonne santé, c'est-à-dire sans atteinte organique, physiologique, biochimique ou psychique.
Score 2	Maladie systémique légère, patient présentant une atteinte modérée d'une grande fonction, par exemple : légère hypertension, anémie, bronchite chronique légère.
Score 3	Maladie systémique sévère ou invalidante, patient présentant une atteinte sévère d'une grande fonction qui n'entraîne pas d'incapacité, par exemple : angine de poitrine modérée, diabète, hypertension grave, décompensation cardiaque débutante.
Score 4	Patient présentant une atteinte sévère d'une grande fonction, invalidante, et qui met en jeu le pronostic vital, par exemple : angine de poitrine au repos, insuffisance systémique prononcée (pulmonaire, rénale, hépatique, cardiaque...).
Score 5	Patient moribond dont l'espérance de vie ne dépasse pas 24 h sans intervention chirurgicale. (Patient moribond dont la survie est improbable sans l'intervention : source SFAR).
Score 6	Patient en état de mort cérébrale, candidat potentiel au don d'organes (selon critères spécifiques).

Tableau 2 : Score de *l'American Society of Anesthesiologist.*

2.3.3 Facteurs de risque post-opératoires

Parmi les facteurs post-opératoires, le plus important semble être l'existence d'une infection superficielle du site chirurgical ou d'une bactériémie, ce qui augmente de 35% le risque d'infection de la prothèse.La formation d'un hématome ou un drainage post-chirurgical persistant augmente le risque d'infection du site chirurgical superficiel et par contiguïté d'une infection profonde[14].

D'autres facteurs sont également à prendre en compte :

- les infections nosocomiales (surtout urinaires),

- les transfusions sanguines,
- la durée d'hospitalisation,
- les survenues de fibrillation auriculaire et d'infarctus du myocarde, pathologies nécessitant l'administration de traitements anticoagulants qui majorentle risque d'infection.

Une étude récente a été menée afin de rechercher si les facteurs de risque différaient selon la localisation anatomique de la prothèse : certains, comme l'obésité ou la présence d'un drain au site opératoire, semblent être impliqués essentiellement dans les infections de prothèses de hanche plutôt que celles de genou[15].

2.4 Physiopathologie

2.4.1 Les modèles animaux

Différents modèles animaux (lapins, chiens, rats, cobayes, la plupart avec du *Staphylococcus aureus* ou *epidermidis*) ont été créés afin de mieux comprendre la physiopathologie de l'infection sur prothèse, les mécanismes de défense de l'hôte, la pharmacocinétique et l'efficacité in vivo et in vitro des antibiotiques[16]. Le modèle de cage tissulaire élaboré par Zimmerli démontre qu'un très faible inoculumbactérien suffit à l'infection de la cage, et que l'activité des polynucléaires décroît très rapidement dans le temps ; il n'y a donc pas de guérison spontanée possible sans l'ablation de la cage et les traitements antibiotiques de courte durée ne permettent pas l'éradication des agents pathogènes[17]. D'autres modèles plus sophistiqués ont été créés, notamment le modèle orthopédique de prothèse chez le lapin [18, 19].

2.4.2 Phénomènes post-opératoires habituels après la pose de prothèse

Durant les mois qui suivent la pose d'une prothèse, il existe une hyper-vascularisation osseuse et tissulaire péri-prothétique. Ce phénomène est lié à la libération de radicaux oxygénés libres et de médiateurs tels que l'Interleukine-1 (IL-1), le tumor necrosis factor-α (TNF-α) et l'Interféron-γ (IFN-γ)… En cas d'évolution post-opératoire favorable, ces sécrétionss'atténuent au fil des mois avec l'apparition d'un tissu scléreux avasculaire peu perméable.

2.4.3 Mécanismes physiopathologiques de l'infection sur prothèse

La surface des prothèses n'est pas un support inerte, elle constitue une interface réactive avec

l'environnement susceptible de créer des conditions favorables à l'adhésion bactérienne.
Les oxydes composant cette surface interagissent avec les glycoprotéines tissulaires, offrant une surface d'interaction liante avec les bactéries [20]. Les microorganismes sont enfermés dans une matrice constituée de fibrine, qui va établir des liaisons spécifiques avec les bactéries par le biais de récepteurs ou de liaisons répulsives et attractives [21, 22] : ainsi se forme ce que l'on appelle le biofilm (figure 1). Par exemple, l'adhérence de *Staphylococcus epidermidis*est générée en deux temps ; tout d'abord, elle se construit à l'aide d'interactions non spécifiques (hydrophobes, électrostatiques…), puis par la formation du biofilm médiée par l'adhésine polysaccharidique intercellulaire encodée par un opéron [23, 24]. La constitution de ce biofilm fait donc l'objet de nombreuses études concernant les espèces de staphylocoques, mais également les entérobactéries [25].

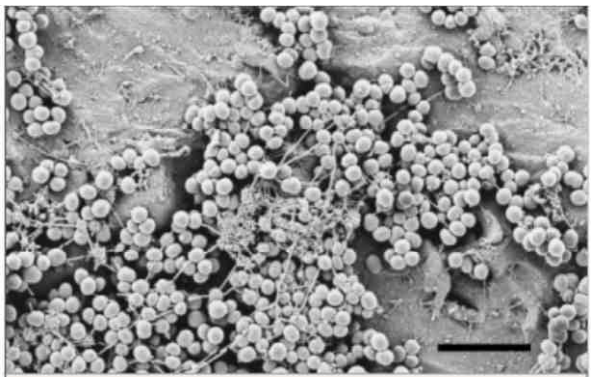


Figure 1 : Biofilm de *Staphylococcus epidermidis* sur un matériel étranger en microscopie électronique (échelle 10 micromètres).

Lorsque la densité bactérienne est élevée, apparaît alors le phénomène de « quorum sensing » : les bactéries, en produisant des molécules de signalement diffusibles, entraînent l'expression de gènes spécifiques nécessaires à leur survie dans ces conditions hostiles[26]. Le biofilm les protège de l'action des antibiotiques et de la réponse immunitaire de l'hôte, ce qui leur procure une résistance bien plus élevée[27].
Le type de matériel prothétique entre en jeu : en effet, il a été démontré que certaines bactéries ont un pouvoir d'adhésion plus important selon que le matériel soit en polyéthylène, cobalt ou titane et selon que la surface soit lisse ou rugueuse [28].*Staphylococcus aureus* aurait une adhérence préférentielle sur les métaux ainsi que sur les tissus nécrotiques, alors que *Staphylococcus epidermidis* aurait une adhérence préférentielle sur les biomatériaux polymériques [21].

Les particules de cobalt, de chrome, de titane peuvent altérer la phagocytose[29]. En effet, les polynucléaires chargés de particules dans leur cytoplasme se révèlent incapable de phagocyter les bactéries, favorisant ainsi le développement de l'infection [30].
Enfin, le ciment utilisé pour stabiliser les prothèses peut également provoquer au contact de l'os cortical une dévascularisation et une nécrose osseuse [31]. Les conditions sont alors réunies pour permettre une colonisation bactérienne de l'implant.

2.5 Diagnostic pré-opératoire

Etablir un diagnostic définitif d'infection sur prothèse ostéo-articulaire avant toute intervention chirurgicale est parfois fastidieux. Ce diagnostic repose sur un faisceau d'arguments cliniques, biologiques et radiologiques.

2.5.1 Critères cliniques

En premier lieu, il est important de noter que les signes et symptômes cliniques sont très peu fiables. La fièvre, les frissons, un érythème ou œdème cicatriciel sont souvent absents, surtout en cas d'infection chronique, ce qui rend ces critères trop peu sensibles. La présence d'une fistule a une très forte valeur prédictive positive, mais ce signe est très inconstant. Les douleurs articulaires représentent le symptôme le plus présent (90% des cas), mais il peut être retrouvé dans un grand nombre de situations cliniques non infectieuses : descellement aseptique, instabilité mécanique…[32, 33].

2.5.2 Critères biologiques

a. Dosages sanguins

Aucun paramètre biologique n'est à lui seul spécifique de l'infection sur prothèse. L'étude des marqueurs inflammatoires sanguins (CRP, vitesse de sédimentation, leucocytose…)est bien évidemment recommandée lors du bilan diagnostic. Cependant, l'interprétation de ces dosages nécessite quelques pré-requis : en effet, la chirurgie entraîne une augmentation non pathologique de ces paramètres jusqu'à deux semaines après la pose de prothèse[34].
Le dosage sanguin le plus sensible et le plus spécifique serait celui de l'interleukine-6 (IL-6), suivi de celui de la CRP, puis la VS et enfin la leucocytose [33]. L'IL-6 est produite par les macrophages et monocytes stimulés, ce qui induit la production de différentes protéines de l'inflammation aiguë, dont la CRP. Les propriétés cinétiques de l'IL-6 en font un marqueur

intéressant en cas de suspicion d'infection précoce sur prothèse ostéo-articulaire ; en effet, son taux est élevé pendant les deux jours après la pose de prothèse, puis il diminue rapidement à sa valeur normale. A noter cependant que, d'une part, ce dosage n'est pas effectué en routine dans les laboratoires, et que d'autre part le nombre d'études scientifiques portant sur l'intérêt de ce marqueur est insuffisant.

La CRP est une protéine de la phase aiguë, elle est produite par le foie en réponse à l'inflammation, l'infection ou la cancérogénèse. On note un pic de CRP 2 ou 3 jours après l'intervention, puis son taux se normalise trois semaines après.

La plupart des experts considère qu'une CRP et une VS négatives permettent d'éliminer le diagnostic d'infection [35]. A contrario, les seuils minimaux au-delà desquels l'existence d'une infection est suspectée, oscillent entre 22 et 30 mm pour la VS et entre 10 et 13,5 mg/l pour la CRP. Ces valeurs sont utilisables uniquement trois mois après la pose de la prothèse. Ces paramètres ont respectivement des valeurs de sensibilité de 82 à 93 % et de 91 à 97 % et des valeurs de spécificité de 84% et de 86 à 92 %[36].L'intérêt du dosage de la CRP résulte bien plus de sa cinétique obtenue que de son taux mesuré.

b. *Ponction du liquide synovial*

La ponction articulaire pré-opératoire semble être l'outil diagnostic le plus contributif dans l'hypothèse d'une infection sur prothèse [37].Cependant, la sensibilité de la culture de cette ponction varie considérablement entre les différentes études menées : de 10 à 100% [38]. Cette aspiration doit être réalisée au bloc opératoire, dans des conditions d'asepsie strictes.

Les variations inter-laboratoires des conditions de transport, d'ensemencement ou de milieu de culture peuvent expliquer en partie ces différences notables de sensibilité ; ainsi, l'ensemencement dans un flacon d'hémoculture directement au bloc opératoire optimise les chances d'isoler la bactérie en cause si tel est le cas. Le principal intérêt d'un tel geste invasif est de permettre l'identification préalable de la bactérie en cause afind'effectuer un changement en un temps de la prothèse avec la mise en place rapide d'un traitement efficace.

La cytologie du liquide synovial permet de s'orienter vers une étiologie infectieuse ou non : pour les ponctions de genou, on retient une numération de blancs supérieure à $1,7.10^3/\mu L$ et un pourcentage de polynucléaires neutrophiles supérieur à 65% comme valeurs seuils[39]. Ces mêmes seuils, utilisés pour les prothèses de hanche, ont montré des résultats similaires.

Le dosage des lactates dans le liquide synovial ne présente pas d'intérêt ; en effet, son taux augmente dans de nombreuses situations autres que les infections : réactions allergiques,

inflammation due aux particules de ciment… [36]. Par contre, une étude récente montre que le taux de leucocyte estérase, enzyme sécrétée par les polynucléaires neutrophiles, pourrait être fortement corrélé à la présence ou non d'une infection. Ainsi, un simple test colorimétrique très facile d'utilisation suffit à donner une réponse qualitative en 2 minutes et ainsi à orienter le diagnostic [40, 41].

2.5.3 Critères radiologiques

a. Radiographies standard

Même si les radiographies standard restent normales dans 50% des cas, il est fortement recommandé de les réaliser en raison de la simplicité et de la rapidité de cet examen. On réalise des clichés de face et de profil, afin de rechercher différents signes tels que :

- un descellement partiel ou total de l'implant,
- la présence d'un séquestre que constitue un petit fragment osseux très dense,
- un liseré clair et étendu autour du matériel,
- des zones d'ostéolyse floues et mal définies (figure 2),
- la présence de gaz intra-articulaire,
- une réaction périostée extensive circonférentielle[42, 43].

Ces signes rarement présents et non spécifiques d'une infection font de la radiographie un examen non sensible et non spécifique.

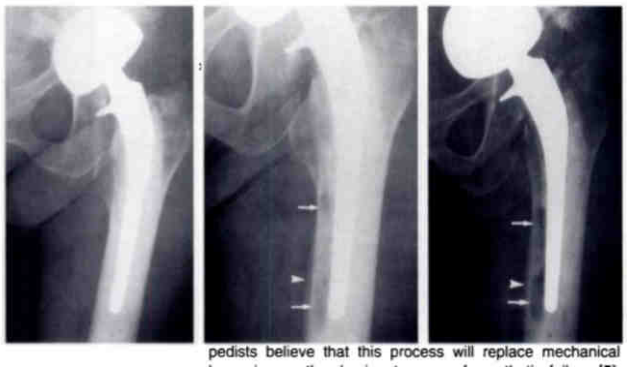


Figure 2: Prothèse de hanche infectée. A : radiographie initiale normale. B : radiographie réalisée 6 mois après la pose, dévoilant des lacunespéri-prothétiques. C : radiographie réalisée 5 mois plus tard, révélant une aggravation des zones d'ostéolyse[42].

b. Scanner

Le scanner permet l'étude du positionnement des implants, la recherche d'une fracture, le dépistage des conflits entre la prothèse et le psoas [44]. Cet examen a longtemps souffert

d'une mauvaise réputation en raison des artéfacts métalliques générés par les prothèses articulaires (artéfacts liés à la composition du métal et à la géométrie des pièces acétabulaire et fémorale). Bien qu'une série d'éléments puissent limiter ces artéfacts, le scanner ne fait pas parti des examens de choix.

c. *Imagerie par résonance magnétique (IRM)*

Cette même problématique d'artéfact est retrouvée pour l'IRM. Cependant, cet examen permet de visualiser parfaitement les parties molles péri-osseuses, et également la plupart des anomalies péri-prothétiques fémorales. L'IRM reste un examen en développement, et n'est pas réalisée en pratique courante [45].

d. *Echographie*

L'échographie ne permet évidemment pas de juger de la bonne intégration ou du bon positionnement des pièces prothétiques. Elle permet néanmoins de mettre en évidence des anomalies ab-articulaires, la présence de collections liquidiennes para-prothétiques…C'est la seule imagerie des parties molles à ne pas être handicapée par les pièces métalliques intra-osseuses [46].

e. *Scintigraphie*

La scintigraphie osseuse est un examen très utile dans l'évaluation des arthroplasties douloureuses et dans les suspicions de descellement septique de prothèse. Il est à noter toutefois que cet examen n'a pas de valeur en post-opératoire immédiat, puisqu'il persiste une anomalie de fixation variant entre 6 et 12 mois pour la hanche et jusqu'à 24 mois pour le genou.

Une scintigraphie à l'Hydroxy-Diphosphonate marqué au Technetium 99 (HDP-Tc99m) traduit l'activité ostéoblastique et comporte 3 temps successifs : vasculaire, tissulaire et osseux plus tardif. Une fixation anormale aux 3 temps est évocatrice d'infection[47]. Sa sensibilité est de 90 à 100%, mais sa spécificité ne dépasse pas les 40%. Cet examen présente donc une très forte valeur prédictive négative[48].

On peut augmenter la sensibilité de cet examen en lui associant une scintigraphie aux polynucléaires marqués à l'Hexa-Méthyl-Propylène-Amine-Oxime marquée au Technetium 99 (HMPAO-Tc-99m), avec images tardives après la réinjection des polynucléaires [49, 50]. En cas d'infection, la fixation anormale doit persister sur les clichés réalisés 24 heures plus tard (figure 3). Cet examen peut éventuellement être complété par un scanner hélicoïdal

couplé à une tomographie par émission monophotonique (TEMP-TDM), qui permet d'améliorer la localisation du foyer infectieux. Cette scintigraphie présente l'avantage d'avoir une meilleure spécificité, et de pouvoir être réalisée dès 6 mois après la pose de la prothèse.

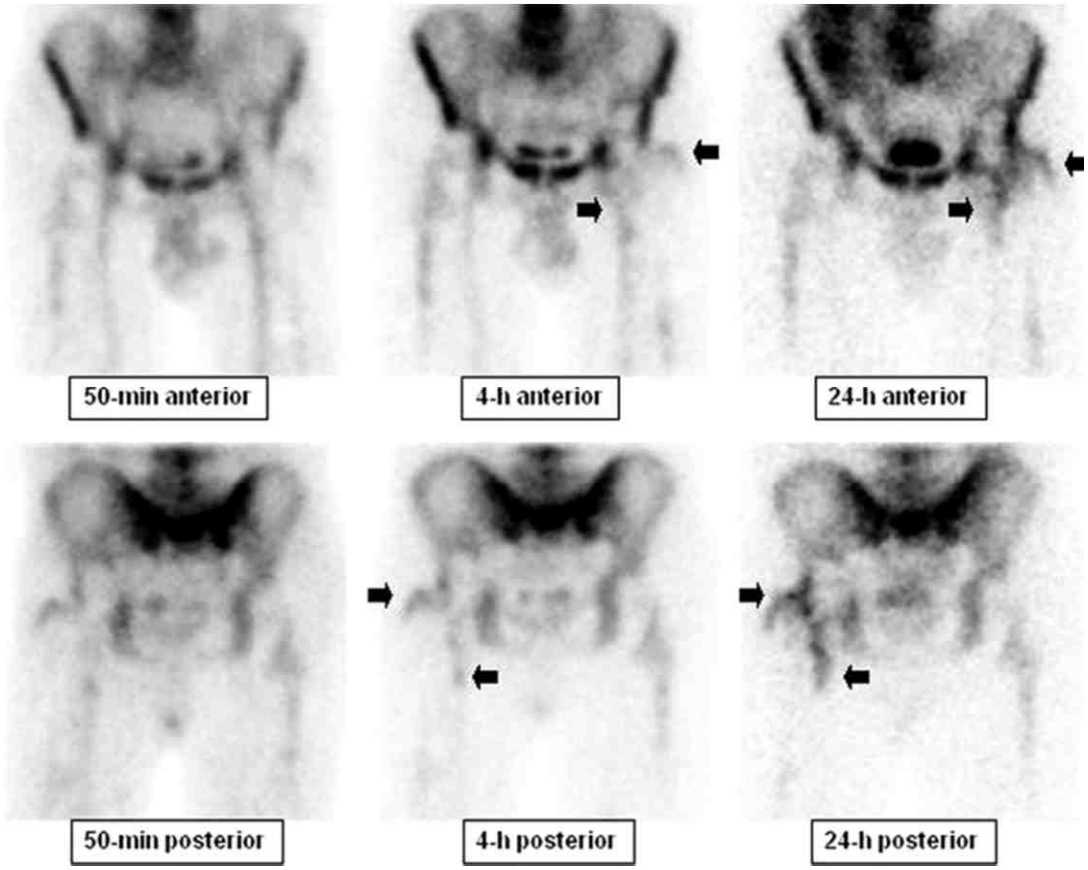


Figure 3: ScintigraphieHMPAO-Tc-99m chez un patient avec suspicion d'infection de la prothèse de hanche gauche : activité péri-prothétique visible[51].

La tomographie d'émission de positons au 18-FDG n'a pour l'instant pas d'indication dans le diagnostic d'infection sur prothèse [52, 53].

2.6 Diagnostic bactériologique

La documentation bactériologique des infections sur matériel associée à la détermination de la sensibilité des antibiotiques constitue une étape indispensable dans le diagnostic.
La fiabilité du diagnostic bactériologique dépend de la qualité des prélèvements, des modalités de leur transport jusqu'au laboratoire et des techniques utilisées.

Enfin, de nombreuses études récentes démontrent l'intérêt de soniquer les prothèses retirées lors de la chirurgie, afin de détruire le biofilm adhérent avant la mise en culture et ainsi d'augmenter les chances de positivité. La prothèse est soumise à une sonication de 35-40 Hz pendant 5 minutes, et le liquide en résultant est ensemencé sur les différents milieux de culture (figure 5). Les premiers essais montrent un gain de sensibilité de la culture significatif, mais un manque de spécificité dû à la contamination des sacs plastiques utilisés lors de la sonication [58, 59]. L'utilisation de containers stériles associée à une étape de vortexage préalable à la sonication permet d'obtenir une spécificité équivalente aux méthodes classiques de prétraitement des échantillons[60]. Afin de différencier les prothèses réellement infectées de celles contaminées lors de la culture, Holinka détermine une quantification des Unités formant colonies (UFC) pour chaque bactérie mise en évidence et propose une valeur seuil minimum de 3 UFC pour conclure à une infection[61].

Les études divergent quant à l'augmentation de la sensibilité chez les patients ayant reçu une antibiothérapie avant le retrait de la prothèse ; théoriquement, les bactéries planctoniques présentes dans les tissus sont plus sensibles aux antibiotiques que les bactéries du biofilm. La sonication devrait donc diminuer le nombre de faux négatifs en culture, et permettre de mieux mettre en évidence les bactéries présentes lors de l'infection[60, 61].

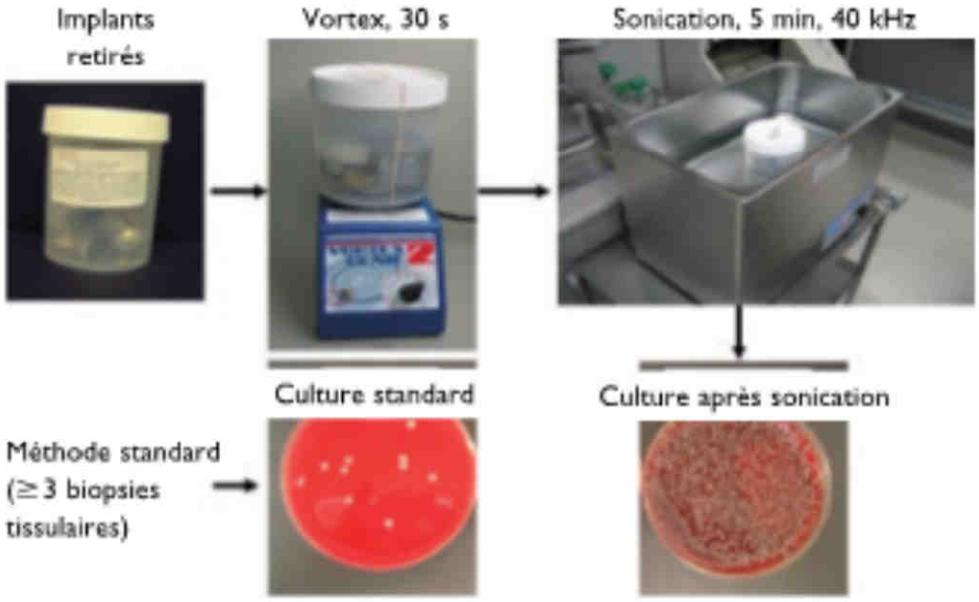


Figure 5 : Sonication d'implants[62].

2.6.3 Culture bactériologique

Qu'ils soient liquides ou solides, tous les prélèvements osseux doivent être ensemencés sur des milieux riches utilisés habituellement au laboratoire, tels que la gélose au sang cuit supplémentée en polyvitamines (incubée sous 5% de CO2 à 37°C), la gélose au sang (incubée à 37°C en aérobiose et anaérobiose), les milieux liquides enrichis type Schaedler…La culture des broyats osseux en flacon hémoculture représente un très bon milieu de culture, tout comme les milieux liquides enrichis à la viande, et permet d'obtenir moins de faux négatifs qu'avec les milieux gélosés [63].
L'incubation des milieux de culture doit impérativement être prolongée pour permettre la croissance des bactéries exigeantes : le délai de 14 jours est conseilléplutôt que celui habituellement utilisé de 7 jours afin de mettre en évidence les bactéries du genre *Propionibacterium*ou bactéries anaérobies du genre *Peptostreptococcus* [64]. En effet, si 48h suffisent pour la plupart des espèces de*Staphylococcus, Enterococcus, Enterobacteriacae*, etc, on recommande de garder les cultures aérobies et anaérobies pendant 13 jours pour maximiser les chances d'isoler un éventuel *Propionibacterium acnes*[65].

Lorsque l'infection est due à des Staphylocoques coagulase négative en particulier*Staphylococcus epidermidis*, il est très fréquent de retrouver des colonies d'aspect très différent. Il est alors indispensable de réaliser des antibiogrammes sur chaque type de colonie variant phénotypiquement, car ilspeuvent être très différents même si les bactéries appartiennent au même clone d'origine[66].
Le délai d'incubation est un facteur crucial, puisqu'il permet également d'isoler les micro-colonies de bactéries à croissance lente ou « small colony variants »(SCV) ; elles apparaissent en plusieurs jours avec un aspect atypique (diminution de la pigmentation des colonies, de l'hémolyse…), leur subculture est fastidieuse [67, 68] (figure 6).

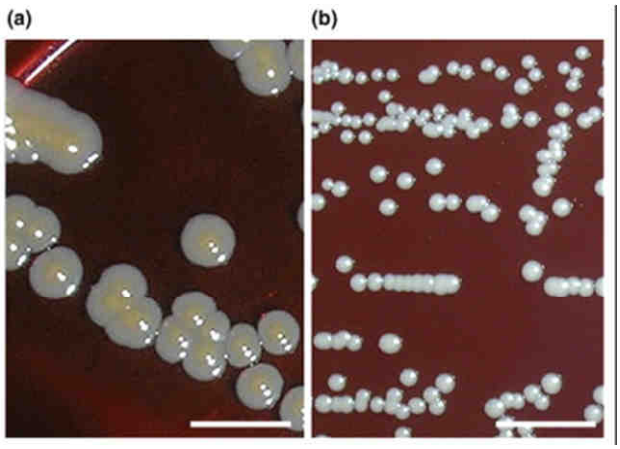


Figure 6 : Colonies de *Staphylococcus aureus* issues du même clone d'origine, après 48h d'incubation sur gélose au sang. (a) Colonies de taille normale (2-3mm) présentant une pigmentation jaune. (b) Micro-colonies de taille plus petite et ayant perdu toute pigmentation.

Ces micro-organismes au métabolisme ralenti sont exigeants : ils sont devenus auxotrophes à certains nutriments essentiels qu'ils ne sont plus capables de synthétiser : par exemple, l'hémine par la mutation *hemB*(figure 7), la ménadione par la mutation *menD* ou encore la thymine [69].

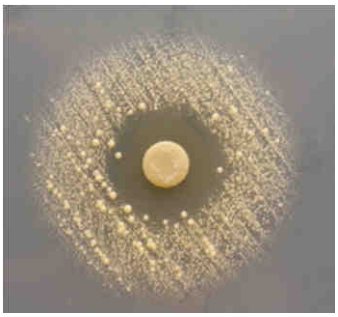


Figure 7 : Micro-colonies de *Staphylococcus aureus* auxotrophes à l'hémine, poussant grâce à l'hémine contenue dans le disque.

Généralement, ces SCV sont plus résistantes aux antibiotiques, en particulier aux aminosides, ce qui remet en question l'utilisation des ciments aux aminosides qui les sélectionneraient.Ce phénomène a largement été décrit chez *Staphylococcus aureus*. Récemment, ce même phénomène de SCV a été étudié chez *Escherichia coli*[70]. Des colonies d'aspect phénotypique très différent sont retrouvées et l'identification bactérienne par les techniques biochimiques peut être en échec à cause de la perte de certains caractères… Des techniques telles que l'électrophorèse en champ pulsé montrent que toutes ces colonies appartiennent au

même clone *d'Escherichia coli*, bien que les antibiogrammes soient très différents. La sonication paraît être un outil indispensable pour améliorer la mise en évidence de cesSCV. L'étude de l'activité des antibiotiques doit bien évidemment être effectuée sur chaque prélèvement et chaque type de colonie. L'antibiogramme est à interpréter selon les règles du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM).

2.6.4 Les germes en cause

Les bactéries les plus fréquemment mises en cause dans les infections de prothèses articulaires, quelque soit le type d'implant, sont les Staphylocoques suivis des Streptocoques, puis des Entérocoques et des bacilles à Gram négatif, et enfin les anaérobies. Dans 10 à 12% des cas, une flore plurimicrobienne est retrouvée avec parfois plusieurs souches d'une même espèce mais de sensibilité différente [71] ; c'est essentiellement le cas avec les Staphylocoques coagulase négative (SCN). Dans environ 10% des cas, on ne retrouve pas de germe.

Le tableau 3 présente un récapitulatif des diverses études épidémiologiques réalisées révélant les principaux germes en cause :

Références	[72]	[73]	[74]	[75]	[12]	[11]	[76]	[77]	[78]	%
Nb isolements (n=2167)	112	248	81	578	63	462	357	42	112	**100**
SCN	13	31	48	30	21	19	17	24	33	**27,3**
Staphylococcus aureus	23	21	14	23	38	22	42	19	17	**23,8**
***Streptococcus* sp.**	5	7	10	9	13	9	6	12	10,7	**9,4**
***Enterococcus* sp.**	3	6	7	3	0	1	3	10	6,3	**4,6**
Diphtérie	2	4	4	0,5	2	0,6	1	0	5,4	**2,6**
Bacille Gram négatif	6	28	0	6	11	8	5	29	16,1	**12,7**
Propionibacterium	0	0,4	3	1,5	0	0	0,3	2	0,9	**0,9**
Polymicrobien	33	0	12	12	6	19	15	0	0	**9 ,7**
Anaérobies	3	2	0	2	0	6	2	2	6,3	**3**
Autres	1	4	0	2	0	3	0,3	19	2,7	**3,5**
Culture négative	5	0	0	11	10	12	8	2	1,8	**5,2**

Tableau 3 : Germes retrouvés dans les infections sur prothèse ostéo-articulaire[32].

De très nombreuses autres espèces sont décrites dans la littérature sous forme de cas isolés [79] :*Haemophilus* sp., *Campylobacter* sp.*[80]*, *Clostridium difficile*, bactéries d'origine animale (*Brucella, Francisella, Pasteurella*...).

Propionibacterium acnes est reconnu comme l'agent de la presque totalité des prothèses d'épaule [81].

Des cas d'infections de prothèses à *Mycobacterium tuberculosis*sont également décrites[82]. Le délai de survenue de l'infection était de 3-4 mois, ce qui laisse sous entendre que la mise en place de l'implant a pû réveiller l'infection chronique. Des cas d'infections à champignons ont également été authentifiés : *Candida glabrata*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Aspergillus* sp.,*Mucoraceae* sp…Elles surviennent généralement dans un contexte de fongémie et d'immunodépression (diabète, dénutrition, corticothérapie, immunosuppresseur, HIV) [83, 84]

Dans les infections aiguës de prothèse, quelque soit le germe en cause, la recherche d'une porte d'entrée potentielle (cutanée, digestive, ORL, urinaire, etc.) doit être systématique de même que la recherche d'endocardite. La guérison ne peut être envisagée sans traitement de la porte d'entrée et de ses complications.

2.7Arguments définissant le diagnostic d'infection

Les dernières recommandations de pratique clinique de la Société de pathologie infectieuse de langue française (SPILF) de 2009 sur les infections ostéo-articulaires définissent une infection « certaine » lorsqu'un des critères suivants est respecté [56]:

- présence d'une fistule au contact de la prothèse ou de l'implant,
- présence de pus dans l'articulation ou au contact de la prothèse ou de l'implant,
- présence d'au moins 3 prélèvements (3 prélèvements per-opératoires ou 2 prélèvements per-opératoires + 1 prélèvement par ponction articulaire réalisée quelques jours avant la chirurgie) ou 2 prélèvements espacés dans le temps (1 prélèvement per-opératoire + 1 prélèvement par ponction articulaire) positifs à la même bactérie (même espèce avec même antibiogramme) appartenant à la flore cutanée et dont l'isolement pose la question d'une éventuelle contamination (ex: staphylocoque à coagulase négative, *Propionibacterium acnes*, corynébactérie...).
- Présence d'au moins 1 prélèvement positif (1 prélèvement par ponction articulaire ou 1 prélèvement per-opératoire ou par hémoculture) à une bactérie n'appartenant pas à la

flore cutanée ou pour laquelle la question d'une contamination ne se pose pas (ex: *Staphylococcus aureus*, entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa*...) ou avec une bactérie exceptionnellement rencontrée pour laquelle la question d'une contamination ne se pose pas (ex: *Streptococcus pneumoniae, Salmonella*sp., *Listeria*sp., *Campylobacter* sp., *Pasteurella*sp. ...)

L'infection est dite probablement exclue ou non détectable en l'absence de fistule ou de pus dans l'articulation ou au contact de l'implant, ou s'il existe l'un des critères suivants :

- tous les prélèvements per-opératoires sont stériles (à condition d'avoir été réalisés 15 jours après l'arrêt de toute antibiothérapie) et lorsqu'il n'existe aucun signe histologique d'infection,
- 1 seul prélèvement per-opératoire est positif à une bactérie de la flore cutanée (staphylocoque à coagulase négative, *Propionibacterium acnes*, corynébactérie...) sans signe histologique d'infection et avec moins de 65 % de polynucléaires neutrophiles dans le liquide de ponction articulaire.

Dans ces 2 situations, une CRP < 10 mg/l peut conforter l'absence d'infection.

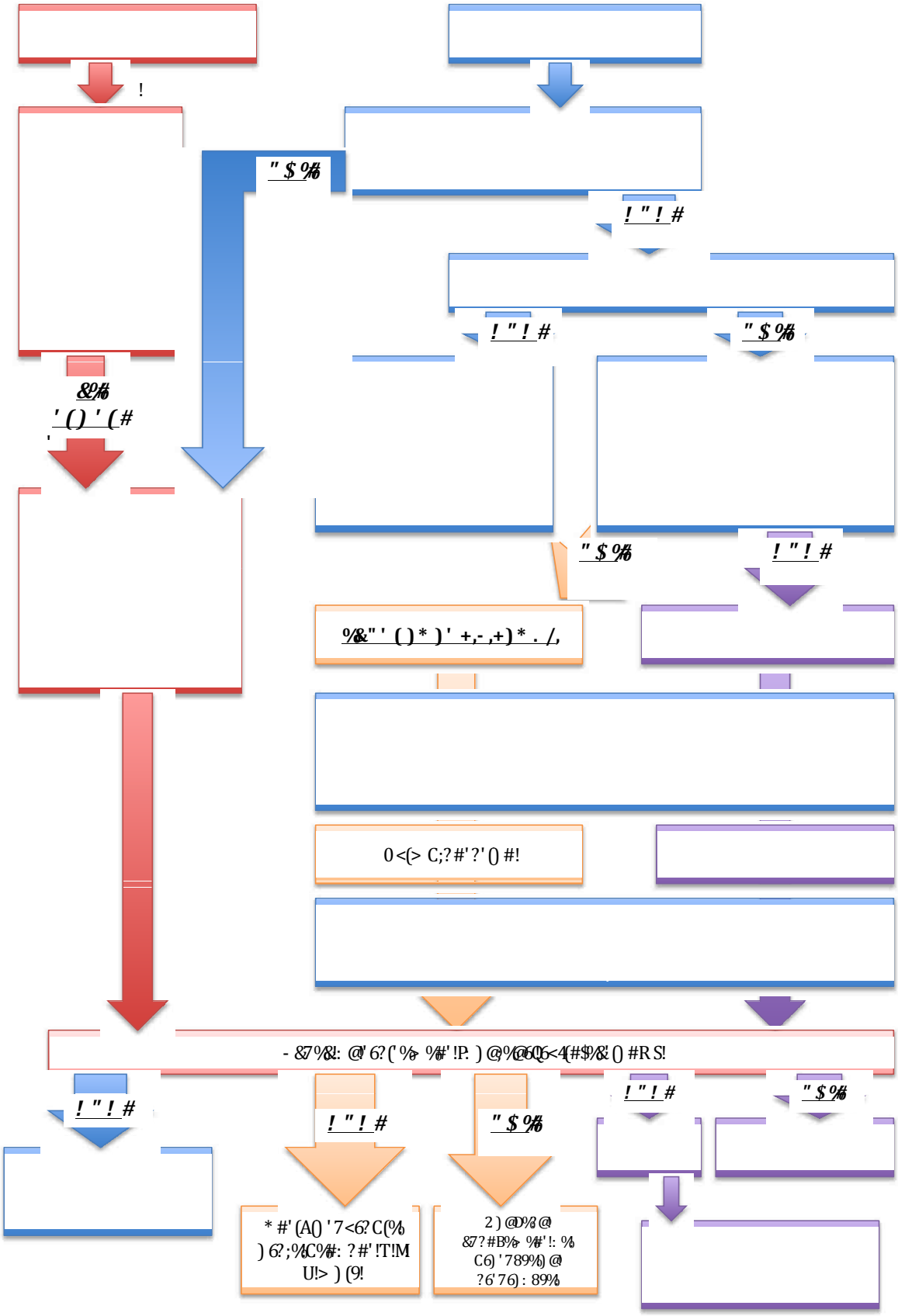
2.8 Diagnostic histopathologique

L'apport de l'histologie au diagnostic d'infection osseuse est rapporté dans la littérature, mais rarement de façon quantifiée et prospective sur un grand nombre de prélèvements [54]. Il est recommandéde réaliser un examen anatomopathologique intéressant le tissu osseux et la synoviale. L'infection péri-prothétique est évaluée au microscope en fonction du nombre de polynucléaires neutrophiles par champ au grossissement x 400 : en général, le chiffre retenu est celui de 5 polynucléaires neutrophiles dans au moins 5 champs microscopiques séparés. Dans ce cas, la sensibilité varie entre 43 et 100% et la spécificité est de l'ordre de 90% [85].
La variabilité inter-examinateur est forte, et le degré d'infiltration par des cellules inflammatoires peut considérablement varier entre les différents échantillons d'un même patient[86].
On considère que la sensibilité de cet examen est satisfaisante en cas de descellement septique, mais elle l'est beaucoup moins en cas de descellement aseptique[87-89].
Cependant, en cas d'infection à mycobactérie ou d'infection fongique, il permet d'orienter le diagnostic et ainsi permettre la culture sur milieu spécifique.

2.9 Traitement

La finalité du traitement des infections sur prothèses ostéo-articulaires est d'éradiquer la présence de l'agent infectieux en cause, afin d'obtenir une articulation fonctionnelle et indolore. Il est nécessaire d'associer un traitement chirurgical adapté à une antibiothérapie efficace. D'une part, l'excision chirurgicale des tissus infectéset parfois du matériel permet d'éliminer le maximum de bactéries ; d'autre part, les antibiotiques agissent sur l'os vivant infecté et lui permettent une guérison et une revascularisation. La revascularisation demande un minimum de 3 à 4 semaines, ce qui explique la longue durée du traitement antibiotique pour couvrir le phénomène[71].

L'organigramme suivant (figure 8) présente les principales situations auxquelles les chirurgiens et cliniciens sont confrontés, et permet d'avoir une vision générale des différentes stratégies thérapeutiques à envisager en fonction d'un certain nombre de critères.



DAIR = « debridement/antibiotics/implant retention »

Figure 8 : Différentes stratégies thérapeutiques des infections sur prothèses ostéo-articulaires [90].

2.9.1 Traitement chirurgical

Les principales techniques chirurgicales utilisées dans le traitement des infections sur prothèse ostéo-articulaire sont:

- la synovectomie-lavage ou débridement, avec rétention de la prothèse,
- le changement en 1 ou 2 temps,
- l'arthrodèse,
- l'amputation.

a. Synovectomie-lavage avec conservation des implants

❖ Les indications

La synovectomie-lavage avec conservation des implants associée à une antibiothérapie de durée limitée fait partie de l'arsenal thérapeutique des infections de prothèses de hanche et de genou. Mais elle ne s'adresse qu'aux infections aiguës (que le mode de contamination soit péri-opératoire ou secondaire), sur implants non descellés et avec des tissus péri-prothétiques non endommagés.

Revient alors la problématique de la définition d'une infection aiguë : unesemaine ? 15 jours ? unmois ? Parfois même plus si on se réfère à la définition de Coventry [91]. Le biofilm se forme à la surface des biomatériaux en 48 heures, et l'excision-lavage n'est pas effective sur ce biofilm. Il semblerait donc que le délai habituellement admis d'un moissoit surestimé.Un délai de deux semaines après la pose de la prothèse ou après le début brutal des symptômes dans une infection secondaire, représente une frontière au-delà de laquelle les chances de guérison s'amoindrissent notablement[92]. Si ce délai est plus facile à évaluer en cas d'infection post-opératoire précoce, il est sujet à caution en cas d'infection secondaire car plus difficile à évaluer. Ainsi l'indication doit être nuancée en fonction de l'étiologie, du type de prothèse, du germe en cause et probablement du terrain (figure 9).

Pour certains germes, il existe un risque indiscutable de sélectionner des souches résistantes si le traitement chirurgical n'est pas complet, et si les antibiotiques sont prescrits sans une réduction suffisante de l'inoculum. C'est le cas entres autres des Staphylocoques, pour lesquels l'acquisition d'une résistance à la rifampicine ou aux quinolones est un risque qui menace de compliquer laprise en charge en cas d'échec[93].

La fragilité du malade peut être interprétée de plusieurs façons. Il est nécessaire de différencier le score ASA (témoin de l'état général) de l'immunocompétence qui, elle, est

beaucoup plus difficile à évaluer. Un score ASA élevé invite à pratiquer une excision-lavage, quitte à y adjoindre une antibiothérapie suppressive. A l'inverse, un immunodéprimé en bon état général sera plus volontiers traité par changement de prothèse en un ou deux temps.

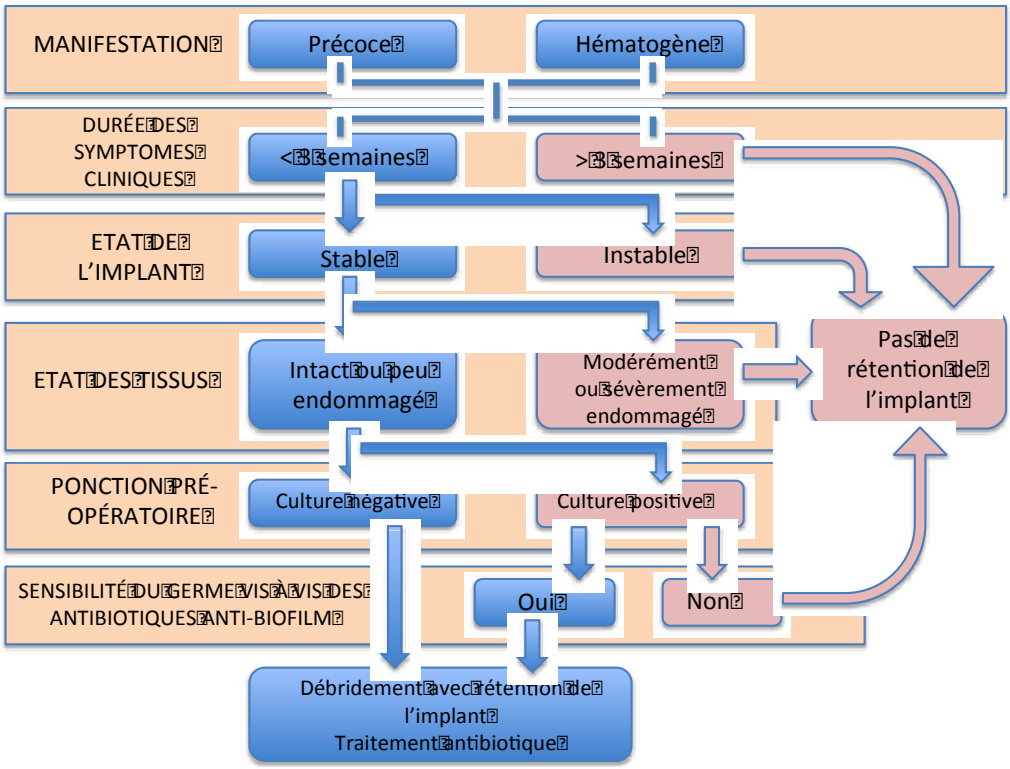


Figure 9 : Algorithme de décision pour le traitement des infections sur prothèses précoces ou hématogènes [86].

❖ Les résultats

Le taux de succès de cette technique est largement sous-estimé, car les études portent souvent sur des patients inclus sans sélection précise et pour laquelle cette option a été choisie dans un but suppressif et non curatif. On trouve donc dans la littérature des taux variant de 20 à 70%[92, 94, 95]. En réalité, le taux de succès est aussi élevé que pour un traitement chirurgical avec changement de prothèse (supérieur à 80%), si les conditions suivantes sont réunies[86] :

- un implant stable,
- un pathogène répondant aux antibiotiques actifs sur le biofilm,
- l'absence d'une fistule ou d'un abcès péri-prothétique,
- une durée des symptômes inférieure à 3 semaines.

❖ La technique chirurgicale

Cette chirurgie reprend la voie d'abord utilisée pour l'implantation, en excisant le trajet de l'incision de la précédente intervention. En cas de trochantérotomie, la voie d'abord varie selon la consolidation du trochanter. Si celui-ci est consolidé (infection secondaire), une arthrotomie postérieure est réalisée, associée à l'ablation des fils d'acier. Si le trochanter n'est pas consolidé (infection post-opératoire récente), la trochantérotomie doit être reprise pour nettoyer les surfaces osseuses et le trochanter refixé par de nouveaux fils métalliques[71].

Il est recommandé d'effectuer une excision totale, circonférentielle et péri-prothétique, emportant la néo-capsule, la néo-synoviale jusqu'à obtention d'un tissu bien vascularisé et sain. La luxation de la prothèse et le nettoyage de l'interligne prothétique sont nécessaires[56]. Le remplacement des pièces prothétiques modulaires (bille fémorale, insert cotyloïdien) est conseillé par certains. Le lavage abondant est un point important de l'intervention, il est réalisé au sérum physiologique mais l'adjonction d'un quelconque antibiotique où antiseptique n'a pas démontré sa supériorité. Les irrigations post-opératoires ne semblent pas indiquées compte tenu du risque de surinfection et parfois des difficultés à récupérer dans le drainage la totalité des solutés d'irrigation instillés. Un drainage par redon est mis en place en intra-articulaire.

Les modalités du traitement antibiotique associé seront détaillées par la suite.

b. Changement en 1 ou 2 temps

❖ Les indications

Le changement en un temps comprend l'ablation de la prothèse infectée et l'implantation d'une nouvelle prothèse durant une seule procédure chirurgicale. Certains pré-requis sont nécessaires pour envisager cette technique :

- patients présentant des parties molles intactes ou légèrement compromises,
- absence d'une pathologie sévère co-existante,
- absence de lourds antécédents d'infection,
- patient pour lequel le micro-organisme responsable est connu,
- absence d'infection à un germe résistant difficile à traiter. Une bactérie pour laquelle le choix de l'antibiothérapie est restreint (bactérie multi-résistante (BMR), *Pseudomonas aeruginosa*), une mycobactérie, un champignon doivent inciter à pratiquer un changement en deux temps[96, 97].

Le changement en deux temps consiste en une ablation de la prothèse avec implantation d'une nouvelle lors d'une intervention chirurgicale ultérieure. L'intervalle de temps peut être court (deux à quatre semaines), ce qui permet une seule hospitalisation pour réaliser les deux chirurgies. Un « spacer » ou fixateur externe est alors inséré pour maintenir l'articulation. Les critères de réimplantation sont la normalité des signes cliniques et des paramètres biologiques (VS et CRP). La repose de prothèse se fait sans interrompre l'antibiothérapie et recommande la réalisation de prélèvements bactériologiques et histologiques lors du second temps. Si ces derniers sont négatifs au bout de 15 jours de culture, le traitement peut être interrompu.

Dans le cas d'infections à germes résistants, tels que les *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM) ou autres, un intervalle de six à huit semaines est préférable ; dans ce cas, deux semaines avant la réimplantation, le traitement antibiotique est stoppé afin de réaliser et d'obtenir des prélèvements stériles témoignant de l'éradication de l'infection. L'intérêt de faire précéder la repose de prothèse d'une ponction n'a pas été confirmé [98]. L'antibiothérapie sera reprise en période post-opératoire après réalisation de prélèvements bactériologiques et histologiques. Elle sera stoppée si la culture est négative. Si tel n'est pas le cas, le traitement est continué pendant trois à six mois (figure 10).

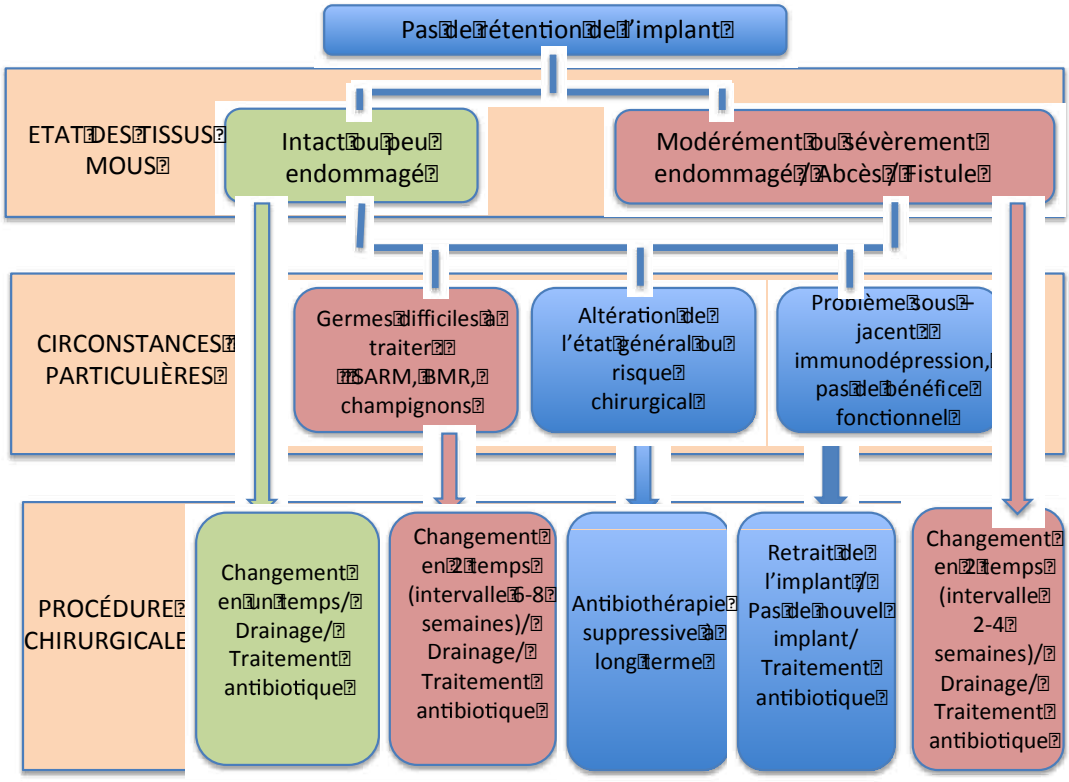


Figure 10 : Algorithme de décision pour le traitement des patients présentant des infections sur prothèses ne permettant pas la conservation de celle-ci [86].

❖ Les résultats

Le taux de succès d'un changement de prothèse de hanche en un temps varie de 86 à 100%[99, 100].

Le changement en deux temps peut être utilisé pour la grande majorité des patients et rencontre un taux de succès dépassant les 90% [101, 102].

❖ La technique chirurgicale

Le choix de la voie d'abord intègre 3 paramètres :

- la voie utilisée lors de l'intervention précédente,
- la nécessité d'une exposition extensive,
- le risque de « conflit cicatriciel ».

La voie d'abord est reprise à condition de pouvoir l'étendre. Au genou, il peut être nécessaire de faire appel à des lambeaux (locaux le plus souvent). Une excision rigoureuse des parties molles périphériques infectées est réalisée, ainsi que l'ablation de la prothèse, de la totalité du ciment ou des corps étrangers, ainsi que des zones osseuses séquestrées.

Dans le cas d'une prothèse de hanche, l'ablation de l'implant fémoral peut se faire :

- par voie endo-fémorale : il est indispensable de s'assurer de l'ablation totale du matériel et de la qualité du nettoyage de l'interface [103].
- par fémorotomie.

La trochantérotomie ne doit pas être dissociée de la fémorotomie ; cependant, une trochantérotomie large peut parfois rendre inutile la fémorotomie.Après fémorotomie, l'utilisation d'un espaceur en ciment reste possible.

Pour une prothèse de genou, l'ablation des implants infectés ne pose pas de problèmes spécifiques. Il peut être intéressant de pratiquer une ostéotomie pédiculée de la tubérosité, ce qui facilite l'excision tout en protégeant l'appareil extenseur.

En ce qui concerne la reconstruction, la reprise peut se faire avec une prothèse cimentée ounoncimentée dans le cas d'un changement en deux temps. Il n'a pas été observé de différence significative en terme d'échec pour cause infectieuse [104, 105].En cas de changement en un temps, il n'existe pas de recommandation sur l'utilisation ou non d'uneprothèse cimentée [100].

c. *Arthrodèse*

❖ Les indications

Initialement considérée comme le seul traitement possible lors d'une infection de prothèse, cette technique n'est à présent utilisée qu'en cas d'échec de reprise pour récidive de l'infection, en cas de capital osseux très pauvre ou chez des patients au pronostic fonctionnel déjà compromis.

❖ Les résultats

Les résultats en terme de guérison de l'infection sont corrects au prix de résultats fonctionnels moyennement satisfaisants. En effet, les patients souffrent alors d'un certain degré de raccourcissement du membre, augmentant ainsi la dépense d'énergie lors de la marche et diminuant la fonctionnalité du membre atteint.

❖ La technique opératoire

La technique opératoire consiste en une ablation totale de la prothèse infectée y compris du ciment, associée à un lavage abondant et un curetage large, puis dans un second temps en une fusion fémoro-tibiale.

d. *Amputation*

Cette option thérapeutique s'effectue de plus en plus rarement. Elle est parfois indiquée pour des patients ayant de grosses co-morbidités, ou en cas de sepsis non contrôlé.

2.9.2 Traitement antibiotique

a. *Principe du traitement antibiotique*

La prescription des antibiotiques doit tenir compte du patient et de ses éventuelles pathologies associées, bien évidemment de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques (antibiogramme), mais aussi du tissu particulier qu'est l'os, de l'existence du biofilm, de la qualité de l'excision chirurgicale…

b. La voie d'administration

Il est recommandé d'administrer initialement les antibiotiques par voie parentérale. La durée du traitement intraveineux est généralement de 2 à 4 semaines pour les infections précoces ou d'origine hématogène. Le relai se fait par voie orale [86].
On doit cependant vérifier que les critères suivants soient respectés, avant d'autoriser la mise en place de ce relai par voie orale[71]

- les antibiotiques utilisés doivent avoir une bonne biodisponibilité orale et une bonne diffusion osseuse. C'est le cas des fluoroquinolones, de la clindamycine, de la rifampicine, de l'acide fusidique ou encore du linézolide[106],
- la tolérance digestive doit être bonne, ce qui n'est pas toujours le cas avec la rifampicine ou la clindamycine utilisées à fortes doses,
- il est nécessaire de vérifier l'absence d'interactions médicamenteuses (en particulier avec les pansements gastriques et le fer),
- enfin, on doit s'assurer de l'observance du patient.

Si le traitement par voie orale est impossible, la pose d'un cathéter central peut s'avérer nécessaire pour administrer confortablement les injections d'antibiotiques. Si la durée d'administration prévue excède 6 semaines, on peut envisager de poser un dispositif implantable[107]. Une surveillance accrue s'impose, en raison des risques d'infection ou d'obstruction de ce genre de matériel. Le succès thérapeutique de l'antibiothérapie par voie parentérale en ambulatoire est comparable à une prise en charge hospitalière, et permet une meilleure qualité de vie pour le patient et une réduction des coûts [108, 109].
L'administration de certains antibiotiques en perfusion intraveineuse continue est très intéressante (certaines bêta-lactamines, clindamycine, vancomycine, fosfomycine). Les concentrations plasmatiques élevées et stables permettent d'obtenir des concentrations osseuses plus élevées qu'au cours des administrations répétées et une moindre toxicité (vancomycine), à condition de surveiller les concentrations plasmatiques régulièrement. Ce mode d'administration peut être utilisé en ambulatoire à l'aide de diffuseurs portables calibrés[110, 111].

c. La durée d'administration

La durée optimale du traitement antibiotique des infections sur prothèses n'est pas consensuelle.

Cependant, il est établi que celle-ci ne doit pas être inférieure à 6 semaines, que l'infection sur prothèse articulaire soit aiguë post-opératoire ou hématogène, qu'elle soit chronique, ou occulte et découverte à l'occasion d'un changement de prothèse. Dans la plupart des cas, il est vraisemblable que cette durée de 6 semaines soit suffisante pour éradiquer l'infection lorsque l'excision chirurgicale a été rigoureuse et complète. Cette durée correspond également au temps nécessaire à la reconstruction d'un tissu conjonctif de granulation à la surface de l'os excisé, bien vascularisé et témoin de la vitalité de l'os[112, 113].

Chez les patients subissant un débridement avec rétention de la prothèse, le traitement antibiotique est généralement prescrit pour une durée de 3 mois pour la hanche et 6 mois pour le genou [114]; ces recommandations suivent le principe de précaution et ne sont pas justifiées si l'on analyse les différentes études suivantes. Laffer n'observe pas de différence significative entre un traitement antibiotique de 3 ou 6 mois pour les infections sur prothèse de genou[115]. Dans son étude de 2009, Farhad recommande une durée maximale de 6 semaines pour toutes les infections osseuses, y compris les infections sur prothèse[116], durée confirmée par Bernard en 2010[117]. La durée de la thérapie infectieuse ne semble pas prédire du risque d'échec ; sa prolongation permet uniquement de retarder les récidives d'infection, comme souhaite le prouver le PHRC national « DATIPO » actuellement en cours. Cette étude multicentrique de non infériorité, randomisée, ouverte, évalue l'efficacité de deux durées d'antibiothérapie (6 semaines versus 12 semaines) dans le traitement des infections sur prothèses ostéo-articulaires, avec changement prothétique (en 1 temps ou 2 temps long) ou non (lavage articulaire). L'objectif est de démontrer que 6 semaines d'antibiothérapie dans les infections sur prothèses ostéo-articulaires (IPOA) avec changement prothétique ou lavage articulaire n'est pas moins efficace que 12 semaines d'antibiothérapie en terme de prévention des résistances ou rechutes d'infections.
En ce qui concerne les changements en 2 temps, la durée minimale admise est également de 6 semaines. Même si le temps entre la dépose et la pose de la prothèse peut être raccourci à 2 ou 4 semaines en cas d'infection causée par un pathogène non résistant, la durée du traitement antibiotique ne doit pas être réduite pour autant[118].

d. Les antibiotiques à utiliser

La rifampicine est l'une des molécules « phares » dans le traitement des infections à Staphylocoques. Elle présente les différentes caractéristiques recherchées ; en plus d'avoir

une bonne diffusion osseuse, elle a une action bactéricide sur les micro-organismes quiescents et producteurs de biofilm[86]. Cet antibiotique aprouvé son efficacité lors d'études chez des modèles animaux[119, 120], mais aussi lors d'essais cliniques[114, 121, 122]. La rifampicine ne doit jamais être administrée en monothérapie, afin d'éviter l'émergence de mutants résistants[123].

Les autres antibiotiques à utiliser de préférence en association avec la rifampicine sont les fluoroquinolones, étant donné leur excellente biodisponibilité, leur activité et leur tolérance. La ciprofloxacine et l'ofloxacine ont largement été testées lors d'études à long terme, ce qui a confirmé leur efficacité[114, 124, 125]. Les nouvelles fluoroquinolones telles que la lévofloxacine ou la moxifloxacine sont encore plus efficaces que la ciprofloxacine contre les bactéries Gram positif. Chaque fluoroquinolone ayant un spectre d'action légèrement différent avec des propriétés pharmacodynamiques variables, celles-ci ne sont donc pas interchangeables[126].Le rapport concentration osseuse/concentration minimale inhibitrice (CMI) pour la bactérie en cause est un des critères de choix[71]. Ainsi, la lévofloxacine présente desconcentrations plasmatiques trois fois plus élevées que l'ofloxacine (concentrations au pic 6 à 8 μg/ml, concentrations résiduelles 0,5 à 3 μg/ml) et les CMI sontdivisées par deux[127].La péfloxacine permet d'obtenir les concentrations plasmatiques et osseuses les plus élevées (concentrations plasmatiques au pic 10 à 15 μg/ml, concentrations plasmatiques résiduelles 6 à 8 μg/ml, concentrations osseuses 20 +/-7 μg/g d'os) [128]. Elle peut être utilisée pour le traitement des infections à Staphylocoques sensibles.La ciprofloxacine peut être utilisée pour les infections à bacilles Gram négatif; les CMI sur ces bactéries sont plus basses que les CMI de la péfloxacine.

Etant donné l'émergence des Staphylocoques résistants aux fluoroquinolones, il a été nécessaire de trouver d'autres alternatives, tels que le triméthoprime-sulfaméthoxazole ou cotrimoxazole, la minocycline, le linézolide, l'acide fusidique…

Différentes études ont été menées avec l'acide fusidique et ont montrés des résultats intéressants[122, 129].

Le linézolide est indiqué dans les infections à cocci Gram positif multirésistants[130, 131].Son action antibactérienne est importante envers les pathogènes du biofilm. La diffusion osseuse est bonne, de même que la biodisponibilité orale. Mais au-delà de trois semaines de traitement, des effets indésirables apparaissent fréquemment.Il en est de même pour le cotrimoxazole[132]. L'association rifampicine-linézolide serait autant efficace que l'association rifampicine-cotrimoxazole dans le traitement des infections à Gram positif résistants[133].

La clindamycinea une excellente activité de part ses propriétés anti-biofilm et anti-toxine staphylococcique TSST-1. La rifampicine est inductrice du cytochrome P450 et la clindamycine inhibitrice. L'association de ces deux antibiotiques nécessite impérativement un contrôle des concentrations, le risque étant d'avoir des concentrations insuffisantes de clindamycine et de sélectionner des mutants résistants. A l'initiation du traitement, la posologie de clindamycine est la posologie maximale proposée dans l'Autorisation de mise sur le marché (AMM), puis adaptée en fonction des besoins. La clindamycine est à préférer à la pristinamycine largement prescrite qui est bien souvent le seul antibiotique oral à avoir une activité *in-vitro* sur les Staphylocoques multirésistants. La pristinamycine a une très médiocre efficacité dans les infections ostéo-articulaires chroniques dues à des staphylocoques résistants à l'érythromycine, elle est souvent mal tolérée sur le plan digestif, et sa diffusion osseuse n'est pas connue.

La vancomycineconserve toujours un intérêt indiscutable dans le traitement des infections osseuses dues à des SARM.La vancomycine en perfusion continue(VPC) a révolutionné le traitement des infections osseuses graves et étendues à SARM [111].La VPC ne peut s'envisager que sur une voie veineuse centrale. La posologie doit être adaptée à chaque malade de façon à obtenir des concentrations sériques permanentes de 35 ± 5 µg/ml pendant des semaines voire pour une durée maximale de 3 à 4 mois. Une dose de charge de 15 mg/kg sur une heure est nécessaire avant d'administrer au pousse-seringue électrique une dose quotidienne double ou triple de celles administrées en discontinu. Il est fréquent d'avoir besoin de 3 à 4 g de vancomycine par 24h pour obtenir des concentrations plasmatiques satisfaisantes. Après deux à trois semaines de traitement, les concentrations osseuses de vancomycine aussi bien dans l'os infecté que dans l'os sain sont au moins équivalentes aux concentrations sériques. Même à ces fortes posologies, la toxicité rénale et auditive de la vancomycine est faible lorsqu'elle est administrée sans aminoside, sans perturbation volémique et en surveillant les concentrations plasmatiques une à deux fois par semaine. En ambulatoire, la VPC s'effectue à l'aide de diffuseurs portables calibrés ou d'une mini-pompe portable, ce qui permet au malade le retour à domicile avec une surveillance médicale et biologique rapprochée systématique.

Enfin, l'utilisation de la daptomycine a largement augmenté ces dernières années dans les infections à SARM et à entérocoques résistants à la vancomycine (VRE). La dose de 4 mg/kg/jour semble insuffisante et liée à un risque d'échec dans le traitement des infections ostéo-articulaires[134, 135]. Dans un modèle expérimental d'infection de prothèse à SARM, il est montré que de hautes doses de daptomycine (8mg/kg/jour) sont aussi efficaces que la

vancomycine. Cependant, devant l'émergence spontanée et rapide de souches résistantes à la daptomycine lors d'un traitement par cet antibiotique, il s'avère indispensable de l'associer à la rifampicine [136, 137].

Ces nouvelles associations permettent d'obtenir des résultats similaires aux associations avec les fluoroquinolones : le médicament principal est la rifampicine, et le rôle de l'antibiotique partenaire est surtout d'éviter l'émergence de résistances.

e. *Propositions thérapeutiques en fonction du germe*

On trouve dans les recommandations de pratique clinique de la SPILF différents tableaux de propositions d'antibiotiques selon les germes en cause (tableaux 4, 5, 6, 7).

	Absence d'allergie à la pénicilline	**Si allergie à la pénicilline**
Antibiothérapie initiale par voie IV (2 semaines)	(oxacilline ou cloxacilline) **ou** céfazoline + gentamicine[1] **ou** rifampicine	clindamycine (si souche érythromycine sensible) **ou** (teicoplanine ou vancomycine) + gentamicine[1] ou rifampicine[2] **ou** (teicoplanine ou vancomycine) + acide fusidique
Relais par voie orale	rifampicine + (ofloxacine ou péfloxacine[3] ou ciprofloxacine ou lévofloxacine[4]) **ou** rifampicine + acide fusidique[5] **ou** rifampicine + clindamycine[2] (si souche érythromycine sensible) **ou** (ofloxacine ou péfloxacine[3] ou ciprofloxacine ou lévofloxacine[4]) + acide fusidique **ou** clindamycine (si souche érythromycine sensible) + acide fusidique **ou** rifampicine + cotrimoxazole (en l'absence d'autre alternative)	

1 : Durée maximale de prescription : 5 à 7 jours

2 : La rifampicine diminue de moitié les concentrations plasmatiques de la clindamycine ; cela peut entraîner des sous-dosages importants de la clindamycine qu'elle soit prescrite par voie orale ou par voie intra-veineuse (dosage de clindamycine recommandé).

3 : Se référer aux mises en garde de l'AFSSAPS

4 : La prescription de lévofloxacine dans cette indication hors AMM, doit être validée par un référent en infectiologie.

5 : Cette association nécessite une surveillance régulière de la biologie hépatique.

Tableau 4 : Propositions d'antibiothérapie pour les infections à *Staphylococcus aureus* sensibles à la méticilline (SASM).

Antibiothérapie initiale par voie IV (2 semaines)	(vancomycine[1] ou teicoplanine[2]) + rifampicine[3] **ou** (vancomycine[1] ou teicoplanine[2]) + ac. fusidique[3] **ou** (vancomycine[1] ou teicoplanine[2]) + fosfomycine **ou** (vancomycine[1] ou teicoplanine[2]) + doxycycline **ou** clindamycine (si souche érythromycine sensible) + gentamicine[4] **puis** clindamycine + rifampicine[5]
Relais oral si la sensibilité de la bactérie le permet	rifampicine + acide fusidique[6] **ou** rifampicine + clindamycine[5] (si souche érythromycine sensible) **ou** rifampicine + cotrimoxazole **ou** rifampicine + (minocycline[7] ou doxycycline) **ou** rifampicine + linézolide[8]

1 : Pour obtenir une efficacité maximale des glycopeptides dans le traitement des IOA, il est indispensable d'utiliser la vancomycine en perfusion IV continue à la seringue électrique (IVSE).

2 : La teicoplanine ne peut être utilisée qu'après détermination de la CMI

3 : En cas d'association d'un glycopeptide avec l'acide fusidique ou avec la rifampicine, il est conseillé de différer la prescription de ces 2 dernières molécules de 48 heures afin d'avoir des taux sériques suffisants de glycopeptides.

4 : Durée maximale de prescription : 5 à 7 jours.

5 : La rifampicine diminue de moitié les concentrations plasmatiques de la clindamycine ; cela peut entraîner des sous-dosages importants de la clindamycine qu'elle soit prescrite par voie orale ou par voie intra-veineuse (dosage de clindamycine recommandé).

6 : Cette association nécessite une surveillance régulière de la biologie hépatique.

7 : La minocycline (se référer aux mises en garde de l'AFSSAPS) a une meilleure CMI que la doxycycline mais est moins bien tolérée.

8 : Le linézolide n'a pas l'AMM dans cette indication. Il doit être prescrit uniquement en cas d'infection documentée et sous surveillance clinique et biologique rapprochée, sans dépasser 28 jours de traitement (toxicité hématologique et neurologique ; en particulier chez le sujet > 58 ans). Sa prescription doit être validée par un référent en infectiologie.

Tableau 5 : Propositions d'antibiothérapie en cas d'infection à *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM).

Streptocoques	**Absence d'allergie à la pénicilline**	**Si allergie à la pénicilline**
Antibiothérapie initiale par voie IV	amoxicilline + gentamicine[1]	clindamycine (si souche érythromycine sensible) + gentamicine[1] **ou** céfazoline + gentamicine[1] **ou** ceftriaxone + gentamicine[1]
Relais oral	amoxicilline **ou** clindamycine (si souche érythromycine sensible)	
Entérocoques		
Antibiothérapie initiale par voie IV	amoxicilline + gentamicine[1] **puis** amoxicilline ± rifampicine	(vancomycine[2] ou teicoplanine) + gentamicine[1] **puis** (vancomycine[2] ou teicoplanine) + rifampicine
Relais oral	amoxicilline ± rifampicine	Avis spécialisé
Anaérobies à Gram (+) *(P. acnes, Peptostreptococcus)* **Anaérobies à Gram (-)** *(Bacteroides spp....)*	amoxicilline **ou** céfazoline **ou** ceftriaxone **ou** clindamycine (si souche érythromycine sensible) clindamycine **ou** métronidazole[3] **ou** amoxicilline-ac. clavulanique	clindamycine clindamycine **ou** métronidazole[3]

1 : Durée maximale de prescription : 5 à 7 jours.

2 : Pour obtenir une efficacité maximale des glycopeptides dans le traitement des IOA, il est indispensable d'utiliser la vancomycine en perfusion IV continue à la seringue électrique (IVSE).

3 : Inefficace sur *P. acnes*

Tableau 6 : Propositions d'antibiothérapie en cas d'infection à streptocoques, entérocoques, anaérobies.

Antibiothérapie initiale **par voie IV** *Pseudomonas aeruginosa*	(céfotaxime ou ceftriaxone) + (ciprofloxacine ou ofloxacine) **ou** (céfotaxime ou ceftriaxone) + gentamicine[1] **ou** (imipénem ou méropénem[2] ou doripénem[2]) + gentamicine[1] (ceftazidime ou céfépime) **ou** (imipénem ou méropénem[2] ou doripénem[2]) + (amikacine[1] ou tobramycine[1]) **ou** ciprofloxacine **ou** fosfomycine
Relais par voie orale (si souche sensible aux fluoroquinolones et en l'absence de fort inoculum bactérien)	ofloxacine **ou** ciprofloxacine si *Pseudomonas aeruginosa*

1 : Durée maximale de prescription : 5 à 7 jours

2 : Hors AMM. La prescription doit être validée par un référent en infectiologie.

Tableau 7 : Propositions d'antibiothérapie en cas d'infection à bacilles gram négatif.

3–LA PCR 16SDITE « UNIVERSELLE »

3.1 Historique

Mise au point en 1985 par Kary Mullis, la Polymerase Chain Reaction (PCR) est certainement la technique qui a connu le développement le plus spectaculaire et le plus rapide dans l'histoire de la biologie. Cette découverte lui vaudra par la suite le prix Nobel de Chimie en 1993.Dès les années 1990, de nombreux laboratoires se dotèrent de cette technique révolutionnaire.

La PCR est une technique de réplication ciblée *in vitro*, basée sur la capacité de l'Acide DésoxyriboNucléotidique (ADN) polymérase à copier un brin d'ADN. Elle permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. Chaque réaction met en oeuvre deux amorces oligonucléotidiques ou «primers» qui définissent,en la bornant, la séquence à amplifier.

Par ailleurs, dans les années 1980, les techniques moléculaires furent également utilisées comme outil de classification des micro-organismes[138]. Les séquences nucléotidiques de l'Acide RiboNucléotidiqueribosomal (ARNr) de divers organismes procaryotes furent déterminées par biologie moléculaire, afin d'évaluer leur position relative dans l'histoire de l'évolution.

Initialement les ARNr étaient séquencés directement par le biais d'une reverse transcriptase [139]. Puis le gène codant l'ARNr 16S (gène *rrs*) a fait l'objet d'un plus grand nombre d'études. Des amorces dites «universelles», ciblant les régions conservées de gènes de l'ARNr 16S ont ainsi été décrites [140]. Ces régions conservées sont communes à toutes les bactérieset leur sont spécifiques puisqu'elles ne sont pas retrouvées chez les eucaryotes et les archées [141]. Les régions variables du gène *rrs* permettent l'identification et la détection d'un large éventail de micro-organismes bactériens.

3.2 Structure de l'ADN ribosomal 16S

Le gène *rrs*(1542 nucléotides) codant l'ARNr 16S, ainsi que le gène *rrl* (2904 nucléotides) codant l'ARNr 23S et le gène *rrf*(120 nucléotides) codant l'ARNr 5S, sont organisés en une unité polycistronique de transcription : l'opéron *rrn*(figure 11).

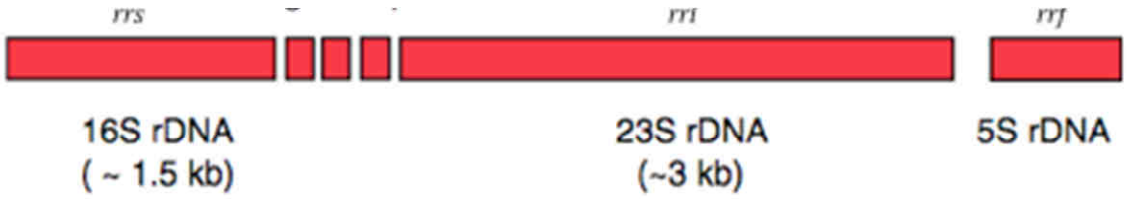
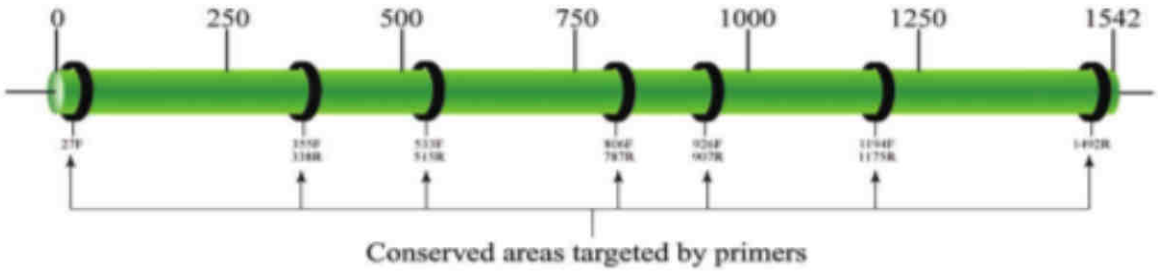


Figure 11 : Représentation schématique de l'opéron *rrn.*

Plusieurs copies de cet opéron sont présentes sur le chromosome bactérien. Le nombre de copies est variable suivant l'espèce bactérienne, et est fonction de la taille du génome et de la vitesse de croissance de la bactérie. Ainsi, chez les mycobactéries à croissance lente, une seule copie est présente, tandis que 2 copies sont présentes chez les mycobactéries à croissance rapide, 5-6 copies chez *Staphylococcus aureus* et même 7 copies chez *Escherichia coli*.

Les gènes de l'opéron *rrn*codent pour les ARNr qui composent la structure ribonucléoprotéique des ribosomes, structures impliquées dans la traduction des ARN messagers en protéines. Chez les procaryotes, il est composé d'une sous unité 30S associée à une sous-unité 50S. L'ARNr 16S code pour la sous unité 30S,alors que les ARNr 23S et5S codent tous deux pour la sous unité 50S.

L'ADN ribosomal présente une alternance de zones conservées et des zones variables, certaines régions du gène évoluant plus vite que d'autres (figure 12). Les amorces de la PCR universelle ciblent ces régions conservées.



Régions conservées = cibles

Figure 12 : Représentation schématique de l'ARN 16S. Les cercles correspondent aux régions conservées qui sont les cibles géniques de l'amplification par PCR [142].

Les gènes ribosomaux sont utilisés à des fins taxonomiques pour plusieurs raisons :

- ils sont ubiquitaires chez les procaryotes et les eucaryotes, ce qui permet leur comparaison,
- ils sont abondants dans la cellule et faciles à purifier,
- l'ADN est plus facilement isolé et manipulé que l'ARN, et peut-être directement séquencé.

3.3 Aspects techniques de la PCR 16S

Voici les différentes étapes chronologiques composant la technique de PCR universelle:

1. Extraction de l'ADN bactérien : elle constitue une phase très importante car l'obtention d'un ADN de bonne qualité est nécessaire pour la détermination d'une séquence exacte,
2. Amplification : un mélange réactionnel réunissant l'ensemble des composants nécessaires à la PCR est réalisé,
3. Séquençage,
4. Comparaison de la séquence obtenue aux séquences connues, publiées sur des bases de données.

3.3.1 Extraction de l'ADN bactérien

L'étape de lyse cellulaire précède l'extraction des acides nucléiques.La nature du prélèvement conditionne cette étape. En effet, l'extraction d'ADN bactérien directement à partir d'un prélèvement biologique, comme les biopsies osseuses, nécessite l'utilisation de techniques de lyse plus intensives qu'une extraction à partir de colonies en culture. Pour la lyse de colonies en culture, on a ainsi recours à un choc hypotonique ou un choc thermique à 90°C pendant 10 minutes[143]. Lorsqu'on travaille à partir d'un prélèvement clinique, on préfère la digestion par des enzymes telles la protéinase K.En règle générale, la lyse des bactéries à Gram négatif est plus facile que celle des bactéries à gram positif dont la paroi est plus épaisse [144].

Les techniques d'extraction sont diverses[143] : la plus communément utilisée repose sur l'adsorption sélective des acides nucléiques sur une membrane de gel de silice en présence de concentrations élevées d'agents chaotropiques. Le tampon de lyse est choisi de telle sorte que les débris cellulaires, les protéines, et les molécules indésirables restent en solution alors que

l'ADN se fixe sur la silice. Après lavage de la colonne par un tampon ad-hoc, l'ADN est élué par un tampon faiblement ionique.

Cette technique a été automatisée et des kits d'extraction basés sur ce principe sont proposés par de nombreux fournisseurs, tels que QIAamp® DNA Mini par QIAGEN®. Il existe même des automates : le système MagNA Pure (Roche®) est une plate-forme automatisée d'extraction d'acides nucléiques qui utilise des billes paramagnétiques recouvertes de silice pour isoler et purifier des acides nucléiques à partir d'échantillons cliniques. En plus de permettre une standardisation de la procédure, c'est une technique simple et rapide avec seulement quelques étapes manuelles, ne nécessitant pas une attention permanente, le tout dans un système clos pour minimiser le risque de contamination.Cette technique montre une efficacité équivalente aux extractions sur colonne de gel de silice (QIAGEN® QIAamp® DNA Mini) et à la méthode manuelle dite «de référence» au phénol-chloroforme [145].

3.3.2 L'amplification

Elle se déroule en plusieurs étapes (figure 13), après préparation du milieu réactionnel tamponné (ou « mix ») qui comprend :

- la Taq ADN polymérase (isolée de *Thermus aquaticus*),
- les précurseurs nucléotidiques ou dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP),
- le cation Mg^{2+} (sous forme de $MgCl_2$),
- les amorces,
- le tampon de PCR,
- un diluant (eau ultrapure ou eau PPI),
- un agent intercalant en cas de détection en temps réel.

L'ADN bactérien (cible nucléotidique) est ensuite ajouté à ce milieu réactionnel, juste avant de lancer les cycles de température.

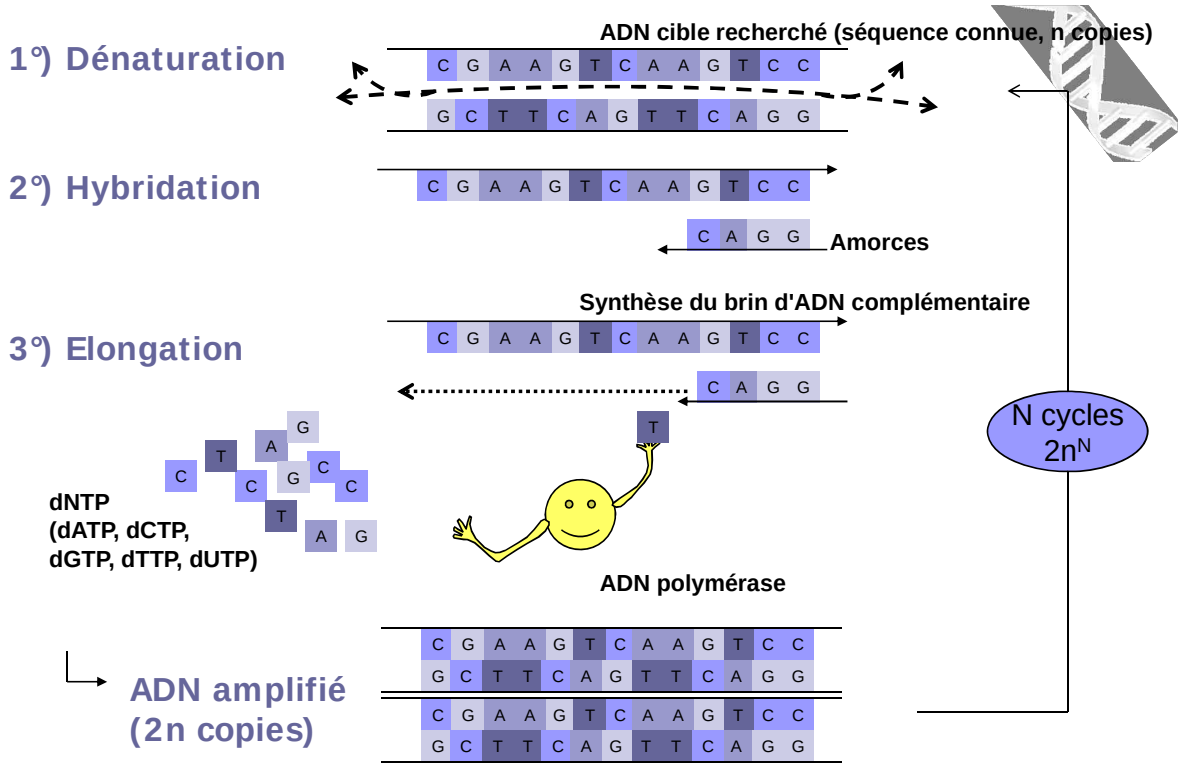


Figure 13 : Les différentes étapes de l'amplification par PCR.

a. *L'ADN polymérase*

La performance d'une PCR est évidemment liée à l'ADN polymérase utilisée. L'un des principaux facteurs affectant la spécificité de la PCR est lié au fait que la Taq ADN polymérase a une activité résiduelle à basse température : ainsi, les amorces peuvent s'hybrider de façon non spécifique à l'ADN ou entre elles formant ainsi des « dimères d'amorces ». Ce problème peut être limité en utilisant une Taq dite «hot start», c'est-à-dire ne devenant active qu' à une température élevée (souvent de 95°C) [146].

b. *Choix des amorces*

Le gène de l'ADN 16S est composé d'environ 1500 paires de bases. Cependant, les amorces proposées dans la littérature (tableau 8) encadrent en général environ 500 paires de bases : ceci semble être un bon compromis pour une identification précise de la plupart des bactéries aérobies et anaérobies [142].

Primer name	Degenerate type	Sequence of primer	Position in *Escherichia coli*
27 F (8 F)	11Y12M	5fi AGA GTT TGA T**YM** TGG CTC AG-3fi	8-27
338 F		5fiACT CCT ACG GGA GGC AGC-3fi	338-355
338R		5fiGCT GCC TCC CGT AGG AGT-3fi	355-338
519 F	5 M	5fiCAG C**M**G CCG CGG TAA TAC-3fi	519-536
519R (536R)	14 K	5fiGTA TTA CCG CGG C**K**G CTG-3fi	536-519
907R (926R)	11 M	5fiCCG TCA ATT C**M**T TTG AGT TT-3fi	926-907
1390R (1406R)	14R	5fiACG GGC GGT GTG T**R**C AA-3fi	1390-1406
1492R	11Y	5fiTAC CTT GTT A**Y**G ACT T-3fi	1492-1507

Tableau 8 : Principaux « primers » utilisés en PCR 16S[147].

3.3.3 La détection du produit amplifié

Le produit amplifié peut-être détecté en temps réel ou au point final de la PCR.

Pour la détection en point final, c'est l'électrophorèse en gel de polyacrilamide puis la révélation à l'aide d'un agent intercalant (SYBR® Green, bromure d'éthidium, GelRed®, GelGreen®) qui va permettre la mise en évidence d'une séquence amplifiée, et sa comparaison par rapport à un marqueur de taille.

Pour la PCR en temps réel, on ajoute l'agent intercalant directement au mélange réactionnel (SYBR® Green), et c'est la lecture de la fluorescence à chaque cycle qui va permettre la mise en évidence de l'amplification exponentielle d'une séquence. La qualité de la séquence amplifiée sera évaluée en réalisant une courbe de dénaturation des doubles brins. La courbe de dénaturation est réalisée à la fin de la PCR en mesurant la fluorescence tout en augmentant la température du milieu de façon constante (60 à 95°C avec une augmentation de 0,2°C/s). Ceci permet d'obtenir la température de fusion (Tm) de l'ADN amplifié qui correspond au point d'inflexion de la courbe (figure 14). Ce Tm correspond à la température moyenne pour laquelle la moitié de l'ADN est dénaturé.

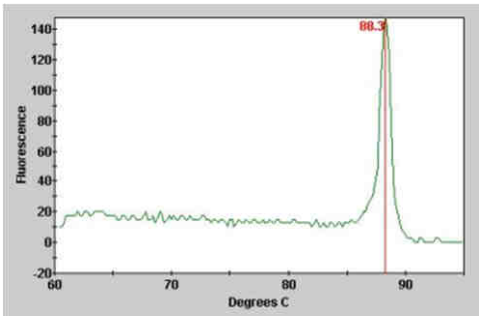


Figure 14 : Courbe de dénaturation d'un amplicon d'une séquence de l'ADNr 16S d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa*. Le point de fusion est déterminé à 88,3°C.

La fluorescence qui sera mesurée tout au long de la PCR est proportionnelle à la quantité d'ADN double brin, mais cet ADN double brin peut résulter d'amplifications parasites ou de dimères d'amorces. L'utilisation de sondes fluorescentes complémentaires de la séquence amplifiée améliore la sensibilité de la technique.

3.3.4 Le séquençage

L'objectif du séquençage est de déterminer la séquence du fragment de l'ADNr 16S amplifié afin de la comparer à des banques de données contenant les séquences de souches bactériennes types.

Avant le séquençage, le produit amplifié par PCR doit être purifié sur une colonne contenant un ensemble de membranes de silice[148].Deux réactions de PCR, l'une avec l'amorce sens et l'autre avec l'amorce anti-sens, sont réalisées en présence d'un terminateur d'élongation (Big Dye®). Les deux brins amplifiés sont ensuite séquencés dans un séquenceur utilisant l'électrophorèse capillaire comme méthode de séparation couplée à une détection de la fluorescence. Une fois la réaction de séquençage terminée, les électrophorégrammes obtenus sont alignés l'un par rapport à l'autre dans un logiciel informatique (exemple : SeqScape®).

3.3.5 Interprétation des résultats

Pour interpréter les séquences obtenues, il est nécessaire de tenir compte de la taille et de la qualité de la séquence obtenue, ainsi que du choix du programme approprié pour l'analyse et l'assignement final des espèces. Ainsi, Drancourt propose un minimum de 500 paires de bases incluant la région 5' la plus variable du gène de l'ARNr 16S pour l'identification d'un certain nombre de groupes bactériens [149].

Bien qu'un niveau de similarité de 97 % ait été proposé pour définir l'espèce en utilisant l'ADNr 16S [150], une différence supérieure à 0,5 % peut être indicative d'une nouvelle espèce [151]. Des cut-offs de plus de 99 % et de plus de 97 % de similarité ont été proposés pour l'identification respective d'espèces et de genres[149]. Donc, lorsqu'une souche présente moins de 97 % de similarité avec l'espèce la plus proche, il peut être convenu qu'il s'agit d'une nouvelle espèce, par contre la signification d'une similarité des séquences supérieure à 97 % n'est pas aussi claire [142].

Différentes études ont identifié des groupes de bactéries pour lesquels le séquençage de l'ADNr 16S n'est pas suffisamment discriminant et pour lesquels d'autres gènes cibles

doivent être utilisés : les gènes rpoB et hsp65 sont utiles pour l'identification des mycobactéries à croissance rapide[152], tout comme le gène tuf dans l'identification des staphylocoques coagulase négative[153].

La séquence obtenue est ainsi confrontée aux banques de données de séquences géniques accessibles à tout public, comme par exemple :

- NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)
- BIBI (http://umr5558-sud-str1.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi) (figure 15),
- EzTaxon (http://eztaxon-e .ezbiocloud.net),

Ces banques de données indiquent les pourcentages de similitude ou de différence entre la séquence étudiée et des séquences connues de bactéries identifiées.

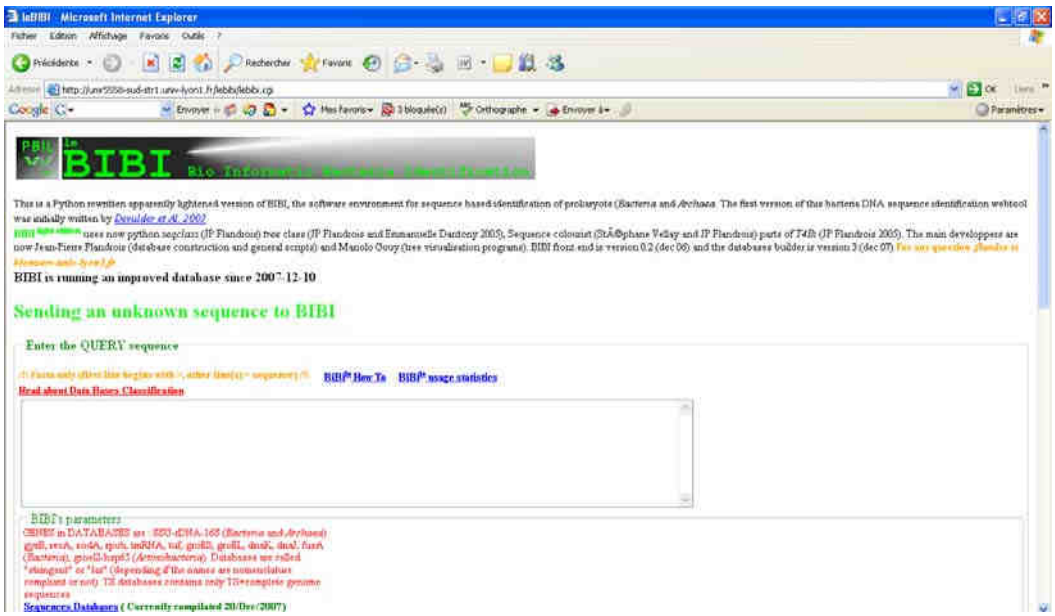


Figure 15 : Page internet de BIBI.

Ces banques publiques ayant des caractéristiques différentes (tableau 9), il est conseillé d'avoir recours à plusieurs d'entre elles en cas de bactéries difficilement identifiables [154]. Des logiciels ont également vu le jour comme MicroSeq® 500 qui utilise des bases de données privées et payantes qui présentent l'avantage de contenir uniquement des séquences vérifiées, mais qui peuvent être mises en défaut lorsque des séquences plus rares ne sont pas enregistrées puisqu'elles contiennent moins de séquences que les bases de données publiques [155, 156].

Database	Characteristic[a]							
	Resource(s) of reference sequences	Target genes	Curated sequences	Updated nomenclature	Origin of sequences	Search engine(s)	Multiple sequence alignment	Phylogenetic inference
GenBank	DDBJ, EMBL, GenBank at NCBI	All	No	No	All	BLAST	No	Neighbor joining, fast minimum evolution (using BLAST pairwise alignment)
EzTaxon	GenBank, sequences of strains provided by authors	16S rRNA	Yes	Yes, from DSMZ	Only type strains	BLAST and FASTA, then pairwise global sequence alignment (Miller-Myers algorithm)	Yes, using Clustal W	Neighbor joining, maximum parsimony, maximum likelihood (using Clustal W)
BIBI	GenBank	16S rRNA, *gyrB*, *recA*, *sodA*, *rpoB*, *tmRNA*, *tuf*, *groel2-hsp65*	Yes	Yes, from DSMZ	All, but categorized analysis	BLAST	Yes, using Clustal W	Not described (using Clustal W)

[a] DDBJ, DNA DataBank of Japan; EMBL, the European Molecular Biology Laboratory; DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures); BLAST, basic local alignment search tool.
[b] The users can choose between the TS database (BacteriaArchaea_TS_SSU-rDNA-16S_stringent), the stringent database (BacteriaArchaea_SSU-rDNA-16S_stringent), and the lax database (BacteriaArchaea_SSU-rDNA-16S_lax), according to their aims. The sequences in the TS database originate from type strains only. The stringent database contains the sequences from the strains with validly published names, including type strains. The lax database contains the sequences from all strains, regardless of whether the strain names are nomenclature compliant or not.

Tableau 9 : Caractéristiques de 3 banques de données différentes [154].

Dernièrement, une nouvelle base de donnée gratuite, la 16SpathDB (http://147.8.74.24/16SpathDB/main.php) a été spécialement développée pour l'interprétation de séquences de l'ADNr 16S de souches bactériennes cliniquement impliquées en pathologie humaine [157].

Les comparaisons sont ensuite présentées sous forme de dendrogrammes . En fonction de la séquence obtenue, la bactérie recherchée représentée par « query »est placée sur l'arbre (figure 16).

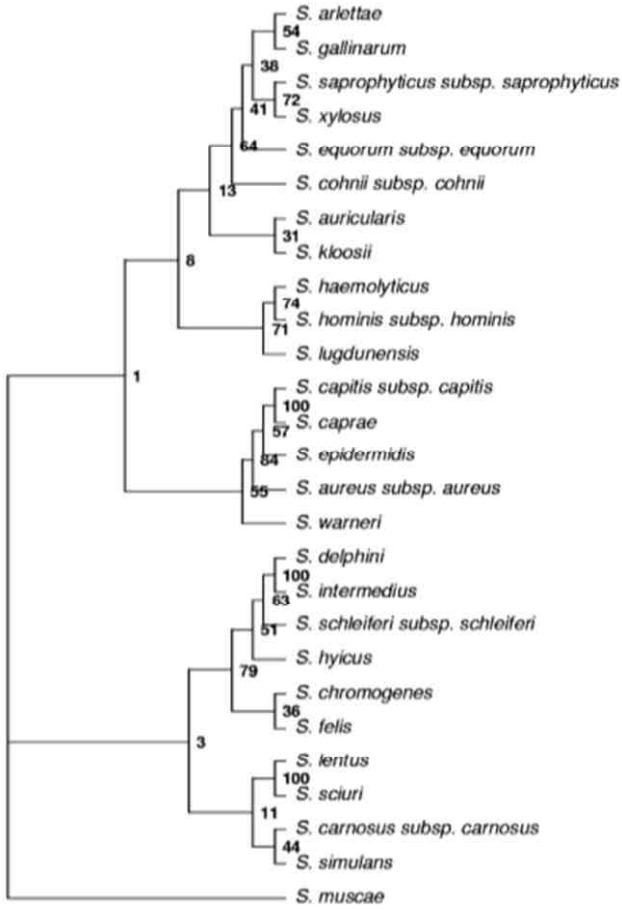


Figure 16 : Dendrogramme montrant les relations phylogénétiques entre 27 espèces de Staphylocoques à partir de l'analyse de séquences d'environ 500 paires de bases du gène *rrs* [158].

3.4 Applications de la PCR 16S

3.4.1 Identification de souches à croissance difficile

Bien que les méthodes phénotypiques classiques soient relativement peu coûteuses et permettent l'identification des bactéries les plus fréquemment rencontrées, certains groupes de bactéries sont difficiles à identifier, comme par exemple celles à croissance lente. La méthode de PCR-séquençage de l'ADNr 16S est une technologie qui, théoriquement, fournit des solutions à ce problème en donnant des résultats en moins de 48h, résultats reproductibles entre les laboratoires [159].

Par exemple, la culture des mycobactéries donnant des résultats entre 1 et 8 semaines, le séquençage de l'ADNr 16S peut être utilisé pour l'identification des espèces de mycobactéries

isolées à partir d'échantillons cliniques [160]. L'utilisation d'autres gènes cibles, tels que hsp65, rpoB ou gyrB, est toutefois nécessaire pour distinguer les différentes espèces au sein du genre *Mycobacterium*[152, 161].

3.4.2 Identification de nouveaux genres ou espèces bactériennes

Naturellement, au cours du processus décrit ci-dessus, de nouvelles espèces potentielles peuvent être définies. Une nouvelle espèce est reconnue lorsqu'il y a une différence significative entre les caractéristiques phénotypiques ou entre la séquence de l'ADNr 16S de la bactérie inconnue et celles qui lui sont les plus étroitement liées sur l'arbre phylogénétique[162]. Entre 2001 et 2007, à l'aide du séquençage de l'ADNr 16S à partir d'échantillons humains, il a été découvert 215 nouvelles espèces dont 29 appartenaient à des genres nouveaux. Parmi ces nouvelles espèces, 100 d'entre elles (soit 15 nouveaux genres) ont été retrouvées chez au moins quatre personnes. Les nouvelles espèces ont principalement été découvertes à partir de prélèvements du tractus gastro-intestinal (26 espèces) et de la cavité buccale (19 espèces) [159].

3.4.3Diagnostic des infections à culture négative

La biologie moléculaire a permis d'améliorer le diagnostic des infections à culture négative oucausées par des bactéries non cultivables.

L'identification des pathogènes d'endocardites infectieuses est un des meilleurs exemples d'application de la biologie moléculaire. Dans un tiers des cas, l'hémoculture estnégative, avec pour conséquence l'utilisation d'une antibiothérapie probabiliste d'où un fort risque d'échec clinique[163]. Les causes de cette négativité en culture sont principalement l'utilisation préalable d'antibiotiques ou l'implication de micro-organismes fastidieux comme les bactéries du groupe HACEK (*Haemophilus, Actinobacillus, Cardiobacterium, Eikenella, Kingella*), *Coxiella burnetii*, *Legionella pneumophila*, *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Brucella*…

Goldenberger a décrit l'une des premières situations dans laquelle le séquençage de l'ADNr 16S a été réalisé sur l'ADN extrait de valves infectées [164, 165]. Cette technique s'avère aussi performante pour diagnostiquer des infections à cultures négatives au cours de méningites [166, 167], de kératites[168], d'arthrites septiques[169] …

Cependant, pour que cette technique puisse être utilisée directement sur un échantillon biologique, plusieurs conditions doivent être respectées :

- le site doit être normalement stérile (sang, liquide céphalo-rachidien, liquide articulaire, prélèvement osseux...),
- le recueil doit être réalisé dans des conditions d'asepsie stricte,
- l'infection suspectée doit être monomicrobienne ; lorsque les sites contiennent plusieurs bactéries, cela entraine l'amplification d'autant de séquences d'espèces différentes qui se mélangent et rendent la réaction de séquençage ininterprétable.

3.5 PCR 16S et infections ostéo-articulaires

Les techniques de PCR 16S ont été expérimentéessur les prélèvements ostéo-articulaires dans différentes études, avec des résultats très variables.Ces résultats sont liés à une sélection inhomogène des patients, à des méthodes différentes de préparation des prélèvements et à des choix variables de techniques moléculaires. De plus, la plupart des études étaient monocentriques[169-175]. Le protocole MICROBIOS, objet de cette thèse, représente donc la première étude multicentrique et prospective à partir deprélèvements ostéo-articulaires broyés de façon automatique, comparant les techniques classiques microbiologiques aux techniques moléculaires.

Déjà en 1999, Tunnay concluait que l'incidence des infections sur prothèses de hanche était largement sous-estimée par l'utilisation unique des techniques de culture conventionnelles [171]; alors que la culture du liquide issu de la sonication de la prothèse est positive dans seulement 22% des cas, 72% des PCR 16Scorrespondantes s'avèrent positives.Cependant,l'étape de séquençage n'était jamais réalisée à l'issue de la PCR 16S.

Dans son étude de 2006, Fenollar utilise le séquençage couplé au clonage, ce qui l'amène à découvrir de nouvelles espèces bactériennes impliquées dans les infections osseuses plurimicrobiennes[173].

En 2007, Fihman apporte des réponses quant à la sensibilité et la spécificité de la PCR 16S[169]. Ces deux paramètres primordiaux pour l'évaluation d'une nouvelle méthode diagnostique sont difficilement comparables entre les différentes études, puisqu'aucun « gold standard » pour le diagnostic d'IPOAn'est réellement défini. Fihman utilise les arguments cliniques, biologiques, radiologiques, microbiologiques et histologiques pour poser le diagnostic d'infection. Il rapporte une sensibilité pour la PCR16Sde 54% pour les IPOA, alors

qu'elle est de 88% pour les autres types d'infections. En comparaison, la sensibilité de la culture est très bonne (92%). A noter également que la PCR 16S semble plus sensible lorsqu'elle est réalisée à partir de prélèvements osseux broyés plutôt qu'à partir de liquide synovial.

Avec un « gold standard » comparable à celui de l'étude de Fihman, Vandercam aboutit à une sensibilité de l'ordre de 90% pour la PCR 16S et de seulement 64% pour la culture[174].

L'étude la plus récente est celle de Marin, publiée en mars 2012 et réalisée de façon prospective sur 122 patients de l'hôpital de Madrid de 2004 à 2007, soit 321 prélèvements issus de patients non-infectés et 176 de patients présentant une IPOA[175]. Trois études statistiques ont été réalisées, permettant ainsi les conclusions suivantes :

- la technique de PCR 16S est plus spécifique et a une meilleure valeur prédictive positive que la culture,
- une PCR 16S positive est largement suggestive d'une infection de prothèse, même si peu d'échantillons sont analysés,
- la culture est généralement cependant plus sensible que la PCR 16S.

3.6 Limites de la méthode de la PCR16S -séquençage

Tout d'abord, il est à noter l'absence de standardisation des méthodes de « PCR universelle », ainsi que l'inexistence de contrôle de qualité : dans la conférence internationale sur l'harmonisation des directives pour la validation des processus analytiques, les exigences pour les techniques d'amplification des acides nucléiques bactériens ne sont pas encore complètes.

Les limites peuvent être liées à l'extraction. Ainsi, pour les PCR réalisées directement sur les prélèvements cliniques, même lorsque le rendement d'extraction de l'ADN total est bon, la très faible quantité d'ADN bactérien dans les prélèvements par rapport à la quantité d'ADN humain est une limite importante ; la sensibilité des réactions d'amplification en est donc réduite[176].

Contrairement aux PCR spécifiques, la contamination par n'importe quel ADN bactérien de l'environnement peut conduire à de faux positifs étant donné l'utilisation d'amorces dites «universelles». La contamination croisée d'une manipulation à l'autre par des amplicons est également un problème qui peut-être atténué en réalisant les différentes étapes de la technique dans des pièces séparées ainsi qu'en utilisant du matériel distinct [177]. La contamination par de l'ADN exogène des réactifs (les enzymes étant en général produites dans des bactéries) est

également problématique [178]. L'utilisation d'une ADN polymérase et de réactifs ultra-purs ainsi que de micro-tubes plastifiés garantis dénués d'ADN est indispensable.

Le SYBR® Green est également responsable de résultats faussement positifs liés à des hybridations aspécifiques ou à la formation de dimères d'amorces.

La PCR 16S est difficilement applicable pour les prélèvements plurimicrobiens : les électrophorégrammes sont inexploitables lors du séquençage et nécessitent une étape de clonage[173].

Les résultats fournis par les bases de données sont parfois ambigus (plusieurs identifications possibles).

Enfin, la PCR 16S n'aboutit pas à l'obtention des antibiogrammes, indispensables par ailleurs.

4 – LE PROTOCOLE « MICROBIOS »

4.1 Le CRIOGO et ses objectifs

La prise en charge adéquate et optimale des infections sur prothèsesostéo-articulaires est un enjeu majeur de santé publique ; c'est dans ce contexte que les centres de référence interrégionaux ont été mis en place par le ministre de la santé le 26 septembre 2008 (figure 17). Neuf centres de référence ont été créés afin d'optimiser la prise en charge de ce type d'infection, devenue une des priorités du programme national de prévention des infections nosocomiales 2009-2013.

Sur la carte suivante n'apparaît pas Rennes, le 9ème centre de référence depuis 2012.

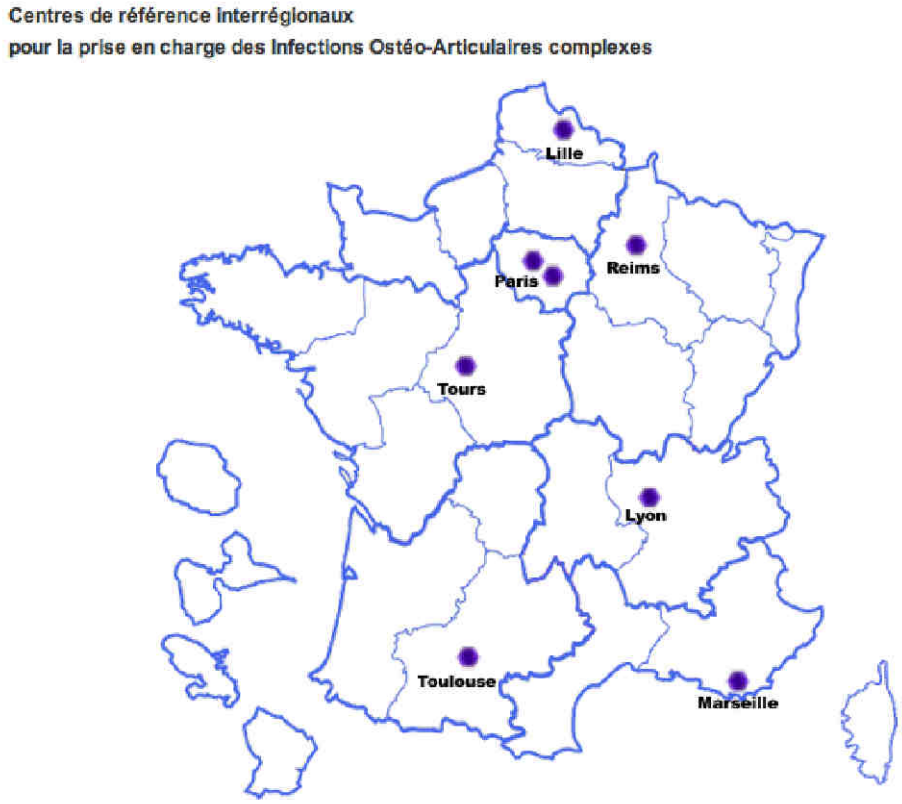


Figure 17 : Centres de référence interrégionaux des infections ostéo-articulaires.

Ces centres de référence ont une mission de coordination, d'expertise, de formation et de recherche ainsi que de prise en charge des infections les plus complexes en lien avec les correspondants d'autres structures.

Chaque centre est un pôle interrégional qui permet de garantir au patient :

- une qualité de prise en charge élevée en s'appuyant sur l'expérience et les professionnels de santé de plusieurs établissements,

- une mise en oeuvre de traitements spécifiques de qualité dans les meilleurs délais,
- une meilleure stratégie thérapeutique par une prise en charge pluridisciplinaire des infections ostéo-articulaires en faisant travailler ensemble chirurgiens, infectiologues, radiologues, biologistes…

Tous ces éléments garantissent au patient une prise en charge globale et sont établis par l'intermédiaire des réunions de concertation pluridisciplinaires (RCP). Ainsi, les RCP permettent :

- de prendre des décisions consensuelles (stratégie d'investigation, stratégie opératoire, stratégie d'antibiothérapie et de suivi),
- de choisir les différentes options maximisantles chances de succès thérapeutique, tout en privilégiant le confort du patient,
- de pouvoir communiquer au patient une décision réfléchie,
- d'accélérer les procédures de prise en charge.

Une RCP se déroule à jour fixe régulier et prédéfiniet tous les participants sont inscrits sur la liste de présence. Trois spécialités sont nécessaires pour atteindre le quorum de validation pour une RCP :la chirurgie orthopédique, l'infectiologie et la microbiologie. Mais de nombreuses autres spécialités sont souvent représentées comme la radiologie, la rhumatologie… Les cas présentés peuvent être ou non des patients hospitalisés au CHU. Les praticiens des cliniques peuvent également demander l'avis de la RCP. Les professionnels proposent pour chaque patient une stratégie diagnostique et/ou thérapeutique adaptée et basée sur des recommandations validées.Chaque cas est présenté par le médecin requérant qui aura, au préalable, complété le formulaire « fiche de présentation RCP ». Cette fiche est mise à disposition des médecins qui souhaitent présenter ou que soit présenté un cas, la demande est alors adressée au centre concerné. Les données de cette fiche correspondent aux items indispensables pour établir une proposition de prise en charge de qualité. La fiche, complétée lors de la réunion, est ensuite transmise par courrier ou par mail au médecin en charge du patient. Certains peuvent être présentés plusieurs fois si une modification intervient dans le traitement ou si il y a un changement de leur état.Les décisions prises sont détaillées dans le dossier du patient.

En 2010, les CHU de Tours et Poitiers, en collaboration avec les CHU d'Angers, Brest, Nantes, Orléans, Poitiers et Rennes, avaient été retenus comme centres de référence pour l'interrégion Grand Ouest (Centre, Poitou-Charentes, Pays de Loire, Bretagne), sous

l'appellation de CRIOGO (Centre de Référence Interrégional des Infections Ostéo-articulaires du Grand Ouest).

Le CRIOGO possède une expérience reconnue en matière de recherche clinique et fondamentale dans le domaine des infections ostéo-articulaires complexes. Différents programmes d'études cliniques sont en cours :

- DATIPO, PHRC lancé en 2009 par le Pr. Louis Bernard (CHRU de Tours). Cette étude multicentrique de non infériorité, randomisée, ouverte, évalue l'efficacité de deux durées d'antibiothérapie (6 semaines versus 12 semaines) dans le traitement des infections sur prothèses ostéo-articulaires, avec changement prothétique (en 1 temps ou 2 temps) ou non (lavage articulaire).
- MICROBIOS, PHRC coordonné par le Dr. Bemer (CHU de Nantes), dont les résultats des patients poitevins sont présentés dans cette thèse.

Parallèlement à sa mise en place et pour répondre aux missions des centres de référence souhaitées par le ministère, plusieurs groupes de travail ont été mis en place :

- diagnostic microbiologique,
- prise en charge médicale et protocoles d'antibiothérapie,
- prise en charge chirurgicale,
- dossier et base de données,
- recherche clinique.

Le but de ces groupes est de faire l'inventaire des moyens, des protocoles et du minimum requis pour la prise en charge de ces pathologies. Toute personne intéressée par le sujet peut y participer et être présente aux réunions du groupe.

4.2 Le groupe des microbiologistes du CRIOGO

Avant de démarrer l'étude MICROBIOS, le groupe des microbiologistes du CRIOGO a travaillé pour l'homogénéisation et l'amélioration du diagnostic microbiologique des infections ostéo-articulaires complexes par :

- l'acquisition pour chaque centre (financée pour le protocole) de broyeurs automatiques à billes, utiles pour tous les types d'infections ostéo-articulaires,
- l'homogénéisation des milieux de culture et de leurs délais de conservation dans les laboratoires des 7 centres participants.

4.3 Description du protocole

MICROBIOS ou « l'évaluation de l'apport des techniques de biologie moléculaire dans le diagnostic des infections sur prothèses ostéo-articulaires » est un PHRC qui a débuté en 2010 dans les 7 centres du CRIOGO.

Cette étude prospective et multicentrique a pour objectif principal d'évaluer l'apport des techniques de la PCR 16S dans le diagnostic des infections sur prothèses ostéo-articulaires notamment chroniques, à germes à croissance lente ou difficile, ou en cas de culture négative.

Les objectifs secondaires sont les suivants :

- évaluation des performances diagnostiques de la PCR 16S,
- étude des prélèvements positifs en culture et de leur délai de positivité,
- étude de la rentabilité de l'inoculation d'un prélèvement en flacon d'hémoculture,
- apport de l'anatomopathologie au diagnostic d'infection sur prothèse ostéo-articulaire,
- épidémiologie des germes rencontrés dans ces infections avec leur sensibilité aux antibiotiques.

La figure 18 reprend brièvement les grandes étapes techniques afin de réaliser ces différents objectifs.

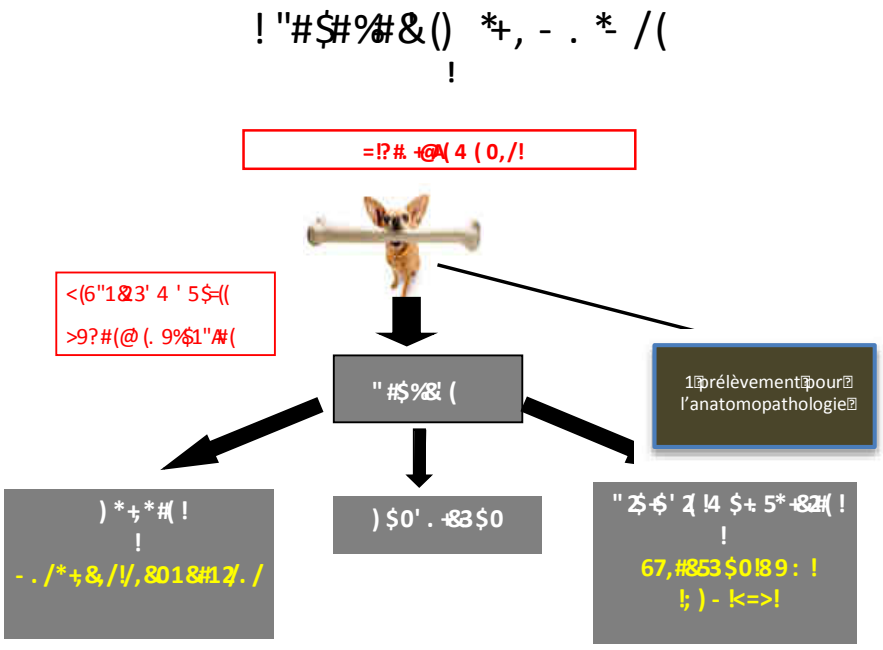


Figure 18 : Schéma synthétisant les grandes étapes du protocole MICROBIOS.

En délivrant une évaluation critique de l'apport de la biologie moléculaire, MICROBIOS a pour but concret d'harmoniser de façon régionale les techniques (protocole d'extraction,

choix des amorces, protocole d'amplification) et de définir les différentes indications à l'utilisation de la biologie moléculaire dans le diagnostic des infections sur prothèses ostéo-articulaires.
Au niveau épidémiologique, le but est d'établir une documentation microbiologique au moins égale à 80% des infections sur prothèses ostéo-articulaires, en s'attachant à ce que tous les patients du CHU de Poitiers présentant une IPOA soient inclus.

Le critère de jugement principal de ce protocole est l'identification bactérienne par PCR.L'infection doit être documentée par des critères cliniques, microbiologiques et histologiques. Trois critères seront utilisés pour définir le « gold standard » :

- clinique: présence d'une fistule communiquant avec la prothèse ou présence de pus dans l'articulation ou autour de la prothèse,
- microbiologique :
    - 3 prélèvements positifs au même germe (3 prélèvements per-opératoires ou 2 prélèvements per-opératoires et 1 prélèvement par ponction articulaire réalisée avant la chirurgie).
    - 1 ou 2 prélèvements positifs à une bactérie n'appartenant pas habituellement à la flore cutanée (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, entérobactéries), ou exceptionnellement rencontrée (*Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*sp.,*Salmonella* sp., *Pasteurella* sp…).
- histologique : plus de 5 polynucléaires neutrophiles par champ microscopique (grossissement x 400) dans au moins 5 champs.

L'infection est définie comme :

- « certaine » sielle associe les 3 critères prédéfinis,
- « probable » si est au moins présent le critère clinique ou le critère microbiologique,
- « exclue » sielle ne comporte aucun des critères prédéfinis.

Si seul le critère histologique est positif, un classement par un comité indépendant sera réalisé.
Les inclusions du protocole MICROBIOS ont eu lieu de novembre 2010 à janvier 2012.

5–MATÉRIEL ET MÉTHODES

5.1 Patients

Les résultats présentés dans cette étude concernent les patients recrutés dans le service d'orthopédie du CHU de Poitiers.
68 patients ont été inclus, soit 340 prélèvements analysés.

5.1.1 Critères d'inclusion

Les différents critères d'inclusion des patients étaient :

- hommes ou femmes majeurs,
- bénéficiant d'un régime de sécurité sociale,
- répondant aux critères diagnostiques présumés d'infection sur prothèse (hanche, épaule, genou, coude) :
    - existence d'une fistule à proximité de la prothèse,
    - éléments en faveur d'une infection aiguë (< 1 mois suivant la pose) :
        - douleur d'intensité anormale,
        - écoulement purulent de la plaie opératoire,
        - désunion ou nécrose ou inflammation cicatricielle.
    - éléments en faveur d'une infection chronique (> 1 mois suivant la pose),
        - douleur et/ou descellement radiologique.
    - sepsis chez un patient porteur de prothèse articulaire,

Les témoins de contrôle négatif sont les sujets pris en charge pour une pose de prothèse de première intention.

5.1.2 Critères d'exclusion

Ont été exclus :

- les patients sous tutelle ou curatelle,
- les femmes enceintes ou allaitantes

5.2 Méthodologie

5.2.1 Consentement du patient

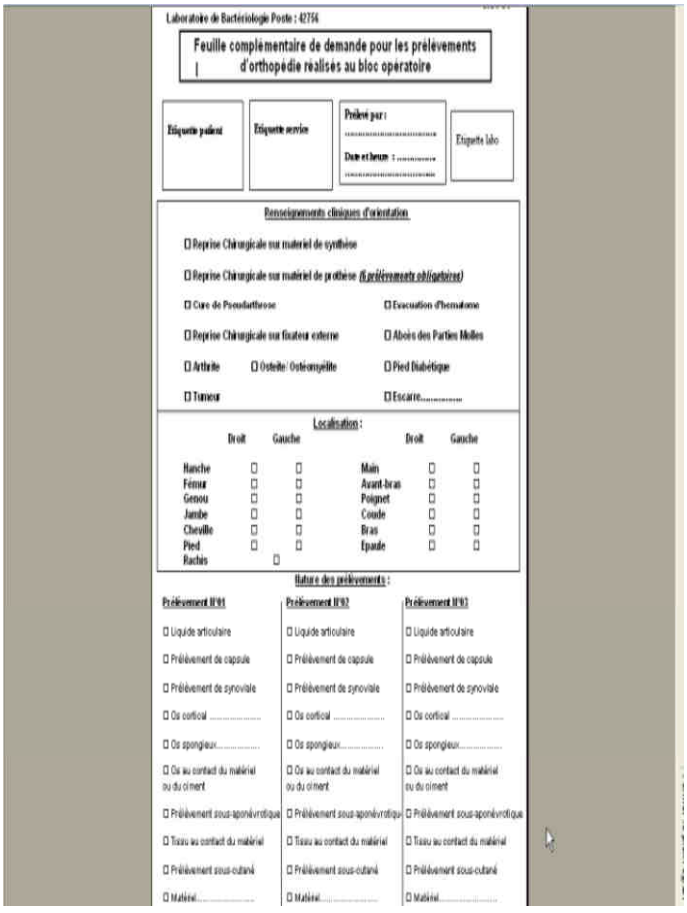
Chaque inclusion a nécessité le consentement du patient, notifié sur le formulaire de non-opposition patient signé par le chirurgien ; une information orale était ainsi donnée au patient sur l'objectif du protocole et le déroulement prévu de l'étude.

5.2.2 Prélèvements opératoires

Pour chaque patient, des prélèvements solides et liquides ont été réalisés :

- 5 prélèvements péri-opératoires, à visée microbiologique et moléculaire, chacun placé dans un flacon stérile approprié. Il peut s'agir d'os cortical, d'os spongieux, de liquide articulaire, de prélèvement synovial, d'os au contact du ciment, de prélèvement sous-aponévrotique, de tissu au contact du matériel…
- 1 prélèvement de capsule ou pseudo-capsulaire à visée anatomopathologique, pour la détermination du compte de polynucléaires par champ microscopique et l'établissement d'une classification histopathologique.

Chaque série de prélèvements était accompagnée du bon de demande spécifique des prélèvements ostéo-articulaires (figure 19).


Laboratoire de Bactériologie Poste : 42756

Feuille complémentaire de demande pour les prélèvements d'orthopédie réalisés au bloc opératoire

Etiquette patient | Etiquette service | Prélevé par : ..... Date et heure : ..... | Etiquette labo

Renseignements cliniques d'orientation

☐ Reprise Chirurgicale sur matériel de synthèse

☐ Reprise Chirurgicale sur matériel de prothèse (6 prélèvements obligatoires)

☐ Cure de Pseudarthrose ☐ Evacuation d'hématome

☐ Reprise Chirurgicale sur fixateur externe ☐ Abcès des Parties Molles

☐ Arthrite ☐ Ostéite/ Ostéomyélite ☐ Pied Diabétique

☐ Tumeur ☐ Escarre.....

Localisation :

	Droit	Gauche		Droit	Gauche
Hanche	☐	☐	Main	☐	☐
Fémur	☐	☐	Avant-bras	☐	☐
Genou	☐	☐	Poignet	☐	☐
Jambe	☐	☐	Coude	☐	☐
Cheville	☐	☐	Bras	☐	☐
Pied	☐	☐	Epaule	☐	☐
Rachis	☐				

Nature des prélèvements :

Prélèvement N°01	Prélèvement N°02	Prélèvement N°03
☐ Liquide articulaire	☐ Liquide articulaire	☐ Liquide articulaire
☐ Prélèvement de capsule	☐ Prélèvement de capsule	☐ Prélèvement de capsule
☐ Prélèvement de synoviale	☐ Prélèvement de synoviale	☐ Prélèvement de synoviale
☐ Os cortical	☐ Os cortical	☐ Os cortical .....
☐ Os spongieux.....	☐ Os spongieux.....	☐ Os spongieux.....
☐ Os au contact du matériel ou du ciment	☐ Os au contact du matériel ou du ciment	☐ Os au contact du matériel ou du ciment
☐ Prélèvement sous-aponévrotique	☐ Prélèvement sous-aponévrotique	☐ Prélèvement sous-aponévrotique
☐ Tissu au contact du matériel	☐ Tissu au contact du matériel	☐ Tissu au contact du matériel
☐ Prélèvement sous-cutané	☐ Prélèvement sous-cutané	☐ Prélèvement sous-cutané
☐ Matériel.....	☐ Matériel.....	☐ Matériel.....

Figure 19 : Bon de prescription spécifique pour les infections ostéo-articulaires au CHU de Poitiers.

5.2.3 Pré-traitement des prélèvements à visée microbiologique

Tous les prélèvements osseux ainsi que les liquides articulaires coagulés ont subi une phase de broyage, selon les étapes suivantes :

1. transvasement du prélèvement dans un pot stérile en polyéthylène à col large Nalgène® de 30 mL, sous hotte PSM,
2. rajout d'un tube contenant 10 mL d'eau distillée pour préparation injectable et 10 billes inox, préparé auparavant et stocké à +4°C,
3. broyage pendant 2 min30s à la fréquence maximum de 30Hz, grâce au broyeur Retsch® MM400.

5.2.4 Mise en culture des prélèvements à visée microbiologique

Sous hotte PSM, 50 µL de chaque broyat a été ensemencé en quadrant sur :

- une gélose Columbia au sang, mise sous CO_2 à 37°C pendant 7 jours,
- une gélose polyvitex au sang cuit, mise sous CO_2 à 37°C pendant 7 jours,
- une gélose Columbia au sang, mise en anaérobiose pendant 7 jours.

Des milieux liquides ont également été ensemencés :

- un bouillon de 10 mL semi-gelosé de type Schaedler avec 1 mL de broyat, mis en incubation à 37°C pendant 14 jours.
- un flacon d'hémoculture de type pédiatrique avec 1 mL de broyat, placé en incubation pendant 14 jours dans l'automate BacT/Alert® de Biomérieux, avec monitoring continu des flacons.

Pour chaque prélèvement, un examen direct sur lame après coloration de Gram a été effectué.

5.2.5 Conservation des broyats

Deux aliquots de 400 µL de broyat ont été conservés à -80°C. D'autre part, tous les broyats restants ont été stockés à -20°C.

5.2.6 Suivi des cultures microbiologiques

Les milieux solides aérobies (gélose au sang et gélose chocolat), ont été examinés à J1, J2, J5 et J7.

La gélose placée en anaérobiose a été examinée à J2 et J7.

Pour chaque culture positive sur gélose, le nombre de colonies a été quantifié (rares/quelques/nombreuses).

Si le bouillon Schaedler ne révélait pas sa positivité au bout de 14 jours, il était repiqué systématiquement sur gélose chocolat incubée à 37°C sous CO_2 et sur gélose au sang en anaérobiose.

Chaque hémoculture positive ensemencée avec le broyat était repiquée sur différentes géloses choisies en fonction du résultat de l'examen direct effectué.

Chaque agent pathogène mis en évidence en culture a été identifié selon les techniques utilisées en routine au laboratoire de bactériologie, soit à l'aide :

- de l'automate Vitek 2®,
- de galeries d'identification de type miniApi®,
- de méthodes manuelles d'agglutination…

Les antibiogrammes ont été réalisés, soit par techniques manuelles sur géloses en diffusion ou en milieu liquide par l'automate Vitek 2®.

5.2.7 Biologie moléculaire

L'analyse des échantillons par PCR 16S a été réalisée indépendamment du suivi clinique et des résultats obtenus en culture et en anatomopathologie. Ceci a pour objectif d'éviter les biais, et ainsi d'obtenir une indépendance entre le « gold standard » de l'infection sur prothèse et l'examen à l'étude qu'est la PCR 16S.

Les laboratoires participant au protocole MICROBIOS ont tous participé à trois séries de contrôles de qualité, qui ont démontré la qualité et l'homogénéité des résultats entre les centres (résultats en cours de publication).

Chaque broyat a subi la même technique d'extraction :

- étape de lyse pour une meilleure dissociation des protéines : 80µL de tampon ROCHE Bactéria Lysis Buffer® et 30µL de protéinase K EUROBIO® à 20mg/mL ajoutés à 200µL d'aliquot de broyat ; vortex puis incubation pendant 3 heures à 65°C.
- centrifugation brève et récupération de 300µL de surnageant afin d'éliminer toute particule solide.

L'extraction d'ADN a été réalisée à l'aide de l'automate ROCHE® MagNA Pure Compact System avec le kit MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I®. Le volume d'élution était de 100 µL.

Le couple d'amorces universelles choisi, ciblant le gène *rrs* codant l'ARNr 16S dans sa première partie, est le suivant :

- 27F : 5' AGA-GTT-TGA-TCM-TGG-CTC-AG 3'
- 685R3 : 5' TCT-RCG-CAT-TYC-ACC-GCT-AC 3'

Ce couple d'amorces dégénérées permet d'amplifier un fragment d'environ 700 paires de bases selon les germes.

Le mélange réactionnel (master mix) de 20 µL comprend :

- 12,5 µL de Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time) TAKARA®, comprenant la hot start Taq polymérase (concentration finale 1x), le $MgCl_2$, le tampon, et les quatre dNTP,
- 4,4 µL d'eau PPI,
- 2,5 µL de SYBR® Green Sigma-Aldrich® (concentration finale 0,5x),
- 0,3 µL de chacune des amorces 27F et 685R3 à 12,5 µM, soit une concentration finale d'amorces de 50 nM.

A ces 20 µL préparés sont ajoutés dans la cupule de SmartCycler® les 5 µL d'extrait d'ADN.

L'amplification a été réalisée sur le thermocycler SmartCycler Cepheid®. Cet automate de PCR en temps réel est composé de 16 thermocycleurs indépendants les uns des autres et pouvant lire sur quatre canaux différents (figure 20).

Le protocole utilisé était le suivant :

- 95°C pendant 25 secondes pour l'activation de la hot start Taq polymérase,
- Puis 40 cycles :
    - 95°C pendant 10s (dénaturation),
    - 58°C pendant 20s (hybridation),
    - 72°C pendant 40s (élongation). La lecture de la fluorescence est réalisée à cette étape.

La phase d'élongation, généralement inutile en PCR temps réel, est conservée en raison de la longueur du fragment.

L'amplification est suivie par la réalisation d'une courbe de dénaturation des doubles brins pour observer le «pic de fusion» du produit amplifié (60 à 95°C avec une augmentation de 0,2°C/s).



Figure 20 : Thermocycleur ou appareil PCR temps réel Cepheid®

Dans chaque série sont ajoutés :

- un témoin positif : ADN extrait d'une souche bactérienne connue,
- un témoin négatif d'amplification: eau PPI,
- un témoin négatif d'extraction.

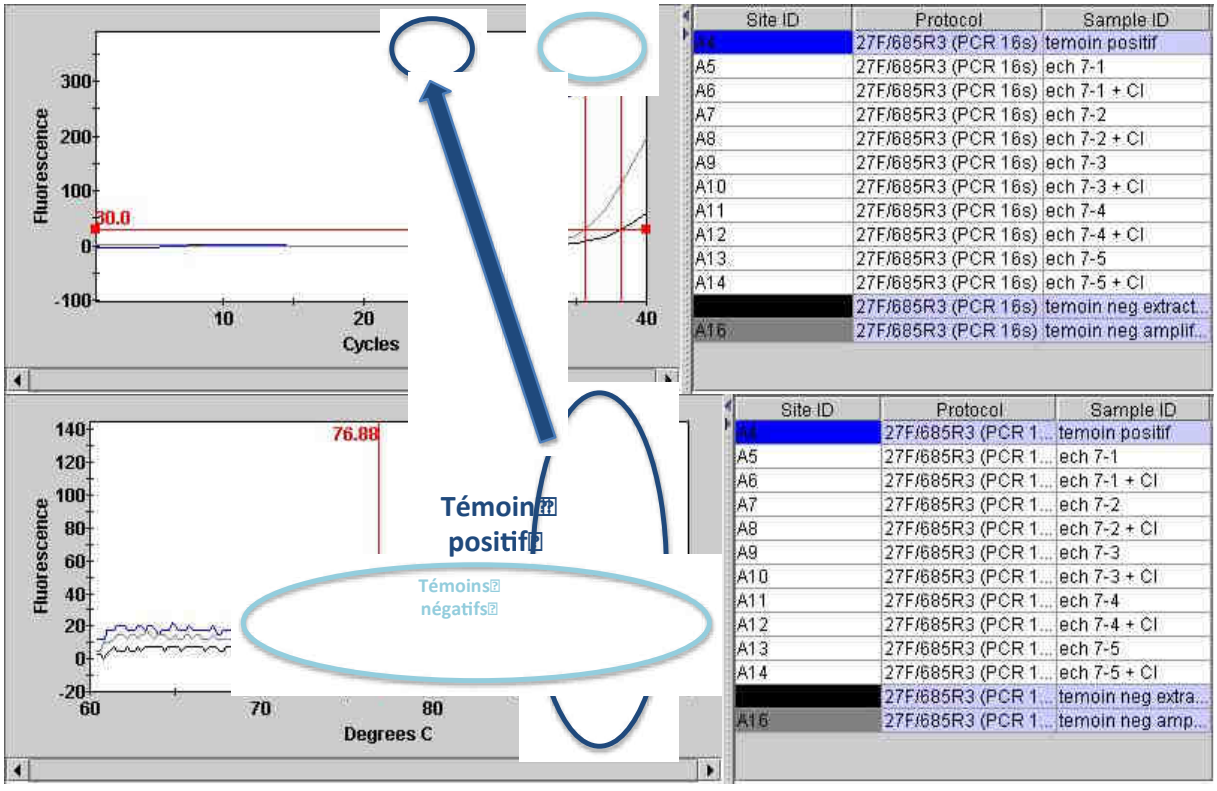


Figure 21 : Courbes d'amplification par PCR 16S des témoins négatifs et positifs.

Les témoins négatifs présentent un signal supérieur à 35 Ct mais ne présentent pas de pic de fusion.Une amplification du gène humain de la béta-globine devait être réalisée afin de valider l'extraction (figure 21).

Pour les PCR 16S négatives, l'ajout d'un contrôle interne permettait de révéler la présence d'inhibiteurs pouvant fausser la détection de l'ADN. Ainsi, on compare le cycle-seuil (Ct) de la PCR « échantillon + contrôle interne (CI) » avec le Ct de la PCR du contrôle interne pur. Si le delta de Ct est supérieur à 2, il est alors nécessaire de refaire les amplifications en diluant l'extrait au 1/10 et au 1/100, afin de diluer également les inhibiteurs.

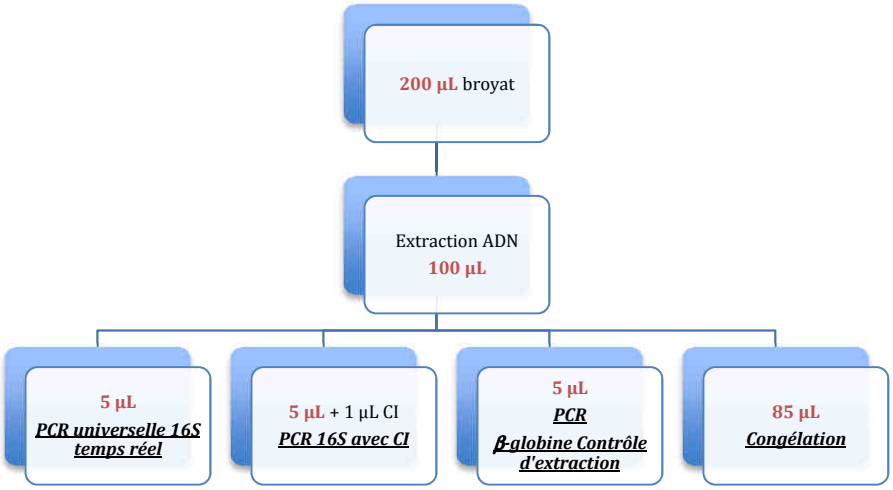


Figure 22 : Répartition du volume du broyat.

Tous les échantillons positifs sont ensuite séquencés.

Avant le séquençage, les amplicons issus de la PCR 16S sont purifiés à l'aide du Kit Qiagen® QIAquick® PCR Purification.

Le mélange réactionnel est le suivant :

- 12,5 µL d'eau PPI
- 3 µL de tampon de séquençage
- 2 µL de Terminator ready Big Dye de chez Applied Biosystems® comprenant les 4 dNTP, de faibles concentrations des 4 ddNTP marqués par un fluorochrome, l'AmpliTaq DNA Polymerase, le $MgCl_2$, et du tampon Tris-HCl à pH=9.
- 0,5 µL d'amorce 27F ou à 3,2 µM.

Une fois le mélange réactionnel terminé, 2 µL du produit de PCR purifié sont ajoutés pour atteindre le volume final de 20 µL.

La PCR est réalisée sur un thermocycleur PERKIN ELMER® GeneAmp PCR System 2400, avec le protocole suivant :

- 96°C pendant 1min (dénaturation)
- Puis 25 cycles selon les 3 étapes suivantes :
  - 96°C pendant 5s (dénaturation),
  - 50°C pendant 10s (hybridation),
  - 60°C pendant 3min (élongation).

Une purification des produits de séquençage est réalisée à l'aide du kit DyeEx® 2.0 spin kit de chez Quiagen® selon un principe de filtration sur gel afin de retirer les terminateurs d'élongation («BigDye Terminators») non utilisés, nuisibles à la réaction de séquençage.
Le séquençage est ensuite réalisé sur l'appareil Applied Biosystems® 3500DX Genetic Analyser.

La figure suivante (figure 42) présente les différentes étapes aboutissant à une identification bactérienne par PCR, de l'obtention d'une amplification d'ADN caractérisée par un pic de fusion à l'obtention d'une séquence intégrée dans BIBI, donnant un arbre phylogénétique.

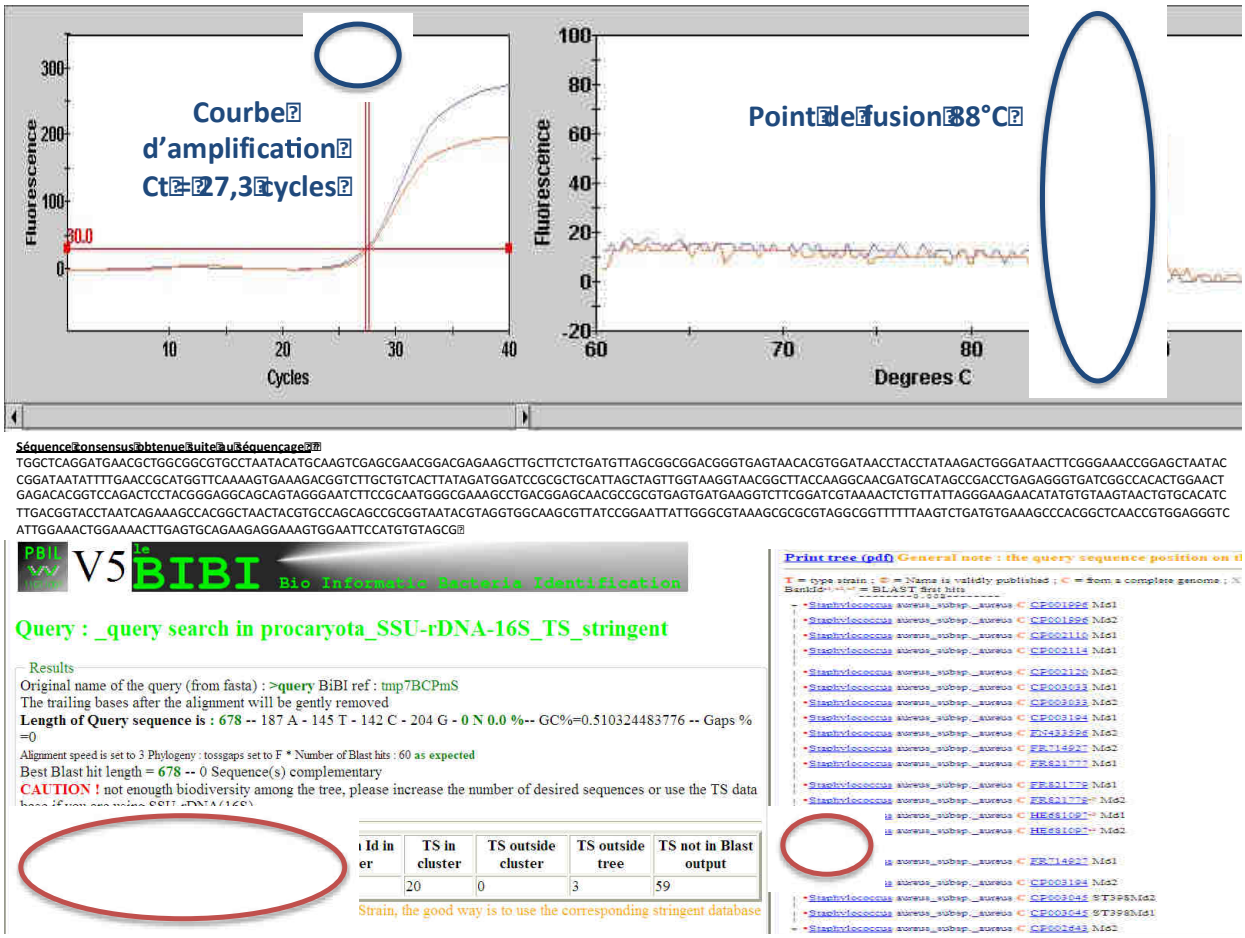


Figure 23 : Les différentes étapes dans le résultat de la PCR 16S sur un prélèvement.

Pour le rendu des résultats, les prélèvements pour lesquels le séquençage est ininterprétable malgré une amplification du produit de PCR sont classés parmi les prélèvements « PCR négative ».

5.2.8 Anatomopathologie

Un prélèvement osseux péri-opératoire était envoyé directement du bloc opératoire au laboratoire d'anatomopathologie pour la détermination du compte de polynucléaires par champ et la détermination du type d'interface péri-prothétique selon la classification de Morawietz. Cette analyse dont le résultat rentre dans les critères du « gold standard »n'est encore que rarement réalisée.

La première lecture (anapath-A) a été réalisée par le laboratoire d'anatomo-pathologie de chaque centre. Une deuxième lecture (anapath-B) a été réalisée ultérieurement en aveugle par le laboratoire d'anatomo-pathologie du centre promoteur, en cas de résultats discordants avec la microbiologie.
La feuille de résultats comporte :

- le nombre de polynucléaires neutrophiles sur 10 champs au grossissement 400,
- la présence ou non de : plasmocytes, nodules lymphocytaires, granulome épithélioïde, tissu fibro-vasculaire cicatriciel, granulome macrophagique, tissu de granulation inflammatoire,
- le type de membrane d'interface péri-prothétique selon la classification de Morawietz :
  - type I : réaction granulomateuse macrophagique aux débris d'usure prothétique,
  - type II : réaction inflammatoire dominée par les polynucléaires neutrophiles (correspond à une infection péri-prothétique),
  - type III : mélange des types I et II (associé majoritairement à une infection),
  - type IV : tissu fibreux riche en vaisseaux, en fibroblastes, et tapissé en surface par un exsudat fibrineux. De rares polynucléaires neutrophiles peuvent être observés en surface (tissu vraisemblablement de nature cicatricielle, secondaire aux sollicitations mécaniques et aux micro-traumatismes péri-prothétiques).

5.3 Recueil des données

Un support Internet de recueil des données a été utilisé dans le cadre de cette étude. Un cahier d'observation électronique a été mis en place dans chacun des centres.

La base de données ne comporte que les données nécessaires à l'analyse en vue de publication. Les données ont été recueillies au fur et à mesure qu'elles ont été obtenues et enregistrées de façon explicite. Chaque donnée manquante a été codée.

Les autres données relatives au patient et nécessaires à son suivi en dehors de l'étude sont colligées dans son dossier médical.

6 –RÉSULTATS

6.1 Caractéristiques générales

Les résultats présentés dans ce travail concernent les 68 patients du protocole MICROBIOS inclus au CHU de Poitiers :

- 61 cas opérés pour suspicion d'infection sur prothèse,
- 7 témoins opérés pour une pose de première intention de prothèse, en absence de tout signe inflammatoire ou infectieux.

Les principales données péri-opératoires sont résumées dans le tableau 10 :

Caractéristiques	Cas	Témoins
Nombre de patients	61	7
Age moyen en années (étendue)	70 (38-91)	62 (42-76)
Nombre :		
d'hommes	27 (44,3%)	2 (28,6%)
de femmes	34 (55,7%)	5 (71,4%)

Type de prothèse :		
hanche	41 (67,2%)	5 (71,4%)
genou	18 (29,5%)	2 (28,6%)
épaule	2 (3,3%)	0
Nb d'échantillons analysés	305	35
Type d'infection:		
aiguë	13 (21,3%)	
chronique	46 (75,4%)	
hématogène	2 (3,3%)	
Consommation d'antibiotiques dans les 15 jours	15 (24,6%)	0
Pus découvert lors de l'opération	31 (50,8%)	0
Fistule découverte lors de l'opération	9 (14,7%)	0

Tableau 10 : Caractéristiques générales des patients inclus dans l'étude.

Les tableaux 11 et 12 rapportent les résultats des cultures et les résultats anatomopathologiques pour chaque patient de façon synthétique :

P. N°	L	Type d'infection	ATB en pré-op	Résultats des cultures		Classification SPLIF 2009	Classification Morawietz (nb PNN/champ)
1	G	Chronique		Négatif		EXCLUE	IV (0)
3	G	Chronique		Négatif		EXCLUE	I (0)
4	H	Aiguë	Oui	Plurimicrobien	*5 à Escherichia coli + Enterobacter cloacae + Enterococcus faecalis + Bacteroides fragilis*	CERTAINE	II (50)
5	H	Chronique		Plurimicrobien	*2 à Staphylococcus warneri + Staphylococcus haemolyticus 1 à Staphylococcus warneri 1 à Staphylococcus haemolyticus*	PROBABLE	IV (10)
6	G	Aiguë	oui	Monomicrobien	*5 Staphylococcus aureus*	CERTAINE	II (100)
7	G	Chronique		Négatif		PROBABLE	IV (0)
8	G	Chronique		Négatif		EXCLUE	NR
9	G	Chronique		Monomicrobien	*5 Staphylococcus epidermidis*	PROBABLE	IV (6)
14	E	Chronique		Monomicrobien	*5 Propionibacterium acnes*	CERTAINE	II (100)
15	H	Chronique		Monomicrobien	*5 Staphylococcus aureus*	PROBABLE	LD (0)

16	G	Aiguë	Oui	Monomicrobien	*5 Staphylococcus epidermidis*	PROBABLE	NR
17	H	Aiguë	Oui	Négatif		PROBABLE	IV (0)
18	H	Chronique		Monomicrobien	*5 Streptococcus mitis*	CERTAINE	IV (3)
20	G	Chronique		Monomicrobien	*5 Propionibacterium acnes*	PROBABLE	NR
21	H	Chronique		Monomicrobien	*5 Staphylococcus aureus*	CERTAINE	II (96)
22	H	Aiguë	Oui	Monomicrobien	*5 Staphylococcus aureus*	PROBABLE	LD (0)
23	G	Chronique	Oui	Monomicrobien	*5 Staphylococcus aureus*	PROBABLE	II (100)
24	H	Hématogène	Oui	Monomicrobien	*4 Enterococcus faecalis*	CERTAINE	II (100)
25	H	Aiguë	Oui	Plurimicrobien	*3 Serratia marsescens + Staphylococcus aureus* *2 Serratia marsescens*	PROBABLE	LDI (10)
26	H	Chronique		Plurimicrobien	*4 Staphylococcus epidermidis*	CERTAINE	III (90)
27	H	Chronique		Négatif		PROBABLE	IV (0)
28	H	Chronique		Monomicrobien	*4 Staphylococcus lugdunensis*	PROBABLE	LDI (35)
29	E	Aiguë		Monomicrobien	*5 Propionibacterium acnes*	PROBABLE	II (100)
30	H	Aiguë	Oui	Monomicrobien	*4 Staphylococcus aureus*	CERTAINE	II (97)
31	H	Chronique		Monomicrobien	*5 Staphylococcus epidermidis*	CERTAINE	II (80)
32	H	Chronique		Négatif		EXCLUE	IV (0)
33	H	Chronique		Négatif		EXCLUE	NR
34	H	Aiguë		Monomicrobien	*4 Bacillus cereus*	CERTAINE	II (100)
35	H	Chronique		Plurimicrobien	*5 Staphylococcus epidermidis*	PROBABLE	II (35)
36	G	Hématogène	Oui	Plurimicrobien	*4 Staphylococcus simulans*	CERTAINE	III (100)
P. N°	L	Type d'infection	ATB en pré-op	Résultats des cultures		Classification SPLIF 2009	Classification Morawietz (nb PNN/champ)
37	G	Chronique		Monomicrobien	*5 Staphylococcus aureus*	PROBABLE	II (99)
38	H	Chronique		Plurimicrobien	*2 Finegoldia magna + Anaerococcus vaginalis*	CERTAINE	III (100)
39	H	Chronique		Plurimicrobien	*2 Enterobacter cloacae* *1 Enterobacter cloacae + Staphylococcus aureus*	PROBABLE	LDI (0)
40	G	Chronique		Monomicrobien	*3 Staphylococcus aureus*	CERTAINE	NC
41	G	Chronique		Monomicrobien	*2 Enterobacter cloacae*	PROBABLE	NC
42	H	Chronique		Monomicrobien	*5 Streptococcus mitis/oralis*	CERTAINE	II (86)
43	H	Chronique	Oui	Monomicrobien	*4 Staphylococcus aureus*	CERTAINE	II (100)
44	G	Chronique		Monomicrobien	*4 Staphylococcus epidermidis*	PROBABLE	IV (0)
46	H	Chronique		Plurimicrobien	*3 Parvimonas micra* *2 Parvimonas micra + Staphylococcus warneri*	CERTAINE	II (95)
47	H	Chronique	Oui	Monomicrobien	*5 Staphylococcus aureus*	PROBABLE	II (46)
48	G	Chronique		Négatif		EXCLUE	I (0)
49	H	Chronique	Oui	Monomicrobien	*2 Staphylococcus aureus*	CERTAINE	II (69)
50	H	Chronique		Monomicrobien	*5 Staphylococcus lugdunensis*	PROBABLE	NR
51	H	Chronique	Oui	Négatif		EXCLUE	NR
52	H	Aiguë		Négatif		EXCLUE	I (0)
53	G	Chronique		Négatif		EXCLUE	I (0)
54	H	Aiguë		Monomicrobien	*5 Staphylococcus aureus*	PROBABLE	II (100)

55	H	Chronique		Négatif		EXCLUE	I (0)
56	H	Chronique		Négatif		EXCLUE	LDI (0)
57	H	Chronique		Négatif		EXCLUE	I (0)
58	H	Aiguë		Monomicrobien	*3 Staphylococcus aureus*	PROBABLE	LD (0)
59	H	Chronique		Monomicrobien	*5 Streptococcus agalactiae*	PROBABLE	LDI (10)
60	H	Aiguë		Monomicrobien	*5 Staphylococcus aureus*	PROBABLE	NC
61	H	Chronique	Oui	Monomicrobien	*5 Staphylococcus epidermidis*	PROBABLE	LD (0)
62	H	Chronique		Monomicrobien	*4 Staphylococcus epidermidis*	PROBABLE	NC
63	H	Chronique		Monomicrobien	*5 Staphylococcus aureus*	PROBABLE	NC
64	H	Chronique		Négatif		EXCLUE	LDI (0)
65	G	Chronique		Négatif		EXCLUE	IV (0)
66	H	Chronique		Négatif		EXCLUE	LD (0)
68	H	Chronique		Négatif		EXCLUE	I (0)
70	G	Chronique		Plurimicrobien	*4 Staphylococcus aureus + Anaerococcus prevoti* *1 Staphylococcus aureus*	CERTAINE	II (81)

L : localisation, H : hanche, G : genou, E : épaule, LD : lésion dégénérative, LDI : lésion dégénérative inflammatoire, NR : non réalisé, NC : non contributif, PNN : polynucléaires neutrophiles

Tableau n°11 : Caractéristiques des 61 patients cas.

P. n°	Localisation	Culture
10	G	Négative
11	G	Négative
12	H	Négative
13	H	Négative
19	H	Négative
67	H	Négative
69	H	Négative

Tableau n°12 : Caractéristiques des 7 patients témoins.

6.1.1 Répartition des patients selon le type de prothèse

Les diagrammes suivants classent les patients en fonction du type de prothèse pour laquelle ils ont subi une opération. Ceci permet ainsi de se rendre compte que la répartition des types de prothèses est comparable entre les cas et les témoins (figure 22) :

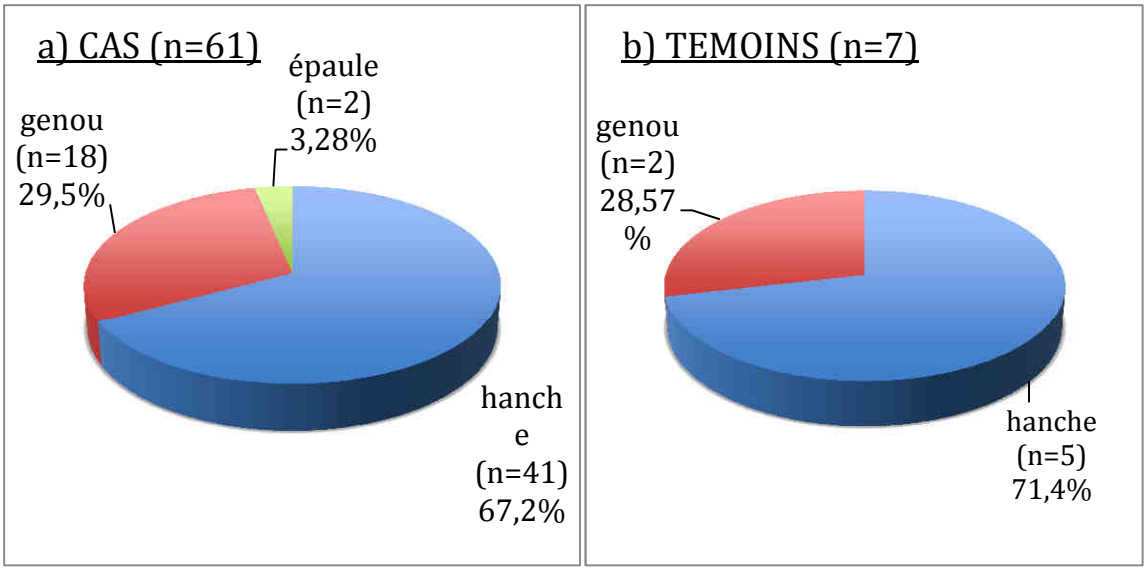


Figure 24 : a) Type de prothèse suspecte d'infection et ayant nécessité une intervention chirurgicale chez les cas b) Type de prothèse posée en 1ère intention chez les témoins.

6.1.2 Répartition des cas selon le type d'infection

La classification des patients selon le type d'infection repose sur les définitions suivantes :

- infection aiguë : survenant dans le mois après la pose,
- infection chronique : survenant après cette période de 1 mois,
- hématogène.

Ainsi, la majorité des reprises sur prothèse correspond à une reprise pour infection chronique (figure 23).

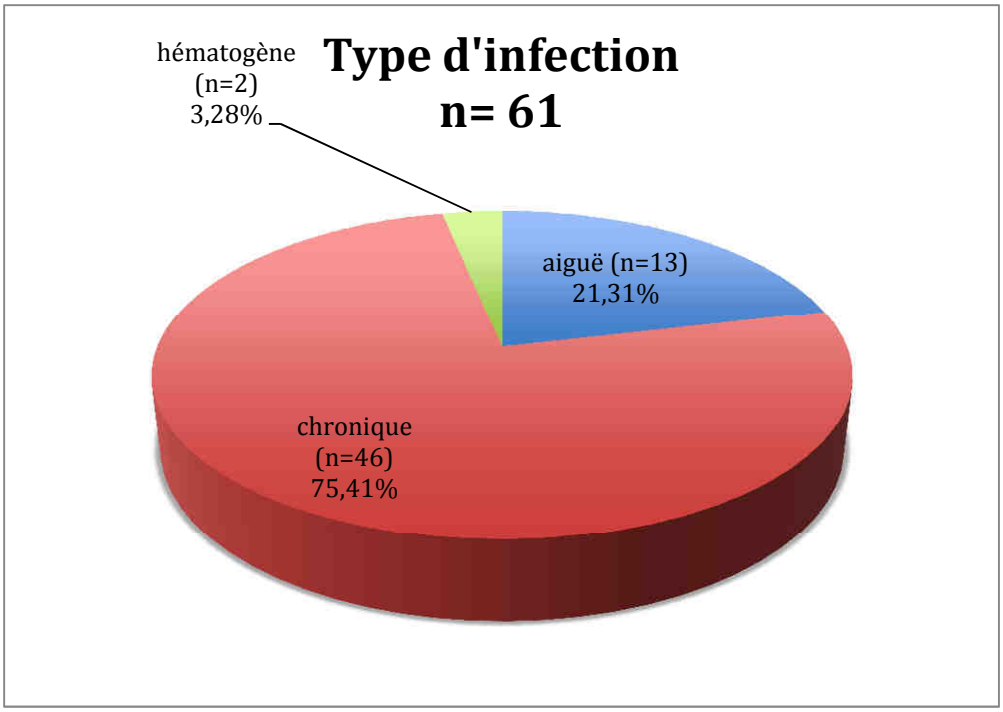


Figure 25 : Classement des cas par type d'infection.

6.1.3 Antibiothérapie préalable à l'intervention chirurgicale

Parmi les 61 cas, 15 avaient consommé des antibiotiques durant les 15 jours précédents l'opération de reprise chirurgicale ; pour 8 d'entre eux, l'indication de cette antibiothérapie était un sepsis bactérien, justifiant donc entièrement le non-arrêt de celle-ci. Cinq autres patients étaient sous antibiotiques pour suspicion d'infection aiguë sur leur prothèse, sans sepsis bactérien. Enfin, chez 2 patients, l'antibiothérapie a été découverte à posteriori, expliquant ainsi que l'opération n'ait pas été décalée dans le temps.

Les différents antibiotiques utilisés sont détaillés dans le diagramme suivant (figure 24) :

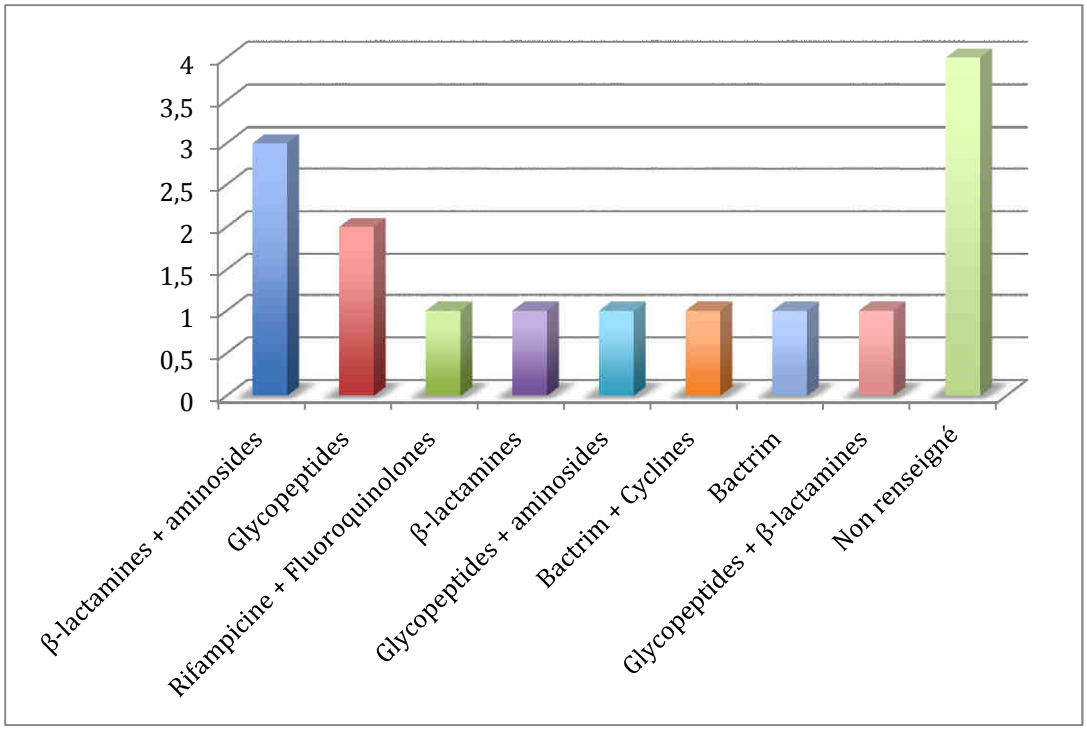


Figure 26 : Classes d'antibiotiques administrées aux 15 cas avant l'opération.

6.1.4 Prise en charge chirurgicale

Les prises en charge thérapeutiques chirurgicales sont répertoriées dans le tableau 13 :

	Changement en 1 ou 2 temps	Lavage	Amputation	Retrait de la prothèse
Infection aiguë		13		
Infection chronique	36	5		3
Infection hématogène		1	1	
Fistule		2		

Tableau 13 : Prise en charge thérapeutique chirurgicale des 61 cas.

Parmi les cas d'infections chroniques, 5 patients n'ont subi qu'un simple lavage : dans 2 cas,il s'agissait d'une prothèse d'épaule. Pour un autre cas, c'est la patientequi a refusé le changement de prothèse juste avant l'anesthésie.

L'infection hématogène traitée par lavage fait suite à une endocardite infectieuse.

Une des deux infections présentant une fistule n'a pas engendré de changement de prothèse car il s'agissait d'un terrain compliqué avec des infections récidivantes.

6.2Résultats des cultures bactériennes

Pour l'interprétation des résultats bactériologiques, nous avons appliqué les règles recommandées par la conférence de la SPLIF de 2009 ; les germes retrouvés ont été notifiés dans le cahier de résultat lorsque l'on retrouvait :

- au moins 3 prélèvements positifs à la même bactérie pour les pathogènes de la flore cutanée,
- ou au moins un seul prélèvement positif à une bactérie n'appartenant pas à la flore cutanée et pour laquelle la contamination est improbable.

Les « faux positifs » en culture considérés comme des contaminants n'ont pas été notifiés.

Sur les 305 échantillons prélevés chez les patients suspects d'infection, 185 sont positifs en culture, soit 60,6% des prélèvements. Par patient, 41 cas sur 61 ont obtenu des cultures positives, soit 67,2% des patients.
Aucun des 35 échantillons des témoins n'a poussé en culture.

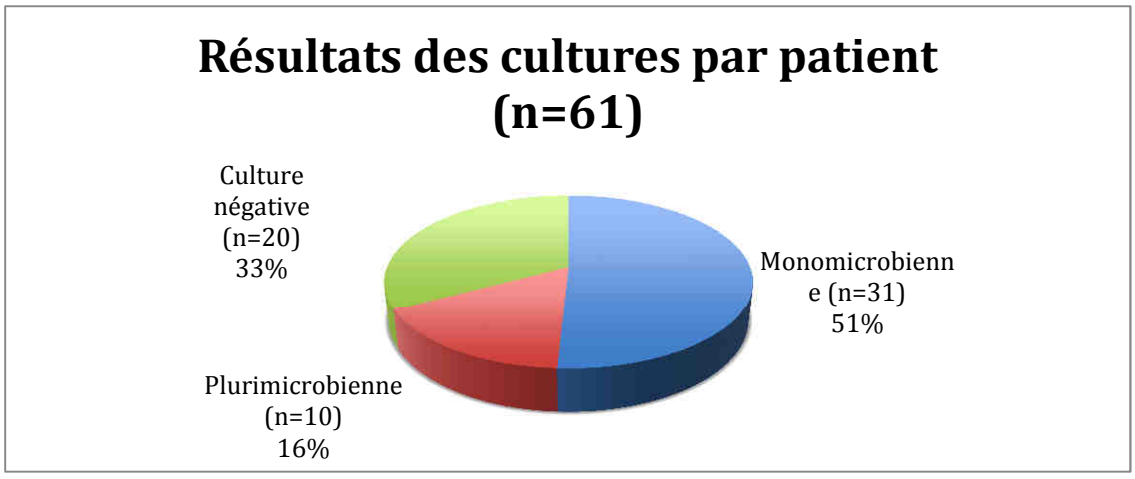


Figure 27 : Classement des cas en fonction des résultats des cultures.

La proportion de cultures négatives est très importante : elle correspond à 20 cas, soit un tiers des patients.
Dans 16% des cas, les infections sont polymicrobiennes (figure 25).

6.2.1 Germes isolés en culture

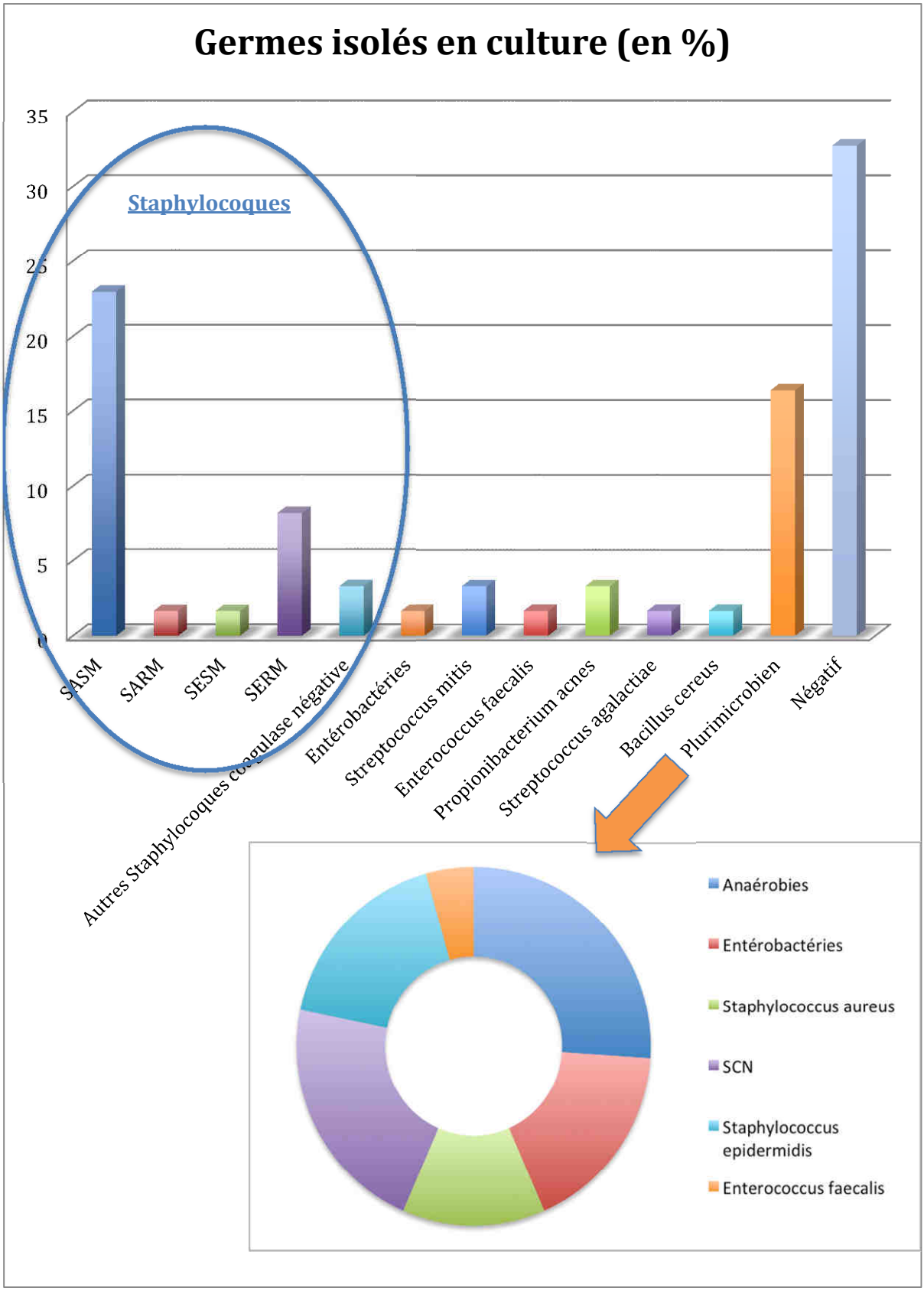


Figure 28 : Répartition (exprimée en %) des différents germesisolés en culture chez les 61 cas.

Parmi les infections monomicrobiennes, les germes les plus fréquemment retrouvés sont le *Staphylococcus aureus* et le *Staphylococcus epidermidis*(figure 26). Au sein des Staphylocoques, plus de la moitié des infections est due au *Staphylococcus aureus*méti-sensible (figure 27).

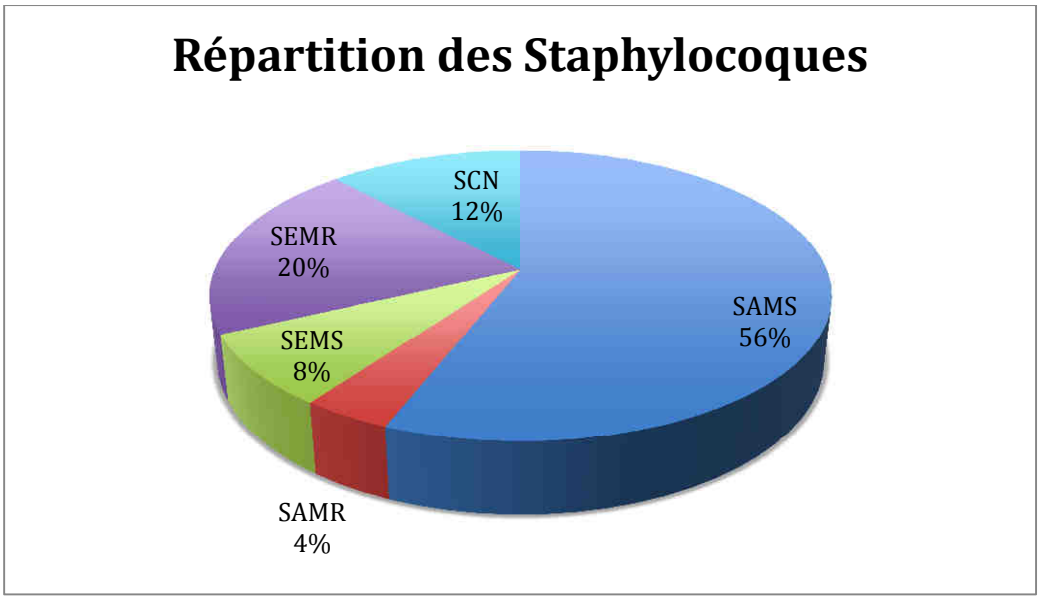


Figure 29 : Répartition des infections monobactériennes à Staphylocoques.

Dans cette série, toutes les infections mettant en jeu des germes anaérobies sont plurimicrobiennes. Parmi les 61 cas, on a dénombré 4 cas d'infection par des anaérobies :

- une infection à *Bacteroides fragilis*, associé à *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* et *Enterococcus faecalis*(patient n°4),
- une infection à *Finegoldia magna* et *Anaerococcus vaginalis*(patient n°38),
- une infection à *Parvimonas micra* et *Staphylococcus warneri*(patient n°46),
- une infection à *Anaerococcus prevotii* et *Staphylococcus aureus*(patient n°70).

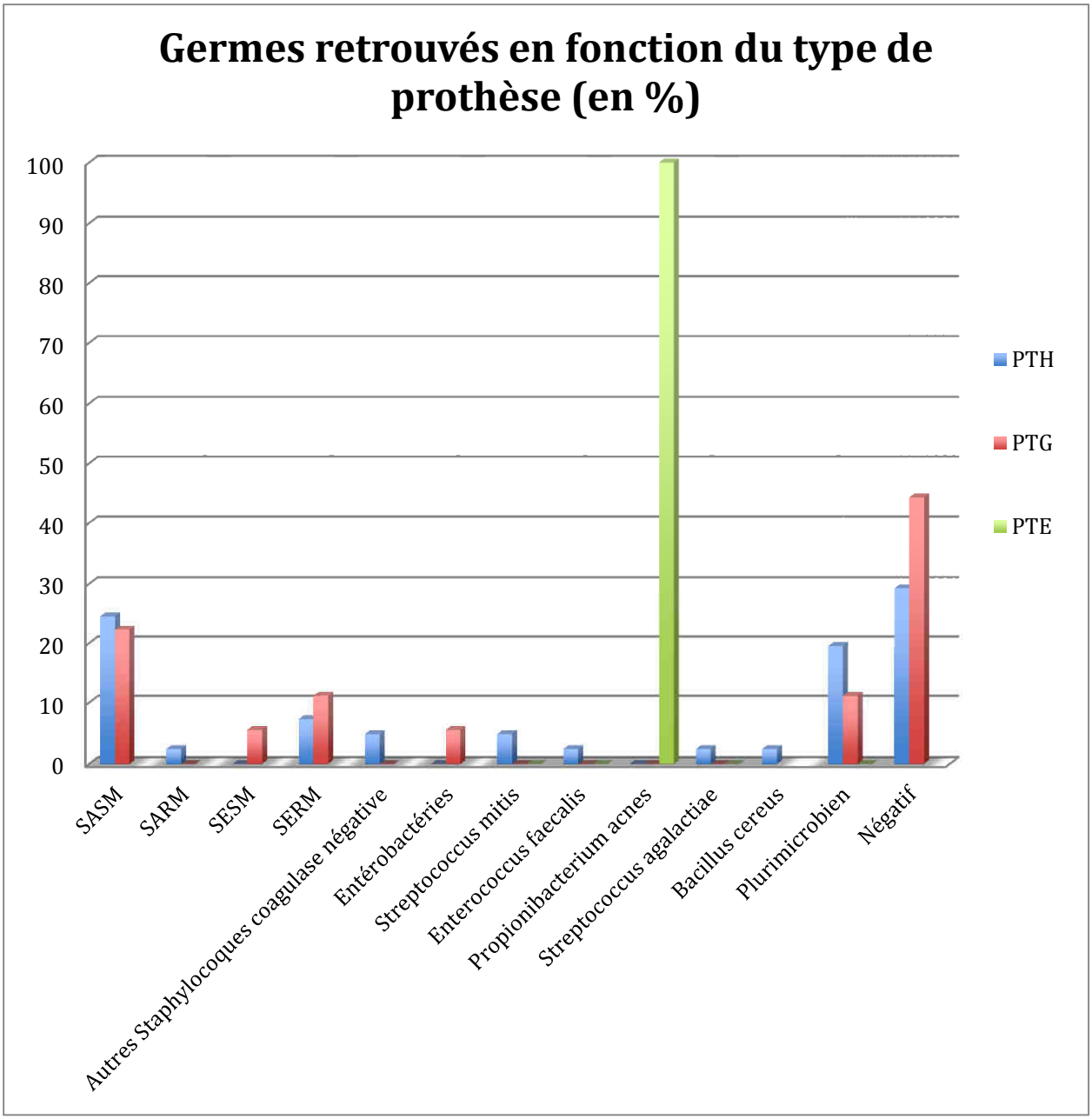
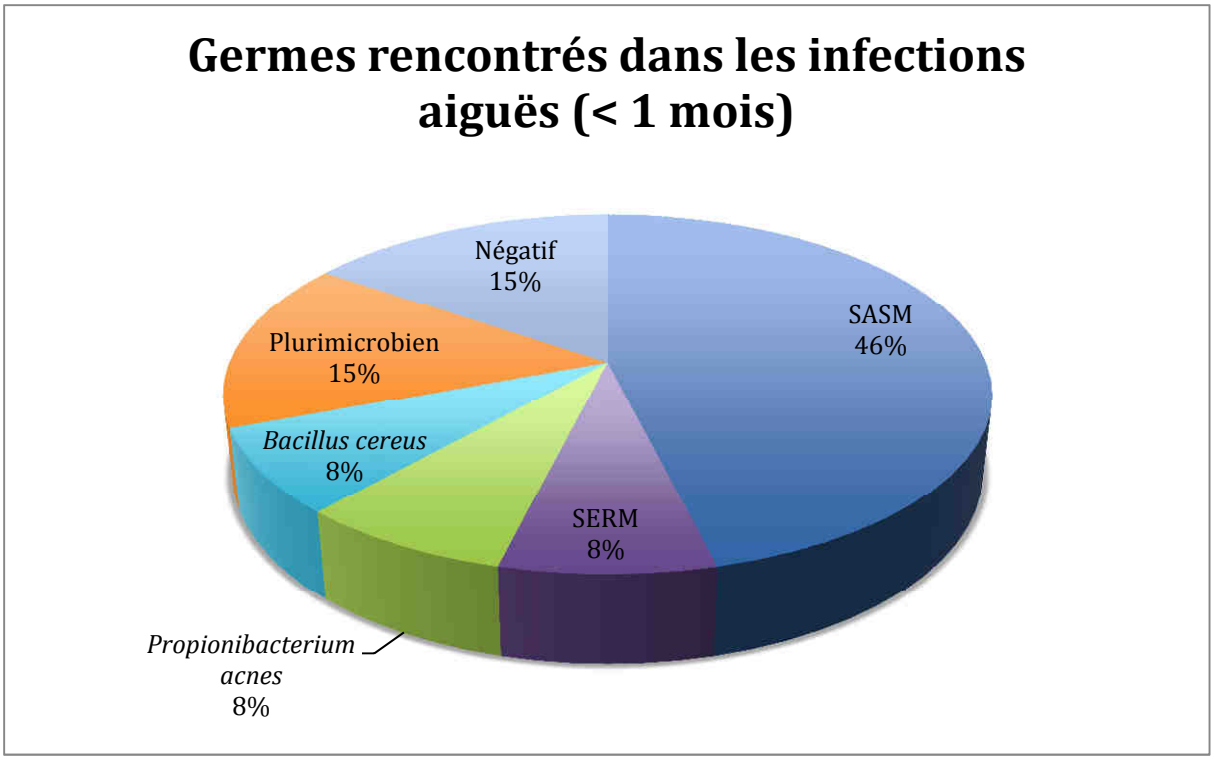


Figure 30 : Répartition (exprimée en %) des différents germes isolés en culture en fonction du type de prothèse concerné.

On observe des différences notables en fonction du type de prothèse mis en jeu. Ainsi, le pourcentage de cultures négatives est plus important pour les prothèses de genou que pour celles de hanche. Les infections plurimicrobiennes sont plutôt retrouvées avec les prothèses de hanche. Enfin, *Propionibacteriumacnes* est l'unique agent infectieux retrouvé dans les 2 cas d'infections sur prothèse d'épaule (figure 28).



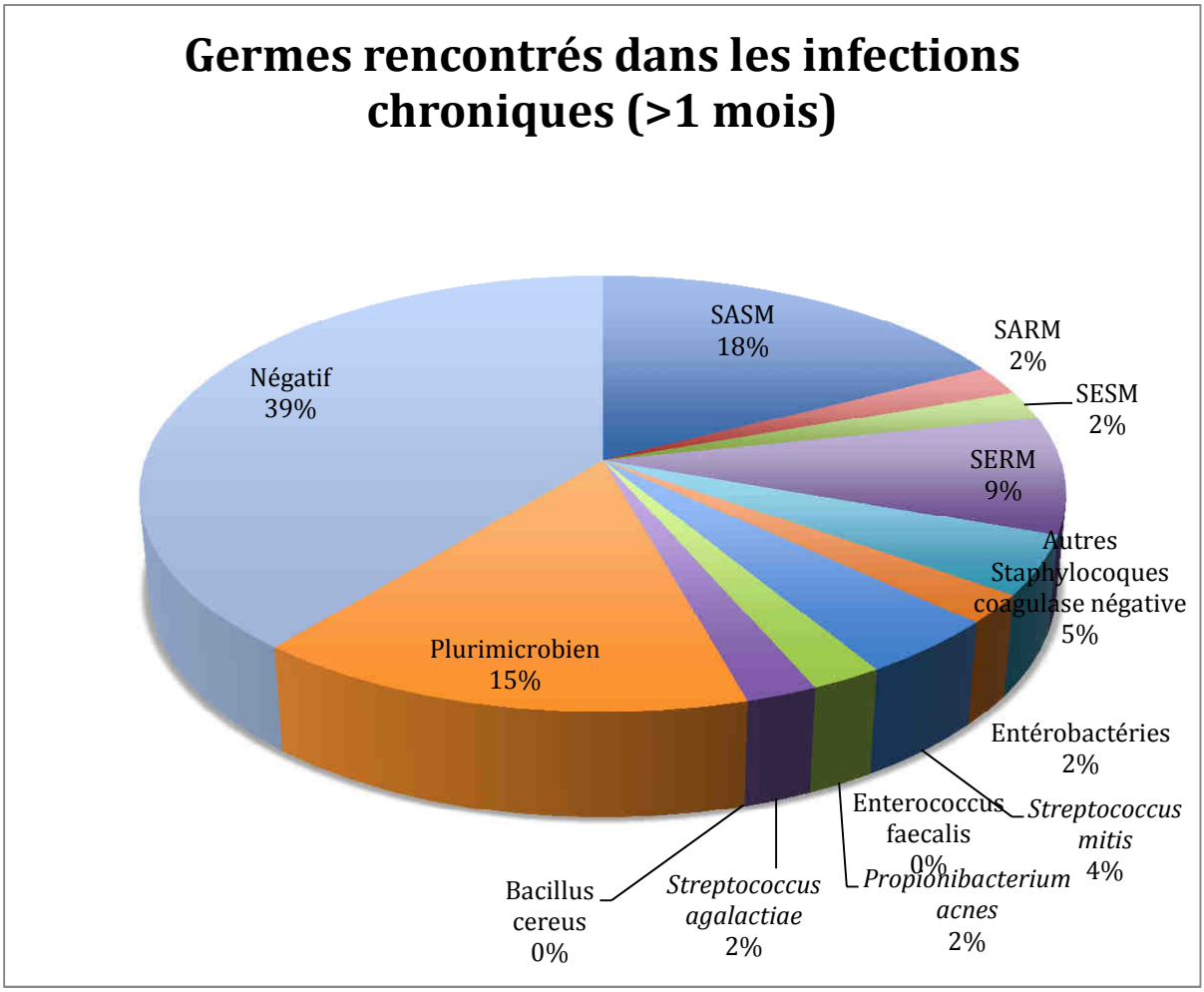


Figure 31 : Germes retrouvés (exprimés en %) en fonction du type d'infection.

En comparant les deux diagrammes précédents (figure 29), on note que le pourcentage de cultures négatives est plus important dans le cas d'infections chroniques.
De même, une plus grande diversité de germes isolés en culture est retrouvée dans les cas d'infections chroniques.

6.2.2 Particularités des cultures bactériologiques de prélèvements osseux

Comme il est fréquemment décrit dans les infections sur prothèses ostéo-articulaires, on peut observer des « small colony variants ». Il est indispensable de réaliser un antibiogramme sur chaque type de colonie macroscopiquement différente, afin de s'assurer qu'elles ne présentent pas un profil de résistance variable entre elles.
Le patient n°36 illustre ce phénomène : la séparation des différents aspects de colonies a permis d'isoler trois *Staphylococcus simulans* avec des antibiogrammes différents (figure 30).

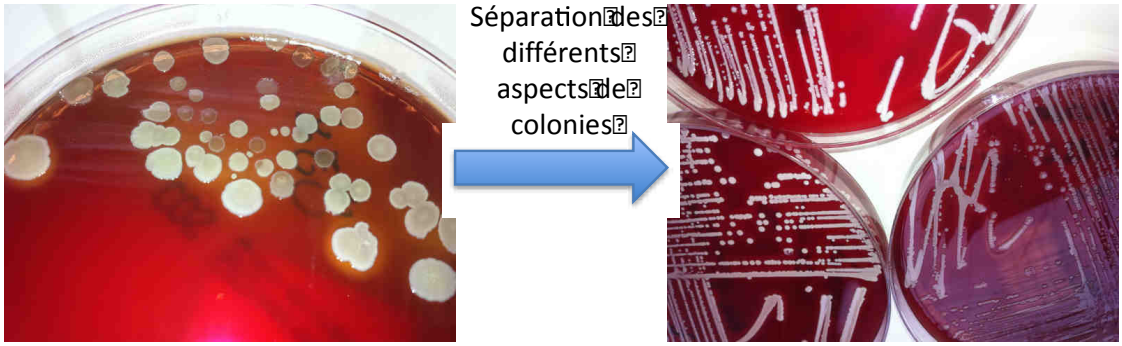


Figure 32 : Présence de colonies de tailles différentes de *Staphylococcus simulans.*

A l'inverse, dans le cas du patient n°14, le polymorphisme des colonies de *Propionibacterium acnes* est macroscopiquement important, mais la séparation des différents types de colonies a abouti à un même antibiogramme (figure 31).



Figure 33 : Colonies d'aspect différent de *Propionibacterium acnes.*

6.2.3 Ponction pré-opératoire

Seuls 6 patients de cette série ont bénéficié d'une ponction pré-opératoire. Cette ponction entrait dans le cadre d'une exploration d'infection chronique chez 5 d'entre euxet dans le cadre d'une infection aiguë pour l'un d'entre eux.Laconcordance entre les résultats bactériologiques de la ponction pré-opératoire et ceux des prélèvements per-opératoiresest de 100% (tableau 14).

	Délai entre la ponction et l'opération (jours)	Germe(s) retrouvé(s) lors de la ponction	Germe(s) retrouvé(s) en per-opératoire	Nombre de prélèvements per-opératoires positifs
Patient n° 15	47	*Staphylococcus aureus*	*Staphylococcus aureus*	5
Patient n° 16	1	*Staphylococcus epidermidis*	*Staphylococcus epidermidis*	5
Patient n° 40	34	*Staphylococcus aureus*	*Staphylococcus aureus*	3
Patient n° 44	27	2 *Staphylococcus epidermidis* différents	2 *Staphyloccocus epidermidis* différents	4
Patient n° 65	106	Négatif	Négatif	0
Patient n° 70	7	*Staphylococcus aureus*	*Staphylococcus aureus*	5

Tableau 14 : Concordance des résultats bactériologiques entre la ponction pré-opératoire et les prélèvements per-opératoires.

6.2.4 Culture négative



Figure 34 : Répartition des patients à culture négative.

Deux cas d'infection aiguë n'ont pas poussé en culture (figure 32):

- le patient n° 17 qui était sous antibiotiques depuis plusieurs jours avant et lors de l'intervention,
- le patient n° 52 pour lequel aucun examen n'est revenu positif (ni en culture, ni en PCR, ni àl'examen anatomopathologique), et pour lequel le diagnostic d'infection n'est donc pas certifié.

Parmi les 18 cas d'infection chronique négatifs en culture, seul un patient avait consommé des antibiotiques dans les 15 jours précédant l'intervention chirurgicale.

Nous reviendrons par la suite sur le cas de ces patients en exploitant les résultats de la PCR et de l'anatomopathologie, afin d'établir la présence ou non d'éléments en faveur d'une infection.

6.2.5 Incidence de l'antibiothérapie

Sur les 15 patients ayant reçu des antibiotiques dans les 15 jours précédant l'intervention, les cultures sont restées stériles pour 2 d'entre eux. Pour les 13 autres patients, l'agent pathogène en cause a pu être isolé en culture, malgré l'antibiothérapie.

Il est connu que l'effet des antibiotiques sur les cultures bactériologiques varie en fonction des types de milieu ensemencés. Ainsi, sur les géloses, l'ensemencement en séparation permet de diluer le prélèvement et donc l'antibiotique, ce qui permet une meilleure croissance bactérienne. A l'inverse, en milieu liquide, l'antibiotique inhibe de façon importante la croissance.

Le patient n° 25 illustre tout à fait ce phénomène : ce dernier a subi un lavage de sa prothèse de hanche pour une infection aiguë, 17 jours après la pose. Il présentait une cicatrice inflammatoire et les hémocultures prélevées ont mis en évidence une *Serratia marsescens*, expliquant la mise sous antibiotiques avant même la prise en charge chirurgicale.

L'aspect très particulier de la pousse des colonies sur les géloses témoigne de l'effet des antibiotiques. A noter également le bénéfice de l'ensemencement sur différents milieux de culture pour la mise en évidence des différents germes : une seule colonie de *Staphylococcus aureus* pousse sur la gélose chocolat au milieu du « tapis » de *Serratia marsescens*, alors que dans le flacon d'hémoculture prédomine le *Staphylococcus aureus* (figure 33).

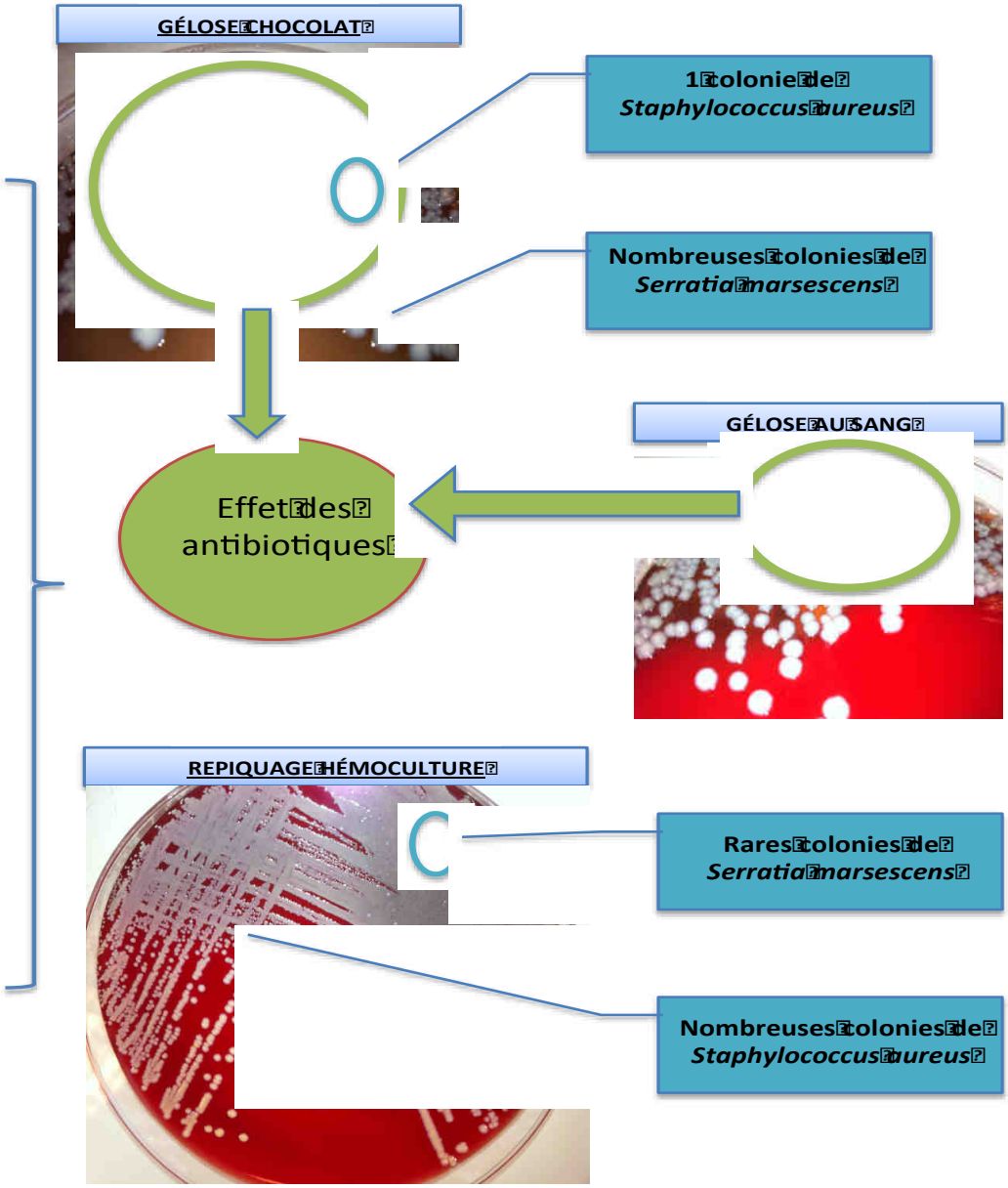


Figure 35 : Patient n°25, effet des antibiotiques.

6.2.6 Résultats bactériologiques en fonction des différents milieux de culture

Un pourcentage important de prélèvements demeure stérile en culture malgré l'absence de toute antibiothérapie préalable.

Le tableau suivant présente la détection des germes aéro-anaérobies facultatifs pour les prélèvementsmonobactériens,en fonction des différents milieux de culture utilisés (figure 34) :

- les milieux solides (géloses MHS et sang cuit),
- le milieu liquide d'enrichissement (Schaedler),
- le flacon d'hémoculture ensemencé avec le prélèvement.

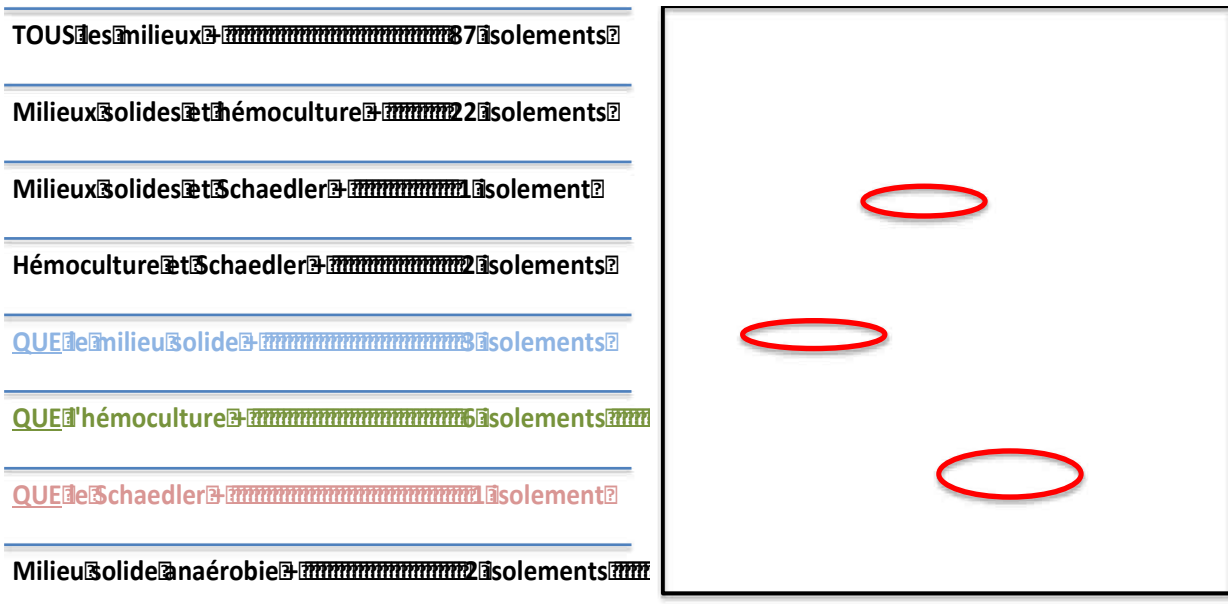


Figure 36 : Détection des germes aéro-anaérobies facultatifs dans les différents milieux de culture utilisés.

La grande majorité des germes aéro-anaérobies facultatifs est donc isolée à la fois à partir des milieux solides, du bouillon Schaedler et du flacon d'hémoculture.

L'élément important à noter est l'apport du flacon d'hémoculture : en effet, pour 6 prélèvements (soit 5% des prélèvements), il est le seul à isoler le pathogène en culture. Le bouillon Schaedler ne semble pas être un milieu performant : dans 22 prélèvements, il demeure négatif alors que les milieux solides et l'hémoculture sont positifs.

En ce qui concerne les germes anaérobies stricts, la moitié est détectée à la fois sur le milieu gélosé solide (MHS) et le bouillon Schaedler, l'autre moitié est détectée uniquement sur la gélose MHS (figure 35).

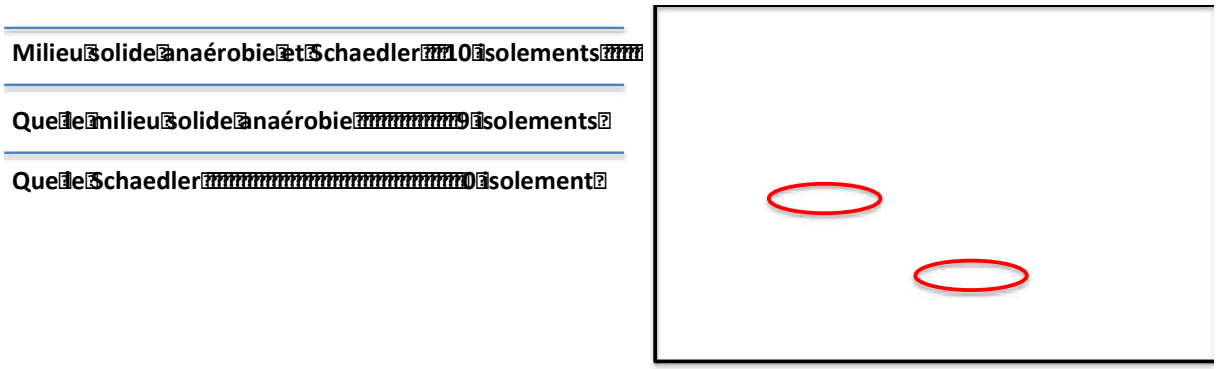


Figure 37 : Détection des germes anaérobies dans les différents milieux de culture utilisés.

6.2.7 Illustration de quelques cas particuliers en culture

La présentation des cas suivants permet de mettre en évidence l'intérêt d'ensemencer différents milieux de culture.

a. Patient n°5

Le patient n°5 a été opéré dans le cadre d'une suspicion d'infection chronique de sa prothèse de hanche, posée trois ans auparavant. Il présentait des douleurs, une cicatrice inflammatoire et du pus a été retrouvé lors de l'intervention chirurgicale. La figure 36 montre les différentes géloses positives au bout de 7 jours d'incubation.



Prélèvement n°2 : 4 colonies de *Staphylococcus epidermidis* n°1

Prélèvement n°4 : 1 colonie de *Staphylococcus epidermidis* n°2

Prélèvement n°5 : 2 colonies de *Staphylococcus warneri*

Figure 38 : Patient n°5, aspect des géloses à J7.

En se basant uniquement sur la culture en milieu gélosé, il est impossible de déterminer l'agent pathogène en cause, puisqu'il s'agit de trois bactéries faisant partie de la flore cutanée, et retrouvées à chaque fois sur un seul milieu de culture ; on les considère donc comme des contaminations.

C’est donc le bouillon Schaedler et l’ensemencement sur flacon d’hémoculture qui ont permis de documenter correctement l’infection, puisqu’un *Staphylococcus haemolyticus*qui n’avait pas poussé sur les boîtes a été retrouvé dans 3 prélèvements sur 5, à la fois dans le Schaedler et l’hémoculture. D’autre part, le *Staphylococcus warneri*retrouvé sur un seul milieu solide a été isolé dans 3 milieux liquides. Les 3 flacons hémoculture ont été détectés comme positifs 24 heures après l’ensemencement (figures 37 et 38).

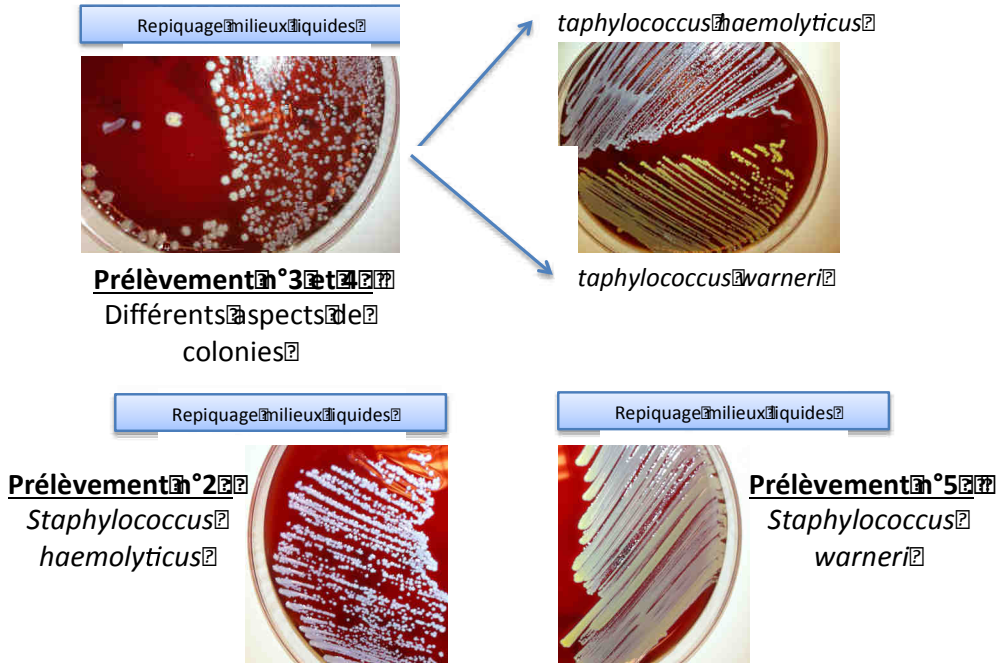


Figure 39 : Patient n°5, repiquage des Schaedler et des hémocultures.

Au bilan, on a obtenu les cultures suivantes :

	Prélèvement N°1	Prélèvement N°2	Prélèvement N°3	Prélèvement N°4	Prélèvement N°5
Géloses	**NÉGATIF**	2 colonies de *Staphylococcus epidermidis* n°1	**NÉGATIF**	1 colonie de *Staphylococcus epidermidis* n°2	2 colonies de *Staphylococcus warneri*
Hémoculture	**NÉGATIF**	*Staphylococcus haemolyticus*	*Staphylococcus haemolyticus* + *Staphylococcus warneri*	*Staphylococcus haemolyticus* + *Staphylococcus warneri*	*Staphylococcus warneri*
Schaedler	**NÉGATIF**	*Staphylococcus haemolyticus*	*Staphylococcus haemolyticus* + *Staphylococcus warneri*	*Staphylococcus haemolyticus* + *Staphylococcus warneri*	*Staphylococcus warneri*

Au total

Staphylococcus warneri
(3 prélèvements/5)

Staphylococcus haemolyticus
(3 prélèvements/5)

Figure 40 : Patient n°5, résultats des cultures.

b. *Patient n°26*

Ce patient a été opéré pour un changement de sa prothèse de hanche en 2 temps, pour infection chronique développée 9 ans après la pose. Les flacons d'hémoculture ensemencés, positifs dès 24 heures après l'ensemencement, ont permis d'isoler deux *Staphylococcus epidermidis* avec des antibiogrammes différents (figure 39). Les milieux liquides Schaedler avaient, eux, sélectionné dans 2 prélèvements un seul des 2 germes retrouvés dans les hémocultures.

	Prélèvement N°1	Prélèvement N°2	Prélèvement N°3	Prélèvement N°4	Prélèvement N°5
Géloses	**NÉGATIF**	**NÉGATIF**	**NÉGATIF**	**NÉGATIF**	***Staphylococcus epidermidis* n°1 + *Staphylococcus epidermidis* n°2**
Hémoculture	***Staphylococcus epidermidis* n°1**	***Staphylococcus epidermidis* n°1 + *Staphylococcus epidermidis* n°2**	***Staphylococcus epidermidis* n°2**	**NÉGATIF**	***Staphylococcus epidermidis* n°1 + *Staphylococcus epidermidis* n°2**
Schaedler	***Staphylococcus epidermidis* n°1**	***Staphylococcus epidermidis* n°1**	**NÉGATIF**	**NÉGATIF**	***Staphylococcus epidermidis* n°1**

Au total

***Staphylococcus epidermidis* n°1**
(3 prélèvements/5)



***Staphylococcus epidermidis* n°2**
(3 prélèvements/5)

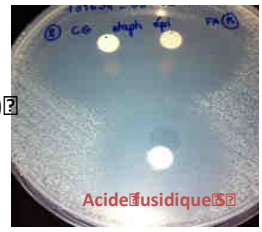


Figure 41 : Patient n°26, résultats des cultures.

c. *Patient n°35*

Un autre cas d'infection chronique sur prothèse de hanche démontre l'intérêt de multiplier les types de milieux ensemencés. Le patient n°35 présentait des douleurs un an après la pose de la prothèse, et a subi un changement en 2 temps suite au bilan diagnostic pré-opératoire qui était en faveur d'une infection. Les géloses n'ont mis en évidence qu'un seul *Staphylococcus epidermidis* méti-sensible, les hémocultures qu'un seul *Staphylococcus epidermidis*méti-résistant, et les Schaedler ont permis de ré-isoler à la fois le Staphylocoque méti-sensible et le méti-résistant (figure 40).

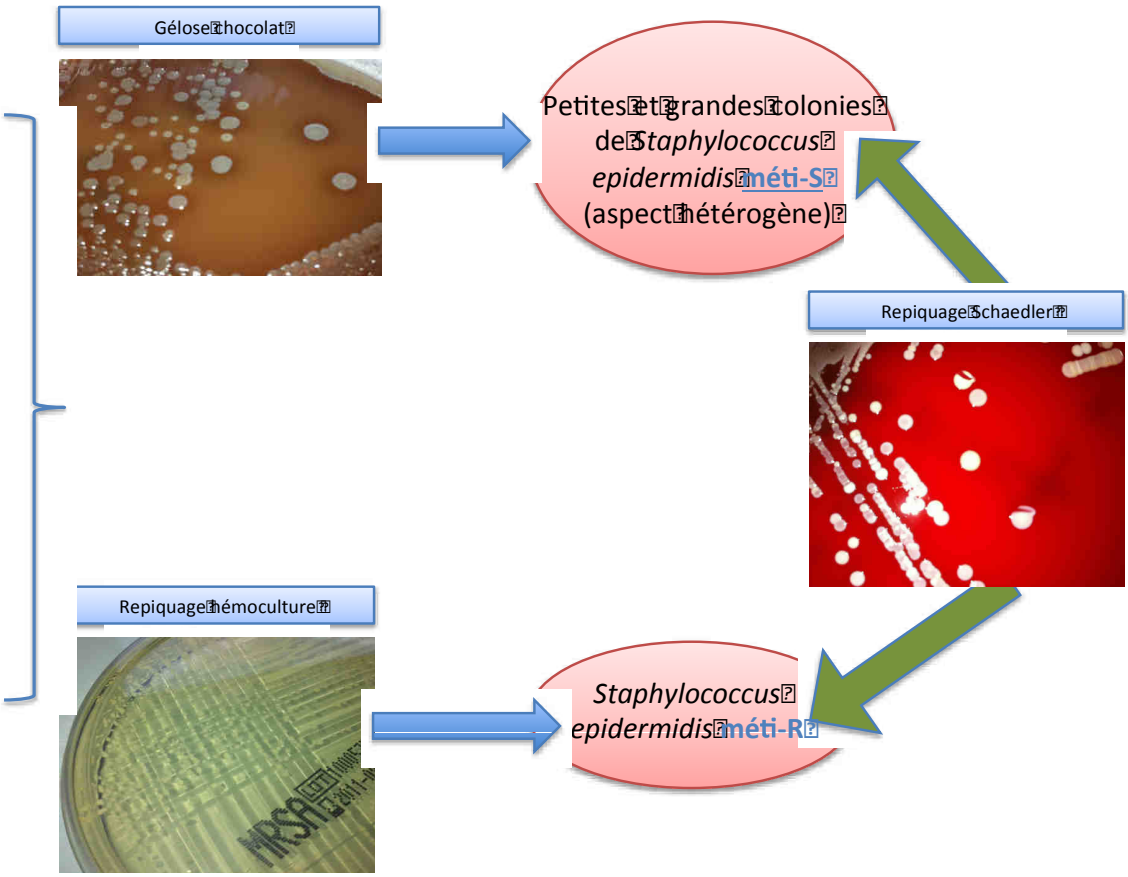


Figure 42 : Patient n°35, résultats des cultures.

6.3Résultats de la PCR 16S

6.3.1 Résultats par prélèvement et par patient

En ce qui concerne les 305 échantillons prélevés chez les patients suspects d'infection (tableau 15) :

- 146 PCRont permis une identification bactérienne, soit 47,9% des prélèvements. Un seul échantillon a nécessité une dilution pour lever la présence d'inhibiteurs (patient n°22).En regroupant les résultats par patient, 42 cas sur 61 ont obtenu au moins un prélèvement positif en PCR, soit 68,9% des patients.
- 36 échantillons se sont avérés positifs lors de l'amplification, mais l'étape de séquençage n'a pas permis d'identifier un germe : séquence ambiguë ou de mauvaise qualité pour 11,80% des prélèvements.

Une réaction aspécifique correspondant à l'amplification de 150 paires de bases d'ADN humain a été observée dans 59 échantillons (19,34%).

	PCR + sans dilution	PCR + après dilution (inhibiteurs)	Amplification + mais séquençage ininterprétable	PCR négative	Total
Cas	145	1	36	123	305
Témoins	3	/	/	32	35

Tableau 15 : Résultats des PCR 16S.

En ce qui concerne les 35 échantillons des témoins :

- 32 PCR ont été négatives (dont 3 réactions aspécifiques avec de l'ADN humain), soit 91,4% des prélèvements.
- 3 ont abouti à une identification bactérienne par PCR, soit 8,6% des prélèvements. En regroupant les résultats par patient, 2 témoins ont obtenu au moins un prélèvement positif en PCR, soit 28,6%des témoins.

6.3.2 Germes mis en évidence par PCR

La figure 44 présente toutes les espèces bactériennes identifiées par PCR pour les 305 prélèvements issus des patients-cas.

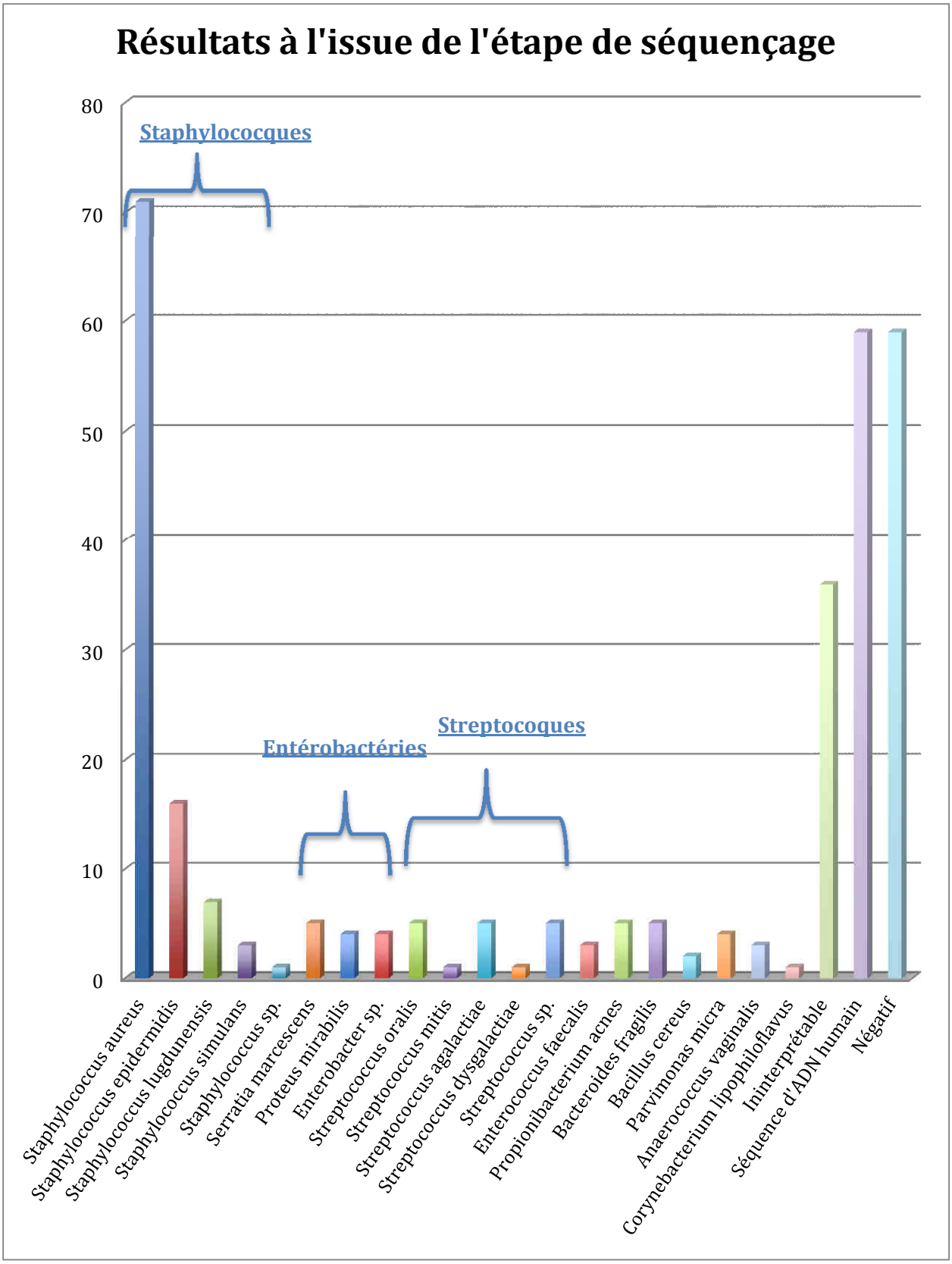


Figure 43 : Répartition des différents germes mis en évidence par PCR.

6.3.3 Pourcentage d'homologie des séquences

Pour chaque séquence intégrée dans BIBI et BLAST, le pourcentage de similitude à l'espèce a été notifié, ce qui permet d'obtenir le tableau suivant :

	% similitude = 100	% = 99	% = 98	% = 97	% = 95	% = 90	% < 90
BIBI	/	125	2	5	5	4	5
BLAST	50	66	12	3	3	7	5

Tableau 16 : Nombre d'échantillons classés par pourcentage d'homologie selon BIBI et BLAST.

Les séquences présentant un pourcentage d'homologie égal ou inférieur à 95% (figure 45) ont été retenues et considérées comme positives quand les bases de données n'avaient pas d'autres propositions.

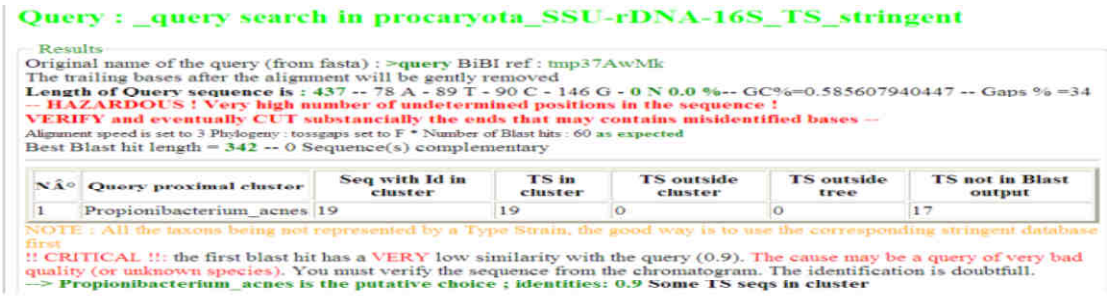




Figure 44 : Patient n°14, faible pourcentage de similitude (90%).

6.3.4Cycles seuils

Le cycle seuil ou Ct a été notifié pour chaque prélèvement positif : il varie entre 14,9 et 36,6 pour une moyenne à 27,66.
La répartition est la suivante :

- 15 ont un Ct inférieur à 20,
- 81 ont un Ct compris entre 20 et 30,
- 50 ont un Ct supérieur à 30.

En ce qui concerne les échantillons « non interprétable » lors du séquençage, la moyenne des Ct est de 32,4 avec un minimum à 24,8 et un maximum à 36,6.

6.4Concordance des différentes techniques

Pour évaluer l'apport de la PCR 16S, nous avons tout d'abord comparé la PCR à la culture pour chaque prélèvement et par patient. Dans un deuxième temps, nous avons comparé les résultats de la PCR à un « gold standard » incluant les résultats de la culture, la clinique et l'anatomopathologie pour classer l'infection (certaine, probable, exclue).

6.4.1 Concordance PCR/culture

a. Par prélèvement

L'objectif principal de cette étude est d'établir l'apport de la PCR 16S« universelle » dans le diagnostic des infections sur prothèses ostéo-articulaires.
Le tableau 17 rassemble les résultats de la culture et de la PCR pour tous les patients cas. Les discordances apparaissent en rouge :

P. n°	CULTURE		PCR		ATB ?
	Nb éch. +	Identification	Nb éch. +	Identification	
1	0	Négatif	1	*1 Corynebacterium lipophiloflavus*	
3	0	Négatif	4	*4 Staphylococcus aureus*	
4	5	*5 à Escherichia coli + Enterobacter cloacae + Enterococcus faecalis + Bacteroides fragilis*	5	*5 Bacteroides fragilis*	Oui
5	4	*2 à Staphylococcus warneri +Staphylococcus haemolyticus 1 à Staphylococcus warneri 1 à Staphylococcus haemolyticus*	1	*1 Staphylococcus aureus*	
6	5	*5 Staphylococcus aureus*	5	*5 Staphylococcus aureus*	Oui
7	0	Négatif	0	Négatif	
8	0	Négatif	0	Négatif	
9	5	*5 Staphylococcus epidermidis*	0	Négatif	
14	5	*5 Propionibacterium acnes*	1	*1 Propionibacterium acnes*	
15	5	*5 Staphylococcus aureus*	3	*3 Staphylococcus aureus*	
16	5	*5 Staphylococcus epidermidis*	4	*3 Staphylococcus epidermidis 1 Streptococcus* sp.	Oui
17	0	Négatif	3	*3 Staphylococcus aureus*	Oui
18	5	*5 Streptococcus mitis*	5	*4 Streptococcus* sp. *1 Streptococcus mitis*	
20	5	*5 Propionibacterium acnes*	0	Négatif	
21	5	*5 Staphylococcus aureus*	4	*4 Staphylococcus aureus*	
22	5	*5 Staphylococcus aureus*	2	*1 Staphylococcus aureus*	Oui
23	5	*5 Staphylococcus aureus*	5	*5 Staphylococcus aureus*	Oui
24	4	*4 Enterococcus faecalis*	3	*3 Enterococcus faecalis*	Oui
25	5	*3 Serratia marsescens +Staphylococcus aureus 2 Serratia marsescens*	5	*5 Serratia marsescens*	Oui
26	4	*4 Staphylococcus epidermidis*	3	*3 Staphylococcus epidermidis*	
27	0	Négatif	1	*1 Streptococcus dysgalactiae*	
28	4	*4 Staphylococcus lugdunensis*	2	*2 Staphylococcus lugdunensis*	
29	5	*5 Propionibacterium acnes*	3	*3 Propionibacterium acnes*	
30	4	*4 Staphylococcus aureus*	5	*5 Staphylococcus aureus*	Oui
31	5	*5 Staphylococcus epidermidis*	5	*5 Staphylococcus epidermidis*	
32	0	Négatif	0	Négatif	
33	0	Négatif	0	Négatif	
34	4	*4 Bacillus cereus*	2	Négatif	
35	5	*5 Staphylococcus epidermidis*	3	*3 Staphylococcus epidermidis*	
36	4	*4 Staphylococcus simulans*	3	*3 Staphylococcus simulans*	Oui
37	5	*5 Staphylococcus aureus*	5	*5 Staphylococcus aureus*	
38	2	*2 Finegoldia magna + Anaerococcus vaginalis*	3	*3 Anaerococcus vaginalis*	
39	3	*2 Enterobacter cloacae 1 Enterobacter cloacae + Staphylococcus aureus*	4	*4 Enterobacter* sp.	
40	3	*3 Staphylococcus aureus*	2	*2 Staphylococcus aureus*	
41	2	*2 Enterobacter cloacae*	0	Négatif	
42	5	*5 Streptococcus mitis/oralis*	5	*5 Streptococcus oralis*	
43	4	*4 Staphylococcus aureus*	4	*3 Staphylococcus aureus*	Oui

P. n°	CULTURE		PCR		ATB ?
	Nb éch. +	Identification	Nb éch. +	Identification	
44	4	*4 Staphylococcus epidermidis*	0	Négatif	
46	5	*3 Parvimonas micra* *2 Parvimonas micra* *+Staphylococcus warneri*	5	*5 Parvimonas micra*	
47	5	*5 Staphylococcus aureus*	5	*5 Staphylococcus aureus*	Oui
48	0	Négatif	0	Négatif	
49	2	*2 Staphylococcus aureus*	1	*1 Staphylococcus aureus*	Oui
50	5	*5 Staphylococcus lugdunensis*	5	*5 Staphylococcus lugdunensis*	
51	0	Négatif	4	*4 Proteus mirabilis*	Oui
52	0	Négatif	0	Négatif	
53	0	Négatif	0	Négatif	
54	5	*5 Staphylococcus aureus*	5	*5 Staphylococcus aureus*	
55	0	Négatif	0	Négatif	
56	0	Négatif	0	Négatif	
57	0	Négatif	0	Négatif	
58	3	*3 Staphylococcus aureus*	2	*2 Staphylococcus aureus*	
59	5	*5 Streptococcus agalactiae*	5	*4 Streptococcus agalactiae*	
60	5	*5 Staphylococcus aureus*	5	*5 Staphylococcus aureus*	
61	5	*5 Staphylococcus epidermidis*	2	*2 Staphylococcus epidermidis*	Oui
62	4	*4 Staphylococcus epidermidis*	2	*1 Staphylococcus aureus* *1 Staphylococcus* sp.	
63	5	*5 Staphylococcus aureus*	4	*4 Staphylococcus aureus*	
64	0	Négatif	1	*1 Propionibacterium acnes*	
65	0	Négatif	0	Négatif	
66	0	Négatif	0	Négatif	
68	0	Négatif	0	Négatif	
70	5	*4 Staphylococcus aureus+Anaerococcus prevoti* *1 Staphylococcus aureus*	4	*4 Staphylococcus aureus*	

Tableau 17 : Récapitulatif des résultats des cultures et des PCR pour les 61 patients-cas (les discordances apparaissent en rouge).

Le tableau 18résume les concordances entre la culture et la PCR pour les prélèvements issus des patients cas, chaque prélèvement étant traité de façon indépendante.

PCR	CULTURE	
	POSITIVE	**NEGATIVE**
POSITIVE	128	**18**
NEGATIVE	**57**	102

Tableau 18 : Concordance culture/PCR par prélèvement pour les 61 patients-cas.

Ainsi, sur les 305 prélèvements, 75 présentent des discordances entre la culture et la PCR, soit 24,6% :

- 18 sont positifs en PCR mais négatifs en culture, dont :
  - 8 qui correspondent à des patients traités par antibiotiques dans les 15 jours précédant l'opération chirurgicale (patient n°17, patient n°30, patient n°51),
  - 2qui retrouvent le même germe que sur d'autres prélèvements du même patient en culture (patient n°38, patient n°39).
- 57 sont positifs en culture mais négatifs en PCR.

L'analyse détaillée des faux négatifs en PCR en fonction de l'espèce bactérienne est présentée dans le tableau ci-dessous (tableau 19).

	Pourcentage de faux négatifs en PCR par type de bactérie	
Staphylococcus epidermidis	18/37	48,6%
Propionibacterium acnes	11/15	73,3%
Staphylococcus aureus	12/67	17,9%
Polymicrobien	3/19	15,8%
Staphylococcus lugdunensis	2/9	22,2%
Bacillus cereus	4/4	100%
Enterobacter cloacae	2/4	50%
Staphylococcus warneri	1/1	100%
Enterococcus faecalis	1/4	25%
Staphylococcus simulans	1/4	25%

Tableau 19 : Pourcentage de faux négatifs en fonction de la bactérie.

Pour les 6 dernières espèces du tableau, il est difficile de tirer des conclusions vu le faible nombre d'isolats. Par contre, on peut noter que dans 73% des cas, le *Propionibacterium acnes*n'est pas mis en évidence par PCR. De même avec le *Staphylococcus epidermidis* dans 49% des cas.

En ce qui concerne les prélèvements polybactériens en culture, la technique de PCR-séquençage utilisée ne permet pas d'obtenir plusieurs espèces par prélèvement. Dans la plupart des cas, la biologie moléculaire a permis de mettre en évidence une seule des bactéries présentes en culture (tableau 20) :

P. n°	CULTURE Identification	PCR Identification
4	*5 à Escherichia coli* *+ Enterobacter cloacae* *+ Enterococcus faecalis* *+ Bacteroides fragilis*	*5 Bacteroides fragilis*
5	*2 à Staphylococcus warneri* *+Staphylococcus haemolyticus*	*1 ininterprétable* *1 Staphylococcus aureus*
25	*3 Serratia marsescens* *+Staphylococcus aureus*	*3 Serratia marsescens*
38	*2 Finegoldia magna* *+ Anaerococcus vaginalis*	*2 Anaerococcus vaginalis*
39	*1 Enterobacter cloacae +* *Staphylococcus aureus*	*1 Enterobacter* sp.
46	*2 Parvimonas micra* *+Staphylococcus warneri*	*2 Parvimonas micra*
70	*4 Staphylococcus* *aureus+Anaerococcus prevoti*	*3 Staphylococcus aureus* *1 ininterprétable*

Tableau 20 : Résultats des PCR 16s pour les prélèvements polybactériens en culture.

Comme pour les patients-cas, voici les résultats de la culture et de la PCR pour les patients témoins (tableau 21)ainsi que les concordances (tableau 22) :

P. n°	CULTURE		PCR	
	Nb éch. +	Identification	Nb éch. +	Identification
10	0	Négatif	0	Négatif
11	0	Négatif	0	Négatif
12	0	Négatif	0	Négatif
13	0	Négatif	2	*2 Staphylococcus aureus*
19	0	Négatif	0	Négatif
67	0	Négatif	1	*1 Streptococcus pseudopneumoniae*
69	0	Négatif	0	Négatif

Tableau 21 : Récapitulatif des résultats des cultures et des PCR pour les 7 témoins.

PCR	CULTURE	
	POSITIVE	**NEGATIVE**
POSITIVE	0	**3**
NEGATIVE	**0**	32

Tableau 22 : Concordance culture/PCR par prélèvement pour les 7 témoins.

Parmi les 35 prélèvements issus des patients témoins, 3 sont positifs en PCR malgré une culture négative :

- 2 concernent le patient n° 13 et retrouvent un *Staphylococcus aureus*,
- 1 concerne le patient n° 67 et retrouve un *Streptococcus pseudopneumoniae*correspondant à un germe de la bouche.

Ces trois échantillons ont été vérifiés par une deuxième PCR sur un aliquot conservé. Ces résultats sont probablement des faux positifs de la PCR 16S liés à des contaminations, car ils se sont avérés négatifs lors du deuxième test.

b. Par patient

Pour évaluer la concordance par patient, nous avons utilisé les critères de la SPILF pour analyser les cultures positives. En ce qui concerne la PCR, en l'absence à ce jour de règle d'interprétation, nous l'avons considérée positive pour un patient dès lors qu'un seul des prélèvements était positif.

PCR	CULTURE	
	POSITIVE	**NEGATIVE**
POSITIVE	38	**6**
NEGATIVE	**4**	13

Tableau 23 : Concordance culture/PCR par patient.

Quatre patients (soit 6,5% des patients) présentent des cultures positives avec toutes les PCR négatives (tableau 23).

L'analyse détaillée de chacun des prélèvements montre qu'il s'agit pour la plupart de cultures pour lesquelles de très rares colonies étaient présentes sur les géloses ou pour lesquelles seuls les milieux liquides d'enrichissement (flacons d'hémoculture et /ou Schaedler) étaient

positifs. A l'opposé, un patient négatif en PCR présentant des fortes quantités de bactéries en culture a été repris à la fin de l'étude (patient n°34). En diluant les échantillons, 2 PCR se sont finalement avérées positives. Il s'agit d'un phénomène de saturation de la PCR par un excès d'ADN. Ce phénomène a été mis en évidence pour 3 autres prélèvements : patients n°22, 43 et 59.

Six patients présentent une PCR positive malgré une culture négative, soit 9,8% des patients.Deuxd'entre eux avaient reçu des antibiotiques dans les 15 jours précédents. Pour les 4 autres, la PCR a été vérifiée sur un deuxième aliquot :

- deux patients, respectivement positifs à *Staphylococcus aureus* et à *Streptococcus agalactiae*, se sont bien confirmés en PCR (patient n°3 et n°27),
- deux patients positifs à *Propionibacterium acnes* et à *Corynebacterium lipophiloflavus* sont eux probablement de faux positifs en PCR car ils se sont avérés négatifs lors d'un deuxième test (patient n°1 et n°64).
-

6.4.2 Concordance PCR/ « gold standard »

Le « gold standard » utilisé pour le protocole dans le but d'affirmer l'infection sur prothèse ostéo-articulaire comprend trois critères : clinique, microbiologique et histologique (cf. partie 4.3).

La classification des patients selon ces critères aboutit au tableau suivant (tableau 24).

Patient n°	Fistule	Pus	Critère microbiologique +	Critère histologique +	Type d'infection
1					EXCLUE
3					EXCLUE
4		☑			CERTAINE
5		☑			PROBABLE
6	☑				CERTAINE
7		☑			PROBABLE
8					EXCLUE
9		☑			PROBABLE
14	☑	☑			CERTAINE
15		☑			PROBABLE
16		☑			PROBABLE
17		☑			PROBABLE
18	☑	☑			CERTAINE
20					PROBABLE
21		☑			CERTAINE

Patient n°	Fistule	Pus	Critère microbiologique +	Critère histologique +	Type d'infection
22	☑	☑			PROBABLE
23					PROBABLE
24		☑			CERTAINE
25					PROBABLE
26		☑			CERTAINE
27	☑	☑			PROBABLE
28					PROBABLE
29					PROBABLE
30		☑			CERTAINE
31		☑			CERTAINE
32					EXCLUE
33					EXCLUE
34		☑			CERTAINE
35					PROBABLE
36		☑			CERTAINE
37					PROBABLE
38	☑	☑			CERTAINE
39	☑	☑			PROBABLE
40		☑			CERTAINE
41		☑			PROBABLE
42		☑			CERTAINE
43		☑			CERTAINE
44		☑			PROBABLE
46	☑	☑			CERTAINE
47					PROBABLE
48					EXCLUE
49	☑	☑			CERTAINE
50					PROBABLE
51					EXCLUE
52					EXCLUE
53					EXCLUE
54					PROBABLE
55					EXCLUE
56					EXCLUE
57					EXCLUE
58		☑			PROBABLE
59		☑			PROBABLE
60		☑			PROBABLE
61					PROBABLE
62					PROBABLE
63					PROBABLE
64					EXCLUE
65					EXCLUE
66					EXCLUE
68					EXCLUE
70		☑			CERTAINE

Tableau 24 : Classement des patients selon le gold standard.

L'infection est certaine pour seulement 18 patients (soit 29,5% des patients), probable pour 27 (44,3%) et exclue pour 16 (26,2%).

- Pour les 18 patients pour lesquels l'infection est certaine : sur les 90 prélèvements, 76 sont positifs en culture contre 65 qui sont positifs en PCR.
- Pour les 27 patients pour lesquels l'infection est probable : sur les 135 prélèvements, 110 sont positifs en culture contre 79 qui sont positifs en PCR.
- Pour les 16 patients pour lesquels l'infection est exclue : sur les 80 prélèvements, aucun n'est positif en culture mais10 sont positifs en PCR.

Les pourcentages de documentation de la culture et de la PCR en fonction du type d'infection sont donc les suivants (tableau 25):

% documentation	CERTAINE	PROBABLE	EXCLUE
CULTURE	84,44%	81,48%	0%
PCR	72,22%	58,51%	12,5%

Tableau 25 : Pourcentages de documentation de la culture et de la PCR en fonction du degré de certitude de l'infection.

Le pourcentage de documentation est supérieur pour la culture par rapport à la PCR, en cas d'infection certaine ou probable. En cas d'infection probable, la différence se creuse entre la PCR et la culture. En cas d'infection exclue, on retrouve quelques cas de PCR positives : si certaines de ces PCR sont probablement des faux positifs liés à une contamination, d'autres semblent bien liées à une infection traitée au moment du prélèvement.

6.5 Nombre de prélèvements positifs en PCR par patient

En moyenne, les patients pour lesquels l'infection est certaine ont 3,6 prélèvements sur 5 positifs en PCR.
Ceux pour lesquels l'infection est probable ont 2,8 prélèvements sur 5 positifs en PCR.

6.6Sensibilité et spécificité de la PCR

Pour la culture, les faux négatifs n'ont pas été notifiés. Seuls les pathogènes vraisemblablement en cause dans l'infection l'ont été. La spécificité de la culture ne peut donc pas être calculée.

On peut dire que la sensibilité de la culture est de :

- 84,4% quand l'infection est certaine,
- 81,48% quand l'infection est probable.

Afin de calculer la sensibilité et la spécificité de la PCR par rapport au gold standard, on peut répartir tous les prélèvements des patients et des témoins de la manière suivante (tableau 26):

PCR	Nombre de prélèvements
VRAIS POSITIFS	134
FAUX POSITIFS	11*
VRAIS NEGATIFS	102
FAUX NEGATIFS	93

Tableau 26 : Classement des échantillons en vrais positifs, faux positifs, vrais négatifs et faux négatifs pour la PCR par rapport au gold standard.

*Parmi les faux positifs sont comptabilisés les 3 PCR positives pour les témoins, et les 8 PCR positives des patients pour lesquelles il y avait une forte suspicion de contamination ; après ré-extraction et ré-amplification, ces PCR se sont avérées négatives.Les autres données sont classées en comparaison avec le gold standard.

On obtient donc une sensibilité de 59% pour la PCR, et une spécificité de 90,3%.

La valeur prédictive positive est de 92,4%, et la valeur prédictive négative de 52,3%.

Si l'on classe par type d'infection, on obtient le tableau suivant :

PCR	INFECTION CERTAINE	INFECTION PROBABLE	INFECTION EXCLUE
VRAIS POSITIFS	62	72	0
FAUX POSITIFS	0	2	9
VRAIS NEGATIFS	0	0	102
FAUX NEGATIFS	28	65	0

Tableau 27 : Classement des échantillons en fonction du type d'infection.

La sensibilité de la PCR est de 68,9% en cas d'infection certaine et baisse à 52,6% en cas d'infection probable.

On obtient donc une sensibilité bien moindre pour la PCR par rapport à la culture que ce soit en cas d'infection certaine ou probable. Cependant, la spécificité est assez élevée ; malheureusement, on ne peut pas la comparer à celle de la culture dans notre étude.

6.7 Evaluation de la PCR en fonction du type d'infection (aiguë, chronique ou hématogène)

Le tableau 28 présente les pourcentages de documentation en culture et en PCR, en fonction du type d'infection.

% documentation	INFECTION AIGUË (n=65)	INFECTION CHRONIQUE (n=230)	INFECTION HEMATOGENE (n=10)
CULTURE	78,5% (n=51)	54,8% (n=126)	80% (n=8)
PCR	70,8% (n=46)	43% (n=99)	60% (n=6)

Tableau 28 : Pourcentages de documentation en culture et en PCR en fonction du type d'infection.

Les infections chroniques sont bien moins documentées, que ce soit par la culture ou la PCR.

6.8 Résultats de l'anatomopathologie

Le résultat anatomopathologique est un critère du gold standard ; cependant, s'il est le seul présent parmi les 3 critères, il ne suffit pas à classer l'infection.

Parmi les 61 patients-cas, seuls 39 ont un résultat anatomopathologique exploitable. En effet, pour 6 d'entre eux, le prélèvement de synovial n'a pas été réalisé au bloc opératoire. Il n'était pas contributif pour les 16 autres patients (pièce opératoire de mauvaise qualité). Ces résultats tiennent compte de la deuxième lecture.

	Classification anatomopathologique selon Morawietz			
	Type I	**Type II**	**Type III**	**Type IV**
Nombre de patients	7	**19**	**3**	10
Nombre de PNNpar champ(×400)	0	> 50 (moyenne = 86,3)	50 (moyenne =96,7)	< 50 (moyenne = 1,9)

Tableau 29 : Résultats anatomopathologiques (objectif ×400).

22 patients présentent un type II ou III, types en faveur d'une infection. Ces derniers ont tous plus de 5 polynucléaires neutrophiles par champ, au grossissement 400.

Parmi les 10 patients pour lesquels l'infection a été exclue et ayant bénéficié d'une étude anatomopathologique, tous présentent un type I ou IV qui ne sont donc pas en faveur d'une infection. Pour les 29 autres patients pour lesquels l'infection est certaine ou probable, tous présentent un type II ou III, sauf un qui présente un type IV (tableau 29).

Le tableau suivant présente la concordance entre le résultat anatomopathologique et la culture (tableau 30):

Anatomo-pathologie	CULTURE	
	POSITIVE	**NEGATIVE**
Type II ou III (en faveur d'une infection)	22	**0**
Type I ou IV (non en faveur d'une infection)	**4**	13

Tableau 30 : Concordance culture/résultats anatomopathologiques.

Seuls 4 patients présentent des résultats discordants avec la culture, ce sont les patients n°5, 9, 18 et 44 : bien qu'ayant des cultures microbiologiques positives, l'étude anatomopathologique n'est pas en faveur d'une infection. Ils correspondent tous à des infections chroniques de prothèses de genou ou de hanche, et sont classés en tant qu'infection probable puisque le critère anatomopathologique leur manque.

Aucun patient négatif en culture n'est classé en type II ou III dans la classification de Morawietz.

Les patients uniquement positifs en PCR (et négatifs en culture) sont tous classés en type I ou IV.

7- DISCUSSION

La prise en charge adéquate et optimale des infections ostéo-articulaires sur prothèses est un enjeu majeur de santé publique ; elle nécessite en premier lieu une amélioration dans l'étape du diagnostic qui demeure encore aujourd'hui fastidieux. Notre étude s'inscrit pleinement dans cette démarche d'optimisation des techniques bactériologiques sur les prélèvements osseux issus des reprises chirurgicales de prothèses articulaires.

Le diagnostic repose sur un faisceau d'arguments cliniques, biologiques et radiologiques, arguments qui dictent la conduite thérapeutique à tenir. Tous les patients inclus dans notre étude ont fait l'objet d'une analyse approfondie de ces différents critères qui concluaient à une suspicion d'infection sur prothèse, nécessitant une reprise chirurgicale adaptée. Par la suite, nous avons pu classer nos patients selon le gold standard prédéfini qui s'inspire des dernières recommandations de pratique clinique de la SPILF de 2009[56], afin de déterminer si l'infection était finalement certaine, probable ou exclue. Sur les 61 patients inclus, l'infection est définie comme certaine pour seulement 18 patients, soit 30% de la population étudiée, et elle est exclue pour 16 patients, soit 26% de la population étudiée. Ceci révèle donc bien la difficulté de différencier les descellements aseptiques des véritables infections sur prothèses en pré-opératoire. L'étude de nouveaux paramètres biologiques ou d'outils diagnostiques radiologiques s'avère donc indispensable, afin de limiter le nombre de reprises chirurgicales non adaptées.

Parmi les outils diagnostiques utilisés en cas de suspicion d'infection sur prothèse, il existe la ponction pré-opératoire. Dans cette série, elle n'a été réalisée que chez 6 de nos patients, dont 5 chroniques. Certes, le nombre de cas n'est pas suffisant pour tirer de véritables conclusions, mais la concordance de 100% entre les résultats bactériologiques de la ponction pré-opératoire et les prélèvements per-opératoires prouve l'intérêt qu'elle apporte. Le germe étant isolé, le traitement antibiotique adapté à l'antibiogramme peut être débuté rapidement après la prise en charge chirurgicale. Cette ponction peut également guider le choix de la technique chirurgicale : changement en un temps au lieu de deux temps. Dans la littérature, la sensibilité est très variable, elle est de l'ordre de 10 à 100%[38].

Dans la moitié des cas, les cultures bactériologiques ont conclu à une infection monomicrobienne, alors que 16% des infections étaient polymicrobiennes. La proportion de cultures négatives est très importante : selon les critères de la SPLIF, les prélèvements ont été considérés comme stériles dans 20 cas, soit un tiers des patients. Ce chiffre est largement supérieur à celui qu'on rencontre dans la littérature (11% pour Zimmerli [86], 9% pour Pulido [12]) mais il est sûrement surestimé. En effet, un grand nombre de patients de la série ont été classés dans la catégorie« infection exclue » à posteriori. En dehors de ces 16 patients classés« infection exclue », seuls 4 patients ont obtenu des cultures négatives.On obtient alors un pourcentage de 8% de patients àcultures négatives (en cas d'infection certaine ou probable). Il s'agit dans la majorité des cas d'infections chroniques pour lesquelles le diagnostic microbiologique est le plus délicat.

Les germes mis en cause sont variés, témoignant des différentes sources de contamination possibles : per-opératoire, hématogène… Cette diversité bactériologique est plus importante dans les cas d'infections chroniques. En culture, le germe le plus fréquent est le *Staphylococcus aureus* dans 25% des cas, suivi des staphylocoques coagulase négative dans 13% des cas, puis des streptocoques et du *Propionibacterium acnes* dans 3% des cas et enfin des entérobactéries et anaérobies. On note une différence par rapport aux données épidémiologiques connues[32], puisque le plus souventles germes majeurs retrouvéssont les Staphylocoques coagulase négative.Cette différence pourrait en partie s'expliquer par le fait que, dans notre série, nous avons appliqué pour la culture les critères de la SPLIF et donc exclu les SCN contaminants.Très peu de SARMont été isolés, certainement en lien probable avec une écologie locale favorable.

Les 4 cas d'infections à germes anaérobies sont polymicrobiens et correspondent à des infections chroniques pour 3 patients ; dans les quelques séries de la littérature d'infections sur prothèses à germes anaérobies, il s'agit principalement d'infections chroniques tardives, mono ou polymicrobiennes, où la douleur semble toujours constante et où du pus ou un écoulement est fréquemment retrouvé[179]. Pour nos 4 patients, du pus a en effet été mis en évidence lors de l'intervention chirurgicale. L'infection à *Bacteroides fragilis*correspond à une infection aiguë, probablement hématogène puisqu'accompagnée d'*Escherichia coli,* d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterobacter cloacae*. De même, comme dans la littérature, les infections à *Clostridium* et *Bacteroides* sont d'origine hématogène, alors que celles à *Peptostreptococcus, Finegoldia, Anaerococcus*…sont plutôt chroniques.

Enfin, on constate que l'on a bien isolé du *Propionibacterium acnes* dans les 2 cas de prothèses d'épaule comme dans la majorité des cas selon la littérature[81].

Un des objectifs secondaires de l'étude était d'évaluer la rentabilité de l'inoculation des broyats osseux dans un flacon d'hémoculture. Ce procédé est déjà largement utilisé en routine pour d'autres types de prélèvements comme les liquides d'ascite ou les liquides articulaires. Le flacon pédiatrique utilisé permet d'isoler une grande majorité des germes, à part les anaérobies. Sur l'ensemble de nos prélèvements, ses performances ont largement été démontrées : en effet, tous les germes poussant sur milieux solides aérobies ont été détectés sans exception dans le flacon d'hémoculture. D'autre part, dans 5% des cas, seul le flacon d'hémoculture était positif. De plus, le délai de positivité étant très court (la majorité des flacons sont détectés positifs en moins de 24 heures), il permet d'obtenir rapidement l'identification et l'antibiogramme du germe.Cependant, cette technique d'ensemencement présente des inconvénients : coût élevé du flacon d'hémoculture, saturation de l'automate BACTEC pour les hémocultures courantes, temps technique important lors de l'inoculation, risque de ne mettre en évidence qu'un seul germe dans les infections mixtes. Mais, tout comme Hughes a déjà commencé à le démontrer, les bénéfices qui en découlent semblent compenser largement ces inconvénients[63]. Le type de flacon d'hémoculture à ensemencer avec le broyat osseux est par contre à discuter car le flacon pédiatrique seul ne permet pas de mettre en évidence les anaérobies dont le *Propionibacterium acnes*, bactériesouvent en cause dans les infections sur prothèses. Un flacon anaérobie seul excluerait les germes aérobies strictes (*Brucella, Pseudomonas*sp.…)

L'hémoculture est plus efficace que le Schaedler : il permet la détection de 94% des germes aéro-anaérobies facultatifs contre 73% pour le Schaedler.De plus, le Schaedler nécessiteun repiquage systématique à 14 jours car il est difficile de détecter visuellement sa positivité, ce qui prolonge le délai de rendu des résultats.

Les milieux liquides, y compris les hémocultures sont parfois en échec lorsque les patients sont sous antibiotiques. L'ensemencement sur gélose par séparation est préconisé, puisqu'il permet d'isoler les germes en cause par phénomène de dilution des antibiotiques sur la gélose.

Les différents milieux de culture solides ou liquides (hémoculture) ont donc chacun des avantages et des inconvénients, ils sont finalement complémentaires.Cette complémentarité est évidemment à exploiter dans le diagnostic de ce genre d'infections, où il est nécessaire à la fois de multiplier le nombre de prélèvements réalisés au bloc opératoire et également de multiplier les types de milieux de culture. En cas d'infection chronique à différents

Staphylocoquescoagulase négative, c'est l'ensemble des différents ensemencements qui va permettre de déterminer si le germe isolé est un contaminant ou rentre en jeu dans l'infection.

En ce qui concerne les résultats de l'étude anatomopathologique, ils sont peu exhaustifs étant donné le faible nombre d'échantillons analysés. Un nombre non négligeable de prélèvements a été considéré comme non contributif ; ils n'ont pas pu être analysés, ce qui montre la difficulté de prélever un échantillon osseux qui convienne à l'analyse. Il semblerait que la classification anatomopathologique ait une bonne valeur prédictive négative ; en effet, tous les prélèvements négatifs en culture ont obtenu une classification non en faveur d'une infection, alors que la valeur prédictive positive n'est pas bonne[85]. Ces données appuient le fait que l'étude anatomopathologique n'est pas discriminante dans le diagnostic d'infection sur prothèse, et que son résultat doit simplement s'ajouteraux autres données.

Enfin, l'objectif principal de cette étude était l'évaluation des performances de la technique de PCR universelle 16S dans le diagnostic des infections sur prothèses ostéo-articulaires.
Sur les 340 prélèvements, la sensibilité de la PCR paraît bien moindre par rapport à la culture : 61% versus 82%. Ainsi, une cinquantaine de prélèvements demeurent négatifs en PCR alors que la culture a permis d'isoler un germe. Ceci nereprésenteque 4 patients sur 61 pour lesquels le diagnostic d'infection sur prothèse n'aurait pas pû être posé grâce à la technique de PCR. La PCR n'est donc pas la technique « miraculeuse » qui permet de résoudre toutes les impasses bactériologiques, comme nous aimons le penser.
Il est difficile d'établir avec précision la sensibilité et la spécificité de la technique de PCR universelle, et de comparer les résultats retrouvés dans les différentes études, tant ces dernières différent en un certain nombre de points : « gold standard » non semblable de part l'évolution des recommandations, critères variables de la population étudiée… Ainsi, en 1999, Tunnay obtient une sensibilité de 72% pour la PCR à partir du produit de sonication de la prothèse contre seulement 22% pour la culture [171] ; cependant, le pourcentage de faux positifs devait être élevé, puisque l'étape de séquençage n'était jamais réalisée à l'issue de la PCR 16S. En 2007, Fihman rapporte une sensibilité de 54% pour les infections sur prothèses articulaires. La sensibilité de la culture était très bonne (92%), mais aucun des patients n'était sous antibiotiques. Avec un « gold standart » comparable, Vandercam trouve une sensibilité de l'ordre de 90% pour la PCR 16S et de seulement 64% pour la culture [174]. Cette fois-ci,

le nombre de patients sous antibiotiques étant non négligeable, ceci explique en partie les différences observées.

Tout comme la culture qui est moins sensible en cas d'infection chronique qu'en cas d'infection aiguë, il en est de même pour la PCR universelle. Les bactéries « quiescentes » des infections chroniques ont beaucoup plus de mal à croître sur les milieux de culture bactériologiques ; on aurait pu penser que la détection de l'ADN aurait permis de mettre en évidence ces germes à croissance difficile, ce n'est malheureusement pas le cas. Les pourcentages de documentation en fonction du type d'infection prouvent le contraire : il n'est que de 43% en cas d'infection chronique contre 71% en cas d'infection aiguë.L'intérêt espéré de mettre en évidence des germes à croissance difficile n'a pas été démontré.
Plusieurs paramètres permettent d'expliquer en partie ce manque de sensibilité : tout d'abord, le manque de rendement de l'extraction de l'ADN. En effet, le volume de broyat tissulaire utilisé n'est que de 200µL, et la grande quantité d'ADN humain par rapport à l'ADN bactérien sature les systèmes d'extraction. Des systèmes d'amélioration existent, comme les kits d'extraction grand volume (jusqu'à 2 mL de prise d'essai), ou des kits permettant un pré-traitement qui détruit l'ADN humain et permet ainsi de concentrer l'ADN bactérien (MOLYSIS de MOLZYM©). D'autre part, certains germes ne sont pas bien détectés comme *Propionibacterium acnes* à cause du type d'amorces universelles utilisées ; il serait nécessaire d'en tester plusieurs pour augmenter la sensibilité. A l'inverse, ces résultats nous ont montré que le manque de sensibilité peut également être dû à un excès d'ADN ; il est donc important de traiter l'échantillon en pur et en dilué pour la technique de PCR 16S. Enfin, c'est surtout l'amélioration du pré-traitement de l'‘échantillon qui permettra un meilleur rendement de l'ensemble des techniques bactériologiques (biologie moléculaire et cultures) : les résultats de la sonication des implants montrent des résultats très intéressants [61].

Bien que moins sensible, la PCR a permis pour 18 prélèvements, soit 6 patients, la mise en évidence d'une bactérie alors que la culture était négative. Pour deux d'entre eux, l'explication réside dans le fait qu'ils étaient sous antibiotiques : la PCR a donc permis à elle seulle diagnostic certain de l'infection. Un patient positif en PCR à *Staphylococcus aureus* n'avait pas reçu d'antibiotiques: l'hypothèse de la contamination lors des manipulations a été excluepar un deuxième test sur un nouvel aliquot. Il pourrait s'agir d'une infection ancienne où l'on aurait détecté des traces d'ADN de *Staphylococcus aureus.*Pour les 3 autres patients et le témoin, il s'agissait de contaminations, ce qui rappelle les contraintes opératoires liées à

cette technique capable d'amplifier l'ADN de n'importe quelle bactérie présent dans l'environnement du laboratoire : salles différentes pour l'extraction/ la préparation du mix/l'amplification, le port de blouses, l'utilisation de hottes PSM ainsi que de matériel dénué d'ADN bactérien (cônes, eppendorfs…).
En se basant sur le gold standard, le pourcentage de documentation en PCR estde 12% en cas d'infection exclue ; cecipeut paraître aberrant et faire penser à une fausse positivité. Il faut se rappeler quel'infection est classée comme « exclue » car elle ne présente aucun des critères suivants : pus, fistule, culture positive, polynucléaires neutrophiles. Dans le cas des patients traités par antibiotiques, il est logique que le critère culture soit négatif tout comme le critère histologique, puisque les antibiotiques diminuent l'inflammation et le recrutement des polynucléaires neutrophiles au site de l'infection. L'infection est donc classée comme « exclue » alors que la PCR permet certainement de mettre en évidence la véritable bactérie en cause.

Les résultats de la PCR 16S ne rentrent pas aujourd'hui dans le « gold standard » qui définit l'infection sur prothèse ostéo-articulaire. Or, pour certains patients dont ceux sous antibiotiques, il est évident que cette donnée pourrait être utile. Comme pour la culture, des règles précises devraient être définies pour interpréter les résultats de la PCR 16S. Plusieurs critères seraient à discuter : le nombre de prélèvements positifs en PCR nécessaire pour affirmer l'infection (selon le type de germe en cause), le pourcentage de similitude acceptable pour conclure à une bonne identification de l'espèce bactérienne, la valeur de Ct minimum pour valider la détection d'ADN…
En ce qui concerne le nombre de prélèvements positifs en PCR, il est, pour nos prélèvements, de 3,6 en cas d'infection certaine et 2,8 en cas d'infection probable. Il semblerait donc raisonnable de devoir porter au moins à 2 le nombre de prélèvements positifs par PCR pour les germes pouvant être considérés comme des contaminants.

Enfin, notre technique ne permet pas d'identifier les différents germes d'une infection plurimicrobienne. Une étape de clonage supplémentaire serait nécessaire, ce qui rendrait encore plus lourde cette technique qui l'est déjà de part les nombreuses étapes qui la composent. D'autres techniques permettront à l'avenir de mettre en évidence des infections mixtes avec une meilleure sensibilité : puces à ADN, spectrométrie de masse couplée à la biologie moléculaire…

En prenant en compte les différents résultats que l'on a obtenus dans l'évaluation de la PCR 16S, on pourrait proposer l'organigramme de décision suivant qui tranche entre les différentes techniques bactériologiques à utiliseren fonction des situations (figure 46).

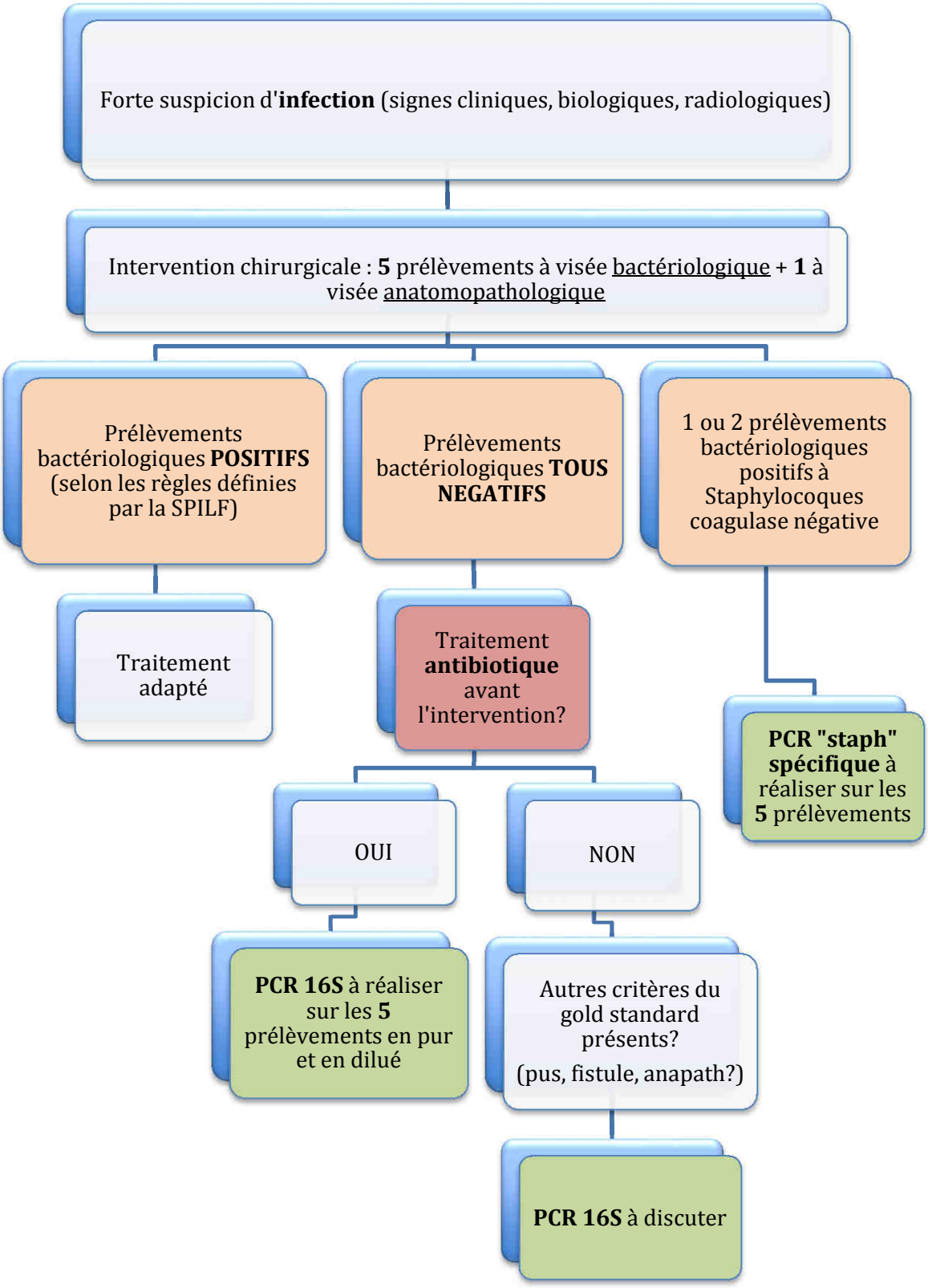


Figure 45 : Organigramme de décision envisageable d'après les résultats de l'étude.

La culture est à privilégier dans tous les cas de figures, puisqu'elle a une bien meilleure sensibilité que la PCR, et puisqu'elle permet d'obtenir l'antibiogramme du germe en cause,

élément indispensable pour adapter au mieux le traitement antibiotique. L'utilisation de la PCR 16S ne devrait donc être limitée qu'à certains cas particuliers, comme la consommation d'antibiotiques dans les 15 jours précédents l'intervention chirurgicale. Etant donné que dans un nombre non négligeable de cas, les cultures sont positives malgré la prise d'antibiotiques, il n'est pas nécessaire de lancer les techniques de biologie moléculaire à l'aveugle dès la réception des prélèvements osseux ; mieux vaut attendre les premiers jours de culture avant de débuter cette technique assez longue et coûteuse.

Si le séquençage aboutit à une identification du genre *Staphylococcus*, on pourrait envisager de réaliser une PCR du gène « mecA » afin de connaître la méticillino-résistance du germe, information-clé pour le traitement. Cependant, la sensibilité de cette PCR dans les prélèvements n'a jamais été étudiée.

Dans des situations particulières où l'on obtiendrait une ou deux cultures positives à Staphylocoques coagulase négative, une PCR du gène « tuf »ciblant les Staphylocoques et réalisée sur les 5 prélèvements pourrait être d'une aide intéressante ; elle permettrait d'apporter une réponse rapide quant à la présence ou non de Staphylocoques dans les prélèvements osseux. Les Staphylocoques étant les premiers germes en cause dans les infections sur prothèses ostéo-articulaires, il serait peut être même plus contributif de réaliser en première intention des PCR du gène « tuf » ou d'autres PCR spécifiques de *Staphylococcus aureus* ou *Staphylococcus epidermidis*, puis des PCR universelles en cas de négativité.

8- CONCLUSION

Malgré le développement de nouvelles techniques diagnostiques, nos résultatsmontrent que le diagnostic des infections sur prothèses demeure complexe et difficile, et que la PCR 16S n'est utile que dans certains cas particuliers, notamment d'antibiothérapie préalable.

L'ensemble des résultats des 7 centresde l'interrégion Ouest (soit 300 patients et donc 1500 prélèvements osseux)doit aujourd'hui être analysé et publié.

A long terme, différentes perspectives s'ouvrent pour le groupe de microbiologie du CRIOGO. Tout d'abord, lesuivi de la cohorte des patients inclus dans le protocole MICROBIOS (cas et témoins), qui apportera de nombreuses données sur l'épidémiologie en cas de rechute. D'autre part, l'amélioration des techniques, en particulier du pré-traitement des échantillons doit rester un objectif majeur, notamment par le développement de la sonication. Enfin, la conservation de tous les prélèvements de cette étude pourra permettre de tester de nouvelles techniques moléculaires, afin de proposer une réelle stratégie diagnostique des infections ostéo-articulaires su prothèses intégrant la biologie moléculaire.

BIBLIOGRAPHIE

1. *Rapport congrès SOFCOT (Société Française de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique).* 2011.
2. Tsukayama, D.T., R. Estrada, and R.B. Gustilo, *Infection after total hip arthroplasty. A study of the treatment of one hundred and six infections.* The Journal of bone and joint surgery. American volume, 1996. **78**(4): p. 512-23.
3. Segawa, H., et al., *Infection after total knee arthroplasty. A retrospective study of the treatment of eighty-one infections.* The Journal of bone and joint surgery. American volume, 1999. **81**(10): p. 1434-45.
4. McPherson, E.J., et al., *Periprosthetic total hip infection: outcomes using a staging system.* Clinical orthopaedics and related research, 2002(403): p. 8-15.
5. Zimmerli, W., A. Trampuz, and P.E. Ochsner, *Prosthetic-joint infections.* N Engl J Med, 2004. **351**(16): p. 1645-54.
6. Maderazo, E.G., S. Judson, and H. Pasternak, *Late infections of total joint prostheses. A review and recommendations for prevention.* Clinical orthopaedics and related research, 1988(229): p. 131-42.
7. Manian, F.A., *Surveillance of surgical site infections in alternative settings: exploring the current options.* American journal of infection control, 1997. **25**(2): p. 102-5.
8. *Surveillance des infections du site opératoire en France de 2006 à 2010.*; Available from: http://www.invs.sante.fr/raisin/.
9. Urquhart, D.M., et al., *Incidence and risk factors for deep surgical site infection after primary total hip arthroplasty: a systematic review.* The Journal of arthroplasty, 2010. **25**(8): p. 1216-22 e1-3.
10. Delaunay, C., E. Aghayev, and C. Roeder, *Registre des prothèses totales de hanche de la SOFCOT.* 2011.
11. Berbari, E.F., et al., *Risk factors for prosthetic joint infection: case-control study.* Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 1998. **27**(5): p. 1247-54.
12. Pulido, L., et al., *Periprosthetic joint infection: the incidence, timing, and predisposing factors.* Clinical orthopaedics and related research, 2008. **466**(7): p. 1710-5.
13. Font-Vizcarra, L., et al., *Relationship between intraoperative cultures during hip arthroplasty, obesity, and the risk of early prosthetic joint infection: a prospective study of 428 patients.* The International journal of artificial organs, 2011. **34**(9): p. 870-5.
14. Saleh, K., et al., *Predictors of wound infection in hip and knee joint replacement: results from a 20 year surveillance program.* Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society, 2002. **20**(3): p. 506-15.
15. Peel, T.N., et al., *Risk factors for prosthetic hip and knee infections according to arthroplasty site.* The Journal of hospital infection, 2011. **79**(2): p. 129-33.
16. Cremieux, A.C. and C. Carbon, *Experimental models of bone and prosthetic joint infections.* Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 1997. **25**(6): p. 1295-302.
17. Zimmerli, W., et al., *Pathogenesis of foreign body infection: description and characteristics of an animal model.* The Journal of infectious diseases, 1982. **146**(4): p. 487-97.

18. Craig, M.R., et al., *A novel total knee arthroplasty infection model in rabbits.* Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society, 2005. **23**(5): p. 1100-4.
19. Southwood, R.T., et al., *Infection in experimental hip arthroplasties.* The Journal of bone and joint surgery. British volume, 1985. **67**(2): p. 229-31.
20. An YH, D.R., Doyle RJ, *Mechanisms of bacterial adhesion and pathogenesis of implant and tissue infections.* Handbook of bacterial adhesion: principles, methods, and applications, 2000: p. 1-27.
21. Gristina, A.G., *Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration.* Science, 1987. **237**(4822): p. 1588-95.
22. Costerton, J.W., P.S. Stewart, and E.P. Greenberg, *Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections.* Science, 1999. **284**(5418): p. 1318-22.
23. Darouiche, R.O., *Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence.* Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 2001. **33**(9): p. 1567-72.
24. Williams, R.J., et al., *Identification of a fibronectin-binding protein from Staphylococcus epidermidis.* Infection and immunity, 2002. **70**(12): p. 6805-10.
25. Cremet, L., et al., *Orthopaedic-implant infections by Escherichia coli: molecular and phenotypic analysis of the causative strains.* The Journal of infection, 2012. **64**(2): p. 169-75.
26. Vuong, C., et al., *Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in Staphylococcus aureus.* The Journal of infectious diseases, 2000. **182**(6): p. 1688-93.
27. Ceri, H., et al., *The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms.* Journal of clinical microbiology, 1999. **37**(6): p. 1771-6.
28. Ramage, G., et al., *Formation of Propionibacterium acnes biofilms on orthopaedic biomaterials and their susceptibility to antimicrobials.* Biomaterials, 2003. **24**(19): p. 3221-7.
29. Rae, T., *A study on the effects of particulate metals of orthopaedic interest on murine macrophages in vitro.* The Journal of bone and joint surgery. British volume, 1975. **57**(4): p. 444-50.
30. Bernard, L., et al., *The inhibition of neutrophil antibacterial activity by ultra-high molecular weight polyethylene particles.* Biomaterials, 2005. **26**(27): p. 5552-7.
31. Santin, M., et al., *Effect of PMMA cement radical polymerisation on the inflammatory response.* Journal of materials science. Materials in medicine, 2004. **15**(11): p. 1175-80.
32. Peel, T.N., K.L. Buising, and P.F. Choong, *Prosthetic joint infection: challenges of diagnosis and treatment.* ANZ journal of surgery, 2011. **81**(1-2): p. 32-9.
33. Berbari, E., et al., *Inflammatory blood laboratory levels as markers of prosthetic joint infection: a systematic review and meta-analysis.* The Journal of bone and joint surgery. American volume, 2010. **92**(11): p. 2102-9.
34. Bilgen, O., et al., *C-reactive protein values and erythrocyte sedimentation rates after total hip and total knee arthroplasty.* The Journal of international medical research, 2001. **29**(1): p. 7-12.
35. Spangehl, M.J., et al., *Prospective analysis of preoperative and intraoperative investigations for the diagnosis of infection at the sites of two hundred and two revision total hip arthroplasties.* The Journal of bone and joint surgery. American volume, 1999. **81**(5): p. 672-83.

36. Nilsdotter-Augustinsson, A., et al., *Inflammatory response in 85 patients with loosened hip prostheses: a prospective study comparing inflammatory markers in patients with aseptic and septic prosthetic loosening.* Acta orthopaedica, 2007. **78**(5): p. 629-39.
37. Duff, G.P., P.F. Lachiewicz, and S.S. Kelley, *Aspiration of the knee joint before revision arthroplasty.* Clinical orthopaedics and related research, 1996(331): p. 132-9.
38. Bernard, L., et al., *Value of preoperative investigations in diagnosing prosthetic joint infection: retrospective cohort study and literature review.* Scandinavian journal of infectious diseases, 2004. **36**(6-7): p. 410-6.
39. Trampuz, A., et al., *Synovial fluid leukocyte count and differential for the diagnosis of prosthetic knee infection.* The American journal of medicine, 2004. **117**(8): p. 556-62.
40. Parvizi, J., et al., *Diagnosis of periprosthetic joint infection: the utility of a simple yet unappreciated enzyme.* The Journal of bone and joint surgery. American volume, 2011. **93**(24): p. 2242-8.
41. Aggarwal, V.K., et al., *Leukocyte Esterase From Synovial Fluid Aspirate: A Technical Note.* The Journal of arthroplasty, 2012.
42. Tigges, S., R.G. Stiles, and J.R. Roberson, *Appearance of septic hip prostheses on plain radiographs.* AJR. American journal of roentgenology, 1994. **163**(2): p. 377-80.
43. Rabin, D.N., et al., *Problem prostheses: the radiologic evaluation of total joint replacement.* Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc, 1987. **7**(6): p. 1107-27.
44. Feydy A, T.F., Guerini H, Hamadouche M, Campagna R, Richarme D, Chevrot A, Drapé J.L, *Imagerie moderne des PTH. Gestion des artefacts en TDM et IRM. .* Groupe GETROA., 2007: p. 453-466.
45. White, L.M., et al., *Complications of total hip arthroplasty: MR imaging-initial experience.* Radiology, 2000. **215**(1): p. 254-62.
46. Adler, R.S., et al., *Diagnostic and therapeutic use of sonography-guided iliopsoas peritendinous injections.* AJR. American journal of roentgenology, 2005. **185**(4): p. 940-3.
47. Rubello, D., et al., *Three-phase bone scintigraphy pattern of loosening in uncemented hip prostheses.* European journal of nuclear medicine, 1995. **22**(4): p. 299-301.
48. Rahmy, A.I., A.J. Tonino, and W.D. Tan, *Quantitative analysis of technetium-99m-methylene diphosphonate uptake in unilateral hydroxyapatite-coated total hip prostheses: first year of follow-up.* Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine, 1994. **35**(11): p. 1788-91.
49. Devillers, A., et al., *Technetium-99m hexamethylpropylene amine oxime leucocyte scintigraphy for the diagnosis of bone and joint infections: a retrospective study in 116 patients.* European journal of nuclear medicine, 1995. **22**(4): p. 302-7.
50. Palestro, C.J., et al., *Combined labeled leukocyte and technetium 99m sulfur colloid bone marrow imaging for diagnosing musculoskeletal infection.* Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc, 2006. **26**(3): p. 859-70.
51. Pelosi, E., C. Baiocco, and M. Pennone, *99mTc-HMPAO-Leukocyte Scintigraphy in Patients with Symptomatic Total Hip or Knee Arthroplasty: Improved Diagnostic*

Accuracy by Means of Semiquantitative Evaluation. The Journal of nuclear medicine, 2004. **45**(3): p. 438-44.
52. Pill, S.G., et al., *Comparison of fluorodeoxyglucose positron emission tomography and (111)indium-white blood cell imaging in the diagnosis of periprosthetic infection of the hip.* The Journal of arthroplasty, 2006. **21**(6 Suppl 2): p. 91-7.
53. Love, C., et al., *Diagnosing infection in the failed joint replacement: a comparison of coincidence detection 18F-FDG and 111In-labeled leukocyte/99mTc-sulfur colloid marrow imaging.* Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine, 2004. **45**(11): p. 1864-71.
54. Atkins, B.L., et al., *Prospective evaluation of criteria for microbiological diagnosis of prosthetic-joint infection at revision arthroplasty. The OSIRIS Collaborative Study Group.* Journal of clinical microbiology, 1998. **36**(10): p. 2932-9.
55. Desplaces, *Bactériologie des infections ostéoarticulaires chez l'adulte.* Revue du Rhumatisme, 2006. **73**: p. 129-135.
56. SPILF, *Recommandations de pratique clinique : Infections ostéo-articulaires sur matériel (prothèse, implant, ostéo-synthèse).* 2009.
57. Roux, A.L., et al., *Diagnosis of prosthetic joint infection by beadmill processing of a periprosthetic specimen.* Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2011. **17**(3): p. 447-50.
58. Trampuz, A., et al., *Sonication of explanted prosthetic components in bags for diagnosis of prosthetic joint infection is associated with risk of contamination.* Journal of clinical microbiology, 2006. **44**(2): p. 628-31.
59. Tunney, M.M., et al., *Improved detection of infection in hip replacements. A currently underestimated problem.* The Journal of bone and joint surgery. British volume, 1998. **80**(4): p. 568-72.
60. Trampuz, A., et al., *Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection.* The New England journal of medicine, 2007. **357**(7): p. 654-63.
61. Holinka, J., et al., *Sonication cultures of explanted components as an add-on test to routinely conducted microbiological diagnostics improve pathogen detection.* Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society, 2011. **29**(4): p. 617-22.
62. Borens, O. and F. Nussbaumer, *Diagnostic et traitement des infections d'implants orthopédiques.* Revue médicale suisse, 2009. **5**: p. 2563-8.
63. Hughes, H.C., et al., *Microbiological diagnosis of prosthetic joint infections: a prospective evaluation of four bacterial culture media in the routine laboratory.* Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2011. **17**(10): p. 1528-30.
64. Schafer, P., et al., *Prolonged bacterial culture to identify late periprosthetic joint infection: a promising strategy.* Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 2008. **47**(11): p. 1403-9.
65. Butler-Wu, S.M., et al., *Optimization of periprosthetic culture for diagnosis of Propionibacterium acnes prosthetic joint infection.* Journal of clinical microbiology, 2011. **49**(7): p. 2490-5.
66. Galdbart, J.O., et al., *Phenotypic and genomic variation among Staphylococcus epidermidis strains infecting joint prostheses.* Journal of clinical microbiology, 1999. **37**(5): p. 1306-12.

67. Sendi, P., et al., *Staphylococcus aureus small colony variants in prosthetic joint infection.* Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 2006. **43**(8): p. 961-7.
68. Vaudaux, P., W.L. Kelley, and D.P. Lew, *Staphylococcus aureus small colony variants: difficult to diagnose and difficult to treat.* Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 2006. **43**(8): p. 968-70.
69. Sendi, P. and R.A. Proctor, *Staphylococcus aureus as an intracellular pathogen: the role of small colony variants.* Trends in microbiology, 2009. **17**(2): p. 54-8.
70. Sendi, P., et al., *Escherichia coli variants in periprosthetic joint infection: diagnostic challenges with sessile bacteria and sonication.* Journal of clinical microbiology, 2010. **48**(5): p. 1720-5.
71. *Tirésias IV : Infection des prothèses de hanche.* La prévention médicale, 2007: p. 55-72.
72. Moran, E., et al., *Guiding empirical antibiotic therapy in orthopaedics: The microbiology of prosthetic joint infection managed by debridement, irrigation and prosthesis retention.* The Journal of infection, 2007. **55**(1): p. 1-7.
73. Sharma, D., et al., *Microbiology of infected arthroplasty: implications for empiric peri-operative antibiotics.* Journal of orthopaedic surgery, 2008. **16**(3): p. 339-42.
74. Pandey, R., A.R. Berendt, and N.A. Athanasou, *Histological and microbiological findings in non-infected and infected revision arthroplasty tissues. The OSIRIS Collaborative Study Group. Oxford Skeletal Infection Research and Intervention Service.* Archives of orthopaedic and trauma surgery, 2000. **120**(10): p. 570-4.
75. Steckelberg, J. and D. Osmon, *Infections associated with indwelling medical devices.* Washington, DC: ASM Press, 2000: p. 173-209.
76. Bengtson, S. and K. Knutson, *The infected knee arthroplasty. A 6-year follow-up of 357 cases.* Acta orthopaedica Scandinavica, 1991. **62**(4): p. 301-11.
77. Fitzgerald, R.H., Jr., et al., *Deep wound sepsis following total hip arthroplasty.* The Journal of bone and joint surgery. American volume, 1977. **59**(7): p. 847-55.
78. McDonald, D.J., R.H. Fitzgerald, Jr., and D.M. Ilstrup, *Two-stage reconstruction of a total hip arthroplasty because of infection.* The Journal of bone and joint surgery. American volume, 1989. **71**(6): p. 828-34.
79. Marculescu, C.E., et al., *Unusual aerobic and anaerobic bacteria associated with prosthetic joint infections.* Clinical orthopaedics and related research, 2006. **451**: p. 55-63.
80. David, J., et al., *Bilateral prosthetic knee infection by Campylobacter fetus.* The Journal of arthroplasty, 2005. **20**(3): p. 401-5.
81. Kelly, J.D., 2nd and E.R. Hobgood, *Positive culture rate in revision shoulder arthroplasty.* Clinical orthopaedics and related research, 2009. **467**(9): p. 2343-8.
82. Marmor, M., N. Parnes, and S. Dekel, *Tuberculosis infection complicating total knee arthroplasty: report of 3 cases and review of the literature.* The Journal of arthroplasty, 2004. **19**(3): p. 397-400.
83. Dutronc, H., et al., *Candida prosthetic infections: case series and literature review.* Scandinavian journal of infectious diseases, 2010. **42**(11-12): p. 890-5.
84. Yilmaz, M., et al., *Aspergillus fumigatus infection as a delayed manifestation of prosthetic knee arthroplasty and a review of the literature.* Scandinavian journal of infectious diseases, 2011. **43**(8): p. 573-8.
85. Trampuz, A., et al., *Advances in the laboratory diagnosis of prosthetic joint infection.* Review medical microbiology, 2003. **14**: p. 1-14.

86. Zimmerli, W., A. Trampuz, and P.E. Ochsner, *Prosthetic-joint infections.* The New England journal of medicine, 2004. **351**(16): p. 1645-54.
87. Feldman, D., et al., *The role of intraoperative frozen sections in revision total joint arthroplasty.* The Journal of bone and joint surgery. American volume, 1995. **77**: p. 1807-1813.
88. Bori, G., et al., *Usefulness of histological analysis for predicting the presence of microorganisms at the time of reimplantation after hip resection arthroplasty for the treatment of infection.* The Journal of bone and joint surgery. American volume, 2007. **89**: p. 1232-7.
89. Pandey, R., E. Drakoulakis, and N. Athanasou, *An assessment of the histological criteria used to diagnose infection in hip revision arthroplasty tissues.* Journal of clinical pathology, 1999. **52**: p. 118-23.
90. Moran, E., I. Byren, and B.L. Atkins, *The diagnosis and management of prosthetic joint infections.* Journal of antimicrobial chemotherapy, 2010. **65**: p. 45-54.
91. Coventry, M.B., *Treatment of infections occurring in total hip surgery.* The Orthopedic clinics of North America, 1975. **6**(4): p. 991-1003.
92. Crockarell, J.R., et al., *Treatment of infection with debridement and retention of the components following hip arthroplasty.* The Journal of bone and joint surgery. American volume, 1998. **80**(9): p. 1306-13.
93. Marculescu, C.E., et al., *Outcome of prosthetic joint infections treated with debridement and retention of components.* Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 2006. **42**(4): p. 471-8.
94. Brandt, C.M., et al., *Staphylococcus aureus prosthetic joint infection treated with debridement and prosthesis retention.* Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 1997. **24**(5): p. 914-9.
95. Tsukayama, D.T., B. Wicklund, and R.B. Gustilo, *Suppressive antibiotic therapy in chronic prosthetic joint infections.* Orthopedics, 1991. **14**(8): p. 841-4.
96. Jackson, W.O. and T.P. Schmalzried, *Limited role of direct exchange arthroplasty in the treatment of infected total hip replacements.* Clinical orthopaedics and related research, 2000(381): p. 101-5.
97. Silva, M., R. Tharani, and T.P. Schmalzried, *Results of direct exchange or debridement of the infected total knee arthroplasty.* Clinical orthopaedics and related research, 2002(404): p. 125-31.
98. Mont, M.A., B.J. Waldman, and D.S. Hungerford, *Evaluation of preoperative cultures before second-stage reimplantation of a total knee prosthesis complicated by infection. A comparison-group study.* The Journal of bone and joint surgery. American volume, 2000. **82-A**(11): p. 1552-7.
99. Ure, K.J., et al., *Direct-exchange arthroplasty for the treatment of infection after total hip replacement. An average ten-year follow-up.* The Journal of bone and joint surgery. American volume, 1998. **80**(7): p. 961-8.
100. Callaghan, J.J., R.P. Katz, and R.C. Johnston, *One-stage revision surgery of the infected hip. A minimum 10-year followup study.* Clinical orthopaedics and related research, 1999(369): p. 139-43.
101. Langlais, F., *Can we improve the results of revision arthroplasty for infected total hip replacement?* The Journal of bone and joint surgery. British volume, 2003. **85**(5): p. 637-40.
102. Windsor, R.E., et al., *Two-stage reimplantation for the salvage of total knee arthroplasty complicated by infection. Further follow-up and refinement of*

indications. The Journal of bone and joint surgery. American volume, 1990. **72**(2): p. 272-8.
103. Pierre-Henri Laffargue, M.d.l., Frédéric Bonnomet, *Reprise fémorale dans les arthroplasties de la hanche - techniques d'ablation des implants et du cimetn : pièges et abords osseux.* Revue de chirurgie orthopédique., 2000. **86**: p. 51-54.
104. Masri, B.A., et al., *Cementless two-stage exchange arthroplasty for infection after total hip arthroplasty.* The Journal of arthroplasty, 2007. **22**(1): p. 72-8.
105. Kraay, M.J., et al., *Cementless two-staged total hip arthroplasty for deep periprosthetic infection.* Clinical orthopaedics and related research, 2005. **441**: p. 243-9.
106. Stengel, D., et al., *Systematic review and meta-analysis of antibiotic therapy for bone and joint infections.* The Lancet infectious diseases, 2001. **1**(3): p. 175-88.
107. Galperine T, e.a., *Antibiothérapie parentérale ambulatoire (APA) par voie intraveineuse dans les infections ostéoarticulaires.* Médecine et maladies infectieuses, 2006. **36**: p. 132-7.
108. Esposito, S., et al., *Outpatient parenteral antibiotic therapy for bone and joint infections: an italian multicenter study.* Journal of chemotherapy, 2007. **19**(4): p. 417-22.
109. Mackintosh, C.L., H.A. White, and R.A. Seaton, *Outpatient parenteral antibiotic therapy (OPAT) for bone and joint infections: experience from a UK teaching hospital-based service.* The Journal of antimicrobial chemotherapy, 2011. **66**(2): p. 408-15.
110. Osmon, D.R. and E.F. Berbari, *Outpatient intravenous antimicrobial therapy for the practicing orthopaedic surgeon.* Clinical orthopaedics and related research, 2002(403): p. 80-6.
111. Desplaces N, e.a., *Vancomycine en perfusion continue et infections ostéo-articulaires à staphylocoques multirésistants. .* Médecine et maladies infectieuses, 1997. **27**: p. 969-74.
112. Trampuz, A. and W. Zimmerli, *Diagnosis and treatment of implant-associated septic arthritis and osteomyelitis.* Current infectious disease reports, 2008. **10**(5): p. 394-403.
113. Mader, J.T., et al., *Evaluation of new anti-infective drugs for the treatment of osteomyelitis in adults. Infectious Diseases Society of America and the Food and Drug Administration.* Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 1992. **15 Suppl 1**: p. S155-61.
114. Zimmerli, W., et al., *Role of rifampin for treatment of orthopedic implant-related staphylococcal infections: a randomized controlled trial. Foreign-Body Infection (FBI) Study Group.* JAMA : the journal of the American Medical Association, 1998. **279**(19): p. 1537-41.
115. Laffer, R.R., et al., *Outcome of prosthetic knee-associated infection: evaluation of 40 consecutive episodes at a single centre.* Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2006. **12**(5): p. 433-9.
116. Farhad, R., et al., *Six weeks antibiotic therapy for all bone infections: results of a cohort study.* European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology, 2010. **29**(2): p. 217-22.
117. Bernard, L., et al., *Six weeks of antibiotic treatment is sufficient following surgery for septic arthroplasty.* The Journal of infection, 2010. **61**(2): p. 125-32.

118. Volin, S.J., S.H. Hinrichs, and K.L. Garvin, *Two-stage reimplantation of total joint infections: a comparison of resistant and non-resistant organisms.* Clinical orthopaedics and related research, 2004(427): p. 94-100.
119. Schwank, S., et al., *Impact of bacterial biofilm formation on in vitro and in vivo activities of antibiotics.* Antimicrobial agents and chemotherapy, 1998. **42**(4): p. 895-8.
120. Zimmerli, W., et al., *Microbiological tests to predict treatment outcome in experimental device-related infections due to Staphylococcus aureus.* The Journal of antimicrobial chemotherapy, 1994. **33**(5): p. 959-67.
121. Widmer, A.F., et al., *Antimicrobial treatment of orthopedic implant-related infections with rifampin combinations.* Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 1992. **14**(6): p. 1251-3.
122. Drancourt, M., et al., *Oral treatment of Staphylococcus spp. infected orthopaedic implants with fusidic acid or ofloxacin in combination with rifampicin.* The Journal of antimicrobial chemotherapy, 1997. **39**(2): p. 235-40.
123. Widmer, A.F., et al., *Correlation between in vivo and in vitro efficacy of antimicrobial agents against foreign body infections.* The Journal of infectious diseases, 1990. **162**(1): p. 96-102.
124. Berdal, J.E., et al., *Use of rifampicin and ciprofloxacin combination therapy after surgical debridement in the treatment of early manifestation prosthetic joint infections.* Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2005. **11**(10): p. 843-5.
125. Drancourt, M., et al., *Oral rifampin plus ofloxacin for treatment of Staphylococcus-infected orthopedic implants.* Antimicrobial agents and chemotherapy, 1993. **37**(6): p. 1214-8.
126. Neuman, M., *Comparative pharmacokinetic parameters of new systemic fluoroquinolones: a review.* Chemioterapia : international journal of the Mediterranean Society of Chemotherapy, 1987. **6**(2): p. 105-12.
127. von Baum, H., et al., *Tissue and serum concentrations of levofloxacin in orthopaedic patients.* International journal of antimicrobial agents, 2001. **18**(4): p. 335-40.
128. Etesse, H., et al., *Diffusion of ciprofloxacin, ofloxacin and pefloxacin in bone tissue.* Reviews of infections diseases, 1988. **10**(Supplément): p. 185-186.
129. Aboltins, C.A., et al., *Treatment of staphylococcal prosthetic joint infections with debridement, prosthesis retention and oral rifampicin and fusidic acid.* Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2007. **13**(6): p. 586-91.
130. Razonable, R.R., D.R. Osmon, and J.M. Steckelberg, *Linezolid therapy for orthopedic infections.* Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic, 2004. **79**(9): p. 1137-44.
131. Bassetti, M., et al., *Linezolid in the treatment of Gram-positive prosthetic joint infections.* The Journal of antimicrobial chemotherapy, 2005. **55**(3): p. 387-90.
132. Stein, A., et al., *Ambulatory treatment of multidrug-resistant Staphylococcus-infected orthopedic implants with high-dose oral co-trimoxazole (trimethoprim-sulfamethoxazole).* Antimicrobial agents and chemotherapy, 1998. **42**(12): p. 3086-91.
133. Nguyen, S., et al., *Efficacy and tolerance of rifampicin-linezolid compared with rifampicin-cotrimoxazole combinations in prolonged oral therapy for bone and joint infections.* Clinical microbiology and infection : the official publication of the

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2009. **15**(12): p. 1163-9.
134. Sakoulas, G., *Clinical outcomes with daptomycin: a post-marketing, real-world evaluation.* Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2009. **15 Suppl 6**: p. 11-6.
135. Rao, N. and D.M. Regalla, *Uncertain efficacy of daptomycin for prosthetic joint infections: a prospective case series.* Clinical orthopaedics and related research, 2006. **451**: p. 34-7.
136. Saleh-Mghir, A., et al., *Ajunctive rifampin is crucial to optimizing Daptomycin efficacity against rabbit prosthetic joint infection due to methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* Antimicrobial agents and chemotherapy, 2011. **55**(10): p. 4589-4593.
137. John, A.K., et al., *Efficacy of daptomycin in implant-associated infection due to methicillin-resistant Staphylococcus aureus: importance of combination with rifampin.* Antimicrobial agents and chemotherapy, 2009. **53**(7): p. 2719-24.
138. Fox, G.E., et al., *The phylogeny of prokaryotes.* Science, 1980. **209**(4455): p. 457-63.
139. Woese, C.R., *Bacterial evolution.* Microbiological reviews, 1987. **51**(2): p. 221-71.
140. Chen, K., et al., *Broad range DNA probes for detecting and amplifying eubacterial nucleic acids.* FEMS microbiology letters, 1989. **48**(1): p. 19-24.
141. Wilson, K.H., R.B. Blitchington, and R.C. Greene, *Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction.* Journal of clinical microbiology, 1990. **28**(9): p. 1942-6.
142. Petti, C.A., *Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing.* Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 2007. **44**(8): p. 1108-14.
143. Ameziane, N., Bogard, and Lamoril, *Principes de biologie moléculaire en biologie clinique.* 2006.
144. Dreier, J., M. Stormer, and K. Kleesiek, *Real-time polymerase chain reaction in transfusion medicine: applications for detection of bacterial contamination in blood products.* Transfusion medicine reviews, 2007. **21**(3): p. 237-54.
145. Exner, M.M. and M.A. Lewinski, *Isolation and detection of Borrelia burgdorferi DNA from cerebral spinal fluid, synovial fluid, blood, urine, and ticks using the Roche MagNA Pure system and real-time PCR.* Diagnostic microbiology and infectious disease, 2003. **46**(4): p. 235-40.
146. Paul, N., J. Shum, and T. Le, *Hot start PCR.* Methods in molecular biology, 2010. **630**: p. 301-18.
147. Mao, D.P., et al., *Coverage Evaluation of Universal Bacterial Primers using the Metagenomic Datasets.* BMC microbiology, 2012. **12**(1): p. 66.
148. Dugan, K.A., et al., *An improved method for post-PCR purification for mtDNA sequence analysis.* Journal of forensic sciences, 2002. **47**(4): p. 811-8.
149. Drancourt, M., et al., *16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates.* Journal of clinical microbiology, 2000. **38**(10): p. 3623-30.
150. Stackebrandt, E. and B. Goebel, *Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology.* International journal of systematic bacteriology, 1994. **44**(4).

151. Palys, T., L.K. Nakamura, and F.M. Cohan, *Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data.* International journal of systematic bacteriology, 1997. **47**(4): p. 1145-56.
152. Park, J.H., et al., *Molecular characterization of Mycobacterium intracellulare-related strains based on the sequence analysis of hsp65, internal transcribed spacer and 16S rRNA genes.* Journal of medical microbiology, 2010. **59**(Pt 9): p. 1037-43.
153. Carpaij, N., et al., *Comparison of the identification of coagulase-negative staphylococci by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry and tuf sequencing.* European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology, 2011. **30**(10): p. 1169-72.
154. Park, K.S., et al., *Evaluation of the GenBank, EzTaxon, and BIBI Services for Molecular Identification of Clinical Blood Culture Isolates That Were Unidentifiable or Misidentified by Conventional Methods.* Journal of clinical microbiology, 2012. **50**(5).
155. Woo, P.C., et al., *Usefulness of the MicroSeq 500 16S ribosomal DNA-based bacterial identification system for identification of clinically significant bacterial isolates with ambiguous biochemical profiles.* Journal of clinical microbiology, 2003. **41**(5): p. 1996-2001.
156. Simmon, K.E., A.C. Croft, and C.A. Petti, *Application of SmartGene IDNS software to partial 16S rRNA gene sequences for a diverse group of bacteria in a clinical laboratory.* Journal of clinical microbiology, 2006. **44**(12): p. 4400-6.
157. Woo, P.C., et al., *Automated identification of medically important bacteria by 16S rRNA gene sequencing using a novel comprehensive database, 16SpathDB.* Journal of clinical microbiology, 2011. **49**(5): p. 1799-809.
158. Ghebremedhin, B., et al., *Genetic classification and distinguishing of Staphylococcus species based on different partial gap, 16S rRNA, hsp60, rpoB, sodA, and tuf gene sequences.* Journal of clinical microbiology, 2008. **46**(3): p. 1019-25.
159. Woo, P.C., et al., *Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories.* Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2008. **14**(10): p. 908-34.
160. Woo, P.C., et al., *Identification of Mycobacterium neoaurum isolated from a neutropenic patient with catheter-related bacteremia by 16S rRNA sequencing.* Journal of clinical microbiology, 2000. **38**(9): p. 3515-7.
161. Adekambi, T. and M. Drancourt, *Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing Mycobacterium species by 16S rRNA, hsp65, sodA, recA and rpoB gene sequencing.* International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2004. **54**(Pt 6): p. 2095-105.
162. Clarridge, J.E., 3rd, *Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases.* Clinical microbiology reviews, 2004. **17**(4): p. 840-62, table of contents.
163. Kotilainen, P., et al., *Aetiological diagnosis of infective endocarditis by direct amplification of rRNA genes from surgically removed valve tissue. An 11-year experience in a Finnish teaching hospital.* Annals of medicine, 2006. **38**(4): p. 263-73.
164. Goldenberger, D., et al., *Molecular diagnosis of bacterial endocarditis by broad-range PCR amplification and direct sequencing.* Journal of clinical microbiology, 1997. **35**(11): p. 2733-9.

165. Breitkopf, C., et al., *Impact of a molecular approach to improve the microbiological diagnosis of infective heart valve endocarditis.* Circulation, 2005. **111**(11): p. 1415-21.
166. Welinder-Olsson, C., et al., *Comparison of broad-range bacterial PCR and culture of cerebrospinal fluid for diagnosis of community-acquired bacterial meningitis.* Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2007. **13**(9): p. 879-86.
167. Schuurman, T., et al., *Prospective study of use of PCR amplification and sequencing of 16S ribosomal DNA from cerebrospinal fluid for diagnosis of bacterial meningitis in a clinical setting.* Journal of clinical microbiology, 2004. **42**(2): p. 734-40.
168. Knox, C.M., V. Cevellos, and D. Dean, *16S ribosomal DNA typing for identification of pathogens in patients with bacterial keratitis.* Journal of clinical microbiology, 1998. **36**(12): p. 3492-6.
169. Fihman, V., et al., *Improved diagnosis specificity in bone and joint infections using molecular techniques.* The Journal of infection, 2007. **55**(6): p. 510-7.
170. Lecouvet, F., et al., *The etiologic diagnosis of infectious discitis is improved by amplification-based DNA analysis.* Arthritis and rheumatism, 2004. **50**(9): p. 2985-94.
171. Tunney, M.M., et al., *Detection of prosthetic hip infection at revision arthroplasty by immunofluorescence microscopy and PCR amplification of the bacterial 16S rRNA gene.* Journal of clinical microbiology, 1999. **37**(10): p. 3281-90.
172. Panousis, K., et al., *Poor predictive value of broad-range PCR for the detection of arthroplasty infection in 92 cases.* Acta orthopaedica, 2005. **76**(3): p. 341-6.
173. Fenollar, F., et al., *Analysis of 525 samples to determine the usefulness of PCR amplification and sequencing of the 16S rRNA gene for diagnosis of bone and joint infections.* Journal of clinical microbiology, 2006. **44**(3): p. 1018-28.
174. Vandercam, B., et al., *Amplification-based DNA analysis in the diagnosis of prosthetic joint infection.* The Journal of molecular diagnostics : JMD, 2008. **10**(6): p. 537-43.
175. Marin, M., et al., *Role of universal 16S rRNA gene PCR and sequencing in diagnosis of prosthetic joint infection.* Journal of clinical microbiology, 2012. **50**(3): p. 583-9.
176. Handschur, M., et al., *Preanalytic removal of human DNA eliminates false signals in general 16S rDNA PCR monitoring of bacterial pathogens in blood.* Comparative immunology, microbiology and infectious diseases, 2009. **32**(3): p. 207-19.
177. Millar, B.C., J. Xu, and J.E. Moore, *Risk assessment models and contamination management: implications for broad-range ribosomal DNA PCR as a diagnostic tool in medical bacteriology.* Journal of clinical microbiology, 2002. **40**(5): p. 1575-80.
178. Corless, C.E., et al., *Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR.* Journal of clinical microbiology, 2000. **38**(5): p. 1747-52.
179. Stahl, *Les anaérobies, ces méconnus maltraités.* La lettre de l'infectiologue, 2000. **Tome XV**.

UNIVERSITÉ DE NANTES **Année de la soutenance**

FACULTÉ DE PHARMACIE **2012**

Nom –Prénoms : COGNEE Anne-Sophie Monique Marie-Thérèse

Titre de la thèse : Evaluation de l'intérêt de la PCR 16s dans les infections ostéo-articulaires sur prothèses – 68 patients du CHU de Poitiers.

Résumé de la thèse :

INTRODUCTION : L'optimisation de la prise en charge des infections sur prothèses ostéo-articulaires est un enjeu majeur de santé publique. Leur diagnostic étant difficile, les microbiologistes tentent d'améliorer les techniques usuelles bactériologiques afin de mieux mettre en évidence les bactéries quiescentes emprisonnées dans le « biofilm ». L'objectif principal de l'étude est de comparer la technique de PCR 16s universelle à la culture.

MATERIEL ET METHODES : Etude prospective incluant 61 patients opérés pour suspicion d'infection sur prothèse de hanche, de genou, d'épauleainsi que 7 patients témoins opérés pour une pose de prothèse de première intention. Pour chaque patient, 6 prélèvements ont été réalisés, 5 à visée bactériologique, 1 à visée anatomopathologique. Chaque prélèvement à visée microbiologique a été d'une part ensemencé sur des milieux appropriés après broyage mécanique, et d'autre parttraité en PCR 16s universelle.

RESULTATS : Les résultats des 340 prélèvements étudiés montrent que la PCR 16s universelle est bien moins sensible que la culture. Son intérêt est limité à quelques situations particulières, comme la prise d'antibiotiques dans les semaines précédant l'intervention. Par ailleurs, en ce qui concerne les techniques de culture, l'ensemencement des prélèvements osseux dans un flacon d'hémoculture est très contributif.

CONCLUSION : La PCR 16s universelle ne semble pas être une technique « révolutionnaire » dans le diagnostic des infections sur prothèses ostéo-articulaires. Peu sensible d'une part et non instructive sur les profils de résistance des bactéries aux antibiotiques d'autre part, il est donc important de conserver les techniques de culture bactériologique en les améliorant et en les protocolisant.

MOTS-CLES : INFECTION,PROTHÈSE OSTÉO-ARTICULAIRE, ADN 16s, PCR UNIVERSELLE, CULTURE, FLACON D'HÉMOCULTURE

JURY :

Président : M. Alain Reynaud, Professeur de Bactériologie - Pharmacie - Nantes
Membres du jury : M. Christophe Burucoa, Professeur de Bactériologie - Poitiers
M. Louis-Etienne Gayet, Professeur de Chirurgie orthopédique - Poitiers
M. Gwenaël Le Moal, Praticien hospitalier en Infectiologie - Poitiers
M. Stéphane Corvec, Maître de Conférences de Bactériologie - Nantes
Directeur : Mme Chloé Plouzeau-Jayle, Praticien hospitalier en Bactériologie - Poitiers

---