

ANNÉE 2014

N°

**MÉMOIRE**  
**DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE**  
**BIOLOGIE MEDICALE**

**Soutenu devant le jury interrégional**

**Le vendredi 21 mars 2014**

**Par Elise LALLEMAND**

Conformément aux dispositions du Décret n° 2012-172 du 3 février

**THÈSE**  
**POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**ÉVALUATION DE L'INTÉRÊT DE LA SPECTROMÉTRIE  
DE MASSE MALDI-TOF DANS LE DIAGNOSTIC DES  
INFECTIONS OSTÉO-ARTICULAIRES.**

**Président :** Madame le Professeur Nathalie CAROFF,  
*Faculté de Pharmacie de Nantes*

**Directeur de thèse :** Madame le Professeur Anne GOUGEON,  
*Faculté de Pharmacie de Rennes*

**Membres du jury :** Monsieur le Professeur Pascal GUGGENBUHL,  
*Faculté de Médecine de Rennes*  
Monsieur le Docteur Cédric ARVIEUX, Praticien Hospitalier,  
*CHU de Rennes*

Président de l'Université  
Doyen  
Vice-doyen Enseignement et Formation  
Vice-doyen Recherche et Valorisation

**Pr. LABOUX Olivier**  
**Pr. FERRÉ Virginie**  
**Pr. DUFLOS Muriel**  
**Pr. RIVAIN-SEBILLE Véronique**

**LISTE DES DIRECTEURS DE THÈSE EN VUE DU DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

ALVAREZ-RUEDA Nidia	MCU de Parasitologie
ANDRE Guillaume	Docteur en Pharmacie (nutrition appliquée)
ANDRE-GARNIER Elisabeth	PH – Service Virologie CHU
AVET-LOISEAU Hervé	PU-PH d'Hématologie (Médecine)
AUDRAIN Marie PH -	Laboratoire d'Immunologie Biologique (Hôtel-Dieu)
BACH-NGOHOU Kalyane	MCU-PH de Biochimie (Médecine)
BALCON Catherine	PH CHRU de Brest
BALLEREAU Françoise	PU-PH de Santé Publique-Pharmacie Clinique
BARD Jean-Marie	PU de Biochimie Générale et Clinique
BARRIER Jacques	PU-PH de Médecine Interne (Médecine)
BARRIÈRE Paul	PU-PH de Biologie du Développement (Médecine)
BAZIN Marc-Antoine	MCU de Chimie Thérapeutique
BERRUT Gilles	PU Chef de service de Médecine Aïgue Gériatrique
BEZIAU Stéphanie	PU-PH Génétique Médicale (Hôtel Dieu)
BIARD Jean-François	PU de Pharmacognosie
BIGOT-CORBEL Édith (H.D.R.)	MCU-PH de Biochimie
BILLON-CHABAUD Aurélie	MCU de Pharmacie Galénique
BIRKLÉ Stéphane (prép)	MCU d'Immunologie
BLANCHARD Frédéric	CR INSERM ERI7
BOBIN-DUBIGEON Christine	MCU de Pharmacologie
BOURGEOIS Mickaël	AHU - Service de Biophysique
BOURIN Michel	PU-PH de Pharmacologie (Médecine)
BRACHET Philippe	DR INSERM U437
CADEAU Emmanuel	MCU de Droit et Sciences Politiques
CAILLON Jocelyne (H.D.R.)	MCU-PH de Bactériologie (Médecine)
CAMPONE Mario	Oncologue Médical C.R.L.C.C.
CANTAROVICH Diego	PH - Néphrologie et Immunologie Clinique (Médecine)
CARBONNELLE Delphine	MCU de Physiologie
CAROFF Nathalie (H.D.R.)	PU de Bactériologie
CHIFFOLEAU Anne	PH - Unité Fonctionnelle de Pharmacovigilance (Hôtel-Dieu)
CLERFEUILLE Fabrice	MCU en Sciences de Gestion (I.A.E.)
COIFFARD Laurence	PU de Cosmétologie
COLLIN Gaëtane (prép)	MCU de Chimie Générale et Minérale
COSTE-BUREL Marianne	PH - Laboratoire de Bactériologie
CORVEC Stéphane (H.D.R.)	MCU-PH de Bactériologie (Médecine)
COUTEAU Céline (H.D.R.)	MCU de Cosmétologie
COUZINET-MOSSION Aurélie	MCU de Chimie Générale et Minérale
DABOUIIS Gérard	PU-PH de Pneumologie (Médecine)
DAILLY Éric (H.D.R.)	MCU-PH de Pharmacologie (Médecine)
DAMIER Philippe	PU-PH de Neurologie (Médecine)
DAVODEAU François (H.D.R.)	DR INSERM 601
DEHAUT Frédéric (H.D.R.)	PAST - Établissement Français du Sang
DEJOIE Thomas	PH Contractuel - Laboratoire de Biochimie (Hôtel-Dieu)
DENIS/DELPierre Nathalie	PH - Soins palliatifs et de Soins de support (Médecine)
DERKINDEREN Pascal	PU-PH de Neurologie (Médecine)
DESLANDES Guillaume	PH Laboratoire Pharmacologie et de Toxicologie
DESPINS Philippe	PU-PH de Cardiologie (Médecine)
DRENO Brigitte	PU-PH de Dermatologie (Médecine)
DUFLOS Muriel	PU de Chimie Organique
EVEILLARD Marion	PU-PH Hématologie
FAIVRE-CHAUVET Alain	PU-PH de Biophysique
FELDMAN David	PH Pharmacien
FERRÉ Virginie	PU-PH de Bactériologie Virologie
GANIÈRE-MONTEIL Catherine	PH Laboratoire de Pharmacologie - Toxicologie

GAUTIER Hélène	MCU de Pharmacie Galénique
GERMAUD Patrick	PH en Pneumologie (Médecine)
GIBAUD/PAPIN Sophie	PH - Laboratoire de Bactériologie
GOUGEON Anne	PU-PH Bactériologie et Virologie (Université Rennes)
GRAS- LE GUEN Christèle	Pr Sservice de réanimation Pédiatrique et Néonatalogie
GRIMANDI Gaël	PU-PH - Centrale Arsenal et Centrale Médicaments (Hôpital Saint-Jacques)
GROVEL Olivier	MCU de Pharmacognosie
GUITTENY Marie	PH Unité de psychiatrie de liaison Service d'addictologie et psychiatrie de liaison
HARDOUIN Jean-Benoît	MCU de Biophysique
HERMOUET Sylvie (H.D.R.)	MCU-PH d'Hématologie (Médecine)
HERRENKNECHT Christine	PU de Chimie Analytique
HEYMANN Dominique (H.D.R.)	PU-PH de Biologie Cellulaire (Médecine)
IMBERT-MARCILLE Berthe-Marie	PU-PH de Virologie
JACQUOT Catherine	MCU de Physiologie
JEAN Miguel	MCU-PH de Biologie du Développement (Médecine)
JOLLIET Pascale	PU-PH de Pharmacologie (Médecine)
KREMPF Michel	PU-PH d'Endocrinologie (Médecine)
LAINE-CESSAC Pascale	PH Pharmacovigilance
LANG François	PU de Pharmacologie
LATOUR Patrick	PH - Laboratoire des Explorations Fonctionnelles (Hôpital Laënnec)
LE CARRER Didier	PH - Laboratoire de Biochimie Spécialisée
LE MAREC Hervé	PU-PH de Cardiologie (Médecine)
LE NÉEL Tanguy	MCU de Pharmacie Galénique
LE PAPE Patrice	PU de Parasitologie et Mycologie Médicale
LEPELLETIER Aline	PH Pharmacien (Hôpital Saint-Jacques)
LEPELLETIER Didier	PU-PH Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Sérologie-Hygiène Hosp.
LOGÉ Cédric	MCU de Chimie Thérapeutique
LOPES Patrice	PU-PH de Gynécologie (Médecine)
LUSTENBERGER Patrick	PU-PH de Biochimie (Médecine)
MALINGE Myriam	PH - Pharmacologue (Anesthésie-Réanimation chirurgicale)
MARCHAND Pascal (H.D.R.)	PU de Chimie Thérapeutique
MARJOLET Michel	PU-PH de Parasitologie (Médecine)
MASSON Damien	MCU-PH de Biochimie Spécialisée (Médecine)
MATHE Jean-François	PU-PH de Rééducation Fonctionnelle (Médecine)
MAULAZ Brigitte	PH Pharmacien (Hôpital Saint-Jacques)
MEURETTE Aurélie	PH Service Transplantation Rénale (CHU Nantes)
MIEGEVILLE Michel (H.D.R.)	MCU-PH de Parasitologie (Médecine)
MIRALLIE-NUSSBAUMER Sophie	PH - Laboratoire de Biologie du Développement et de la Reproduction (PME)
MORIO Florent	MCU - Laboratoire de Parasitologie-Mycologie (Médecine)
MOUGIN-DEGRAEF Marie	MCU de Biophysique
NAVAS-HOUSSAIS Dominique	MAST-PH de Santé Publique-Pharmacie Clinique
NAZIH Françoise	MCU de Biochimie
NAZIH El-Hassane (H.D.R.)	MCU de Biochimie
NIZARD Julien	PH - Centre d'Évaluation et de Traitement de la Douleur (Hôpital Laënnec)
OLIVIER Christophe	MCU de Toxicologie
ORSONNEAU Jean-Luc	PH - Biochimie Générale
OULD-AOUDIA Vincent	PH - Pôle de Soins Gériatriques (Hôpital Saint-Jacques)
OURLIAC-GARNIER Isabelle	MCU de Chimie Analytique
PAGNIEZ Fabrice	MCU de Parasitologie
PATRICE Thierry	PU-PH de Physiologie
PERROCHEAU Geneviève	Praticien des CLCC
PERROUIN-VERBE Brigitte	PH - Rééducation Fonctionnelle Polyvalente
PETIT Karina	MCU de Pharmacognosie
PIESSARD Sylvie	PU de Chimie Thérapeutique
PINEAU Alain	PU-PH de Toxicologie
PLANCHON Bernard	PU-PH de Médecine Interne (Médecine)
POIRIER Laurence	MCU de Chimie Analytique
PONGE Thierry	PH Médecine Interne (Médecine)
POTEL Gilles	PU-PH de Thérapeutique (Médecine)
POTIRON-JOSSE Michèle	MCU-PH de Physiologie (Médecine)
POUCHUS Yves-François	PU de Cryptogamie et Botanique
RAFFI François	PU-PH de Maladies Infectieuses et Maladies Tropicales (Médecine)
RAINGEARD Erwin	PH CHD La Roche sur Yon
REYNAUD Alain	PU-PH de Bactériologie
ROBERT Jean-Michel	PU de Chimie Thérapeutique
ROCHARD Sophie	PH (responsable de la pharmacie du Centre René GAUDUCHEAU)

RODAT Olivier	PU-PH de Médecine légale (Médecine)
ROLLI-DERKINDEREN Malvyne	CR INSERM U915
ROUSSAKIS Christos	Professeur de Biologie Cellulaire et de Génétique Moléculaire
ROUSSEAU Pascale	MAST - Service de Pharmacologie et Pharmacocinétique
RUELLAN Anne-Lise	PH Pharmacologie Clinique
RUIZ Nicolas	MCU de Mycologie et Mycochimie
SALLENAVE-NAMONT Claire	MCU de Botanique
SÉBILLE-RIVAIN Véronique (H.D.R.)	PU-PH de Biomathématiques
SELLAL Olivier	PH Arsenal - Centrale de Médicaments
SOULILLOU Jean-Paul	PU-PH d'Immunologie (Médecine)
STALDER Jean-François	PU-PH de Dermatologie (Médecine)
THOMARÉ Patrick	MAST-PH - Unité Fonctionnelle de Pharmacie Clinique Oncologique (Hôtel-Dieu)
TROCHU Jean-Noël	PU-PH de Cardiologie (Médecine)
TROSSAËRT Marc	PH - Laboratoire d'Hématologie (Hôtel-Dieu)
VANELLE Jean-Marie	PU-PH de Psychiatrie (Médecine)
VERGNOUX Aurore	MCU de Chimie Analytique
VERRON Elise	MCU de Toxicologie
VEYRAC Aude	MAST – Formation Pharmaceutique Continue
VEYRAC Gwénaëlle	PH - Unité Fonctionnelle de Pharmacovigilance (Hôtel-Dieu)
VICTORRI-VIGNEAU Caroline	MCU-PH – Pharmacologie Clinique (Médecine)

Conservateur de la Bibliothèque Universitaire : Mme GROGNET

Par délibération du Conseil, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

*PU Professeur des Universités PH Praticien Hospitalier PAST Professeur Associé à mi-temps  
MCU Maître de Conférences des Universités DR Directeur de Recherche MAST Maître de Conférences Associé à mi-temps  
HDR Habilité à Diriger des Recherches CR Chargé de Recherche AHU Assistant Hospitalo-Universitaire*

# Table des matières

Liste des enseignants .....	2
Remerciements .....	5
Table des matières .....	6
Table des tableaux.....	10
Table des illustrations .....	12
Liste des abréviations.....	14
<b>Introduction</b> .....	15
<b>Revue de la littérature</b> .....	17
1. Les infections ostéo-articulaires.....	17
1.1. L'articulation.....	17
1.2. Les arthropathies.....	18
1.2.1. Etiologie .....	18
1.2.2. Clinique .....	19
1.2.3. Stratégie diagnostique.....	20
1.3. Différentes infections ostéo-articulaires.....	21
1.3.1. Epidémiologie .....	22
1.3.2. Physiopathologie .....	25
1.3.3. Micro-organismes en cause.....	30
1.3.4. Diagnostic .....	33
1.3.4.1. Clinique.....	33
1.3.4.2. Biologie .....	36
1.3.4.3. Imagerie.....	37
1.3.4.4. Anatomopathologie.....	38
1.3.5. Traitement .....	38
2. Techniques d'études en Bactériologie pour le diagnostic des IOA.....	43
2.1. Prélèvements ostéo-articulaires .....	43
2.2. Examen bactériologique standard .....	44
2.2.1. Préparation du prélèvement .....	44
2.2.2. Examen direct .....	45
2.2.3. Mise en culture .....	48
2.2.4. Antibiogramme .....	49
2.2.5. Interprétation des résultats.....	49
2.2.6. Identification.....	51
2.3. Biologie moléculaire .....	53
2.3.1. Principe de la PCR .....	53
2.3.2. Applications en Bactériologie .....	55
2.3.2.1. PCR universelle dite à large spectre .....	55
2.3.2.2. PCR spécifique .....	57

2.3.2.3. Autres .....	57
3. Spectrométrie de masse .....	58
3.1. Généralités sur la spectrométrie de masse.....	58
3.1.1. Introduction .....	58
3.1.1.1. Définition .....	58
3.1.1.2. Unités.....	59
3.1.2. Appareillage.....	59
3.1.2.1. Source .....	60
3.1.2.2. Les ions .....	60
3.1.2.3. Analyseur de masse.....	62
3.1.2.4. Détection des échantillons .....	63
3.1.3. Le spectre de masse .....	63
3.1.4. Couplage à d'autres techniques analytiques.....	64
3.2. Spectrométrie de masse MALDI-TOF .....	65
3.2.1. Généralités.....	65
3.2.2. Principe .....	66
3.2.2.1. Protéines étudiées.....	66
3.2.2.2. Echantillonnage .....	67
3.2.2.3. Analyse.....	67
3.2.2.4. Interprétation des résultats .....	69
3.2.3. Robustesse.....	71
3.2.3.1. Matrice .....	71
3.2.3.2. Solvant .....	72
3.2.3.3. Dépôt de l'échantillon .....	73
3.2.3.4. Extraction.....	74
3.2.3.5. Laser.....	75
3.2.3.6. Conditions de culture .....	75
3.2.4. Autres applications .....	76
3.2.4.1. En Bactériologie.....	76
3.2.4.2. Hors Bactériologie .....	76
3.2.5. Systèmes présents sur le marché .....	77
3.2.6. Apport par rapport aux techniques d'identification usuelles .....	78
3.2.6.1. Performances .....	79
3.2.6.2. Limites.....	79
<b>Objectifs de l'étude .....</b>	<b>81</b>
<b>Matériel et méthodes.....</b>	<b>83</b>
1. Description de la population étudiée.....	83
1.1. Critères de participation à l'étude .....	83
1.2. Recueil des données médicales.....	84
2. Techniques .....	85
2.1. Schéma de l'étude .....	85

2.2.	Examen bactériologique standard des prélèvements ostéo-articulaires .....	86
2.3.	Spectrométrie de masse .....	90
2.3.1.	Extraction.....	90
2.3.2.	Analyse au spectromètre de masse.....	92
2.4.	Biologie moléculaire : PCR ARN 16S et séquençage .....	94
3.	Critères de jugement.....	98
3.1.	Critères d'infection.....	98
3.1.1.	Critères cliniques .....	98
3.1.2.	Critères bactériologiques.....	98
3.1.3.	Classification .....	101
3.1.4.	R.C.P.....	102
3.2.	Critères d'identification bactérienne par spectrométrie de masse.....	102
3.3.	Critère de biologie moléculaire par PCR ARN 16S.....	103
4.	Analyse des résultats.....	104
4.1.	Termes à comparer .....	104
4.2.	Exploitation statistique .....	105
<b>Résultats</b>	.....	106
1.	Caractéristiques de la population étudiée .....	106
1.1.	Echantillonnage .....	106
1.2.	Diagnostic .....	107
1.3.	Epidémiologie.....	108
1.4.	Nombre d'articulations atteintes .....	109
1.5.	Type d'articulations atteintes .....	110
1.6.	Facteurs de risque d'IOA .....	111
1.7.	Espèces bactériennes isolées .....	112
2.	Evaluation de la spectrométrie de masse après extraction directe sur le prélèvement : résultats des différentes techniques.....	113
2.1.	Culture .....	113
2.2.	Examen direct sur le prélèvement .....	114
2.3.	Biologie moléculaire PCR ARN 16S sur le prélèvement .....	115
2.4.	Spectrométrie de masse sur le prélèvement .....	116
2.5.	Comparaison des différentes techniques .....	117
3.	Evaluation de la spectrométrie de masse après extraction sur les flacons.....	117
3.1.	Echantillonnage .....	117
3.2.	Spectrométrie de masse après extractions des flacons.....	118
3.3.	Identification .....	119
3.3.1.	Selon le milieu de culture .....	120
3.3.2.	Selon le type de bactérie .....	121
3.4.	Flacons polymicrobiens .....	122
3.5.	Délai de croissance.....	124

<b>Discussion</b> .....	126
<b>Conclusion</b> .....	138
Annexes .....	140
Références bibliographiques.....	148
Serment de Galien.....	164

## Table des tableaux

Tableau I : Comparaison entre les différents constituants du plasma sanguin et du liquide synovial .....	18
Tableau II : Caractéristiques des douleurs articulaires inflammatoires et mécaniques .....	19
Tableau III : Facteurs favorisant dans l'arthrite septique .....	23
Tableau IV : Incidence annuelle des infections sur prothèse en fonction du score NNIS .....	24
Tableau V : Classification de Gustilo .....	25
Tableau VI : Principales espèces bactériennes rencontrées lors d'une arthrite septique.....	31
Tableau VII : Espèces bactériennes mises en cause dans les IOA hors arthrite septique.....	33
Tableau VIII : Perturbation des différents paramètres biologiques et leur probabilité d'apparition dans l'arthrite septique bactérienne.....	37
Tableau IX : Diffusion osseuse des antibiotiques .....	39
Tableau X : Différentes caractéristiques d'un liquide synovial .....	47
Tableau XI : Caractéristiques des infections aiguës et chroniques .....	50
Tableau XII : Signification des indices de confiance .....	70
Tableau XIII : Tableau de correspondance des scores .....	71
Tableau XIV : Caractéristiques des différentes matrices utilisées en SM MALDI-TOF.....	72
Tableau XV : Correspondance du nombre d'éléments par champ microscopique .....	86
Tableau XVI : Paramètres de mise en culture .....	89
Tableau XVII : Cycles de la PCR ARN 16S .....	97
Tableau XVIII : Classement des patients en infection sur prothèse certaine, probable ou exclue en fonction de la présence ou non des critères bactériologique et clinique .....	101
Tableau XIX : Classement des patients en arthrite septique certaine, probable ou exclue en fonction de la présence ou non des critères bactériologique et clinique.....	101
Tableau XX : Recueil des données pour le calcul de Se, Sp, Vpp, Vpn .....	105
Tableau XXI : Données épidémiologiques relatives aux patients atteints d'IOA ou non.....	108
Tableau XXII : Espèces bactériennes isolées chez les patients atteints d'IOA .....	112
Tableau XXIII : Résultats des cultures.....	113
Tableau XXIV: Résultats de l'examen direct.....	114
Tableau XXV : Résultats de la PCR ARN 16S suivie d'un séquençage sur les prélèvements..	115
Tableau XXVI : Résultats de la spectrométrie de masse sur les prélèvements .....	116
Tableau XXVII : Détails des résultats de spectrométrie de masse obtenus parmi les prélèvements ayant un critère d'identification non acceptable .....	116
Tableau XXVIII : Evaluation des différentes techniques (Se, Sp, Vpp, Vpn, AUC) .....	117
Tableau XXIX : Résultat de la subculture des flacons aérobies et anaérobies.....	117
Tableau XXX : Résultat de l'identification en spectrométrie de masse après extraction des flacons aérobies, anaérobies ou des colonies bactériennes directement sur milieu gélosé	120
Tableau XXXI : Résultat de l'identification en spectrométrie de masse après extraction sur les flacons, en fonction du type de bactérie isolée .....	121

Tableau XXXII: Détail des identifications incorrectes obtenues en spectrométrie de masse après extraction des flacons.....	122
Tableau XXXIII : Nature des bactéries isolées dans les flacons polymicrobiens donnant un résultat d'identification positif polymicrobien en spectrométrie de masse après extraction .....	123
Tableau XXXIV : Différence entre le délai de croissance sur le milieu gélosé et le flacon Bactec positifs en premier dans un prélèvement donné.....	124

## Table des illustrations

Figure 1 : Représentation schématique d'une articulation .....	17
Figure 2 : Orientation diagnostique devant un épanchement articulaire .....	20
Figure 3 : Cycle de vie d'un biofilm .....	28
Figure 4 : Coloration de Gram : cocci à Gram positif et bacilles à Gram négatif.....	46
Figure 5 : Cristaux de pyrophosphate de calcium et d'acide urique.....	47
Figure 6 : Représentation schématique d'une PCR.....	54
Figure 7 : Représentation schématique d'un spectromètre de masse .....	60
Figure 8 : Détermination de la Résolution .....	63
Figure 9 : Spectre de masse en barres obtenu avec une source d'ionisation dure .....	64
Figure 10 : Spectre de masse en barres obtenu avec une source d'ionisation douce.....	64
Figure 11 : Séquence d'identification par spectrométrie de masse type MALDI-TOF à partir d'une colonie bactérienne.....	66
Figure 12: Principe de fonctionnement d'un MALDI-TOF.....	67
Figure 13 : Spectre de masse d'un <i>Escherichia coli</i> .....	69
Figure 14 : Cible pour le dépôt des échantillons MALDI-TOF .....	73
Figure 15: Automates VITEK MS et Microflex Biotyper .....	77
Figure 16: Différentes étapes du traitement d'un prélèvement ostéo-articulaire lors de l'étude « Spectro-LA ».....	85
Figure 17 : Etape de broyage : versement du tube contenant l'eau stérile et les billes dans l'échantillon .....	87
Figure 18 : Etape de broyage : mise en place de l'échantillon dans le broyeur .....	87
Figure 19 : Automate Bactec® 9240.....	88
Figure 20 : Ensemencement des milieux de culture : géloses et flacons Bactec.....	89
Figure 21 : Kit d'extraction MALDI Sepsityer® (Bruker®) .....	91
Figure 22 : Bacterial Test Standard (Bruker®) .....	92
Figure 23 : Matrice HCCA (Bruker®) .....	93
Figure 24: Etapes de réalisation de la PCR ARN 16S et du séquençage.....	94
Figure 25 : PCR BGH : séquence nucléotidique des amorces et de la sonde utilisés .....	95
Figure 26 : Séquence nucléotidique du gène de la beta-globine humaine .....	95
Figure 27 : Cycles de la PCR BGH.....	96
Figure 28 : PCR ARN 16S : séquence nucléotidique des amorces.....	96
Figure 29 : Disposition des amorces sur le gène <i>rrs</i> d' <i>Escherichia coli</i> .....	96
Figure 30: Détail des patients, des prélèvements et des flacons inclus ou non dans l'étude	106
Figure 31 : Diagnostic porté chez les patients atteints d'IOA .....	107
Figure 32: Diagnostic porté chez les patients non atteints d'IOA.....	108
Figure 33: Nombre d'articulations cliniquement symptomatiques.....	109
Figure 34: Localisation de l'articulation cliniquement symptomatique (IOA).....	110
Figure 35: Localisation de l'articulation cliniquement symptomatique (absence d'IOA).....	110

Figure 36: Différents facteurs de risque retrouvés .....	111
Figure 37 : Répartition du nombre d'espèces isolées .....	114
Figure 38 : Résultats de la spectrométrie de masse après extraction des flacons .....	118

## Liste des abréviations

<b>IOA (C)</b>	Infection Ostéo-Articulaire (Complexe)
<b>POA</b>	Prélèvement Ostéo-Articulaire
<b>SM</b>	Spectrométrie de Masse
<b>MALDI-TOF</b>	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight
<b>CRIOGO</b>	Centre de Référence des Infections Ostéo-articulaires du Grand Ouest
<b>RCP</b>	Réunion de Concertation Pluri-disciplinaire
<b>AS</b>	Arthrite Septique
<b>PAR</b>	Polyarthrite Rhumatoïde
<b>CRP</b>	Protéine C Réactive
<b>IRM</b>	Imagerie par Résonance Magnétique
<b>TDM</b>	Tomodensitométrie
<b>RAISIN</b>	Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections nosocomiales
<b>NNISS</b>	National Nosocomial Infection Surveillance Score
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>ADN</b>	Acide Désoxyribonucléique
<b>ARN</b>	Acide Ribonucléique
<b>Pb</b>	Paire de bases
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>BLAST</b>	Basic Local Alignment Search Tool
<b>BIBI</b>	Bioinformatics Bacterial Identification
<b>ESI</b>	Electrospray Ionization
<b>HCCA</b>	Acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique
<b>SPILF</b>	Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française
<b>IDSA</b>	Infectious Disease Society of America
<b>PCHIR</b>	Prélèvement Chirurgical
<b>LAR</b>	Liquide Articulaire
<b>ROC</b>	Receiver Operating Characteristic
<b>AUC</b>	Area Under Curve
<b>IC</b>	Intervalle de Confiance
<b>VPP</b>	Valeur Prédicative Positive
<b>VPN</b>	Valeur Prédicative Négative

## Introduction

« On a souvent dit qu'un être humain a l'âge, non de son acte de naissance, mais de ses artères, de ses articulations. » écrivait André Maurois alias Emile Herzog (1885-1967), biographe littéraire, dans son livre « Un Art de vivre » (1939). Si l'on relève aujourd'hui en France entre 2000 et 2500 cas d'infections ostéo-articulaires, celles-ci sont considérées comme un problème majeur de Santé Publique par le Ministère de la Santé (1). En effet, leur morbi-mortalité et leur importante tendance à la chronicité engendre un retentissement social conséquent, puisque près de la moitié des personnes qui en souffrent subissent une incapacité de travail de 2 ans en moyenne.

Ces infections, difficiles à traiter en raison de leur localisation et des pathogènes mis en cause, font l'objet de Réunions de Concertation Pluridisciplinaires (RCP) au sein des 10 Centres de Référence régionaux mis en place en France en 2008. Le Centre Hospitalo-Universitaire de Rennes est inscrit dans cette démarche de par son appartenance au Centre de Référence des Infections Ostéo-articulaires du Grand Ouest (CRIOGO).

Le travail du laboratoire de Bactériologie occupe une place centrale dans le diagnostic des infections ostéo-articulaires, par la détermination des espèces bactériennes en cause et de leur sensibilité aux antibiotiques. Parmi les techniques utilisées, la spectrométrie de masse (SM) de type MALDI-TOF (« Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight ») est une méthode d'identification bactérienne rapide, simple d'utilisation et performante en comparaison des méthodes phénotypiques traditionnellement utilisées en microbiologie clinique. Elle permet d'identifier en quelques minutes et à moindre coût des colonies de bactéries, levures ou encore dermatophytes. Dernièrement, cette technologie a été employée directement sur des flacons d'hémoculture et sur des échantillons urinaires dans le but de réduire encore les délais d'identification bactérienne.

Dans le cadre des infections ostéo-articulaires (IOA), en particulier les infections chroniques, les bactéries impliquées peuvent avoir une croissance longue ou difficile sur les milieux gélosés usuels et les repiquages successifs, souvent nécessaires, retardent l'identification bactériologique.

L'objectif de l'étude « Spectro-LA » est de déterminer l'intérêt de la spectrométrie de masse dans le diagnostic des infections ostéo-articulaires, afin de proposer une identification bactérienne dans les plus brefs délais pour permettre d'adapter au mieux la thérapeutique. Pour cela, des patients ont été inclus dans l'étude de façon prospective sur une durée de 10 mois, de janvier à octobre 2013, au CHU de Rennes. Des échantillons de leurs prélèvements ostéo-articulaires ont ensuite été analysés au laboratoire de Bactériologie et Hygiène Hospitalière.

L'étude se découpe en 2 axes : l'analyse de la faisabilité de l'identification bactérienne par spectrométrie de masse après extraction directement sur le prélèvement ostéo-articulaire et à partir des cultures de ces mêmes prélèvements dans des flacons à hémocultures. La performance de l'identification par MALDI-TOF est ensuite comparée à celle des méthodes usuellement employées. D'une part, la sensibilité et spécificité de l'identification par SM sur le prélèvement sont comparées à celles de la PCR ARN 16S sur le prélèvement, de l'examen direct et des cultures bactériennes. D'autre part, la proportion d'identifications correctes en SM sur le flacon d'enrichissement contenant un échantillon ostéo-articulaire est comparée à celle obtenue par la spectrométrie de masse sur des colonies bactériennes et à celle retrouvée dans les travaux sur flacons d'hémoculture.

La première partie de ce mémoire est une revue de la littérature qui décrit les différents types d'infections ostéo-articulaires et les techniques utilisées pour le diagnostic en Bactériologie Médicale, dont la PCR ARN 16S et la spectrométrie de masse type MALDI-TOF. La seconde partie présentera l'étude « Spectro-LA » : la méthodologie et le matériel employés, ainsi que les principaux résultats qui seront discutés en lien avec les données de la littérature.

# Revue de la littérature

## 1. Les infections ostéo-articulaires

### 1.1. L'articulation

Une articulation est formée par les extrémités d'au moins deux os, fixées entre elles par les ligaments et la capsule articulaire. Les extrémités osseuses en contact sont recouvertes d'une couche de cartilage qui permet un mouvement dénué de douleur ou de résistance. Si celui-ci est endommagé, les articulations deviennent algiques et perdent leur mobilité. Chaque articulation est entourée d'une capsule dense de tissu fibreux, constituée dans sa partie externe de ligaments qui maintiennent les os entre eux et recouverte dans sa partie interne par la membrane synoviale constituée de synoviocytes. Celle-ci sécrète le liquide synovial dont le rôle principal est de réduire le frottement et l'usure de l'articulation ; on parle d'épanchement de synovie lorsque qu'il est présent en quantité excessive.

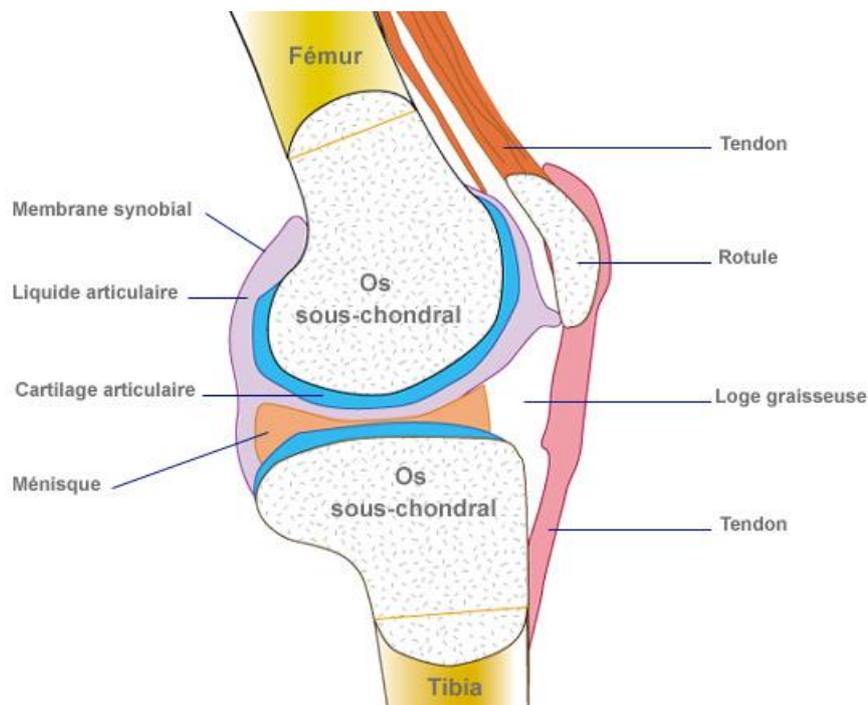


Figure 1 : Représentation schématique d'une articulation (exemple du genou) (Source : Société Française de Rhumatologie (2))

Le liquide synovial est un dialysat du plasma sanguin enrichi en protéines variées. Il possède des propriétés viscoélastiques propres, liées à la présence d'acide hyaluronique polymérisé associé sans liaisons covalentes à des immunoglobulines.

<i>Constituants du LS</i>	<i>Composition par rapport au plasma sanguin</i>
Ions minéraux	Même composition
Glucose	2/3 du taux plasmatique
Protéines	25 g/L, de même composition mais en concentration inférieure : - Moins d'albumine - Majoritairement des immunoglobulines, enzymes (phosphatases, aldolase, amino-transférases, inhibiteurs de métallo protéinases), mucopolysaccharides et grosses protéines (fibrinogène, $\alpha$ 2-macroglobuline, collagène) - Acide hyaluronique : 3 g/L (<1 mg/L dans le plasma)

Tableau I : Comparaison entre les différents constituants du plasma sanguin et du liquide synovial (LS) (3)

## 1.2. Les arthropathies

Les arthralgies sont un motif fréquent de consultation en médecine générale. Elles peuvent être d'origine extrêmement variée et révéler une arthropathie sous-jacente. En ce qui concerne les étiologies infectieuses, l'arthrite septique est une urgence diagnostique et thérapeutique car elle met en jeu le pronostic fonctionnel et vital du patient.

### 1.2.1. Etiologie

On différencie les arthropathies inflammatoires, dites arthrites, des arthropathies dites mécaniques, l'arthralgie désignant quant à elle la plainte douloureuse du patient. Comme de nombreuses affections peuvent se révéler par des signes articulaires, une arthropathie peut avoir diverses origines :

- Infectieuse (arthrite septique bactérienne, virale, parasitaire, mycosique) ou post-infectieuse (rhumatisme post-streptococcique)
- Microcristalline (goutte, chondrocalcinose, rhumatisme à cristaux d'hydroxyapatite, cholestérol...)
- Rhumatismale inflammatoire (Polyarthrite Rhumatoïde (PAR), spondylarthropathie, maladies auto-immunes telles que le lupus, la sclérodermie ou le syndrome de Gougerot-Sjörger, certaines connectivites et vascularites, la sarcoïdose...)
- Mécanique (arthrose, chondropathie...)

- Métabolique (hémochromatose)
- Etiologies rares : rhumatisme paranéoplasique (cancer solide, syndrome lymphoprolifératif), iatrogène...

### 1.2.2. Clinique

Les principaux signes d'arthropathie consistent en une douleur localisée, une limitation de la mobilité de l'articulation, un épanchement possiblement accompagné par une rougeur et une chaleur cutanée, voire une déformation ostéo-articulaire. L'épanchement, qui traduit une souffrance intra-articulaire, n'est jamais visible dans une articulation saine. Il s'agit d'un gonflement liquidien de la cavité articulaire, lié à différents phénomènes agressant la membrane synoviale, qui peut être associé à un épaississement de celle-ci voire à des signes inflammatoires locaux, ce qui permet de distinguer des épanchements dits « chauds » d'épanchements dits « froids ».

La douleur est le symptôme le plus fréquent et sa caractérisation est importante pour le diagnostic :

- Délai d'apparition
- Intensité : douleur intense (arthrite inflammatoire septique ou microcristalline), intermittente ou faible (atteintes mécaniques et/ou chroniques)
- Topographie de l'atteinte, caractère fixe ou migrateur
- Nature : inflammatoire, mécanique ou mixte

<i><b>Douleur</b></i>	<i><b>Mécanique</b></i>	<i><b>Inflammatoire</b></i>
Lors de l'activité	Recrudescence en fonction de l'intensité	Amélioration partielle
Au repos	Amélioration complète ou partielle	Recrudescence en fin de nuit
Enraidissement matinal	Absent	Présent (>15 minutes)

Tableau II : Caractéristiques des douleurs articulaires inflammatoires et mécaniques

Selon le nombre d'articulations touchées par l'inflammation, on distingue :

- Monoarthrite (1 articulation)
- Oligoarthrite (2 à 3 articulations)
- Polyarthrite (≥ 4 articulations)

Devant un ou plusieurs de ces signes, l'interrogatoire clinique recherche les antécédents personnels et familiaux (dans le cadre de formes héréditaires de goutte, de spondylarthrite...), les caractères individuels tels que l'âge, le sexe et la profession (qui conditionnent la prise en charge), les circonstances déclenchantes (traumatisme, geste local tel qu'une infiltration, infection récente, vaccin, traitement, voyage récent) et les signes associés généraux ou extra-articulaires (hyperthermie, signes cutanés, digestifs, cardiaques, pulmonaires, uro-génitaux, oculaires ou bien neurologiques) qui peuvent guider vers certaines étiologies.

### 1.2.3. Stratégie diagnostique

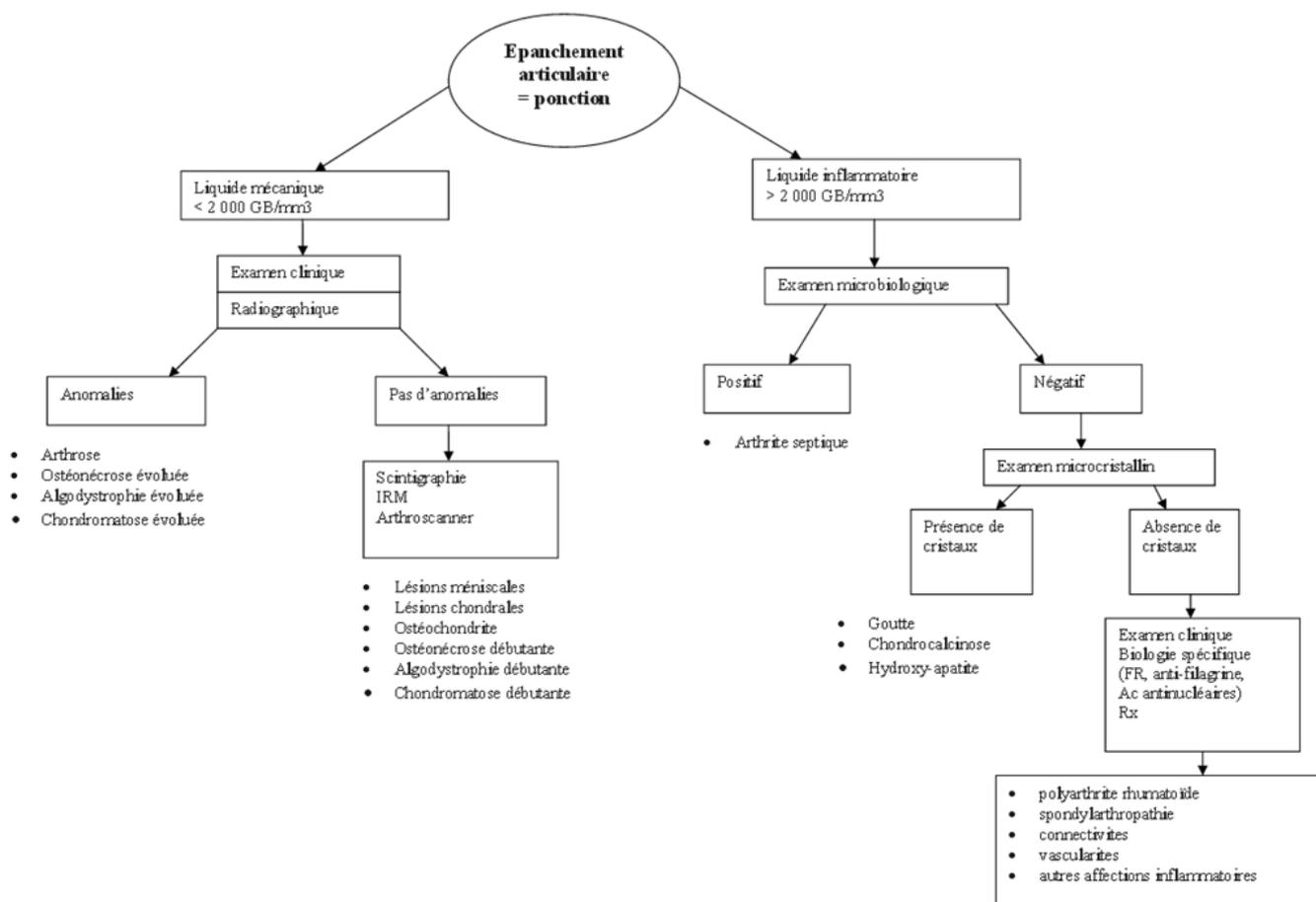


Figure 2 : Orientation diagnostique devant un épanchement artulaire (extrait de (4))

### 1.3. Différentes infections ostéo-articulaires

Le terme d'infection ostéo-articulaire désigne plusieurs pathologies :

- Arthrite septique
- Infection sur matériel ostéo-articulaire (prothèse...)
- Infection sur pied diabétique
- Ostéite et ostéomyélite infectieuse
- Spondylodiscite infectieuse...

Une infection ostéo-articulaire est considérée comme complexe (IOAC) à partir du moment où elle génère des difficultés de prise en charge (1):

- Chirurgicales : infection sur prothèse ostéo-articulaire, certaines infections sur matériel d'ostéosynthèse ou liées à un traumatisme ouvert

et/ou

- Médicales : présence de micro-organismes résistants aux antibiotiques, infection chez un patient à risque (immunodéprimé, diabétique...)

Les IOAC nécessitent des traitements longs et coûteux et sont responsables de lourdes séquelles. Leur prise en charge peut donc faire appel à plusieurs disciplines : chirurgie (orthopédique et plastique), rhumatologie, infectiologie, bactériologie, radiologie et autres spécialités d'imagerie médicale, anesthésie et rééducation fonctionnelle.

De nombreuses classifications des infections sur matériel existent en fonction de leur étiologie, leur localisation, leur durée d'évolution et du terrain du patient. La plus utilisée est celle de Tsukayama qui concerne les prothèses infectées de hanche et de genou (5) ou plus récemment celle de Mac Pherson (6). En l'absence de classification unique, la prise en charge thérapeutique dépend des données suivantes d'après les recommandations de 2008 de la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF) (7) :

- mode de contamination suspecté (direct, hématogène, par contiguïté)
- intervalle libre entre la pose de prothèse et l'apparition de symptômes, permettant de différencier l'infection postopératoire de l'infection hématogène
- état infectieux (connaissance des micro-organismes, gravité du retentissement de l'infection)

- état mécanique du foyer infecté (prothèse descellée ou non, fracture consolidée ou non, matériel explantable ou non)
- localisation de l'infection (os périphérique, articulation, rachis)
- état des parties molles et de la couverture cutanée
- statut du malade (fonctionnel et général, état immunitaire, terrain sous-jacent et contexte environnemental)

Les infections peuvent être distinguées en fonction de leur délai de survenue après la pose chirurgicale du matériel (classification de Coventry (1975) et Fitzgerald et al. (1977) (8)) :

- Infection précoce : < 1 mois
- Infection tardive : > 1 mois
- Infection hématogène : elle peut survenir après un intervalle de temps libre après la chirurgie
- La SPILF ajoute une catégorie intermédiaire : les infections retardées, entre 1 et 6 mois après la chirurgie.

En ce qui concerne les infections sur site opératoires, elles sont considérées comme des infections associées aux soins lorsqu'elles surviennent dans un délai de 30 jours après la chirurgie ou 1 an en cas de pose de matériel. Le terme matériel peut désigner du matériel d'ostéosynthèse interne (plaques, broches, vis, tiges...) ou externe (fixateurs externes), une prothèse ou encore des substituts osseux et allogreffes.

### *1.3.1. Epidémiologie*

- **Arthrite septique :**

L'arthrite septique désigne une arthrite infectieuse d'origine bactérienne, aussi appelée arthrite suppurative. C'est une pathologie peu fréquente ; son incidence à l'année est de 2 à 10 cas /100 000 personnes mais elle augmente chez certaines catégories de population : 28 à 38 cas /100 000 personnes/an chez les personnes atteintes de polyarthrite rhumatoïde (PAR) et 40 à 68 cas /100 000 personnes/an chez les porteurs de prothèse articulaire (9).

Il existe donc des facteurs favorisant sa survenue (10–12) :

<b>Comorbidités</b>	<b>Processus invasifs</b>	<b>Facteurs personnels</b>
- Pathologies articulaires telles que la PAR, la chondrocalcinose...	-Chirurgie, prothèse articulaire	-Sexe masculin (sauf après 80 ans)
- Immunodépression (VIH, traitements immunosuppresseurs, hypogammaglobulinémie)	-Traumatisme y compris injection intra articulaire (corticoïdes...)	-Age > 65 ans
-Diabète, insuffisance hépatique ou rénale, drépanocytose, pathologie maligne	-Cathéters centraux	-Alcoolisme
-Infections cutanées		-Toxicomanie intraveineuse
-Maladies sexuellement transmissibles (gonococcie...)		

Tableau III : Facteurs favorisant dans l'arthrite septique

La mortalité est proche de 0,7% en dessous de 60 ans et augmente avec l'âge : 4,8% de 60 à 79 ans et 9,5% au dessus de 80 ans (13). Certaines études mentionnent néanmoins jusque 11,5% à 30% de mortalité globale avec une morbidité allant de 31,6% à 50% (9,14).

- **Infection sur matériel :**

C'est un phénomène rare mais grave (3500 cas/an en France en 2008), dont le risque en postopératoire est variable en fonction de la localisation du matériel ostéo-articulaire : 0,9 à 1,6% pour les prothèses de hanche, 0,6% pour les prothèses de genou et 1% pour les autres prothèses articulaires, d'après les données du Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales (RAISIN) de 1995 à 2005 (15). En ce qui concerne le matériel non prothétique (matériel d'ostéosynthèse), ce risque varie de 0,5% à 3,7%.

Les facteurs de risque sont (16–18) :

- Ceux de toute infection postopératoire (hospitalisation > 4 jours...)
- Infectieux : antécédent d'infection du site opératoire ou bien de la prothèse, présence d'un foyer infectieux distal (digestif, urinaire, dentaire)
- Liés au patient : âge > 65 ans, dénutrition, obésité, tabagisme, insuffisance hépatique ou rénale, immunodépression (traitement, HIV...), diabète, pathologie inflammatoire systémique (PAR, Lupus Erythemateux Disséminé (LED)...) ...
- Liés à l'état de la plaie (6)

Il est possible de relier le risque de survenue d'une infection sur prothèse à l'index de risque chirurgical NNISS (National Nosocomial Infection Surveillance Score), calculé en fonction de

la durée d'intervention, de la classe de contamination de l'intervention d'Altemeier (chirurgie propre ou contaminée) et du score de risque anesthésique (score ASA) :

<i>Score NNIS</i>	<i>Incidence annuelle (%)</i>
0	0,7
1	1,4
2-3	2,3

Tableau IV : Incidence annuelle des infections sur prothèse en fonction du score NNIS (données du RAISIN, 1999-2005)

- **Infection de pied diabétique :**

Celle-ci concerne principalement les personnes atteintes de diabète insulino-dépendant, avec une fréquence d'amputation en conséquence de 5 à 10% (de l'orteil, du pied, de la jambe voire de la cuisse) (19). En effet, 15 à 25% des diabétiques souffrent de plaies chroniques ou de mal perforant plantaire qui s'infectent dans 40 à 80% des cas (20,21). Plusieurs facteurs favorisent la survenue d'une infection chez ces patients (22) :

- le mauvais contrôle glycémique
- la neuropathie périphérique sensitive (perte de sensibilité)
- l'artériopathie des membres inférieurs avec ischémie distale
- les facteurs mécaniques (zones d'hyperpression, chaussures traumatiques...)

- **Ostéomyélite infectieuse :**

Sa fréquence a diminué en France en raison de l'amélioration des conditions d'hygiène. Elle est plus fréquente chez l'enfant et l'adolescent ainsi que dans les pays en voie de développement, avec un risque accru en cas de drépanocytose homozygote (23).

- **Ostéite infectieuse :**

Elle est principalement d'origine postopératoire ou traumatique (tibia, fibula), avec un risque d'infection lié à la nature de l'opération (23) :

- 1 à 3% en cas de traumatisme fermé
- 1 à > 50% en cas de fracture ouverte, suivant l'importance des lésions vasculaires et des tissus mous, ainsi que le risque de contamination tellurique. Le risque d'infection

peut être évalué par le stade de gravité estimé via la classification de Gustilo fondée sur l'importance de l'ouverture cutanée lors d'une fracture ouverte (24,25) :

<i>Grade</i>	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III (A à C)</i>
Atteinte	Ouverture punctiforme de l'intérieur vers l'extérieur	Ouverture linéaire > 1 cm	Lésions associées à des fractures pluri fragmentaires et perte de substance osseuse
Décollement cutané	Absence	Absence	Etendues, délabrement cutané-musculaire, lésion vasculo-nerveuse
Lésion des parties molles	Absence ou petite	Absence ou petite	
Risque d'infection (%)	1 - 2	1 - 7	10 - >50

**Tableau V : Classification de Gustilo, évaluant le risque d'infection lors d'une fracture ouverte en fonction de la sévérité des lésions aux parties molles**

Les facteurs de risque liés au patient sont : le diabète, la dénutrition, l'âge avancé, la polyarthrite rhumatoïde... (9,23)

- **Spondylodiscite infectieuse :**

L'incidence de la spondylodiscite est de 1/250 000 cas / an, avec un risque de survenue en postopératoire de chirurgie rachidienne de moins de 1% (3% en cas de mise en place de matériel). Elle survient plus volontiers dans un contexte de diabète, d'immunodépression, d'éthylisme et chez l'homme de plus de 60 ans... L'atteinte touche majoritairement les vertèbres lombaires (50%), puis dorsales (40%) et cervicales (10%), et porte parfois sur plusieurs étages (20%) (23).

### *1.3.2. Physiopathologie*

L'infection est une invasion tissulaire avec prolifération de micro-organismes responsables de dommages, accompagnée ou non d'une réaction inflammatoire. A l'inverse, la colonisation est un phénomène physiologique lié au développement de flores commensales sur un site donné. Les IOA sont habituellement la conséquence d'une diffusion hématogène (arthrite, ostéomyélite, spondylodiscite) ou d'un geste chirurgical voire traumatique (ostéite, infection sur prothèse), et présentent une physiopathologie variée.

- **Arthrite septique :**

L'arthrite septique survient dans la majorité des cas après diffusion hématogène du micro-organisme qui vientensemencer la membrane synoviale vasculaire de l'articulation à partir d'un foyer primitif (cutané, ORL, respiratoire, urinaire...), mais il peut également être directement inoculé lors d'une injection intra-articulaire, d'une ponction-aspiration articulaire, d'une chirurgie ou d'un traumatisme de type morsure d'animal ou bien piqûre humaine. Une autre possibilité est la propagation du germe par contiguïté, notamment chez l'enfant en bas âge où les petits capillaires croisent la zone de croissance épiphysaire, ce qui permet la propagation de l'inflammation de l'épiphyse vers l'articulation. De même une infection locale telle qu'une ostéite ou une infection des parties molles peut être à l'origine de l'arthrite septique.

L'infection par une souche bactérienne donnée est fonction de plusieurs facteurs :

- son tropisme pour l'articulation en question
- sa virulence propre
- la sensibilité de la synoviale

Les étapes de l'infection se déroulent alors de la façon suivante :

- Adhérence de la bactérie via des protéines de liaison aux constituants de la synoviale (collagène, fibrinogène, fibronectine, laminine, acide hyaluronique). Cette adhérence est favorisée par l'existence de lésions membranaires qui augmentent l'exposition des protéines concernées (26).
- Colonisation puis prolifération bactérienne avec relargage de cytokines inflammatoires, activation du complément et libération de métallo protéinases, d'enzymes lysosomiales et de toxines bactériennes (hémolysine...). Ceci entraîne en réponse une réaction inflammatoire avec migration de leucocytes sur le site d'infection qui produisent des protéases et des cytokines (Interleukine-6 (IL-6), Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )...).
- Dégradation du cartilage, des protéoglycanes et du collagène par la réponse immunitaire de l'hôte et les toxines bactériennes. L'épanchement articulaire est responsable d'une augmentation de la pression intra-articulaire qui aggrave la destruction du cartilage et de la synoviale par ischémie tissulaire. L'infection, si elle n'est pas traitée, peut ensuite gagner les tissus environnants (tissus mous, tendons, ligaments et autres structures péri-articulaires).

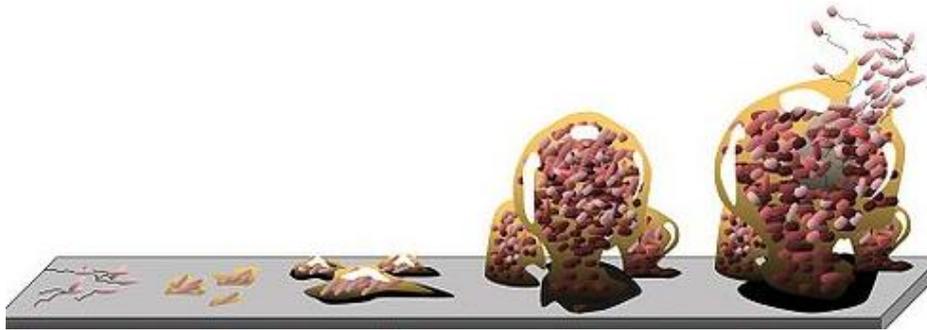
- **Infection sur matériel :**

La contamination se fait par voie directe lors d'un geste invasif (intervention chirurgicale, ponction, infiltration...) ou d'un traumatisme (fracture ouverte, escarre...), par contiguïté à partir des tissus environnants ou bien indirectement par voie hématogène ou lymphatique à partir d'un foyer à distance (dentaire, cutané, urinaire, digestif).

La présence de matériel favorise l'adhérence de la bactérie par interaction des oxydes le composant avec les glycoprotéines tissulaires (27) et diminue les défenses immunitaires locorégionales par inhibition du chimiotactisme, de la phagocytose et de l'activité bactéricide des macrophages et polynucléaires neutrophiles. Ainsi, même en cas de faible inoculum (< 1000 UFC), l'environnement au contact de la prothèse est favorable au développement bactérien.

Dans un premier temps, les bactéries sont adsorbées de façon réversible sur le matériel puis elles forment des liaisons covalentes avec les protéines de l'hôte, entraînant une colonisation irréversible du matériel (28). Elles produisent ainsi en 1 à 2 semaines une entité dynamique protectrice : le biofilm (appelé glycocalyx) composé d'expolysaccharides (slime) (29). En raison des conditions nutritives médiocres au sein de cette matrice polymérique, le métabolisme est ralenti (absence de production d'ATP) et les bactéries s'organisent sous l'influence de communications intercellulaires en micro-colonies hétérogènes dont la croissance est lente, appelées « Small Colony Variants » (SCV) (30). Celles-ci peuvent persister dans un état de quiescence, responsable de rechutes plusieurs mois ou années après le traitement de l'infection, à l'occasion par exemple d'un traumatisme ou d'une intervention. Le biofilm diminue la pénétration des facteurs de défense immunitaire de l'hôte ainsi que des antibiotiques, créant un environnement protecteur pour le développement des bactéries, qui sont relarguées de façon intermittente à sa surface permettant l'extension de la colonisation. À partir d'une certaine densité microbienne se produit une libération de molécules de signalisation intercellulaire qui vont activer des gènes eux-mêmes impliqués dans la production du biofilm (*quorum sensing*) (31). Ainsi, les germes sont capables de coloniser le matériel inerte prothétique ou les tissus voisins et d'y survivre de façon ralentie pendant de nombreuses années. L'ensemble de ces phénomènes provoque

une activation des ostéoclastes responsables d'une résorption osseuse à l'interface de l'implant, qui entraîne à long terme une désinsertion de la prothèse.



**Figure 3 : Cycle de vie d'un biofilm : adhérence, attachement irréversible, croissance et maturation puis dispersion (de gauche à droite) (32)**

- **Infection de pied diabétique :**

L'infection a habituellement pour point de départ un traumatisme aigu passé inaperçu ou un traumatisme minime répété, responsable d'une plaie chronique au sein de laquelle les bactéries vont se loger. Elle siège préférentiellement au niveau des zones d'appui et est favorisée chez le patient diabétique par un déficit des mécanismes cellulaires de défense liés à l'hyperglycémie (altération des fonctions et apoptose des leucocytes) ainsi que par la diminution de l'afflux de sang au niveau de la plaie due à l'artériopathie (hypoxie et nécrose cellulaire). La neuropathie est quant à elle responsable d'une indolence des zones d'hyperpression qui retarde le diagnostic.

- Pour l'infection suppurée du pied neuropathique, la lésion initiale est une hyperkératose à partir de laquelle une cavité sous-dermique se forme. Celle-ci va ensuite s'ulcérer et gagner vers l'intérieur et l'extérieur.
- Pour l'infection suppurée du pied neuro-ischémique : une ulcération cutanée sans hyperkératose se forme au niveau de zones de compression permanente, porte d'entrée de micro-organismes qui vont la coloniser.

Plusieurs types d'infections superficielles ou profondes existent : dermohypodermite bactérienne nécrosante ou non (atteinte de l'hypoderme et secondairement du derme), gangrène humide (nécrose tissulaire noirâtre), abcès ou phlegmon (collections purulentes). L'infection chronique peut ensuite évoluer par contiguïté en ostéite ou en ostéoarthrite.

- **Ostéomyélite infectieuse :**

L'ostéomyélite est une inflammation de la moelle osseuse et du tissu adjacent. D'origine habituellement hémotogène chez l'enfant avec une porte d'entrée cutanée (plaie, furoncle, panaris) ou muqueuse (angine), elle est plutôt liée à une infection par contiguïté des tissus voisins chez l'adulte. Elle entraîne une augmentation de la pression contre les vaisseaux sanguins pouvant créer des séquestres liés à la nécrose de l'os (fragment détaché ayant perdu sa vascularisation et son innervation), ou encore une abcédation par extension aux tissus mous environnants.

Elle évolue en 2 phases :

- **Aiguë :** forme la plus fréquente, entre 5 et 15 ans, elle affecte plus souvent la métaphyse des os longs et le squelette en croissance (tibia, fémur) mais tous les os sont susceptibles d'être touchés. Il existe une suppuration avec migration infectieuse en direction de la diaphyse ou du périoste, puis l'infection peut se propager vers l'articulation (ostéo-arthrite) (9).
- **Chronique :** elle succède à l'ostéomyélite aiguë après un intervalle de temps plus ou moins long ou elle peut être présente d'emblée notamment chez l'adulte. L'ostéolyse et la nécrose entraînent la formation de séquestres osseux entretenant la suppuration qui peut se fistuliser à la peau. La reconstruction osseuse en parallèle est responsable d'une périostose hypertrophique.

- **Ostéite infectieuse :**

Elle désigne une infection du tissu osseux. Celle-ci est le plus souvent d'origine postopératoire ou post-traumatique liée à une inoculation directe de bactéries, plus rarement d'origine tuberculeuse, syphilitique, parasitaire (*Echinococcus*) ou bien mycosique chez l'immunodéprimé (*Candida*, *Aspergillus*, *Histoplasma*, *Cryptococcus*, *Sporotrichon*). En cas de mise en place de matériel, sa pathogénie est identique à celle des infections sur prothèse.

- **Spondylodiscite infectieuse :**

Elle désigne les infections atteignant les systèmes disco-vertébraux cervicaux, dorsaux, lombaires et sacrés. La contamination est principalement hématogène à partir d'un foyer distant (via les artères spinales, intercostales ou lombaires ou par le plexus veineux de Batson) mais elle peut être per opératoire en cas de chirurgie rachidienne ou à la suite d'un geste de ponction-infiltration. Sa pathogénie rejoint également celle des infections sur prothèse en cas de pose de matériel. L'évolution se fait en 3 phases :

- Phase initiale : envahissement osseux avec formation d'une caverne sur le plateau vertébral.
- Phase de destruction : extension de la caverne avec écrasement du disque et atteinte de la vertèbre adjacente. Cette phase peut se compliquer par l'apparition d'un abcès, de séquestres osseux ou de déformations vertébrales.
- Phase de réparation : elle est marquée par un arrêt de l'évolution, une cicatrisation avec fusion osseuse parfois incomplète et de possibles foyers séquellaires responsables de rechutes.

### *1.3.3. Micro-organismes en cause*

Différents types de micro-organismes peuvent être responsables d'infection articulaire : bactéries, virus, champignons ou bien parasites. Leur nature varie selon la localisation articulaire ou osseuse de l'atteinte, l'âge et les comorbidités du patient, l'origine tellurique ou bien postopératoire de l'infection...

Ainsi la majorité des espèces bactériennes isolées sont des Staphylocoques, Streptocoques, Entérobactéries ou *Pseudomonas*, mais l'on retrouve également des germes anaérobies et des atteintes pluri microbiennes, plus particulièrement dans le cas des infections chroniques.

- **Arthrite septique :**

- Arthrites infectieuses d'origine bactérienne (9) :
- Staphylocoques (50-80%) dont *Staphylococcus aureus* (35-65%)
- Streptocoques : streptocoques  $\beta$ -hémolytiques (20%) du groupe A (*Streptococcus pyogenes*), B, F ou G de la classification de Lancefield, ou plus rarement des streptocoques non groupables (*Streptococcus pneumoniae*...)

- Bacilles à Gram négatif : majoritairement de la famille des *Enterobacteriaceae* (5-20%) dont *Escherichia coli*, ainsi que *Pseudomonas aeruginosa* (patients avec comorbidités, hospitalisés ou avec des affections articulaires chroniques, usagers de drogues intraveineuses...)
- Polymicrobiennes : 8% des infections

D'autres bactéries peuvent être retrouvées dans certaines situations particulières :

<i>Situation</i>	<i>Espèce bactérienne</i>
Activité sexuelle à risque	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Morsures humaines	<i>Eikenella corrodens</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i>
Morsures de chat ou chien	<i>Pasteurella multocida</i> , <i>Capnocytophaga canimorsus</i>
Morsures de rat	<i>Streptobacillus moniliformis</i>
Piqûre de tique	<i>Borrelia burgdorferi</i>
Ingestion de lait non pasteurisé	<i>Brucella</i>
Toxicomanie intraveineuse	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i>
Drépanocytose	<i>Salmonella sp</i> , <i>S. aureus</i>
Immunodépression, hospitalisation ou affection articulaire chronique	Bacilles à Gram négatif, <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Post partum et hypogammaglobulinémie	<i>Mycoplasma hominis</i>
Post-infiltration articulaire	<i>Staphylococcus sp</i> , <i>Streptococcus sp</i> , <i>Propionibacterium acnes</i>
Traumatisme (environnement aquatique)	<i>Mycobacterium marinum</i>

Tableau VI : Principales espèces bactériennes rencontrées lors d'une arthrite septique en fonction de la situation (9,23)

De même, l'espèce impliquée varie en fonction de l'âge :

- Nouveau-né : *Streptococcus agalactiae*, *E. coli*, *S. aureus*
- Enfant de moins de 4 ans : *Kingella kingae*, *S. pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *S. aureus*
- Personnes âgées : les Staphylocoques demeurent majoritaires mais il existe une plus grande proportion de Streptocoques (26%) et ceux-ci sont principalement des Streptocoques des groupes B et C et *S. pneumoniae*, ainsi que de bacilles à Gram négatif (25 - 33% d'*E. coli*).

Certaines bactéries intracellulaires ne sont pas retrouvées en culture bactérienne : *Tropheryma whippelii* (maladie de Whipple), *Borrelia burgdorferi* (maladie de Lyme).

- Arthrites infectieuses non bactériennes (9) :

D'autres agents infectieux peuvent être également être imputés lors des arthrites infectieuses tels que les virus des hépatites A, B et C, le virus de la rubéole, le Parvovirus B19, le VIH... Plus rares encore sont les étiologies mycosiques (*Candida sp*, *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*...) ou parasitaires (filarioses, helminthiases), chez des patients souvent immunodéprimés.

- Arthrites post-infectieuses ou réactionnelles :

Elles surviennent dans des situations variées : rhumatisme post-streptococcique après une infection à *S. pyogenes*, arthrite réactionnelle après une infection génitale à *Chlamydia trachomatis*, une infection intestinale à *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia* ou *Campylobacter*... Elles sont induites par la réponse immunitaire et surviennent au moins 4 semaines après l'infection (gastro-entérite, urétrite, méningite...), préférentiellement chez le sujet jeune masculin. La bactérie n'est dans ce cas pas retrouvée en culture.

- **Autres IOA :**

IOA	Espèces bactériennes incriminées
<b>Infection sur matériel</b>	* Contamination per-opératoire : <i>S.aureus</i> (25%), Staphylocoques à coagulase négative (25%) dont <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>P. acnes</i> (10%) * Contamination hématogène : Streptocoques et Entérocoques (10%), Bacilles à Gram négatif dont Entérobactéries et <i>P. aeruginosa</i> <b>=&gt; Elles peuvent être polymicrobiennes (10%)</b>
<b>Infection de pied diabétique</b>	* <i>S.aureus</i> majoritairement, Streptocoques $\beta$ -hémolytiques, Bacilles à Gram négatif dont Entérobactéries et <i>P. aeruginosa</i> , Anaérobies de type cocci à Gram positif (plaies peu profondes) ou bacille à Gram négatif (plaies profondes) * Staphylocoques à coagulase négative, Entérocoques et Corynebactéries sont souvent des commensaux mais peuvent entraîner des infections opportunistes <b>=&gt; Il s'agit dans la plupart des cas d'infections polymicrobiennes</b>
<b>Ostéomyélite infectieuse aiguë ou chronique</b>	<i>S. aureus</i> principalement, Streptocoque B (nouveau-né) et A (enfant et nourrisson), <i>K. kingae</i> , Staphylocoques à coagulase négative, <i>P. aeruginosa</i> , Entérobactéries
<b>Ostéite infectieuse</b>	<i>S. aureus</i> , Staphylocoques à coagulase négative, Streptococoques, Bacilles à Gram négatif ( <i>P. aeruginosa</i> ), Corynebactéries, anaérobies ( <i>Propionibacterium sp</i> ) <b>=&gt; Profil comparable aux infections sur prothèse avec seulement une plus forte proportion d'infections polymicrobiennes (25%), sauf en cas de fracture ouverte pour laquelle s'ajoutent des bactéries environnementales (<i>Clostridium sp</i>, <i>Bacillus cereus</i>) ou de la flore cutanée, inoculées au moment du traumatisme ou après l'intervention.</b>
<b>Spondylodiscite infectieuse</b>	* Contamination hématogène : <i>S. aureus</i> (40%), Bacilles à Gram négatif dont Entérobactéries (20-30%), Streptococoques, <i>M. tuberculosis</i> et <i>Brucella sp</i> (rare) *Postopératoire (flore cutanée) : Staphylocoques à coagulase négative, Corynebactéries, <i>P. acnes</i>

Tableau VII : Espèces bactériennes mises en cause dans les IOA hors arthrite septique (9,23,33)

### 1.3.4. Diagnostic

#### 1.3.4.1. Clinique

- **Arthrite septique :**

La présentation principale est celle d'une monoarthrite fébrile touchant une articulation de gros calibre (genou, poignet, épaule et cheville chez l'adulte, hanche chez l'enfant), accompagnée la plupart du temps d'un épanchement, d'une perte de mobilité, d'une rougeur et d'une hyperalgie au niveau de l'articulation touchée (10).

Une atteinte polyarticulaire est possible dans près de 20% des cas (11), celle-ci est en faveur d'une virose (parvovirus B19, rubéole, virus hépatotrope), d'une endocardite bactérienne, d'un rhumatisme post-streptococcique ou plus rarement d'une maladie de Whipple ou de

Lyme. Les atteintes virales peuvent s'accompagner de ganglions et d'un rash cutané caractéristique et être spontanément régressives. L'arthrite septique est généralement aiguë mais peut également apparaître subaiguë voire chronique et sans signes locaux (excepté un épanchement froid) dans le cas des atteintes fongiques, parasitaires, liées à des mycobactéries ou à des bactéries rares (*Treponema pallidum*, *Nocardia sp...*). Le cas de l'arthrite gonococcique est à part : il s'agit d'une polyarthralgie migratrice avec dermatite et ténosynovite, touchant plus volontiers le poignet ou les doigts, fréquemment chez la femme enceinte ou en période de menstruation (34,35).

Les symptômes diffèrent aussi aux âges extrêmes et en fonction des facteurs de comorbidité :

- Chez le nouveau-né : la présentation est proche de celle d'une septicémie, c'est-à-dire, un caractère irritable avec une perte de poids et un arrêt de l'alimentation, avec peu de signes inflammatoires généraux et locaux (hyperthermie...).
- Chez la personne âgée ou immunodéprimée : la présentation peut être pauci symptomatique et/ou polyarticulaire.
- Chez les personnes atteintes de pathologie articulaire rhumatoïde : les symptômes peuvent être difficiles à différencier avec une poussée de la maladie.

L'arthrite septique étant une urgence diagnostique et thérapeutique, ce diagnostic est à considérer en priorité avant preuve du contraire, et ce malgré sa faible fréquence (9,23). Le diagnostic différentiel principal est celui d'une arthrite microcristalline qui peut mimer une atteinte infectieuse ; des cas concomitants existent mais sont extrêmement rares. D'autres diagnostics possibles sont l'arthrite rhumatoïde débutante, une bursite, une poussée congestive d'arthrose ou des étiologies plus rares comme le lupus érythémateux disséminé...

- **Infection sur matériel :**

- Infection précoce : douleur d'intensité anormale, écoulement purulent de la plaie, désunion ou nécrose cicatricielle avec d'éventuels signes généraux (hyperthermie, frissons). Les complications sont bactériémiques.
- Infection tardive : douleur persistante, descellement radiologique de la prothèse, absence possible de signes inflammatoires locaux ou généraux. Si l'existence d'une

fistule à proximité traduit systématiquement une infection, l'absence de signes cliniques quant à elle ne l'exclue pas.

Ces symptômes sont à différencier de ceux d'un descellement aseptique, d'un conflit mécanique, d'un épanchement non infectieux, d'une hernie, d'une déchirure musculaire ou d'une tendinite...

- **Infection de pied diabétique :**

- Pour le pied neuropathique : le tableau est insidieux avec une plaie perforante torpide, chronique et peu algique. Elle s'accompagne de signes inflammatoires locaux : œdème, tuméfaction, hyperthermie et érythème péri lésionnel.
- Pour le pied neuro-ischémique : le pied est à l'inverse froid et algique, avec des zones d'ischémies noirâtres. Une odeur nauséabonde ainsi qu'un tissu friable ou un décollement sont en faveur d'une infection.

La classification du Consensus International sur le Pied Diabétique permet d'évaluer la sévérité de l'infection (36). Un aspect érythémateux oedematié (en « saucisse ») ou la mobilité anormale d'un orteil peut évoquer une ostéite sous-jacente.

- **Ostéomyélite infectieuse :**

- Aiguë : c'est une véritable urgence médicale. Elle se manifeste par un syndrome infectieux majeur (hyperthermie majeure, frissons, altération de l'état général) et des signes locaux d'hyperalgie.
- Chronique : les signes sont subaigus avec douleur non spécifique au niveau de la zone atteinte et des signes généraux discrets (hyperthermie modérée, altération de l'état général plus ou moins marquée).

Une forme aiguë peut mimer une fracture ou un ostéosarcome. Les complications sont l'atteinte bactériémique, le passage à la chronicité et l'abcédation avec fistulisation qui peut engendrer une dissémination articulaire.

- **Ostéite infectieuse :**

Les signes apparaissent plusieurs semaines après le geste chirurgical ou la fracture ouverte avec une absence de consolidation du site de fracture et une mauvaise guérison de la

blessure : érythème, écoulement et douleur locale. La pseudarthrose et la fistulisation sont des complications possibles.

- **Spondylodiscite infectieuse :**

Elle se manifeste par une douleur rachidienne inflammatoire progressivement croissante avec possible irradiation radiale et raideur segmentaire, soit une douleur persistante plus de 2 semaines dans un contexte postopératoire. Les signes généraux sont marqués (fièvre, frissons, asthénie) mais peuvent être insidieux en cas d'origine tuberculeuse ou brucellienne. Ces infections peuvent se compliquer par une compression médullaire ou radiculaire ainsi que par une bactériémie. Le diagnostic différentiel doit être fait avec certaines métastases cancéreuses, une spondylarthrite ankylosante, un tassement vertébral ou encore un myélome qui engendrent parfois une symptomatologie similaire.

#### 1.3.4.2. Biologie

- **Bactériologie :**

Le diagnostic se fait via l'identification du microorganisme responsable par examen direct, cultures et/ou biologie moléculaire.

- ✓ Prélèvements ostéo-articulaires (POA) : ponction ou biopsie synoviale, osseuse, discale ou vertébrale, ponction d'un abcès ou d'une collection...
  - ✓ Hémocultures (en cas de signes généraux associés)
  - ✓ Recherche d'une porte d'entrée (atteinte cutanée, ORL, urinaire, digestive...) ou d'une endocardite associée (échographie transoesophagienne)
  - ✓ Sérologies : *Chlamydia trachomatis*, *Yersinia*, *Salmonella*, Anticorps anti-streptolysine O (ASLO), Anticorps anti-streptodornase (ASDO), *Brucella*...
- **Bilan d'inflammation :** il s'agit de marqueurs non spécifiques qui orientent vers le diagnostic d'infection mais ne l'excluent pas en cas de négativité
    - ✓ Vitesse de sédimentation, C-Reactive Protein (CRP)
    - ✓ Numération-formule sanguine recherchant une hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles (PNN) ...

<i>Paramètre biologique</i>	<i>Probabilité dans l'AS</i>	<i>Remarques</i>
CRP augmentée	98 %	Une CRP normale diminue fortement la probabilité d'arthrite septique
Hyperleucocytose à PNN	62 %	
Hémocultures positives	60 %	La probabilité augmente avec la répétition du prélèvement

Tableau VIII : Perturbation des différents paramètres biologiques et leur probabilité d'apparition dans l'arthrite septique (AS) bactérienne (10,11,38)

- Bilan spécifique : en fonction de l'orientation diagnostique
  - ✓ Uricémie (goutte)
  - ✓ Facteur rhumatoïde (PAR)
  - ✓ Recherches virales : sérologie VHC et VHB, VIH, Parvovirus B19 ...
  - ✓ Auto-immunité : anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires (vascularites), anticorps antiphospholipides (syndrome des antiphospholipides), anticorps anti-CCP...
  - ✓ Tests génétiques : HLA B27 (spondylarthropathies) ...

#### 1.3.4.3. Imagerie

L'imagerie contribue au diagnostic de l'infection ostéo-articulaire mais elle peut aussi servir à guider un prélèvement. Différentes techniques sont utilisées : radiographie standard, Tomodensitométrie (TDM), échographie, Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), arthrographie, scintigraphie au Technétium-99 métastable (Tc-99m), médecine nucléaire... (23)

Dans la plupart des cas, l'apparition des signes radiologiques est retardée par rapport au début de la maladie. L'IRM est l'un des meilleurs examens pour le diagnostic morphologique d'IOA (notamment au niveau du rachis), de même que le scanner. Ce dernier peut également guider une ponction au même titre que l'échographie, qui peut quant à elle mettre en évidence abcès et épanchements. Enfin, la scintigraphie couplée (leucocytes et os marqués) est utile pour le diagnostic d'exclusion, en raison de sa forte valeur prédictive négative.

#### 1.3.4.4. Anatomopathologie

L'examen histologique permet d'orienter le diagnostic en cas d'infection à mycobactérie ou d'infection fongique, et d'écarter des étiologies non infectieuses (dégénérative, tumorale, microcristalline).

Il existe des critères spécifiques pour l'infection sur matériel (39–41) : la présence de plus de 5 polynucléaires neutrophiles par champ à fort grossissement (x 400) dans au moins 5 champs microscopiques séparés sur un examen intéressant le tissu osseux et la synoviale, présente une sensibilité et une spécificité variant respectivement entre 43 et 100 % et entre 81 et 98 % pour le diagnostic d'infection bactérienne.

En ce qui concerne les ostéites, l'anatomopathologie peut montrer une inflammation du tissu conjonctif et des espaces de l'os avec 3 stades possibles (congestion, abcédation et passage à la chronicité) ainsi qu'une nécrose, une raréfaction de l'os et une hyperostose sous-périostée. Pour l'ostéite tuberculeuse, il s'agit d'un granulome avec caséum, cellules géantes et épithélioïdes.

#### 1.3.5. Traitement

Le traitement des IOA fait appel à plusieurs spécialités comme l'orthopédie, la rhumatologie, la microbiologie ou l'infectiologie et peut associer geste chirurgical et antibiothérapie. Cette dernière dépend de l'espèce bactérienne et de la résistance de la souche incriminée, de la localisation de l'infection (pharmacocinétique dans l'os) et du patient concerné (contre-indications, hypersensibilité, interactions médicamenteuses...). Elle doit être débutée si possible après les prélèvements à visée bactériologique, sauf en cas de sepsis ou de risque infectieux sévère (immunosuppression...). En cas d'IOAC, il est possible de faire appel aux Centres de Référence des infections ostéo-articulaires complexes.

La guérison est déterminée par l'absence de rechute sur une durée de 6 mois (arthrites, spondylodiscites) à 2 ans (infections sur matériel).

- **Arthrites septiques bactériennes :**

Le traitement antibiotique doit être le plus précoce et efficace possible afin d'éviter un passage à la chronicité de l'infection, une destruction irréversible de l'articulation voire la mise en jeu du pronostic vital avec le risque septique. L'antibiothérapie est d'abord

probabiliste puis est ajustée en fonction de l'espèce bactérienne sur une durée moyenne de 3 à 4 semaines. Il n'est pas nécessaire dans ce cas d'utiliser des molécules à forte pénétration osseuse, mais une action sur la flore anaérobie peut être nécessaire dans les contextes de morsure par exemple.

L'antibiothérapie est associée à un drainage articulaire par ponctions itératives via une aspiration à l'aiguille pour les articulations facilement accessibles, ou le cas échéant par abord chirurgical (lavage par arthroscopie ou bien arthrotomie, c'est-à-dire par ouverture chirurgicale de l'articulation), qui permettent de diminuer l'inoculum bactérien. Si l'infection persiste, une synovectomie peut être nécessaire.

La prise en charge thérapeutique est complétée par une immobilisation à titre antalgique et une remise en charge progressive.

- **Infections sur matériel :**

Le traitement doit également être précoce afin de détruire le micro-organisme avant l'organisation du biofilm protecteur (en 1 à 2 semaines), car une fois celui-ci constitué, l'efficacité de l'antibiothérapie sera amoindrie et le traitement nécessitera une ablation du matériel d'ostéosynthèse ainsi que des tissus infectés (42). L'antibiothérapie associe des molécules ayant une bonne biodisponibilité, une bonne diffusion osseuse ainsi qu'une bonne pénétration du biofilm. Elle est administrée par voie intraveineuse puis si possible en relai per os au bout de 15 jours au moins (7).

<i>Perméabilité forte</i>	<i>Perméabilité moyenne</i>	<i>Perméabilité faible</i>
Fluoroquinolones	Clindamycine	Aminosides
Teicoplanine	Vancomycine	Imipénème
Cyclines	Cotrimoxazole	Pénicilline M
Macrolides	Linézolide	Penicilline A
Rifampicine	Fosfomycine	Céphalosporines 1 <sup>ère</sup> génération
Acide fusidique	Uréidopénicillines	
Metronidazole	Céphalosporines	
	Phénicolés	

Tableau IX : Diffusion osseuse des antibiotiques (23)

La prise en charge dépend de la durée d'évolution de l'infection :

- Infection précoce ou hémotogène :
  - Antibiothérapie : 4 semaines
  - Lavage abondant avec synovectomie (résection partielle ou totale de la membrane synoviale entourant l'articulation) et changement des pièces prothétiques mobilisables.
- Infection tardive (7) :
  - Antibiothérapie : 6 à 12 semaines
  - Une reprise chirurgicale de la prothèse en 1 temps (remplacement du matériel en une seule opération) ou en 2 temps court ou long (retrait de la prothèse avec pose d'un espaceur qui peut être imprégné de fortes doses d'antibiotiques (aminosides, vancomycine ou clindamycine) durant 6 semaines à 6 mois avant la réimplantation d'une nouvelle prothèse) peut être réalisée en fonction de l'état du patient (âge, comorbidités), de la sensibilité aux antibiotiques de la souche incriminée, de la multiplicité des localisations septiques et de l'importance de la destruction osseuse. La chirurgie en 1 temps pourrait présenter un meilleur résultat fonctionnel et un moindre coût tandis que la chirurgie en 2 temps, plus coûteuse, exposerait à une réimplantation parfois difficile mais présenterait en contrepartie de meilleurs résultats cliniques (57-90% contre 93-100% de réussite).

Une prise en charge de la douleur, médico-sociale (assistante sociale, psychologue...) ainsi que de la rééducation accompagnent le traitement médico-chirurgical.

*Nota bene* : Une antibiothérapie per os à durée indéterminée peut être proposée pour les patients inopérables pour lesquels une espèce bactérienne a été mise en évidence.

- **Infection de pied diabétique :**

Il s'agit d'une prise en charge pluridisciplinaire qui associe le maintien de l'équilibre glycémique, une décharge mécanique (par suppression de l'appui sur la plaie : alitement, fauteuil roulant, chaussures de décharge...), un débridement médical (excision des tissus dévitalisés), le rétablissement d'un apport artériel suffisant (geste endovasculaire, pontage ...) ainsi que des soins de pansement quotidiens (37). Les antiseptiques ou antibiotiques

locaux n'ont pas d'intérêt dans ce cas de figure. L'antibiothérapie par voie générale n'a pas pour objet de stériliser la plaie et n'a pas d'influence sur la colonisation, néanmoins elle est utilisée pour éviter une évolution défavorable chez les patients présentant une plaie avec des critères d'infection sévères. Elle doit systématiquement comporter des antibiotiques à large spectre couvrant les bactéries fréquemment impliquées, notamment les cocci à Gram positif aérobies-anaérobies facultatifs comme *S. aureus*. La présence d'une artériopathie diminue la pénétration des antibiotiques sur le site infecté et peut nécessiter de prescrire des posologies élevées ainsi que des antibiotiques ayant une bonne diffusion tissulaire sur le pied diabétique comme les fluoroquinolones, la clindamycine ou la fosfomycine (43). La durée de traitement ne fait pas l'objet de consensus, elle peut varier entre 1 et 4 semaines et doit être réévaluée après 48 à 72h.

En cas d'urgence mettant en jeu le pronostic vital ou fonctionnel ou en l'absence d'amélioration sous traitement médical, la chirurgie orthopédique permet l'exérèse des tissus nécrosés ainsi que la correction des déformations du pied. Elle peut être conservatrice ou bien mener à l'amputation, en fonction de la sévérité des lésions.

L'éducation du patient à l'auto-examen et à l'entretien des pieds est également un point important dans la prévention des infections.

- **Ostéomyélite et ostéite :**

Ces infections sont difficiles à traiter en raison de la localisation des bactéries dans les séquestres osseux. Le traitement de 4 à 6 semaines par antibiotiques à pénétration osseuse n'est souvent pas seul suffisant et doit être suivi d'un geste chirurgical de débridement pour obtenir la guérison, à l'exception des ostéomyélites hématogènes de l'enfant où l'antibiothérapie est la plupart du temps suffisante. La prise en charge s'accompagne de repos et d'une immobilisation antalgique (44).

- **Spondylodiscite :**

La SPILF (2007) donne des indications des spécialités à utiliser et de leur posologie pour le traitement probabiliste ou adapté à l'espèce bactérienne (45). La durée de traitement peut être de 6 à 12 semaines (bactéries pyogènes), 3 mois (*Brucella*), 6 mois (*Candida*, *Aspergillus*) ou jusque 9 à 12 mois (*M. tuberculosis*).

Un geste chirurgical de décompression (laminectomie) ou de drainage peut être réalisé s'il existe des signes neurologiques de déficit ou de paralysie depuis moins de 72h, voire exceptionnellement une intervention chirurgicale de stabilisation en cas de déformation majeure. L'arthrodèse est un traitement chirurgical de dernière intention souvent irréversible consistant à bloquer une articulation par l'obtention d'une fusion osseuse.

Des mesures d'immobilisation (décubitus antalgique suivi d'une reverticalisation), de contention et de rééducation (kinésithérapie) doivent également être prises (décubitus, minerve, corset...).

## 2. Techniques d'études en Bactériologie pour le diagnostic des IOA

Le laboratoire de Bactériologie occupe une place importante pour la prise en charge des patients atteints d'IOA. L'étude des prélèvements ostéo-articulaires permet de diagnostiquer une infection par l'identification d'un pathogène, de déterminer sa sensibilité aux antibiotiques et ses facteurs de virulence ou encore de comparer les différentes souches isolées afin d'établir un lien de clonalité en cas d'épidémie. Différentes techniques sont mises en œuvre pour réaliser le diagnostic microbiologique : examen direct, numération cytologique, broyage ou sonication, culture en milieu solide ou liquide, biologie moléculaire, tests biochimiques ou spectrométrie de masse...

### 2.1. Prélèvements ostéo-articulaires

Les POA doivent être réalisés sous condition d'asepsie chirurgicale, afin de limiter la contamination des sites normalement stériles par des bactéries appartenant à la flore commensale (cutanéomuqueuse principalement) non responsables de l'infection. Les échantillons doivent parvenir dans un contenant stérile à température ambiante, dans les 2 heures suivant le prélèvement afin de préserver les espèces fragiles. Le contenant doit en outre permettre la survie des bactéries anaérobies (seringue dont on a chassé l'air au préalable...). Si l'état de santé du patient le permet, un délai de 15 jours vis-à-vis d'une antibiothérapie préalable est recommandé pour éviter l'obtention d'un résultat faussement négatif (23,46).

Les prélèvements peuvent être d'origines et de consistances diverses (solide ou liquide) en fonction du site anatomique concerné, de la présence ou non de matériel associé :

- Ponction de liquide articulaire (LAR) ou de pus : il est recommandé d'ajouter une partie du prélèvement dans un tube additionné d'anticoagulant (héparine, citrate) pour permettre une numération cytologique des LAR en s'affranchissant d'un éventuel caillot.
- Prothèse et matériel d'ostéosynthèse (clou, ciment, vis, tiges, pièces intermédiaires...).

- Prélèvements per-opératoires : ils sont de natures diverses (tissus mous, os, liquide articulaire, pus...)
  - o Il est préconisé pour les infections sur matériel de réaliser 5 prélèvements en zone suspecte macroscopiquement pathologique, avec changement de matériel entre chaque prélèvement (7).
  - o Réaliser moins de 5 prélèvements entraîne des difficultés d'interprétation, et inversement réaliser plus de 5 prélèvements engendre une augmentation du risque de contamination sans amélioration de la sensibilité diagnostique (46).
- Prélèvements superficiels (écouvillonnage de fistules, plaies) : ils s'avèrent peu utiles car fréquemment contaminés par la flore cutanée (46).
- Liquides de drainage et drains de redon : leur valeur diagnostique est contestée, ils sont plus sensibles dans le suivi des chirurgies septiques qu'aseptiques (47).
- Des biopsies percutanées sous scanner peuvent être réalisées au niveau vertébral ou en l'absence de liquide à ponctionner.
- Dans le cas des infections sur pied diabétique, les prélèvements bactériologiques ne sont recommandés qu'en cas d'infection cliniquement visible de la plaie (37) et doivent être réalisés sur une plaie lavée et débridée afin d'éviter la contamination par la flore commensale cutanée. Plusieurs techniques peuvent s'appliquer mais il n'existe pas de consensus : écouvillonnage superficiel de la plaie, curetage-écouvillonnage profond, biopsie tissulaire, aspiration à l'aiguille fine...

## **2.2. Examen bactériologique standard**

L'examen bactériologique standard comporte plusieurs étapes : du prétraitement du prélèvement à l'identification bactérienne et la réalisation d'un antibiogramme.

### *2.2.1. Préparation du prélèvement*

- Manipulation : les prélèvements et les cultures qui en sont issues doivent être traités de manière stérile tout au long de l'analyse, en respectant les règles d'hygiène en vigueur dans les laboratoires de Biologie Médicale Hospitaliers (48).

- Prétraitement : une étape de dilacération supplémentaire avant ensemencement des prélèvements peut être nécessaire pour libérer les bactéries quiescentes piégées dans le biofilm ou dans des séquestres osseux, qui compliquent le diagnostic des IOA :
  - La technique de broyage par billes d'acier permet la mise en culture homogène de la totalité du prélèvement opératoire, tout en diminuant le risque de contamination du prélèvement si elle est réalisée de façon stérile dans un système fermé. Les techniques manuelles de broyage sont quant à elles longues, fastidieuses et exposent à la contamination (49).
  - Une autre technique utilisée est la sonication du prélèvement, mais contrairement au broyage elle n'est utilisable que sur les pièces prothétiques. Son utilisation permettrait d'augmenter la sensibilité de la culture (78,5% pour le liquide de sonication de l'implant contre 60,5% pour les 5 prélèvements tissulaires (50)) notamment en cas d'antibiothérapie (51), mais cet apport est contesté ou n'est retrouvé que sur la PCR (Polymerase Chain Reaction) du liquide de sonication selon certains auteurs (52,53). Aucune recommandation à ce jour ne favorise l'une ou l'autre de ces techniques.

### *2.2.2. Examen direct*

- **Aspect macroscopique (3,54) :**

L'aspect d'un liquide synovial peut donner des éléments d'orientation sur la pathologie en cause :

- Liquide trouble ou purulent : il est composé principalement de polynucléaires neutrophiles et est dit puriforme si sa numération leucocytaire est  $> 20\ 000/\text{mm}^3$ 
  - Arthrite septique bactérienne
  - Arthrite microcristalline
- Liquide hémorragique :
  - Agression aiguë de la synoviale liée à un traumatisme, une inflammation aiguë (microcristaux ou infection) ou bien une lésion tumorale
  - Troubles de la coagulation responsables d'hémarthrose (hémophilie A ou B).
- Liquide citrin : autres étiologies (mécanique : arthrose...)

- **Coloration de Gram :**

Elle colore les bactéries en fonction de la structure de leur paroi et permet en cas de positivité d'orienter vers une étiologie infectieuse, voire directement vers une famille bactérienne (en fonction de la coloration, de la morphologie et du mode de groupement du germe). Le seuil de sensibilité au microscope optique est évalué à 1 bactérie pour 100 champs (au grossissement x1000) ce qui correspond à un inoculum d'environ  $10^4$  bac/mL (33).

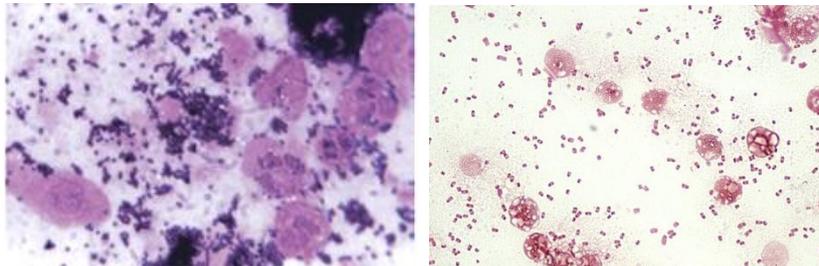


Figure 4 : Coloration de Gram montrant des cocci à Gram positif et des bacilles à Gram négatif (de gauche à droite) (3)

- **Numération :**

Une numération des leucocytes et des hématies est réalisée pour les liquides synoviaux (en nombre d'éléments par unité de volume) ; on distingue ainsi un liquide d'origine mécanique ( $< 2000$  leucocytes / $\text{mm}^3$ ) ou inflammatoire ( $> 2000$  leucocytes / $\text{mm}^3$ ) (33).

- **Coloration de May-Grünwald-Giemsa (MGG) :**

Elle permet d'établir une formule leucocytaire (en % des éléments figurés) et d'orienter vers certaines pathologies :

- Majorité de polynucléaires neutrophiles ( $>65\%$ ) : liquide inflammatoire, fréquemment d'origine septique bactérienne (10,55)
- Majorité de lymphocytes : origine rhumatismale ou bien septique d'étiologie virale ou tuberculosique
- Majorité de monocytes : possible dans certaines viroses ou rhumatismes
- Excès d'éosinophiles : origine parasitaire...

*Nota bene* : lorsque la numération d'un liquide synovial est impossible (prélèvement visqueux ou coagulé), la cytologie peut être appréciée dans ce cas sur la coloration MGG par une évaluation semi-quantitative des leucocytes et des hématies.

	<i>Normal</i>	<i>Septique</i>	<i>Inflammatoire non bactérien</i>	<i>Tuberculose</i>
<i>Aspects</i>	Citrin	Trouble	+/- Trouble	Trouble
<i>Coagulation spontanée</i>	-	+	+	+
<i>Cristaux</i>	-	-	+/-	-
<i>Leucocytes (/mm<sup>3</sup>)</i>	< 2000	2000 à > 50 000	2000 à 50 000	~ 5000
<i>Polynucléaires (%)</i>	< 25	> 80	Environ 50	50
<i>Examen direct</i>	-	+	-	+ au Ziehl
<i>Protéine (g/l)</i>	< 20	> 50	> 50	> 50

Tableau X : Différentes caractéristiques d'un liquide synovial (33)

- **Recherche de microcristaux :**

Elle permet le diagnostic différentiel avec les arthrites microcristallines et est réalisée par microscopie optique avec lumière polarisée. Le type de cristaux observé est lié à la pathologie en cause :

- cristaux d'urate de sodium : maladie de la goutte
- cristaux de pyrophosphate de calcium : chondrocalcinose
- cristaux d'hydroxyapatite dans certains rhumatismes...
- cristaux de cholestérol, de phospholipides (croix de Malte), de cortisone, d'hémoglobine, de cryoglobuline de Charcot-Leyden (éosinophilie) ...

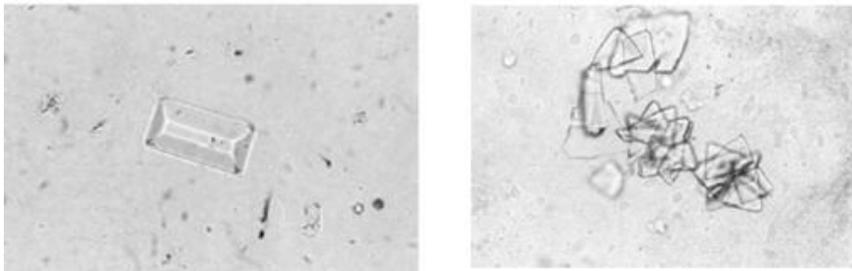


Figure 5 : Cristaux de pyrophosphate de calcium (gauche) et d'acide urique (droite) (3)

### 2.2.3. Mise en culture

La culture n'est réalisable que sur des bactéries viables capables de se multiplier et lorsque les milieux, les conditions atmosphériques et de température sont adéquats pour permettre la croissance de l'espèce recherchée. C'est à partir de la culture que l'identification et la détermination de la sensibilité aux antibiotiques sont réalisées.

Elle s'avère néanmoins parfois difficile pour les prélèvements ostéo-articulaires car les bactéries peuvent être présentes en nombre limité, piégées au sein d'un biofilm voire se multiplier faiblement en raison de leur physiologie intrinsèque (*Kingella kingae*, anaérobies...) ou bien de leur présence sous la forme de variants métaboliques (« Small Colony Variants ») (30,56). Plusieurs types de milieux de culture sont utilisés (57) : (cf. annexe 1 p140)

- Milieux non sélectifs
- Milieux semi-sélectifs
- Milieux chromogènes
- Milieux d'enrichissement liquide

Pour les POA il convient d'utiliser en première intention des milieux enrichis (gélose au sang et sang cuit) à différentes conditions de température et d'atmosphère. Il faut donc ensemer au minimum (46) :

- une gélose au sang en aérobiose
- une gélose au sang cuit sous 5% de CO<sub>2</sub>
- une gélose au sang en anaérobiose
- deux flacons d'hémoculture aérobie et anaérobie ou un milieu liquide d'enrichissement permettant la recherche d'anaérobies (Schaedler, Rosenow...)

Les milieux gélosés doivent être incubés au minimum 5 jours en aérobiose, 8 jours en anaérobiose et les milieux liquides au minimum 14 jours pour permettre la pousse de bactéries à croissance plus lente (7,58). La recherche de mycobactéries fait quant à elle appel à des cultures spécifiques, qui ne seront pas décrites ici.

#### 2.2.4. Antibiogramme

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques peut être réalisée à partir de la culture, sur milieu solide par la méthode de diffusion en gélose (méthode des disques ou méthode de détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par E-tests) ou bien en milieu liquide. Elle est généralement réalisée sur l'ensemble des espèces retrouvées (hors contaminants) et sur l'ensemble des morphotypes de colonies car il peut exister plusieurs profils de résistance (antibiotypes) au sein d'une même espèce.

#### 2.2.5. Interprétation des résultats

L'interprétation des cultures de prélèvements ostéo-articulaires peut s'avérer délicate car les espèces bactériennes responsables d'IOA sont variées et peuvent appartenir à la flore cutanéomuqueuse commensale (*Staphylocoques* à coagulase négative, *Propionibacterium*, *Corynebacterium*...) parfois responsable de la contamination du prélèvement. Celle-ci peut survenir au moment où le prélèvement est effectué (contamination endogène) ou lors de son transport voire de sa manipulation au sein du laboratoire (contamination exogène).

Ainsi, si les précautions nécessaires sont respectées, l'os, le liquide articulaire et les tissus associés sont des sites normalement stériles et toute souche bactérienne isolée doit être considérée comme potentiellement pathogène et être conservée (au minimum 1 an à titre médico-légal pour les souches isolées d'infection sur matériel) (46).

Dans le cas des infections sur pied diabétique, la plaie étant obligatoirement contaminée par la flore commensale du patient ou par des germes environnementaux, la présence de bactéries sur le prélèvement ne signifie pas forcément qu'elle soit infectée. Il est alors toujours nécessaire de distinguer infection et colonisation. Des critères de diagnostic bactériologique variant en fonction du type d'IOA suspectée existent :

- Prélèvement unique de liquide synovial : il faut tenir compte de la cytologie (numération des leucocytes, formule à prédominance de polynucléaires), de l'examen direct, de la nature de l'espèce bactérienne isolée (pathogène strict ou bien appartenant à la flore cutanée)... pour différencier une bactérie infectante d'un éventuel contaminant (46).

- Prélèvements multiples per-opérateurs : l'Infectious Disease Society of America (IDSA) et la SPILF proposent des critères diagnostiques pour les infections sur prothèse (7,59). La probabilité d'infection augmente avec le nombre de prélèvements dans lesquels on retrouve une même souche bactérienne, celle-ci étant de (46) :
  - 95% lorsque 3/5 prélèvements sont positifs
  - 20% lorsque 2/5 prélèvements sont positifs
  - 10% lorsque 1/5 prélèvement est positif
  - 3% lorsqu'aucun prélèvement n'est positif

Les infections sur matériel d'ostéosynthèse peuvent être polymicrobiennes (10 à 15% d'entre elles (7)). Il est par conséquent possible de retrouver différentes espèces bactériennes qui sont toutes à prendre en considération, à condition que le prélèvement ait été correctement réalisé.

- Des recommandations spécifiques existent aussi pour les infections sur pied diabétique (22) et les spondylodiscites (45).

De plus, si le diagnostic des infections aiguës est généralement aisé (à l'exception des infections décapitées par une antibiothérapie) le diagnostic des infections chroniques est quant à lui compliqué par la présence de variants métaboliques qui rendent difficile la lecture des cultures. On peut ainsi observer un polymorphisme au sein d'une même espèce bactérienne avec des colonies pouvant prendre divers aspects atypiques et présentant des différences de sensibilité aux antibiotiques, voire la présence de micro-colonies de croissance lente (phénomène retrouvé lors d'infection profondes à *Staphylococcus...*(30)).

<i>Infections aiguës</i>	<i>Infections chroniques</i>
Culture rapide en 24 -48h	Culture lente >> 48 heures, voire positive uniquement en milieu liquide enrichi
Colonies en grand nombre	Faible nombre de colonies
Colonies monomorphes	Colonies pouvant être d'aspect polymorphe
Examen après coloration de Gram souvent positif	Examen après coloration de Gram souvent négatif

Tableau XI : Caractéristiques des infections aiguës et chroniques (46)

L'interprétation bactériologique d'un POA doit donc tenir compte des facteurs suivants (46) :

- Contexte clinique : âge, comorbidités et facteurs de risque, présence de prothèse ou de matériel d'ostéosynthèse, infection aiguë ou chronique, antibiothérapie préalable...
- Cytologie, nature et nombre de prélèvements positifs, nombre de milieux positifs par prélèvement, nombre de colonies et leur délai de pousse...

Etant donné que la négativité de la culture des prélèvements à visée bactériologique ne permet pas d'exclure formellement le diagnostic d'IOA (infection à bas bruit, espèces bactériennes de croissance difficile, infection décapitée par une antibiothérapie...), celui-ci doit nécessairement être pluridisciplinaire : à la fois clinique, bactériologique, radiologique, chirurgical...

### *2.2.6. Identification*

L'identification d'une bactérie fait appel à diverses techniques, reflétant différentes caractéristiques d'une souche donnée :

- **Caractères cultureux :**

La morphologie d'une colonie et son aspect (coloration, consistance, adhérence), le caractère hémolytique ou non sur gélose au sang, les caractéristiques de croissance (vitesse, température optimale, exigence quant à la richesse du milieu de culture) et le métabolisme respiratoire (aéro-anaérobie, aérobie ou anaérobie strict, micro-aérophile), permettent l'orientation vers une famille voire un genre ou une espèce bactérienne en particulier.

- **Techniques d'identification phénotypiques (60) :**

En plus des caractères cultureux, les tests biochimiques permettent d'orienter plus précisément vers un genre ou une espèce bactérienne : recherche de catalase, recherche de cytochrome oxydase, recherche de nitrate réductase ou de coagulase, étude du métabolisme des lipides (recherche de lipase...), des glucides (fermentation des sucres, dégradation du lactose ou de l'esculine...) et des protéines (recherche de décarboxylases, de désaminases, de tryptophanase...) ...

Ces tests nécessitent que les micro-organismes présentent un métabolisme actif, dans le cas contraire ils seront peu performants et le délai d'identification de 24 à 72h peut s'allonger

jusque plusieurs semaines (mycobactéries, germes atypiques, anaérobies...). Un caractère est considéré comme positif s'il est présent chez plus de 90% des souches, négatif si absent chez plus de 90% des souches et variable s'il est présent chez 11 à 89% des souches (33). L'utilisation d'un algorithme référençant les différents caractères des taxons bactériens connus permet ensuite l'identification de la souche étudiée. Plusieurs systèmes permettent de réaliser des tests phénotypiques (33) :

- **Tests unitaires** : principalement réalisés en tubes, ceux-ci sont délaissés au profit de galeries ou de systèmes automatisés.
- **Galeries miniaturisées** (système API® de bioMérieux) : elles contiennent des substrats sous forme déshydratée et permettent la réalisation d'une vingtaine de tests biochimiques, la lecture colorimétrique ou turbidimétrique étant réalisée après incubation de plusieurs heures.
- **Automates** : les systèmes d'identification en milieu liquide type Phoenix® (Becton Dickinson) ou encore Vitek® (bioMérieux), Walkaway® (Siemens) automatisent la distribution des galeries via des cartes contenant plusieurs dizaines de réactifs déshydratés et permettent d'identifier bon nombre d'espèces bactériennes grâce à un algorithme d'interprétation de l'appareil. Seule la préparation de l'inoculum reste manuelle.

Ils présentent l'avantage de pouvoir également tester la sensibilité de certaines bactéries aux antibiotiques en combinant identification puis antibiogramme, avec interprétation par un système expert. Ils permettent en outre de traiter un flux analytique important pour les bactéries à croissance rapide et profil de résistance connu.

Les inconvénients sont liés à l'absence de contrôle automatisé de la pureté, au caractère fermé de l'automate (pas de choix des antibiotiques possible et réactifs spécifiques). Si ces automates permettent l'identification des espèces courantes (Staphylocoques, Entérobactéries, Streptocoques) ils sont généralement moins fiables pour certains groupes de bactéries (bacilles à Gram positif, bacilles à Gram

négatif non fermentaires) et peuvent nécessiter le recours à d'autres techniques d'identification. De même, la réalisation d'un antibiogramme en milieu gélosé peut être nécessaire pour des isolats ayant un profil de résistance atypique ou pour vérifier la présence de certaines résistances naturelles.

- **Recherche d'antigènes :**

- Tests d'agglutination : ces tests reposent sur la recherche d'antigènes à partir des colonies bactériennes à l'aide de particules de latex sensibilisées avec un anticorps monoclonal. Ils peuvent être utilisés pour l'identification de *S. aureus*, pour le groupage de Streptocoques  $\beta$ -hémolytiques via le polyside C de paroi, le sérogroupage de *Salmonella*, de *Shigella* ou de *P. aeruginosa* à l'aide d'immunsérums polyvalents puis monovalents...
- Tests immunochromatographiques à partir de liquides biologiques : ces tests permettent notamment la détection d'antigènes de *Legionella pneumophila* de séro groupe L1 ou de *S. pneumoniae* dans les urines ou le liquide céphalo-rachidien. Ces tests sont simples, rapides d'utilisation et permettent un diagnostic tardif même après un traitement antibiotique adapté.

Deux autres méthodes d'identification sont désormais couramment utilisées en Bactériologie : les techniques de biologie moléculaire et la spectrométrie de masse MALDI-TOF.

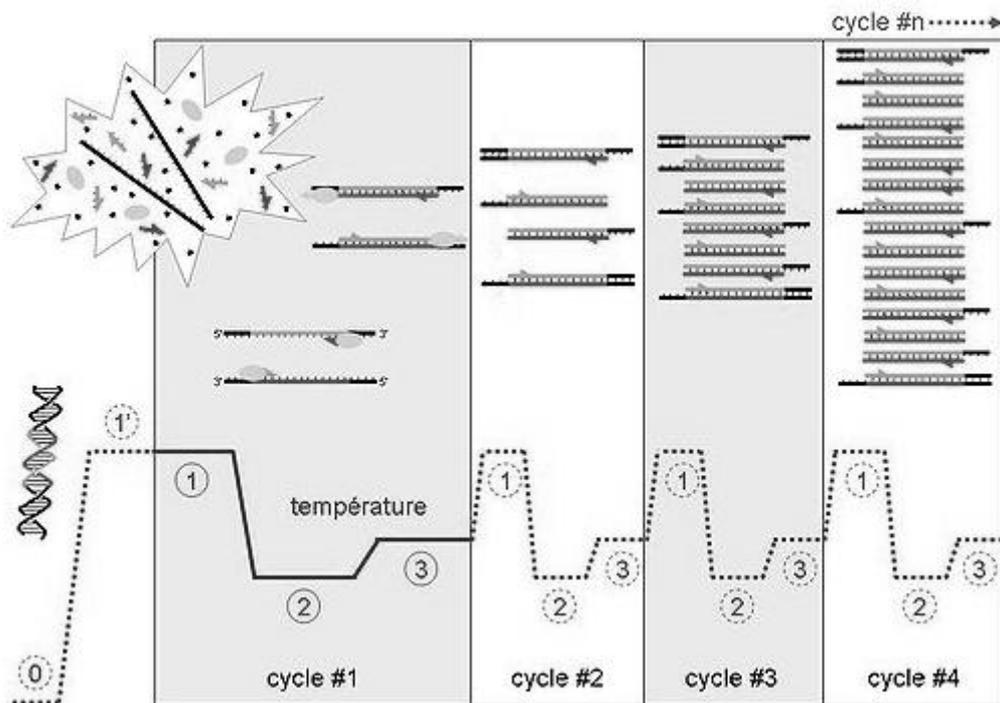
## **2.3. Biologie moléculaire**

### ***2.3.1. Principe de la PCR***

La PCR ou réaction de polymérisation en chaîne est mise au point dans les années 1980 par Karen Mullis (61). Il s'agit d'une technique de détection et de quantification du matériel génétique (ADN : Acide Désoxyribonucléique, ou ARN : Acide Ribonucléique) par amplification exponentielle d'une simple copie d'une séquence particulière d'acides

nucléiques à l'aide d'une enzyme. Elle se décompose en plusieurs étapes : (cf. annexe 2 p141)

- Extraction des acides nucléiques
- Amplification des acides nucléiques
- Détection :
  - PCR en point final
  - PCR en temps réel



- Séquençage :

Le séquençage a pour but de déterminer la séquence nucléotidique du gène cible amplifié par PCR. La méthode utilisée au laboratoire de Bactériologie du CHU de Rennes est la méthode par fluorescence (« Dye terminator sequencing ») ; cette technique dans laquelle le séquençage se fait en une seule réaction dans un automate est la plus utilisée. Une PCR est réalisée avec seul type d'amorce entraînant l'augmentation linéaire du nombre de copie d'un seul des brins d'ADN (sens ou anti-sens). Dans le milieu réactionnel, des didésoxyribonucléotides (ddNTP) marqués par un fluorophore spécifique à chaque type de

base arrêtent la synthèse du brin d'ADN lors de leur incorporation dans celui-ci à la place du dNTP attendu (« BigDye terminators »), ce qui permet d'obtenir des fragments de tailles différentes. Ceux-ci sont ensuite séparés par électrophorèse puis passent dans le séquenceur qui détecte la fluorescence émise propre à chaque type de nucléotide. L'analyse par ordinateur du signal reçu (taille du fragment et nature du nucléotide le terminant) permet de reconstituer la séquence avec précision en confrontant celles obtenues avec l'amorce sens et anti-sens (62). L'espèce correspondante est ainsi identifiée par comparaison de la séquence reconstituée avec celles de souches de références dans une banque de données telles que BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de NCBI (National Center for Biotechnology Information) ou BiBi (Bioinformatics Bacterial Identification...), ce qui permet d'obtenir un résultat sous forme de pourcentage de similarité. En pratique courante il est admis qu'une similarité entre les 2 séquences génétiques de 99% est identifiante au niveau de l'espèce, qu'une similarité de 97% est identifiante au niveau du genre et qu'en dessous de ce pourcentage il est possible d'être en présence d'une autre espèce, mais il n'existe cependant pas de consensus à ce propos (66).

D'autres méthodes existent comme la méthode de Sanger qui est la technique originelle du séquençage (63), ou les procédés plus récents de pyroséquençage (64) qui demeurent plus rapides et ne nécessitent pas de clonage ce qui permet une lecture directe de la séquence obtenue.

### ***2.3.2. Applications en Bactériologie***

En Bactériologie, 2 types de PCR sont principalement utilisées : la PCR dite « universelle » suivie d'un séquençage et la PCR spécifique.

#### **2.3.2.1. PCR universelle dite à large spectre**

Cette PCR vise des gènes présents chez toutes les bactéries, comme le gène *rrs* (1540 nucléotides chez *E. coli*) codant pour l'ARN 16S ribosomique, qui est largement employé. Elle cible des régions conservées du gène, mais encadre tout de même des régions polymorphes, afin de permettre la différenciation des espèces. Elle est utilisée pour l'identification de souches ou pour la détection de pathogènes sur un prélèvement stérile en culture (65).

La PCR-séquençage de l'ARN 16S présente l'avantage d'identifier un grand nombre d'espèces bactériennes de croissance lente ou difficiles à identifier à l'aide des méthodes traditionnelles (67) (*Finegoldia magna*, *Granulicatella*, *Mycoplasma*, *Bartonella henselae*...), ainsi que des bactéries non cultivables (*Tropheryma whipplei*, *Coxiella burnetii*...) voire dangereuses à cultiver (microorganismes de classe A pour le bioterrorisme : *Francisella tularensis*...). Elle peut également être utilisée pour des prélèvements paucibactériens ou pour des prélèvements de patients ayant reçu préalablement une antibiothérapie (68). En effet, si la culture nécessite la présence de bactéries viables, les techniques de biologie moléculaire nécessitent uniquement la présence de matériel génétique dans le prélèvement. Elle peut enfin être utilisée pour différencier un contaminant de laboratoire d'une bactérie responsable d'infection : l'absence de matériel génétique bactérien dans un prélèvement retrouvé positif en culture est en faveur d'une contamination de celui-ci.

Cependant, contrairement à son appellation, cette technique n'est pas véritablement universelle puisque que certaines espèces bactériennes nécessitent le séquençage d'autres gènes pour être correctement identifiées. Ainsi d'autres cibles existent pour l'identification bactérienne par PCR-séquençage : le gène *sodA* (pour les espèces du genre *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, *Pasteurella* (69,70)), *rpoB* (*Mycobacterium*, *Bartonella*, *Legionella*, *Corynebacterium*... (71)), *infB* (*Lactococcus*, *Bacillus*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus*... (72)), *gltA* (*Bartonella*, *Rickettsiae* (73)), *groEL* (*Borrelia*, *Staphylococcus*... (74)) ...

Elle possède également un coût élevé, un délai analytique de plusieurs jours et requiert une qualification poussée des techniciens. Tout ceci rend difficile la pratique en routine de la PCR-séquençage ARN 16S dans nombre de laboratoires. De plus, à l'inverse de la culture, cette technique ne permet pas la réalisation d'un antibiogramme.

La recherche du génome bactérien par biologie moléculaire complète donc la culture mais elle ne s'y substitue pas. En pratique, la technique de PCR-séquençage de l'ARN 16S est utilisée si l'on suspecte la présence d'une bactérie particulièrement difficile à identifier voire à cultiver, ou bien en cas de stérilité en culture des prélèvements bactériologiques d'un patient fortement suspect d'IOA.

#### 2.3.2.2. PCR spécifique

Il s'agit de PCR non suivies de séquençage, recherchant une séquence génétique caractéristique d'une espèce bactérienne dans un contexte syndromique particulier (suspicion de méningite bactérienne, arthrite septique de l'enfant, endocardite à hémoculture négative...). La réaction est dans ce cas ciblée sur le gène d'un genre ou d'une espèce précise, déterminé en fonction du contexte clinique du patient (*K. kingae*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Bartonella* et *Coxiella sp...*).

Cette méthode demeure plus rapide et plus sensible que la PCR universelle ARN 16S mais elle ne détecte que l'espèce ou le genre bactérien recherché et demande donc d'avoir une orientation diagnostique au préalable.

Elle peut également être utilisée pour la recherche de gènes de résistance (gène *mecA* du *S. aureus*, gène *van* d'*Enterococcus*...) ou de caractères de virulence tels que les toxines (*Clostridium difficile*, *E. coli*...).

#### 2.3.2.3. Autres

Des techniques moléculaires telles que l'électrophorèse en champs pulsés, la RFLP (polymorphisme de longueur des fragments de restriction), la RAPD (amplification aléatoire d'ADN polymorphe) ou la MLST (« Multi Locus Sequence Typing ») (75) peuvent être utilisées à titre exceptionnel ou dans le cadre de la recherche pour étudier le lien épidémiologique entre différents isolats : mise en évidence d'une épidémie nosocomiale, différenciation d'une récurrence ou d'une rechute chez un même patient, et différenciation de morphotypes bactériens au sein d'une même prélèvement pour éliminer ou non une contamination.

A l'heure actuelle, le recours à la biologie moléculaire notamment au séquençage de l'ARN 16S est de moins en moins fréquent pour l'identification bactérienne, avec l'apparition des techniques de spectrométrie de masse, plus rapides, moins coûteuses et performantes.

### 3. Spectrométrie de masse

#### 3.1. Généralités sur la spectrométrie de masse

##### 3.1.1. Introduction

La recherche de nouvelles cibles thérapeutiques, de marqueurs d'états pathologiques ou physiologiques dans un but diagnostique ou pronostique fait aujourd'hui en grande partie appel à l'analyse protéomique. Celle-ci consiste en l'étude de l'ensemble des protéines codées par un génome (protéome), issues d'une cellule, d'un tissu ou bien d'un liquide biologique. On parle ainsi de protéomique descriptive lorsque l'on observe le profil d'expression de celles-ci sous leurs différentes formes et de protéomique fonctionnelle lorsque l'on étudie la variation de ce profil en fonction de l'environnement et des conditions de vie.

La spectrométrie de masse est un outil de choix pour la recherche (76,77) en ce qui concerne l'identification de peptides ou de protéines, l'analyse de leur séquence en acides aminés ou encore la mise en évidence de modifications post-traductionnelles. Elle connaît des applications tant dans le domaine Agroalimentaire que celui de la Toxicologie, de la Pharmacologie ou de la Biologie Médicale. Ainsi, elle sert de méthode de référence pour la caractérisation des étalons nécessaires à l'étude de la justesse des mesures, de méthode de dosage de métabolites pour le dépistage de maladies héréditaires en Biochimie, pour le dosage des stéroïdes en Hormonologie et plus récemment ont été développées des applications en microbiologie pour l'identification de micro-organismes.

##### 3.1.1.1. Définition

La spectrométrie de masse est une méthode physique de mesure des rapports masse-sur-charge ( $m/z$ ) de molécules individuelles ionisées et de leurs produits de fragmentation. Elle permet ainsi la détermination de la masse moléculaire, la caractérisation structurale, l'identification et la quantification des composés analysés. Contrairement à d'autres méthodes d'analyses structurales comme la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ou la cristallographie par diffraction des rayons X qui utilisent des substances en phase condensée, elle étudie les échantillons sous forme gazeuse. C'est également une méthode destructrice puisque l'échantillon ne peut être réutilisé après l'analyse.

La spectrométrie de masse est fondée sur la séparation et la détection d'ions provenant de la molécule à analyser formés dans une source d'ionisation ou une chambre de collision. L'analyse se résume en trois étapes essentielles : l'ionisation-vaporisation de l'échantillon, la séparation des ions formés puis la détection du signal. Les résultats seront ensuite présentés sous forme d'un spectre de masse.

#### 3.1.1.2. Unités

Le spectromètre de masse sépare les molécules en fonction de leur rapport masse/charge (**m/z**) :

○ La masse (**m**) s'exprime en Dalton (Da) :  $1 \text{ Da} = 1,673 \cdot 10^{-27} \text{ kg} = 1,007 \text{ uma}$   
Plusieurs types de masses peuvent être définis pour une même molécule à partir de sa composition élémentaire :

- Masse nominale (calculée avec la masse atomique nominale c'est à dire en nombre entier des isotopes les plus abondants)
- Masse isotopique (utilisant pour chaque atome la masse atomique exacte des isotopes les plus abondants)
- Masse chimique ou moyenne utilisant les masses atomiques moyennes tenant compte de l'abondance des isotopes.
- Pour ce qui est du dénominateur, ce n'est pas la valeur de la charge (**q**) qui est utilisée mais la valeur absolue du nombre de charge (**z**).
- Le rapport (**m/z**) obtenu s'exprime en « Thomson » (Th), ou en Dalton (Da) si  $z = 1$ .

#### *3.1.2. Appareillage*

Le spectromètre de masse est un appareil composé de différentes parties permettant l'évaporation et l'ionisation des molécules M introduites (source d'ion), l'accélération et la séparation des ions formés  $M^{(+/-)}$  en fonction de leur rapport m/z (analyseur) puis leur détection. Le trajet global d'un échantillon peut être représenté comme suit :

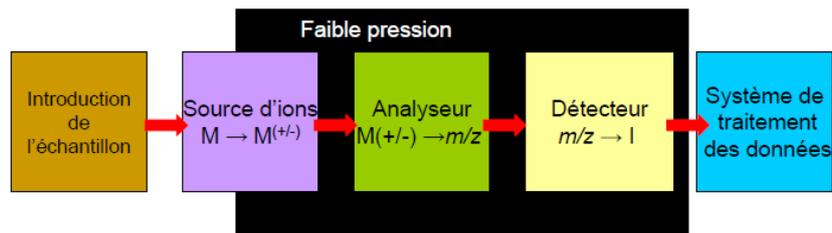


Figure 7 : Représentation schématique d'un spectromètre de masse (78)

### 3.1.2.1. Source

La source est l'enceinte où a lieu l'évaporation et l'ionisation des molécules analysées afin d'obtenir des ions en phase gazeuse. Il existe différentes méthodes d'ionisation classées en fonction de l'énergie interne transférée lors de l'ionisation (ionisation directe ou bien ionisation indirecte par désorption ou désolvatation d'ions), le choix de la méthode dépendant de plusieurs paramètres :

- Les propriétés physico-chimiques de l'échantillon concerné : taille, volatilité, stabilité thermique, labilité chimique, aptitude à induire une ionisation...
- La quantité de matière disponible
- Le type d'information recherchée à partir du spectre : poids moléculaire, information de structure...
- Le type d'introduction souhaitée : introduction directe de l'échantillon ou bien couplage à une autre technique

### 3.1.2.2. Les ions

Différents types d'ions peuvent être générés par la source :

- **L'ion moléculaire** : il provient de l'addition ( $M^-$ ) ou de la perte d'un électron ( $M^+$ ) à la molécule sans rupture de liaison, il a donc une masse égale à celle de la molécule neutre introduite dans la source puisqu'il contient tous les atomes de celle-ci mais possède un nombre impair d'électrons.
- **L'ion pseudo-moléculaire** : il provient de l'addition ou de la perte d'atome chargé à la molécule (exemple :  $M + H^+ \leftrightarrow MH^+$ ).
- **L'ion parent (précurseur)** : ce terme désigne tout ion susceptible de se fragmenter et donc d'engendrer un ion fils.

- **L'ion fils (fragment)** : il s'agit de l'ion issu de la fragmentation d'un précurseur par perte d'un ou plusieurs fragments.

#### *Ionisation directe ou conventionnelle dite « dure »*

Les méthodes d'ionisation dure sont :

- L'ionisation par impact électronique
- L'ionisation chimique positive

Ces méthodes très énergétiques sont les plus anciennes et leur utilisation tend aujourd'hui à diminuer. Elles sont réservées aux composés facilement volatilisables, stables à température élevée et de faible masse moléculaire (<1000 Da).

Les ions fils sont obtenus par fragmentation des ions moléculaires ou pseudo-moléculaires d'origine en suivant des règles de fragmentation connues et caractéristiques de l'analyte, permettant par ce moyen d'obtenir des informations structurales. Les ions obtenus ont ainsi souvent un nombre impair d'électrons et par conséquent une durée de vie plus courte, ils sont appelés ions métastables lorsque celle-ci est assez longue pour qu'ils sortent de la source et se décomposent en fragments lors de la traversée de l'analyseur.

#### *Ionisation indirecte dite « douce »*

Les méthodes d'ionisation douce sont :

- L'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI = « Atmospheric pressure ionization »)
- L'électronebulisation (ESI = « Electrospray ionization »)
- La désorption/ionisation laser assistée par une matrice (MALDI)

Ces méthodes moins énergétiques développées il y a une vingtaine d'années permettent l'ionisation de molécules en provoquant peu ou pas leur fragmentation. Elles sont adaptées aux biomolécules de masse moléculaire élevée (1000 à 300 000 Da).

L'ion moléculaire ou pseudo-moléculaire formé peut être ici consécutif à l'addition d'un électron ou d'un ion ( $H^+$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $NH_4^+$ ) voire à la soustraction d'un électron ou d'un proton à la molécule d'origine. Les ions obtenus ont un nombre pair d'électrons et sont par conséquent relativement stables, c'est-à-dire que leur durée de vie est suffisante pour traverser l'analyseur et arriver au détecteur.

### 3.1.2.3. Analyseur de masse

Cette partie de l'appareil sépare les particules du flux gazeux ionique formé dans la source en fonction de leur rapport  $m/z$ , via un déplacement de celles-ci au sein de champs électromagnétiques. Il y règne un vide suffisant pour que le libre parcours moyen des ions soit supérieur à la distance à parcourir dans l'appareil pour atteindre le détecteur, en évitant les collisions qui dévieraient l'ion de sa trajectoire. Des champs électrostatiques très précis guident et déplacent les ions dans l'appareil (lentilles électrostatiques...). Différents types d'analyseurs existent :

- Filtres quadripolaires et pièges à ions
- Analyseurs à temps de vol - TOF (à champ électrique constant)

Le choix d'un couple source et analyseur est crucial pour le type d'analyse que l'on souhaite effectuer. En Bactériologie Médicale, les spectromètres de masses couplant une source MALDI et un analyseur TOF sont utilisés pour l'identification bactérienne via leur spectre de masse protéique.

Un analyseur est caractérisé par différents paramètres :

- **La résolution (R)** : c'est l'aptitude de l'analyseur à séparer deux ions présentant des rapports  $m/z$  voisins mais différents. Il est considéré que des pics sont résolus lorsque l'intensité de la vallée située entre les 2 pics est inférieure à 10% de la hauteur du pic le plus faible. La résolution peut être calculée partir de la formule suivante :

$$R = M/\Delta M$$

*M : masse du 1<sup>er</sup> pic, M + ΔM : masse du 2<sup>ème</sup> pic*

*ΔM = pouvoir séparateur : différence de masse entre 2 pics adjacents résolus*

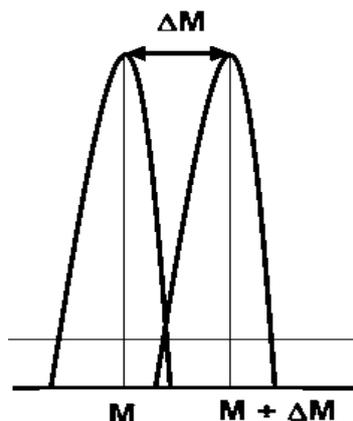


Figure 8 : Détermination de la Résolution (78)

Elle peut également être mesurée à partir d'un pic isolé :  $M$  étant dans ce cas la masse du pic et  $\Delta M$  sa largeur à mi-hauteur. On parle de résolution unitaire lorsque l'on s'intéresse à la capacité de distinguer l'ion de rapport  $m/z$  et l'ion de rapport  $m/z+1$ .

- **La limite en masse** : valeurs minimum et maximum des rapports  $m/z$  mesurables.
- **L'exactitude en masse** : justesse des rapports  $m/z$  mesurés exprimée en ppm (partie par million) ou en %.
- **La vitesse de balayage** : domaine de masse mesurable par unité de temps exprimée en unité de masse / seconde ou milliseconde.
- **La transmission** : rapport entre le nombre d'ions arrivant au détecteur et entrant dans l'analyseur.

#### 3.1.2.4. Détection des échantillons

Le détecteur mesure l'intensité du signal ( $I$ ) correspondant aux différentes valeurs  $m/z$  des ions via un dispositif de multiplication d'électrons. Il transforme le courant ionique en courant électrique puis celui-ci est amplifié, numérisé et enregistré.

### 3.1.3. Le spectre de masse

Le résultat de l'analyse est un graphique à double entrée présentant la variation d'intensité du courant ionique détecté en fonction du rapport masse ( $m/z$ ) des ions produits par la molécule analysée : le spectre de masse. Il peut être présenté sous forme de spectre continu (ensemble de pics plus ou moins larges reflétant le courant ionique traversant le

détecteur) ou sous forme d'un spectre de barres (grâce à un traitement informatique du spectre continu, chaque pic est présenté sous forme d'un trait vertical).

Il permet d'apporter plusieurs informations sur le composé analysé : la masse moléculaire du composé, la masse de ses fragments (pour les sources d'ionisation dures), et leur quantité dans l'échantillon analysé.

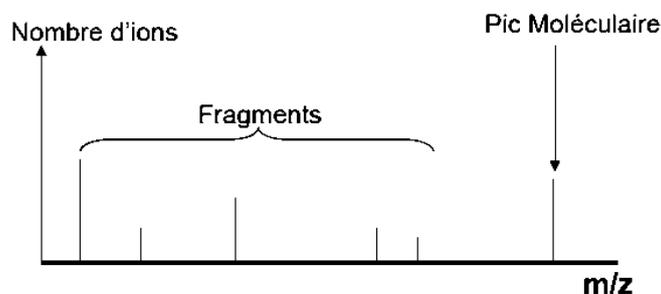


Figure 9 : Spectre de masse en barres obtenu avec une source d'ionisation dure (78)



Figure 10 : Spectre de masse en barres obtenu avec une source d'ionisation douce (78)

Le rapport  $m/z$  de l'ion moléculaire permet de mesurer la masse moléculaire de l'analyte, tandis que les fragments de l'analyte apportent des informations structurales.

#### 3.1.4. Couplage à d'autres techniques analytiques

La spectrométrie de masse peut aisément être couplée à des méthodes séparatives telles que la chromatographie en phase liquide ou gazeuse, ce qui apporte un paramètre supplémentaire pour l'identification de l'analyte. Un tel processus permet également de faciliter la purification et de concentrer davantage les molécules d'intérêt avant leur entrée dans la source d'ion, ce qui a pour effet d'améliorer leur détection et leur quantification.

Ainsi l'ionisation par impact électronique et l'ionisation chimique sont fréquemment couplées à la chromatographie en phase gazeuse, tandis que l'ESI et l'APCI sont plutôt associées à la chromatographie en phase liquide.

## **3.2. Spectrométrie de masse MALDI-TOF**

### *3.2.1. Généralités*

La spectrométrie de masse (SM) est développée à la fin du XIXe siècle puis étudiée dès 1975 avec une source d'ionisation à impact électronique dans le but d'identifier des micro-organismes (79). L'apparition de techniques utilisant une source d'ionisation douce comme le MALDI-TOF ou l'ESI a permis l'analyse de divers biomarqueurs (80), puis dès 1996 apparaissent des applications pour l'identification de bactéries en laboratoire de routine (81,82).

La spectrométrie de masse type MALDI-TOF est une technique de désorption et ionisation par impulsion laser assistée par une matrice d'inclusion de l'échantillon (MALDI : « Matrix Assisted Laser Desorption Ionization ») et couplée à un spectromètre de masse à temps de vol (TOF : « Time of Flight »). Elle est aujourd'hui utilisée pour l'identification en routine de micro-organismes tels que les bactéries, les champignons filamenteux ou les levures, par la caractérisation de leur contenu en protéines. C'est une méthode performante, rapide, simple d'utilisation, fiable et peu chère qui est, par conséquent, de plus en plus utilisée dans les laboratoires d'analyse de biologie médicale.

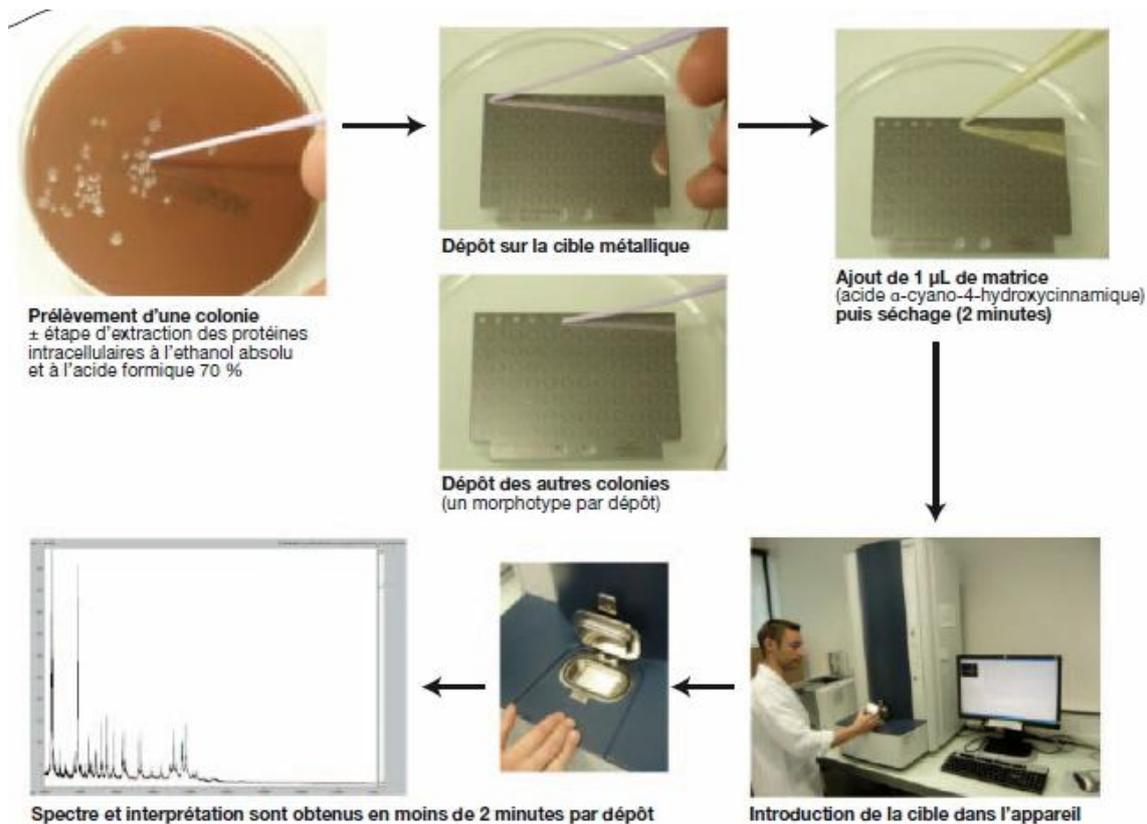


Figure 11 : Séquence d'identification par spectrométrie de masse type MALDI-TOF à partir d'une colonie bactérienne, d'après (83)

### 3.2.2. Principe

#### 3.2.2.1. Protéines étudiées

La SM de type MALDI-TOF permet l'analyse de l'empreinte moléculaire d'un micro-organisme en mesurant les protéines hautement abondantes contenues dans celui-ci. Les spectres obtenus sont ceux des molécules à masse moléculaire élevée comprise entre 2000 et 20 000 Da, soit 20 à 60 pics par spectre de masse (84). Bien que la majeure partie des 200 à 6000 protéines d'une bactérie possèdent un poids allant de 4000 à 15 000 Da, seule une fraction d'entre elle est détectée par le MALDI-TOF (85) mais les profils obtenus sont suffisants pour différencier les espèces entre elles. Ainsi, la majorité des protéines analysées correspondent à des protéines cytoplasmiques basiques hydrophiles provenant de la grande sous-unité (protéines RL pour *Ribosomal Large*) ou de la petite sous-unité (protéines RS pour *Ribosomal Small*) du ribosome bactérien, des « cold shock proteins », ainsi que des protéines membranaires (84).

### 3.2.2.2. Echantillonnage

Pour l'analyse on peut utiliser deux types d'échantillons :

- Colonie bactérienne : provenant d'une culture sur milieu solide (gélose...)
- Extraits bactériens : provenant de colonies difficiles à identifier en dépôt direct, de flacons d'hémoculture...

Les échantillons de micro-organismes sont déposés sur une plaque d'acier appelée cible. Ils sont recouverts d'une grande quantité de matrice, qui co-cristallise avec l'analyte lors de l'évaporation du solvant : le produit à identifier est ainsi inclus dans une matrice et immobilisé sous forme de cristaux sur un support inerte.

### 3.2.2.3. Analyse

La cible est déposée dans le spectromètre de masse. Un faisceau laser percute l'ensemble échantillon-matrice via une série de tirs de photons dans la longueur d'onde d'absorption de la matrice.

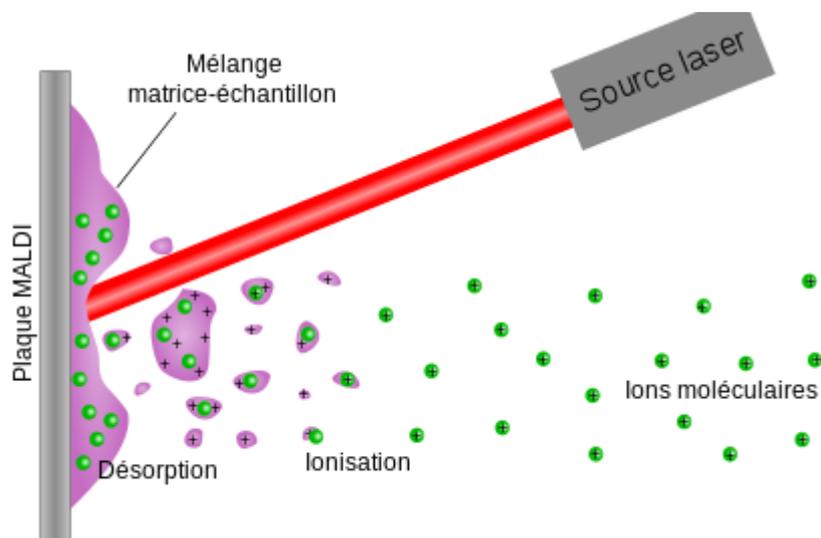
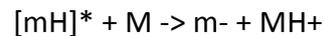


Figure 12: Principe de fonctionnement d'un MALDI-TOF (Manuel Bruker®)

L'accumulation d'énergie dans la phase condensée provoque l'ionisation de l'échantillon par l'intermédiaire d'un transfert de protons entre la matrice et les protéines bactériennes via un mécanisme qui n'est pas complètement élucidé à l'heure actuelle. Il est cependant acquis que ce sont principalement des ions moléculaires monochargés positivement qui sont

formés (86). La réaction suivante se produit ainsi, en phase solide tout comme en phase gazeuse (87) :



$[mH]^*$  : matrice photoexcitée,  $M$  : analyte

L'excitation transmise par le laser est transformée en mouvement thermique des molécules de matrice au niveau de la surface du cristal, provoquant la sublimation des cristaux de matrice et son expansion en phase gazeuse (88). L'analyte est donc entraîné dans le plasma d'expansion en phase gazeuse (désorption).

A l'interface entre la source et l'analyseur, les ions sont accélérés électrostatiquement sur une courte distance grâce à une différence de potentiel entre deux disques à haute tension (génération d'un champ électrique) en présence d'un vide d'air poussé généré par des pompes (minimisation des interférences provenant de la collision des particules entre elles). Ils sont ensuite refocalisés à l'aide de lentilles.

Ceci entraîne leur passage dans le tube de vol avec une vitesse qui dépend de leur rapport  $m/z$ , leur permettant de se séparer et d'atteindre le détecteur en un temps qui dépend de leur masse. Les ions présentant le rapport masse/charge le plus petit sont ainsi les premiers arrivés au détecteur et les ions qui ont le même rapport  $m/z$  sont séparés grâce à un miroir électrostatique.

*Explication :*

Les ions formés dans la source sont accélérés par un champ magnétique généré par une différence de potentiel (eV), avant de pénétrer dans le tube de vol constituant l'analyseur. Celui-ci est d'une longueur (L) beaucoup plus grande que celle de la source (S) et n'a pas de champ. Les ions (de masse  $m$  et de charge  $z$ ) détectés à l'autre extrémité du tube auront donc l'énergie cinétique ( $E_c$ ) suivante :

$$E_c = \frac{1}{2} (m \cdot v^2) = z \cdot eV$$

Ils parcourront la distance L avec une vitesse  $v$  en un temps de vol  $t$  tel que :

$$t = L/v \quad \text{d'où} \quad t^2 = (m/z) \cdot (L^2/2eV)$$

Ceci permet de relier le temps de vol directement au rapport  $m/z$  de l'ion d'où une détection différentielle des espèces ayant un rapport  $m/z$  différent.

La mesure du temps (en nanosecondes) entre l'accélération en impulsion et les signaux correspondant du détecteur peut alors être convertie en rapport masse/charge (noté  $m/z$ ), et en masse moléculaire pour les ions monovalents majoritaires.

Le détecteur convertit le courant ionique en courant électrique qui sera amplifié, numérisé et enregistré. Le résultat est un spectre d'abscisse masse/charge et d'ordonnée dépendante de l'intensité et représentant l'abondance relative des ions détectés.

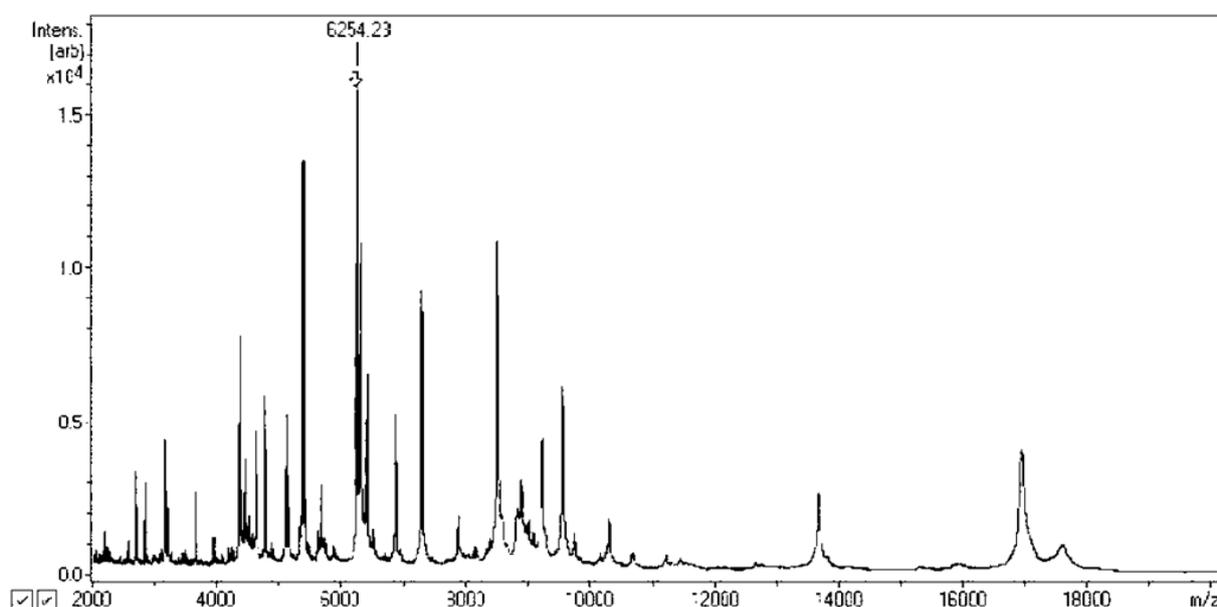


Figure 13 : Spectre de masse d'un *Escherichia coli* (Manuel Bruker®)

Le spectromètre de masse est couplé à un logiciel dédié à l'interprétation des spectres protéiques obtenus : le profil protéique moyen de la souche étudiée obtenu après mesure d'un certain nombre de spectres est comparé aux entrées référencées dans la base de données via une stratégie propre au fabricant.

#### 3.2.2.4. Interprétation des résultats

L'identification des micro-organismes par cette technique est basée sur le constat que l'empreinte spectrale est différente d'un genre à l'autre et d'une espèce à l'autre (79).  
Selon les fabricants, 2 stratégies bioinformatiques existent (89):

- Utilisation de spectres moyens : l'identification se fait par similitude entre le spectre obtenu et ceux de la base de données qui contiennent pour chaque espèce l'essentiel des pics de plusieurs souches. Cela nécessite un grand nombre de souches dans la base de données.
- Utilisation de pics spécifiques d'espèce : l'identification se fait par comparaison entre le spectre obtenu et des pics spécifiques constants et d'intensité relative élevée retenus pour chaque espèce dans la banque de données. Le nombre de pics étudié est plus restreint mais cette technique nécessite moins de souches dans la base de données.

L'algorithme employé dans notre étude est celui de l'automate Microflex LT/SH Biotyper (Bruker®) : sa stratégie se concentre sur les pics ayant la plus forte intensité relative, au maximum une centaine de pics dont l'intensité relative est supérieure au bruit de fond. Les banques de spectres sont créées par plusieurs mesures d'une espèce bactérienne ou d'une souche connue sous différentes conditions de culture.

L'identification est établie en termes de niveaux de fiabilité biostatistique, sur la base d'une corrélation entre le spectre acquis et les spectres de référence. La congruence des spectres est représentée par une valeur numérique (« log (score) »=score) entre 0 et 3 et par un degré de confiance ou pourcentage de similitude (il permet en cas de score  $\geq 2$  de s'assurer qu'il n'y a pas de mélange de micro-organismes).

Catégorie	Description
A	« <b>Confiance sur l'espèce</b> » : Le profil de référence (MSP) ayant le score le plus élevé est classé en vert (voir ci-dessus). Les MSP de scores inférieurs également classés en vert appartiennent à la même espèce. Les MSP suivants, classés en jaune, correspondent au minimum au même genre que le profil classé premier.
B	« <b>Confiance sur le genre</b> » : Le profil de référence (MSP) ayant le score le plus élevé est classé en vert ou en jaune (voir ci-dessus). Les MSP de scores inférieurs et classés en vert ou en jaune appartiennent au même genre que le profil classé premier. L'indice de confiance sur l'espèce proposée pour le MSP classé premier n'est pas suffisant.
C	« <b>Indice de confiance faible</b> » : Les résultats ne permettent de se prononcer ni sur le genre, ni sur l'espèce (veuillez vérifier l'éventuelle présence de synonymes dans les noms des espèces classées premières ou la possibilité d'un mélange de micro-organismes).

Tableau XII : Signification des indices de confiance (Manuel Bruker®)

Le résultat final présente ainsi les 10 premières espèces existantes dans la base de données dont le score d'homologie avec le spectre de l'échantillon analysé est le plus élevé. L'interprétation tient compte de deux paramètres indépendants : la valeur du score d'homologie et la reproductibilité de l'identification obtenue (au moins 3 fois la même

espèce bactérienne avec les scores les plus élevés, à prendre en compte notamment en cas de score <1,7). Une identification avec un score  $\geq 2$  est considérée comme fiable à l'espèce et une identification avec un score  $\geq 1,7$  est considérée comme fiable au genre.

Valeur	Description	Symboles	Couleur
2.300 ... 3.000	<b>forte probabilité d'identification à l'espèce</b>	(+++)	vert
2.000 ... 2.299	<b>identification du genre sécurisée, identification à l'espèce probable</b>	(++)	vert
1.700 ... 1.999	<b>identification au genre probable</b>	(+)	jaune
0.000 ... 1.699	<b>degré de confiance insuffisant pour l'identification</b>	(-)	rouge

Tableau XIII : Tableau de correspondance des scores (Manuel Bruker®)

Pour les systèmes non fermés il est possible de créer sa propre base de spectres. Par contre, ce n'est plus possible quand la base est marquée CE-IVD : l'ajout de spectres n'est alors réalisable que par le fournisseur lors des mises à jour.

### 3.2.3. Robustesse

Divers paramètres expérimentaux tels que le type de matrice utilisée, les propriétés du solvant (pH, teneur en sels), la nature du dépôt ou encore la méthode d'extraction des protéines modifient la qualité des spectres obtenus (90) en changeant le processus de cristallisation de la matrice avec l'échantillon et donc l'efficacité d'ionisation des molécules analysées. De même, les conditions de culture peuvent également influencer le résultat d'identification.

#### 3.2.3.1. Matrice

La matrice a pour propriété de co-cristalliser sélectivement avec les biomolécules (protéines bactériennes) lors de l'évaporation du solvant, permettant ainsi de les séparer des contaminants (sels...). Elle doit être adaptée à la nature de l'échantillon et répondre à certains critères physico-chimiques afin d'obtenir un bon rendement d'ionisation et un spectre de bonne résolution : stabilité sous vide, caractère sublimable, potentiel d'ionisation, propriétés acido-basiques en fonction de l'échantillon à analyser...

Il s'agit principalement de composés aromatiques avec un acide carboxylique, de petite taille et de masse faible. Deux types de matrices sont ainsi utilisés pour l'identification bactérienne :

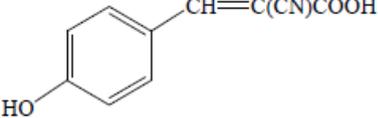
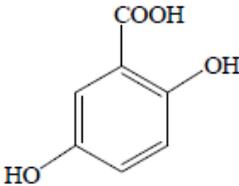
Nom courant	Matrice	Formule semi-développée	$\lambda$ absorption (nm)	Masse molaire (Da)	Utilisation
HCCA	Acide $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique		266, 337, 355	189.04	Peptides et protéines
DHB	Acide 2,5-dihydrobenzoïque		266, 337, 355, 2940, 10600	154.03	Peptides, glucides, glycolipides, et polymères synthétiques

Tableau XIV : Caractéristiques des différentes matrices utilisées en SM MALDI-TOF (91)

L'utilisation d'une matrice en spectrométrie de masse à ionisation laser permet de minimiser les dommages occasionnés par le laser en absorbant son énergie incidente (rayons UV), tout en augmentant l'efficacité du transfert qui provoque l'ionisation de l'échantillon. Elle améliore également la sensibilité de la technique puisque les molécules de matrice étant en excès par rapport aux analytes, ces derniers ont moins tendance à former des agrégats qui limitent la création d'ions monomoléculaires (92). Enfin, la longueur d'onde d'émission du laser est constante, contrairement aux autres techniques d'ionisation laser, puisqu'elle est adaptée à la longueur d'onde d'absorption de la matrice et non plus à celle de l'analyte.

À l'heure actuelle, le dépôt en goutte épaisse utilisant l'HCCA est largement utilisé pour les identifications de routine, car la cristallisation obtenue est plus homogène qu'avec la DHB.

### 3.2.3.2. Solvant

Le solvant a pour rôle de :

- Dissoudre la matrice

- Dissoudre l'analyte (macrobiomolécule), elle influence donc par ce biais la répartition de celui-ci au sein des cristaux
- Maintenir le pH de la solution, puisqu'un pH acide <1,8 est favorable pour l'obtention d'un spectre de qualité pour les protéines de masse > 3000 Da (93).

### 3.2.3.3. Dépôt de l'échantillon

Les dépôts d'échantillons bactériens pour analyse au MALDI-TOF se font sur plaque hydrophobe (cible) en acier inoxydable chimiquement inerte vis-à-vis de l'échantillon, comprenant un certain nombre de points de dépôts (spots).

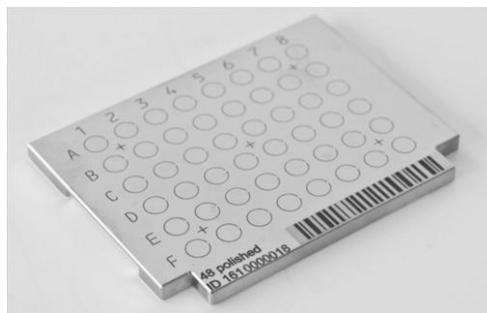


Figure 14 : Cible pour le dépôt des échantillons MALDI-TOF

Le processus de cristallisation de la matrice avec l'échantillon est un point clé dans l'obtention d'un spectre de masse de qualité. Celui-ci est influencé par le ratio analyte/matrice (de 1/1000 à 1/100000 (92)), la distribution de l'analyte au sein des cristaux, ainsi que la morphologie des cristaux qui dépend du type de matrice et de la qualité du dépôt et qui agit sur la reproductibilité des tirs laser, modifiant ainsi la qualité et le délai d'analyse (en effet moins la qualité du spectre obtenu est satisfaisante, plus l'automate réalise de tirs laser sur un échantillon) (94). Ainsi un dépôt fin et régulier est nécessaire : un excès d'échantillon ou un dépôt non homogène sur la cible peuvent générer des spectres de mauvaise qualité. Il faut également prendre garde à ne pas contaminer le spot voisin lors de la manipulation (81).

Plusieurs méthodes de dépôts sont utilisées (95) :

- Préparation en goutte épaisse ou goutte sèche : matrice et échantillon sont mélangés soit dans un tube puis déposés sur la plaque cible, soit directement sur la plaque cible selon 2 techniques :

- La technique « *smear* » : dépôt direct en couche mince d'une colonie bactérienne (monomicrobienne), via un embout de pipette à usage unique (cône), une oese ou un bâtonnet de bois type cure-dent.

*Nota bene* : le dépôt doit être adapté en fonction du type de colonie (petite, grande, sèche, muqueuse...), en effet celui-ci doit être suffisant pour permettre l'analyse mais en contrepartie de meilleurs résultats sont obtenus avec un dépôt plus fin, ce qui peut nécessiter de déposer une seule ou bien plusieurs colonies selon la souche à identifier (95).

- La technique « *bottom layer* » : dépôt d'un échantillon sous forme liquide après extraction à l'éthanol/acide formique qui sèche alors à température ambiante

La matrice en solution est ensuite ajoutée, puis le solvant s'évapore à température ambiante ce qui permet la co-cristallisation de la matrice avec l'échantillon. La cible peut donc être déposée dans le spectromètre de masse.

- Préparation en « couches minces » : l'échantillon est déposé sur une couche de matrice préalablement déposée sur la plaque cible pour former de larges films minces polycristallins.
- Préparation en « sandwich » : l'échantillon est déposé sur un film de matrice avant d'être lui-même recouvert par une dernière couche de matrice.

#### 3.2.3.4. Extraction

Il existe différentes méthodes d'extraction qui peuvent être utilisées préalablement à l'analyse par le spectromètre de masse afin d'améliorer la qualité du spectre obtenu :

- L'extraction à l'éthanol / acide formique permet d'identifier les micro-organismes qui n'ont pas pu être identifiés avec la procédure de dépôt direct (« *smear* » ) (84,96). Les colonies bactériennes sont suspendues dans un mélange eau stérile/éthanol, qui provoque la translocation des protéines cytoplasmiques sans lyser la bactérie, par la formation de pores membranaires (90). Après centrifugation, le culot est additionné d'acide formique qui lyse la paroi bactérienne puis d'acétonitrile qui solubilise les protéines ribosomales et membranaires.
- La méthode Sepsityper® (Bruker®) quant à elle est une étape préalable à cette extraction qui est utilisée pour identifier les micro-organismes directement à partir des flacons d'hémoculture détectés positifs par l'automate. Elle consiste en une

succession d'étapes de lyse et de lavage permettant d'éliminer les hématies et protéines de l'hôte pour récupérer un culot contenant les protéines bactériennes.

De nombreuses études montrent cependant que d'autres méthodes d'extraction que celle proposée par Bruker® peuvent être utilisées pour l'identification bactérienne à partir de flacons d'hémoculture et donner des résultats comparables au MALDI Sepsityper Kit®, telles que des techniques d'extraction utilisant la saponine (97), le chlorure d'ammonium (98), l'acide trifluoroacétique ou l'acide formique (99).

#### 3.2.3.5. Laser

Le laser a pour rôle de provoquer le transfert d'ions de la matrice vers l'analyte, avec comme but de maximiser l'absorption d'énergie photochimique par la matrice et de réduire celle de l'analyte pour minimiser sa fragmentation. Il fournit pour cela une série d'impulsions intenses et brèves. Bien que des lasers IR comme UV peuvent être employés pour obtenir un spectre protéique bactérien (100), pour des raisons financières ce sont principalement des lasers UV tels que le laser à nitrogène ( $N_2$ ,  $\lambda$  émission = 337 nm) qui sont utilisés pour l'identification bactérienne.

#### 3.2.3.6. Conditions de culture

Les conditions de croissance des pathogènes influencent la qualité des spectres qui change de façon plus ou moins importante selon l'âge des cultures et le milieu utilisé (101,102). En effet, les variations environnementales entraînent la production de protéines de fonctionnement cellulaire ou de stress par la bactérie qui modifient le spectre de masse (85,101,103). Ainsi, l'utilisation de milieux sélectifs comme la gélose CNA (acide nalidixique et colistine) (104) ou le stockage à +4°C (manuel Bruker®) diminuent la qualité du spectre obtenu.

Pour obtenir un résultat d'identification optimal il faut donc se placer dans les conditions de réalisation de la banque de données de spectre de masse par le fournisseur. Chez Bruker® par exemple, il est recommandé d'utiliser des géloses de sang de mouton (5%) après 24h à 48h de délai de croissance.

### 3.2.4. Autres applications

#### 3.2.4.1. En Bactériologie

La spectrométrie de masse MALDI-TOF connaît également d'autres applications que l'identification bactérienne :

- Détection de résistance aux antibiotiques : mise en évidence d'enzymes telles que les  $\beta$ -lactamases : ampicillinases, carbapénémases (105–110)... Des études pour dépister la résistance du *S. aureus* à la méticilline ont été réalisées mais n'ont pas permis pour l'instant de différencier les souches résistantes (SARM) des souches sensibles (SASM) (111,112).
- Détection de facteurs de virulence comme la leucocidine de Pantone-Valentine de *S. aureus*, qui a fait l'objet de recherches aux conclusions contradictoires (113,114).
- Identification directement sur le prélèvement : certaines études proposent des applications de la spectrométrie de masse directement sur les urines (115,116).
- Typage épidémiologique par MALDI—RE (MALDI-based resequencing) : il s'agit d'une alternative à la technique MLST (« Multilocus Sequence Typing ») pour le phylogénotypage bactérien (117,118).
- Différenciation de sérovars bactériens : la possibilité de différencier *Salmonella* Typhi des autres sérovars de *Salmonella* via une analyse plus détaillée du spectromètre de masse a été décrite (119).

Ainsi, nombre de travaux ont été réalisés et bien que certaines techniques souffrent encore d'un manque de standardisation, cela montre l'étendue de ce qu'il pourrait être possible de réaliser en Bactériologie avec la technologie MALDI-TOF.

#### 3.2.4.2. Hors Bactériologie

Le MALDI-TOF permet également d'identifier des levures (120–123) et depuis peu des champignons filamenteux, avec chez Bruker® une bibliothèque comprenant actuellement plus de 110 espèces parmi presque 40 genres de champignons filamenteux (124–126).

L'identification était jusqu'alors compliquée en raison de l'impact des conditions de culture sur la pousse du champignon (nécessité d'obtenir un mycélium uniforme), ce qui a été résolu

via une culture standardisée en milieu liquide en rotation constante qui inhibe le processus de germination et la formation de spores, suivie d'une préparation d'une dizaine de minutes (sédimentation, centrifugation du sédiment, lavage du culot à l'eau puis extraction par l'éthanol) avant passage dans l'automate.

### *3.2.5. Systèmes présents sur le marché*

Actuellement, seuls deux fabricants proposent des spectromètres de masse MALDI-TOF pour l'identification bactérienne : Shimadzu® (AXIMA Assurance) récemment racheté par bioMérieux® (VITEK MS) et Bruker Daltonics® (Microflex Biotyper). Les deux automates disposent d'un logiciel de pilotage, d'une banque de données et d'un système expert dont la stratégie pour l'identification d'une souche par analyse des spectres de masse obtenus diffère en fonction du fournisseur (95).

L'étude de Cherkaoui et al. compare les deux systèmes et montre une identification acceptable des bactéries à l'espèce dans 93,6 % des cas pour Bruker® et 88,3 % des cas pour Shimadzu® (127), tandis qu'une étude de Carbonelle et al. trouve une identification au genre et à l'espèce pour 94.9%, 83.4% et 83.8%, 65.9% avec le Biotyper et l'Axima respectivement (128). D'une façon générale, les études montrent une identification significativement meilleure avec le Biotyper par rapport au Vitek-MS (129,130).



Figure 15: Automates VITEK MS (bioMérieux®) et Microflex Biotyper (Bruker®) (de gauche à droite)

Différentes bases de données existent :

- VITEK-MS (bioMérieux®) : environ 645 espèces bactériennes d'intérêt médical (base VITEK-MS), avec une base de données annexe, Saramis (AnagnosTek GmbH®) comportant des espèces agroalimentaires et environnementales.
- Biotyper (Bruker Daltonics®) : près de 4613 souches de référence et 2180 espèces bactériennes, d'intérêt médical, vétérinaire et agroalimentaire.
- Andromas : base de données d'environ 1900 espèces bactériennes d'intérêt médical mais aussi des mycobactéries, des dermatophytes ainsi que les différentes espèces d'*Aspergillus* et les levures, avec un système expert compatible avec les spectromètres de masse distribués par Bruker® et Shimadzu®.

### *3.2.6. Apport par rapport aux techniques d'identification usuelles*

Dans les LBM la technologie MALDI-TOF supplante les méthodes d'identification traditionnelles (phénotypiques : automate Vitek-II®, galeries API®...) pour la plupart des bactéries (120,131,132), car son utilisation est :

- Simple : elle nécessite moins de formation et d'expérience de la part des techniciens
- Rapide : sans extraction, 12 minutes sont nécessaires pour l'identification d'1 isolat et 1h40 pour environ 100 isolats, ainsi que 20 minutes pour 1 isolat et 4h pour environ 100 isolats avec extraction préalable (d'après Bruker®).
- Peu coûteuse pour ce qui est des tests unitaires, en raison de la faible fréquence de maintenance (seules deux intendances annuelles chez Bruker®) et de la faible consommation en réactifs, malgré son important prix d'acquisition

Cette méthode est également plus facile à accréditer, car elle remplace une multiplicité de techniques phénotypiques. En terme de gestion de l'intendance cela signifie aussi moins de commandes à générer, à recevoir, à étiqueter, moins de contrôles de péremption et une diminution des volumes de stockage et de DASRI (déchets d'activité de soin à risque infectieux). De plus, le spectromètre de masse peut être couplé à un automate d'antibiogramme assurant la traçabilité entre identification et antibiogramme, via l'utilisation de logiciels « middleware ».

### 3.2.6.1. Performances

En termes de performance, beaucoup d'études comparant l'identification bactérienne par SM MALDI-TOF avec les méthodes phénotypiques traditionnelles (avec dans la plupart des cas analyse des discordances par PCR séquençage ARN 16S) montrent qu'elle est plus sensible et plus spécifique, avec une meilleure identification à l'espèce (espèces du groupe HACEK par exemple: *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Cardiobacterium*, *Eikenella*, et *Kingella*) et moins d'identifications incorrectes au genre (120,133,134).

La sensibilité dépend de la présence et du nombre de spectres des différentes espèces dans la base de données du fournisseur ; la valeur du score d'homologie obtenu et sa reproductibilité découlant directement du nombre de spectres correspondant à l'espèce recherchée. Ainsi une espèce non présente dans la base de données ne pourra pas être identifiée (pour la base de données Bruker® par exemple, une mise à jour pluriannuelle est réalisée). Plusieurs études montrent cependant que l'identification bactérienne d'environ 95% des espèces rencontrées en routine dans les LBM peut être réalisée par spectrométrie de masse (95,128,133).

Par rapport au séquençage bactérien par PCR ARN 16S l'identification bactérienne par SM MALDI-TOF demeure moins performante mais elle est parfois plus spécifique pour l'identification de certaines bactéries (*Achromobacter ruhlandii*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Ochrobactrum intermedium*, *Enterococcus casseliflavus* et *Pasteurella multocida* (134)). Elle peut tout de même remplacer la biologie moléculaire dans presque 50% des cas, sachant qu'elle est notablement moins coûteuse et plus rapide (environ 48h au minimum sont nécessaires pour un séquençage).

### 3.2.6.2. Limites

Des problèmes d'identification persistent pour certaines espèces bactériennes, décrits dans la littérature ou bien par le fabricant (par exemple chez Bruker®) (135) :

- Les streptocoques notamment le groupe *mitis* sont mal différenciés du *Streptococcus pneumoniae*.
- Les *Shigella* sont pour l'instant indifférenciables d'*E. coli*.

- Pour l'identification de *Listeria monocytogenes*, étant donné que cinq espèces différentes de *Listeria* sont très étroitement apparentées du point de vue taxonomique elles ne peuvent pas généralement être clairement différenciées par le MALDI-TOF.
- Les membres des groupes suivants ne peuvent être différenciés : *Enterobacter* complexe *cloacae*, *Burkholderia* complexe *cepacia*, *Acinetobacter* complexe *baumanii-calcoaceticus*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*
- Les bactéries suivantes présentent des spectres de masse similaires : *Bordetella pertussis* et *bronchiseptica*, *Achromobacter xylosoxidans* et *ruhlandii*, *Bacteroides nordii* et *salyersiae*, *Klebsiella oxytoca* et *Raoultella ornitholytica*.

## Objectifs de l'étude

Les infections ostéo-articulaires sont des infections potentiellement sévères, difficiles à traiter du fait de leur localisation et des pathogènes mis en cause, et dont l'évolution se fait volontiers vers la chronicité si un traitement efficace n'est pas rapidement mis en place. Elles représentent à ce titre un véritable enjeu de santé publique.

Afin de surveiller et d'optimiser la prise en charge de ces infections, le Centre de Référence des Infections Ostéo-articulaires du Grand Ouest (CRIOGO) est créé en 2008 par le ministre en charge de la santé. Celui-ci rassemble les C.H.U. de Rennes et de Tours, en collaboration avec les centres hospitaliers d'Angers, Brest, Nantes et Poitiers. Il a pour mission la coordination, l'expertise, la formation et la recherche ainsi que la prise en charge des infections les plus complexes.

C'est dans ce cadre que s'inscrit l'étude « Spectro-LA », dont l'objectif est de développer une méthode permettant d'établir un diagnostic étiologique plus rapide en caractérisant un prélèvement ostéo-articulaire, infecté ou non, afin d'optimiser la prise en charge médicale des patients souffrant d'IOA. Elle évalue pour cela une technique d'identification bactérienne performante dernièrement introduite dans les laboratoires de Biologie Médicale : la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.

Cette étude a été réalisée de manière prospective sur une durée de 10 mois, de janvier à octobre 2013, au CHU de Rennes. Elle concerne des prélèvements de liquide articulaire ou des prélèvements chirurgicaux de tissus mous, os voire matériel ostéo-articulaire parvenus au laboratoire de Bactériologie et Hygiène hospitalière (Pôle biologie, CHU de Rennes) durant cette période.

Les principaux partenaires du projet sont les services suivants :

- Chirurgie Orthopédique, Réparatrice et Traumatologique et Bloc opératoire des urgences chirurgicales
- Rhumatologie
- Maladies Infectieuses
- Chirurgie Pédiatrique

La question posée par l'étude est la suivante :

*L'analyse directe en spectrométrie de masse du prélèvement et des flacons de culture prolongée, présente-t-elle un intérêt pour le diagnostic des IOA, comparée au résultat de l'examen direct, à l'identification conventionnelle après culture et à la PCR ARN 16S sur le prélèvement ?*

Des échantillons de prélèvements ostéo-articulaires réalisés chez des patients pour lesquels une IOA est suspectée ont donc été étudiés, parallèlement à un examen clinique, par un examen bactériologique standard (examen direct et culture) et une analyse par biologie moléculaire réalisée sur le prélèvement (PCR ARN 16S et séquençage). La spectrométrie de masse MALDI-TOF (Biotyper, Bruker®) a quant à elle été réalisée directement sur les prélèvements ainsi que sur les bouillons d'enrichissement (flacons à hémoculture; Bactec, BD®), avec pour objectif principal de déterminer plus rapidement l'espèce bactérienne causale de l'infection.

L'objectif secondaire de ce travail est d'avoir un aperçu de l'épidémiologie des IOA au CHU de Rennes sur plusieurs mois ainsi que d'évaluer l'efficacité de la technique de spectrométrie de masse MALDI-TOF pour l'identification des échantillons polymicrobiens.

# Matériel et méthodes

## 1. Description de la population étudiée

### 1.1. Critères de participation à l'étude

La population éligible à l'étude est composée de tous les patients (quel que soient leur âge, leur sexe ou leur service) présentant :

- Un épanchement articulaire quelle qu'en soit l'origine suspectée ou connue (arthrite septique, microcristalline, rhumatismale...)
- Une suspicion d'IOA
- Tout type d'articulation ou d'os concerné

Les critères de sélection sont les suivants :

- Critères d'inclusion :
  - Tout patient ayant une ponction de liquide articulaire ou un prélèvement chirurgical ostéo-articulaire
  - Prélèvement arrivant aux heures ouvrables du laboratoire (du lundi au samedi de 7h30 à 17h)
  
- Critères de non inclusion :
  - Patient sous tutelle ou curatelle
  - Patient ayant explicitement manifesté son refus de participer à l'étude, lequel sera mentionné sur la fiche de non opposition présentée au patient par le médecin préleveur par la case « oui » cochée en face de la mention « opposition exprimée »

## 1.2. Recueil des données médicales

Le recueil des informations relatives au patient est réalisé par le biais d'un questionnaire effectué lors de chaque inclusion d'un nouveau patient (*cf. annexe 3 p146*), il rend compte des points suivants :

- *Données démographiques* : âge, sexe
- *Traitement chirurgical ou médical* : existence d'une antibiothérapie au cours du mois précédant la ponction, antécédents de ponction ou d'injection intra-articulaire, de chirurgie ostéo-articulaire (pose ou remplacement de prothèse...), présence d'un traitement immunosuppresseur par voie générale (corticoïdes, chimiothérapie, autres immunosuppresseurs) ou locale (injection de corticoïdes par voie intra-articulaire...) ...
- *Facteurs de comorbidité* : insuffisance rénale chronique, cirrhose, alcoolisme ou toxicomanie, immunosuppression (VIH...), dyslipidémie ou diabète ...
- *Présence d'une pathologie ostéo-articulaire préexistante* : arthrose, arthrite rhumatoïde (polyarthrite rhumatoïde, spondylarthrite), arthrite microcristalline (goutte, chondrocalcinose), traumatisme articulaire, présence d'une prothèse...
- *Recherche de signes cliniques associés* : chaleur/ algie / œdème ou limitation de la mobilité d'une articulation, hyperthermie, atteinte cutanée en regard de l'articulation (inflammation, suppuration...), ancienneté de l'épanchement...

Le recueil des données de l'étude est ensuite réalisé quotidiennement au laboratoire de Bactériologie pour chaque prélèvement inclus, via une feuille de suivi (*cf. annexe 4 p147*) regroupant les points suivants :

- Caractéristiques de l'échantillon : identification, date d'arrivée, aspect, broyage ou non, résultat de l'examen direct et de la cytologie
- Résultats de la culture : délai de pousse, quantité de colonies et milieux concernés
- Résultats de la spectrométrie de masse : score et reproductibilité pour chaque espèce bactérienne identifiée directement sur milieu solide, puis après extraction sur les flacons de culture prolongée et sur le prélèvement

- Résultats de biologie moléculaire : amplification par PCR ARN 16S, séquençage

L'existence d'hémocultures prélevées de façon contemporaine au prélèvement (dans les 7 jours suivant ou précédant celui-ci) dans lesquelles des germes ont été retrouvés est également prise en compte.

## 2. Techniques

### 2.1. Schéma de l'étude

Lors de cette étude ont été inclus de manière prospective 78 patients, ce qui représente 111 prélèvements et 216 flacons Bactec<sup>®</sup>, sur une durée de 10 mois. Les échantillons de prélèvements ostéo-articulaires étudiés concernent des patients atteints d'IOA ou non, selon les critères définis par l'étude.

La spectrométrie de masse type MALDI-TOF (Biotyper, Bruker<sup>®</sup>) est alors réalisée directement sur les prélèvements et sur les bouillons d'enrichissement (flacons Bactec<sup>®</sup>, BD<sup>®</sup>) après traitement préalable grâce au kit MALDI Sepsityper<sup>®</sup> (Bruker<sup>®</sup>). En parallèle ont été réalisés un examen bactériologique standard et une analyse par biologie moléculaire du prélèvement (PCR ARN 16S et séquençage).

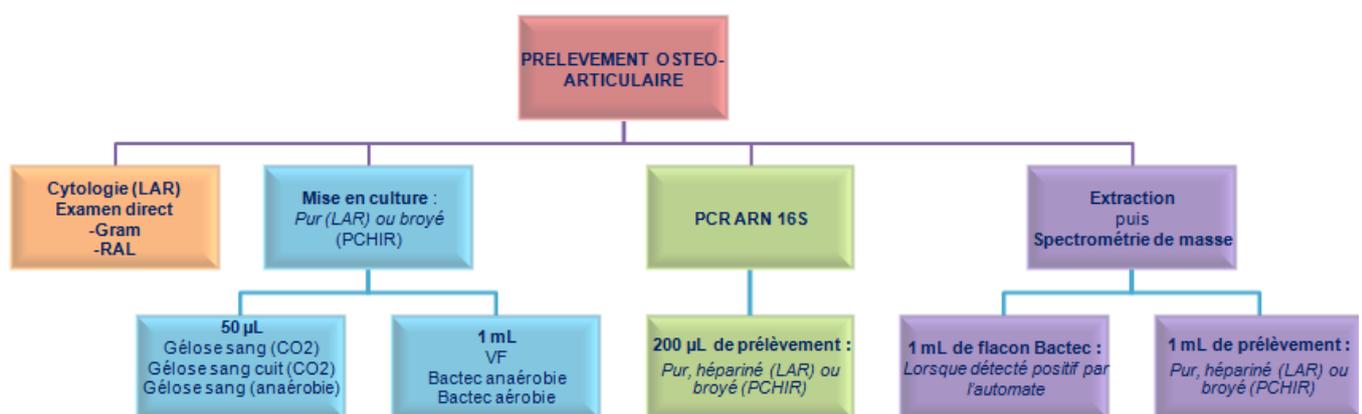


Figure 16: Différentes étapes du traitement d'un prélèvement ostéo-articulaire lors de l'étude « Spectro-LA ».

## 2.2. Examen bactériologique standard des prélèvements ostéo-articulaires

D'après les recommandations de la SFM (46) :

- Prélèvement : réalisé dans le service clinique ou au bloc opératoire

Délai de prise en charge : dans les 2 heures suivant la réception, avec une conservation à température ambiante.

Contenants :

- Os ou fragments d'os, biopsies osseuses, produits d'alésage, tendons... : pot stérile de 30 mL (HDPE Nalgen®)
  - Liquides articulaires : tube Tubes BD Vacutainer® avec héparine pour la numération cellulaire et tube type Falcon® stérile pour la bactériologie
- Analyse cyto bactériologique au laboratoire :
    - Numération des leucocytes et érythrocytes : /mm<sup>3</sup> sur cellule à usage unique (Kova-Slide®, CML, Nemours, France)

Pour les prélèvements ostéo-articulaires hors liquide articulaire ou en cas de prélèvement sanglant voire coagulé impossible à énumérer, une estimation semi-quantitative des éléments est réalisée :

Nombre d'éléments / champ microscopique (10x100)	Libellé de la réponse	Quantité d'éléments / mL	Quantité d'éléments / mm <sup>3</sup>
Aucun	Absence	< 10 <sup>4</sup>	< 10
< 1	Rare	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup>	10 - 100
1 à 4	Quelques	~ 1 à 4.10 <sup>6</sup>	1000 - 4000
5 à 30	Nombreux	~ 10 <sup>7</sup>	10 000
> 30	Très nombreux	~ 10 <sup>8</sup>	100 000

Tableau XV : Correspondance du nombre d'éléments /champ microscopique au 10x100 avec la quantité d'éléments présents dans l'échantillon /mm<sup>3</sup> et /mL, d'après (2)

- Examen direct : coloration de Gram
- Formule cytologique : coloration rapide RAL® (Kit RAL 555, RAL Diagnostics®)

Ces examens sont réalisés avant le broyage éventuel, et dans le cas des colorations à partir d'une pastille de cyto centrifugation (Cytospin®) ou bien directement sur le frottis en cas de prélèvement de consistance visqueuse.

- Broyage :

Des tubes contenant 10 billes en inox (INOX AISI 304 Grade 1000 (afbma) ; Marteau & Lemarié, Pantin) dans 10 ml d'eau distillée (qualité biologie moléculaire), sont préparés et stérilisés au laboratoire de Bactériologie. Le contenu d'un tube est versé sous poste de sécurité microbiologique (PSM) sur chaque échantillon contenu dans un pot stérile (HDPE). Le broyage est effectué à l'aide d'un broyeur à billes (Broyeur Retsch® MM400) réglé de la façon suivante : fréquence 30.0/s, durée : 2 min 30. Les tubes sont conservés à température ambiante, près du broyeur, durant 3 mois maximum (au-delà : stériliser à nouveau).



Figure 17 : Etape de broyage : versement du tube contenant l'eau stérile et les billes dans l'échantillon (136)

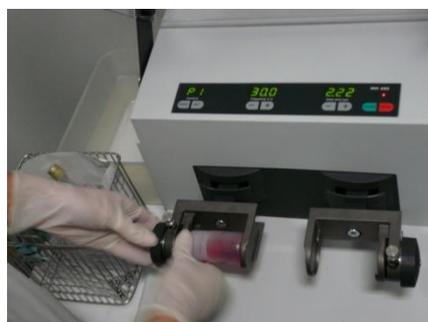


Figure 18 : Etape de broyage : mise en place de l'échantillon dans le broyeur (136)

Le broyage est réalisé :

- systématiquement : pour les prélèvements chirurgicaux solides ou mous
- en cas de quantité < 4 ml : pour les liquides articulaires

- Cultures :

Ensemencement sous PSM à partir du liquide articulaire ou du broyat :

- par isolement en quadrant pour les géloses : gélose Columbia 5% sang de cheval et gélose Chocolat vitox (Oxoid®)
- par inoculation à l'aide d'une seringue (aiguilles de type 1,2x40 et seringues 5 mL ou 10 mL) pour les flacons de culture prolongée Bactec® (BD BACTEC™ Plus Aerobic/F, BD BACTEC™ Lytic/10 Anaerobic/F, BD BACTEC™ Peds Plus/F)

L'incubation est réalisée :

- dans une étuve à 37°C pour les géloses
- dans un automate Bactec® 9240 pour les flacons (agitation et surveillance continue)



Figure 19 : Automate Bactec® 9240

<i>Milieu</i>		<i>Volume</i>	<i>Incubation</i>		<i>Lecture</i>
			<i>Conditions</i>	<i>Durée</i>	
<b>Milieux gélosés</b>	Gélose au sang	50µL	CO <sub>2</sub>	72h	Tous les jours
	Gélose chocolat	50µL	CO <sub>2</sub>	72h	
<b>Milieux liquides</b>	Gélose au sang VF	50µL	anaérobie	5 j	J2, J5
	Flacon Bactec® :	1 mL		10 j	J10
	- Anaérobie	1mL	automate	10 j	Automatique
	- Aérobie	1mL	automate	10 j	Automatique

Tableau XVI : Paramètres de mise en culture ; volume d'échantillon ensemencé, milieux utilisés et conditions d'incubation (atmosphère, durée)

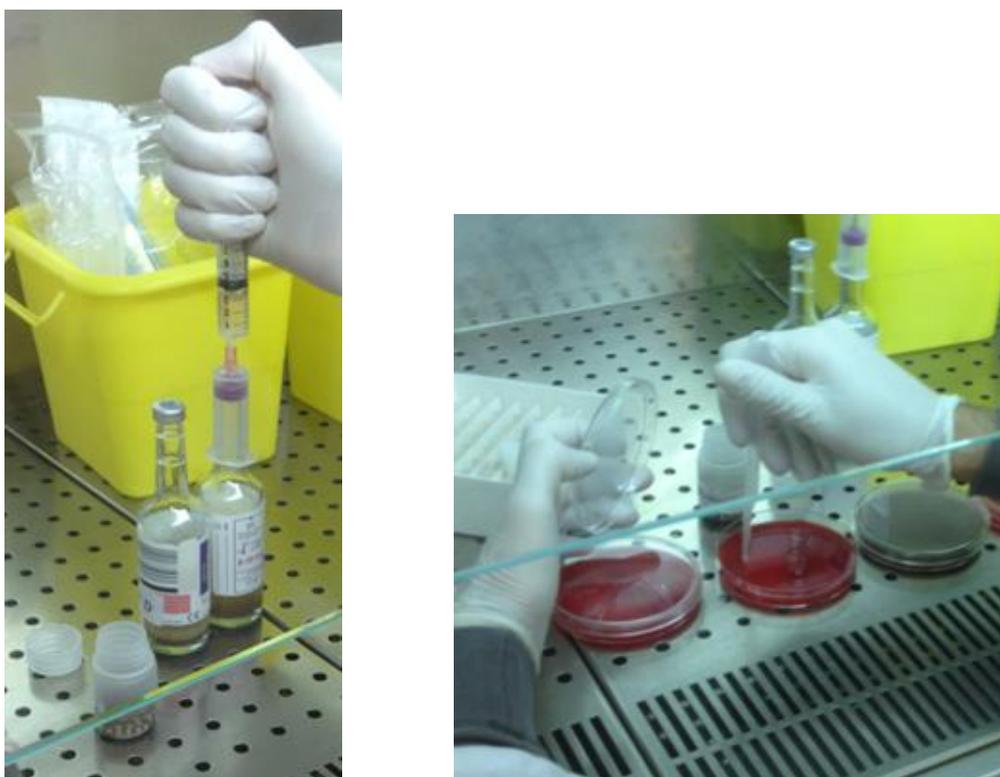


Figure 20 : Ensemencement des milieux de culture : géloses et flacons Bactec (136)

- Suivi des cultures : dénombrement et identification bactérienne sur chaque morphotype de colonie différent observé par prélèvement.

- Suivi des flacons : coloration de Gram des flacons détectés positifs par l'automate et réalisation de subcultures.
- Conservation des échantillons :
  - Prélèvement : congélation à -20°C en microtubes de 500 µL minimum du prélèvement pur (LAR : liquide articulaire) ou du broyat (PCHIR : prélèvement chirurgical) pour la recherche par Biologie Moléculaire.
  - Extraits Sepsityper® : congélation à -20°C en microtubes des extraits issus du prélèvement ou du contenu des flacons Bactec lors de l'étape de mise dans l'éthanol, permettant de réaliser l'extraction éthanol/acide formique dans un délai différé.
  - Souches bactériennes : conservation de toutes les souches en bouillon glycérolé à -20°C pendant une période de 1 an.

## 2.3. Spectrométrie de masse

### 2.3.1. Extraction

La méthode d'extraction utilisée pour les prélèvements ostéo-articulaires et les flacons de culture prolongée qui en sont issus est celle recommandée par Bruker® pour les flacons d'hémoculture.

Elle consiste en une extraction par la méthode Sepsityper® suivie d'une extraction à l'éthanol/acide formique. L'extraction à l'éthanol/acide formique peut être utilisée seule (non précédée d'une extraction Sepsityper®) pour les colonies bactériennes issues de culture sur milieu gélosé pour lesquelles l'identification simple par spectrométrie de masse n'est pas satisfaisante.

L'extraction a été réalisée dès la réception du prélèvement et dès le signal de la détection de croissance par l'automate pour les flacons Bactec®. Il n'est pas possible de différer l'analyse en conservant les échantillons à -20°C, sous peine d'altérer le spectre obtenu en spectrométrie de masse, d'après les données du fournisseur (Bruker®).

- Extraction avec le kit Sepsityper® (Bruker®) :

A partir d'1 ml de prélèvement ou de flacon de culture prolongée détecté positif par l'appareil, dans un tube eppendorf conforme pour le Biotyper :

- Ajout de 200 µL de Buffer Lysis, puis 10 secondes d'agitation par vortex
- Centrifugation 1 minute/13 000 rpm (centrifugeuse Thermo Scientific®)
- Elimination du surnageant et remise en suspension du culot dans 1 mL de Washing Buffer
- Centrifugation 1 minute/13 000 rpm
- Elimination du surnageant et remise en suspension du culot dans 300 µL d'eau déminéralisée
- Ajout de 900 µL d'éthanol absolu

*Cette suspension eau/éthanol peut être conservée jusqu'à 6 mois à -18° et contient les organismes sous forme inactivée.*



Figure 21 : Kit d'extraction MALDI Sepsityper® (Bruker®)

- Extraction à l'éthanol/acide formique :

A partir de la suspension précédente :

- Centrifugation 2 minutes/13 000 rpm
- Elimination du surnageant et séchage du culot
- Ajout de 10 à 40 µL d'acide formique à 70% (Sigma-Aldrich®) en fonction de la taille du culot, homogénéisation par aspiration-refoulement

*Le volume d'acide formique peut être réduit suivant la quantité de matériel disponible, jusqu'à 10 µL en cas de culot de faible volume afin de ne pas diluer le signal dans un volume trop important.*

- Ajout d'un volume d'acétonitrile (Sigma-Aldrich®) équivalant au volume d'acide formique utilisé, puis homogénéisation
- Centrifugation 2 minutes/13 000 rpm

L'extrait bactérien obtenu est ensuite analysé sur le spectromètre de masse.

### 2.3.2. Analyse au spectromètre de masse

- Dépôt de l'échantillon sur la cible (plaque en inox réutilisable comprenant 96 spots) :
  - o Colonie bactérienne (technique « smear ») : étalement de la colonie en film mince sur la totalité du « spot » à l'aide d'un embout de pipette type cône de P100 ou d'une anse plastique à usage unique.

*Précautions : utilisation d'un échantillon pur monomicrobien, en faisant attention à ne pas prélever de gélose.*

- o Prélèvements ou flacons Bactec® après extraction Sepsityper® - éthanol/acide formique (technique « bottom layer ») : dépôt de 1,2 µL d'extrait bactérien.
- Dépôt de 1,2 µL de Bacterial Test Standard (BTS) sur la cible.

Celui-ci est composé d'un mélange d'extrait d'*E. coli* ATCC 25922 (American Type Culture Collection), de RNase et de Myoglobine, reconstitué selon les recommandations du fabricant (Bruker®). L'IVD MALDI Biotyper® effectue une validation automatique via le BTS pour vérifier les performances de l'instrument chaque fois qu'une séquence d'identification est lancée (il rend compte de différents paramètres du système, qui ensuite sont comparés à une échelle de valeur du fabricant).



Figure 22 : Bacterial Test Standard (Bruker®)

- Séchage à température ambiante.
- Dépôt de 1,2  $\mu\text{L}$  de matrice HCCA (Bruker®) sur chaque « spot » par capillarité à l'aide d'une pipette, dans les 15 minutes suivant le dépôt.



Figure 23 : Matrice HCCA (Bruker®)

- Séchage à température ambiante.
- Passage dans les 4h suivant le dépôt au spectromètre de masse MALDI TOF (Microflex LT/SH Biotyper, Bruker® : laser à nitrogène 337 nm, analyseur TOF linéaire, logiciel IVD MALDI Biotyper® 2.3).

## 2.4. Biologie moléculaire : PCR ARN 16S et séquençage

Les étapes de réalisation de la PCR ARN 16S suivie du séquençage sont les suivantes :

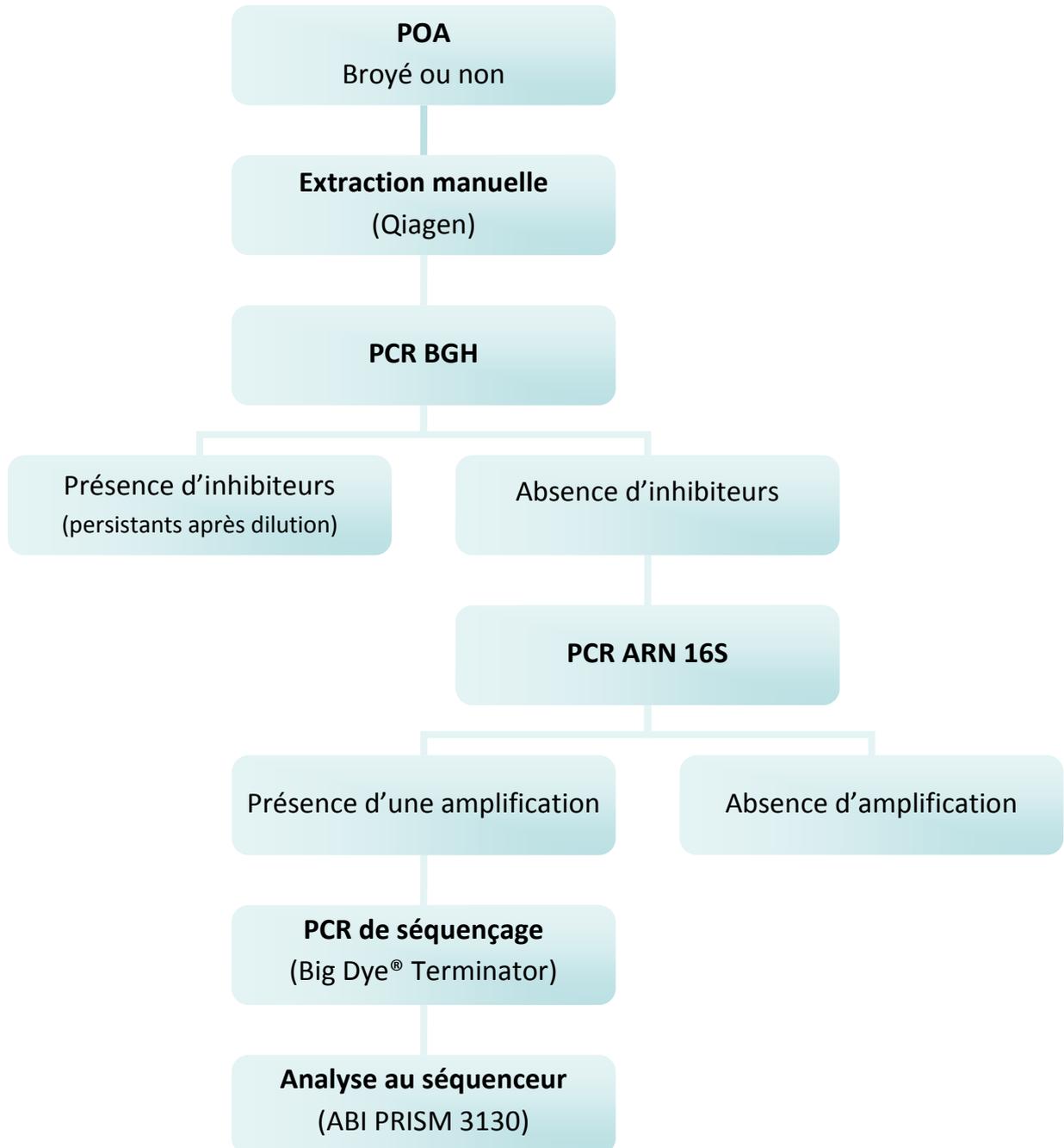


Figure 24: Etapes de réalisation de la PCR ARN 16S et du séquençage sur les prélèvements ostéo-articulaires

- Extraction de l'ADN bactérien à partir du prélèvement :

Il s'agit d'une extraction manuelle à l'aide du kit QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) : par adsorption puis élution de l'ADN sur une membrane de silice en présence de fortes concentrations de sel, avec une étape de lyse des tissus par la protéinase K au préalable.

Une succession de 3 PCR est ensuite réalisée :

- PCR du gène de la  $\beta$ -globine humaine (BGH) :

Il s'agit d'une PCR en temps réel qui amplifie le gène de la  $\beta$ -globine humaine, réalisée sur un thermocycleur StepOne Plus® (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Elle a pour but de rechercher les éventuels inhibiteurs de la réaction de PCR présents dans le prélèvement (68) :

- Tout échantillon d'origine humaine devrait être positif, tandis qu'une souche bactérienne seule par exemple (ne possédant donc pas ce gène) ne présentera pas d'amplification.
- En l'absence d'amplification une dilution au 1/10<sup>e</sup>, 1/20<sup>e</sup> puis 1/40<sup>e</sup> est réalisée afin de diminuer l'effet inhibiteur. Si celui-ci persiste, le résultat de la PCR ARN 16S ne peut être interprété.

Amorce B.G.H. sens : 5'- GCA AGG TGA ACG TGG ATG AA – 3'  
 Amorce B.G.H. antisens : 5'- AAC CTG TCT TGT AAC CTT GAT ACC AA – 3'  
 Sonde B.G.H. : VIC-5'- TTG GTG GTG AGG CCC TGG GC –TAMRA-3'

Figure 25 : PCR BGH : séquence nucléotidique des amorces et de la sonde utilisés

>U01317. Humanbetaglobin[gi:455025]  
 gagccacaccctagggttgccaatctactcccaggagcagggagggcaggagccagggctgggcataaaagtcaaggcagagccatctattgcttacatttg  
 cttctgacacaactgtgttactagcaaacctcaaacagacaccatggtgcacctgactcctgaggagaagtctgccgttactgccctgtgggcaaggtgaacct  
 ggatgaagtgggtgtagggcctggcaggcttggtatcaaggttacaagacaggtttaaggagaccaatagaaactgggcatgtgagaca

Figure 26 : Séquence nucléotidique du gène de la beta-globine humaine

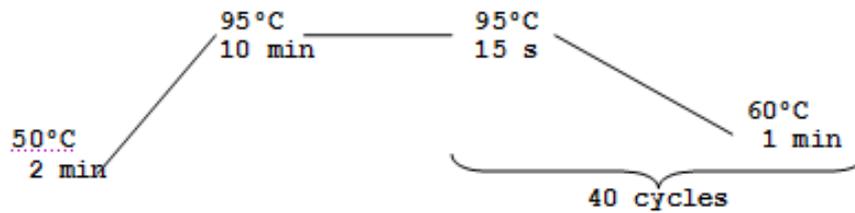


Figure 27 : Cycles de la PCR BGH

- PCR pour amplification du gène de l'ARN 16S :

Elle est réalisée en point final et comporte 2 couples d'amorces encadrant le gène de l'ARN 16S : PB/UNI21 et UNI14/P13B sur un thermocycleur GeneAmp PCR® System 9700 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France).

Une migration par électrophorèse (80 volts, 2h) sur gel d'agarose à 1,2% (Seakem LE® Agarose, LONZA, Rockland ME USA) en présence d'un agent intercalant de l'ADN (SyberGreen®) avec révélation sous UV permet de savoir si l'amplification a fonctionné ou non, en regardant la présence des produits par comparaison à des témoins positifs et négatifs ainsi qu'à un marqueur de poids moléculaire.

PB : 5'-TAA CAC ATG CAA GTC GAA CG-3'  
 UNI21 : 5'-ACA CGA GCT GAC GAC AGC CA-3'  
 UNI14 : 5'-GTG CCA GCA GCC GCG GTA AT-3'  
 P13B : 5'-CGG GAT CCC AGG CCC GGG AAC-3'

Figure 28 : PCR ARN 16S : séquence nucléotidique des amorces

```

aaattgaagagtttgatcatggctcagattgaacgctggcggcaggcctaacacatgcaa ← PB >
gtcgaacggtaacaggaagaagcttgcctcctttgctgacgagtgccggacgggtgagtaa
tgtctgggaaactgcctgatggaggggataactactggaaaacggtagctaaataccgcat
aacgtcgcgaagaccaaagagggggacctcgggacctctgcccacggatgtgccagatg
ggattagctagtaggtgggtaacggctcacctaggcgaagatccctagctggtctgaga
ggatgaccagccacactggaactgagacacgggtccagactcctacgggagggcagcagtg
ggaatattggcacaatggcgcgaagcctgatgcagccatgccgcgtgtatgaagaaggcct
tcgggttgtaaaagtactttcagcggggagggaagggagtaaaagttaatacctttgctcatt
gacgttaccgcgagaagaagcaccggcctaactccgtgccagcagccgggtaatacgggag
ggtgcaagcgttaatcggaattactgggcgtaaaagcgcacgcaggcgggttggtaagtca
gatgtgaaatccccgggctcaacctgggaactgcatctgatactggcaagcttgagtctc
gtagagggggtagaattccaggtgtagcgggtgaaatgcgtagagatctggaggaataacc
ggtaggggaagggcccccctggacgaagactgacgctcaggtgcgaaagcgtggggagca
aacaggattagataccctggtagtccacggcgtaaacgatgtcgaactggagggttgtgcc
cttgaggcgtggcttccggagctaacgcgttaagtgcaccgctggggagtacggccgca
agggtaaaaactcaaatgaattgacggggcccgccacaagcgggtggagcatgtggttaat
tcgatgcaacgcggaagaaccttacctggcttgacatccacggaagttttcagagatgag
aatgtgccttcgggaaccgtgagacaggtgctgcatggtctgctcagctcgtgttgga
aatgttgggttaagtcccgcaacgagcgcacacccttatccttggtagcagcgggtccggc
cgggaactcaaggagactgccagtgatagcgcaacgcaacgcaacgcaacgcaacgcaactgacgtcaagtc
atcatggccttacgaccagggctacacacgctgctacaatggcgcatacaaaagagaagcg
acctcgcgagagcaagcggacctcataaaagtgcgtcgtagtcgggattggagctcgcacac
tcgactccatgaaatcgggaagcggctaatcgtggatcagaatgccaccgggaatcgg
tcocgggacctgtadacacccccgtccacccacgggaggggttgcaaaagaagttagt
agcttaaccttcgggagggccttaccactttgtgattcatgactggggtggaagtctgaa
caaggaaccgtaggggaaccgcgcaacgcaacgcaacgcaacgcaacgcaacgcaacta
  
```

Figure 29 : Disposition des amorces sur le gène *rrs* d'*Escherichia coli* (1542 pb)

94°C pendant 7 mn	94°C pendant 30 secondes	55°C pendant 30 secondes	72°C pendant 1 mn	72°C pendant 10 mn	4°C jusqu'à électrophorèse
35 cycles					

Tableau XVII : Cycles de la PCR ARN 16S

L'échantillon amplifié est purifié sur une résine déshydratée Sephadex G100 (Bio-Gel®, BioRad Laboratories Inc, Marnes La Coquette, France). Ceci permet d'éliminer les amorces et autres débris de la réaction et de récupérer l'ADN double brin du gène amplifié.

- PCR de séquençage Big Dye® Terminator :

Elle est réalisée à l'aide du kit Big Dye Terminator cycle sequencing Ready Reaction version 3.1 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) selon les recommandations du fabricant.

Elle permet l'élongation du gène amplifié afin d'obtenir des fragments nucléotidiques de taille variable, par incorporation au hasard d'un nucléotide terminateur de chaîne marqué par un fluorochrome possédant un spectre d'émission propre à chaque nucléotide.

Il s'ensuit une étape de purification à l'aide d'un système de billes magnétiques.

- Séquençage :

Dans l'appareil ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems, Applied Biosystems France SA) a lieu la migration par électrophorèse capillaire des fragments en fonction de leur taille et de leur charge (les plus petits sortent en 1<sup>er</sup>) puis la lecture de la séquence par fluorescence.

Les séquences obtenues sont ensuite alignées et corrigées à l'aide des logiciels Applied Biosystem (Sequencing Analysis) et/ou Bionumerics. Une comparaison à la base de données BLAST de NCBI permet l'identification.

### 3. Critères de jugement

#### 3.1. Critères d'infection

Un ensemble de critères est pris en compte pour différencier les patients non infectés de ceux atteints d'infection ostéo-articulaire : arthrite septique, infection sur matériel, ostéomyélite...

##### *3.1.1. Critères cliniques*

- Infection sur prothèse : présence de fistule et/ou de pus lors de l'intervention (d'après les recommandations du SPILF en 2009 (7) et de l'IDSA en décembre 2012 (59))
  
- Arthrite septique :
  - Erythème, algie, hyperthermie, limitation de la mobilité au niveau d'une articulation (10)
  - Le critère clinique est **peu spécifique** d'un phénomène infectieux car il est valable pour le diagnostic des arthrites en général, que leur origine soit septique ou non (137), il n'est donc pas seul suffisant pour faire le diagnostic d'arthrite septique.

### 3.1.2. Critères bactériologiques

Pour cette étude :

- Deux souches bactériennes sont considérées identiques si l'espèce et l'antibiogramme sont identiques (raisonnement adopté en pratique quotidienne au laboratoire).
- Un échantillon est dit positif si au moins 1 milieu de culture est positif, parmi les 6 milieux ensemencés (4 milieux solides et 2 milieux liquides).

Des critères spécifiques en fonction du type d'infection sont ensuite appliqués :

- **Infection sur prothèse** : par culture bactérienne et/ou par biologie moléculaire sur le prélèvement
- Echantillon : série de 5 prélèvements ostéo-articulaires étagés
- Critères d'infection monomicrobienne : d'après l'IDSA (59)
  - $\geq 1$  prélèvement positif à une souche bactérienne pathogène stricte ou rare : *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*...
  - $\geq 2$  prélèvements positifs à une souche bactérienne appartenant à la flore cutanée : *P. acnes*, Staphylocoques à coagulase négative...

*Nota bene* : les critères de la SPILF (7) prennent en compte  $\geq 3$  prélèvements positifs à une souche bactérienne appartenant à la flore cutanée comme critère d'infection monomicrobienne ; ce critère plus restrictif que celui de l'IDSA (59) n'a pas été retenu pour l'étude.

- Critères d'infection polymicrobienne : il n'existe actuellement pas de consensus sur le diagnostic des infections polymicrobiennes sur prothèse, les critères d'interprétation proposés ici donc sont issus de l'étude Microbios du CRIOGO : Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC) 2010 - Dr Pascale Bemer (CHU de Nantes) :
  - Association de  $\geq 3$  prélèvements positifs à une souche bactérienne cutanée et  $\geq 1$  prélèvement positif à une souche bactérienne pathogène stricte ou rare
  - Association de  $\geq 2$  prélèvements positifs à 2 ou 3 souches bactériennes pathogènes strictes ou rares

- Association de  $\geq 3$  prélèvements positifs à 2 ou 3 souches bactériennes appartenant à la flore cutanée

- **Arthrite septique :**

- Echantillon : prélèvement de liquide synovial

En l'absence de consensus dans la littérature, il a été décidé d'un diagramme décisionnel comprenant un seuil minimal de leucocytes  $> 1700 /\text{mm}^3$  dans le liquide synovial (d'après le seuil défini pour les infections sur prothèse par la SPILF (7)), celui-ci pouvant varier de  $1100/\text{mm}^3$  jusque plus de  $50\,000 /\text{mm}^3$  selon les études ((10) ; (137)) :

- Cytologie :
  - $< 1700$  leucocytes  $/\text{mm}^3$  : origine non infectieuse, sauf cas particulier (immunosuppression...)
  - $> 1700$  leucocytes  $/\text{mm}^3$  : recherche de cristaux :
    - Positive : arthrite microcristalline

*Nota bene* : il est possible d'observer une arthrite septique chez un patient atteint d'arthrite microcristalline sur la même articulation, la positivité de la culture ou de la biologie moléculaire est donc dans ce cas également prise en compte.

- Négative : culture bactérienne et/ou PCR ARN 16S sur le prélèvement :
  - Négative : absence de critère bactériologique
  - Positive :
    - Bactérie pathogène strict ou rare : critère bactériologique positif
    - Bactérie de la flore cutanée ou peu pathogène : nécessite un 2ème prélèvement de LAR positif avec la même souche bactérienne et/ou une hémoculture positive avec la même souche pour que le critère soit positif.

**Arthrite sur matériel** : dans cette étude, cette terminologie est utilisée les prélèvements de liquide articulaire avec présence de matériel associé au niveau de l'articulation ponctionnée et pour lesquels les critères d'arthrite septique sont positifs. Il s'agit dans la plupart des cas de patients pour lesquels les 5 prélèvements chirurgicaux n'ont pas été réalisés car ils ne

peuvent être opérés, ou bien en cas d'infection avec une souche bactérienne sensible aux antibiotiques et ayant peu d'adhérence au matériel pour laquelle la chirurgie n'est pas envisagée (traitement par lavage et antibiothérapie) ...

### 3.1.3. Classification

Les patients sont ainsi répartis en fonction des critères définis précédemment dans le groupe des infections certaines, probables ou exclues :

<b>Infection sur prothèse</b>		Critère clinique	
		Présent	Absent
Critère bactériologique	Présent	<i>Infection certaine</i>	<i>Infection probable</i>
	Absent	<i>Infection probable</i>	<i>Infection exclue</i>

Tableau XVIII : Classement des patients en infection sur prothèse certaine, probable ou exclue en fonction de la présence ou non des critères bactériologique et clinique

<b>Arthrite septique</b>		Critère clinique	
		Présent	Absent
Critère bactériologique	Présent	<i>Infection certaine</i>	<i>Infection probable</i>
	Absent	<i>Infection exclue</i>	<i>Infection exclue</i>

Tableau XIX : Classement des patients en arthrite septique certaine, probable ou exclue en fonction de la présence ou non des critères bactériologique et clinique

La sensibilité et la spécificité des différentes techniques sont ainsi évaluées et comparées par rapport aux groupes de population suivants :

- Patients infectés : classés dans le bras infection certaine ou infection probable
- Patients non infectés : classés dans le bras infection exclue

Pour le diagnostic des infections sur prothèse ou matériel un seul des deux critères bactériologique ou clinique suffit à classer le patient dans le groupe des infections probables (l'infection est dite certaine si les deux sont présents), tandis que pour l'arthrite septique le critère bactériologique est obligatoire pour classer celui-ci dans le bras des infections probables.

En effet, le critère clinique étant peu spécifique d'un phénomène infectieux il n'est pas seul suffisant pour classer l'infection en infection probable et sert uniquement à différencier une infection certaine et d'une infection probable, si celui-ci est présent de façon concomitante avec le critère bactériologique.

#### ***3.1.4. R.C.P.***

Pour les infections ostéo-articulaires autres (ostéomyélite, spondylodiscite...) ou complexes, en l'absence de recommandations consensuelles, les dossiers des patients concernés ont été évalués en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) du CRIOGO selon un ensemble de critères radiologiques, cliniques, bactériologiques...

Lors d'une séance, quatre spécialités du corps médical comptent obligatoirement un représentant : Chirurgie orthopédique, Radiologie, Infectiologie et Microbiologie. De nombreuses autres spécialités sont cependant fréquemment représentées comme la rhumatologie, la pharmacologie ou toute autre spécialité médico-chirurgicale concernée par le dossier étudié.

### **3.2. Critères d'identification bactérienne par spectrométrie de masse**

Les critères pris en compte sont basés en partie sur les recommandations du fabricant (Bruker®) :

- Score  $\geq 1,7$  pour une identification probable au genre ou 2 pour une identification probable à l'espèce,  
et/ou
- Reproductibilité acceptable c'est-à-dire au moins 3 espèces identiques dans la liste de résultats présentée, à l'exception des bactéries rares dont le spectre est présent

moins de 3 fois dans la base de données du spectromètre de masse et qui ne peuvent donc pas avoir de reproductibilité acceptable.

Les résultats d'identification par spectrométrie de masse sont classés ainsi :

- Critères acceptables pour l'identification :
  - « Positif monomicrobien » : identification d'une seule espèce de score et/ou de reproductibilité acceptable, qui peut être correcte ou incorrecte (différente de l'espèce bactérienne attendue)
  - « Positif polymicrobien » : identification de  $\geq 2$  espèces de score et/ou de reproductibilité acceptable chacune,
- Critères non acceptables pour l'identification :
  - « Degré de confiance insuffisant pour l'identification » : identification d'espèce avec un score et une reproductibilité inacceptable,
  - « Négatif » : absence de pics.

### **3.3. Critère de biologie moléculaire par PCR ARN 16S**

Les résultats d'amplification sont classés ainsi :

- « Négatif »,
- « Positif » (sur échantillon pur, ou dilué pour éliminer les inhibiteurs)
- « Ininterprétable, persistance des inhibiteurs après dilution ».

Si l'amplification est positive les résultats du séquençage sont répertoriés de la façon suivante :

- Identité de la bactérie et pourcentage de similitude de la séquence obtenue par rapport aux données de la base BLAST de NCBI, avec une homologie  $\geq 98\%$  (138).
- Présence de séquences peu informatives ou non analysables ne permettant pas de conclure.

Le critère par biologie moléculaire est acceptable si l'amplification 16S est positive (au pur ou après dilution) et si le séquençage permet l'identification correcte d'une espèce bactérienne.

## 4. Analyse des résultats

### 4.1. Termes à comparer

L'analyse des résultats se fera par comparaison de :

- Sensibilité et spécificité de l'identification directement par spectrométrie de masse sur le prélèvement et :
  - Cultures bactériennes
  - PCR ARN 16S sur le prélèvement
  - Examen direct sur le prélèvement
  
- Score d'identification directement sur le flacon Bactec® :
  - Par rapport à l'identification sur milieu gélosé (colonies)
  - Selon le type de flacon (aérobie et anaérobie)
  - Selon type bactérien (bacilles à Gram négatif, Staphylocoques, Streptocoques, Anaérobies...)
  - Sur les flacons polymicrobiens
  
- Délais d'identification :
  - Sur milieu gélosé : le délai de positivité des cultures pris en compte était soit de 24h (jour 1), 48h (jour 2), 36h (jour 3)... ou 10j, selon le milieu de culture concerné et les recommandations de l'instruction de travail.
    - *Nota bene* : les cultures anaérobies sont observées à partir de 48h.
  - Sur flacon : les flacons détectés positifs par l'automate sont classés en fonction du délai (en heures) fourni par l'automate : 12 à 24h (jour 1), 24 à 48h (jour 2), 48 à 72h (jour 3)... En cas de délai < 12h ceux-ci ont été considérés comme positifs au jour 0, car au laboratoire les flacons détectés positifs sont analysés 2 fois par jour (matin et après-midi).

## 4.2. Exploitation statistique

- Calculs de sensibilité, spécificité, valeurs prédictive positive et négative :

	Malade	Non-malade	
Positif	a	b	a + b
Négatif	c	d	c + d
Total	a + c	b + d	N

Tableau XX : Recueil des données pour le calcul de sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive et négative

Sensibilité (Se) : probabilité qu'un test réalisé sur une personne malade se révèle positif, c'est à dire nombre de personnes malades et positives au test (vrais positifs) parmi l'ensemble des personnes malades.

$$Se = a / ( a + c )$$

Spécificité (Sp) : probabilité qu'un test réalisé sur une personne saine se révèle négatif, c'est à dire nombre de personnes non-malades et négatives au test (vrais négatifs) parmi l'ensemble des personnes non-malades.

$$Sp = d / ( b + d )$$

Valeur prédictive positive (Vpp) : probabilité que le sujet soit malade si le test est positif, c'est-à-dire nombre de vrais positifs parmi l'ensemble des tests positifs.

$$Vpp = a / ( a + b )$$

Valeur prédictive négative (Vpn) : probabilité que le sujet soit indemne si le test est négatif, c'est-à-dire nombre de vrais négatifs parmi l'ensemble des tests négatifs.

$$Vpn = d / ( c + d )$$

- Traitement par logiciel de biostatistique pour l'obtention de courbes ROC (« Receiver Operating Characteristic ») : Stata® 9.0 (« Data analysis and Statistical Software »), calcul de l'AUC (« Area under Curve ») et de son intervalle de confiance (IC) à 95%
- Test du  $\chi^2$  et test exact de Fisher, avec un risque relatif  $\alpha = 5\%$

# Résultats

## 1. Caractéristiques de la population étudiée

### 1.1. Echantillonnage

Le résultat du recueil des échantillons est le suivant :



Figure 30: Détail des patients, des prélèvements et des flacons inclus ou non dans l'étude « Spectro-LA » (LAR = liquide articulaire, PCHIR = prélèvement chirurgical)

Au total 111 prélèvements ont été analysés :

-70 dont l'analyse a porté en plus de l'examen bactériologique standard (culture, examen direct) sur l'étude en PCR ARN 16S puis spectrométrie de masse après extraction

directe des prélèvements, et sur l'analyse en spectrométrie de masse après extraction des flacons Bactec.

-41 dont l'analyse a porté en plus de l'examen bactériologique standard uniquement sur l'analyse en spectrométrie de masse après extraction des flacons Bactec (principalement en raison d'une quantité insuffisante du prélèvement pour réaliser la PCR ARN 16S et la SM). 2 patients ont été exclus car le diagnostic réalisé n'entraîne finalement pas dans le cadre des IOA (1 cellulite du dos de la main et 1 hématome surinfecté avec fistule sous-cutanée). 6 flacons Bactec n'ont pas étéensemencés à l'arrivée du prélèvement et 4 ont été exclus car non extraits pour des raisons techniques.

## 1.2. Diagnostic

Le diagnostic définitif est porté sur l'ensemble des arguments clinico-biologiques et radiologiques :

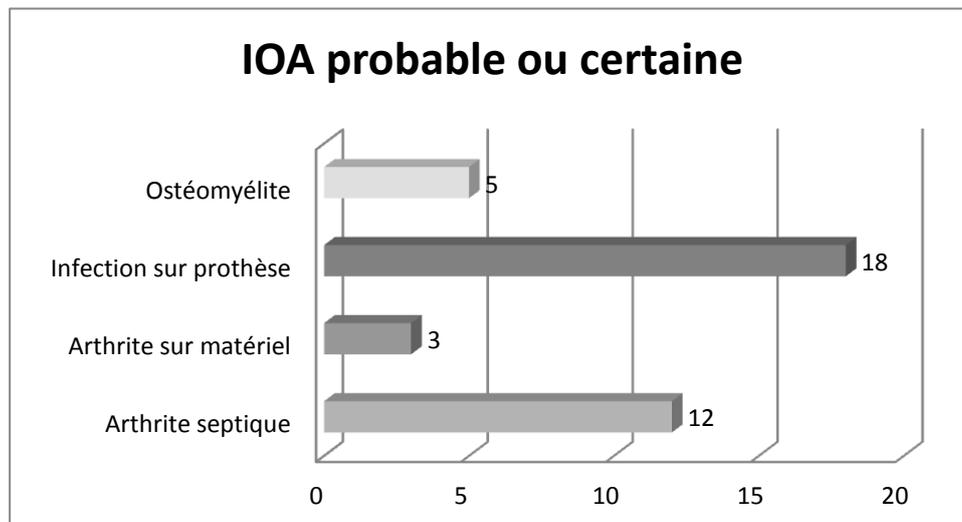


Figure 31 : Diagnostic porté chez les patients atteints d'IOA (n = 38)

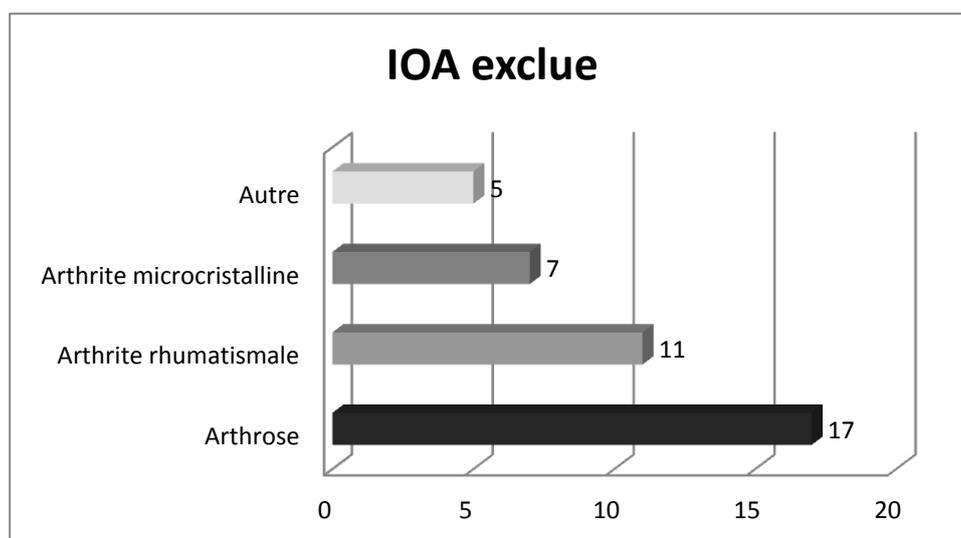


Figure 32: Diagnostic porté chez les patients non atteints d'IOA (n = 40)

### 1.3. Epidémiologie

Paramètre	Infection ostéo-articulaire probable ou certaine	Infection ostéo-articulaire exclue
Patients	38	40
Prélèvements	64	47
Age - Moyenne (médiane)	55,8 (63)	64,5 (66)
- Ecart	1 - 92	27 - 93
Sexe - Homme	27	22
- Femme	11	18
- Sexe ratio	2.45	1.22
Antibiothérapie dans le mois précédent (%)	9 (23.7)	5 (12.8) (1 NR)
Antécédent de ponction ou de chirurgie locale (%)	26 (68.4)	26 (65.0)
Immunosuppression locale ou générale (%)	2 (5.1)	17 (42.5)
Facteurs de risque autres (%)	18 (47.4)	18 (45.0)
Pathologie ostéo-articulaire (%)	30 (78.9)	36 (90.0)
Atteinte cutanée en regard (%)	12 (30.8)	0 (0)
Infection sur matériel (%)	22 (57.9)	0
Hémocultures positives (%)	8 (25,0) (6 non réalisées)	0

Tableau XXI : Données épidémiologiques relatives aux patients atteints d'IOA ou non

Les 2 populations semblent comparables en ce qui concerne le nombre d'éléments inclus (38 patients infectés pour 40 non infectés), l'existence d'une pathologie ostéo-articulaire préalable, la présence d'antécédents de ponction ou de chirurgie locale ainsi que de facteurs de risques d'IOA.

Bien que l'écart d'âge des patients inclus soit étendu (de 1 à 93 ans), l'âge des 2 populations étudiées est similaire, avec une médiane autour de 64,5 ans. Le sex ratio apparaît par contre supérieur dans la population infectée.

#### 1.4. Nombre d'articulations atteintes

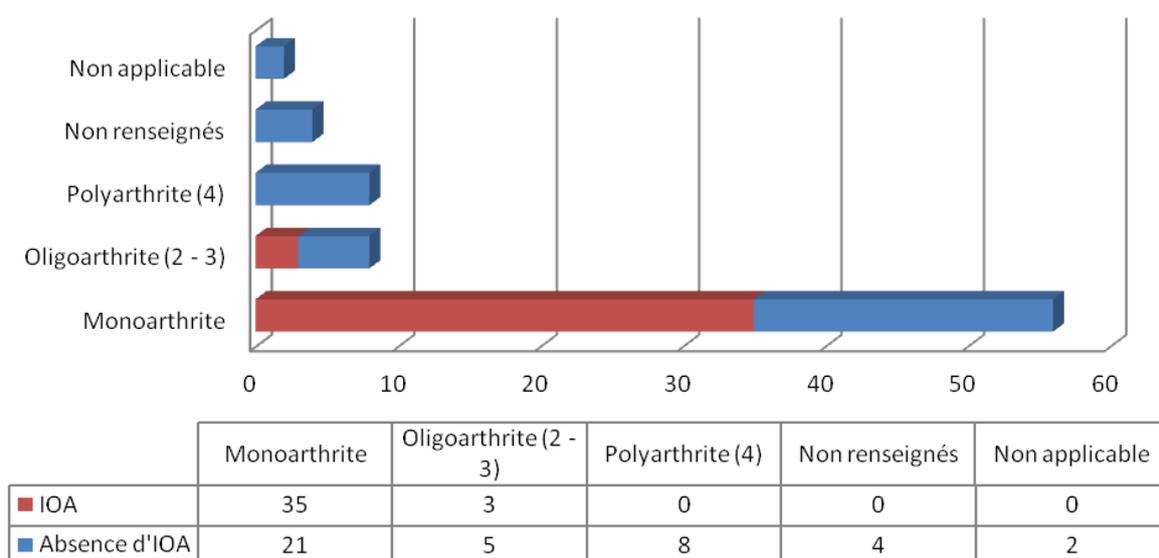


Figure 33: Nombre d'articulations cliniquement symptomatiques chez les patients atteints d'IOA ou non

### 1.5. Type d'articulations atteintes

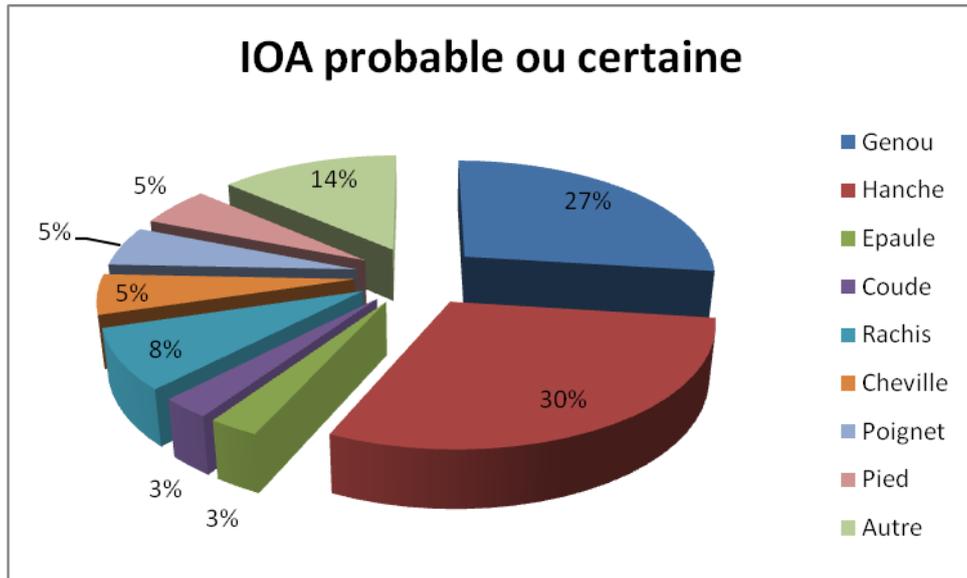


Figure 34: Localisation de l'articulation cliniquement symptomatique chez les patients atteints d'IOA

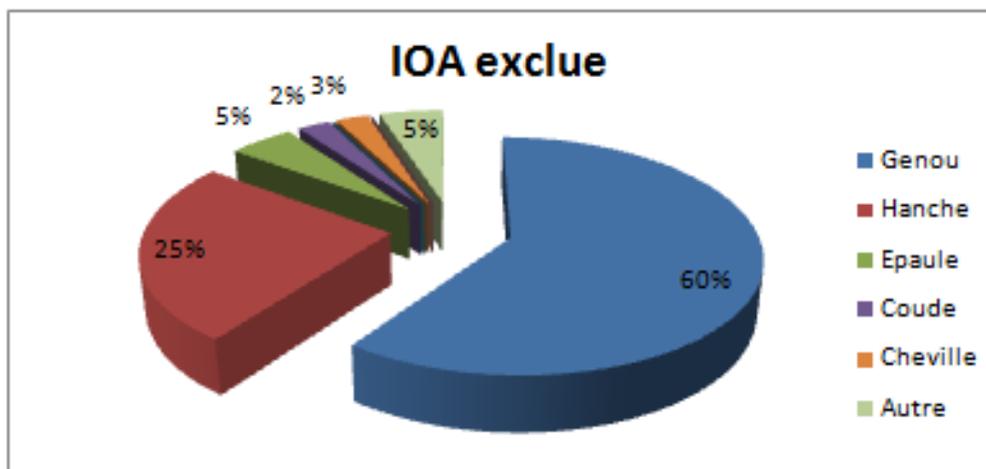


Figure 35: Localisation de l'articulation cliniquement symptomatique chez les patients non atteints d'IOA

La catégorie « autre » comprend les atteintes osseuses non situées sur une articulation regroupant notamment certains patients atteints d'ostéomyélite : tibia, phalange...

## 1.6. Facteurs de risque d'IOA

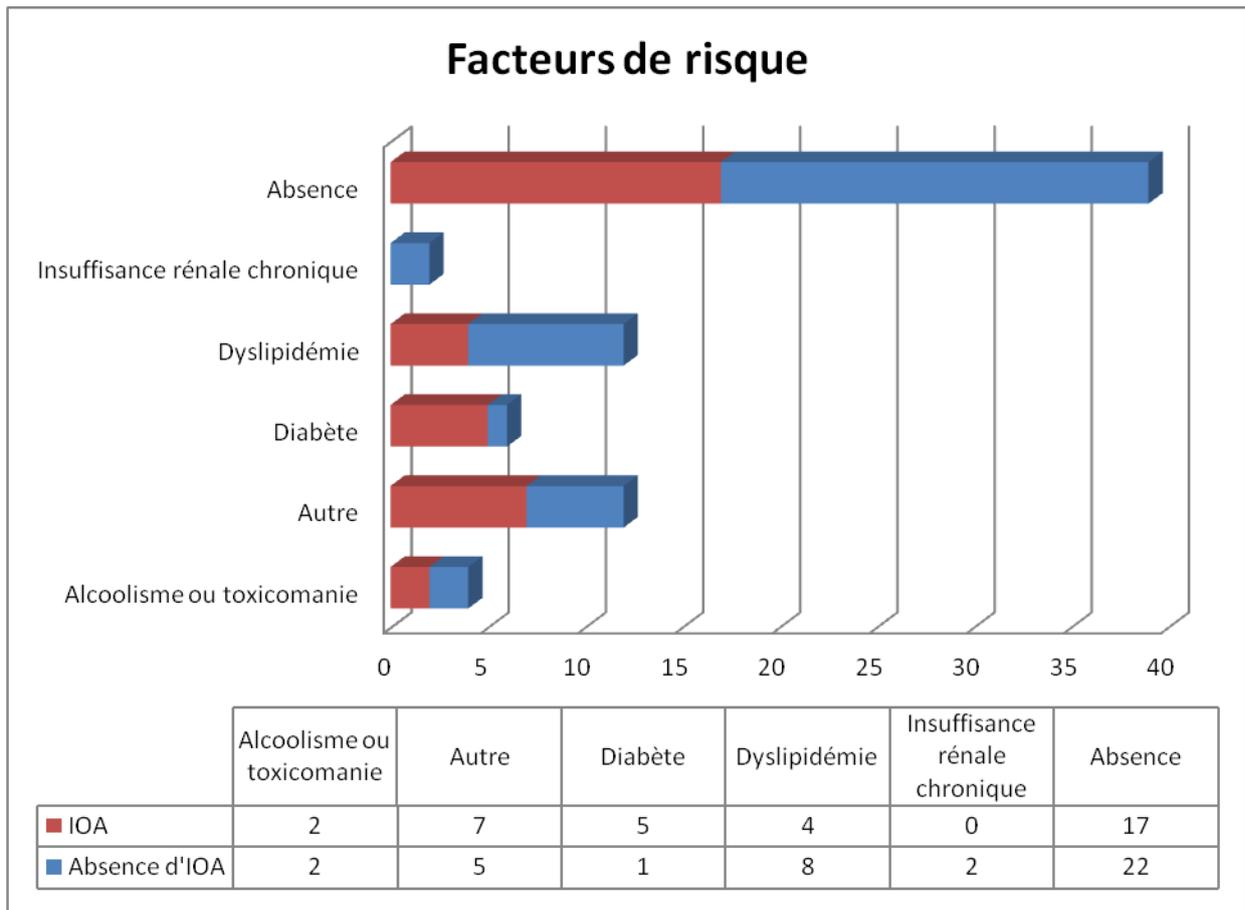


Figure 36: Différents facteurs de risque retrouvés chez les patients atteints d'IOA ou non

La catégorie « autre » comprend les patients atteints de cancer (SMP... ), de troubles de la vascularisation (Artériopathie Oblitérante des Membres Inférieurs...), de maladies rares ...

En dehors de l'immunosuppression et de l'existence d'une pathologie ostéo-articulaire qui sont traitées à part, la répartition des facteurs de risque d'IOA est hétérogène entre les 2 populations avec en apparence plus de patients atteints de dyslipidémie (20%) et d'insuffisance rénale chronique (5%) dans le groupe des patients non infectés et plus de diabète (13,2 %) dans les groupe des patients infectés.

## 1.7. Espèces bactériennes isolées

La distribution des bactéries responsables d'IOA rapportée au nombre de patients (certains patients ayant plusieurs prélèvements) est la suivante :

Bactéries	Nombre de patients (%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	13 (25,5)
<i>Enterobacter cloacae</i> complexe	3 (5,9)
<i>Escherichia coli</i>	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3
<i>Streptococcus pyogenes</i>	3
<i>Eikenella corrodens</i>	2 (3,9)
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	2
<i>Streptococcus anginosus</i>	2
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	1 (2,0)
<i>Bacteroides vulgatus</i>	1
<i>Clostridium subterminale</i>	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	1
<i>Kingella kingae</i>	1
<i>Listeria monocytogenes</i>	1
<i>Moraxella catarrhalis</i>	1
<i>Parvimonas micra</i>	1
<i>Peptoniphilus harei</i>	1
<i>Propionibacterium acnes</i>	1
<i>Propionibacterium avidum</i>	1
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1
<i>Streptococcus minor</i>	1
<i>Streptococcus mutans</i>	1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1
<i>Streptococcus sanguinis</i>	1

Tableau XXII : Espèces bactériennes isolées chez les patients atteints d'IOA : nombre de patients pour lesquels une espèce bactérienne a été retrouvée

Les espèces bactériennes isolées chez les patients classés dans le groupe IOA exclue (contaminants) sont les suivantes :

*S. epidermidis/capitis/hominis/pasteuri*, *E. faecalis*, *Arthrobacter cummingsii*, *P. acnes*, *Actinomyces radingue*, *Corynebacterium*, *Gemella haemolysans* ...

## 2. Evaluation de la spectrométrie de masse après extraction directe sur le prélèvement : résultats des différentes techniques

### 2.1. Culture

Culture	Infection ostéo-articulaire		Total
	Certaine ou probable	Exclue	
Monomicrobienne	39	5	44
Polymicrobienne	16	7	23
Négative	9	35	44
<b>Total</b>	<b>64</b>	<b>47</b>	<b>111</b>

Tableau XXIII : Résultats des cultures des prélèvements de patients atteints ou non d'IOA (négative : culture bactérienne stérile, monomicrobienne : 1 espèce isolée, polymicrobienne : > 1 espèce isolée)

Parmi les prélèvements des patients infectés, la culture est restée négative dans 14% des cas (9/64), ce qui peut s'expliquer de la façon suivante :

- 7 prélèvements concernent des patients qui étaient sous antibiothérapie dans le mois précédant l'inclusion (dont 2 prélèvements présentant une PCR ARN 16S positive)
- 2 autres prélèvements étaient négatifs alors qu'un prélèvement ultérieur moins d'une semaine plus tard s'est avéré positif en culture bactérienne.

Parmi les prélèvements des patients non infectés, 25.5% d'entre eux (12/47) présentaient des bactéries en culture correspondant à une contamination soit endogène (flore bactérienne du patient) soit exogène (manipulation du prélèvement dans le service ou au laboratoire) car ils ne possédaient pas les critères d'infection ostéo-articulaire précédemment définis (critère clinique, critère bactériologique par culture ou RCP).

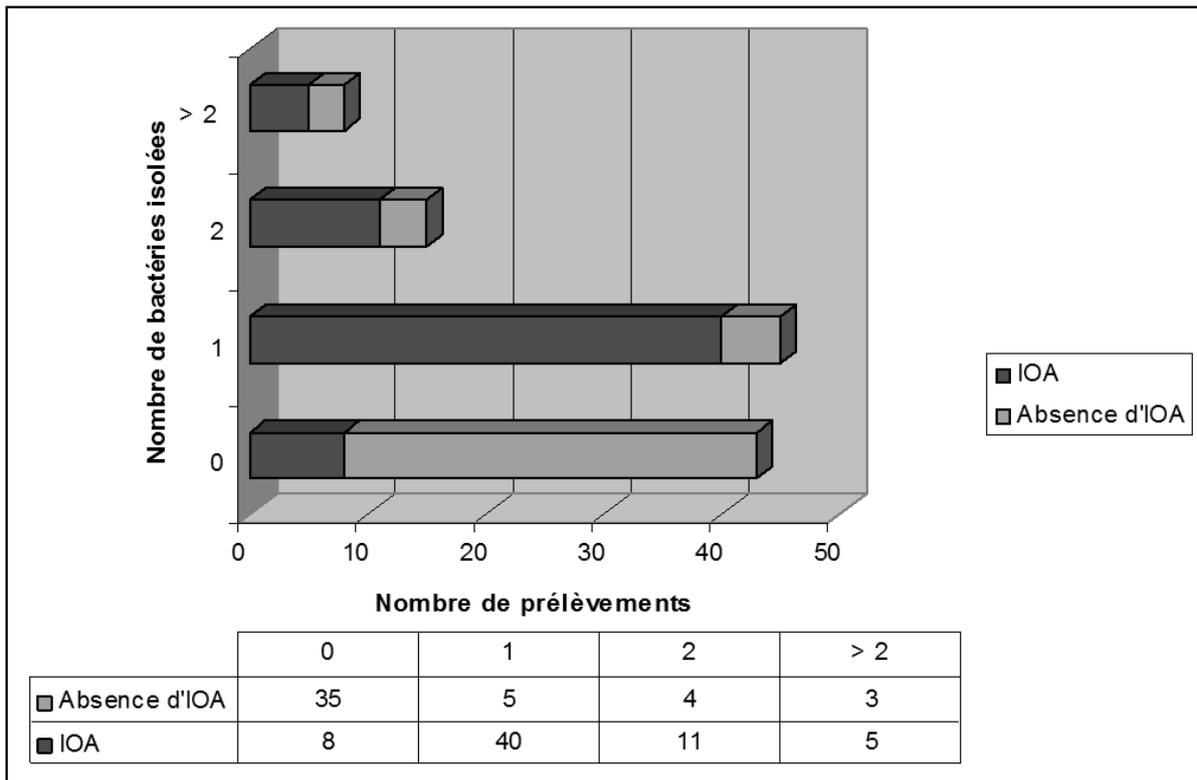


Figure 37 : Répartition du nombre d'espèces isolées dans les prélèvements de patients atteints ou non d'IOA

## 2.2. Examen direct sur le prélèvement

Examen direct	Infection ostéo-articulaire		Total
	Certaine ou probable	Exclue	
Positif monomicrobien	17	0	17
Positif polymicrobien	3	0	3
Négatif	43	47	90
<b>Total</b>	<b>63</b>	<b>47</b>	<b>110</b>

Tableau XXIV: Résultats de l'examen direct des prélèvements de patients atteints ou non d'IOA

Il n'y a que 110 prélèvements (au lieu des 111 inclus) dans ce tableau car l'examen direct n'a pas été effectué pour un prélèvement pour des raisons techniques.

### 2.3. Biologie moléculaire PCR ARN 16S sur le prélèvement

Critère moléculaire : PCR ARN 16S et séquençage	Infection ostéo-articulaire		Total
	Certaine ou probable	Exclue	
Acceptable	8	0	8
Non acceptable	20	38	58
<b>Total</b>	<b>28</b>	<b>38</b>	<b>66</b>

Tableau XXV : Résultats de la PCR ARN 16S suivie d'un séquençage dans les prélèvements de patients atteints ou non d'IOA

Il n'y a que 66 prélèvements dans ce tableau (pour 70 échantillons inclus dès le prélèvement) car la PCR ARN 16S n'a pas été effectuée pour 4 prélèvements pour des raisons techniques. Lorsque l'on rapporte le nombre d'échantillons ayant un critère moléculaire acceptable au nombre d'échantillons correspondants pour lesquels la culture est positive (qu'ils soient dans le groupe des patients infectés ou non) l'on obtient 8/27 soit 29,6% de sensibilité.

Tous les prélèvements ayant un critère par biologie moléculaire acceptable proviennent de patients appartenant au groupe des IOA certaines ou probables, et les bactéries identifiées sont les suivantes : *E. coli* (4), *S. pyogenes* (2), *P. aeruginosa* (2). 2 d'entre eux sont stériles en culture : il s'agit d'un même patient pour lequel la croissance bactérienne a été inhibée par un traitement antibiotique 1 à 2 jours avant le prélèvement. Peu avant la mise sous traitement, un prélèvement de liquide articulaire avait montré une arthrite septique à *S. pyogenes*.

Tous les prélèvements de patients classés dans le groupe infection exclue ont présenté un critère moléculaire non acceptable. Un échantillon de ce groupe n'a cependant pas pu être analysé en raison de la présence d'inhibiteurs de la Taq polymérase dans le prélèvement.

Parmi les prélèvements ayant un critère par biologie moléculaire non acceptable, 20 proviennent de patients appartenant au groupe des infections certaines ou probables :

- 19 prélèvements ne présentent pas d'amplification,
- 1 prélèvement présente une amplification positive mais la séquence génétique obtenue est ininterprétable. Ce résultat s'explique par la présence dans l'échantillon

de plusieurs espèces bactériennes, entraînant l'amplification d'une succession incohérente de bases d'ADN qui ne peut être lue directement par un séquenceur.

## 2.4. Spectrométrie de masse sur le prélèvement

Critère d'identification par SM sur le prélèvement	Infection ostéo-articulaire		Total
	Certaine ou probable	Exclue	
Acceptable	2	0	2
Non acceptable	30	38	68
<b>Total</b>	<b>32</b>	<b>38</b>	<b>70</b>

Tableau XXVI : Résultats de la spectrométrie de masse sur les prélèvements de patients atteints ou non d'IOA

Parmi les échantillons ayant un critère par SM non acceptable, les résultats se répartissent de la façon suivante :

Résultat de SM	IOA certaine ou probable	IOA exclue
Degré de confiance insuffisant pour l'identification	5	12
Absence de pic	25	26

Tableau XXVII : Détails des résultats de spectrométrie de masse obtenus parmi les prélèvements ayant un critère d'identification non acceptable

La spectrométrie de masse retrouve une identification acceptable sur 2 prélèvements, avec un score et une reproductibilité respectivement de 1,81 ; 1,58 et 8 ; 4.

Dans les 2 cas, la bactérie a poussé sur la totalité des 5 milieux de chaque échantillon : dans un délai de 1 jour pour les cultures solides et entre 4,5 et 4,8 heures pour les flacons Bactec®. De même, l'examen direct montrait la présence de bacilles à Gram négatif pour 1 des 2 prélèvements et la PCR ARN 16S était systématiquement positive.

Il s'agit en l'occurrence de prélèvements chirurgicaux broyés réalisés au contact du fourreau dural et dans le rachis profond, pour un même patient appartenant au groupe des IOA certaines ou probables. L'histoire clinique est celle d'un abcès postopératoire de chirurgie d'arthrodèse rachidienne pour une discopathie, pour lequel 4/4 prélèvements réalisés retrouvent de l'*E. coli*.

## 2.5. Comparaison des différentes techniques

	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	Valeur prédictive positive (VPP) (%)	Valeur prédictive négative (VPN) (%)	Aire sous la courbe ROC (IC à 95%)
<b>Culture</b>	85,9	74,5	82,1	79,5	0,849 (0,748 – 0,949)
<b>Examen direct</b>	31,7	100	100	52,2	0,593 (0,448 – 0,737)
<b>PCR ARN 16S (prélèvement)</b>	28,6	100	100	65,5	0,648 (0,509 – 0,790)
<b>Spectrométrie de masse (prélèvement)</b>	6,3	100	100	55,9	0,532 (0,395 – 0,670)

Tableau XXVIII : Evaluation des différentes techniques (Se, Sp, Vpp, Vpn, AUC) : culture bactérienne, examen direct, PCR ARN 16S et spectrométrie de masse sur le prélèvement

## 3. Evaluation de la spectrométrie de masse après extraction sur les flacons

### 3.1. Echantillonnage

Type de flacon	Total	Infection probable ou certaine	Absence d'infection	Nombre total de flacons
<b>Aérobie</b>	<b>Total</b>	<b>109</b>	62	47
	<b>Positif</b>	61 (56 %)	52	9
	<b>Négatif</b>	48 (44%)	10	38
<b>Anaérobie</b>	<b>Total</b>	<b>107</b>	60	47
	<b>Positif</b>	56 (52%)	48	8
	<b>Négatif</b>	51 (48%)	12	39
				<b>216 :</b> <b>117 positifs</b> <b>99 négatifs</b>

Tableau XXIX : Résultat de la subculture des flacons aérobies et anaérobies issus de prélèvements de patients atteints ou non d'IOA

Il existe une différence entre le nombre de flacons aérobies et anaérobies car 2 flacons aérobies et 4 flacons anaérobies n'ont pas été ensemencés.

### 3.2. Spectrométrie de masse après extractions des flacons

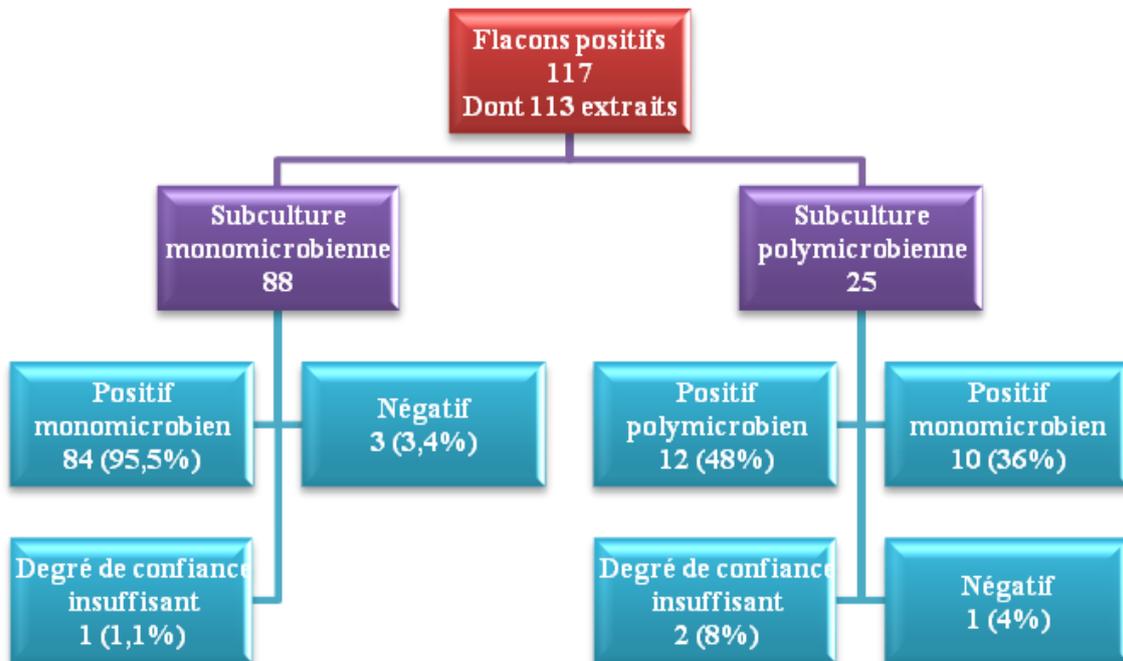


Figure 38 : Résultats de la spectrométrie de masse après extraction de l'ensemble des flacons positifs (le % fait référence au nombre de flacons positifs parmi les subcultures mono ou polymicrobiennes)

113 flacons parmi les 117 positifs sont étudiés car 4 flacons aérobies n'ont pas été extraits.

Au total sur l'ensemble des flacons détectés positifs par l'automate :

- Une identification acceptable (correcte ou incorrecte) a été obtenue par SM après extraction pour au moins une bactérie présente dans le flacon pour 106/117 flacons (**90,5%**), avec 94 positifs monomicrobiens (**80%**) et 12 positifs polymicrobiens (**10,5%**).
- Un degré de confiance insuffisant pour l'identification a été obtenu pour 3 flacons (**2,5%**)
- Un résultat négatif (aucun pic retrouvé pour l'identification) a été obtenu pour 4 flacons (**3%**) avec les résultats suivants :

- Echec de l'extraction sur flacon anaérobie mais identification acceptable et correcte sur le flacon aérobie pour les espèces bactériennes suivantes : *Streptococcus sanguinis*, *Staphylococcus haemolyticus*,
- Echec de l'extraction sur le flacon anaérobie avec mais identification acceptable et incorrecte sur le flacon aérobie pour les espèces bactériennes suivantes : *Streptococcus minor* (*Streptococcus sinensis* sur le flacon aérobie), *Streptococcus oralis* (*Streptococcus pneumoniae* sur le flacon aérobie).

Des discordances entre les flacons aérobies et anaérobies des prélèvements monomicrobiens sont observées :

- Flacons aérobies positifs seuls : 8/117 (**6,8%**) (*S. aureus* 3/8, *S. epidermidis* 2/8, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus capitis*, *S. pyogenes*)
- Flacons anaérobies positifs seuls : 5/117 (**4,2%**) (*P. acnes* 3/5, *Staphylococcus pasteurii*, *S. aureus*)

### 3.3. Identification

Le seuil de 1,5 pour le score d'identification a également été retenu car plusieurs études le considèrent comme acceptable (99,139,140).

### 3.3.1. Selon le milieu de culture

<b>Résultat de l'identification par spectrométrie de masse</b>	<b>Gélose sang (%)</b>	<b>Flacons totaux (%)</b>	<b>Flacons aérobies (%)</b>	<b>Flacons anaérobies (%)</b>
Haut degré d'identification à l'espèce <i>Score &gt; 2,3</i>	42 (40,4)	61 (54,0)	31 (54,4)	30 (53,6)
Identification à l'espèce <i>Score &gt; 2</i>	85 (81,7)	90 (79,6)	49 (86,0)	41 (73,2)
Identification au genre <i>Score &gt; 1,7</i>	98 (94,2)	101 (89,4)	54 (94,7)	47 (83,9)
Identification au genre si seuil modifié <i>Score &gt; 1,5</i>	98 (94,2)	104 (92,0)	55 (96,5)	49 (87,5)
Identification inacceptable <i>Score &lt; 1,7</i>	1 (1,0)	3 (2,7)	1 (1,8)	2 (3,6)
Identification incorrecte	5 (4,8)	5 (4,4)	2 (3,5)	3 (5,4)
Absence d'identification	0 (0)	4 (3,5)	0 (0)	4 (7,1)
Reproductibilité acceptable	91 (87,5)	98 (86,7)	52 (92,9)	45 (80,4)
<i>Total</i>	<i>104</i> <i>(100)</i>	<i>113</i> <i>(100)</i>	<i>57</i> <i>(100)</i>	<i>56</i> <i>(100)</i>

Tableau XXX : Résultat de l'identification en spectrométrie de masse après extraction des flacons aérobies, anaérobies ou des colonies bactériennes directement sur milieu gélosé

Il n'y a pas de différence significative entre la SM sur gélose au sang et sur flacons totaux en ce qui concerne l'identification à l'espèce, l'identification au genre, les identifications incorrectes, l'absence d'identification et la reproductibilité (*p-value* respectivement à 0,70 ; 0,20 ; 0,89 ; 0,12 ; 0,87). Une différence significative est par contre retrouvée pour le haut degré d'identification (*p-value* = 0,045).

Concernant la SM sur flacon aérobie et anaérobie, aucune de différence significative n'a été retrouvée pour l'ensemble des paramètres : haut degré d'identification, identification à

l'espèce, identification au genre, identifications incorrectes, absence d'identification et reproductibilité (*p-value* respectivement à 0,93 ; 0,09 ; 0,06 ; 0,68 ; 0,06 ; 0,10).

### 3.3.2. Selon le type de bactérie

<b>Type de bactérie</b>	<b>Staphylocoques (%)</b>	<b>Streptocoques et entérocoques (%)</b>	<b>Bacilles à gram négatif (%)</b>	<b>Bacilles à gram positif (%)</b>	<b>Anaérobies (%)</b>
Haut degré d'identification à l'espèce (%) <i>Score &gt; 2,3</i>	33 (60)	9 (34,6)	15 (68,2)	2 (50)	2 (33,3)
Identification à l'espèce (%) <i>Score &gt; 2</i>	49 (89)	15 (57,7)	20 (90,9)	2 (50)	4 (66,7)
Identification au genre (%) <i>Score &gt; 1,7</i>	54 (98,2)	18 (69,2)	21 (95,5)	3 (75)	5 (83,3)
Identification au genre si seuil modifié (%) <i>Score &gt; 1,5</i>	55 (100)	19 (73,1)	21 (95,5)	3 (75)	6 (100)
Identification inacceptable <i>Score &lt; 1,7</i>	1 (1,8)	1 (4,6)	0 (0)	0 (0)	1 (16,7)
Identification incorrecte (%)	0 (0)	3 (11,5)	1 (4,5)	1 (25)	0 (0)
Absence d'identification	0 (0)	4 (15,4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Reproductibilité acceptable (%)	53 (96,4)	17 (65,4)	21 (95,5)	3 (75)	4 (66,7)
<i>Total</i>	55	26	22	4	6

Tableau XXXI : Résultat de l'identification en spectrométrie de masse après extraction sur les flacons (score, reproductibilité et identifications incorrectes), en fonction du type de bactérie isolée

Il n'y a pas de différence significative entre la SM sur les flacons contenant des bacilles à Gram négatif ou des Staphylocoques en ce qui concerne le haut degré d'identification,

l'identification au genre, les identifications inacceptables, les identifications incorrectes, l'absence d'identification et la reproductibilité (*p-value* respectivement à 0,50 ; 0,49 ; 1 ; 0,29 ; 1 ; 1). Une différence significative est par contre retrouvée pour l'identification à l'espèce (*p-value* = 0,02).

Concernant la SM sur flacon contenant des Staphylocoques ou des Streptocoques, une différence significative est retrouvée pour l'ensemble des paramètres : haut degré d'identification, identification à l'espèce, identification au genre, identifications incorrectes, absence d'identification et reproductibilité (*p-value* respectivement à 0,03 ; 0,001 ; 0,0003 ; 0,03 ; 0,009 ; 0,0004), à l'exception des identifications inacceptables (*p-value* = 0,54).

Les résultats obtenus sur les bacilles à Gram positif et les bactéries anaérobies demeurent néanmoins peu informatifs car ces catégories comportent peu d'échantillons : respectivement 4 (2 *Listeria*, 2 *Arthrobacter*) et 6 (2 *Clostridium*, 4 *Propionibacterium*) spécimens.

Les identifications incorrectes obtenues concernent les espèces bactériennes suivantes :

Identifications incorrectes	
Espèce bactérienne attendue	Identification en spectrométrie de masse après extraction sur le flacon
<i>Streptococcus minor</i>	<i>Streptococcus sinensis</i>
<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Streptococcus parasanguis</i>	<i>Gemella haemolysans</i>
<i>Kingella kingae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Arthrobacter cumminsii</i>	<i>Corynebacterium lipophile</i> groupe F1

Tableau XXXII: Détail des identifications incorrectes obtenues en spectrométrie de masse après extraction des flacons (score et/ou reproductibilité acceptable)

### 3.4. Flacons polymicrobiens

Dans la majorité des cas 2 espèces bactériennes sont retrouvées avec un score et/ou une reproductibilité acceptable (48%), ou bien une seule espèce est retrouvée (36%). Une plus grande proportion de résultats négatifs ou ayant un degré de confiance insuffisant est observée par rapport aux flacons monomicrobiens : 12% contre 4,5%.

Les espèces bactériennes identifiées conjointement avec un score et/ou une reproductibilité acceptable (« positif polymicrobien ») en SM après extraction d'un même flacon sont les suivantes :

<b>Espèce bactérienne n°1</b>	<b>Espèce bactérienne n°2</b>
<i>Arthrobacter cumminsii</i>	<i>Weeksella virosa</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Propionibacterium avidum</i>	<i>Peptoniphilus harei</i>
<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>

Tableau XXXIII : Nature des bactéries isolées dans les flacons polymicrobiens donnant un résultat d'identification "positif polymicrobien" en spectrométrie de masse après extraction (une ligne correspond à un flacon)

### 3.5. Délai de croissance

Bactérie	Ecart entre le délai de croissance sur milieu gélosé et sur flacon		
	< 1j	1j	> 1j
<i>Actinomyces odontolyticus</i>		1	
<i>Bacteroides vulgatus</i>			1
<i>Clostridium subterminale</i>		1	2
<i>Eikenella corrodens</i>		1	
<i>Enterobacter cloacae</i>		4	
<i>Enterococcus faecalis</i>		3	
<i>Escherichia coli</i>		5	
<i>Peptoniphilus harei</i>			1
<i>Propionibacterium acnes</i>			1
<i>Propionibacterium avidum</i>			1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		3	
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	14	5
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1		
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>		2	
<i>Streptococcus anginosus</i>		1	1
<i>Streptococcus minor</i>			1
<i>Streptococcus mutans</i>			1
<i>Streptococcus oralis</i>		2	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		1	
<i>Streptococcus pyogenes</i>		1	
<i>Streptococcus sanguinis</i>			2

Tableau XXXIV : Différence entre le délai de croissance sur le milieu gélosé et le flacon Bactec positifs en premier dans un prélèvement donné, en nombre de prélèvements par espèce bactérienne.

Sur le total des espèces bactériennes isolées l'on retrouve donc :

- 3,1% des bactéries isolées avec un délai de croissance < 1 jour entre la culture sur gélose et le flacon
- 39,8% des bactéries isolées pour lesquelles le flacon est positif 1 jour avant la culture sur gélose
- 16,3% des bactéries isolées pour lesquelles le flacon est positif plus d'1 jour avant la culture sur gélose
- Les flacons sont positifs seuls pour 33,7% des bactéries isolées.
  - o *Nota bene* : si l'on ne prend en compte que les prélèvements de patients appartenant au groupe des IOA probables ou certaines : 18/88 soit 20,4% des

bactéries isolées ne sortent qu'en flacon (les bactéries isolées sur flacon seul des prélèvements de patients appartenant au groupe des IOA exclues correspondent à des contaminants).

- Les milieux gélosés sont positifs seuls pour 7 prélèvements en ce qui concerne les espèces bactériennes suivantes (7,1% des bactéries isolées sur tous les prélèvements) : *E. corrodens*, *Moraxella catarrhalis*, *Fingoldia magna*, *Actinomyces radingue*, *Pasteurella multocida*, *S. aureus*, *S. epidermidis*.

## Discussion

L'étude « Spectro-LA » nous permet d'avoir une représentation épidémiologique succincte de la population incluse. Dans ce travail, les critères cliniques et microbiologiques définis au préalable permettent de distinguer deux populations de patients :

- groupe patients infectés : IOA probable ou certaine
- groupe patients non infectés : IOA exclue

Bien que l'on observe des similitudes en termes d'âge et de comorbidités, plusieurs points différencient ces 2 groupes. Le sexe masculin est prédominant chez les patients infectés, ce qui a été décrit dans la littérature (141). De même, alors que l'on aurait pu s'attendre à voir apparaître l'immunosuppression comme un facteur de risque d'infection (26,141), dans notre étude la proportion de patients présentant une immunosuppression locale ou générale est plus grande dans le bras des patients non infectés. Ceci s'explique par la proportion élevée de patients présentant une arthrite rhumatoïdale dans la population non infectée (11 patients soit 27.5% dans le groupe non infecté pour aucun dans l'autre groupe), ces derniers étant couramment traités par corticoïdes ou immunosuppresseurs (méthotrexate, anticorps monoclonaux...). Dans le groupe des patients infectés aucun facteur de risque prédominant n'a été retrouvé, mais tout comme décrit dans l'étude de Ryan et al. (141), on observe l'existence contemporaine au prélèvement d'hémocultures positives (12,6% des cas). De même, les signes d'infection cutanée en regard de l'articulation touchée ne sont rapportés que dans cette population.

Concernant le nombre d'articulations atteintes : dans le groupe des patients infectés, des monoarthrites ont été principalement observées, avec quelques oligoarthrites (touchant 2 articulations dans ce cas) alors qu'une majorité de polyarthrites et d'oligoarthrites a été décrite dans l'autre groupe. Cette observation est en accord avec le profil décrit des infections ostéo-articulaires qui sont principalement monoarticulaires (9) tandis que les arthrites rhumatoïdales ou microcristallines touchent plus volontiers plusieurs articulations. La majorité des prélèvements de patients du groupe IOA certaine ou probable correspondent à des infections monomicrobiennes avec 25% d'infections polymicrobiennes, qui sont souvent décrites dans les infections sur prothèse et les infections sur pied diabétique (9).

Les articulations de gros volume sont principalement touchées dans les 2 populations (>50%), avec une prédominance d'atteintes au niveau du genou pour les patients non infectés (60%) et de la hanche pour les patients infectés (30%) ; ces articulations sont celles rationnellement les plus fréquemment touchées par des arthropathies (9). Le reste des articulations concernées regroupe sans prédominance le rachis, l'épaule, la cheville, le poignet...

On retrouve parmi les bactéries responsables d'infection une majorité de *Staphylococcus aureus* (25,5%) puis des entérobactéries, staphylocoques à coagulase négative, streptocoques et *Pseudomonas aeruginosa* (5,9%), ce qui est cohérent avec l'épidémiologie des IOA décrite dans la littérature (9,23,33,141).

Un des objectifs de notre étude était de déterminer l'intérêt de la SM directement sur le prélèvement après extraction, pour cela une comparaison des performances en termes de sensibilité et spécificité avec la culture, l'examen direct et la PCR-séquençage ARN 16S sur le prélèvement a été réalisée.

La culture, qui demeure la technique de référence pour le diagnostic des IOA, présente la meilleure sensibilité (85,9% ici et jusque 82% dans les travaux sur l'AS (14)) mais la moins bonne spécificité (74.5%) parmi les techniques évaluées, en raison d'une potentielle contamination du prélèvement. Elle présente également l'AUC la plus élevée dans notre étude (0,849), ce qui en fait donc le meilleur marqueur prédictif d'IOA parmi ceux étudiés. Une diminution de la sensibilité peut être due à une mauvaise qualité de l'échantillon (prélèvement, délai d'acheminement ou de mise en culture...), à la prise d'antibiotiques préalablement au prélèvement ou encore à la présence de bactéries difficiles voire impossible à cultiver sur les milieux usuels (142). Ceci témoigne de l'importance de se référer aux différents critères existants pour l'interprétation d'une culture issue de POA (7,46,59) : critères bactériologiques par culture et par biologie moléculaire, critères cliniques, critères d'imagerie... afin de distinguer une bactérie réellement responsable d'infection d'un contaminant.

La PCR-séquençage ARN 16S sur le prélèvement a présenté une sensibilité de 28,6% et elle a permis notamment de confirmer l'origine bactérienne de l'IOA pour certains prélèvements, malgré l'échec de la culture inhibée par l'antibiothérapie. Ce résultat rappelle

l'intérêt de la biologie moléculaire dans le cas de prélèvements réalisés après mise en place d'un traitement antibiotique (143,144). La présence de plusieurs espèces bactériennes dans le prélèvement est un obstacle à l'obtention d'une séquence génétique interprétable, ce qui pourrait être résolu par une étape intermédiaire de clonage des amplicons (145). L'utilisation de telles techniques demeure toutefois difficile en routine de laboratoire d'analyses médicales. Il n'y a pas eu de faux positif en biologie moléculaire dans cette étude tout comme dans celle de Fihman (146), bien que des faux positifs en PCR ARN 16S liés à une contamination par de l'ADN aient déjà été observés (145). On retrouve en revanche beaucoup de faux négatifs contrairement à ce qui est décrit dans plusieurs travaux (145,146) ; ceci peut s'expliquer par la variabilité des techniques d'extraction utilisées dans ces derniers. En l'occurrence, seuls des bacilles à Gram négatif ou des streptocoques ont été correctement identifiés par biologie moléculaire directement sur le prélèvement dans notre étude, alors qu'aucun staphylocoque n'a été retrouvé, bien qu'ils soient majoritairement isolés par culture dans les prélèvements inclus (24/111 prélèvements). Ce résultat peut être lié à une difficulté pour identifier les cocci à Gram positif en raison de leur paroi plus difficile à lyser pendant l'étape d'extraction (en effet, celle-ci est plus résistante car composée principalement de peptidoglycane) (68,147,148). Une autre hypothèse est celle d'un inoculum trop faible, puisque la sensibilité de la biologie moléculaire reste proche de celle de l'examen direct.

L'examen direct a présenté une sensibilité de 31,7% (entre 45 - 50% dans les travaux sur l'AS (14,149)), comparable dans notre étude à celle de la PCR- séquençage ARN 16S sur le prélèvement, mais son implication est différente. Réalisée dès la réception du prélèvement, la lecture après coloration de Gram permet d'orienter l'antibiothérapie du patient avant les résultats de la culture ou de la biologie moléculaire. En cas de culture négative tous les examens directs correspondants étaient également négatifs, cette technique n'a donc pas présenté de faux positif dans notre étude.

La spectrométrie de masse a été utilisée dans ce travail car de nombreuses publications montrent sa supériorité en terme d'identifications acceptables au genre et à l'espèce pour la plupart des bactéries isolées dans les laboratoires de biologie médicale (120,131,133,150,151), et démontrent sa capacité à identifier des bactéries réputées difficiles à caractériser comme certaines bactéries anaérobies ou les bactéries du groupe

HACEK (*Haemophilus*, *Actinobacillus actino-mysetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens*, *Kingella*...) ... (134,152,153) Les limites de cette technique demeurent toutefois l'identification des bactéries de type streptocoques alpha-hémolytiques (notamment la distinction entre le groupe *Streptococcus mitis* et *Streptococcus pneumoniae*), le genre *Shigella* (dont le spectre n'est pas toujours présent dans les bases de données), les espèces de *Listeria*... qui sont régulièrement mal identifiées en spectrométrie de masse (99,120,131,151,154). En cas de difficulté d'identification par spectrométrie de masse (score et reproductibilité insuffisantes), l'identification a été obtenue par l'utilisation de galeries biochimiques (API, ID32...) ou de disques antibiotiques (optochine pour les pneumocoques...) voire par biologie moléculaire si les méthodes phénotypiques se sont avérées également insuffisantes (séquençage avec PCR des gènes codant l'ARN 16S, la superoxyde dismutase (SOD), ou bien PCR spécifique...). Par rapport à un examen direct réalisé sur prélèvement ou sur flacon de culture prolongée, l'orientation thérapeutique déduite de l'identification par SM est plus précise (155), notamment pour la différenciation des bacilles à Gram négatif et des cocci à Gram positif en amas. En effet, la sensibilité aux antibiotiques et la prise en charge thérapeutique diffèrent notablement entre *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter* ou *Pseudomonas* (156,157), de même qu'entre *S.aureus* qui est souvent pathogène et les différentes espèces de Staphylocoques à coagulase négative ou de *Micrococcus*, qui sont possiblement des contaminants.

Parmi les 70 prélèvements analysés seuls 2 échantillons ont un résultat de spectrométrie de masse sur le prélèvement avec un score et/ou une reproductibilité acceptable. Ainsi le nombre trop faible d'échantillons positifs ne permet pas d'extrapoler des conditions favorables à la réussite de l'analyse (nature du prélèvement de type liquide synovial ou prélèvement chirurgical, consistance solide ou liquide, broyage ou non au préalable...). Toutefois, l'espèce bactérienne retrouvée sur ces 2 échantillons est un *E. coli*, bactérie aisément identifiée en pratique quotidienne par SM (fréquemment de score >2 et de reproductibilité = 10) et ayant poussé rapidement sur la totalité des milieux ensemencés pour chaque échantillon, avec une PCR ARN 16S (2/2 prélèvements) et un examen direct (1/2) positifs, laissant supposer que l'inoculum était important.

La spectrométrie de masse après extraction sur le prélèvement présente donc une sensibilité moindre (6,3%), inférieure à celle des techniques existantes (biologie moléculaire, culture et

examen direct), ne justifiant pas son utilisation en pratique quotidienne dans cette indication. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cela. La plus probable est celle d'un inoculum insuffisant : en effet, les travaux de Ferreira et al. (115,116) évaluant directement la spectrométrie de masse sur des échantillons d'urines montrent qu'un résultat correct n'est obtenu qu'à partir d'un inoculum de  $6 \times 10^4$  UFC/mL pour *E. coli* voire  $10^5$  UFC/mL pour d'autres bactéries telles que *P. aeruginosa* ou *E. faecalis*. D'autres études sur le même type de prélèvement retrouvent cependant des identifications cohérentes dès  $10^3$  UFC/mL (158). A l'inverse, des travaux réalisés sur flacons d'hémoculture obtiennent une identification acceptable à partir seulement de  $10^6$  UFC/mL, sachant que l'inoculum moyen est de  $5 \times 10^8$  UFC/mL lorsqu'un flacon est détecté positif par l'automate (159). Les bons résultats dans notre étude de la spectrométrie de masse après extraction sur les flacons Bactec® de POA confortent également l'hypothèse d'un inoculum insuffisant, puisque la principale différence entre cette méthode et l'analyse sur le prélèvement d'origine est l'enrichissement de l'inoculum bactérien. Cependant cette explication n'est pas seule suffisante pour expliquer les résultats. En effet, le seuil de sensibilité en microscopie optique étant d'environ 1 bactérie pour 100 champs (au grossissement  $10 \times 100$ ), ce qui correspond au minimum à  $10^4$  UFC/ml (33), il y aurait dû avoir presque autant de résultats positifs en SM sur le prélèvement que d'examens directs positifs soit près de 37,1%.

L'interférence avec la matrice du prélèvement est également une explication possible. En effet, le liquide articulaire est de composition riche en mucopolysaccharides et en hyaluronate et les bactéries peuvent demeurer piégées au sein de la trame tissulaire des POA, en dépit du broyage réalisé. Des difficultés semblables sont observées pour la PCR ARN 16S dont la sensibilité est plus faible sur les POA que sur d'autres liquides biologiques comme le liquide céphalo-rachidien (160,161) ou les valves cardiaques (162–165).

Enfin, la consistance du prélèvement peut aussi avoir une influence sur le résultat : souvent visqueux et parfois coagulé, celui-ci forme fréquemment un culot d'aspect fibrineux lors de l'extraction, susceptible de masquer ou d'englober le culot bactérien recherché et rendant difficile la réalisation de l'extraction.

En définitive, le manque de sensibilité de la spectrométrie de masse sur les prélèvements ostéo-articulaires peut s'expliquer par la conjonction de plusieurs facteurs : inoculum insuffisant, interférence matricielle et difficultés d'extraction liées à la consistance du

prélèvement. L'ensemble des résultats obtenus sur les différentes méthodes comparées dans notre étude (examen direct, culture, PCR ARN 16S et SM sur le prélèvement) rappellent également qu'à l'heure actuelle, la culture demeure un élément incontournable dans le diagnostic bactériologique des IOA.

Notre étude avait également pour objectif d'étudier l'efficacité de l'identification par SM après extraction sur les flacons d'hémocultures utilisés pour l'enrichissement des POA. La performance de cette technique a donc été comparée à celle de l'identification par SM directement sur les colonies issues de cultures gélosées et celle obtenue dans la littérature sur des flacons d'hémoculture. En parallèle, les résultats ont été analysés en fonction du type de flacon et de la nature de l'espèce bactérienne incriminée.

La performance de l'identification par spectrométrie de masse après extraction sur les flacons d'enrichissement de prélèvements ostéo-articulaires est statistiquement comparable à celle obtenue sur gélose au sang dans notre étude. Le pourcentage de haut degré d'identification est néanmoins significativement supérieur sur flacon (54,0% contre 40,4%), ce qui peut être lié au fait qu'il n'y ait pas systématiquement d'extraction à l'acide formique pour l'identification directement à partir des colonies, alors que pour l'identification à partir des flacons l'extraction Sepsityper® est obligatoirement suivie d'une extraction à l'acide formique.

A notre connaissance, peu d'études ont évalué les performances de la SM sur des flacons de culture prolongée ensemencés avec des POA. Une étude de Ferroni et al (155) analysant les flacons d'enrichissement (flacons sans charbon, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) de 15 liquides de conservation de greffons et 31 POA (liquide articulaire, biopsie osseuse et abcès profond) retrouve une identification à 100% au genre et 96% à l'espèce sur l'ensemble des bactéries testées.

Les résultats obtenus par spectrométrie de masse sur flacon de POA (respectivement 89,4% et 76,9% d'identifications au genre et à l'espèce) sont analogues à ceux décrits lors de travaux réalisés sur des flacons d'hémoculture, pour lesquels le pourcentage d'identification correcte à l'espèce est proche de 80%, avec une variation de 31,8 à 99 % selon les études (95,99,135,139,140,155,159,166–170). Par ailleurs en considérant uniquement les flacons monomicrobiens, on obtient dans notre étude une identification acceptable au genre ou à

l'espèce de 95,5% en SM après extraction et seule une faible proportion (<5%) obtient un résultat négatif ou un degré de confiance insuffisant pour l'identification.

Le pourcentage d'identification au genre obtenu augmente à 92 % sans obtention d'identifications incorrectes supplémentaires, si l'on prend en compte le seuil de 1,5 retenu par certaines études dont celle de Nonnemann et al. (139), dans laquelle ce pourcentage est porté de 54 à 63 % en abaissant le seuil de 1,8 à 1,5. Pour Moussaoui et al (140), un score > 1,4 est pertinent si la reproductibilité à l'espèce est d'au moins 4 et concerne des propositions successives. L'utilisation du seuil proposé par le fabricant sous-estimerait donc la proportion d'identifications correctes, l'obtention d'un score inférieur étant principalement due à la qualité de l'échantillon (faible inoculum et présence d'un bruit de fond) plutôt qu'à un faible degré de corrélation entre le spectre de masse de l'échantillon isolé et le meilleur profil correspondant dans la base de données (159).

Le pourcentage de haut degré d'identification c'est-à-dire de score > 2,3 (54%) est plus élevé dans notre étude que celui retrouvé sur flacon d'hémoculture dans l'étude de Kok et al. (169) qui mentionne 47,1% pour les bactéries à gram négatif (68,2% dans notre étude), 9,8% sur les Staphylocoques (60%) et 22,6% pour les Streptocoques (34,6%). Cette étude comporte cependant plus de Staphylocoques à coagulase négative et de bacilles à Gram négatif non fermentants qui y sont moins bien identifiés, ce qui peut expliquer la différence retrouvée avec nos travaux.

Quelques différences sont observées entre les résultats retrouvés sur flacons aérobies et anaérobies dans la littérature. Christner et al (159) décrivent ainsi des scores inférieurs sur flacons d'hémoculture aérobies par rapport aux flacons anaérobies (1,786 contre 2,101 en moyenne) pour l'espèce *S.aureus*, avec 6 *S.aureus* mal identifiés sur flacon aérobie contre aucun sur flacon anaérobie. Ce n'est pas le cas dans notre étude où une différence est observée uniquement avec le genre *Streptococcus*, mieux identifié sur les flacons aérobies (4 absences d'identification sur flacons anaérobies contre aucune sur flacon aérobie).

En ce qui concerne l'extraction des flacons contenant plusieurs espèces bactériennes, des résultats similaires à ceux obtenus dans notre étude sont retrouvés dans les travaux sur flacons d'hémocultures polymicrobiens. Kok et al. rapportent ainsi 35,5% de flacons non identifiés ou mal identifiés (12% dans notre étude) et 64,5% de flacons sur lesquels une

seule des 2 espèces bactériennes est retrouvée (169). D'après l'étude de Ferroni et al. (155), en cas d'identification unique sur un flacon polymicrobien, l'espèce bactérienne la plus fréquemment identifiée est celle présente en plus grande quantité sur la coloration de Gram (dans cette étude seulement 2,3% des flacons polymicrobiens ont un seul morphotype à l'examen direct). Aucun des flacons monomicrobiens n'a donné de résultat faussement polymicrobien après extraction, ceci amène à penser qu'en cas d'identification multiple il est possible de tenir compte de la présence de toutes les espèces ayant un score et/ou une reproductibilité acceptables (48% des flacons polymicrobiens dans notre étude obtiennent une identification après extraction avec plusieurs espèces ayant un score acceptable). Inversement, la présence d'une seule espèce bactérienne en SM après extraction ne permet pas d'exclure la présence d'une autre espèce dans le prélèvement (pour 36% des flacons polymicrobiens dans notre étude une seule espèce bactérienne a été identifiée après extraction).

L'analyse a également porté sur la performance de l'identification en SM sur flacon en fonction de l'espèce bactérienne considérée. Celle-ci est significativement meilleure sur les Staphylocoques et les bacilles à Gram négatif que sur les Streptocoques. Ces résultats correspondent à ceux trouvés dans la littérature sur les flacons d'hémoculture : en effet, les bacilles à Gram négatif sont usuellement mieux identifiés que les bactéries à Gram positif (98,99,139,168,169). Plusieurs études décrivent un inoculum inférieur dans les flacons contenant des bactéries à Gram positif au moment de la détection de pousse par l'automate, et Christner et al (159) observent une similarité entre les spectres des échantillons mal identifiés et ceux de flacons d'hémoculture stériles. Les scores inférieurs obtenus sur les flacons contenant des bactéries à Gram positif pourraient donc être la conséquence d'une différence d'inoculum (dès  $< 10^6$  UFC/mL, les spectres obtenus sur hémocultures sont proches de ceux d'échantillons stériles (159)). Les bons résultats obtenus sur les Staphylocoques dans notre étude peuvent quant à eux s'expliquer par le fait qu'il y ait plus de *S. aureus* que de Staphylocoques à coagulase négative (55 prélèvements contre 16), le Staphylocoque doré étant décrit comme mieux identifié dans les travaux réalisés sur flacon d'hémoculture (9,3% contre 36% de non identification (score  $< 1,7$ ) d'après Kok et al. (169)). Une différence d'inoculum peut néanmoins également en être à l'origine car ce résultat n'est pas retrouvé dans l'étude de Loonen et al. (171) qui porte uniquement sur

l'identification à partir de colonies sur milieu gélosé de Staphylocoques à coagulase négative, et qui recense 99,3% d'identifications correctes.

Les bacilles à Gram positif sont quant à eux pauvrement identifiés avec 50% d'identification à l'espèce et 75% au genre, tout comme dans l'étude de Kok et al. (169) où 65% des bacilles à Gram positif sont non identifiés. Il en est de même dans notre étude pour les bactéries anaérobies avec 66,7% d'identification à l'espèce et 83,3% au genre tandis qu'aucune espèce bactérienne anaérobie n'a été identifiée par SM sur flacon dans l'étude de Kok et al (169). Ces derniers n'ont cependant pas considéré le *Propionibacterium* comme un genre anaérobie et les effectifs de l'étude étaient également faibles (seulement 4 flacons contenant des anaérobies). L'étude de Stevenson et al. (170) reporte quant à elle 12/44 identifications non acceptables (score < 1,7) pour *P. acnes*, résultat qui avait été retrouvé également sur les études par SM directement sur colonies (131).

L'ensemble des bactéries non identifiées et la majorité des identifications incorrectes concernent les Streptocoques (13,6% d'entre eux) dont le groupe des alpha-hémolytiques, ce qui est retrouvé dans de nombreuses études réalisées sur flacons d'hémoculture (98,99,167,169,170). Une erreur d'identification de *K. kingae* a également été observée (identification en *S. aureus*). Cette discordance est probablement liée à une contamination lors de la manipulation puisqu'aucune étude ne mentionne ce type d'incohérence. De plus, seule *K. kingae* a été retrouvée sur la subculture du flacon tandis que le *S. aureus* est une espèce moins exigeante et dont la pousse est beaucoup plus rapide ; il est donc peu probable que celui-ci ait été réellement présent dans le flacon.

En définitive, la spectrométrie de masse après extraction sur les flacons de culture prolongée de POA ne permet pas de s'affranchir de la subculture de celui-ci mais permet dans la plupart des cas une identification acceptable pour au moins une bactérie présente dans le flacon (90,5% des flacons de notre étude). De plus, parmi le groupe des patients infectés, une importante proportion des bactéries ne pousse que dans les flacons de culture prolongée (20,4%) ce qui permettrait donc une identification bactérienne plus rapide en utilisant cette technique. Dans le cas des flacons polymicrobiens le résultat est seulement indicatif, mais pour les flacons monomicrobiens (74%) les résultats sont directement interprétables en ce qui concerne les bactéries pathogènes (les examens étant à répéter sur d'autres prélèvements pour les bactéries appartenant à la flore cutanée, qui peuvent être

des contaminants). Il existe en revanche un risque de faux négatif (3%) (notamment pour les *Streptococcus viridans*) ; il conviendrait donc dans le cas d'un flacon détecté positif par l'automate dont l'analyse par SM après extraction est négative de ne pas rendre le résultat, en attendant l'analyse de la subculture sur milieu gélosé.

Cette étude présente toutefois certaines limites. En effet, l'échantillonnage pour l'étude de la spectrométrie de masse directement sur le prélèvement est relativement faible : pour ce paramètre 32 prélèvements de patients appartenant au groupe des IOA certaines ou probables ont pu être inclus. Ces difficultés de recrutement sont liées d'une part à l'épidémiologie locale, et d'autre part à la quantité souvent insuffisante de prélèvement parvenue au laboratoire.

Différents types d'échantillons sont utilisés dans l'étude, tant en terme de matrice (liquides articulaires, tissus mous, os...) que de contenant (pot stérile, tube hépariné...) ou de traitement (broyage ou non), ce qui pourrait constituer un biais dans l'exploitation des résultats. De même, le volume de prélèvement utilisé pour la mise en culture des liquides articulaires de quantité < 5 ml est incertain car ceux-ci sont broyés à partir de la totalité du prélèvement ce qui représente un volume variable. Ces incertitudes n'ont cependant probablement pas eu d'influence sur les résultats de l'étude, puisque l'identification après extraction par spectrométrie de masse est peu sensible sur l'ensemble des prélèvements et elle est performante sur l'ensemble des flacons, ceci quel que soit le type de prélèvement et la quantité d'échantillon utilisée.

Cette technique nécessite également un temps de réalisation conséquent pouvant impacter sur l'organisation du laboratoire : en effet, la technique d'extraction utilisée dans cette étude (kit Sepsityper® commercialisé par Bruker®) requiert près de 40 minutes (169,172), mais elle présente l'avantage d'être standardisée et validée par des essais dans la littérature (169,173). D'autres méthodes d'extraction simplifiées ont été testées sur les flacons d'hémocultures et permettent toutefois de réduire ce délai de moitié, telles que les méthodes à la saponine (155,174,175), au chlorure d'ammonium (98), à l'acide trifluoroacétique ou à l'acide formique (99), voire même des méthodes comprenant uniquement une série de centrifugations (173,175).

De plus, il n'y a pas de données dans notre étude sur la spécificité de l'identification par SM après extraction sur flacon (aucune extraction de flacon non détecté positif par l'automate n'a été réalisée), mais les résultats sont systématiquement comparés avec la subculture issue du flacon dont on ne peut actuellement s'affranchir (pour la réalisation d'un antibiogramme, en cas de flacon polymicrobien...).

Enfin, l'évaluation précise de l'incidence d'une identification bactérienne plus précoce sur la prise en charge du patient atteint d'IOA ou sur l'écologie des bactéries multi-résistantes dans le service pourra faire l'objet d'une étude future.

Au travers de notre étude, l'utilisation de la SM sur les flacons de culture de POA apparaît prometteuse dans le diagnostic et la prise en charge des IOA. Cette technique permettrait notamment la réduction du délai pour le rendu des résultats au clinicien avec un coût modéré.

En effet, malgré son prix d'achat, la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF a permis de réduire le prix de l'identification bactérienne par rapport aux tests phénotypiques et aux divers kits d'agglutination, en raison de son faible coût de réalisation par échantillon (réduction du coût de 56,9% par an (151), environ 5 fois moins cher (135)). De plus, l'utilisation d'une méthode à la saponine par exemple est moins coûteuse qu'une extraction avec le kit Sepsityper® (0,72 contre 7,45 € par analyse d'après (174)), le coût de cette étape peut donc être encore diminué. Ainsi, au laboratoire, l'identification bactérienne par SM après extraction sur les flacons pourrait être réalisée avec un coût matériel raisonnable.

Une réduction des délais d'identification est également envisageable : d'après Tan et al. (151), l'utilisation de la SM pour l'identification sur colonies bactériennes réduit de 1,45 jours le délai d'identification par rapport aux méthodes traditionnelles. Celui-ci est estimé à environ 6 minutes par colonie bactérienne (135), pour plus d'1 jour avec les méthodes phénotypiques (au moins 16h (135)) ou la biologie moléculaire. Dans le cas des flacons d'hémocultures, l'identification bactérienne par SM directement sur le flacon optimise le délai de rendu de résultat par rapport aux méthodes conventionnelles avec un gain variant de 1h à plus de 24h selon les méthodes d'extraction (97,159). Ce gain de temps est également observé dans notre étude puisque 89,8% des bactéries isolées des POA inclus poussent soit uniquement en flacon de culture prolongée soit avec un délai  $\leq$  à 1 jour sur flacon par

rapport aux milieux gélosés. Etant donné que les performances de l'identification par SM directement sur flacons de POA sont comparables à celles sur flacons d'hémoculture, il est donc possible de réduire les délais d'identification bactérienne pour une majorité de ces prélèvements.

Une étude de Vlek et al (176) montre de surcroît que l'identification par spectrométrie de masse après extraction effectuée sur des flacons d'hémocultures réduit le délai d'identification de 28,8h et augmente par conséquent de 11,3% la proportion de patients recevant une antibiothérapie adaptée à la résistance naturelle de l'espèce bactérienne identifiée et à l'écologie du service, 24h après la positivité du flacon (177). La réduction du délai d'identification permettrait d'une part de réduire la prescription empirique d'antibiotiques à large spectre d'action qui favorise l'émergence des résistances bactériennes (156,178,179), et d'autre part de diminuer la morbidité (180,181) et la mortalité pour le patient (d'après des études réalisées dans le cadre des septicémies notamment (180,182,183)), cette dernière pouvant atteindre 11,5% dans les arthrites septiques (14). D'un point de vue financier cela se traduirait par une diminution du coût en traitement (177,182,184) et de la durée d'hospitalisation (181,184,185). Ces résultats, associés à ceux de l'étude « Spectro-LA », mettent en relief l'intérêt de l'utilisation de la SM sur les flacons de culture de POA dans le diagnostic et la prise en charge des IOA.

## Conclusion

Les infections ostéo-articulaires sont de par leur impact sur la morbi-mortalité un problème majeur de santé publique, justifiant la création en 2008 des Centres de Référence des Infections Ostéo-articulaires du Grand Ouest (CRIOGO) dont fait partie le C.H.U. de Rennes. C'est dans ce contexte qu'a été initiée l'étude « Spectro-LA », qui a pour objectif d'évaluer l'apport de la spectrométrie de masse dans la réduction du délai d'identification des bactéries responsables d'IOA, afin d'améliorer la prise en charge thérapeutique des patients concernés. Elle utilise pour cela une technique performante récemment introduite en laboratoire de Bactériologie médicale : la spectrométrie de masse avec source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI-TOF).

Durant 10 mois, 78 patients pour un total de 111 prélèvements ont été inclus dans l'étude au laboratoire de Bactériologie et Hygiène hospitalière du C.H.U. de Rennes (Pontchaillou). La spectrométrie de masse type MALDI-TOF (Biotyper, Bruker®) est alors réalisée directement sur les prélèvements et sur les bouillons d'enrichissement (flacons Bactec, BD®) après traitement préalable grâce au kit MALDI Sepsityper® (Bruker®), en parallèle d'un examen bactériologique standard et d'une analyse par biologie moléculaire du prélèvement (PCR ARN 16S et séquençage). Les conclusions de l'étude « Spectro-LA » sont les suivantes :

D'une part, l'identification par spectrométrie de masse après extraction directement sur le prélèvement ne peut être utilisée en pratique quotidienne au laboratoire car elle possède une sensibilité insuffisante (6,3%), ceci pour des raisons probablement multifactorielles : inoculum insuffisant, interférence avec la matrice du prélèvement, difficultés techniques lors de l'extraction liées à la consistance du prélèvement...

D'autre part, l'identification par spectrométrie de masse après extraction sur les milieux liquides d'enrichissement (flacons) de POA présente des performances similaires aux résultats des travaux réalisés sur flacons d'hémocultures, avec une proportion d'identification à l'espèce et au genre respectivement de 79,6 et 89,4%. Ses limites sont également les mêmes : l'intérêt est limité pour les flacons polymicrobiens et certaines

bactéries incorrectement identifiées (streptocoques alpha-hémolytiques...). Au final, cette technique pourrait permettre l'amélioration des délais d'identification sur les prélèvements ostéo-articulaires puisque près de 90% des espèces bactériennes isolées par prélèvement poussent dans un délai inférieur d'au moins 1 jour sur flacon de culture prolongée par rapport aux milieux gélosés ou bien poussent uniquement sur le flacon d'enrichissement. Compte tenu de l'importance dans les infections ostéo-articulaires aiguës de la mise en place dans les délais les plus brefs d'un traitement adapté afin d'éviter un passage à la chronicité et une morbi-mortalité conséquente, l'implantation en routine de cette technique pourrait permettre d'améliorer la prise en charge thérapeutique du patient par la mise en place plus rapide d'une antibiothérapie adaptée à l'espèce bactérienne et de diminuer le coût d'hospitalisation.

De plus, des études récentes montrent que la méthode d'extraction utilisée (kit Sepsityper®) pourrait être simplifiée avec une réduction du coût d'utilisation et du temps technique nécessaire à sa réalisation, facilitant ainsi son utilisation en pratique quotidienne au laboratoire.

A terme, cette technique pourrait également être appliquée à d'autres prélèvements biologiques soit directement sur l'échantillon pour les prélèvements à fort inoculum (examen direct positif...) soit sur le flacon pour ceux ensemencés dans des flacons de type Bactec® pour enrichissement : valves cardiaques, liquides de dialyse péritonéale, liquide de conservation d'organes, liquides d'ascite... Une automatisation de l'extraction pourra sans doute également être envisagée.

Si aujourd'hui le laboratoire de Bactériologie propose comme stratégie diagnostique dans les infections ostéo-articulaires un examen direct rapide et spécifique mais relativement peu sensible, ainsi qu'une mise en culture pouvant être accompagnée de biologie moléculaire pour les espèces bactériennes exigeantes et les patients sous antibiothérapie, la spectrométrie de masse MALDI-TOF réalisée sur les flacons de culture lors de la détection de leur positivité par l'automate pourrait permettre de réduire les délais d'identification pour une importante proportion de prélèvements, et améliorer ainsi la prise en charge des patients.

# Annexes

## Annexe 1 : Milieux de culture utilisés

- **Milieux non sélectifs** : ils contiennent au minimum des peptones ainsi que des extraits de viande et de levure et sont complétés ou non de diverses substances (vitamines, sang, sérum, œuf...) selon les exigences de la bactérie à cultiver. Ils peuvent être sous forme liquide ou solide si additionnés d'une substance gélifiante (agar-agar). Les géloses de type trypticase-soja permettent donc la croissance des bactéries peu exigeantes tandis que les géloses au sang frais de cheval ou de mouton (5 à 10%) et les géloses au sang cuit (permettant la libération des facteurs de croissance érythrocytaires) permettent la pousse des bactéries plus exigeantes.
- **Milieux semi-sélectifs** : ils contiennent des substances inhibant la croissance de certaines bactéries telles que des antibiotiques ou des antiseptiques permettant de mieux isoler l'espèce recherchée au sein d'un milieu polymicrobien, ce qui est le cas des prélèvements provenant de sites où une flore locale commensale est présente (peau, tractus respiratoire et digestif...). Il existe ainsi des milieux semi-sélectifs pour *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Legionella*, *Brucella*...
- **Milieux chromogènes** : les POA étant normalement stériles, ces milieux ne sont pas utilisés en première intention sauf en cas de croissance polymicrobienne avec des colonies difficiles à différencier ou à isoler.
- **Milieux d'enrichissement liquide** : bouillon cœur-cerveille, bouillon Schaedler, milieu de Rosenow, flacons d'hémoculture aérobies et anaérobies... Ils sont plus performants que les milieux solides car ils permettent de cultiver des prélèvements paucimicrobiens ou de favoriser la croissance des espèces bactériennes à pousse lente voire déficients, comme c'est le cas parfois dans les IOA. En effet, la composition optimale du milieu utilisé, la mise en culture d'une quantité de liquide plus importante, la présence d'agents adsorbants d'antibiotiques (résines) et d'agents lytiques libérant les bactéries intracellulaires ainsi que la possibilité être ensemencés au lit du malade augmentent les chances des flacons d'hémoculture de permettre la culture de ces bactéries fragiles (7,186,187).

## **Annexe 2 : Principe de la PCR**

### **Extraction des acides nucléiques**

Cette première opération a pour but de purifier les acides nucléiques sans pour autant les détruire, tout en éliminant les inhibiteurs pouvant perturber l'amplification. Elle peut être réalisée à partir d'une colonie bactérienne pure ou d'un échantillon biologique. La contamination du produit d'extraction par des acides nucléiques non contenus dans l'échantillon doit être soigneusement prévenue.

Elle comporte deux étapes, variables en fonction du type de prélèvement et de l'espèce bactérienne recherchée :

- La lyse du tissu collecté et de la paroi bactérienne : enzymatique (lysozyme, protéinase K), mécanique (broyage à billes, ultrasons), thermique (micro-ondes, bain marie) ou bien chimique (chélateurs tels que le Chelex® ou le sodium-dodecyl-sulfate).
- La purification des acides nucléiques à partir du produit lysé : manuelle (à l'aide de phénol/chloroforme puis précipitation à l'éthanol), semi-manuelle (sur colonnes de silice) ou automatisée.

Le rendement de cette étape conditionne la réussite de l'amplification.

### **Amplification des acides nucléiques**

Elle consiste à produire un grand nombre de copies d'acides nucléiques à partir d'une faible quantité et fait appel à la réaction de polymérisation en chaîne.

Les différents réactifs utilisés sont :

- Les nucléotides : sels de lithium ou de sodium des désoxyribonucléotides triphosphates (dGTP, dCTP, dATP, dTTP)
- La Taq polymérase : enzyme thermostable à plus de 70°C (optimum à 75°C, inactive à 90°C) issue de la bactérie *Thermus aquaticus* (souche YT1) ou d'un clonage dans l'*E. coli* (188,189)

- Les amorces (« primers ») : oligonucléotides complémentaires de la séquence d'ADN cible à analyser se positionnant à chaque extrémité de celle-ci, elles conditionnent la spécificité de la réaction
- Le tampon : composé de Tris-HCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, il équilibre la concentration en sels de la solution et apporte le Mg<sup>2+</sup> indispensable à la réaction enzymatique.

La réaction d'amplification est réalisée dans un thermocycleur et comporte 3 étapes qui se reproduisent sur plusieurs cycles (20 à 40) :

- La dénaturation : dissociation des brins d'acides nucléiques bicaténaires par chauffage entre 90 - 95°C.
- L'hybridation : appariement des amorces avec la séquence cible d'ADN monocaténaire complémentaire, grâce à un refroidissement de la température à un degré qui varie en fonction de leur composition en nucléotides (la température doit être < T<sub>m</sub>). La température d'hybridation peut se calculer de la façon suivante :

$$T_m = 2 (A+T) + 4 (G+C)$$

*T<sub>m</sub> : température de demi-dénaturation de l'hybride formé entre chaque amorce*

*A, T, G, C : nombre de bases de l'oligonucléotide correspondant (Adénine, Cytosine, Guanine, Thymine) présent dans la séquence de l'amorce utilisée*

- L'élongation : synthèse d'acides nucléiques par la Taq polymérase à partir des extrémités libres des amorces, grâce à l'augmentation de la température jusqu'à 70 à 75°C.

A chaque cycle les fragments synthétisés au cours du cycle précédent servent de matrice lors du cycle suivant, l'amplicon prédominant devenant la séquence autour de laquelle les amorces s'hybrident. L'amplification en tant que nombre final de copies de la séquence cible peut être exprimée par l'équation suivante :

$$(2^n - 2n)x$$

*n : nombre de cycles, x : nombre de copies de la matrice originelle*

Plusieurs éléments peuvent perturber la réaction et diminuer le rendement :

- Epuisement ou dénaturation des réactifs (amorces, nucléotides)
- Dimérisation ou compétition des amorces
- Hybridation des fragments amplifiés entre eux

- Production de sous-produits de réaction ayant un pouvoir inhibiteur (pyrophosphates)

## Détection

Plusieurs modalités de détection des produits amplifiés existent :

- PCR en point final

Lors d'une PCR en point final la détection du produit amplifié n'est effectuée qu'une fois la réaction de PCR achevée. La révélation peut être effectuée :

- Par électrophorèse sur gel : avec migration des protéines polyanioniques en fonction de leur masse moléculaire et révélation par un agent intercalant (bromure d'ethidium) présentant une fluorescence orange sous l'effet de rayons UV. La taille des bandes de produits amplifiés est alors comparée à un marqueur de poids moléculaire et à des témoins positifs et négatifs.
- Par hybridation sur bandelette de nitrocellulose : elle contient une sonde spécifique du produit recherché marquée à la biotine avec révélation par addition de streptavidine-peroxydase par exemple.

- PCR en temps réel

Dans les systèmes de PCR en temps réel, la détection de la production d'amplicons se fait tout au long de la réaction par la mesure de fluorescence d'un émetteur situé sur une sonde, dont le signal est proportionnel à la quantité d'amplicons générés. Le thermocycleur dans lequel s'effectue la réaction de PCR est donc couplé à un détecteur fluorimétrique.

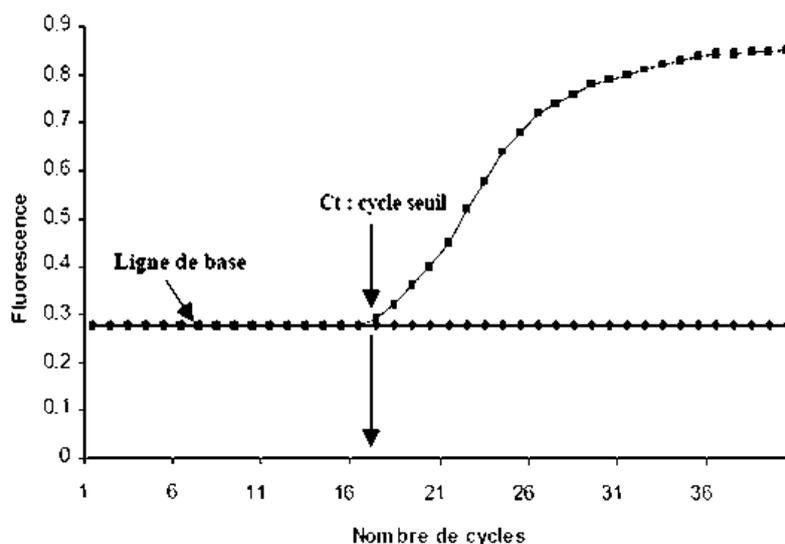
Différents types de sondes de sensibilité équivalente mais de spécificité variable peuvent être utilisées (190):

- Sondes d'hydrolyse (Taqman®)
- Agents se liant à l'ADN double brin :
  - Agents intercalants : SYBR Green
  - Agents se fixant au sillon mineur (« minor groove binders »)

- Hybridation de 2 sondes
- Amorces scorpion (Scorpion primer: « self-fluorescing amplicon »)
- « Molecular beacons »

Le résultat est une courbe sigmoïde exprimant l'intensité de fluorescence en fonction du nombre de cycles de la réaction. On distingue 3 phases :

- Phase d'initiation : au cours des 1ers cycles d'amplification, l'intensité faible de fluorescence permet de définir la ligne de base de la courbe. La cinétique d'hybridation des amorces est supérieure à celle des sondes, il n'y a donc pas de signal tant que les amorces sont en excès.
- Phase exponentielle : l'amplification est réalisée de façon constante à un taux exponentiel car la concentration des réactifs en excès demeure assez faible pour que la renaturation des amplicons n'entre pas en compétition avec l'hybridation des amorces. C'est lors de cette phase aisément reproductible qu'est extrapolée la quantité de matrice cible présente avant amplification : l'intensité de fluorescence est alors proportionnelle à la concentration d'amplicons.
- Phase de plateau : la réaction entre dans une phase linéaire où le taux d'amplification devient extrêmement variable, à cause d'une compétition entre la renaturation des amplicons et l'hybridation des amorces, puis il décroît à près de zéro générant très peu d'amplicons.



Courbe de résultats d'une PCR en temps réel

Le cycle seuil (Ct) représente le nombre de cycles requis pour que le signal d'émission de fluorescence soit statistiquement et significativement plus élevé que la ligne de base (bruit de fond). Comparé à une gamme d'étalonnage, il permet une quantification : plus il y a de matrice à amplifier moins le nombre de cycles requis pour atteindre le Ct sera élevé. En ce qui concerne les échantillons négatifs, soit il n'y a pas de valeur de Ct car ceux-ci ne dépassent pas la ligne de base soit la valeur du Ct est trop élevée et la réaction est considérée comme aspécifique.

Deux autres courbes sont à étudier :

- La courbe de température en fonction du temps : pour s'assurer que les cycles ont été correctement réalisés.
- La courbe de fusion dérivée (dérivée primaire de la courbe de fluorescence en fonction de la température) : permet pour les technologies SYBR Green® de vérifier qu'il n'y a qu'un seul type de produit amplifié. La température de fusion de l'échantillon doit être proche de celle du témoin positif, plusieurs pics pouvant signaler un mélange d'amplicons.

### Annexe 3 : Fiche de renseignements cliniques : étude SPECTRO-LA

#### Etiquette patient

Nom Prénom:

Date de naissance: .... / .... / .....

Sexe : H / F

#### Partie réservée au laboratoire

N° d'inclusion : SL .....

Date de la ponction : .... / .... / 2013

#### Thérapeutique :

- Antibiothérapie, au cours du mois précédent (date et traitement) : .....
- Injection ou ponction intra-articulaire : antécédents (date et traitement) .....
- Immunosuppression (corticoïdes, immunosuppresseurs, chimio...) : .....

#### Terrain :

- Insuffisance rénale chronique       Cirrhose       Immunodépression (HIV, tt)
- Alcoolisme, toxicomanie       Dyslipidémie       Diabète
- Autre (préciser) : .....

#### Pathologie ostéo-articulaire :

- Goutte/Chondrocalcinose       Traumatisme articulaire       Arthrose
- Spondylarthropathie       Polyarthrite rhumatoïde       Prothèse

#### Clinique :

Articulation ponctionnée (**entourer l'articulation concernée sur le schéma**)

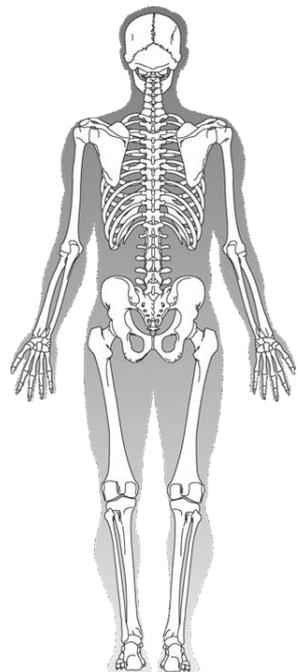
Signes articulaires :     douleur     chaleur     gonflement     limitation de la mobilité

Ancienneté de l'épanchement : ..... jours

Nombre d'articulations gonflées: .....       Fièvre (température) : ..... °C

Infection cutanée (en regard de l'articulation)       Infection sur prothèse associée

Autre : .....



#### Diagnostic final retenu :

- arthrite septique       arthrite rhumatismale (PR/ Spa)       goutte/chondrocalcinose
- arthrose       autre (préciser) .....



## Références bibliographiques

1. Ministère de la Santé, de la Jeunesse, des Sports et de la Vie associative. Les infections ostéo-articulaires. Dossier de presse. 26 sept 2008.
2. Société Française de Rhumatologie web site. Consulté le 13 janvier 2014. <<http://www.rhumatologie.asso.fr>>.
3. Damiano J, Bardin T. Liquide synovial normal et pathologique. EMC - Podol. déc 2005;1(4):65-79.
4. Sibilia J. Douleur et épanchement articulaire -Arthrite d'évolution récente -Orientations diagnostiques. ULP Faculté de Medecine de Strasbourg. France ; 2005.
5. Tsukayama DT, Estrada R, Gustilo RB. Infection after total hip arthroplasty. A study of the treatment of one hundred and six infections. J Bone Joint Surg Am. avr 1996;78(4):512-523.
6. McPherson EJ, Woodson C, Holtom P, Roidis N, Shufelt C, Patzakis M. Periprosthetic total hip infection: outcomes using a staging system. Clin Orthop. oct 2002;(403):8-15.
7. SFMN, SFM, SPILF, SFHH, SFAR. Recommandations de pratique clinique. Infections ostéo-articulaires sur matériel (prothèse, implant, ostéo-synthèse). Texte long. SPILF; 2009.
8. Coventry MB. Treatment of infections occurring in total hip surgery. Orthop Clin North Am. oct 1975;6(4):991-1003.
9. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. Churchill Livingstone/Elsevier; 2010. 2054 p.
10. Margaretten ME, Kohlwes J, Moore D, Bent S. Does this adult patient have septic arthritis? J Am Med Assoc. 4 avr 2007;297(13):1478-1488.
11. Smith JW, Chalupa P, Shabaz Hasan M. Infectious arthritis: clinical features, laboratory findings and treatment. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. avr 2006;12(4):309-314.
12. Kaandorp CJ, Van Schaardenburg D, Krijnen P, Habbema JD, van de Laar MA. Risk factors for septic arthritis in patients with joint disease. A prospective study. Arthritis Rheum. déc 1995;38(12):1819-1825.
13. Gavet F, Tournadre A, Soubrier M, Ristori JM, Dubost JJ. Septic arthritis in patients aged 80 and older: a comparison with younger adults. J Am Geriatr Soc. juill 2005;53(7):1210-1213.
14. Weston VC, Jones AC, Bradbury N, Fawthrop F, Doherty M. Clinical features and outcome of septic arthritis in a single UK Health District 1982-1991. Ann Rheum Dis. avr 1999;58(4):214-219.

15. Réseau d'alerte, d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales (Raisin). Surveillance des infections du site opératoire en France de 1999 à 2005 – Réseau ISO-Raisin – Résultats. Institut de veille sanitaire, Saint-Maurice – 2007, 31 p.
16. Folk JW, Starr AJ, Early JS. Early wound complications of operative treatment of calcaneus fractures: analysis of 190 fractures. *J Orthop Trauma*. juill 1999;13(5):369-372.
17. Eveillard M, Mertl P, Canarelli B, Lavenne J, Fave MH, Eb F, et al. Risk of deep infection in first-intention total hip replacement. Evaluation concerning a continuous series of 790 cases. *Presse Médicale Paris Fr* 1983. 15 déc 2001;30(38):1868-1875.
18. De Boer AS, Mintjes-de Groot AJ, Severijnen AJ, van den Berg JM, van Pelt W. Risk assessment for surgical-site infections in orthopedic patients. *Infect Control Hosp Epidemiol Off J Soc Hosp Epidemiol Am*. juin 1999;20(6):402-407.
19. Moxey PW, Gogalniceanu P, Hinchliffe RJ, Loftus IM, Jones KJ, Thompson MM, et al. Lower extremity amputations--a review of global variability in incidence. *Diabet Med J Br Diabet Assoc*. oct 2011;28(10):1144-1153.
20. Mayfield JA, Reiber GE, Sanders LJ, Janisse D, Pogach LM. Preventive foot care in people with diabetes. *Diabetes Care*. déc 1998;21(12):2161-2177.
21. Boulton AJM, Vileikyte L, Ragnarson-Tennvall G, Apelqvist J. The global burden of diabetic foot disease. *Lancet*. 12 nov 2005;366(9498):1719-1724.
22. Lipsky BA, Berendt AR, Cornia PB, Pile JC, Peters EJG, Armstrong DG, et al. Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Treatment of Diabetic Foot Infections. *Clin Infect Dis*. 15 juin 2012;54(12):1679-1684.
23. CMIT. E. Pilly. *Maladies infectieuses et tropicales*. Alinéa Plus; 2014.
24. Gustilo RB. Management of open fractures. An analysis of 673 cases. *Minn Med*. mars 1971;54(3):185-189.
25. Gustilo RB, Simpson L, Nixon R, Ruiz A, Indeck W. Analysis of 511 open fractures. *Clin Orthop*. oct 1969;66:148-154.
26. Shirtliff ME, Mader JT. Acute septic arthritis. *Clin Microbiol Rev*. oct 2002;15(4):527-544.
27. Ribeiro M, Monteiro FJ, Ferraz MP. Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial-material interactions. *Biomatter*. déc 2012;2(4):176-194.
28. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. avr 2002;15(2):167-193.

29. Sutherland IW. The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.* mai 2001;9(5):222-227.
30. Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, Becker K, McNamara P, Herrmann M, et al. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol.* avr 2006;4(4):295-305.
31. Vuong C, Gerke C, Somerville GA, Fischer ER, Otto M. Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis.* 1 sept 2003;188(5):706-718.
32. Monroe D. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *PLoS Biol.* 2007; 5(11): e307.
33. Denis F. *Bactériologie médicale: Techniques usuelles.* Elsevier Masson; 2011. 656 p.
34. Masi AT, Eisenstein BI. Disseminated gonococcal infection (DGI) and gonococcal arthritis (GCA): II. Clinical manifestations, diagnosis, complications, treatment, and prevention. *Semin Arthritis Rheum.* févr 1981;10(3):173-197.
35. Eisenstein BI, Masi AT. Disseminated gonococcal infection (DGI) and gonococcal arthritis (GCA): I. Bacteriology, epidemiology, host factors, pathogen factors, and pathology. *Semin Arthritis Rheum.* févr 1981;10(3):155-172.
36. Schaper NC, Apelqvist J, Bakker K. The international consensus and practical guidelines on the management and prevention of the diabetic foot. *Curr Diab Rep.* déc 2003;3(6):475-479.
37. SPILF. *Recommandations pour la pratique clinique. Prise en charge du pied diabétique infecté.* 2006.
38. Piroo MH, Mandell BF. Septic arthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* mai 1997;23(2):239-258.
39. Pandey R, Drakoulakis E, Athanasou NA. An assessment of the histological criteria used to diagnose infection in hip revision arthroplasty tissues. *J Clin Pathol.* févr 1999;52(2):118-123.
40. Feldman DS, Lonner JH, Desai P, Zuckerman JD. The role of intraoperative frozen sections in revision total joint arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am.* déc 1995;77(12):1807-1813.
41. Bori G, Soriano A, García S, Mallofré C, Riba J, Mensa J. Usefulness of histological analysis for predicting the presence of microorganisms at the time of reimplantation after hip resection arthroplasty for the treatment of infection. *J Bone Joint Surg Am.* juin 2007;89(6):1232-1237.
42. Crockarell JR, Hanssen AD, Osmon DR, Morrey BF. Treatment of infection with débridement and retention of the components following hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am.* sept 1998;80(9):1306-1313.

43. Seabrook GR, Edmiston CE, Schmitt DD, Krepel C, Bandyk DF, Towne JB. Comparison of serum and tissue antibiotic levels in diabetes-related foot infections. *Surgery*. oct 1991;110(4):671-676; discussion 676-677.
44. Lazzarini L, Lipsky BA, Mader JT. Antibiotic treatment of osteomyelitis: what have we learned from 30 years of clinical trials? *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis*. mai 2005;9(3):127-138.
45. Recommandations pour la pratique clinique : Spondylodiscites infectieuses primitives, et secondaires à un geste intradiscal, sans mise en place de matériel. *Médecine Mal Infect*. 37(9):554-572.
46. SFM. Rémic : référentiel en microbiologie médicale (bactériologie et mycologie). 4ème édition 2010. FR: SFM; 2010.
47. Bernard L, Pron B, Vuagnat A, Gleizes V, Signoret F, Denormandie P, et al. The value of suction drainage fluid culture during aseptic and septic orthopedic surgery: a prospective study of 901 patients. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1 janv 2002;34(1):46-49.
48. Prévention des risques infectieux dans les laboratoires d'analyse de biologie médicale. Hygiène vol. 15. Société Française d'Hygiène Hospitalière (SF2H): Paris; 2007.
49. Roux A-L, Sivadon-Tardy V, Bauer T, Lortat-Jacob A, Herrmann J-L, Gaillard J-L, et al. Diagnosis of prosthetic joint infection by beadmill processing of a periprosthetic specimen. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. mars 2011;17(3):447-450.
50. Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR, et al. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med*. 16 août 2007;357(7):654-663.
51. Achermann Y, Vogt M, Leunig M, Wüst J, Trampuz A. Improved diagnosis of periprosthetic joint infection by multiplex PCR of sonication fluid from removed implants. *J Clin Microbiol*. avr 2010;48(4):1208-1214.
52. Cazanave C, Greenwood-Quaintance KE, Hanssen AD, Karau MJ, Schmidt SM, Gomez Urena EO, et al. Rapid molecular microbiologic diagnosis of prosthetic joint infection. *J Clin Microbiol*. juill 2013;51(7):2280-2287.
53. Gomez E, Cazanave C, Cunningham SA, Greenwood-Quaintance KE, Steckelberg JM, Uhl JR, et al. Prosthetic joint infection diagnosis using broad-range PCR of biofilms dislodged from knee and hip arthroplasty surfaces using sonication. *J Clin Microbiol*. nov 2012;50(11):3501-3508.
54. Thierry Grancher, Guillaume J. Biologie des liquides d'épanchement. bioMérieux; 2006.
55. Trampuz A, Hanssen AD, Osmon DR, Mandrekar J, Steckelberg JM, Patel R. Synovial fluid leukocyte count and differential for the diagnosis of prosthetic knee infection. *Am J Med*. 15 oct 2004;117(8):556-562.

56. Maduka-Ezeh AN, Greenwood-Quaintance KE, Karau MJ, Berbari EF, Osmon DR, Hanssen AD, et al. Antimicrobial susceptibility and biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* small colony variants associated with prosthetic joint infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*. nov 2012;74(3):224-229.
57. Marchal N, Richard C, Bourdon J-L. Les Milieux de culture: pour l'isolement et l'identification biochimique des bacteries . Paris: Doin; 1982.
58. Schäfer P, Fink B, Sandow D, Margull A, Berger I, Frommelt L. Prolonged bacterial culture to identify late periprosthetic joint infection: a promising strategy. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1 déc 2008;47(11):1403-1409.
59. Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, Lew D, Zimmerli W, Steckelberg JM, et al. Diagnosis and Management of Prosthetic Joint Infection: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 6 déc 2012;cis803.
60. Institut Pasteur. Milieux et réactifs de laboratoire Pasteur : Microbiologie, immunologie. Oxoid Le Manuel Editions. 2001.
61. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. 1987;155:335-350.
62. Ameziane N, Bogard M, Lamoril J. Principes de biologie moléculaire en biologie clinique. Elsevier Masson; 2005. 726 p.
63. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnol Read Mass*. 1992;24:104-108.
64. Petrosino JF, Highlander S, Luna RA, Gibbs RA, Versalovic J. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clin Chem*. mai 2009;55(5):856-866.
65. Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, Tse H, Yuen K-Y. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. oct 2008;14(10):908-934.
66. Clarridge JE 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*. oct 2004;17(4):840-862, table of contents.
67. Petti CA, Polage CR, Schreckenberger P. The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. *J Clin Microbiol*. déc 2005;43(12):6123-6125.
68. Rantakokko-Jalava K, Nikkari S, Jalava J, Eerola E, Skurnik M, Meurman O, et al. Direct amplification of rRNA genes in diagnosis of bacterial infections. *J Clin Microbiol*. janv 2000;38(1):32-39.

69. Gautier A-L, Dubois D, Escande F, Avril J-L, Trieu-Cuot P, Gaillot O. Rapid and accurate identification of human isolates of *Pasteurella* and related species by sequencing the *sodA* gene. *J Clin Microbiol.* mai 2005;43(5):2307-2314.
70. Poyart C, Quesne G, Coulon S, Berche P, Trieu-Cuot P. Identification of *Streptococci* to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase. *J Clin Microbiol.* janv 1998;36(1):41-47.
71. Adékambi T, Drancourt M, Raoult D. The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists. *Trends Microbiol.* janv 2009;17(1):37-45.
72. Hedegaard J, Steffensen SA, Nørskov-Lauritsen N, Mortensen KK, Sperling-Petersen HU. Identification of *Enterobacteriaceae* by partial sequencing of the gene encoding translation initiation factor 2. *Int J Syst Bacteriol.* oct 1999;49 Pt 4:1531-1538.
73. Joblet C, Roux V, Drancourt M, Gouvernet J, Raoult D. Identification of *Bartonella (Rochalimaea)* species among fastidious gram-negative bacteria on the basis of the partial sequence of the citrate-synthase gene. *J Clin Microbiol.* juill 1995;33(7):1879-1883.
74. Kolbert CP, Persing DH. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol.* juin 1999;2(3):299-305.
75. Pérez-Losada M, Cabezas P, Castro-Nallar E, Crandall KA. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis.* juin 2013;16:38-53.
76. Gonçalves A, Bertucci F, Birnbaum D, Borg J-P. Proteic profiling SELDI-TOF and breast cancer: clinical potential applications. *Médecine Sci MS.* mars 2007;23 Spec No 1:23-26.
77. Emadali A, Gallagher-Gambarelli M. Quantitative proteomics by SILAC: practicalities and perspectives for an evolving approach. *Médecine Sci MS.* oct 2009;25(10):835-842.
78. Sanglier S. Cours spectrométrie de masse. CNRS ULP Strasbourg. France ; 2005.
79. Anhalt JP, Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal Chem.* 1 févr 1975;47(2):219-225.
80. Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem.* 1 oct 1988;60(20):2299-2301.
81. Claydon MA, Davey SN, Edwards-Jones V, Gordon DB. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat Biotechnol.* nov 1996;14(11):1584-1586.
82. Krishnamurthy T, Ross PL, Rajamani U. Detection of pathogenic and non-pathogenic bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom RCM.* 1996;10(8):883-888.

83. Blondiaux N, Gaillot, O Courcol RJ. Identification bactérienne de routine par spectrométrie de masse MALDI-TOF au CHU de Lille : impact médical et économique. EuroReference. Consulté le 15 novembre 2013. Consultable à l'URL : <http://www.ansespro.fr/euroreference/Documents/ER05-Meth-MaldiTof.pdf>.
84. Fenselau C, Demirev PA. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev.* août 2001;20(4):157-171.
85. Demirev PA, Ho YP, Ryzhov V, Fenselau C. Microorganism identification by mass spectrometry and protein database searches. *Anal Chem.* 15 juill 1999;71(14):2732-2738.
86. Knochenmuss R, Zenobi R. MALDI ionization: the role of in-plume processes. *Chem Rev.* févr 2003;103(2):441-452.
87. Karas M, Krüger R. Ion formation in MALDI: the cluster ionization mechanism. *Chem Rev.* févr 2003;103(2):427-440.
88. Dreisewerd K. The desorption process in MALDI. *Chem Rev.* févr 2003;103(2):395-426.
89. Giebel R, Worden C, Rust SM, Kleinheinz GT, Robbins M, Sandrin TR. Microbial fingerprinting using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) applications and challenges. *Adv Appl Microbiol.* 2010;71:149-184.
90. Ruelle V, El Moualij B, Zorzi W, Ledent P, Pauw ED. Rapid identification of environmental bacterial strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom RCM.* 2004;18(18):2013-2019.
91. Laprevotte O. Spectrométrie de Masse : introduction à l'instrumentation utile en analyse protéomique. Module proteomique. Université Paris Descartes. France. 2009.
92. Tholey A, Heinze E. Ionic (liquid) matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-applications and perspectives. *Anal Bioanal Chem.* sept 2006;386(1):24-37.
93. Cohen SL, Chait BT. Influence of matrix solution conditions on the MALDI-MS analysis of peptides and proteins. *Anal Chem.* 1 janv 1996;68(1):31-37.
94. Dai Y, Whittal RM, Li L. Confocal Fluorescence Microscopic Imaging for Investigating the Analyte Distribution in MALDI Matrices. *Anal Chem.* 1 août 1996;68(15):2494-2500.
95. Carbonnelle E, Nassif X. Applications of MALDI-TOF-MS in clinical microbiology laboratory. *Médecine Sci MS.* oct 2011;27(10):882-888.
96. Alatoom AA, Cunningham SA, Ihde SM, Mandrekar J, Patel R. Comparison of direct colony method versus extraction method for identification of gram-positive cocci by use of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* août 2011;49(8):2868-2873.

97. Meex C, Neuville F, Descy J, Huynen P, Hayette M-P, De Mol P, et al. Direct identification of bacteria from BacT/ALERT anaerobic positive blood cultures by MALDI-TOF MS: MALDI Sepsityper kit versus an in-house saponin method for bacterial extraction. *J Med Microbiol.* nov 2012;61(Pt 11):1511-1516.
98. Prod'hom G, Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets. *J Clin Microbiol.* avr 2010;48(4):1481-1483.
99. La Scola B, Raoult D. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One.* 2009;4(11):e8041.
100. Niu S, Zhang W, Chait BT. Direct comparison of infrared and ultraviolet wavelength matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins. *J Am Soc Mass Spectrom.* janv 1998;9(1):1-7.
101. Valentine N, Wunschel S, Wunschel D, Petersen C, Wahl K. Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol.* janv 2005;71(1):58-64.
102. Wunschel DS, Hill EA, McLean JS, Jarman K, Gorby YA, Valentine N, et al. Effects of varied pH, growth rate and temperature using controlled fermentation and batch culture on matrix assisted laser desorption/ionization whole cell protein fingerprints. *J Microbiol Methods.* sept 2005;62(3):259-271.
103. Keys CJ, Dare DJ, Sutton H, Wells G, Lunt M, McKenna T, et al. Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis.* sept 2004;4(3):221-242.
104. Anderson NW, Buchan BW, Riebe KM, Parsons LN, Gnacinski S, Ledebøer NA. Effects of solid-medium type on routine identification of bacterial isolates by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* mars 2012;50(3):1008-1013.
105. Camara JE, Hays FA. Discrimination between wild-type and ampicillin-resistant *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* nov 2007;389(5):1633-1638.
106. Hoyos-Mallecot Y, Cabrera-Alvargonzalez JJ, Miranda-Casas C, Rojo-Martín MD, Liebana-Martos C, Navarro-Marí JM. MALDI-TOF MS, a useful instrument for differentiating metallo- $\beta$ -lactamases in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas spp.* *Lett Appl Microbiol.* 28 nov 2013.

107. Hrabák J, Studentová V, Walková R, Zemlicková H, Jakubu V, Chudácková E, et al. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* juill 2012;50(7):2441-2443.
108. Hrabák J, Walková R, Studentová V, Chudácková E, Bergerová T. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* sept 2011;49(9):3222-3227.
109. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V, et al. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* mai 2012;18(5):432-438.
110. Carvalhaes CG, Cayô R, Assis DM, Martins ER, Juliano L, Juliano MA, et al. Detection of SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* and class D  $\beta$ -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* isolates by use of liquid chromatography-mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* janv 2013;51(1):287-290.
111. Du Z, Yang R, Guo Z, Song Y, Wang J. Identification of *Staphylococcus aureus* and determination of its methicillin resistance by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem.* 1 nov 2002;74(21):5487-5491.
112. Jackson KA, Edwards-Jones V, Sutton CW, Fox AJ. Optimisation of intact cell MALDI method for fingerprinting of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol Methods.* sept 2005;62(3):273-284.
113. Bittar F, Ouchenane Z, Smati F, Raoult D, Rolain J-M. MALDI-TOF-MS for rapid detection of staphylococcal Panton-Valentine leukocidin. *Int J Antimicrob Agents.* nov 2009;34(5):467-470.
114. Dauwalder O, Carbonnelle E, Benito Y, Lina G, Nassif X, Vandenesch F, et al. Detection of Panton-Valentine toxin in *Staphylococcus aureus* by mass spectrometry directly from colony: time has not yet come. *Int J Antimicrob Agents.* août 2010;36(2):193-194.
115. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, González-Avila M, Cembrero-Fuciños D, Herrero-Hernández A, González-Buitrago JM, et al. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* juin 2010;48(6):2110-2115.
116. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Muñoz-Bellido JL, González-Buitrago JM. Rapid method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: intact cell vs. extraction method. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* juill 2011;17(7):1007-1012.
117. Sauer S, Kliem M. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nat Rev Microbiol.* janv 2010;8(1):74-82.

118. Honisch C, Chen Y, Mortimer C, Arnold C, Schmidt O, van den Boom D, et al. Automated comparative sequence analysis by base-specific cleavage and mass spectrometry for nucleic acid-based microbial typing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 19 juin 2007;104(25):10649-10654.
119. Kuhns M, Zautner AE, Rabsch W, Zimmermann O, Weig M, Bader O, et al. Rapid discrimination of *Salmonella* enterica serovar Typhi from other serovars by MALDI-TOF mass spectrometry. *PLoS One*. 2012;7(6):e40004.
120. Van Veen SQ, Claas ECJ, Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol*. mars 2010;48(3):900-907.
121. Hamprecht A, Christ S, Oestreicher T, Plum G, Kempf VAJ, Göttig S. Performance of two MALDI-TOF MS systems for the identification of yeasts isolated from bloodstream infections and cerebrospinal fluids using a time-saving direct transfer protocol. *Med Microbiol Immunol (Berl)*. 6 déc 2013.
122. Bader O, Weig M, Taverne-Ghadwal L, Lugert R, Gross U, Kuhns M. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. sept 2011;17(9):1359-1365.
123. Marklein G, Josten M, Klanke U, Müller E, Horré R, Maier T, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol*. sept 2009;47(9):2912-2917.
124. Alanio A, Beretti J-L, Dauphin B, Mellado E, Quesne G, Lacroix C, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for fast and accurate identification of clinically relevant *Aspergillus* species. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. mai 2011;17(5):750-755.
125. Chalupová J, Raus M, Sedlářová M, Sebelá M. Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biotechnol Adv*. 7 nov 2013;
126. Santos C, Paterson RRM, Venâncio A, Lima N. Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Appl Microbiol*. févr 2010;108(2):375-385.
127. Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, Tangomo M, Girard M, Francois P, et al. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *J Clin Microbiol*. avr 2010;48(4):1169-1175.
128. Carbonnelle E, Grohs P, Jacquier H, Day N, Tenza S, Dewailly A, et al. Robustness of two MALDI-TOF mass spectrometry systems for bacterial identification. *J Microbiol Methods*. mai 2012;89(2):133-136.

129. Chen JHK, Ho P-L, Kwan GSW, She KKK, Siu GKH, Cheng VCC, et al. Direct bacterial identification in positive blood cultures by use of two commercial matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems. *J Clin Microbiol.* juin 2013;51(6):1733-1739.
130. Marko DC, Saffert RT, Cunningham SA, Hyman J, Walsh J, Arbefeville S, et al. Evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cultures from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol.* juin 2012;50(6):2034-2039.
131. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier P-E, Rolain JM, et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 août 2009;49(4):543-551.
132. Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G, Prod'hom G. Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Bacterial Strains Routinely Isolated in a Clinical Microbiology Laboratory. *J Clin Microbiol.* 5 janv 2010;48(5):1549-1554.
133. Eigner U, Holfelder M, Oberdorfer K, Betz-Wild U, Bertsch D, Fahr A-M. Performance of a matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry system for the identification of bacterial isolates in the clinical routine laboratory. *Clin Lab.* 2009;55(7-8):289-296.
134. Bizzini A, Jaton K, Romo D, Bille J, Prod'hom G, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains. *J Clin Microbiol.* févr 2011;49(2):693-696.
135. García P, Allende F, Legarraga P, Huilcaman M, Solari S. Bacterial identification based on protein mass spectrometry: A new insight at the microbiology of the 21st century. *Rev Chil Infectol Órgano Of Soc Chil Infectol.* juin 2012;29(3):263-272.
136. Rottman M. Diagnostic microbiologique des infections ostéo-articulaires : nouvelles approches. 47<sup>e</sup> Journées de Biologie Praticienne. Paris. 2013.
137. Horowitz DL, Katzap E, Horowitz S, Barilla-LaBarca M-L. Approach to septic arthritis. *Am Fam Physician.* 15 sept 2011;84(6):653-660.
138. Basic Local Alignment Search Tool web site. Consultable à l'URL : <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>
139. Nonnemann B, Tvede M, Bjarnsholt T. Identification of pathogenic microorganisms directly from positive blood vials by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* sept 2013;121(9):871-877.
140. Moussaoui W, Jaulhac B, Hoffmann A-M, Ludes B, Kostrzewa M, Riegel P, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly

- from blood culture vials. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* nov 2010;16(11):1631-1638.
141. Ryan MJ, Kavanagh R, Wall PG, Hazleman BL. Bacterial joint infections in England and Wales: analysis of bacterial isolates over a four year period. *Br J Rheumatol.* mars 1997;36(3):370-373.
142. Dubost J-J. Septic arthritis with no organism: a dilemma. *Jt Bone Spine Rev Rhum.* juill 2006;73(4):341-343.
143. Van der Heijden IM, Wilbrink B, Vije AE, Schouls LM, Breedveld FC, Tak PP. Detection of bacterial DNA in serial synovial samples obtained during antibiotic treatment from patients with septic arthritis. *Arthritis Rheum.* oct 1999;42(10):2198-2203.
144. Grif K, Heller I, Prodinger WM, Lechleitner K, Lass-Flörl C, Orth D. Improvement of detection of bacterial pathogens in normally sterile body sites with a focus on orthopedic samples by use of a commercial 16S rRNA broad-range PCR and sequence analysis. *J Clin Microbiol.* juill 2012;50(7):2250-2254.
145. Fenollar F, Roux V, Stein A, Drancourt M, Raoult D. 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. *J Clin Microbiol.* mars 2006;44(3):1018-1028.
146. Fihman V, Hannouche D, Bousson V, Bardin T, Lioté F, Raskine L, et al. Improved diagnosis specificity in bone and joint infections using molecular techniques. *J Infect.* déc 2007;55(6):510-517.
147. Bonilla H, Kepley R, Pawlak J, Belian B, Raynor A, Saravolatz LD. Rapid diagnosis of septic arthritis using 16S rDNA PCR: a comparison of 3 methods. *Diagn Microbiol Infect Dis.* avr 2011;69(4):390-395.
148. Harris KA, Hartley JC. Development of broad-range 16S rDNA PCR for use in the routine diagnostic clinical microbiology service. *J Med Microbiol.* août 2003;52(Pt 8):685-691.
149. Faraj AA, Omonbude OD, Godwin P. Gram staining in the diagnosis of acute septic arthritis. *Acta Orthop Belg.* oct 2002;68(4):388-391.
150. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev.* mars 2012;36(2):380-407.
151. Tan KE, Ellis BC, Lee R, Stamper PD, Zhang SX, Carroll KC. Prospective evaluation of a matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system in a hospital clinical microbiology laboratory for identification of bacteria and yeasts: a bench-by-bench study for assessing the impact on time to identification and cost-effectiveness. *J Clin Microbiol.* oct 2012;50(10):3301-3308.

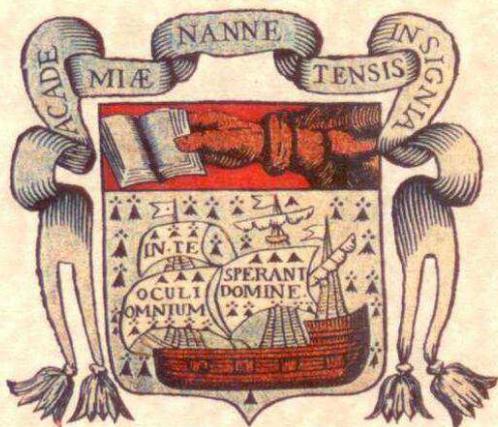
152. Biswas S, Rolain J-M. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture. *J Microbiol Methods*. janv 2013;92(1):14-24.
153. Mellmann A, Cloud J, Maier T, Keckevoet U, Ramminger I, Iwen P, et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. *J Clin Microbiol*. juin 2008;46(6):1946-1954.
154. Steensels D, Verhaegen J, Lagrou K. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of bacteria and yeasts in a clinical microbiological laboratory: a review. *Acta Clin Belg*. août 2011;66(4):267-273.
155. Ferroni A, Suarez S, Beretti J-L, Dauphin B, Bille E, Meyer J, et al. Real-time identification of bacteria and *Candida* species in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. mai 2010;48(5):1542-1548.
156. Kang C-I, Kim S-H, Park WB, Lee K-D, Kim H-B, Kim E-C, et al. Bloodstream infections caused by antibiotic-resistant gram-negative bacilli: risk factors for mortality and impact of inappropriate initial antimicrobial therapy on outcome. *Antimicrob Agents Chemother*. févr 2005;49(2):760-766.
157. Micek ST, Lloyd AE, Ritchie DJ, Reichley RM, Fraser VJ, Kollef MH. *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection: importance of appropriate initial antimicrobial treatment. *Antimicrob Agents Chemother*. avr 2005;49(4):1306-1311.
158. Köhling HL, Bittner A, Müller K-D, Buer J, Becker M, Rübber H, et al. Direct identification of bacteria in urine samples by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and relevance of defensins as interfering factors. *J Med Microbiol*. mars 2012;61(Pt 3):339-344.
159. Christner M, Rohde H, Wolters M, Sobottka I, Wegscheider K, Aepfelbacher M. Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by use of matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry fingerprinting. *J Clin Microbiol*. mai 2010;48(5):1584-1591.
160. Salord F, Druel B, Grando J, Verneau V, Perret C, Vandenesch F, et al. Aseptic meningitis. Demonstration of bacterial DNA in cerebrospinal fluid by gene amplification. *Ann Fr Anesthésie Réanimation*. 1995;14(4):320-325.
161. Kotilainen P, Jalava J, Meurman O, Lehtonen OP, Rintala E, Seppälä OP, et al. Diagnosis of meningococcal meningitis by broad-range bacterial PCR with cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol*. août 1998;36(8):2205-2209.
162. Goldenberger D, Künzli A, Vogt P, Zbinden R, Altwegg M. Molecular diagnosis of bacterial endocarditis by broad-range PCR amplification and direct sequencing. *J Clin Microbiol*. nov 1997;35(11):2733-2739.

163. Lang S, Watkin RW, Lambert PA, Bonser RS, Littler WA, Elliott TSJ. Evaluation of PCR in the molecular diagnosis of endocarditis. *J Infect.* avr 2004;48(3):269-275.
164. Marín M, Muñoz P, Sánchez M, del Rosal M, Alcalá L, Rodríguez-Créixems M, et al. Molecular diagnosis of infective endocarditis by real-time broad-range polymerase chain reaction (PCR) and sequencing directly from heart valve tissue. *Medicine (Baltimore).* juill 2007;86(4):195-202.
165. Vondracek M, Sartipy U, Aufwerber E, Julander I, Lindblom D, Westling K. 16S rDNA sequencing of valve tissue improves microbiological diagnosis in surgically treated patients with infective endocarditis. *J Infect.* juin 2011;62(6):472-478.
166. Wieser A, Schneider L, Jung J, Schubert S. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl Microbiol Biotechnol.* févr 2012;93(3):965-974.
167. Drancourt M. Detection of microorganisms in blood specimens using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a review. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* nov 2010;16(11):1620-1625.
168. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Porrás-Guerra I, García-García MI, García-Sánchez JE, González-Buitrago JM, et al. Microorganisms direct identification from blood culture by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* avr 2011;17(4):546-551.
169. Kok J, Thomas LC, Olma T, Chen SCA, Iredell JR. Identification of bacteria in blood culture broths using matrix-assisted laser desorption-ionization Sepsityper™ and time of flight mass spectrometry. *PloS One.* 2011;6(8):e23285.
170. Stevenson LG, Drake SK, Murray PR. Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* févr 2010;48(2):444-447.
171. Loonen AJM, Jansz AR, Bergland JNB, Valkenburg M, Wolffs PFG, van den Brule AJC. Comparative study using phenotypic, genotypic, and proteomics methods for identification of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol.* avr 2012;50(4):1437-1439.
172. Schubert S, Weinert K, Wagner C, Gunzl B, Wieser A, Maier T, et al. Novel, improved sample preparation for rapid, direct identification from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *J Mol Diagn JMD.* nov 2011;13(6):701-706.
173. Juiz PM, Almela M, Melción C, Campo I, Esteban C, Pitart C, et al. A comparative study of two different methods of sample preparation for positive blood cultures for the rapid identification of bacteria using MALDI-TOF MS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* juill 2012;31(7):1353-1358.

174. Martiny D, Dediste A, Vandenberg O. Comparison of an in-house method and the commercial Sepsityper™ kit for bacterial identification directly from positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption-ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* sept 2012;31(9):2269-2281.
175. Schmidt V, Jarosch A, März P, Sander C, Vacata V, Kalka-Moll W. Rapid identification of bacteria in positive blood culture by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* mars 2012;31(3):311-317.
176. Vlek ALM, Bonten MJM, Boel CHE. Direct matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry improves appropriateness of antibiotic treatment of bacteremia. *PLoS One.* 2012;7(3):e32589.
177. Kerremans JJ, Verboom P, Stijnen T, Hakkaart-van Roijen L, Goessens W, Verbrugh HA, et al. Rapid identification and antimicrobial susceptibility testing reduce antibiotic use and accelerate pathogen-directed antibiotic use. *J Antimicrob Chemother.* févr 2008;61(2):428-435.
178. Livermore DM. Minimising antibiotic resistance. *Lancet Infect Dis.* juill 2005;5(7):450-459.
179. Leone M, Martin C. How to break the vicious circle of antibiotic resistances? *Curr Opin Crit Care.* oct 2008;14(5):587-592.
180. Harbarth S, Garbino J, Pugin J, Romand JA, Lew D, Pittet D. Inappropriate initial antimicrobial therapy and its effect on survival in a clinical trial of immunomodulating therapy for severe sepsis. *Am J Med.* nov 2003;115(7):529-535.
181. Galar A, Leiva J, Espinosa M, Guillén-Grima F, Hernández S, Yuste JR. Clinical and economic evaluation of the impact of rapid microbiological diagnostic testing. *J Infect.* oct 2012;65(4):302-309.
182. Doern GV, Vautour R, Gaudet M, Levy B. Clinical impact of rapid in vitro susceptibility testing and bacterial identification. *J Clin Microbiol.* juill 1994;32(7):1757-1762.
183. Ibrahim EH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH. The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Chest.* juill 2000;118(1):146-155.
184. Barenfanger J, Drake C, Kacich G. Clinical and financial benefits of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing. *J Clin Microbiol.* mai 1999;37(5):1415-1418.
185. Beekmann SE, Diekema DJ, Chapin KC, Doern GV. Effects of rapid detection of bloodstream infections on length of hospitalization and hospital charges. *J Clin Microbiol.* juill 2003;41(7):3119-3125.

186. Von Essen R. Culture of joint specimens in bacterial arthritis. Impact of blood culture bottle utilization. *Scand J Rheumatol.* 1997;26(4):293-300.
187. Hughes JG, Vetter EA, Patel R, Schleck CD, Harmsen S, Turgeant LT, et al. Culture with BACTEC Peds Plus/F bottle compared with conventional methods for detection of bacteria in synovial fluid. *J Clin Microbiol.* déc 2001;39(12):4468-4471.
188. Chien A, Edgar DB, Trela JM. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol.* sept 1976;127(3):1550-1557.
189. Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK, Myambo K, Drummond R, Gelfand DH. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *J Biol Chem.* 15 avr 1989;264(11):6427-6437.
190. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques.* janv 1997;22(1):130-131, 134-138.

# Université de Nantes



## Faculté de Pharmacie

### Serment

**J**e jure, en présence des maîtres de la faculté et de mes condisciples :

**D'**honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

**D'**exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

**D**e ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

**Q**ue les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

**Q**ue je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

**Vu, le Président du jury,**

**Vu, le Directeur de thèse,**

Pr. Anne Gougeon  


**Vu, le Directeur de l'UFR,**

---

**Nom - Prénoms :** Lallemand Elise Anne

**Titre de la thèse :** **Évaluation de l'intérêt de la spectrométrie de masse MALDI-TOF dans le diagnostic des infections ostéo-articulaires.**

---

**Résumé de la thèse :**

Les infections ostéo-articulaires (IOA) sont des pathologies graves du fait de leur morbi-mortalité et de la complexité de leur prise en charge diagnostique et thérapeutique. L'étude « Spectro-LA » a pour objectif d'évaluer l'intérêt pour le diagnostic de ces infections de la spectrométrie de masse MALDI-TOF, technique d'identification sur colonie bactérienne performante récemment introduite dans les laboratoires de Bactériologie. Elle s'est déroulée de manière prospective de janvier à octobre 2013 au CHU de Rennes, incluant 78 patients pour un total de 111 prélèvements. La performance de l'identification par spectrométrie de masse après extraction à l'aide d'un kit (Sepsityper®) a été évaluée directement sur les prélèvements ostéo-articulaires ainsi que sur leurs flacons de culture prolongée en milieu liquide. La sensibilité de l'identification sur le prélèvement s'avère insuffisante (6%) en comparaison des méthodes traditionnelles (examen direct, culture, PCR-séquençage de l'ARN 16S sur le prélèvement), pour de multiples raisons : inoculum insuffisant, interférence avec la matrice du prélèvement, difficultés d'extraction... La performance de l'identification à partir des flacons de prélèvements ostéo-articulaires quant à elle est similaire à celle obtenue sur les colonies en milieu gélosé et dans les études sur les hémocultures, avec un taux d'identification de 79,6% et 89,4% à l'espèce et au genre respectivement. Ses résultats sont de la même façon limités pour les flacons polymicrobiens et certaines espèces (Streptocoques  $\alpha$ -hémolytiques...). Etant donné que 90% des espèces bactériennes isolées dans cette étude poussent dans un délai inférieur d'au moins 1 jour sur flacon de culture prolongée par rapport aux milieux gélosés ou bien poussent uniquement sur flacon, son utilisation pourrait permettre de réduire les délais d'identification bactérienne pour une majorité de prélèvements réalisés dans le cadre des IOA.

---

**MOTS CLÉS : SPECTROMETRIE DE MASSE, MALDI-TOF, INFECTION OSTEO-ARTICULAIRE, IDENTIFICATION BACTERIENNE**

---

**JURY**

**PRESIDENT :** Madame le Professeur Nathalie CAROFF,  
*Faculté de Pharmacie de Nantes*

**ASSESEURS :** Madame le Professeur Anne GOUGEON,  
*Faculté de Pharmacie de Rennes*  
Monsieur le Professeur Pascal GUGGENBUHL,  
*Faculté de Médecine de Rennes*  
Monsieur le Docteur Cédric ARVIEUX, Praticien Hospitalier,  
*CHU de Rennes*

---

**Adresse de l'auteur : 5 place Henri Terriere, 35200 RENNES**