



**HAL**  
open science

# Apport du broyage mécanique des prélèvements per-opératoires et de la PCR pan-bactérienne dans le diagnostic des infections de prothèse articulaire de hanche et de genou

Guillaume Teissier

► **To cite this version:**

Guillaume Teissier. Apport du broyage mécanique des prélèvements per-opératoires et de la PCR pan-bactérienne dans le diagnostic des infections de prothèse articulaire de hanche et de genou. Médecine humaine et pathologie. 2013. dumas-00871482

**HAL Id: dumas-00871482**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00871482v1>**

Submitted on 9 Oct 2013

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
FACULTE DE MEDECINE DE GRENOBLE

ANNEE : 2013

N°

**Apport du broyage mécanique des prélèvements per-opératoires  
et de la PCR pan-bactérienne dans le diagnostic des infections  
de prothèse articulaire de hanche et de genou**

Mémoire du diplôme d'études spécialisées de Biologie Médicale  
Conformément aux dispositions du décret N° 90-810 du 10 septembre 1990 tient lieu de thèse

THESE  
PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN MEDECINE  
DIPLOME D'ETAT

**Guillaume TEISSIER**

Né le 6 mai 1984 à Montpellier, Hérault

Thèse soutenue publiquement à la faculté de Médecine de Grenoble  
Le 26 septembre 2013

Devant le jury composé de :

Président du jury : Monsieur le Professeur Dominique SARAGAGLIA

Membres du jury : Madame le Docteur Sandrine BOISSET (directrice de thèse)

Madame le Docteur Patricia PAVESE

Monsieur le Professeur Max MAURIN

*\* La faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs*

**Faculté de Médecine Postes PU-PH 2012-2013**

**PUPH 2012-2013**

Nom - Prénom	Discipline
ALBALADEJO Pierre	Anesthésiologie réanimation
ARVIEUX-BARTHELEMY Catherine	chirurgie générale
BACONNIER Pierre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
BAGUET Jean-Philippe	Cardiologie
BALOSSO Jacques	Radiothérapie
BARRET Luc	Médecine légale et droit de la santé
BAUDAIN Philippe	Radiologie et imagerie médicale
BEANI Jean-Claude	Dermato-vénérologie
BENHAMOU Pierre Yves	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
BERGER François	Biologie cellulaire
BLIN Dominique	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
BONAZ Bruno	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie
BOSSON Jean-Luc	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
BOUGEROL Thierry	Psychiatrie d'adultes
BOUILLET Laurence	Médecine interne
BRAMBILLA CHRISTIAN	Pneumologie
BRAMBILLA Elisabeth	Anatomie et cytologie pathologiques
BRICAULT Ivan	Radiologie et imagerie médicale
BRICHON Pierre-Yves	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
CAHN Jean-Yves	Hématologie
CARPENTIER Françoise	Thérapeutique, médecine d'urgence
CARPENTIER Patrick	Chirurgie vasculaire, médecine vasculaire

**Faculté de Médecine Postes PU-PH 2012-2013**

CESBRON Jean-Yves	Immunologie
CHABARDES Stephan	Neurochirurgie
CHABRE Olivier	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
CHAFFANJON Philippe	Anatomie
CHAVANON Olivier	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
CHIQUET Christophe	Ophtalmologie
CHIROSSEL Jean-Paul	Anatomie
CINQUIN Philippe	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
COHEN Olivier	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
COUTURIER Pascal	Gériatrie et biologie du vieillissement
CRACOWSKI Jean-Luc	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
DE GAUDEMARIS Régis	Médecine et santé au travail
DEBILLON Thierry	Pédiatrie
DEMATTEIS Maurice	Addictologie
DEMONGEOT Jacques	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
DESCOTES Jean-Luc	Urologie
ESTEVE François	Biophysique et médecine nucléaire
FAGRET Daniel	Biophysique et médecine nucléaire
FAUCHERON Jean-Luc	chirurgie générale
FERRETTI Gilbert	Radiologie et imagerie médicale
FEUERSTEIN Claude	Physiologie
FONTAINE Eric	Nutrition
FRANCOIS Patrice	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
GARBAN Frédéric	Hématologie, transfusion
GAUDIN Philippe	Rhumatologie
GAVAZZI Gaetan	Gériatrie et biologie du vieillissement

## Faculté de Médecine Postes PU-PH 2012-2013

GAY Emmanuel	Neurochirurgie
GRIFFET Jacques	Chirurgie infantile
HALIMI Serge	Nutrition
HENNEBICQ Sylviane	Génétique et procréation
HOFFMANN Pascale	Gynécologie obstétrique
HOMMEL Marc	Neurologie
JOUK Pierre-Simon	Génétique
JUVIN Robert	Rhumatologie
KAHANE Philippe	Physiologie
KRACK Paul	Neurologie
KRAINIK Alexandre	Radiologie et imagerie médicale
LABARERE José	Département de veille sanitaire
LANTUEJOUL Sylvie	Anatomie et cytologie pathologiques
LE BAS Jean-François	Biophysique et médecine nucléaire
LEBEAU Jacques	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
LECCIA Marie-Thérèse	Dermato-vénéréologie
LEROUX Dominique	Génétique
LEROY Vincent	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie
LETOUBLON Christian	chirurgie générale
LEVY Patrick	Physiologie
LUNARDI Joël	Biochimie et biologie moléculaire
MACHECOURT Jacques	Cardiologie
MAGNE Jean-Luc	Chirurgie vasculaire
MAITRE Anne	Médecine et santé au travail

## Faculté de Médecine Postes PU-PH 2012-2013

MAURIN Max	Bactériologie - virologie
MERLOZ Philippe	Chirurgie orthopédique et traumatologie
MORAND Patrice	Bactériologie - virologie
MORO Elena	Neurologie
MORO-SIBILOT Denis	Pneumologie
MOUSSEAU Mireille	Cancérologie
MOUTET François	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique, brûlogie
PALOMBI Olivier	Anatomie
PASSAGIA Jean-Guy	Anatomie
PAYEN DE LA GARANDERIE Jean-François	Anesthésiologie réanimation
PELLOUX Hervé	Parasitologie et mycologie
PEPIN Jean-Louis	Physiologie
PERENNOU Dominique	Médecine physique et de réadaptation
PERNOD Gilles	Médecine vasculaire
PIOLAT Christian	Chirurgie infantile
PISON Christophe	Pneumologie
PLANTAZ Dominique	Pédiatrie
POLACK Benoît	Hématologie
PONS Jean-Claude	Gynécologie obstétrique
RAMBEAUD Jacques	Urologie
REYT Emile	Oto-rhino-laryngologie
RIGHINI Christian	Oto-rhino-laryngologie
ROMANET J. Paul	Ophthalmologie

**Faculté de Médecine    Postes PU-PH 2012-2013**

SARAGAGLIA Dominique	Chirurgie orthopédique et traumatologie
SCHMERBER Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
SCHWEBEL Carole	Réanimation médicale
SERGENT Fabrice	Gynécologie obstétrique
SESSA Carmine	Chirurgie vasculaire
STAHL Jean-Paul	Maladies infectieuses, maladies tropicales
STANKE Françoise	Pharmacologie fondamentale
TIMSIT Jean-François	Réanimation
TONETTI Jérôme	Chirurgie orthopédique et traumatologie
TOUSSAINT Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire
VANZETTO Gérald	Cardiologie
VUILLEZ Jean-Philippe	Biophysique et médecine nucléaire
WEIL Georges	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
ZACUI Philippe	Néphrologie
ZARSKI Jean-Pierre	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie



Faculté de Médecine

Postes MCU-PH 2012-2013

MCU-PH 2012/2013

Nom - Prénom	Discipline
APEL Florent	Ophthalmologie
BOISSET Sandrine	Agents infectieux
BONNETERRE Vincent	Médecine et santé au travail
BOTTARI Serge	Biologie cellulaire
BOUTONNAT Jean	Cytologie et histologie
BOUZAT Pierre	Réanimation
BRENIER-PINCHART M. Pierre	Parasitologie et mycologie
BRIOT Raphaël	Thérapeutique, médecine d'urgence
CALLANAN-WILSON Mary	Hématologie, transfusion
DERANSART Colin	Physiologie
DETANTE Olivier	Neurologie
DIETERICH Klaus	Génétique et procréation
DUMESTRE-PERARD Chantal	Immunologie
EYSSERIC Hélène	Médecine légale et droit de la santé
FAURE Julien	Biochimie et biologie moléculaire
GILLOIS Pierre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
GRAND Sylvie	Radiologie et imagerie médicale
GUZUN Rita	Endocrinologie, diabétologie, nutrition, éducation thérapeutique
LAPORTE François	Biochimie et biologie moléculaire
LARDY Bernard	Biochimie et biologie moléculaire
LARRAT Sylvie	Bactériologie, virologie
LAUNOIS-ROLLINAT Sandrine	Physiologie
MALLARET Marie-Reine	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MAUBON Danièle	Parasitologie et mycologie
MC LEER (FLORIN) Anne	Cytologie et histologie
MOREAU-GAUDRY Alexandre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MOUCHET Patrick	Physiologie
PACLET Marie-Hélène	Biochimie et biologie moléculaire
PAYSANT François	Médecine légale et droit de la santé

**Faculté de Médecine****Postes MCU-PH 2012-2013**

PELLETIER Laurent	Biologie cellulaire
RAY Pierre	Génétique
RIALLE Vincent	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
ROUX-BUISSON Nathalie	Biochimie, toxicologie et pharmacologie
SATRE Véronique	Génétique
STASIA Marie-Josée	Biochimie et biologie moléculaire
TAMISIER Renaud	Physiologie

# REMERCIEMENTS

## Aux membres du jury,

A Monsieur le **Professeur Dominique Saragaglia**, de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse. Je vous remercie de l'intérêt que vous portez à ce travail. Je tiens également à vous remercier de votre implication et celle de votre service dans la réalisation de ce projet.

A Madame le **Docteur Sandrine Boisset**, d'avoir accepté d'encadrer ce travail de thèse. Un immense merci pour ton soutien, tes précieux conseils et ta disponibilité. Tes compétences et ton investissement ont été déterminants pour l'aboutissement de cette étude. Je tiens également à te remercier de m'avoir initié aux joies de la Biologie Moléculaire.

A Madame le **Docteur Patricia Pavese**, de me faire l'honneur de juger ce travail de thèse. Un grand merci pour votre aide, votre gentillesse et pour avoir rendu possible ce projet.

A Monsieur le **Professeur Max Maurin**, de m'avoir accueilli au sein du laboratoire de Bactériologie de nombreux semestres et de m'avoir accordé votre confiance pour effectuer ce travail. Je voudrais aussi vous exprimer ma profonde et sincère reconnaissance pour votre soutien tout au long de cette expérience.

A Monsieur le **Docteur Jacques Croizé**, de m'avoir proposé ce sujet si intéressant, moi fils et frère de chirurgien orthopédique. Je vous remercie surtout de m'avoir fait découvrir et aimer la Microbiologie. Merci également de votre enthousiasme et de votre plaisir à partager vos nombreuses passions qu'elles soient médicales ou non.

A Monsieur le **Professeur Philippe Merloz** et au service d'Orthopédie de l'Hôpital Nord pour leur participation à ce projet.

## A ma famille,

A **Maëlle**, ma compagne, pour ta présence, ton soutien permanent et pour m'avoir supporté tout au long de cette année !! Merci de ton amour et du bonheur que tu m'apportes. Merci...pour tout.

A **mes parents**, pour votre soutien sans faille et votre amour indéfectible. Je vous dois tout. Merci de nous avoir transmis ces valeurs de travail, de famille et d'avoir su construire avec nous une relation privilégiée.

A mon frère **Philippe**, pour ta présence et tes encouragements en toutes circonstances, pour tous ces moments passés ensembles et pour notre complicité. Tu as toujours été un grand frère parfait. Merci également à Alice, ma belle-sœur, de rendre mon frère heureux.

A ma famille, **Mado**, ma « deuxième maman », mes **grands-parents** (à ma **mamie** qui ne comprend toujours pas en quoi consiste mon métier), **Jacques** mon parrain pour ton investissement dans mes projets d'avenir, **Lili** ma marraine et tout le reste de la famille, sans oublier **Ralph**.

A ma future **belle-famille** pour votre accueil et votre gentillesse.

A la Lozère et aux Gouttes, ce petit paradis synonyme de sérénité et de vacances en famille.

### **A mes amis,**

A **Olivier, Gigi, Mat** et **Rico** pour votre amitié depuis des années.

Aux copains de Médecine (**Ed, Pierre, Nabs, Xav, Auré, Stéfano, Thibault...**) pour nos souvenirs mémorables.

A **Pierre** (JC, clo-clo...), pour les bons moments passés mais aussi pour tes qualités pédagogiques. Humainement et professionnellement, tu es une « belle rencontre ». Merci de t'être occupé de mes prélèvements quand j'étais en DU à Paris !!!

Aux amis grenoblois, pour m'avoir fait apprécier cette ville, les montagnes et la vie grenobloise : **Pafou, M. Casez, Eric, Philippe, Minor, Yannou, M. Pacault, Spirou, Champi**, et bien sur la **famille Souchal...**

A mes co-internes et amis, notamment **Âne-sôt, Yvan, Gautier** le picard, **Saber, Sylvain** et les **Guillaume**.

Un grand merci à **Christine Recule** et **Isabelle Pelloux** pour votre disponibilité, votre gentillesse et pour avoir participé à ma formation de biologiste.

A tout le personnel du laboratoire de Bactériologie pour leur bonne humeur, leur professionnalisme et leur aide précieuse. Ce travail n'aurait pu aboutir sans leur soutien.

A toutes les personnes que j'ai pu rencontrer durant mon internat. Merci notamment aux biologistes et aux techniciens qui ont contribué à ma formation et qui m'ont guidé durant tous ces semestres d'internat dans cette vaste et belle discipline qu'est la Biologie Médicale. Merci également à l'équipe de la clinique mutualiste de m'avoir donné du temps pour finaliser ce projet.

A tous ceux que j'ai pu oublier...

## RESUME

**Introduction :** Les infections ostéo-articulaires sur prothèse (IOAP) constituent un enjeu majeur de santé publique. Leur diagnostic est difficile mais capital pour assurer une prise en charge optimale des patients. L'objectif de cette étude était double : d'une part, évaluer les performances de la méthode de culture classique après prétraitement des prélèvements per-opératoires par broyage mécanique et, d'autre part, comparer la technique de PCR pan-bactérienne à la culture conventionnelle.

**Méthodes :** Une étude prospective a été menée sur des patients opérés pour un descellement de prothèse articulaire de hanche ou de genou pour cause septique ou non. Pour chaque patient, 7 prélèvements ont été réalisés à visée bactériologique ; les 5 prélèvements habituellement recommandés traités de manière classique et 2 prélèvements supplémentaires homogénéisés à l'aide d'un broyeur à billes avant leur mise en culture. Les prélèvements broyés et le liquide articulaire ont ensuite été testés en PCR universelle.

**Résultats :** De novembre 2012 à juin 2013, l'analyse des prélèvements des 24 patients inclus n'a pas montré d'amélioration de la sensibilité de la culture par le broyage mécanique préalable des échantillons. En revanche, ce prétraitement a permis de réduire le délai de positivité des cultures, de favoriser la détection des « small colony variants » et de limiter le risque de contamination. Bien que moins sensible que la culture, la PCR universelle présente un intérêt dans certaines situations spécifiques, notamment la prise d'antibiotiques dans les jours précédant l'intervention.

**Conclusion :** Le broyage mécanique des prélèvements apparaît donc comme une technique intéressante pour optimiser le diagnostic des infections sur prothèse articulaire même si d'autres études sont nécessaires pour confirmer son intérêt. La PCR universelle doit s'envisager en complément de la culture microbiologique dans le cas d'IOAP.

# TABLE DES MATIERES

<b><u>LISTE DES FIGURES .....</u></b>	<b><u>6</u></b>
<b><u>LISTE DES TABLEAUX .....</u></b>	<b><u>7</u></b>
<b><u>LISTE DES ABREVIATIONS .....</u></b>	<b><u>8</u></b>
<b><u>INTRODUCTION.....</u></b>	<b><u>10</u></b>
<b><u>Partie 1 - RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....</u></b>	<b><u>13</u></b>
1. <u>EPIDEMIOLOGIE des IOAP</u> .....	13
1.1. Incidence .....	13
1.2. Germes responsables d'IOAP .....	14
1.3. Facteurs de risque d'IOAP .....	16
2. <u>PHYSIOPATHOLOGIE des IOAP</u> .....	17
2.1. Modes de contamination : mécanismes d'entrée de la bactérie .....	17
2.2. Bactéries et biofilm .....	18
2.2.1. Généralités sur le biofilm .....	19
2.2.2. Epidémiologie – Biofilm et infections .....	21
2.2.3. Formation du biofilm .....	23
2.2.4. Biofilm et système immunitaire .....	28
2.2.5. Biofilm et antibiotiques .....	29
2.3. Internalisation bactérienne par les cellules de l'hôte et persistance intracellulaire.....	31
2.4. Small colony variants.....	32
2.5. Impact du biofilm, de l'internalisation et des SCV.....	37
3. <u>CLASSIFICATION des IOAP</u> .....	41
4. <u>DIAGNOSTIC des IOAP</u> .....	43
4.1. Signes cliniques .....	44
4.2. Place de l'imagerie.....	45
4.3. Apport de l'examen anatomopathologique .....	47
4.4. Diagnostic biologique .....	48
4.4.1. Biomarqueurs de l'inflammation .....	48
4.4.2. Diagnostic microbiologique .....	49
4.4.2.1. Prélèvements pré-opératoires.....	50
4.4.2.2. Prélèvements per-opératoires.....	52
4.4.3. Apport du broyage mécanique .....	59
4.4.4. Diagnostic moléculaire .....	62
4.4.4.1. Principes de la PCR pan-bactérienne ou universelle .....	64
4.4.4.2. PCR universelle et IOAP .....	66
4.4.4.3. PCR spécifique .....	67
4.4.4.4. Autres techniques moléculaires .....	68
4.5. Critères diagnostiques.....	69
4.6. Limites du diagnostic.....	71
5. <u>TRAITEMENT des IOAP</u> .....	73
5.1. Traitement chirurgical.....	74
5.2. Antibiothérapie .....	80

<b>Partie 2 – TRAVAIL EXPERIMENTAL .....</b>	<b>86</b>
MATERIELS et METHODES .....	87
RESULTATS .....	96
DISCUSSION .....	103
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>111</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>113</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>117</b>

# LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Biofilm en microscopie électronique. D'après Donlan <i>et al.</i> , 2002.....	19
<b>Figure 2</b> : Schéma représentant les 5 étapes de formation d'un biofilm. D'après Watkins <i>et al.</i> , 2012.....	23
<b>Figure 3</b> : Colonisation par le biofilm ( <i>Staphylococcus epidermidis</i> ) d'une surface inerte <i>in vitro</i> . D'après Olson <i>et al.</i> , 1988. ....	27
<b>Figure 4</b> : Présentation schématique de la réponse immunitaire lors d'une infection liée au biofilm. D'après Costerton <i>et al.</i> , 1999 .....	29
<b>Figure 5</b> : 3 hypothèses concernant les mécanismes de résistance aux antibiotiques des biofilms. D'après Stewart <i>et al.</i> , 2001 .....	30
<b>Figure 6</b> : Internalisation de <i>S. aureus</i> dans les ostéoblastes. D'après Rasigade, 2012. ....	32
<b>Figure 7</b> : hypothèse de modèle des voies métaboliques et énergétiques associées au phénotype « SCV ». D'après Proctor <i>et al.</i> , 2006. ....	34
<b>Figure 8</b> : « Small colony variants ». D'après Proctor <i>et al.</i> , 2006. ....	35
<b>Figure 9</b> : (a) Radiographie de la hanche droite et (b) Reformatage TDM coronal en fenêtre osseuse chez un patient porteur d'une prothèse totale de hanche douloureuse. D'après Cyteval <i>et al.</i> , 2012 .....	45
<b>Figure 10</b> : Schémas et image représentant la préparation d'un prélèvement solide ou d'un matériel étranger explanté par broyage mécanique. Issus du site de Labomoderne.....	60
<b>Figure 11</b> : Algorithme de prise en charge chirurgicale des patients infectés non éligibles au traitement avec conservation de la prothèse. D'après Zimmerli <i>et al.</i> , 2004 .....	78
<b>Figure 12</b> : Résultats des cultures de SCN (SCV) à droite et <i>E. coli</i> à gauche respectivement sans et avec broyage .....	99



# LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Revue de la littérature des données microbiologiques associées aux infections de prothèse de hanche et de genou. D’après Peel <i>et al.</i> , 2012.....	15
<b>Tableau 2</b> : Liste non exhaustive des infections humaines impliquant le biofilm. D’après Costerton <i>et al.</i> , 1999.....	22
<b>Tableau 3</b> : Facteurs intervenant dans l’attachement des cellules et la formation du Biofilm. D’après Donlan, 2002 .....	24
<b>Tableau 4</b> : Rapport médian des concentrations des principaux antibiotiques et familles d’antibiotiques : concentration osseuse/concentration sérique ou plasmatique (%). D’après Pea, 2009 .....	39
<b>Tableau 5</b> : Classification des infections d’implants en orthopédie en accord avec le début des symptômes après implantation. D’après Borens <i>et al.</i> , 2009 .....	43
<b>Tableau 6</b> : Sensibilité et spécificité des marqueurs biochimiques dans l’IOAP. D’après Peel <i>et al.</i> , 2010.....	49
<b>Tableau 7</b> : Comparaison de 3 méthodes de culture pour le diagnostic d’IOAP de hanche et de genou. D’après Larsen <i>et al.</i> , 2012 .....	50
<b>Tableau 8</b> : Revue d’études comparant les performances de la culture sans et avec sonication de l’implant prothétique en cas d’IOAP. D’après Larsen <i>et al.</i> , 2012.....	55
<b>Tableau 9</b> : Caractéristiques des patients ayant une IOAP suspectée ou avérée.....	97
<b>Tableau 10</b> : Comparaison des résultats de la culture microbiologique sans et avec broyage mécanique en termes de nombre de colonies et de délai de positivité des 12 patients du groupe « IOAP avérée ou suspectée ». .....	100
<b>Tableau 11</b> : Résultats de la culture microbiologique et de la PCR universelle des 12 patients du groupe « IOAP avérée ou suspectée ». .....	102

# LISTE DES ABREVIATIONS

°C : degré celsius

ADN : Acide désoxyribonucléique

AI : Auto-inducteur

AMM : Autorisation de mise sur le marché

ARN : Acide ribonucléique

ATIH : Agence Technique de l'Information sur l'Hospitalisation

ATP : Adénosine triphosphate

BGN : Bacille à Gram négatif

BMR : Bactérie multi-résistante

CDC : *Center for Disease Control*

CHU : Centre Hospitalo-Universitaire

CMEB : Concentration minimale d'éradication du biofilm

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CRP : Protéine C-réactive

DNase : Désoxyribonucléase

ESI-TOF : *Electrospray time-of-flight*

FQ : Fluoroquinolone

IL-6 : Interleukine-6

IN : Infection nosocomiale

INF- $\gamma$  : Interféron- $\gamma$

IOA : Infection ostéo-articulaire

IOAP : Infection ostéo-articulaire sur prothèse

IRM : Imagerie par résonance magnétique

ISO : Infection du site opératoire

MALDI-TOF MS : *Matrix Assisted Lazer Desorption Ionisation / Time-of-flight Mass Spectrometry*

MEC : Matrice extracellulaire

NIH : *National Institute of Health*

NNISS : *National Nosocomial Infections Surveillance System*

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PCT : Procalcitonine

PNN : Polynucléaires neutrophiles

PSM : Poste de sécurité microbiologique

QS : Quorum sensing

RAISIN : Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

SCN : Staphylocoque à coagulase négative

SCV : Small colony variants ou variants micro-colonies

SPILF : Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française

TNF- $\alpha$  : *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*

UFC : Unité formant colonie

VPN : Valeur prédictive négative

VPP : Valeur prédictive positive

VS : Vitesse de sédimentation

# INTRODUCTION

Avec près de 150 000 prothèses de hanche et 80 000 prothèses de genou posées chaque année, les arthroplasties de hanche et de genou apparaissent comme des interventions courantes et sûres permettant de diminuer les douleurs et d'améliorer la qualité de vie des patients. Avec moins de 10% de complications et des résultats satisfaisants, le succès de ces interventions semble maintenant évident à tous. De plus, l'amélioration des procédures d'antibioprophylaxie et la mise en place de flux laminaires dans les blocs opératoires ont permis de réduire le risque d'infection à moins de 1% pour les prothèse de hanche et à moins de 2% pour celles de genou<sup>1</sup>. Mais bien que l'infection ostéo-articulaire sur prothèse (IOAP) soit un évènement rare après arthroplastie, elle en représente une complication majeure car associée à une morbidité élevée et des coûts économiques importants. En outre, le nombre d'IOAP est en augmentation constante en raison du nombre croissant de patients porteurs de prothèses articulaires<sup>2</sup>.

Les IOAP constituent un véritable challenge tant sur le plan diagnostique que thérapeutique. En effet, leur diagnostic est complexe et repose sur un faisceau d'arguments cliniques, biologiques, radiologiques et anatomo-pathologiques parmi lesquels la microbiologie est prédominante<sup>3</sup>. La difficulté de ce

diagnostic est liée aux propriétés des bactéries à produire un biofilm au contact du matériel, à la grande diversité de microorganismes impliqués dans les IOAP, à l'existence d'une éventuelle antibiothérapie préalable et à l'absence de consensus sur les critères permettant de définir une IOA sur matériel<sup>4 5</sup>. Ainsi, les méthodes diagnostiques actuelles, basées sur la mise en culture des prélèvements pré- et per-opératoires manque de sensibilité avec 10 à 30% de faux-négatifs<sup>6</sup>. Or un diagnostic précis et rapide avec l'identification du germe en cause et la détermination de son profil de résistance est crucial pour la réussite du traitement.

Avec les nouvelles techniques permettant de libérer les bactéries enchâssées dans le biofilm comme le broyage mécanique des biopsies péri-prothétiques ou la technique de sonication des prothèses articulaires explantées, la sensibilité de la culture a augmenté de manière significative<sup>7 8</sup>.

Néanmoins, chez une part non négligeable de patients avec une IOAP avérée, le germe responsable de l'infection reste inconnu, en particulier chez les patients ayant reçu préalablement un traitement antibiotique. Dans ce cas et dans les situations où la bactérie en cause est difficile voire impossible à cultiver, la PCR pan-bactérienne ciblant l'ADNr 16S, plus couramment appelée PCR universelle peut être une aide au diagnostic. Mais cette PCR a des limites à savoir une faible sensibilité globale et une incapacité à détecter les infections poly-microbiennes<sup>4 9 10</sup>.

L'objectif de notre étude était donc d'évaluer une nouvelle approche diagnostique des IOAP de hanche et de genou associant la culture conventionnelle optimisée par le broyage préalable des prélèvements solides et une technique indépendante de la culture, la PCR universelle. Pour cela, à partir d'échantillons profonds prélevés lors de révisions de prothèses de hanche ou de genou pour des raisons septiques ou non, nous avons comparé les résultats de la culture classique aux performances d'une nouvelle stratégie diagnostique associant culture optimisée et biologie moléculaire. Le but était donc double, évaluer l'apport du broyage des biopsies avant la mise en culture et déterminer la place de la PCR pan-bactérienne.

# Partie 1 - RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

## 1. EPIDEMIOLOGIE des IOAP

### 1.1. Incidence

En France, près de 150 000 prothèses de hanche et 80 000 prothèses de genou sont mises en place chaque année selon les données de l'Agence Technique de l'Information sur l'Hospitalisation (ATIH) datant de 2011<sup>11</sup>. L'IOAP est une complication rare de ces interventions depuis la généralisation de l'antibioprophylaxie per-opératoire, l'amélioration du « design » des implants et de la technique chirurgicale et la mise en place de flux laminaires dans les blocs opératoires.

En 2011, en se basant sur les données de surveillance du Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales (RAISIN), l'incidence globale des infections sur prothèses articulaires de hanche était estimée à 1,4% et à 0,4% pour les prothèses de genou<sup>12</sup>. Mais ces données étaient sous-estimées car le suivi postopératoire des patients n'était que de 30 jours maximum. Plusieurs études françaises retrouvent des taux d'infection après arthroplastie allant de 0,9 à 4,29%<sup>13 14 15 16 17</sup> ; tandis que Zimmerli *et al.* estime l'incidence des IOAP de hanche et de genou à respectivement 1 et 2%<sup>1</sup>. Le risque d'IOAP est plus élevé s'il s'agit d'une reprise de prothèse ; en

effet, ce risque est de 3,2 % pour une reprise de prothèse de hanche et de 5,6% pour celle de genou<sup>18</sup>.

Bien que relativement peu fréquentes, les IOAP représentent une complication majeure de ces interventions car elles sont liées à une morbidité élevée et des coûts médicaux importants. Une étude récente, ayant pour objectif d'évaluer l'impact médico-économique des IOA de l'adulte en France, a évalué le coût moyen d'hospitalisation à 8 161 euros pour une IOA sur matériel et à 259 millions d'euros les dépenses pour l'assurance maladie<sup>19</sup>. Cependant, ces chiffres ne prennent en compte que les coûts directs d'hospitalisation et ne considèrent ni les coûts de soins au long cours, ni les coûts indirects comme ceux liés aux arrêts de travail. En France, la prise en charge globale d'un patient avec une infection de prothèse de hanche coûterait 3,6 fois plus qu'une arthroplastie primitive et 2,6 fois plus qu'une révision « aseptique »<sup>20</sup>.

De plus, du fait de l'augmentation du nombre de prothèses posées, liée notamment au vieillissement de la population, les situations d'IOAP ne devraient qu'augmenter dans les années à venir<sup>2</sup>.

## **1.2. Germes responsables d'IOAP**

L'agent étiologique le plus fréquemment rencontré est *Staphylococcus* sp., retrouvé dans près de 50% des cas<sup>21</sup>. Par ordre de fréquence, les bactéries isolées d'IOAP de hanche et de genou sont : les staphylocoques à coagulase



négative (SCN) (30 à 43%), *Staphylococcus aureus* (12 à 23%), les streptocoques (9 à 10%), les entérocoques (3 à 7%), les bacilles à Gram négatif (3 à 6%) et anaérobies (2 à 4%)<sup>1</sup>. Les infections sont polymicrobiennes dans 10 à 36% des cas<sup>3 22</sup>. Le tableau 1 reprend les résultats de plusieurs études concernant les microorganismes à l'origine d'IOAP<sup>22</sup>.

**Tableau 1 : Revue de la littérature des données microbiologiques associées aux infections de prothèse de hanche et de genou. D'après Peel et al., 2012<sup>22</sup>.**

Reference	11	20	2	3	24	30	21	29	27	Current study	Total
Publication yr	1977	1989	1991	1998	2000	2000	2007	2008	2008	2012	
Country	USA	USA	Sweden	USA	UK	USA	UK	Australia	USA	Australia	
No. of isolates	42	81	357	462	81	578	112	248	63	163	2,187
No. (%) of coagulase-negative staphylococcal isolates	8 (24)	37 (46)	59 (17)	86 (19)	39 (48)	172 (30)	15 (13)	78 (31)	13 (21)	18 (11)	525 (24)
No. (%) of <i>Staphylococcus aureus</i> isolates	10 (19)	19 (23)	149 (42)	101 (22)	11 (14)	135 (23)	26 (23)	53 (21)	23 (38)	47 (29)	574 (26)
No. (%) of streptococcus species isolates	5 (12)	12 (15)	17 (6)	42 (9)	8 (10)	51 (9)	6 (5)	17 (7)	8 (13)	2 (1)	168 (8)
No. (%) of enterococcus species isolates	4 (10)	7 (9)	10 (3)	6 (1)	6 (7)	16 (3)	3 (3)	15 (6)	0 (0)	1 (0.6)	68 (3)
No. (%) of diptheroid isolates	0 (0)	6 (7)	5 (1)	3 (0.6)	3 (4)	3 (0.5)	2 (2)	11 (4)	1 (2)	1 (0.6)	35 (2)
No. (%) of Gram-negative bacillus isolates	12 (29)	18 (22)	19 (5)	38 (8)	2 (2)	33 (6)	7 (6)	58 (23)	7 (11)	23 (14)	217 (10)
No. (%) of propionibacterium species isolates	1 (2)	1 (1)	1 (0.3)	0 (0)	2 (2)	0 (0)	0 (0)	1 (0.4)	0 (0)	0 (0)	6 (0.3)
No. (%) of polymicrobial isolates	11 (26)	0 (0)	55 (15)	88 (19)	10 (12)	71 (12)	53 (33)	0 (0)	4 (6)	59 (36)	351 (16)
No. (%) of anaerobe isolates	1 (2)	7 (9)	8 (2)	6 (1)	0 (0)	23 (4)	3 (3)	4 (2)	0 (0)	0 (0)	52 (2)
No. (%) of isolates of other infectious species	19 (19)	3 (4)	1 (0.3)	7 (2)	0 (0)	10 (2)	1 (1)	8 (3)	0 (0)	1 (0.6)	50 (2)
No. (%) of culture negative isolates	2 (2)	2 (2)	29 (8)	5 (1)	0 (0)	64 (11)	7 (5)	0 (0)	6 (10)	12 (7)	127 (6)

Il est à noter qu'en présence de matériel, n'importe quelle espèce bactérienne peut être impliquée (*Brucella*, *Campylobacter*, Mycobactéries...). *Propionibacterium acnes*, impliqué dans les infections retardées et souvent considéré comme un contaminant, est plus souvent responsable d'infection après arthroplastie d'épaule<sup>23</sup>.

La diversité des espèces bactériennes responsables d'IOAP explique pour partie la complexité du diagnostic de ces infections ; l'identification de la bactérie étant pourtant cruciale pour la réussite du traitement.

### 1.3. Facteurs de risque d'IOAP

Les facteurs entraînant une majoration du risque d'IOAP sont maintenant bien connus<sup>24 25</sup> :

- 4 facteurs indépendants ont été identifiés par l'équipe de la Mayo Clinic : Infection du Site Opératoire (ISO) avec conservation de la prothèse, score de NNISS  $\geq 1$  (« National Nosocomial Infections Surveillance System »), antécédent de pathologie tumorale ou d'arthroplastie sur l'articulation opérée.
- D'autres facteurs s'y ajoutent liés au terrain (âge > 65 ans, présence d'un autre foyer infectieux chez le patient, diabète, polyarthrite rhumatoïde, néoplasie, traitement immunosuppresseur) et des facteurs de risque locaux (rasages traumatiques, escarre cutanée à proximité, dermatose infectieuse ou inflammatoire...).
- La durée d'intervention (> 3 heures), la qualité de l'hémostase et de la fermeture cutanée, la présence d'un hématome et d'une cicatrisation difficile en post-opératoire semblent influencer l'incidence des infections précoces.
- Par contre, l'obésité, la dénutrition, l'insuffisance rénale, la cirrhose ne semblent pas être des facteurs de risque d'infection de prothèse.

## 2. PHYSIOPATHOLOGIE des IOAP

Les infections sur matériel orthopédique sont une complication grave nécessitant une prise en charge thérapeutique optimale basée sur un diagnostic fiable et rapide. La compréhension des mécanismes physiopathologiques de l'IOAP est donc indispensable pour l'élaboration d'une stratégie diagnostique et thérapeutique adaptée.

### 2.1. Modes de contamination : mécanisme d'entrée de la bactérie

L'IOAP résulte de 3 voies de contamination possibles<sup>3 26</sup> :

- Par inoculation directe du microorganisme dans un site anatomique normalement stérile : il s'agit principalement de la contamination per-opératoire (ISO) ; ce peut être également le résultat d'un acte invasif diagnostique ou thérapeutique (ponction articulaire, infiltrations) ou d'une effraction cutanée (fracture ouverte, escarre cutanée...).
- Infection secondaire :
  - Par contamination « hématogène » lors de bactériémies à partir d'un foyer septique à distance (dentaire, ORL, urinaire, cutanée, endocardique...) ; une prothèse serait plus sensible aux bactériémies dans l'année qui suit son implantation et lorsqu'elle commence à se desceller. De plus, lors d'une infection hématogène sur prothèse articulaire, le matériel prothétique et l'interface os-ciment ne sont touchés que secondairement ce

qui explique la guérison possible sans ablation de la prothèse à condition que le délai de prise en charge soit court.

- Par extension par contiguïté d'un foyer septique : il s'agit de la propagation aux structures ostéo-articulaires de proximité d'une infection des parties molles, suivant les territoires de drainage lymphatique (cellulite, abcès, mal perforant plantaire...).

Quel que soit le mode de contamination, de très faibles inocula bactériens (< 1000 germes) peuvent générer une infection sur matériel<sup>27</sup>.

Différents acteurs sont impliqués dans la physiopathologie des IOAP et participent au développement et à la persistance de l'infection :

- Le corps étranger : les biomatériaux orthopédiques n'étant pas des surfaces inertes.
- La réaction inflammatoire loco-régionale liée à l'implant.
- Les bactéries : de par leur virulence, leurs mécanismes de protection, de régulation (production d'un biofilm au contact du matériel, internalisation dans les ostéoblastes) et d'adaptation métabolique (les « Small Colony Variants » (SCV) ou variants micro-colonies).

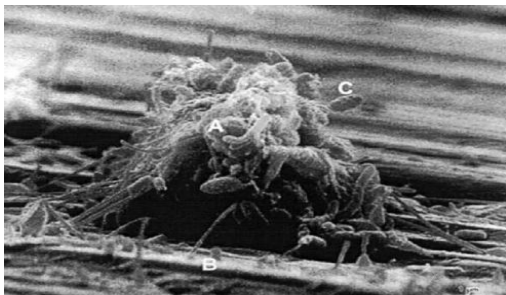
## **2.2. Bactéries et biofilm**

Les IOAP sont dues typiquement à des microorganismes qui se développent dans des biofilms<sup>1</sup>. Le biofilm confère aux bactéries un environnement

protecteur les protégeant à la fois des antibiotiques et des mécanismes de défense de l'hôte.

### 2.2.1. Généralités sur le biofilm

Les bactéries se lient à un support biotique (tissus ou cellules vivantes) ou abiotique (matériaux) pour former des biofilms<sup>28</sup>. Le biofilm est une communauté organisée et structurée de microorganismes entourés par une matrice extracellulaire qu'ils ont eux-mêmes produit. Ces microorganismes adhèrent entre eux et à une surface vivante ou inerte. Cette structure hétérogène permet aux bactéries de survivre dans un environnement hostile et de coloniser de nouvelles niches par divers mécanismes de dispersion<sup>29</sup>.



**Figure 1** : Biofilm en microscopie électronique.  
(A) Biofilm en développement,  
(B) Substratum,  
(C) Cellules attachés.  
D'après Donlan et *al.*, 2002<sup>39</sup>.

Dans la nature, il existe ainsi 2 modes de vie pour les bactéries :

- Bactéries isolées, libres dites planctoniques (environ 1% des bactéries totales) : accessibles au système immunitaire et sensibles en général aux antibiotiques.
- Bactéries regroupées en communauté au sein d'un biofilm (99%) : bactéries dites sessiles beaucoup plus résistantes.

Il est à noter que les bactéries peuvent passer d'une organisation à l'autre, les cellules planctoniques se constituant un biofilm qui à son tour libère des germes isolés ; le processus est donc cyclique<sup>29 30</sup>.

Les scientifiques s'accordent à dire que « les biofilms constituent le mode vie privilégié des bactéries dans la nature, alors que la phase planctonique ne serait qu'un passage permettant la dissémination vers de nouvelles surfaces »<sup>31</sup>.

Le biofilm est une entité dynamique au sein de laquelle les bactéries échangent grâce à un réseau de communication intercellulaire et à un mécanisme de communication dépendant de la densité bactérienne appelé « Quorum Sensing » (QS). Ce QS est donc un mode de signalisation bactérien qui repose sur la production, la sécrétion et la détection par les bactéries de petites molécules médiatrices appelées « Auto-inducteurs » (AI) ; lorsque suffisamment de microorganismes sont présents, le seuil de concentration en AI est atteint ce qui leur permet d'interagir avec un régulateur transcriptionnel et en réponse d'entraîner l'activation ou la répression de gènes cibles<sup>32</sup>. Ce phénomène est impliqué dans la différenciation du biofilm.

De plus, les contacts étroits entre bactéries favorisent les transferts horizontaux d'information génétique au sein du biofilm principalement par des mécanismes de conjugaison<sup>33</sup>.

Ainsi, la régulation de l'expression génétique et les conditions de vie particulières engendrées par le biofilm, vont permettre aux bactéries, une fois

attachées, de subir des modifications phénotypiques leur permettant de s'adapter à ce nouvel environnement : on parle de bénéfices adaptatifs (production de matrice extracellulaire, de facteurs de résistance, de virulence...). En outre, du fait de la complexité de structure, ces bactéries sessiles vont présenter des caractères phénotypiques hétérogènes en fonction de leur localisation dans le biofilm<sup>34</sup>.

### **2.2.2. Epidémiologie – Biofilm et infections**

Les infections liées au biofilm sont devenues un vrai problème de santé publique de par leur fréquence, leur diagnostic difficile et surtout la résistance aux antibiotiques des bactéries impliquées. Elles sont, de plus, associées à une morbi-mortalité élevée.

Le « Center for Disease Control » (CDC) estime que 65% des infections nosocomiales (IN) seraient liées au biofilm ; pour le « United States National Institute of Health » (NIH), 80% des infections chroniques seraient causées par des bactéries constituant un biofilm<sup>35 36</sup>.

Le biofilm se développe préférentiellement sur du matériel étranger (sonde, cathéter, prothèse articulaire...) mais il peut également se former sur du tissu humain ce qui explique le grand nombre de situations pathologiques dans lesquelles il peut être impliqué (tableau 2)<sup>29</sup>.

Les biofilms sont responsables d'infections présentant des caractéristiques communes à savoir une apparition retardée des symptômes (délai lié au

développement du biofilm), un caractère chronique et une tendance à la récurrence<sup>29</sup>. Le plus souvent, seul un traitement chirurgical avec ablation du matériel et débridement des tissus infectés permet d'éradiquer l'infection ; les antibiotiques étant incapables d'éliminer complètement le biofilm.

**Tableau 2** : Liste non exhaustive des infections humaines impliquant le biofilm. D'après Costerton *et al.*, 1999<sup>29</sup>.

Infection or disease	Common biofilm bacterial species
Dental caries	Acidogenic Gram-positive cocci (e.g., <i>Streptococcus</i> )
Periodontitis	Gram-negative anaerobic oral bacteria
Otitis media	Nontypable strains of <i>Haemophilus influenzae</i>
Musculoskeletal infections	Gram-positive cocci (e.g., staphylococci)
Necrotizing fasciitis	Group A streptococci
Biliary tract infection	Enteric bacteria (e.g., <i>Escherichia coli</i> )
Osteomyelitis	Various bacterial and fungal species—often mixed
Bacterial prostatitis	<i>E. coli</i> and other Gram-negative bacteria
Native valve endocarditis	Viridans group streptococci
Cystic fibrosis pneumonia	<i>P. aeruginosa</i> and <i>Burkholderia cepacia</i>
Meloidosis	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>
Nosocomial infections	
ICU pneumonia	Gram-negative rods
Sutures	<i>Staphylococcus epidermidis</i> and <i>S. aureus</i>
Exit sites	<i>S. epidermidis</i> and <i>S. aureus</i>
Arteriovenous shunts	<i>S. epidermidis</i> and <i>S. aureus</i>
Scleral buckles	Gram-positive cocci
Contact lens	<i>P. aeruginosa</i> and Gram-positive cocci
Urinary catheter cystitis	<i>E. coli</i> and other Gram-negative rods
Peritoneal dialysis (CAPD) peritonitis	A variety of bacteria and fungi
IUDs	<i>Actinomyces israelii</i> and many others
Endotracheal tubes	A variety of bacteria and fungi
Hickman catheters	<i>S. epidermidis</i> and <i>C. albicans</i>
Central venous catheters	<i>S. epidermidis</i> and others
Mechanical heart valves	<i>S. aureus</i> and <i>S. epidermidis</i>
Vascular grafts	Gram-positive cocci
Biliary stent blockage	A variety of enteric bacteria and fungi
Orthopedic devices	<i>S. aureus</i> and <i>S. epidermidis</i>
Penile prostheses	<i>S. aureus</i> and <i>S. epidermidis</i>

Un large spectre d'espèces bactériennes peut être à l'origine de ces infections.

Ces bactéries peuvent être pathogènes ou opportunistes<sup>37</sup>. Les plus fréquentes sont : *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, les Streptocoques, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*.

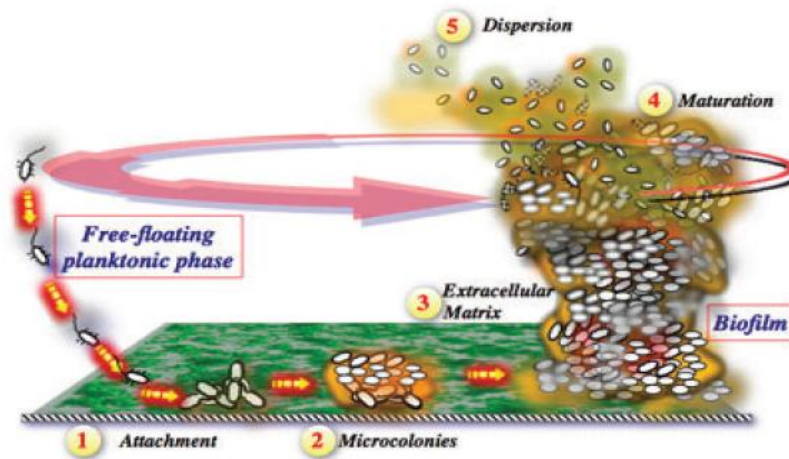


### 2.2.3. Formation du biofilm

Trois éléments de base sont nécessaires à la constitution de cette structure : les microorganismes, la surface d'adhésion et le milieu environnemental. Une large variété de surface (animale, minérale, végétale) peut être le siège d'une colonisation bactérienne avec formation d'un biofilm<sup>38</sup>.

Le développement du biofilm se fait en 5 étapes<sup>39</sup> (figure 2) :

**Figure 2** : Schéma représentant les 5 étapes de formation d'un biofilm. D'après Watkins *et al.*, 2012<sup>31</sup>.



- Il débute par l'attachement réversible de la bactérie planctonique à un support (étape 1) :

Les propriétés physico-chimiques du support influencent ce processus d'attachement (effet substratum). En effet, la rugosité et l'hydrophobicité sont décrites comme facilitant l'adhésion bactérienne ; la surface non plane des biomatériaux orthopédiques ainsi que leur composition (métal, alliages métalliques recouverts d'hydroxyapatite, polyéthylène, interface céramique) participent à l'intégration de l'implant mais jouent aussi un rôle dans les phénomènes d'interaction avec les bactéries en contact<sup>39 40</sup>. Des conditions

environnementales spécifiques en termes de pH, de température, de nutriments disponibles sont nécessaires et varient selon les espèces bactériennes. Un flux sanguin ralenti et turbulent favorise également le processus d'adhésion<sup>39</sup>. De plus, à l'interface entre le fluide contaminé et le support, il se forme une couche visqueuse appelée « film de conditionnement » ; ce film protéique, riche en nutriments, intervient en modifiant les propriétés de surface de l'implant (hydrophobicité, charges électriques...) et favorise donc l'adhérence des microorganismes<sup>39</sup> (tableau 3).

Properties of the substratum	Properties of the bulk fluid	Properties of the cell
Texture or roughness	Flow velocity	Cell surface hydrophobicity
Hydrophobicity	pH	Fimbriae
Conditioning film	Temperature	Flagella
	Cations	Extracellular polymeric substances
	Presence of antimicrobial agents	

**Tableau 3 : Facteurs intervenant dans l'attachement des cellules et la formation du Biofilm. D'après Donlan, 2002<sup>39</sup>.**

Dans les mois suivant la pose de la prothèse et lors de l'usure de certains biomatériaux (ciment, polyéthylène en particulier), il existe une hypervascularisation tissulaire et osseuse péri-prothétique et une réaction inflammatoire locale chronique qui encourage le mécanisme d'attachement bactérien par l'apport de nutriments et de protéines au contact du matériel. Ces phénomènes réactionnels sont liés à la libération de radicaux libres oxygénés tels que l'interleukine-1, le TNF- $\alpha$  et l'INF- $\gamma$ . Ils contribuent également au processus de descellement de la prothèse au cours duquel une greffe bactérienne peut survenir. Ces mécanismes expliquent donc pourquoi le

risque d'IOAP est majoré dans les suites de la pose de l'implant et lors du descellement de celui-ci<sup>40</sup>.

Initialement, le 1<sup>er</sup> contact bactérie-matériel obéit à des forces d'attraction physico-chimiques (forces gravitationnelles d'attraction et répulsives électrostatiques). Ensuite, l'adhésion bactérienne nécessite l'interaction des protéines de surfaces du germe avec les protéines présentes à la surface du matériel. Des adhésines bactériennes spécifiques et variables selon les espèces, ayant une forte affinité avec les protéines adsorbées sur le matériel interviennent également<sup>40</sup>. Cette base d'attachement, encore réversible, permet la coalescence des microorganismes et la formation de microcolonies ; Ces microcolonies constituant l'unité de base structurale et certainement fonctionnelle des biofilms<sup>34</sup>.

L'adhérence devient ainsi progressivement irréversible (étape 2).

- Le développement du biofilm se poursuit par la production de matrice extracellulaire (MEC) permettant l'ancrage définitif de la structure (étape 3). Dès que la densité bactérienne est suffisante (QS), le slime (=glycocalix) est sécrété par les bactéries ; le slime est la « colle » qui maintient rapidement les bactéries entre elles et le biofilm à la surface. L'attachement intercellulaire est aussi médié par l'expression d'adhésines intercellulaires spécifiques (Polysaccharide Intercellular Adhesin et *S. aureus* par exemple)<sup>38</sup>. Ainsi, les microcolonies se développent engluées dans cette structure constituée d'une matrice polysaccharidique riche en eau, en acides nucléiques, en protéines et

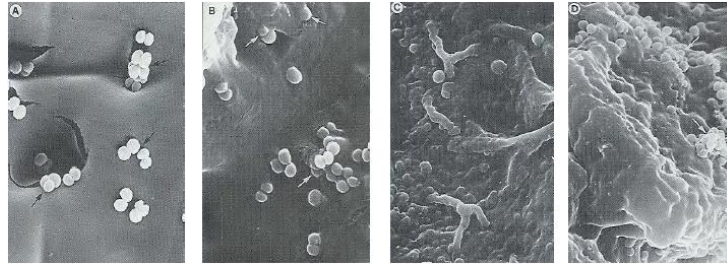
molécules de signalisation<sup>40</sup>. Le biofilm est constitué de 75 à 90% de MEC selon l'espèce impliquée et de cellules bactériennes pour le reste ; cette composition est évolutive dans le temps et l'espace<sup>29 39</sup>.

Cette communauté de cellules se développe par la multiplication des bactéries déjà présentes et par le recrutement de bactéries planctoniques<sup>41</sup>.

- L'étape 4 correspond à la formation d'un biofilm mature, épais et structuré :

Entre les microcolonies, le biofilm est traversé par de véritables canaux permettant à la fois l'apport de nutriments et l'élimination de déchets<sup>42</sup>. A l'intérieur du biofilm, la quantité d'oxygène et de nutriments est donc d'autant plus faible que l'on s'approche de la surface colonisée et que l'on s'éloigne des canaux ; les zones situées en profondeur sont donc en anaérobiose et dépourvues de nutriments. Ces conditions environnementales expliquent l'existence d'un gradient d'activité métabolique et de croissance pour les bactéries au sein du biofilm. Ainsi, les bactéries des couches profondes ont une activité métabolique et une croissance ralentie ou nulle alors que celles situées en périphérie ont une activité normale.

Des études expérimentales ont montré que les bactéries planctoniques adhèrent en quelques minutes à un support et qu'un biofilm mature, résistant aux antibiotiques, se développe en quelques heures à quelques jours en fonction de l'espèce bactérienne en cause et des conditions de croissance<sup>43 44</sup> (figure 3).



**Figure 3 :** Colonisation par le biofilm (*Staphylococcus epidermidis*) d'une surface inerte *in vitro*. (A) 2 heures : Fixation des bactéries planctoniques sur les irrégularités du support, (B) 4 heures : début de la synthèse du slime, (C) 8 heures : la surface du matériel est recouverte par une épaisse couche tridimensionnelle de matrice et (D) 24 heures : libération des bactéries du biofilm. D'après Olson *et al.*, 1988<sup>44</sup>.

Le biofilm constitue donc un environnement hautement organisé et hétérogène où coexistent des germes aux propriétés métaboliques différentes avec la présence de niches fonctionnelles constituées de bactérie en quiescence<sup>45</sup>.

- Enfin, des microcolonies bactériennes peuvent se détacher de la surface colonisée, se disperser et établir de nouveaux foyers septiques à distance (étape 5). Cette libération peut être le résultat soit d'une carence en nutriments, soit des contraintes mécaniques dues à la circulation sanguine, soit d'un processus de détachement actif lié au QS<sup>46</sup>. Le mode de dispersion pourrait affecter les caractéristiques phénotypiques des bactéries ; celles arrachées du biofilm conserveraient certaines caractéristiques comme la résistance aux antibiotiques alors que les bactéries relarguées retrouveraient rapidement un phénotype planctonique<sup>39</sup>.

Le mode de vie en biofilm maintient un réservoir bactérien résilient envers les antibiotiques et le système immunitaire tout en assurant simultanément la possibilité d'une dissémination bactérienne retardée.

#### 2.2.4. Biofilm et système immunitaire

La capacité des bactéries sessiles à résister à la réponse immunitaire de l'hôte favorise le développement d'infections persistantes<sup>37</sup>. Même chez les individus immunocompétents, les infections liées au biofilm sont rarement résolues par les mécanismes de défense de l'hôte<sup>29</sup>.

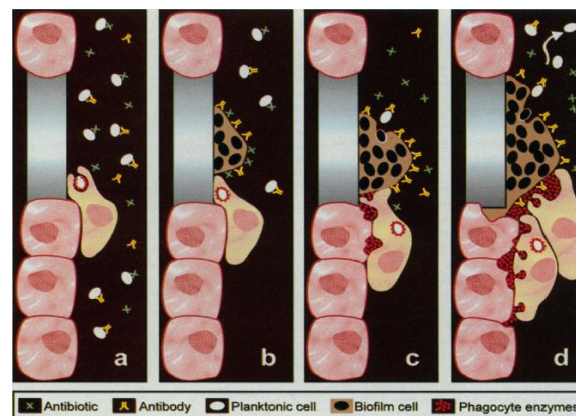
Les mécanismes de résistance aux défenses immunitaires sont mal connus et incluraient<sup>47</sup> :

- Une pénétration limitée des cellules phagocytaires au sein des biofilms et la diffusion médiocre de leurs molécules bactéricides ; bien que certaines études aient prouvé que les polynucléaires neutrophiles (PNN) soient capables de pénétrer dans cette structure<sup>48</sup>.
- Le blocage de l'accès des anticorps aux bactéries du biofilm ; ces germes peuvent via des déterminants antigéniques stimuler la synthèse d'anticorps spécifiques mais ces derniers sont incapables d'accéder à leur cible.
- Le rôle du QS dans la mise en place d'un programme de résistance aux phagocytes et à leurs effecteurs bactéricides.
- L'inhibition des propriétés bactéricides des effecteurs des PNN par des molécules concentrées dans la MEC du biofilm.
- La diminution de la capacité de phagocytose des cellules de l'immunité recrutées par les composants du biofilm. De même, la réponse phagocytaire étant dépendante de la taille, de la composition et de la densité des particules *in situ*, elle peut être inhibée en présence de débris prothétiques (polyéthylène,

ciment...) et de production importante de cobalt (cas des prothèses avec une interface métal-métal)<sup>40</sup>. On parle de « frustrated phagocytosis »<sup>29</sup> (figure 4).

- Un « switch génétique » permettant d'augmenter la résistance bactérienne.

Les cellules phagocytaires libèrent des enzymes ayant peu d'effet sur le biofilm ; cependant, ces enzymes associées aux complexes immuns formés par les anticorps sont responsables de lésions tissulaires et de la libération de bactéries sous forme planctonique assurant la dissémination de l'infection vers un tissu voisin ou à distance. Ce phénomène, s'il persiste, peut aboutir au descellement de l'implant.



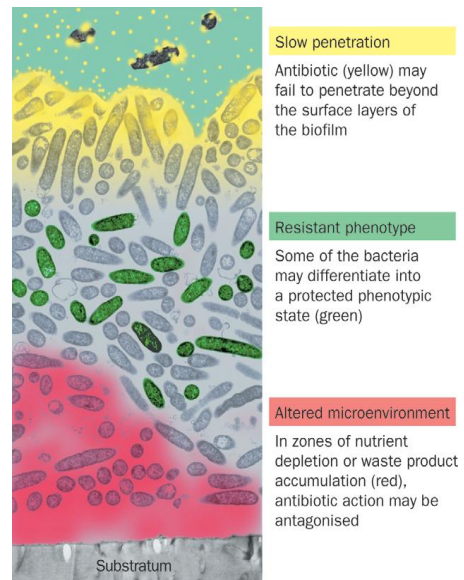
**Figure 4 :** Présentation schématique de la réponse immunitaire lors d'une infection liée au biofilm. (A) les bactéries planctoniques peuvent être détruites par les anticorps, les phagocytes et sont sensibles aux antibiotiques, (B) les bactéries regroupées en communauté sessile sont résistantes à l'action des anticorps, des phagocytes et des antibiotiques, (C) les phagocytes sont attirés par le biofilm ; la phagocytose est inefficace (« frustrated phagocytosis ») mais des enzymes sont libérées par les phagocytes et (D) les enzymes phagocytaires altèrent le tissu autour du biofilm et libèrent des bactéries planctoniques ; cette libération entraîne la dissémination de l'infection vers les tissus voisins. D'après Costerton *et al.*, 1999<sup>29</sup>.

### 2.2.5. Biofilm et antibiotiques

Les bactéries à l'intérieur du biofilm sont jusqu'à 1000 fois plus résistantes aux antibiotiques que les cellules planctoniques<sup>39</sup>. La diminution de sensibilité aux antibiotiques induite par le biofilm est probablement multifactorielle et

dépendante du type de bactérie et du type d'antibiotique<sup>37</sup>. Différentes hypothèses concernant les mécanismes de résistance des bactéries sessiles ont été avancées<sup>37 49 50</sup> (figure 5):

- La matrice du biofilm constitue une barrière physico-chimique limitant et retardant la pénétration et la diffusion de certains antibiotiques. Ainsi, les doses bactéricides disponibles sont diminuées ; de plus, le retard de pénétration pourrait induire l'expression de gènes de résistance. De même, les composants de la matrice (enzymes, charges des polymères...) pourraient « piéger » et/ou désactiver les antibiotiques.



**Figure 5 : 3 hypothèses concernant les mécanismes de résistance aux antibiotiques des biofilms.**  
D'après Stewart *et al.*, 2001<sup>50</sup>.

- L'hétérogénéité métabolique des bactéries et la présence de microorganismes en phase de « dormance » entraînent une diminution de sensibilité aux antibiotiques actifs uniquement sur les bactéries en division comme les bêta-lactamines.
- Les aminosides sont moins efficaces dans une atmosphère anaérobie.
- Les bactéries dans le biofilm adoptent un phénotype spécifique, protégé qui serait une réponse programmée à la croissance sur une surface<sup>29</sup>.
- La fréquence des mutations et celle des transferts horizontaux de gènes (plasmides de résistance) sont augmentées dans le biofilm. Ainsi, les



bactéries sessiles deviennent des « mutants résistants » capables simultanément de produire des enzymes dégradant les antibiotiques (bêta-lactamases...), de surexprimer des pompes à efflux et de modifier la cible de l'antibiotique ou son affinité.

- La présence de « Persisters »<sup>51</sup> : ces bactéries persistantes représentent une petite fraction de bactéries qui entrent lors de situations de stress dans un état de dormance et deviennent hautement résistants aux antibiotiques. Ils atteignent cet état sans subir de modification génétique à la différence de mutants résistants. Dès que la pression des antibiotiques disparaît, ces cellules sont capables de redonner naissance à un biofilm sauvage expliquant le caractère récurrent des infections liées au biofilm.

La résistance aux antibiotiques des bactéries sessiles est probablement due à la combinaison de plusieurs de ces facteurs.

Il semblerait, du reste, que l'exposition à des concentrations subinhibitrices d'antibiotiques constitue en elle-même un signal pour le développement du biofilm<sup>52</sup>.

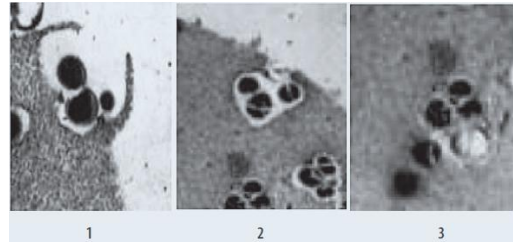
### **2.3. Internalisation bactérienne par les cellules de l'hôte et persistance intracellulaire**

Certaines espèces bactériennes dont *S. aureus*, longtemps considérées comme des pathogènes extracellulaires, sont capables de provoquer leur internalisation par les ostéoblastes (par un mécanisme proche de

l'endocytose) et de persister à l'intérieur de ceux-ci<sup>53 54</sup> (figure 6). Ce phénomène a été démontré *in vivo* et *in vitro*<sup>55</sup>. Les bactéries intracellulaires

constituent donc un « réservoir » protégé qui échappe à l'action de nombreux antibiotiques et à la réponse immunitaire.

Ainsi, cette persistance intracellulaire pourrait expliquer en partie le caractère chronique et récurrent des IOAP.



**Figure 6 :** Internalisation de *S. aureus* dans les ostéoblastes. (1) Adhésion à la surface cellulaire, (2) Internalisation au sein d'une vacuole cellulaire et (3) *S. aureus* libre dans le cytoplasme cellulaire. D'après Rasigade, 2012<sup>54</sup>.

Néanmoins, les données sont encore insuffisantes pour déterminer la part de responsabilité de ce mécanisme dans la pathogénie des IOA chroniques. De plus, une étude récente suggère que le rôle de l'internalisation bactérienne par les cellules hôtes dans la physiopathologie des infections chroniques dépendrait de l'espèce bactérienne impliquée et de la localisation de l'infection. En effet, l'internalisation de *Staphylococcus epidermidis* dans les ostéoblastes ne semble pas avoir un rôle majeur dans les IOA sur matériel, contrairement à ce qui a été observé dans d'autres situations cliniques avec *S. epidermidis* (infections endovasculaires, urinaires notamment) ou dans les IOAP avec d'autres germes comme *S. aureus*<sup>56</sup>.

#### **2.4. « Small colony variants » (SCV)**

Les SCV représentent une sous-population bactérienne responsable d'infections chroniques et récidivantes. En effet, ce phénotype a tendance à

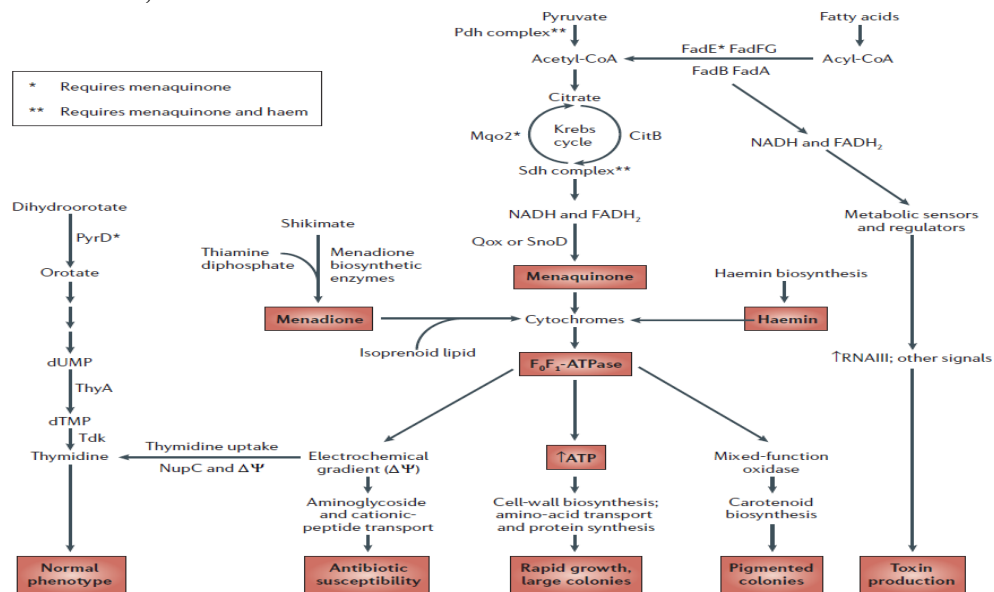
persister malgré un traitement antibiotique bien conduit et ce particulièrement s'il s'agit d'infection sur matériel. Les SCV se rencontrent dans diverses situations cliniques et leur incidence dans les échantillons cliniques varie de 1 à 30% selon les études ; cette incidence étant en plus sous-estimée de par la difficile mise en évidence de ces variants microcolonies<sup>57</sup>.

L'émergence de SCV résulte d'une adaptation des populations bactériennes à la pression de sélection spécifique de l'infection chronique, comme la baisse des ressources et le stress provoqué par la réponse cellulaire, immunitaire et un éventuel traitement antibiotique. Plus spécifiquement, ce phénotype est adapté à la survie au sein du biofilm et à la persistance intracellulaire prolongée<sup>30 54</sup>.

Ces SCV ne sont pas particulièrement virulents mais sont capables de persister à l'intérieur des ostéoblastes en cas d'IOA. Leur rôle dans le développement d'infections chroniques peut être modélisé comme suit : une sous-population bactérienne gagne le milieu intracellulaire et forme un phénotype SCV ; cette sous-population persiste dans un état viable à l'abri des antibiotiques et des défenses de l'hôte puis, à la mort de la cellule, ces SCV sont relargués dans le milieu extracellulaire et gagnent le cytoplasme d'autres cellules grâce à leur capacité d'invasion accrue (par rapport au phénotype sauvage). Ainsi, un réservoir bactérien pérenne, potentiellement source d'infections récurrentes, persiste<sup>54</sup>.

Ce mode de vie suppose un certain nombre de modifications comportementales<sup>30</sup> (figure 7) : phénotypiques (modification de la taille), métaboliques avec l'absence de production d'ATP (croissance ralentie), biochimiques (avec des caractères biochimiques inhabituels et de faibles besoins nutritionnels), l'expression réduite de facteurs de virulence et un phénotype réversible.

**Figure 7:** hypothèse de modèle des voies métaboliques et énergétiques associées au phénotype « SCV ». D'après Proctor *et al.*, 2006<sup>57</sup>.

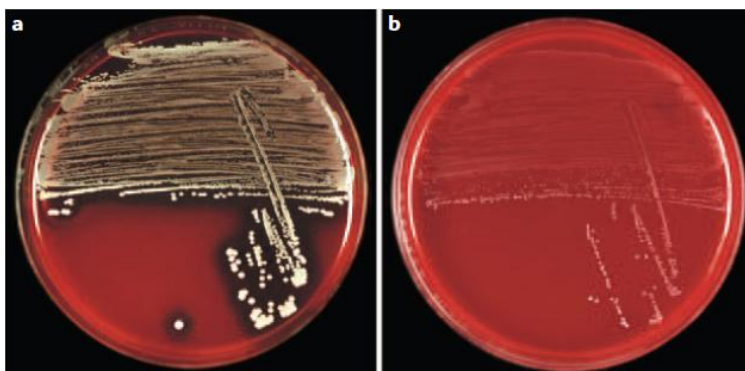


L'altération du métabolisme bactérien est liée à un défaut d'une voie de biosynthèse, soit au niveau de la chaîne respiratoire (caractère auxotrophe pour la ménadione, l'hémine ou la thiamine), soit au niveau de la chaîne métabolique (caractère auxotrophe pour la thymidine)<sup>57</sup>.

Initialement décrits il y a plus d'un siècle, les SCV ont été principalement étudiés chez *S. aureus* ; mais ce phénotype réversible n'est pas l'apanage de celui-ci. Il a été également décrit chez d'autres espèces bactériennes

impliquées dans les IOAP, telles que *S. epidermidis*, *E. coli* et *P.aeruginosa*<sup>58</sup>. Ces variants microcolonies présentent des particularités communes entre les espèces bactériennes : auxotrophisme pour l'hémine, la ménadione et la thiamine (*E. coli*, *S. aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*...), diminution de la production de pigment (*S. aureus*, *P. aeruginosa*), diminution de la fermentation des sucres (*E. coli*, *Shigella*...), capacité de réverter au phénotype sauvage (*Shigella*, *E. coli*, *Proteus sp*, *Klebsiella pneumoniae*...) et réduction de l'activité de transport des électrons<sup>57</sup>.

Les SCV posent une difficulté diagnostique aux microbiologistes. En effet, la morphologie atypique des colonies (petites tailles, absence de pigment, d'hémolyse, polymorphisme), les conditions de croissance fastidieuses (apparition retardée), la présence d'une population mixte avec des bactéries de phénotype sauvage (taille normale, croissance rapide) masquant les SCV ne facilitent pas leur diagnostic<sup>59</sup> (figure 8).



**Figure 8** : « Small colony variants ». (a) Phénotype normal (b) Phénotype SCV D'après Proctor *et al.*, 2006<sup>57</sup>.

De même, leur métabolisme lent négative certains tests phénotypiques utilisés pour l'identification comme les tests d'agglutination ou les galeries

d'identification biochimique et retarde la positivité d'autres tests comme la détection de la coagulase par exemple. Ces particularités font courir le risque d'erreur diagnostique, ces SCV pouvant être méconnus ou identifiés à tort<sup>54</sup>. De plus, leurs caractères rendent peu fiables l'étude de la sensibilité par les techniques classiquement utilisées en routine de laboratoire ; de même, l'hétérogénéité de vitesse de croissance des souches bactériennes rend difficile la standardisation de l'antibiogramme.

Ainsi, pour les isolats suspects de présenter ce phénotype, en particulier dans un contexte d'infection chronique, la nécessité de faire un examen approfondi est claire et passe par la réalisation d'une identification et d'un antibiogramme sur chaque type de colonies bactériennes retrouvées en culture. L'incubation des milieux de culture doit être prolongée car les SCV apparaissent tardivement. Et idéalement, l'identification et les mécanismes de résistance doivent être confirmés par une méthode non phénotypique c'est-à-dire par technique moléculaire (PCR 16S universelle, détection du gène *mecA* par PCR par exemple)<sup>57 60</sup>.

En outre, les variants microcolonies sont difficiles à traiter car ils présentent une résistance accrue aux antibiotiques : l'inhibition de la biosynthèse de ménadione ou d'hémine entraîne une interruption du transport transmembranaire d'électrons responsables entre autre de la résistance aux aminosides ; en effet, leur pénétration est réduite car ils utilisent le gradient

électrochimique pour traverser la membrane et atteindre leur cible. De même, l'action des antibiotiques ciblant la paroi comme les bêta-lactamines est diminuée sur les bactéries en phase stationnaire<sup>60</sup>.

## **2.5. Impact du biofilm, de l'internalisation et des SCV**

Le biofilm, l'internalisation dans les ostéoblastes et le développement de phénotype SCV permettent aux bactéries d'être protégées à la fois des antibiotiques et des défenses naturelles de l'hôte. Ces derniers sont capables de supprimer les symptômes liés à l'infection en éliminant les cellules planctoniques mais échouent à éradiquer le biofilm. Ainsi, les bactéries persistant à l'intérieur de cette structure, constituent un « réservoir » de microorganismes pouvant réactiver l'infection<sup>29</sup>. Ces mécanismes expliquent donc le caractère chronique et le taux élevé de récurrence des infections associées à un biofilm.

En plus de protéger les bactéries, le biofilm participe à leur agressivité en induisant l'expression de facteurs de virulence (toxines...) médiée par le QS<sup>32</sup>.

La mise en évidence, l'identification et l'étude de la sensibilité des bactéries responsables d'IOAP sont impactées par ces mécanismes de défense développés par les bactéries. Il existe effectivement un risque non négligeable de faux-négatif de la culture ainsi que des tests phénotypiques d'identification avec comme conséquence le risque d'erreurs diagnostiques. De même, les

techniques utilisées en routine pour déterminer la sensibilité aux antibiotiques des bactéries ne sont pas adaptées et peuvent conduire à des erreurs d'interprétation. En effet, la détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) permet d'évaluer l'activité d'antibiotique vis-à-vis de bactéries planctoniques ; mais cette activité n'est que rarement extrapolable aux bactéries du Biofilm. Il est maintenant bien connu que pour une même bactérie, le mode de vie sessile tolère des concentrations d'antibiotiques 10 à 1000 supérieures à celles tolérées par les cellules planctoniques<sup>61</sup>. La sensibilité aux antibiotiques des bactéries du biofilm devrait être évaluée par la Concentration Minimale d'Eradication du Biofilm (CMEB)<sup>61</sup>. Mais les techniques permettant de déterminer la CMEB ne sont pas accessibles en routine et actuellement aucune méthode « approuvée » ne permet de tester l'efficacité des antibiotiques sur le biofilm. Or, l'identification du germe en cause et la caractérisation de son profil de résistance sont fondamentales pour la réussite du traitement.

Certains antibiotiques semblent plus actifs que d'autres sur les bactéries vivant en communauté. Pour être actives sur le biofilm, les molécules utilisées doivent avoir une bonne diffusion osseuse, être bactéricides et avoir une activité sur les germes en phase stationnaire de croissance et éventuellement en position intracellulaire<sup>62</sup>. Le choix de l'antibiotique repose donc sur ses propriétés pharmacocinétiques/pharmacodynamiques en plus d'un spectre



d'activité adapté et d'une bonne tolérance. Les résultats concernant la pénétration osseuse des antibiotiques sont résumés dans le tableau 4<sup>63</sup>. De plus, il est nécessaire de choisir les molécules qui pénètrent le mieux dans la matrice extracellulaire de façon à atteindre leur cible et d'utiliser une molécule active sur les bactéries quiescentes. L'indication de la rifampicine, de par son activité sur les Staphylocoques et son aptitude à diffuser dans le tissu osseux, est indiscutable dans la prise en charge des IOAP ; à condition de l'associer à une autre molécule pour prévenir l'apparition de résistances<sup>59</sup>. D'autres antibiotiques comme le linézolide, la daptomycine et la tigécycline semblent avoir une activité intéressante vis-à-vis des bactéries du biofilm<sup>64 65</sup>. Le traitement actuel fait appel aux antibiotiques, en dépit de leur activité réduite sur le biofilm. De nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant le biofilm sont à l'étude : inhibiteur du QS, vaccin anti-biofilm, enzymes dégradant le biofilm, procédés mécaniques (champ électrique, ultrasons...) <sup>30</sup> ; l'avenir du traitement de ces infections passera peut être par l'utilisation d'associations antibiotiques/molécules ou procédés antibiofilm.

**Tableau 4 : Rapport médian des concentrations des principaux antibiotiques et familles d'antibiotiques : concentration osseuse/concentration sérique ou plasmatique (%). D'après Pea, 2009<sup>63</sup>.**

	Pénicillines	Céphalosporines	Inhibiteurs de bêtalactamases	Glycopeptides	Acide fusidique	Fosfomycine
$[C]_{os}/[C]_{sérique}$ (%)	17	19	24	21	23	25
	Rifampicine	Clindamycine	Linézolide	Fluoroquinolones	Tétracyclines	Macrolides
$[C]_{os}/[C]_{sérique}$ (%)	27	35	40	50	72	91

Un biofilm mature, résistant aux antibiotiques, s'étend en quelques jours à la surface du matériel prothétique. Par conséquent, un lavage chirurgical tardif

même s'il est associé à une antibiothérapie est inefficace. L'ablation du matériel infecté est donc le plus souvent nécessaire et ce d'autant que l'infection est ancienne et l'implant descellé. Les sociétés savantes recommandent d'effectuer une synovectomie lavage avec conservation de la prothèse seulement si la prothèse est stable, s'il n'y a pas de fistule et si le début des symptômes date de moins de 3 semaines<sup>3 66</sup>. La réussite de cette prise en charge est donc conditionnée par sa précocité.

Le meilleur traitement de ces infections liées au biofilm reste la prévention. La stratégie globale de prévention des IOAP repose essentiellement sur la prévention de la contamination per-opératoire du matériel par la maîtrise de l'aérobiocontamination (flux laminaires, nombre de personnes et mouvements limités dans la salle d'opération), une asepsie rigoureuse et une antibioprofylaxie<sup>3</sup>. Pour prévenir l'adhésion bactérienne, l'utilisation de matériaux ou de revêtements particuliers, soit antiadhésifs (couche de polymères hydrophiles...), soit « coatés » avec des antibiotiques pourrait être une option intéressante. En prévention des infections secondaires, il est recommandé, chez tout patient porteur d'une prothèse articulaire de diagnostiquer une infection à distance et de la traiter. De même, une antibioprofylaxie est nécessaire avant tout geste invasif.

Ainsi, les IOAP sont à l'origine de difficultés diagnostiques et thérapeutiques. Les mécanismes physiopathologiques complexes expliquent ces difficultés.

En effet, il n'y a pas un seul type d'IOAP mais des IOAP avec différentes physiopathologies liées au type de matériel et son usure, à l'hôte et à la ou les bactérie(s) en cause. De plus, nos connaissances sur ces infections doivent être encore approfondies et de nouveaux outils diagnostiques et thérapeutiques doivent être développés pour améliorer la prise en charge des patients.

### **3. CLASSIFICATION des IOAP**

Les IOAP ont été largement étudiées au cours du temps et plusieurs classifications ont été proposées. Mais à l'heure actuelle, il n'existe pas de classification universelle.

La 1<sup>ère</sup> classification a été publiée en 1970 par Waldvogel et distinguait 3 catégories d'infection : hémotogène, secondaire à un foyer d'infection contigu et associée à une insuffisance vasculaire<sup>67</sup>.

La classification la plus utilisée est celle de Tsukayama qui définit 4 types d'infection sur prothèse de hanche et de genou : post-opératoire précoce (< 1 mois), tardive (>1 mois), hémotogène et existence de prélèvements bactériologiques positifs lors d'un remplacement de prothèse présumée aseptique<sup>68 69</sup>.

En 2003, Zimmerli *et al* ont proposé une classification qui tient compte du délai d'apparition des symptômes après implantation de la prothèse et du mode de contamination ; cette classification a été reprise dans de nombreuses études par la suite (tableau 5)<sup>70</sup> . Celle-ci catégorise les IOAP en infection précoce (< 3 mois après implantation), retardée ou subaigüe (entre 3 et 24 mois) et tardive (> 24 mois). Les IOAP précoces se présentent typiquement avec un tableau aigu, bruyant, associant de la fièvre, des frissons, une cicatrice inflammatoire, une articulation douloureuse et un épanchement purulent. Elles sont causées par des germes virulents comme *S. aureus*. Pour celles retardées, l'infection évolue souvent à bas bruit (douleurs, descellement de l'implant) ; elle est souvent difficile à distinguer d'un descellement « aseptique ». On retrouve généralement dans ce type d'infection des germes moins virulents comme les SCN et *P. acnes*. Infections précoces et retardées sont liées le plus souvent à l'inoculation directe de la bactérie lors de la pose de la prothèse. Inversement, les infections tardives sont dues à une contamination par voie hématogène et se manifestent généralement par une symptomatologie similaire aux infections précoces. Le point de départ de la bactériémie est le plus souvent cutanée, respiratoire, dentaire ou urinaire<sup>1</sup>.

Les infections précoces, retardées et tardives représentent respectivement 29 à 45%, 23 à 41% et 30 à 33% des IOAP de hanche et de genou<sup>71 72</sup>.

**Tableau 5** : Classification des infections d’implants en orthopédie en accord avec le début des symptômes après implantation. D’après Borens *et al.*, 2009<sup>26</sup>.

Classification	Début de l'infection après implantation		Pathogénèse	Micro-organismes typiques
	Prothèses orthopédiques infectées	Matériel d'ostéosynthèse infecté		
Infection précoce	< 3 mois	< 2 semaines	Pendant l'implantation ou dans les deux à quatre jours postopératoires	Micro-organismes hautement virulents comme <i>S. aureus</i> ou bacilles Gram négatifs
Infection subaiguë	3-24 mois	2-10 semaines	Pendant l'implantation avec manifestation tardive	Organismes peu virulents comme staphylocoques coagulase négatifs ou <i>Propionibacterium acnes</i>
Infection tardive	> 24 mois	> 10 semaines	Essentiellement due à des infections hématogènes par foyer infectieux distant	Typiquement due à des micro-organismes virulents comme <i>S. aureus</i> , streptococci ou bacilles Gram négatifs

En l’absence de classification unique, il est recommandé d’analyser 7 données fondamentales afin de conditionner la prise en charge de ces infections<sup>3</sup> :

- Mode de contamination suspectée (directe, hématogène par contiguïté)
- Intervalle libre depuis l’implantation de la prothèse
- Etat infectieux (germes en cause, retentissement de l’infection)
- Etat mécanique du foyer infecté (prothèse descellé ou non)
- Localisation de l’infection
- Etat des parties molles et de la couverture cutanée
- Statut du malade (terrain, antécédents, contexte)

#### **4. DIAGNOSTIC des IOAP**

Les IOAP mettent en jeu le pronostic fonctionnel de l’articulation et parfois le pronostic vital ; elle nécessite donc une prise en charge optimale et multidisciplinaire basée sur un diagnostic fiable. Malgré la multiplication

d'examens biologiques et d'imagerie, le diagnostic d'IOAP peut être difficile et ce d'autant que les critères d'infection ne font pas l'objet d'un consensus. Cependant, un faisceau d'arguments peut conduire à suspecter ou à affirmer une infection. La documentation de l'infection sur le plan microbiologique est déterminante pour la réussite du traitement.

#### **4.1. Signes cliniques**

Le tableau clinique varie selon le type d'infection ; une infection précoce ou tardive se manifestant typiquement par un tableau bruyant alors qu'une infection retardée évolue plutôt à bas bruit et est parfois difficile à différencier d'un descellement aseptique<sup>1</sup>.

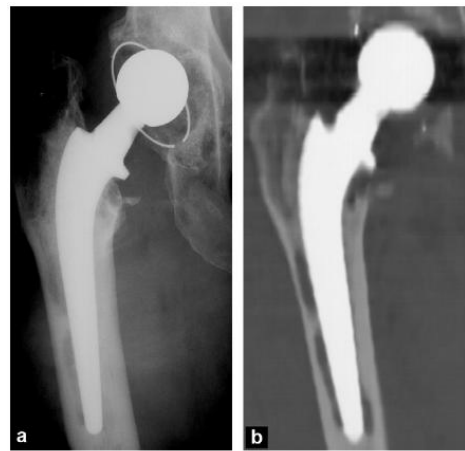
L'existence d'une fistule à proximité de la prothèse affirme le diagnostic<sup>3 66</sup>. Dans les suites de la pose de l'implant, une IOAP est suspectée devant des douleurs d'intensité anormale, un écoulement purulent de la plaie opératoire, la désunion ou la nécrose de la cicatrice et/ou l'existence d'un syndrome inflammatoire local ou de signes généraux (fièvre, frissons). A distance de l'intervention, la présence d'une douleur et/ou d'un descellement radiologique doit faire évoquer le diagnostic d'IOAP surtout si la pose est récente. L'absence de signes cliniques inflammatoires locaux et généraux ne permet pas d'éliminer une infection<sup>3</sup>.

Chez tout patient porteur d'une prothèse articulaire, une bactériémie sans point d'appel infectieux doit faire suspecter une infection de matériel.

## 4.2. Place de l'imagerie

La place de l'imagerie est restreinte en cas d'infections précoces ou hémotogènes ; ces examens participant plutôt au diagnostic des infections retardées et tardives. L'IOAP peut être évoquée devant différentes anomalies, à la fois osseuses et des parties molles. La présence d'un trajet fistuleux et de collections a une valeur prédictive positive (VPP) de 100% ; inversement, l'absence d'épanchement autour d'une prothèse articulaire présente une valeur prédictive négative (VPN) de 100%<sup>73</sup>.

La radiographie standard est l'examen de première intention bien qu'elle soit normale dans 50% des cas (14% de sensibilité et 70% de spécificité)<sup>74</sup>. Les principaux signes radiologiques évocateurs d'infection sont : la présence d'un séquestre osseux, d'un liseré clair de descellement autour de la prothèse, l'existence de zones d'ostéolyse plurifocales, floues, en périphérie du matériel ou d'appositions périostées extensives, non incorporées à la corticale (figure 9)<sup>73</sup>. La présence de gaz autour du matériel fait suspecter un germe anaérobie.



**Figure 9** : (a) Radiographie de la hanche droite et (b) Reformage TDM coronal en fenêtre osseuse chez un patient porteur d'une prothèse totale de hanche douloureuse : ostéolyse plurifocale hors de la zone importante ; sepsis confirmé lors de la ponction aspiration. D'après Cyteval *et al.*, 2012<sup>73</sup>.

Le scanner avec injection de produit de contraste iodé est l'examen de deuxième intention. Il permet l'analyse des structures osseuses et des parties

molles. Les signes osseux à rechercher sont identiques à ceux visualisés sur des radiographies standards mais l'analyse est plus fine. Dans une étude de 2002, Cyteval *et al.* retrouvaient une anomalie des tissus mous dans 100% des cas, avec une spécificité de 87% (collection à parois épaisses se rehaussant après injection correspondant à un abcès)<sup>75</sup>.

L'échographie permet de rechercher une collection, un épanchement intra-articulaire, un épaissement des tissus mous et une hyperhémie doppler. En cas de collection au contact de l'implant dont la ponction est difficile, il est recommandé de la pratiquer sous contrôle scopique, échographique ou tomodensitométrique et dans des conditions d'asepsie chirurgicale.

L'IRM est d'interprétation délicate à cause des artéfacts liés au matériel prothétique (sauf si le matériel est en titane). L'injection de gadolinium permet de sensibiliser la détection des anomalies des parties molles.

Les différentes techniques de médecine nucléaire sont complémentaires de l'imagerie conventionnelle et constituent une aide utile aux cliniciens. La scintigraphie osseuse aux diphosphonates marqués au Technetium 99 (en 3 temps) est l'examen de médecine nucléaire utilisé en première intention car facilement réalisable et non invasif. Sa sensibilité est de 90 à 100% dès les premières heures d'infection mais sa spécificité est médiocre (35%) ; une hyperfixation persistant plusieurs mois après la pose de la prothèse. L'association d'une hyperhémie, d'une augmentation de diffusion tissulaire et



d'une hyperfixation au temps tardif permet d'évoquer le diagnostic<sup>73</sup>. La scintigraphie aux leucocytes marqués *in vitro* (couplée au scanner et à une scintigraphie aux colloïdes) est la technique de routine la plus spécifique de l'infection. Elle présente une sensibilité de 96% et une spécificité de 87%<sup>76</sup>. La scintigraphie osseuse couplée à une scintigraphie aux polynucléaires marqués est indiquée en cas de forte suspicion d'infection retardée ou tardive et de négativité des examens précédents<sup>3</sup>.

Il n'existe aucun examen d'imagerie de référence. Malgré sa sensibilité, la radiographie standard reste incontournable ; le scanner et l'IRM sont fiables pour rechercher des anomalies des parties molles. La scintigraphie osseuse a pour but d'éliminer une infection évolutive avec son excellente VPN tandis que la scintigraphie aux leucocytes marqués couplée à la scintigraphie aux colloïdes reste l'examen de référence. La tomographie d'émission de positons au 18 FDG n'a pour l'instant pas d'indication dans le diagnostic des IOAP<sup>73</sup>.

### **4.3. Apport de l'examen anatomopathologique**

Il est recommandé de réaliser de manière systématique un examen anatomopathologique intéressant le tissu osseux et la synoviale<sup>3</sup>. Le diagnostic histologique d'IOAP repose sur la présence de plus de 5 PNN par champ (grossissement x 400) dans au moins 5 champs microscopiques différents. Il présente une sensibilité > 80% et une spécificité > 90%<sup>77</sup>. Il existe néanmoins une variabilité inter-observateur élevé et chez un même

malade, le degré d'infiltration par les cellules inflammatoires varient considérablement entre les échantillons prélevés et à l'intérieur d'un même échantillon. Cet examen nécessite donc un examen attentif par un médecin anatomopathologiste expérimenté<sup>77</sup>.

#### **4.4. Diagnostic biologique**

##### **4.4.1. Biomarqueurs de l'inflammation**

Aucun de ces paramètres biologiques n'est à lui seul spécifique de l'IOAP. La leucocytose sanguine et la proportion de PNN sont peu informatives<sup>3</sup>.

Dans le mois suivant l'implantation de la prothèse, des mesures répétées de protéine-C réactive (CRP) sont plus intéressantes qu'une seule valeur ; en effet, la CRP s'élève après chaque geste chirurgical et diminue en 10 à 15 jours. C'est donc une augmentation de la CRP après une diminution initiale ou la persistance d'une CRP élevée qui fait suspecter une IOAP<sup>77</sup>. La vitesse de sédimentation (VS) n'a aucune valeur diagnostique dans ce cas<sup>3</sup>.

Dans les IOAP retardées et tardives et en l'absence de facteurs interférents (âge élevé, pathologies inflammatoires en poussée, insuffisance rénale...), il est recommandé de combiner le dosage de la CRP et de la VS<sup>3 66</sup>.

Dans une méta-analyse publiée en 2010, Berbari *et al.* ont montré la supériorité de l'interleukine-6 (IL-6) par rapport à la CRP, la VS et le compte de leucocytes dans le diagnostic d'IOAP<sup>78</sup>. IL-6, marqueur très sensible, serait utile au dépistage de l'infection dans la période post-opératoire précoce car

elle redevient normal 2 jours après l'intervention<sup>79</sup>. La procalcitonine (PCT) est un marqueur très spécifique pour la détection des IOA ; Une valeur de PCT supérieure à 0,5 ng/ml a une forte valeur prédictive positive d'infection mais manque de sensibilité (tableau 6)<sup>79 80</sup>. Le dosage de la procalcitonine, couplé au dosage d'un marqueur plus sensible comme la CRP ou l'IL-6, pourrait être une option intéressante. D'autres études évaluant l'apport de l'IL-6 et de la PCT sont néanmoins nécessaires.

**Tableau 6** : Sensibilité et spécificité des marqueurs biochimiques dans l'IOAP. D'après Peel *et al.*, 2010<sup>79</sup>.

	Sensitivity (%)	Specificity (%)
ESR	81-92%	90-96
CRP	84-89	83-96
IL-6	95-100	87-95
TNF- $\alpha$	43	94
Procalcitonin	33	98
Synovial white cell count $\geq 1.7 \times 10^9/\mu\text{L}$	94	88
Synovial leucocyte differential >65% neutrophils	97	98

CRP, C-reactive protein; ESR, erythrocyte sedimentation rate; IL-6, interleukin-6; TNF- $\alpha$ , tumour necrosis factor  $\alpha$ .

#### 4.4.2. Diagnostic microbiologique

Le diagnostic microbiologique des IOAP repose sur l'analyse de plusieurs prélèvements profonds. Il constitue, pour les laboratoires, un exercice fastidieux mais capital pour assurer le diagnostic de certitude et guider l'antibiothérapie ; le laboratoire devant identifier de façon exhaustive les agents microbiens en cause et déterminer leur profil de résistance. La fiabilité du diagnostic microbiologique dépend de la qualité des prélèvements, des modalités d'acheminement jusqu'au laboratoire et des techniques utilisées.

#### 4.4.2.1. Prélèvements pré-opératoires

- **Etude du liquide articulaire :**

En cas d'épanchement intra-articulaire ou d'abcès au contact du matériel, il est recommandé d'effectuer une ponction, éventuellement radioguidée, en respectant des conditions d'asepsie chirurgicale et en l'absence de traitement antibiotique. Le liquide ponctionné doit être réparti de la manière suivante : une partie dans un tube hépariné pour la cytologie et une partie laissée dans la seringue bouchée pour l'examen microscopique et la culture classique. Une partie peut éventuellement être inoculée directement dans des flacons d'hémocultures aérobies et anaérobies (ou pédiatrique en cas de faible volume) ; l'ensemencement des flacons d'hémocultures augmenterait les performances de la culture et réduirait les risques de contamination (tableau 7)<sup>81 82</sup>.

**Tableau 7 : Comparaison de 3 méthodes de culture pour le diagnostic d'IOAP de hanche et de genou. D'après Larsen et al., 2012<sup>81</sup>.**

	No. of patients	Swab culture (intraoperative)		Synovial fluid culture (blood culture vials)		Tissue culture (sample set)	
		Sensitivity	Specificity	Sensitivity	Specificity	Sensitivity	Specificity
Levine & Evans (2001) 95 % CI	32/34/20	76 % (19/25) (55; 91)	86 % (6/7) (42; 100)	92 % (23/25) (74; 99)	100 % (9/9) (66; 100)	77 % (10/13) (46; 95)	100 % (7/7) (59; 100)
Font-Vizcarra et al. (2010) 95 % CI	150	68 % (59/87) (57; 77)	99 % (62/63) (91; 100)	90 % (78/87) (81; 95)	100 % (63/63) (94; 100)	82 % (71/87) (72; 89)	81 % (51/63) (89; 90)

La mesure des leucocytes et la proportion de PNN dans le liquide synovial est un test rapide et précis pour différencier une IOAP d'un descellement aseptique. En effet, un liquide articulaire avec plus de 1700 leucocytes/mm<sup>3</sup> (sensibilité de 94% et spécificité de 88%) et plus de 65% de PNN (sensibilité de 97% et spécificité de 98%) est fortement évocateur d'IOAP<sup>83</sup> (tableau 6).

Une autre publication retrouve des valeurs seuils similaires (1100 leucocytes/mm<sup>3</sup> et 64% de PNN)<sup>84</sup>. Cependant, ces études ont été réalisées chez des patients ayant une IOAP de genou, à distance de l'implantation et en l'absence de rhumatisme inflammatoire. Or, il semblerait que le compte de leucocytes et sa capacité à prédire une IOAP soient fonction de la localisation de la prothèse (hanche ou genou), du type d'infections (précoces ou à distance de l'implantation) et du terrain du patient<sup>66</sup>.

L'examen direct après coloration de Gram et cyto centrifugation peut permettre de visualiser des bactéries et d'orienter le traitement. Le liquide seraensemencé de la même manière que les prélèvements per-opératoires.

Plusieurs études récentes ont évaluées l'intérêt du dosage de la CRP dans le liquide synovial ; les premiers résultats (sensibilité de 85% et spécificité de 95% à un seuil de 9,5 mg/l) laissent penser que ce dosage pourrait être une méthode simple et fiable pour le diagnostic d'IOAP à l'avenir. En effet, le dosage de la CRP dans le liquide synovial serait plus spécifique d'IOAP que son dosage classique dans le sérum<sup>85 86</sup>. Cependant, d'autres études sont nécessaires pour confirmer ces résultats, valider la méthode de dosage et fixer une valeur seuil.

- **Autres prélèvements pré-opératoires :**

En l'absence d'épanchement, il est possible de réaliser une biopsie tissulaire au True-cut. Les prélèvements superficiels de plaies ou de fistules par

écouvillonnage doivent être évités car ces sites sont colonisés par des bactéries ne correspondant pas, le plus souvent, aux bactéries en profondeur responsables de l'infection<sup>3</sup>. En cas de fièvre, de signes généraux ou d'infection à distance, des hémocultures doivent être réalisées.

#### **4.4.2.2. Prélèvements per-opératoires**

- **Réalisation des prélèvements** :

Les prélèvements per-opératoires doivent être multiples et réalisées en début d'intervention, si possible en dehors de toute antibiothérapie et avant toute antibioprophylaxie afin d'augmenter le rendement de la culture ; un délai minimal de 15 jours par rapport à un traitement antibiotique est recommandé. De même, pour éviter les prélèvements faussement positifs, des mesures d'asepsie strictes sont nécessaires<sup>3 66</sup>.

Il est recommandé de réaliser 5 prélèvements afin de distinguer les contaminants des bactéries infectantes<sup>3 87</sup>. En effet, un nombre inférieur risque de diminuer la sensibilité de la culture et de poser des problèmes d'interprétation. Un nombre supérieur n'améliore pas les performances de l'examen ; par contre, il engendre une probabilité accrue de contamination, une surcharge de travail pour le laboratoire ainsi que des coûts supplémentaires. Ces prélèvements doivent être réalisés en des sites anatomiques différents et ciblés sur des zones macroscopiquement pathologiques ; ils peuvent être liquides (pus, liquide articulaire) ou solides

(tissus au contact du matériel et tout tissu paraissant suspect) ; le matériel prothétique peut également être retiré et envoyé pour analyse bactériologique. Les prélèvements par écouvillonnage, en raison de leur faible sensibilité, doivent être proscrits<sup>1 81</sup>. Chaque prélèvement doit être effectué avec un instrument différent pour éviter les contaminations croisées<sup>3 66</sup>. Les flacons de prélèvement doivent être compatibles avec les techniques de traitement réalisées en aval (broyage mécanique, sonication). Il faut limiter les manipulations des échantillons ainsi que le transfert d'un flacon à un autre pour limiter les risques de contamination. Ces flacons doivent être garantis sans DNases ni ADN pour permettre la réalisation éventuelle de technique moléculaire ultérieurement.

- **Transport des échantillons** :

Les échantillons correctement identifiés doivent être adressés le plus rapidement possible au laboratoire, accompagnés d'un bon de demande comportant les renseignements cliniques pertinents et les recherches particulières éventuelles (mycobactérie...). L'importance du transport a été longtemps sous-estimée et peu d'études ont étudiées l'impact du délai et des conditions de transport sur les résultats de la culture. Le transport doit s'effectuer à température ambiante et si le délai d'acheminement dépasse les 2 heures, il est conseillé de mettre les prélèvements dans des milieux de transport permettant la survie des bactéries fragiles et anaérobies<sup>3</sup>.

- **Préparation des échantillons au laboratoire :**

Au laboratoire, les prélèvements doivent être systématiquement manipulés avec précaution, sous conditions strictes de stérilité et sous Poste de Sécurité Microbiologique (PSM) de type 2 pour éviter les contaminations ; il est recommandé d'utiliser du matériel à usage unique.

Le pré-traitement des échantillons, basé sur le broyage des prélèvements solides et/ou la sonication des matériels explantés, a pour but de libérer les bactéries incluses dans le biofilm et adhérentes au matériel. Le broyage, réalisé de manière manuelle ou mécanique, sera détaillé dans le chapitre 4.4.3.

La sonication des implants est réalisée dans un bain à ultrasons avec un support scellé contenant le liquide de sonication et l'implant retiré. L'application d'ultrasons à basse fréquence permet de détacher le biofilm de la surface et de le casser sans altérer la viabilité des bactéries<sup>88</sup>. Le liquide de sonication est ensuite soumis à culture et/ou PCR après une étape de centrifugation pour concentrer les bactéries libérées. Dans une étude de 2007, Trampuz *et al.* ont prouvé la supériorité de cette méthode en terme de sensibilité par rapport à la culture classique (78,5% *versus* 60,8%) ; les spécificités étant équivalentes avec des valeurs de 99,2% et de 98,8% pour la culture classique et la technique de sonication respectivement<sup>8</sup>. D'autres études ont prouvé l'apport de cette technique, notamment en cas d'antibiothérapie préalable (tableau 8)<sup>81 89 90</sup>. Cependant, la sonication n'a



d'intérêt qu'en cas de retrait de l'implant et ne s'applique pas au diagnostic pré-opératoire. Elle ne doit donc pas être la seule modalité diagnostique des IOA.

**Tableau 8 : Revue d'études comparant les performances de la culture sans et avec sonication de l'implant prothétique en cas d'IOAP. D'après Larsen *et al.*, 2012<sup>81</sup>.**

	No. of patients	+ Sonication (prosthesis)		- Sonication (tissue)		Comments
		Sensitivity	Specificity	Sensitivity	Specificity	
Piper <i>et al.</i> (2009) 95 % CI	134	67 % (22/33) (48; 82)	98 % (99/101) (93; 100)	55 % (18/33) (36; 72)	95 % (96/101) (89; 98)	PJIs of the shoulder
Esteban <i>et al.</i> (2008) 95 % CI	31	94 % (16/17) (71; 100)	50 % (7/14) (23; 77)	88 % (15/17) (64; 99)	100 % (8/8) (63; 100)	PJIs of hip, knee and miscellaneous
Trampuz <i>et al.</i> (2007) 95 % CI	331	78 % (62/79) (68; 87)	99 % (249/252) (97; 100)	61 % (48/79) (49; 72)	99 % (250/252) (97; 100)	PJIs of hip and knee
Trampuz <i>et al.</i> (2006) 95 % CI	78	75 % (18/24) (53; 90)	87 %* (47/54) (75; 95)	54 % (13/24) (33; 74)	98%* (53/54) (90; 100)	Contamination due to leakage of sonication bags

- **Examen Bactériologique :**

Les recommandations de la Société Française de Microbiologie concernant la mise en culture des prélèvements liquides, des broyats et/ou du liquide de sonication obtenus sont les suivantes<sup>91</sup> :

- Ensemencement de 2 géloses au sang (l'une incubée en aérobiose et l'autre en anaérobiose), d'une gélose au sang cuit supplémentée incubée sous 5% de CO2 et d'un milieu liquide de type bouillon Schaedler. Des flacons d'hémocultures peuvent être ensemencés.
- Incubation pendant 14 jours à 35°C pour permettre l'isolement de SCV, des bactéries de croissance lente et d'infections pluri-microbiennes. En effet, prolonger les cultures à 14 jours permettrait d'augmenter la sensibilité de la culture notamment en cas d'IOAP retardée<sup>92</sup>.
- Lecture des géloses à J1, J2 et J5 (et J10 pour la gélose anaérobique) ; lecture régulière des milieux liquides jusqu'à J14. Ces derniers seront

systématiquement repiqués dès qu'un trouble apparaît ou à J14 même s'ils ne sont pas troubles (certaines bactéries pouvant ne pas troubler le bouillon d'enrichissement).

- Une partie de chaque prélèvement doit être congelée à -80°C pour d'éventuelles analyses complémentaires (PCR, mycobactérie...).

L'examen direct d'un frottis après coloration de Gram permet de rechercher la présence de PNN et de bactéries ; cet examen réalisé à partir du liquide synovial et des prélèvements solides montre une faible sensibilité (9,8%) alors que la spécificité est proche de 100%<sup>93</sup>.

La sensibilité de la culture des prélèvements per-opératoires varie de 65 à 94% selon la définition d'une IOAP, soulignant l'importance de critères diagnostiques consensuelles. Une antibiothérapie préalable, des bactéries de croissance fastidieuse ou encapsulées dans le biofilm, des microorganismes ne se cultivant pas sur les milieux usuels, la mort des bactéries à cause de mauvaises conditions de transport ou de l'antibiothérapie locale libérée lors du retrait de l'implant peuvent être à l'origine de cultures faussement négatives<sup>94</sup>.

La lecture des géloses doit être attentive à la recherche des différents aspects de colonies et notamment des SCV ; une culture positive précoce ne dispense pas des lectures suivantes et d'une incubation complète à la recherche de bactéries à croissance plus lente, les infections polymicrobiennes représentant

10 à 36% des IOAP. Une identification et un antibiogramme doivent être réalisés sur les différents types de colonies isolées par les méthodes utilisées en routine<sup>3</sup>. L'identification par les tests phénotypiques peut être prise à défaut en cas de SCV et de bactéries anaérobies. Or, identifier les bactéries avec fiabilité est non seulement important pour le choix du traitement mais aussi pour l'interprétation des résultats ; en effet, distinguer 2 espèces différentes évite de confondre une double contamination avec une infection vraie et inversement. Le recours à d'autres techniques comme la biologie moléculaire peut être nécessaire. De même, L'identification bactérienne par MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionisation-Time-of-flight Mass Spectrometry*), qui tend à se généraliser dans les laboratoires de Bactériologie, permet d'obtenir une identification rapide et fiable d'un certain nombre de pathogènes et de contaminants et a donc toute sa place dans le diagnostic des IOAP<sup>95</sup>.

- **Interprétation des résultats** :

Pour les infections aiguës, l'interprétation des résultats ne posent habituellement pas de problème sauf si le patient est sous antibiotique au moment des prélèvements. En général, les cultures se positivent rapidement et les bactéries en cause n'entraînent pas de problème d'identification selon les méthodes phénotypiques classiques, ni d'interprétation ; l'antibiogramme ne posant également aucune difficulté particulière.

Inversement, en cas d'infections chroniques, le diagnostic est souvent tardif et plus complexe ; les germes impliqués ayant une pousse ralentie, en petite quantité, une morphologie atypique et des caractères biochimiques inhabituelles avec un risque d'erreur d'identification (SCV). Les colonies d'une même espèce peuvent présenter des aspects polymorphes en culture avec parfois des antibiogrammes différents faisant évoquer une contamination alors que le génotypage révèle des souches identiques. De plus, il est parfois difficile de conclure entre le rôle pathogène ou contaminant des bactéries appartenant à la flore cutanée, fréquemment observées dans les IOA chroniques.

L'interprétation des résultats bactériologiques est complexe et doit tenir compte du contexte clinique, de la ou les espèces identifiées, de la nature et du nombre de prélèvements positifs et également pour ces derniers du nombre de milieux positifs et de colonies observées. Elle repose sur l'étude de plusieurs prélèvements profonds. Ainsi, la probabilité d'infection augmente avec le nombre de prélèvements positifs en culture avec la même bactérie. Du fait de la sensibilité de la culture, la négativité des prélèvements n'exclut pas le diagnostic d'IOAP.

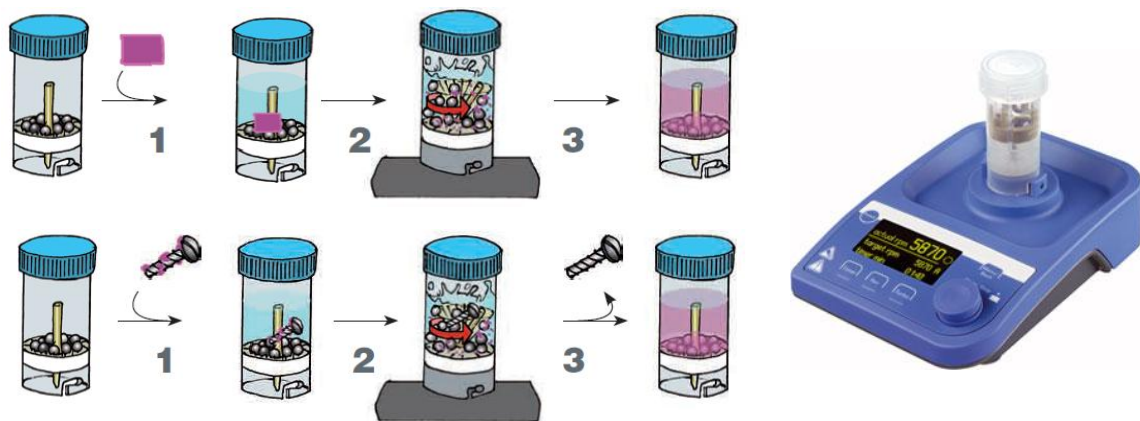
Dans tous les cas, ce n'est qu'au terme d'une confrontation multidisciplinaire que le diagnostic final doit être retenu et la conduite à tenir décidée.

#### 4.4.3. Apport du broyage mécanique

Les prélèvements solides (fragments d'os, de tissus) doivent être broyés afin de libérer les bactéries piégées dans le biofilm<sup>3</sup>. La littérature ne révèle pas d'étude comparative sur la préparation des échantillons tissulaires avant la mise en culture microbiologique ni d'étude comparant les performances de la culture sans et avec broyage. Néanmoins Günthard *et al.* ont rapporté 2 cas d'endocardite à *P. acnes* dont le broyage des prélèvements tissulaires a permis de rattraper le diagnostic ; les cultures après homogénéisation des prélèvements étant positives alors que celles sans pré-traitement sont demeurées stériles<sup>96</sup>.

Les techniques classiques de broyage à l'aide d'un mortier et d'un pilon stériles ou avec un scalpel sont sujettes à des contaminations, des disparités en fonction de la nature des pièces opératoires et sont consommatrices de temps techniques. Leur bénéfice par rapport au risque de contamination n'est pas démontré. Ainsi, de nouvelles techniques de broyage, utilisant un broyeur mécanique, ont été développées. Il s'agit notamment des broyeurs à billes (figure 10). Ces systèmes fonctionnent dans un environnement clos protégeant le prélèvement comme l'opérateur des aérosols. Ces dispositifs à usage unique permettent, en outre, de diminuer les manipulations du prélèvement ; les échantillons étant mis directement par le chirurgien dans les poudriers à billes au bloc opératoire et broyés au laboratoire dans le poudrier qui n'est ouvert que sous hotte pour l'ensemencement. Cette méthode n'utilisant ni

mortier ni pilon et évitant les ouvertures multiples du poudrier permet de limiter le risque de contamination et donc de faux positif. Des gains de temps et économiques sont également observés : temps de manipulation, aucune stérilisation (à usage unique), diminution des contaminations et des tests non pertinents sur ces contaminants. De plus, les poudriers contiennent des réactifs sans DNases et sans ADN rendant possibles toutes les approches moléculaires en aval.



**Figure 10** : Schémas et image représentant la préparation d'un prélèvement solide ou d'un matériel étranger explanté par broyage mécanique. Issus du site de Labomoderne<sup>97</sup>.

Une seule étude a évalué le broyage mécanique et l'apport de celui-ci dans le diagnostic des IOAP ; dans cette étude récente portant sur 92 patients hospitalisés pour une prise en charge chirurgicale d'IOAP, le broyage mécanique semble une excellente technique pour parvenir à la documentation microbiologique de l'infection ; en effet, Roux *et al.* retrouvent une sensibilité de la culture après broyage mécanique de 83,7% comparable à la sensibilité de la culture après sonication de matériel explanté (78,5%) et bien supérieure à celle de la culture seule (60,8%)<sup>7 8</sup>. Ils rapportent également un faible taux

de contamination (8,7%)<sup>7</sup>. Deux hypothèses principales sont avancées pour expliquer la sensibilité du broyage : premièrement, il entraînerait une libération accrue des bactéries du foyer intra-tissulaire et du compartiment intracellulaire ; la deuxième hypothèse est que le stress subi par les bactéries pendant l'homogénéisation accélérerait leur passage de la phase stationnaire dans laquelle elles se trouvent à l'intérieur du biofilm à une phase de croissance<sup>98</sup>. Ces hypothèses permettent, en outre, de penser que l'identification des SCV serait facilitée. De même, le délai de positivité des cultures devrait être raccourci et permettre un diagnostic plus rapide.

L'avantage du broyage par rapport à la sonication des prothèses explantées est qu'il ne nécessite pas le retrait de l'implant ; il peut donc être appliqué aux IOA sans et avec matériel, aux prises en charge chirurgicales sans et avec retrait du matériel et plus largement à chaque fois qu'un prélèvement tissulaire est réalisé dans un contexte d'infection liée au biofilm. Il peut également participer à la documentation pré-opératoire du diagnostic d'IOAP en cas de biopsie au True-cut. Les matériels explantés de petite taille (vis...) peuvent être traités au broyeur à billes.

Dans les recommandations de pratique clinique concernant le diagnostic et la prise en charge des IOAP parues en 2012, « The Infectious Diseases Society of America évoque un nouveau procédé technique qui pourrait aider à

l'identification du pathogène » en parlant du broyage mécanique et pose la question de son rôle dans le diagnostic de ces infections<sup>66</sup>.

Ainsi, le broyeur à billes apparaît comme une technique prometteuse permettant un gain de sensibilité et de spécificité, une diminution des contaminations et l'optimisation du temps, des coûts et de la qualité ; néanmoins, des études complémentaires à plus grande échelle sur ses performances sont nécessaires. De même, les poudriers à billes ayant un coût non négligeable, une étude médico-économique évaluant les économies engendrées par cette technique serait intéressante.

#### **4.4.4. Diagnostic moléculaire**

L'approche moléculaire vise à mettre en évidence l'ADN bactérien. Plusieurs techniques moléculaires fondées sur l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) existent. Mise au point en 1985 par Kary Mullis, la PCR a connu depuis un développement spectaculaire et rapide<sup>99</sup>.

La PCR est une technique de répllication ciblée *in vitro*, permettant d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique ; l'amplification spécifique de ce fragment d'intérêt se fait par la répétition de cycles de dénaturation de l'ADN, d'hybridation des amorces spécifiques du gène à amplifier et d'élongation du fragment par une ADN polymérase<sup>99</sup>.



Les techniques moléculaires peuvent être appliquées au diagnostic d'IOAP bien que la culture reste la méthode de référence. Le rendement de la PCR dans le diagnostic de ces infections est dans l'ensemble assez faible si elle est étendue à l'ensemble des prélèvements. Par contre, son usage ciblé en deuxième intention chez des patients suspects d'IOAP mais dont les prélèvements sont demeurés stériles en culture pourrait s'avérer intéressant. En effet, les techniques conventionnelles de culture sont mises à défaut par les bactéries ne se cultivant pas sur milieux usuels (bactéries intracellulaires, mycobactéries), celles qui ont perdu leur capacité de croissance (antibiothérapie, conditions de transport des échantillons inappropriées) et enfin celles dont la croissance est ralentie ou difficile (SCV). Les méthodes moléculaires, qui ne dépendent ni de la viabilité ni du métabolisme bactériens, sont donc théoriquement capables de permettre le diagnostic dans ces situations. L'approche moléculaire permet, en outre, une identification et un diagnostic rapide<sup>46</sup>. Ainsi, l'apport de ces techniques dans la prise en charge des IOAP doit être évalué car il s'agit de pratiques réalisées en plus des approches classiques de culture et sont donc à l'origine de coûts et de temps technique supplémentaires. Il faut également souligner que la plupart des méthodes moléculaires restent du ressort de laboratoires spécialisés et sont donc difficilement accessibles en routine.

Le diagnostic moléculaire peut être réalisé à partir du liquide articulaire, des broyats et/ou du liquide de sonication mais aussi à partir de souches bactériennes dont l'identification pose des difficultés. Deux types de PCR sont principalement utilisés pour la documentation microbiologique des IOAP: la PCR universelle dite PCR « large spectre » permettant d'amplifier théoriquement l'ADN de toutes les bactéries et la PCR spécifique, dite à « spectre étroit » ciblant une espèce ou un genre bactérien.

#### **4.4.4.1. Principes de la PCR pan-bactérienne ou universelle**

La PCR universelle consiste à amplifier les gènes codant l'ARN ribosomal 16S, retrouvés chez toutes les bactéries mais absents des génomes humains, viraux et fongiques. Il s'agit d'une PCR large spectre offrant la possibilité d'identifier pratiquement n'importe quelles bactéries y compris celles ne se cultivant pas ou mal.

La technique débute par l'extraction de l'ADN total (humain et bactérien) du prélèvement ; cette extraction peut être manuelle ou automatisée, une étude récente recommande la procédure automatisée car elle limite le risque de contamination croisée<sup>100</sup>. De plus, cette étape doit être précédée d'une phase de digestion indispensable pour les échantillons d'os et de tissus. L'extraction d'ADN est suivie de deux réactions de PCR : la qualité de l'ADN extrait est premièrement évaluée en amplifiant le gène humain de la bêta-globine ; cette PCR permet, en outre, de vérifier l'absence d'inhibiteur. Une réaction d'amplification à l'aide d'amorces universelles amplifiant un fragment

spécifique de l'ADNr 16S bactérien est secondairement réalisée. Le produit d'amplification est ensuite révélé par électrophorèse sur gel d'agarose ; une amplification positive signe la présence de bactéries. Le fragment amplifié est ensuite séquencé et la séquence obtenue est comparée avec une base de données (banques de séquences) permettant l'identification de la bactérie (genre ou espèce dont la séquence est phylogénétiquement la plus proche de la séquence-requête).

L'intérêt majeur de la PCR universelle est d'offrir une approche large « sans à priori » sur la nature du germe en cause ; une seule PCR pouvant mettre en évidence n'importe quelles bactéries. Cependant, cette PCR présente des limites : une sensibilité imparfaite et variable selon les espèces bactériennes (sensibilité inférieure à la PCR spécifique) ; par conséquent, un résultat négatif n'exclut pas le diagnostic d'IOAP. De plus, selon le fragment du gène de l'ADNr 16S amplifié, la PCR universelle n'est pas fiable pour différencier des espèces phylogénétiquement très proches. Par exemple, les espèces *S. mitis*, *S. oralis* et *S. pneumoniae* possèdent la même séquence de l'ADNr 16S en 5'. Les autres inconvénients de la PCR universelle sont le délai d'obtention des résultats assez long à cause du séquençage et le risque de contamination présent à toutes les étapes à l'origine de faux-positifs et de problèmes d'interprétation des résultats. Enfin le diagnostic par cette technique est difficile voire impossible en cas d'infection polymicrobienne ; cependant, si

on associe une étape de clonage à la PCR universelle, la détection de ces infections et l'identification des principales bactéries en cause deviennent possibles<sup>101</sup>.

L'efficacité de cette PCR dans la détection des microorganismes dépend de la qualité des échantillons, du rendement de la technique d'extraction, du protocole et des automates de PCR utilisés, de la validation et de l'interprétation de chaque analyse de PCR<sup>100</sup>.

Du fait de ses limites, le développement d'autres techniques d'amplification est nécessaire.

#### **4.4.4.2. PCR universelle et IOAP**

Les techniques de PCR universelle ont été expérimentées sur les prélèvements ostéo-articulaires dans différentes études, avec des résultats très variables. Ces résultats sont liés à une sélection hétérogène des patients, à des méthodes différentes de préparation des échantillons, à des protocoles de PCR différents et à l'absence de « gold standard » dans les critères de définition des IOAP.

Dès 1999, Tunnay *et al.* ont évalué l'intérêt de la PCR 16S à partir du liquide de sonication : les résultats étaient très encourageants puisque la PCR était positive dans 72% des cas contre seulement 22% pour la culture<sup>102</sup>. Depuis, un nombre limité d'études ont évalué l'apport de la PCR pan-bactérienne dans le diagnostic des IOAP à partir de prélèvements péri-prothétiques et du liquide articulaire ; la sensibilité et la spécificité de cette technique dans ce

contexte varient selon les publications de 50 à 92% et de 65 à 94%, respectivement<sup>9 103 104</sup>. Une étude récente a conclu à la supériorité de l'approche moléculaire sur la culture en termes de spécificité et de valeur prédictive positive ; une PCR « large spectre » positive serait donc largement suggestive d'une infection de prothèse articulaire. Néanmoins, la culture classique reste plus sensible dans ce cas<sup>105</sup>. La PCR universelle a également été testée à partir du liquide de sonication avec une sensibilité proche de celle de la culture (70,4% *versus* 72,6) et une spécificité identique (98%) ; la sensibilité progressant à 78,5% en combinant la culture et la PCR<sup>106</sup>.

Ainsi, en l'absence de standardisation des méthodes de PCR et devant les résultats contrastés des différentes études, nous avons décidé de comparer les performances de la méthode classique microbiologique à notre technique moléculaire pan-bactérienne dans le diagnostic des IOAP.

#### **4.4.4.3. PCR spécifique**

La technique de PCR spécifique consiste à amplifier une partie de l'ADN bactérien d'une espèce ou d'un genre en particulier, soit à l'aide d'amorces spécifiques de l'espèce ciblée pour un gène non restreint à cette espèce, soit à l'aide d'amorces permettant l'amplification d'un gène présent uniquement dans l'espèce ciblée. Le fragment amplifié est révélé en temps réel ou sur gel. Une amplification positive suffit à attester de la présence de la seule espèce recherchée dans le prélèvement ; le séquençage n'est donc pas nécessaire. Le

résultat signifie la présence ou l'absence de la bactérie recherchée. La PCR spécifique peut être appliquée à un grand nombre de bactéries.

Cette technique présente de nombreux avantages à savoir une sensibilité supérieure à la PCR universelle, l'absence d'interférence par des bactéries contaminantes et un délai de rendu des résultats plus courts car elle ne nécessite pas de séquençage après l'amplification. En revanche, elle présente un spectre étroit en ne ciblant qu'une seule espèce bactérienne. La place de cette PCR est donc en deuxième ligne lorsque la PCR universelle est négative ou ne permet pas de différencier plusieurs espèces ou en première ligne lorsque le diagnostic est orienté (bactéries identifiées sur des prélèvements précédents ou sur hémocultures par exemple) ou lorsqu'une espèce particulière possède une prévalence élevée.

Pour les IOAP, le choix de la bactérie ciblée se fera en fonction de critères cliniques et épidémiologiques ; ainsi, une PCR spécifique *S. aureus* ou SCN sera envisagée en priorité.

#### **4.4.4.4. Autres techniques moléculaires**

De nouvelles techniques moléculaires ont été appliquées aux prélèvements péri-prothétiques et aux implants soniqués. Une étude récente a, par exemple, comparé les performances d'une PCR multiplex en temps réel permettant la détection et l'identification de 25 bactéries et espèces fongiques (SeptiFast, Roche Diagnostics) à la culture classique à partir du liquide de sonication. La

sensibilité de la PCR multiplex était supérieure à celle de la culture (78% versus 62%), notamment en cas d'antibiothérapie préalable (100% versus 42%) suggérant l'utilité de cette technique en complément de la sonication des implants retirés dans le diagnostic d'IOAP<sup>90</sup>. De plus, les performances de cette technique pourraient encore progresser en adaptant le panel de bactérie recherchée. De même, le système GeneXpert, à partir du kit Xpert® MRSA/SA SSTI (Cepheid), permettant la détection en 1 heure de la présence de *S. aureus* et de la résistance à la méticilline y compris pour les SCN a été testé avec succès dans cette indication. L'intérêt est de pouvoir adapter le traitement antibiotique immédiatement<sup>107</sup>. L'avenir de cette technique passe par le développement d'un kit dédié spécifiquement au diagnostic des IOA. D'autres techniques, comme la PCR couplée à la spectrométrie de masse ESI-TOF (*Electrospray time-of-flight*) ou encore les puces à ADN, pourraient être intéressantes dans ce contexte.

Bien que les premiers résultats soient encourageants, de nouvelles études sont nécessaires pour valider l'application de ces technologies et définir leur place dans le diagnostic des IOA ; ces techniques devant également être adaptées à une utilisation en routine.

#### **4.5. Critères diagnostiques**

Il n'y a pas de consensus concernant les critères permettant de définir une IOAP. Cependant, une classification binaire a été proposée par la Société de

Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF) : infection certaine / infection probablement exclue ou non détectable. Entre les 2, plusieurs situations d'infections restent possibles. En l'absence de critères bien définis, leur diagnostic repose sur un faisceau d'arguments cliniques, biologiques et radiologiques.

- **Une infection est certaine si :**

- Présence d'une fistule au contact de la prothèse ;
- Présence de pus dans l'articulation ou au contact de l'implant ;
- Présence d'au moins 3 prélèvements (3 prélèvements per opératoires ou 2 prélèvements per-opératoires et 1 prélèvement par ponction articulaire réalisée quelques jours avant la chirurgie) ou 2 prélèvements espacés dans le temps (1 prélèvement per-opératoire et 1 prélèvement par ponction articulaire) positifs à la même bactérie (même espèce avec même antibiogramme) appartenant à la flore cutanée (ex : SCN, *P. acnes*, Corynébactérie...) et dont l'isolement pose la question d'une éventuelle contamination ;
- Présence d'au moins 1 prélèvement positif (1 prélèvement par ponction articulaire ou 1 prélèvement per-opératoire ou par hémoculture) à une bactérie n'appartenant pas à la flore cutanée et pour lequel la question d'une contamination ne se pose pas (ex : *S. aureus*, Entérobactéries, *P. aeruginosa*...) ou avec une bactérie exceptionnellement rencontrée pour



laquelle la question d'une contamination ne se pose pas (ex: *S. pneumoniae*, *Salmonella*, *Listeria*, *Campylobacter*, *Pasteurella*...).

- **Une infection est probablement exclue ou non détectable :**

- En l'absence de fistule ou de pus dans l'articulation ou au contact de l'implant ;
- Tous les prélèvements per-opératoires sont stériles (à condition d'avoir été réalisés après 15 jours d'arrêt de toute antibiothérapie) et lorsqu'il n'existe aucun signe histologique d'infection ;
- 1 seul prélèvement per-opératoire est positif à une bactérie de la flore cutanée (SCN, *P. acnes*, Corynébactérie...) sans signe histologique d'infection et avec moins de 65 % de PNN dans le liquide de ponction articulaire.

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

#### **4.6. Limites du diagnostic**

En l'absence de critères diagnostiques consensuels, le diagnostic d'IOAP repose sur un faisceau d'arguments cliniques, biologiques et d'imagerie. Néanmoins, le diagnostic microbiologique est primordial pour assurer le diagnostic et surtout guider la prise en charge thérapeutique. Il constitue souvent un véritable défi pour le microbiologiste notamment dans les infections chroniques et à bas bruit. En effet, il présente un certain nombre de

difficultés spécifiques dans la réalisation, le traitement et l'interprétation des prélèvements.

Le diagnostic bactériologique est rendu délicat par la diversité et les caractéristiques des bactéries incriminées. En effet, ces dernières appartiennent souvent à la flore commensale cutanéomuqueuse posant des problèmes en termes d'interprétation (caractère contaminant ou pathogène du germe isolé) ; une contamination pouvant avoir lieu au moment du prélèvement ou au moment de sa prise en charge au laboratoire. De plus, ces bactéries cultivent souvent mal (SCV, anaérobies) : lentement, en petite quantité, ayant un aspect atypique, polymorphique et apparaissant de manière décalée dans le temps en cas d'infections plurimicrobiennes ; leur culture peut donc être mise à défaut. Une antibiothérapie préalable peut aussi décapiter l'infection. Ce diagnostic dépend également des conditions de prélèvements, de transport (délai+++ ) et de traitement de l'échantillon (broyage+++). Ainsi, la méthode de culture conventionnelle des os et des tissus manque de sensibilité. De même, les résultats posent régulièrement des problèmes d'interprétation liés à la fréquence des contaminations. Le traitement de ces prélèvements est souvent fastidieux et coûteux pour étudier et identifier toutes les colonies. Enfin, la croissance lente et/ou difficile des bactéries en cause entraîne des rendus de résultats tardifs (souvent à 14 jours ou plus) ; or, la prise en charge des IOAP nécessite d'adapter le traitement le plus rapidement

possible pour éviter les complications sévères, les récurrences et réduire la durée de l'antibiothérapie large spectre.

Il apparaît donc nécessaire de disposer de techniques complémentaires des techniques classiques de diagnostic permettant d'améliorer la détection, l'identification des pathogènes et le délai d'obtention des résultats. Selon Roux *et al.*, le pré-traitement des prélèvements par broyage mécanique permettrait d'augmenter la sensibilité de la culture classique et de la PCR ; ce système diminuant, en outre, le risque de contamination et le temps de traitement des échantillons au laboratoire<sup>7</sup>. De plus, la culture pourrait se positiver plus précocement après broyage et ainsi permettre un diagnostic plus rapide. De même, une approche moléculaire, en complément de la culture classique, pourrait aider à la documentation de l'infection même si la PCR ne permet pas l'étude de la sensibilité aux antibiotiques, élément clé de la prise en charge thérapeutique. Le diagnostic d'IOAP pourrait donc progresser à l'avenir grâce à l'utilisation de nouvelles techniques prometteuses et complémentaires que sont le broyage mécanique, la PCR ou encore la sonication du matériel.

## **5. TRAITEMENT des IOAP**

L'objectif du traitement des IOAP est l'éradication de l'infection tout en maintenant une articulation indolore et fonctionnelle et la qualité de vie du

patient. L'IOAP est donc un défi thérapeutique nécessitant une prise en charge rapide et multidisciplinaire. Plusieurs options thérapeutiques sont possibles reposant en général sur une antibiothérapie prolongée active sur les bactéries du biofilm et une prise en charge chirurgicale. Une composante essentielle de l'approche thérapeutique est la collaboration étroite entre les acteurs des différentes spécialités impliquées (infectiologues, chirurgiens orthopédiques et plastiques, microbiologistes, radiologues et anatomopathologistes).

### **5.1. Traitement chirurgical**

Le traitement chirurgical des IOAP inclut le débridement avec conservation de l'implant, le changement de prothèse en 1 temps ou en 2 temps et le retrait de la prothèse sans réimplantation<sup>1</sup>. La décision finale concernant la prise en charge chirurgicale incombe au chirurgien après concertation si nécessaire<sup>66</sup>. Plusieurs facteurs influencent ce choix ; ainsi, pour un patient donné, la stratégie thérapeutique dépendra du délai entre l'apparition des symptômes et la prise en charge chirurgicale, du type d'infection (précoce, retardée, tardive), du germe en cause et de sa sensibilité aux antibiotiques, de la stabilité de l'implant et de l'état cutané en regard de la prothèse. Le terrain du patient, les antécédents au niveau du site infecté et l'expérience du chirurgien déterminent également le choix du traitement<sup>66</sup>. Les préférences du patient

doivent être prises en compte après lui avoir exposé les avantages et les inconvénients de chaque approche thérapeutique.

La synovectomie lavage (« le débridement ») avec conservation de la prothèse consiste en une excision étendue des parties infectées jusqu'à l'obtention d'un tissu sain et bien vascularisé et en un changement des inserts amovibles (polyéthylène par exemple). Le choix de cette procédure repose sur le fait qu'initialement l'IOAP est une simple infection de la cavité articulaire sans contamination de l'interface os-prothèse. Cette prise en charge est donc recommandée seulement s'il s'agit d'une infection post-opératoire précoce (< 30 jours suivant la pose de l'implant) ou si le début des symptômes date de moins de 3 semaines en cas d'infection hémotogène et ce, en l'absence de descellement et de fistule<sup>66</sup>. Cette procédure est associée à un taux de succès de 59 à 85% ; sa réussite étant corrélé à sa précocité<sup>3</sup>. A l'inverse, le risque d'échec augmenterait en cas d'IOAP à *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) ou à une bactérie à Gram négatif<sup>108 109</sup>. L'utilisation de molécules actives sur le biofilm, notamment la rifampicine sur les bactéries à Gram positif ou une fluoroquinolone sur celles à Gram négatif (comme la ciprofloxacine) permet d'augmenter les chances de réussite de l'approche conservatrice<sup>110 79</sup>. Par contre, en cas d'infection fongique, il est recommandé d'enlever tout le matériel<sup>3</sup>. Différentes études ont montré la supériorité de la synovectomie à ciel ouvert par rapport à la synovectomie arthroscopique<sup>111</sup>.

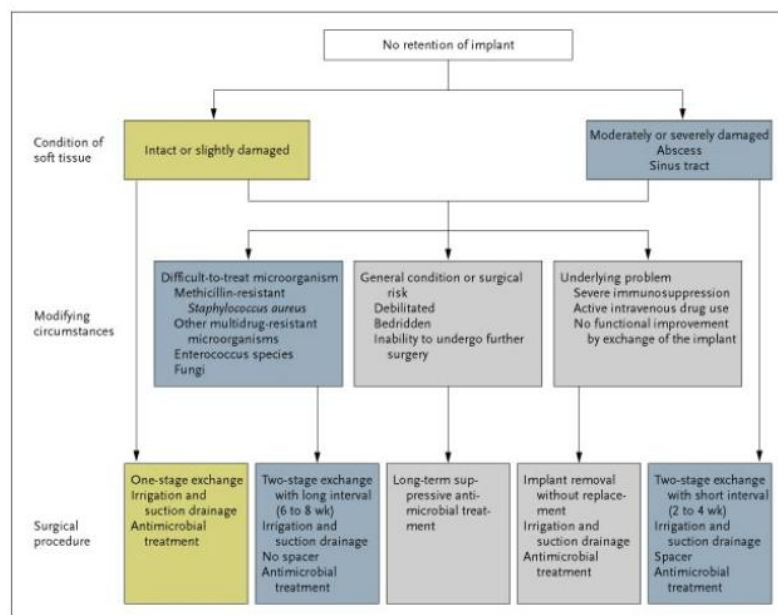
La chirurgie en 1 temps consiste en la dépose de la prothèse infectée, le débridement et l'implantation d'une nouvelle prothèse lors de la même intervention. Inversement, le changement en 2 temps comprend le retrait de l'implant avec « lavage » lors d'une 1<sup>ère</sup> opération. Ce premier geste doit être réalisé avant toute antibiothérapie de façon à pouvoir réaliser des prélèvements per-opératoires à visée bactériologique. Un espaceur imprégné de doses élevées d'antibiotiques est couramment utilisé pour maintenir l'espace après la dépose et diffuser localement une antibiothérapie. La réimplantation de la prothèse est réalisée au cours d'une 2<sup>ème</sup> intervention après un intervalle plus ou moins long au cours duquel une antibiothérapie systémique est dispensée (antibiothérapie initialement probabiliste puis secondairement adaptée au germe). On parle de 2 temps court ou de 2 temps long en fonction du délai entre la dépose et la repose. Le délai de repose idéal ne fait pas l'objet d'un consensus ; le délai recommandé est de 4 à 6 semaines pour un 2 temps court et de 3 à 6 mois pour un 2 temps long ; une « fenêtre antibiotique » de 15 jours sera effectuée avant la repose en cas de 2 temps long. Les critères de réimplantation sont la normalité des signes cliniques et des paramètres biologiques (VS et CRP)<sup>3</sup>.

Les résultats relevés dans la littérature ne permettent pas de définir objectivement les indications respectives de réimplantation en 1 ou 2 temps. Le changement en 1 temps suppose la connaissance et la sensibilité du germe

impliqué, un capital osseux suffisant (pour la stabilité de l'implant) et un état satisfaisant des tissus péri-prothétiques (pour une bonne cicatrisation); toutes les publications insistent sur le fait de sélectionner cette indication. Cette procédure est associée à un taux de réussite de 80 à 90%<sup>66</sup> ; son succès étant principalement attribuable à la qualité du débridement et à l'ablation complète du matériel infecté. Cette technique nécessite donc une équipe chirurgicale expérimentée. En outre, la réimplantation en 1 temps entraîne de meilleurs résultats fonctionnels et de moindres coûts que celle en 2 temps. Cependant, avec un succès dans 87% des cas, l'approche en 2 temps serait associée à un meilleur pronostic en termes de guérison que l'approche en 1 temps mais aucune étude à large échelle n'a démontré cette supériorité<sup>112</sup>. Ainsi, le « 2 temps » est indiqué aux patients ne répondant pas aux critères du changement en 1 temps et aux patients capables de supporter plusieurs interventions ; Il est principalement recommandé en cas de bactéries multi-résistantes ou difficiles à traiter, de défauts osseux et/ou des tissus mous importants et aux patients ayant des antécédents d'infection sur matériel<sup>66</sup>. Le changement en 2 temps reste la technique de référence mais la tendance va vers la diminution de ses indications. La figure 11 présente un algorithme décisionnel proposé par Zimmerli *et al.* pour les patients ne pouvant pas bénéficier du débridement avec conservation de l'implant<sup>1</sup>. En outre, il n'existe pas de recommandation sur l'utilisation ou non d'une prothèse cimentée en cas de changement en 1 ou 2 temps ; par contre, en cas

d'utilisation de prothèse cimentée, il est fortement recommandé d'utiliser un ciment aux antibiotiques<sup>3</sup>.

Le retrait de la prothèse sans réimplantation consiste en une ablation définitive de la prothèse associée à un débridement. Il est habituellement réservé aux patients présentant un haut risque de réinfection (bactéries hautement résistantes et difficiles à traiter, échec d'un précédent changement de prothèse en 2 temps chez un patient à haut risque infectieux, toxicomanie, immunodépression sévère) ou aux cas où l'on ne peut espérer une amélioration fonctionnelle après réimplantation<sup>65</sup>. Les solutions proposées sont la résection ou la coaptation articulaire, l'arthrodèse ou l'amputation<sup>3</sup>.



**Figure 11 :** Algorithme de prise en charge chirurgicale des patients infectés non éligibles au traitement avec conservation de la prothèse. D'après Zimmerli *et al.*, 2004<sup>1</sup>.

Le retrait de la prothèse sans réimplantation consiste en une ablation définitive de la prothèse associée à un débridement. Il est habituellement réservé aux patients présentant un haut risque de réinfection (bactéries



hautement résistantes et difficiles à traiter, échec d'un précédent changement de prothèse en 2 temps chez un patient à haut risque infectieux, toxicomanie, immunodépression sévère) ou aux cas où l'on ne peut espérer une amélioration fonctionnelle après réimplantation<sup>65</sup>. Les solutions proposées sont la résection ou la coaptation articulaire, l'arthrodèse ou l'amputation<sup>3</sup>.

En cas de contre-indication à la chirurgie, une antibiothérapie suppressive au long cours avec conservation de l'implant est possible. Cependant, ce traitement ne fait que contrôler les symptômes et le risque de rechute à l'arrêt des antibiotiques est important<sup>26</sup>. De plus, la possibilité de ce traitement palliatif est dictée par 2 impératifs : l'identification d'un germe sensible à une antibiothérapie active par voie orale et bien tolérée et une prothèse non descellée<sup>65</sup>.

La réussite du traitement repose sur l'élimination du biofilm et implique donc une prise en charge chirurgicale adaptée en plus d'une antibiothérapie systémique bien conduite. Le choix du type de procédure chirurgicale est le principal facteur déterminant le résultat du traitement<sup>113</sup>. Le 1<sup>er</sup> geste chirurgical doit, dans la mesure du possible, toujours précéder le traitement antibiotique pour permettre la réalisation de prélèvements afin d'affirmer le diagnostic et documenter l'infection.

## 5.2. Antibiothérapie

Le traitement des IOAP est délicat et nécessite une antibiothérapie optimale basée sur un diagnostic microbiologique rapide et sûr. Les principes généraux de l'antibiothérapie au cours des IOAP sont les suivants : la molécule utilisée doit être bactéricide et avoir une activité sur les germes impliqués, sur les bactéries isolées et celles en phase de croissance ralentie. Elle doit permettre l'obtention de concentrations plasmatiques élevées et avoir une bonne diffusion osseuse et dans le biofilm. L'antibiothérapie est prescrite à fortes doses et systématiquement débutée par une association de molécules. Enfin, elle doit être bien tolérée et présenter peu ou pas d'interactions médicamenteuses avec les éventuels traitements en cours du patient. Une surveillance clinique et biologique rapprochée est impérative. Il est également indispensable de déterminer la sensibilité de la ou les bactérie(s) responsable(s) de l'infection avant de débiter le traitement<sup>3</sup>.

L'antibiothérapie doit être débutée par voie intra-veineuse ; la durée de l'antibiothérapie parentérale est habituellement de 15 jours<sup>3</sup>. L'administration en perfusion continue (seringue électrique) des antibiotiques ayant une bactéricidie temps-dépendante (bétalactamines, vancomycine...) est très intéressante pour atteindre des concentrations osseuses plus élevées<sup>114</sup>. Ensuite, la voie orale peut être proposée à condition de disposer d'une molécule active sur la bactérie impliquée, ayant une biodisponibilité et une

diffusion osseuse satisfaisante et dont la tolérance digestive est bonne ; il faut aussi s'assurer de la compliance du patient et de l'absence d'interactions médicamenteuses diminuant la biodisponibilité du traitement envisagé. Si l'antibiothérapie parentérale doit être poursuivie, la pose d'un cathéter central ou d'une chambre implantable est nécessaire<sup>3</sup>.

L'antibiothérapie est débutée dès la réalisation des prélèvements, initialement de manière probabiliste puis adaptée aux résultats de l'antibiogramme. En France, la durée totale du traitement antibiotique est de 6 à 12 semaines ; au-delà, la prescription doit être argumentée<sup>3</sup>. La durée optimale du traitement des IOAP n'est pas bien définie (et la durée intraveineuse encore moins). En cas de synovectomie lavage avec conservation de l'implant, la durée recommandée est de 6 semaines ; il est inutile de prolonger l'antibiothérapie au-delà car la persistance de signes cliniques et/ou biologiques à ce terme doit conduire à la dépose du matériel. Lors du second temps d'un changement de prothèse, il est recommandé de poursuivre ou de reprendre une antibiothérapie en période post-opératoire jusqu'aux résultats de la culture (environ 15 jours) et de l'interrompre si la culture est négative et si la durée totale du traitement est de 6 semaines au moins<sup>3</sup>.

L'antibiothérapie consiste en une association de molécules. L'efficacité de la rifampicine sur les bactéries en phase stationnaire et productrices de biofilm en fait le partenaire incontournable des associations en cas d'IOAP à

Staphylocoques. De plus, elle satisfait aux exigences de l'antibiothérapie dans ce contexte. Les propriétés de la rifampicine ont été démontrées *in vitro*, *in vivo* et lors d'essais cliniques d'IOAP<sup>115 116 117</sup>. La rifampicine doit toujours être associée à une autre molécule pour prévenir l'apparition de résistance et pour les mêmes raisons ne devrait pas faire partie de schémas thérapeutiques probabilistes.

Les fluoroquinolones (FQ) sont les antibiotiques utilisés de préférence avec la rifampicine dans les IOAP à Staphylocoques. En effet, les FQ présentent une excellente biodisponibilité, un large spectre d'activité antimicrobienne et une bonne tolérance. La ciprofloxacine et l'ofloxacine ont été largement étudiées dans les IOA<sup>116 117 118</sup>. Par contre, peu d'études existent sur l'efficacité et la toxicité au long cours des nouvelles quinolones comme la levofloxacine et la moxifloxacine dans le traitement des IOAP<sup>119 120</sup>. Étant donné l'émergence des Staphylocoques résistants au FQ (notamment le SARM), de nouvelles combinaisons ont été étudiées. L'association avec du triméthoprime-sulfaméthoxazole, de la minocycline, de la doxycycline, de la clindamycine ou encore de l'acide fusidique dans la prise en charge des IOAP à Staphylocoque a été proposée en fonction du profil de résistance de la bactérie et du terrain du patient<sup>3</sup>. Une étude de 2007 a montré l'efficacité de la combinaison rifampicine-acide fusidique en cas d'IOAP précoces à Staphylocoque traitées par une synovectomie lavage et rétention de

l'implant<sup>121</sup>. De même, la clindamycine en association, de par son excellente diffusion osseuse, son activité sur le biofilm, sa biodisponibilité et sa tolérance, représente une alternative valide dans le traitement des IOAP<sup>122</sup>. S'il s'agit d'un SARM, les glycopeptides deviennent les partenaires de choix<sup>117</sup>.

Peu d'études sont disponibles sur le traitement des IOAP à bacilles à Gram négatif (BGN). Des études *in vitro* et sur modèle animal ont montré la supériorité de la ciprofloxacine sur les bêta-lactamines pour l'élimination des BGN dans le cas d'infection sur matériel<sup>123</sup>. L'utilisation de FQ après une chirurgie de débridement et conservation de l'implant pour une IOAP à BGN permettrait d'améliorer le pronostic<sup>124</sup>. Ainsi, les FQ apparaissent comme le partenaire idéal des associations dans la prise en charge des IOAP à BGN.

On trouve dans les recommandations de pratique clinique de la SPILF différents tableaux de propositions d'antibiotiques selon le germe en cause<sup>3</sup>.

Dans certaines situations, lorsqu'une bactérie multi-résistante (BMR) est impliquée, lorsque le patient présente des échecs microbiologiques multiples ou lorsque le patient développe une hypersensibilité à un traitement de première ligne, il peut être nécessaire de proposer une antibiothérapie "non conventionnelle", reposant sur des molécules qui n'ont pas l'autorisation de mise sur le marché (AMM) pour le traitement des IOA. Parmi ces molécules actives sur le biofilm, le linézolide, la daptomycine, et la tigécycline sont des

options intéressantes malgré leur coût élevé. L'efficacité de la daptomycine sur le biofilm a été prouvée *in vitro*<sup>125</sup>. Une étude récente a également montré les performances de la daptomycine à 6 et à 8 mg/kg dans le traitement des IOAP à staphylocoque en complément d'un changement de prothèse en 2 temps<sup>126</sup>. La daptomycine est, en outre, bien tolérée à des doses de 6 mg/kg ou plus et constitue donc une alternative intéressante<sup>127</sup>.

En raison de l'hétérogénéité des cas, les stratégies thérapeutiques ne peuvent être définies pour chaque patient. En effet, l'antibiothérapie doit être adaptée à la ou les bactérie(s) retrouvée(s) en culture, au choix de la procédure chirurgicale, à la gravité de l'infection (sepsis), aux formes pharmaceutiques possibles et au terrain du patient. Ainsi, l'avis d'un infectiologue est indispensable. En outre, les résultats de l'antibiogramme doivent être interprétés avec prudence ; les techniques standards (CMI) ne fournissant pas une réelle estimation de la concentration d'antibiotique requise pour traiter le biofilm. L'avenir du laboratoire en la matière passera probablement par le développement d'outils permettant d'étudier la sensibilité du biofilm *in vitro* (CMEB).

Enfin, la prise en charge du patient en cas d'IOAP doit être globale (prise en charge sociale, médico-psychologique, traitement de la douleur, rééducation).

La création des centres de référence inter-régionaux de prise en charge des IOA complexes, ayant des missions de coordination, d'expertise, de formation

et de recherche permettra sûrement d'optimiser la prise en charge des patients ayant une IOAP. Ces centres ont pour objectif également de renforcer la collaboration des acteurs impliqués dans le traitement de ces infections.

## **Partie 2 - TRAVAIL EXPERIMENTAL**

Les services d'Orthopédie du centre hospitalo-universitaire (CHU) de Grenoble gèrent un nombre important de patients nécessitant une pose de prothèses orthopédiques. Ils prennent également en charge les patients ayant une complication infectieuse de cette chirurgie, réalisée au CHU ou hors CHU. Le diagnostic étiologique des IOAP est essentiel à une bonne prise en charge médicale et chirurgicale de ces infections. La plupart des infections étant d'origine bactérienne, le rôle du laboratoire de Bactériologie est donc primordial. L'objectif de cette étude est d'évaluer la sensibilité d'une nouvelle stratégie diagnostique combinant une technique optimisée de culture et la technique de PCR pan-bactérienne, par rapport à une technique de culture traditionnelle.

Une étude prospective, monocentrique a ainsi été conduite au CHU de Grenoble, structure pourvue de 2 services spécialisés en chirurgie orthopédique et traumatologique réalisant des implantations primaires et des révisions de prothèse de hanche et de genou. Le protocole de l'étude a été revu par le médecin infectiologue responsable des IOA au CHU de Grenoble et approuvé par les 2 équipes de chirurgie orthopédique.



# **MATERIELS et METHODES**

## **Population étudiée**

De novembre 2012 à juin 2013, étaient inclus de manière prospective des patients pris en charge pour une reprise chirurgicale de leur prothèse de hanche ou de genou. Ces révisions étaient liées, soit à un descellement aseptique ou une usure mécanique, soit à une infection présumée de l'implant. Les interventions consistaient en un changement en 1 temps ou en 2 temps de la prothèse ou une simple synovectomie lavage avec à chaque fois réalisation de prélèvements bactériologiques multiples. Initialement limitée aux prothèses de hanche et de genou, l'étude a été étendue par la suite aux reprises de prothèse d'épaule et de matériel d'ostéosynthèse. Les patients étaient exclus si moins de 3 échantillons per-opératoires étaient envoyés au laboratoire de Bactériologie.

## **Définitions**

En accord avec les recommandations de pratique clinique de la SPILF<sup>3</sup>, le diagnostic d'IOAP était validé si au moins un des critères suivants étaient présents : présence d'une fistule au contact du matériel, ou présence de pus dans l'articulation ou au contact du matériel, ou culture positive du liquide de ponction articulaire préopératoire ou des prélèvements per-opératoires ;

sachant que pour les bactéries appartenant à la flore cutanée, au moins 3 prélèvements positifs à la même bactérie (même espèce et même antibiogramme) étaient nécessaires et pour les bactéries plus virulentes, 1 seul suffisait. Le descellement était considéré comme aseptique si aucun des critères précédents n'était retrouvé. Une antibiothérapie préalable était définie comme l'administration d'antibiotiques dans les 15 jours précédents l'intervention.

### **Echantillons cliniques**

Durant l'intervention, le liquide synovial et les biopsies tissulaires ou osseuses péri-prothétiques ayant un aspect inflammatoire étaient collectés pour une analyse bactériologique. Parmi les prélèvements solides, le chirurgien en choisissait 2 suspects d'infection (contact avec la prothèse, aspect macroscopique pathologique). Chacun de ces 2 prélèvements était ensuite coupé en 2 au bloc opératoire de manière stérile ; l'un des 2 morceaux était placé dans un flacon stérile classique tandis que l'autre partie était mise dans un poudrier à billes stérile (Tube DHX88, Labomoderne). Des kits de prélèvements contenant les flacons stériles classiques, les 2 tubes à billes stériles ainsi qu'un tube EDTA pour la cytologie du liquide articulaire étaient à disposition au bloc opératoire. Au total, au moins 7 prélèvements étaient adressés au laboratoire de Bactériologie, les 5 prélèvements habituellement recommandés et les 2 échantillons supplémentaires pour l'évaluation du

broyage. Ces prélèvements per-opératoires étaient ensuite envoyés le plus rapidement possible au laboratoire avec la fiche de renseignements cliniques standardisée du protocole IOAP (annexe 1) et traités par celui-ci idéalement dans les 4 heures. En période de garde du service de Bactériologie, seul le liquide articulaire était techniqué immédiatement ; les autres prélèvements étant congelés à -80°C et pris en charge le jour suivant.

### **Broyage des biopsies tissulaires et osseuses**

Dès réception au laboratoire, les 2 poudriers à billes stériles étaient techniqués de manière stérile, sous PSM. 1 mL d'eau qualité biologie moléculaire (Invitrogen corporation) était rajouté dans chacun des 2 flacons. Ces derniers étaient ensuite positionnés sur le disperseur Ultra-Turrax™ TD 300D (IKA, Germany) permettant le broyage mécanique des prélèvements durant 1 minute à 6000 RPM à l'aide des billes en inox présentes à l'intérieur des poudriers. Enfin, les homogénats (ou liquides de broyat) étaient ensemencés comme décrit ci-dessous puis congelés à -20°C dans l'attente de la PCR.

### **Méthode de référence : Culture conventionnelle**

A partir de tous les prélèvements per-opératoires y compris les prélèvements broyés, étaient ensemencés une gélose columbia au sang de mouton et une gélose chocolat polyvitex (BioMérieux, Marcy l'étoile, France) incubées sous 5% de CO<sub>2</sub> et un bouillon gélosé Schaedler (BioMérieux). Tous les milieux étaient incubés à 37°C. Les géloses étaient observées à 24 heures, 48 heures et

J5 et les bouillons quotidiennement. Ces derniers étaient systématiquement repiqués à J5, J14 et si un trouble apparaissait ; le repiquage était effectué sur 2 géloses au sang, l'une incubée sous 5% de CO<sub>2</sub> et l'autre mise en anaérobiose. Les cultures étaient donc conservées 14 jours avant d'être considérées comme stériles. Les bactéries provenant de colonies isolées étaient identifiées à l'aide des méthodes de diagnostic classiquement utilisées au laboratoire, à savoir galerie d'identification biochimique (galerie API®, BioMérieux) et/ou système Vitek® 2 (automate Vitek®, BioMérieux). Pour chaque patient, le résultat des cultures avec éventuellement le dénombrement des colonies était renseigné (annexe 2).

Pour les liquides articulaires, une cytologie (sauf si coagulés) avec le compte des leucocytes et la détermination du pourcentage de polynucléaires était réalisée ainsi qu'un examen direct après cyto centrifugation (Shandon 4 Cytospin®, Thermo Electron Corp., Saint-Herblain, France) et coloration de Gram. Un examen direct après coloration de Gram était également réalisé à partir de tous les prélèvements.

### **Technique de Biologie Moléculaire**

La PCR universelle était réalisée sur 2 ou 3 prélèvements par patient en fonction de la présence ou non de liquide synovial : les 2 prélèvements broyés et éventuellement le liquide synovial.

Les manipulations d'ADN et les préparations de mix de PCR étaient réalisées dans des pièces séparées avec du matériel de pipetage différent pour éviter la contamination des échantillons. Tous les équipements utilisés pour les étapes de pré-PCR étaient stériles (« DNA-free ») et traités par irradiation aux Ultraviolets.

L'extraction des acides nucléiques consistait en une extraction semi-automatisée à l'aide du kit EZ1 DNA tissue kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) utilisé selon les recommandations du fournisseur. Avant cette étape, le liquide articulaire devait être prétraité :

- Pour les liquides hémorragiques, une lyse des hématies était réalisée en mélangeant le prélèvement avec 5 volumes d'eau qualité biologique moléculaire (InvitroGene corporation) puis centrifugé 10 minutes à 7500 RPM. Le surnageant était ensuite éliminé pour enlever l'hème qui est un puissant inhibiteur de PCR et le culot était repris par 200 µL de tampon de lyse.
- Pour les liquides non hémorragiques, l'extraction était réalisée sur le culot de centrifugation (centrifugés 10 minutes à 7500 RPM) repris par 200 µL de tampon de lyse.

Pour les prélèvements broyés, 200 µL de tampon de lyse était ajouté à 200 µL de liquide de broyat dans un tube Sarstedt de 2 mL.

L'étape de digestion des prélèvements se poursuivait par l'ajout de 20 µL de protéinase K au mélange échantillon-tampon de lyse ; le tout était ensuite incubé 3 heures à 63°C puis 10 minutes à 95°C. Enfin, la purification et la récupération de l'ADN étaient réalisées à l'aide de l'automate BioRobot EZ1 (Qiagen, Courtaboeuf, France). Le volume d'élution était de 100 µl. L'ADN extrait était conservé à -80°C en attendant l'étape d'amplification.

Pour vérifier l'absence d'inhibiteur de PCR dans les prélèvements et tester l'efficacité de l'extraction de l'ADN, une réaction d'amplification du gène de la bêta-globine humaine a été effectuée pour l'ensemble des extraits d'ADN par PCR en temps-réel à l'aide du thermocycleur LightCycler 2.0 (Roche Molecular Diagnosis, Meylan, France) et du kit LightCycler FastStart DNA Master SYBR green I (Roche Applied Science, Meylan, France). Les amorces utilisées étaient celles décrites par Bauer<sup>128</sup> à savoir PCO<sub>4</sub> (CAACTTCATCCACGTTCCACC) et GH<sub>20</sub> (GAAGAGCCAAGGACAGGTAC). Un µL d'extrait d'ADN était ajouté au mix de PCR contenant 4,8 µL d'eau PCR grade (Roche, France), 1,2 µL de MgCl<sub>2</sub> à 25 mM, 1 µL de mélange LC FastStart DNA Master SYBR green et 1 µL de chaque amorce à 5 µM. Le mix de PCR seul servait de témoin négatif ; il n'y avait pas de témoin positif, les échantillons patients devant être positifs. De plus, la PCR bêta-globine renseigne de manière indirecte sur la quantité d'ADN total. Une trop grande quantité d'ADN inhibe la réaction de

PCR. En fonction de la quantité d'ADN, les échantillons étaient passés purs ou dilués au 1/10<sup>ème</sup> en PCR universelle.

Par la suite, une nouvelle réaction de PCR utilisant le thermocycleur SEE AMP™ (Seegene, Germany) était réalisée sur l'ADN extrait des prélèvements pour détecter la présence ou non d'ADN bactérien. Chaque mélange réactionnel contenait 5 µL de produit d'extraction des échantillons de patients pour un volume final de réaction de PCR de 50 µL (23 µL d'eau PCR grade (Roche, France), 2 µL de MgCl<sub>2</sub> à 25 mM, 5 µL de dNTPs à 2mM (Qiagen), 0,25 unités de Hot Start *Taq* DNA polymerase (Qiagen), 5 µL de tampon d'incubation à 15 mM et 5 µL de chaque amorce à 5 µM. Les amorces 91E et 13BS (respectivement TCAAAGGAATTGACGGGGGC et GCCCGGGAACGTATTCAC) permettaient l'amplification d'un fragment de 492 paires de bases du gène codant l'ADN ribosomal 16S. Le programme de la PCR était le suivant : 15 minutes d'incubation à 94°C pour l'activation de la *Taq* DNA polymerase et la dénaturation de l'ADN suivies de 35 cycles d'amplification comprenant pour chaque cycle 30 secondes à 94°C, 45 secondes à 58°C et 30 secondes à 72°C et enfin 10 minutes d'incubation à 72°C. Chaque run incluait un contrôle positif (ADN d'une souche bactérienne connue) et un contrôle négatif (contenant uniquement le mix de PCR).

Les produits de PCR étaient ensuite révélés, après migration des fragments amplifiés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1%, par fluorescence sous

ultraviolet suite à l'addition d'un intercalant d'ADN, le GelRed™ (Biotium). En cas de positivité, l'identification du germe était effectuée par séquençage de l'ADN amplifié. Dans l'attente du séquençage, les produits de PCR étaient purifiés et conservés à -80°C.

Le séquençage était précédé d'une nouvelle réaction de PCR dont le mélange réactionnel contenait 20 µL d'eau qualité biologie moléculaire (Roche, France), 2 µL de chaque amorce 91E et 13BS à 1,6 µM, 8 µL de DTCS Quick Start Master Mix (Beckman Coulter Inc.) et 5 ou 8 µL du produit de PCR primaire en fonction de la quantité d'ADN amplifiée (quantité déterminée à partir de l'électrophorèse en gel d'agarose). L'amplification était effectuée sur le thermocycleur iCycler® (Biorad, France) avec le programme suivant : 20 secondes à 96°C puis 20 secondes à 50°C et 4 minutes à 60°C pour 30 cycles d'amplification. Une fois la PCR de séquençage terminée, le produit de PCR était purifié et conservé à +4°C pendant au moins 3 heures.

Les amplicons correspondants étaient finalement séquencés sur l'automate CEQ 8000 Genetic Analysis system (Beckman Coulter Inc.) et comparés aux séquences répertoriées dans la base de données GenBank via l'outil bioinformatique BIBI (BioInformatics Bacterial Identification)<sup>129</sup>. Après réalisation de l'alignement des séquences et de l'arbre phylogénétique, le nom du genre et de l'espèce bactérienne est assigné sur la distance phylogénétique (distance la plus proche) entre la séquence analysée et les séquences déposées



dans les bases de données. Ceci correspond en général à un score  $\geq$  à 99% de similitude entre la séquence analysée et les séquences déposées.

# RESULTATS

## Population étudiée

De novembre 2012 à juin 2013, les prélèvements de 25 patients ont été reçus au laboratoire de Bactériologie ; 1 patient a été exclu de l'étude car il s'agissait d'une prise en charge chirurgicale pour une arthrite septique de cheville sans matériel. Au final, 24 patients ont été inclus dans l'étude ; 14 étaient porteurs d'une prothèse de genou, 8 une prothèse de hanche, 1 une prothèse d'épaule et 1 du matériel d'ostéosynthèse au niveau du tibia (plaque). Douze patients avaient un descellement aseptique ou une usure mécanique et 12 avaient une suspicion d'IOAP ou une IOAP avérée.

Dans le groupe « IOAP avérée ou suspectée », une majorité d'hommes, un âge médian plus élevé et un nombre plus important d'intervention sur prothèse de genou étaient constatés par rapport au groupe « descellement aseptique ». Les données démographiques et clinico-biologiques de ces patients sont détaillées dans le tableau 9.

En définitive, 191 prélèvements ont été analysés avec la méthode de référence, la culture classique ; parmi ces prélèvements, 48 ont fait l'objet d'un prétraitement par broyage mécanique avant leur mise en culture. Enfin,

une recherche bactérienne par PCR universelle a été réalisée sur 69 de ces échantillons.

**Tableau 9 : Caractéristiques des patients ayant une IOAP suspectée ou avérée**

Données	Nombres de patients ou valeur du paramètre (%)
Age (années)	74 (range 36 – 86)
Sexe	
Homme	8 (67)
Femme	4 (33)
Localisation de l'IOAP	
Hanche	3 (25)
Genou	9 (75)
Causes de l'arthroplastie primaire	
Arthrose	8 (67)
Fracture	3 (25)
Autres	1 (8)
Types d'infections	
Précoces (< 3 mois)	1 (8)
Retardées (3 mois à 2 ans)	2 (17)
Tardives (> 2 ans)	9 (75)
Présence d'une fistule	5 (42)
Paramètres biologiques préopératoires	
Leucocytes sanguins (> 11 G/l)	5/12 (42)
CRP (> 10 mg/l)	11/12 (92)
Leucocytes dans le liquide synovial (> 1700/mm <sup>3</sup> )	7/8 (87,5)
Proportion de PNN dans le liquide synovial (> 65%)	6/8 (75)
Antibiothérapie préalable (dans les 15 jours précédents l'intervention)	3 (25)

## Résultats de la culture

Parmi les 12 patients du groupe « septique », 8 étaient positifs en culture (66,7%). Cinq patients avaient une infection monomicrobienne (62,5%) : *S. aureus* (n=2), *E. coli* (n=1), anaérobies (n=2) avec *Peptoniphilus asaccharolyticus* et *Anaerococcus murdochii* ; l'infection était polymicrobienne dans 3 cas (37,5%). Pour tous les patients positifs en culture, l'IOAP était avérée car plus de 2 prélèvements étaient positifs à la même bactérie (même identification et même antibiogramme).

Globalement, sur les 95 prélèvements de ce groupe, la culture était positive dans 59 cas (62%).

Parmi les 4 patients dont les milieux de culture sont restés stériles, 3 étaient sous antibiotique au moment des prélèvements. Pour le dernier patient, le diagnostic d'IOAP était fortement suspecté devant un syndrome inflammatoire clinico-biologique, une scintigraphie aux PNN marqués en faveur d'une arthrite septique et ce, malgré des cultures négatives et l'absence d'antibiothérapie.

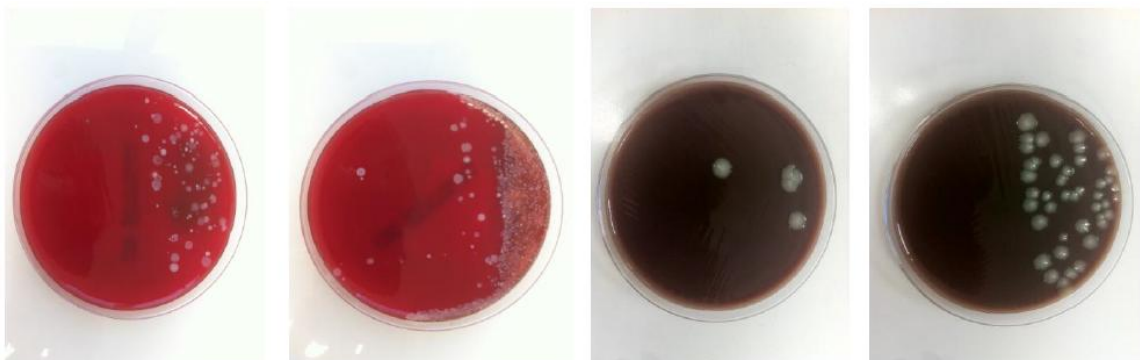
Dans le groupe « descellement aseptique ou usure mécanique », les cultures sont demeurées stériles pour 10 patients ; pour les 2 autres patients, 1 seul prélèvement était positif sur les 8, après enrichissement et à des germes de la flore cutanée (SCN) dans les 2 cas ; compte-tenu du contexte, le caractère contaminant des bactéries a été retenu. Ainsi, la spécificité de la culture se situe à 98%. Des bacilles à Gram positif ont été vus à l'examen direct des prélèvements d'un patient mais la culture et la PCR universelle ont été négatives ; Toujours en tenant compte du contexte, il a été conclu à un faux positif de l'examen direct.

La sensibilité globale de la culture conventionnelle pour les patients et pour les prélèvements était similaire, autour de 60% tandis que la spécificité était de 98%.

## Résultats de la culture sans et avec broyage mécanique

Pour évaluer l'apport du broyage mécanique, 48 prélèvements ont été ensemencés sur milieux de culture sans pré-traitement et 48 échantillons provenant du même site anatomique ont été homogénéisés à l'aide d'un broyeur à billes avant d'être mis en culture.

Dans le groupe « IOAP avérée ou suspectée », 15 prélèvements broyés sur 24 sont revenus positifs en culture (62,5%) ; par comparaison, les prélèvements non broyés correspondants ont été positifs en culture dans 14 cas (58%). De même, pour un échantillon, le prélèvement broyé a permis de mettre en évidence des SCV contrairement au prélèvement non broyé correspondant. Parmi les 14 prélèvements positifs sans et avec broyage, 7 avaient un nombre d'unités formant colonies (UFC) par gélose nettement supérieur après broyage mécanique (figure 12). De plus, dans 3 cas, les prélèvements pré-traités se sont positivés plus précocement en culture. Enfin, pour un patient, seuls les prélèvements broyés étaient positifs avant enrichissement permettant le diagnostic en 48 heures au lieu de 14 jours (tableau 10).



**Figure 12** : Résultats des cultures de SCN (SCV) à droite et *E. coli* à gauche respectivement sans et avec broyage.

**Tableau 10** : Comparaison des résultats de la culture microbiologique sans et avec broyage mécanique en termes de nombre de colonies et de délai de positivité des 12 patients du groupe « IOAP avérée ou suspectée ».

Patients	Nombre d'UFC par gélose		Délai de positivité	
	Prélèvements non broyés	Prélèvements broyés	Prélèvements non broyés	Prélèvements broyés
1	< 15 UFC	< 15 UFC	48 h	48 h
	< 15 UFC	15 à 50 UFC (SCV)	48 h	48 h
2	AE	< 15 UFC	J14	24 h
	AE	< 15 UFC	J14	24 h
3	15 à 50 UFC	> 50 UFC	48 h	48 h
	< 15 UFC	> 50 UFC	48 h	48 h
4	AE	AE	J5	J5
	Stérile	AE	/	J5
5	< 15 UFC	15 à 50 UFC	48 h	24 h
	< 15 UFC	15 à 50 UFC	24 h	24 h
6	AE	< 15 UFC	J5	24 h
	15 à 50 UFC	> 50 UFC	24 h	24 h
7	15 à 50 UFC	> 50 UFC	24 h	24 h
	15 à 50 UFC	15 à 50 UFC	24 h	24 h
8	< 15 UFC	< 15 UFC	24 h	24 h
	Stérile	Stérile	/	/
9	Stérile	Stérile	/	/
	Stérile	Stérile	/	/
10	Stérile	Stérile	/	/
	Stérile	Stérile	/	/
11	Stérile	Stérile	/	/
	Stérile	Stérile	/	/
12	Stérile	Stérile	/	/
	Stérile	Stérile	/	/

UFC : Unité formant colonie  
 SCV : « Small colony variants »  
 AE : Après enrichissement

Pour l'ensemble des prélèvements homogénéisés, une contamination, ne faisant aucun doute, n'a été relevée que dans 2 cas (*P. acnes*).

## Résultats de la PCR universelle

Parmi les 12 patients du groupe « IOAP avérée ou suspectée », 9 étaient positifs en PCR large spectre ; cette dernière était positive sur 16 des 34

prélèvements concernés (47%). Le séquençage était en échec dans 3 cas. La sensibilité globale du diagnostic d'IOAP augmentait à 69,5% quand la PCR était associée à la culture. Les résultats de la culture et de la PCR universelle sont résumés dans le tableau 11.

Pour les 4 patients de ce groupe dont les cultures sont demeurées stériles, 2 patients et leurs 6 prélèvements étaient positifs en PCR universelle ; ces 2 patients avaient reçu une antibiothérapie préalable. Le troisième patient sous antibiotique au moment des prélèvements était, quant à lui, négatif en PCR.

Les prélèvements des patients dont les cultures retrouvaient du *S. aureus* ont été passés en PCR universelle et en PCR spécifique *S. aureus*. Seulement 3 échantillons étaient positifs en PCR large spectre alors que 5 l'étaient en PCR spécifique ce qui confirme le manque de sensibilité de la PCR universelle, notamment pour les Staphylocoques. De même, pour les patients positifs en culture à des bactéries anaérobies, un seul des 3 prélèvements étaient positifs en PCR large spectre dans les 2 cas.

Des 3 patients ayant une infection polymicrobienne, un prélèvement uniquement (sur les 8) était positif (*S. epidermidis*) mettant en évidence les difficultés de la PCR universelle à détecter et à documenter ces infections sur le plan microbiologique.

Pour les 12 patients non suspects d'IOAP, la PCR universelle réalisée sur les prélèvements broyés et le liquide articulaire était négative.

**Tableau 11 : Résultats de la culture microbiologique et de la PCR universelle des 12 patients du groupe « IOAP avérée ou suspectée ».**

Patients	Contexte	Culture microbiologique		PCR universelle	
		Nombre de positifs/nombre total d'échantillons	Pathogènes	Nombre de positifs/nombre total d'échantillons	Pathogènes
1	Hanche	7/7 5/7	<i>S. epidermidis</i> <i>S. epidermidis</i>	0/2	Négative
2	Genou	7/7	<i>P. asaccharolyticus</i>	1/3	<i>P. asaccharolyticus</i>
3	Genou	7/7	<i>S. aureus</i>	2/3	Echec séquençage
4	Genou	7/9	<i>A. murdochii</i> <sup>1</sup>	2/3	<i>A. murdochii</i>
5	Genou	7/7	<i>E. coli</i>	3/3	<i>E. coli</i>
6	Genou	10/10	<i>S. aureus</i>	1/3	Echec séquençage
7	Hanche	7/11	<i>S. epidermidis</i> (x2)	0/2	Négative
8	Hanche	7/9 7/9	<i>S. epidermidis</i> <i>S. auricularis</i> <sup>1</sup>	1/3	<i>S. epidermidis</i>
9	Genou ATB <sup>2</sup>	0/7	Stérile	3/3	<i>S. parasanguinis</i>
10	Genou ATB <sup>2</sup>	0/7	Stérile	3/3	<i>S. gallolyticus</i>
11	Genou ATB <sup>2</sup>	0/11	Stérile	0/3	Négative
12	Genou	0/7	Stérile	0/3	Négative

<sup>1</sup>Après enrichissement

<sup>2</sup>Antibiothérapie préalable

Ainsi, la sensibilité de la PCR universelle était faible et inférieure à celle de la culture microbiologique (47%) ; par contre, la spécificité était excellente puisqu'il n'y a eu aucune contamination. De plus, la PCR pan-bactérienne a permis de rattraper le diagnostic pour 2 des 3 patients sous antibiothérapie.



## DISCUSSION

Il y a plus de 10 ans, des études suggéraient déjà que le diagnostic d'IOAP était un véritable challenge parce que les outils diagnostiques existants, notamment la culture microbiologique, n'étaient pas suffisamment performants<sup>88</sup>. Les résultats de notre étude montrent que la culture à partir de prélèvements solides broyés de manière mécanique n'est pas plus sensible que la méthode de culture sans broyage. En effet, la sensibilité de la culture microbiologique sans et avec broyage étaient respectivement de 58% et de 62,5%, comparables à celle retrouvée dans d'autres publications<sup>8</sup>. Par contre, ces résultats sont nettement inférieurs à ceux retrouvés par Roux *et al.* (83,7%)<sup>7</sup>. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats, notamment le faible nombre de patients suspects d'IOAP et la proportion de patients sous antibiotiques (25%). En revanche, notre étude rapporte une excellente spécificité de la culture après broyage mécanique avec seulement 2 cas de contamination, confirmant les données de Roux *et al.*<sup>7</sup>. Ce dernier point est d'autant plus intéressant que l'interprétation des résultats pour le diagnostic d'IOAP pose régulièrement des problèmes.

La principale limite de cette étude est le faible nombre de patients inclus et surtout le peu de cas suspects d'IOAP parmi ces patients (12 patients suspects

d'IOAP *versus* 92 patients infectés dans l'étude de Roux *et al.*). De plus, avec seulement 2 cas, la proportion d'infections retardées était relativement faible. Or, c'est dans ces situations d'infection chronique que l'on retrouve des SCV, des germes déficients et des bactéries piégées dans un biofilm à l'origine de résultats faussement négatifs de la culture. Ainsi, la préparation de l'échantillon par broyage mécanique semble particulièrement intéressante dans ce contexte et mérite donc une évaluation à plus grande échelle. L'intérêt de ce procédé doit également être apprécié dans d'autres situations d'IOA chroniques et plus généralement à chaque fois qu'un prélèvement solide est réalisé dans des circonstances d'infection chronique ou récurrente. Dans cette étude, la part significative de patients suspects d'IOAP sous antibiothérapie au moment des prélèvements (25% des cas) pourrait expliquer les résultats décevants de la culture microbiologique. L'absence de standardisation dans la réalisation des prélèvements et les conditions de transports pourraient également être responsables de ces résultats ; en effet, le chirurgien effectuant les prélèvements avait libre choix de la zone à prélever et certains échantillons broyés n'étaient peut-être pas faits au contact du matériel. Ainsi, pour un patient, tous les prélèvements étaient positifs à l'exception de 2 échantillons : celui broyé et celui non broyé correspondant. De plus, le délai entre le prélèvement et l'ensemencement pouvait dépasser les 2 heures et aucun milieu de transport n'a été utilisé. Ce travail, en outre, ne permettait pas la détection des mycobactéries et des champignons. Enfin, l'absence de « gold

standard » dans les critères de définition des IOAP constitue aussi une limite, en rendant difficile la comparaison des résultats entre études.

Nous avons cependant montré que le broyage permettait de libérer un grand nombre de microorganismes et donnait classiquement un nombre plus important d'UFC par gélose (par exemple, < 15 UFC sans pré-traitement *versus* > 50 UFC après broyage mécanique) ; pour les prélèvements positifs en culture sans et avec homogénéisation, le nombre de colonies était supérieur après broyage dans la moitié des cas. L'intérêt est double : premièrement, augmenter les capacités de détection des SCV et des infections polymicrobiennes et deuxièmement quantifier le nombre de bactéries dans le broyat qui pourrait aider à distinguer une infection d'une contamination ; les échantillons tissulaires pouvant être contaminés au moment des prélèvements ou durant leur prise en charge au laboratoire<sup>8</sup>. Dans notre étude, un cas de SCV a été mis en évidence grâce au broyage préalable du prélèvement.

Un autre intérêt du broyage mécanique est le délai de positivité rapide de la culture à partir des prélèvements broyés (par exemple, 24 heures *versus* 14 jours). Or, une détection rapide de l'infection et une identification précoce des bactéries en cause permettraient une adaptation rapide du traitement antibiotique et éviteraient donc les risques d'échec et les effets indésirables d'une antibiothérapie large spectre prolongée et inadaptée. En cas d'IOAP

retardées, les cultures se positivent souvent tardivement ; le broyage mécanique serait donc particulièrement utile dans ce type d'infection.

Par contre, contrairement à la technique de sonication, notre travail n'a pas montré de supériorité de la culture avec broyage mécanique en cas d'antibiothérapie préalable<sup>8</sup>. L'administration pré-opératoire d'antibiotiques peut affecter la sensibilité de la technique microbiologique ; en effet, 3 des 4 patients dont la culture était négative avaient été traités dans les 15 jours précédant l'intervention. Néanmoins, dans un cas, les cultures sont demeurées stériles malgré l'absence d'antibiothérapie systémique. D'autres raisons, expliquant la négativité des cultures, incluent : l'absence d'infection, la présence de microorganismes ne poussant pas dans les conditions de l'étude (milieux de cultures inappropriés, temps d'incubation insuffisants ou conditions de transport inadéquates) ou la libération locale d'antibiotiques par le ciment au moment de l'explantation<sup>94</sup>.

Il a été suggéré que certains cas de descellement aseptique étaient en réalité des IOAP<sup>102</sup>. Malgré l'utilisation du broyage mécanique, nous n'avons pas identifié de cas d'infection parmi les patients du groupe « descellement aseptique ou usure mécanique ». Ces résultats indiquent donc que, soit les bactéries ne sont pas impliquées dans la pathogénicité de ces descellements, soit la préparation du prélèvement par broyage mécanique n'est pas suffisant pour détecter les microorganismes responsables de ce phénomène. La

technique de sonication du matériel explanté a également montré ses limites dans ce contexte même si d'autres études sont nécessaires<sup>8</sup>.

Enfin, le broyage mécanique permettrait de gagner du temps technique et de faire des économies en évitant les tests inutiles sur les contaminants.

Ainsi, malgré l'utilisation de ce nouveau procédé, les performances de la méthode classique de culture sont encore insuffisantes et de nouvelles techniques indépendantes de cette dernière sont nécessaires. Cette étude montre une faible sensibilité de la PCR pan-bactérienne dans le diagnostic des IOAP (47,5%) mais une très bonne spécificité, en accord avec les données de la littérature<sup>4 9</sup>. La sensibilité diagnostic de ces infections augmente quand on associe la PCR universelle à la culture (69,5%), comme le rapporte également De Man *et al.*<sup>9</sup>. L'étude a confirmé les limites de cette PCR pour la détection des infections polymicrobiennes et de certaines espèces bactériennes ; de même, la sensibilité de la PCR spécifique *S. aureus* était supérieure à celle de la PCR « large spectre ». Par contre, la technique moléculaire a confirmé son intérêt chez les patients sous antibiotiques les jours précédant l'intervention ou au moment des prélèvements et a donc toute sa place dans cette circonstance ; en effet, elle a permis le diagnostic de 2 patients sur les 3 sous antibiothérapie. Cependant, le manque de sensibilité pour les prélèvements ostéo-articulaires, le coût et la disponibilité seulement en laboratoires spécialisés justifient l'indication de la PCR pan-bactérienne uniquement en

complément de la culture, et non de manière systématique. De même, elle ne permet pas l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries impliquées dans l'infection, élément pourtant capital de la prise en charge des patients. La PCR universelle a donc un intérêt en cas de culture négative et de suspicion d'IOAP, en cas d'identification difficile de souches bactériennes, en cas d'infection à bactérie de croissance lente ou difficile et si le patient est sous antibiotiques. Elle pourrait être également utile, toujours en association avec la culture, pour faire un diagnostic rapide en cas d'infections chroniques ; la positivité de la culture étant souvent retardée dans ce contexte. Dans notre étude, les 2 cas d'IOAP à bactéries anaérobies ont été positifs en culture après enrichissement (J5 et J14) ; la PCR pan-bactérienne pourrait ainsi permettre un diagnostic plus précoce de ces infections à germes déficients.

Les données de la littérature concernant la sensibilité de la PCR universelle dans le diagnostic d'IOAP sont variables. Dans cette étude, le manque de sensibilité de cette technique pourrait être lié au taux important d'infections polymicrobiennes (25%), de Staphylocoques et au protocole d'extraction et de PCR utilisés.

Ainsi, en l'absence de standardisation de la méthode de PCR 16S et de critères consensuels pour le diagnostic d'IOAP, il était nécessaire d'évaluer l'apport de notre PCR « large spectre » dans notre laboratoire, avec nos pratiques cliniques et nos patients. Néanmoins, d'autres études sont requises

pour définir la stratégie diagnostique (réalisation systématique de la PCR universelle en première intention ? après 48h de culture restée stérile ?) et la population de patients pour laquelle l'approche moléculaire peut avoir un bénéfice pour affirmer ou exclure une IOAP.

En conclusion, le broyage mécanique des prélèvements per-opératoires solides est une technique simple et réalisable dans tous les laboratoires de Bactériologie. Notre étude n'a pas permis de montrer la supériorité de la technique de culture classique avec broyage préalable des échantillons ; néanmoins, au vu des recommandations des sociétés savantes concernant le broyage, au vu également de la physiopathologie des IOAP et des limites des techniques actuelles dans le diagnostic microbiologiques de ces infections, le broyage mécanique, associé en outre à de faibles taux de contamination, apparaît comme une technique prometteuse et justifie des études supplémentaires. L'utilisation de poudriers à billes pourrait, par exemple, devenir systématique en cas de prise en charge chirurgicale d'IOA chroniques. Ayant un coût non négligeable, une étude évaluant les bénéfices en termes diagnostique et les économies engendrées par cette technique serait pertinente. Une autre technique, faisant l'objet de nombreuses études, pourrait permettre d'augmenter la sensibilité de la culture classique et ainsi améliorer le diagnostic des IOAP ; il s'agit de la technique de sonication des prothèses explantées<sup>8 90</sup>.

La PCR pan-bactérienne doit s'envisager en complément de la méthode de culture conventionnelle, notamment en cas d'antibiothérapie préalable et de suspicion d'infection à germe de croissance fastidieuse. Cette PCR pourrait, par exemple, être réalisée de manière systématique à 48 ou 72 heures de cultures demeurant stériles, si la suspicion d'IOAP est forte. Néanmoins, ses limites imposent le développement d'autres techniques moléculaires ; ainsi, les PCR multiplex en temps-réel ou les techniques rapides de biologie moléculaire (par exemple, PCR par le système GeneXpert) sont probablement l'avenir du diagnostic moléculaire des IOAP et nécessitent des études complémentaires. De même, de nouvelles approches moléculaires, comme les puces à ADN, doivent faire l'objet d'une évaluation dans ce contexte.

Malgré le développement de nouveaux outils, l'approche diagnostique se doit d'être toujours multidisciplinaire incluant les données cliniques, radiologiques, microbiologiques et anatomopathologiques.



THESE SOUTENUE PAR : Guillaume TEISSIER

**TITRE : "Apport du broyage mécanique des prélèvements per-opératoires et de la PCR pan-bactérienne dans le diagnostic des infections de prothèse articulaire de hanche et de genou"**

## **CONCLUSION**

Les infections de prothèse articulaire de hanche et de genou sont à l'origine de difficultés diagnostiques et thérapeutiques, nécessitant une approche multidisciplinaire.

Les examens bactériologiques permettent, d'une part, d'établir le diagnostic de certitude des infections ostéo-articulaires sur prothèse (IOAP) par l'isolement et l'identification de la ou les bactéries en cause et, d'autre part, de mettre en œuvre un traitement efficace et adapté par l'étude de la sensibilité aux antibiotiques. Un diagnostic microbiologique rapide et fiable est ainsi indispensable pour la réussite de la prise en charge thérapeutique de ces pathologies lourdes et coûteuses. Or, les outils diagnostiques actuels, basés sur la culture classique, manquent de sensibilité, de spécificité et sont associés à un temps de manipulation relativement long et à des délais de rendu prolongés. Le broyage des prélèvements solides, recommandé par les sociétés savantes, peut permettre d'améliorer le diagnostic d'IOAP en libérant les bactéries enchâssées dans le biofilm ; néanmoins, la méthode conventionnelle de broyage par technique manuelle est associée à un risque important de contamination.

Notre étude avait pour objectif d'évaluer les performances de la culture précédée d'un pré-traitement de l'échantillon par broyage mécanique et de déterminer la place de la PCR universelle dans le diagnostic des IOAP. Ce travail n'a pas montré de supériorité, en termes de diagnostic, de la culture avec broyage mécanique ; cependant, le très faible taux de contamination, le délai de positivité rapide et la capacité à détecter les SCV, confirmant le peu de données existantes, en font une technique prometteuse pour la documentation microbiologique de ces infections. L'intérêt de la PCR universelle, en cas d'antibiothérapie préalable, a été confirmé par notre étude ; par contre, du fait de sa faible sensibilité globale, l'approche moléculaire ne doit s'envisager qu'en complément de la culture, notamment lorsque celle-ci est négative et que la suspicion d'IOAP est forte.

D'autres études, à plus grande échelle, sont nécessaires pour confirmer l'apport du broyage mécanique ainsi que son impact médico-économique. Cette technique mérite, de plus, d'être évaluée dans d'autres situations d'infections liées à un biofilm. D'autres technologies, en cours d'évaluation, comme la sonication des prothèses explantées, pourraient encore faire progresser le diagnostic des IOA à l'avenir.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER  
Grenoble, le 2-09-13

LE DOYEN

J.P. ROMANET



LE PRESIDENT DE LA THESE

PROFESSEUR D. SARAGAGLIA

A large, stylized handwritten signature in black ink, corresponding to the name D. Saragaglia.

# Annexe 1 : Fiche de renseignements cliniques standardisée du protocole IOAP

## Prélèvements per-opératoires à visée microbiologique en cas de suspicion d'infection (IOA) sur prothèse de Hanche ou de Genou

**Identification patient (étiquette)**

**Informations patient**

- **Préciser le contexte** : Suspicion d'IOA sur prothèse orthopédique :  
 PTH  PTG   
 Précoce (<1 mois)  Retardée (entre le 2<sup>e</sup> et 6<sup>e</sup> mois)  Tardive (> 6 mois)
- **ATCD d'IOA** : oui  non
- **Antibiothérapie** (durant le mois précédant l'intervention) : oui  non
- **Antibioprophylaxie** (per-opératoire) : oui  non

**Identification prescripteur : service, opérateur**

**Prélèvements**

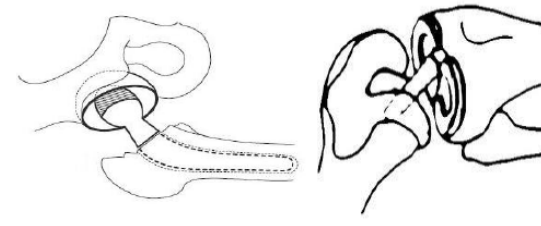
• **Date et heure des prélèvements** :

• **Nature et localisation** :

1.
2.
3.
4.
5.

Tube EDTA pour cytologie du liquide articulaire

Prélèvements conditionnés en tubes **DHX88**



**Faire les 5 prélèvements per-opératoires recommandés**

⇓

**Des 5 prélèvements :**

- Prendre les 2 prélèvements (osseux/tissulaires) les plus suspects et les couper en 2 pour avoir 4 échantillons à analyser de façon comparative.
- Pour le liquide articulaire, mettre une partie du liquide dans un tube EDTA pour la cytologie et une partie dans un pot à bouchon rouge classiques pour culture + PCR.

⇓

**8 échantillons sont donc envoyés au laboratoire :**

- 2 échantillons sont mis directement dans les tubes **DHX88** à billes (biopsies de taille ≤ 1 cm<sup>3</sup>).
- 5 échantillons sont mis dans les pots à bouchon rouge classiques.
- 1 tube **EDTA** pour la cytologie du liquide articulaire

## Annexe 2 : Fiche de suivi des résultats de la culture microbiologique

Nom patient (étiquette):	ensemencé par:				le:
	Milieux ensemencés	Lecture_J1 le : par :	Lecture_J2 le : par :	Lecture_J5 le : par :	
Liquide articulaire	Gélose sang COS CO <sub>2</sub>				
	Gélose chocolat CO <sub>2</sub>				
	Bouillon Schaedler				
Prélèvement dédoublé n°1 (pot à bouchon rouge)	Gélose sang COS CO <sub>2</sub>				
	Gélose chocolat CO <sub>2</sub>				
	Bouillon Schaedler				
Prélèvement broyé correspondant (tubes à billes)	Gélose sang COS CO <sub>2</sub>				
	Gélose chocolat CO <sub>2</sub>				
	Bouillon Schaedler				
Prélèvement dédoublé n°2 (pot à bouchon rouge)	Gélose sang COS CO <sub>2</sub>				
	Gélose chocolat CO <sub>2</sub>				
	Bouillon Schaedler				
Prélèvement broyé correspondant (tubes à billes)	Gélose sang COS CO <sub>2</sub>				
	Gélose chocolat CO <sub>2</sub>				
	Bouillon Schaedler				

Pour les géloses sang et chocolat : noter le nombre de colonies 0 à 15 colonies : mettre 1 + (+) et le nombre exact de colonies  
15 à 50 colonies : mettre 2 + (++)  
> 50 colonies : mettre 3 + (+++)

noter les différents types de colonies et les résultats de l'identification

Pour le bouillon schaedler : à J5 si bactéries sur GS et/ou choc ou dès que trouble si absence de bactéries, faire un examen direct et repiquer sur les milieux appropriés → noter le résultat de l'examen direct et de la culture,

### Annexe 3 : Tableau récapitulatif des résultats des patients inclus dans le protocole IOAP

patient	Articulation	Contexte	Prélevements	PCR 16S labo	PCR16S 91E-138S	Séquençage	PCR spécifique	β-globuline	Gram	Cyto	Culture	
1	Hanche	Descellement aseptique Luxation itérative	Liquide synovial	negative	negative			pur	AB Coagulé		Stérile	
			1bis - DHX synovial	negative				pur	QQBGP		Stérile	
			4 - arrière fond de cotyle	negative					TR BGP			Stérile
			4 - DHX arrière fond de cotyle	negative					pur?	AB		Stérile
			5 - toit du cotyle	negative					TR BGP			Stérile
2	Genou	Descellement aseptique Prélevements systématisés	Liquide synovial		negative			pur	AB 1000 Leucos, 90% PNN		Stérile	
			1 - DHX Cul de sac synovial		negative			dilué	AB		Stérile	
			2 - DHX cul de sac synovial tibia		negative			pur	AB		Stérile	
3	Epaule	Descellement aseptique	Liquide synovial		negative			pur	AB rares leucos		Stérile	
			2 - DHX Biopsie épaule		negative			pur	AB		Stérile	
			3 - DHX épaule droite		negative			pur	AB		Stérile	
4	Genou	Bactériémie à E.coli (pt de départ urinaire) Arthrite septique tardive (pose en 2005) contamination : hématoène	Liquide synovial		positive	<b>E. coli</b>		pur?	TR BGN > 50000 leucos; 100% PNN		E. coli	
			1 - DHX Cul de sac quadrifolial 2 - DHX tissu ligament		positive	<b>E. coli</b>		pur?	AB			E. coli
5	Hanche	Descellement aseptique, hyperalgique	Liquide synovial		negative			pur	AB non faite, hémorragique		Stérile	
			3 - DHX capsule		negative			pur	AB		Stérile	
			5 - DHX arrière du cotyle		negative			pur	AB		Stérile	
			4 - DHX tissu contact cotyle		negative			pur	AB hémorragique		Stérile	
			5 - DHX tissu contact cotyle		negative			pur	AB		Stérile	
7	Genou	Arthrite chronique Synovectomie	Liquide synovial		negative			pur	AB > 10 000 leucos, 90% PNN		Peptoniphilus asaccharolyticus	
			2 - DHX cul de sac rotulien		negative			pur	AB		Peptoniphilus asaccharolyticus	
			1 - DHX cul de sac sous - quadrifolial		positive	en cours		dilué	AB		Peptoniphilus asaccharolyticus	
			4 - DHX Fibrose autour matériel		negative			pur	RCCP		Stérile	
			6 - DHX Os autour prothèse		negative			dilué	AB		Staphylococcus epidermidis	
			Liquide synovial		negative			pur?	AB Coagulé		Staphylococcus aureus	
8	Femur	Pseudarthrose fémur droit après multiples ostéosynthèse	3 - DHX os tibia		negative			pur	AB		Staphylococcus aureus	
			4 - DHX Synoviale		positive	echec séquençage	<b>S. aureus + Ct = 36,26</b>	pur?	AB		Staphylococcus aureus	
			Liquide synovial		negative			pur	AB non faite		Stérile	
			4 - DHX Echarcure inter-condylienne		negative			pur	AB		Stérile	
10	Genou	Descellement aseptique Prélevements systématisés	5 - DHX Synoviale		negative			pur	AB		Stérile	
			Liquide synovial		negative			pur	AB 80 leuco, 90% PNN		Stérile	
			1 - DHX synoviale		negative			dilué	AB		Stérile	
			2 - DHX synoviale		negative			pur	AB		Stérile	
			Liquide synovial		positive	en cours		pur	AB 500 leuco, 95% PNN		Stérile	
12	cheville	Fracture septique	1 - DHX prélevement profond pertuis		positive faible	en cours		dilué	AB		Stérile	
			2 - DHX prélevement profond pertuis		positive faible	echec séquençage		pur	AB		Stérile	
13	Genou	Prélevements systématisés	Liquide synovial		negative			pur	AB 1000 leuco, 80% PNN		Stérile	
			1 - DHX synoviale		negative			pur	AB		Stérile	
			2 - DHX synoviale		negative			pur	AB		Stérile	

14	Plaque tibial	Pseudarthrose	2 - DHX sous la plaque 4 - DHX contact plaque	negative negative			pur pur	AB AB			Stérile Stérile
15	Genou	Suspicion de sepsis chronique	Liquide synovial 4 - DHX synoviale fémorale 5 - DHX synoviale tibiale	negative negative negative			pur pur pur	AB Coagulé AB AB			Stérile Stérile Stérile
16	Hanche	Prélèvements systématiques	Liquide synovial 2 - DHX capsule postérieure 4 - DHX fond du cotyle	negative negative negative			pur pur pur	AB 200 leuco, 60% PNN AB AB			Stérile Stérile Stérile
17	Genou	Sepsis sur PTG	Liquide synovial 1 - DHX fût tibial 2 - DHX interface os-dément	positive negative positive	en cours		pur dilué pur	AB > 10000 leuco, 90% PNN AB AB			Anaerococcus murdochii Anaerococcus murdochii Anaerococcus murdochii
18	Genou	Suspicion de sepsis Ep articulaire avec sd infl	Liquide synovial 2 - DHX synoviale antérieure 3 - DHX matériel intra-articulaire	negative negative negative			pur pur pur	AB 4000 leuco, 90% PNN AB AB			Stérile Stérile Stérile
19	Genou	Bactériémie à Strepto galloyticus arthrite septique ATB pré-op	Liquide synovial 2 - DHX tissu synovial 3 - DHX tissu osseux	positive positive positive faible	S. galloyticus S. galloyticus en cours		pur pur pur	AB > 10000 leuco, 100% PNN AB AB			Stérile Stérile Stérile
20	Genou	Prélèvements systématiques	Liquide synovial 3 - DHX fausse membrane sous quille 4 - DHX synoviale fémorale	negative negative negative			pur pur pur	AB < 100 leuco AB AB			Stérile Stérile Stérile
21	Genou	Arthrite septique	Liquide synovial 2 - DHX synoviale 3 - DHX muscle quadriceps	positive faible positive faible negative	echec séquençage S. aureus + Ct=33,35 echec séquençage S. aureus + Ct = 33,53 S. aureus negative		pur pur? pur	TR CGP Coagulé QCGP AB			Staphylococcus aureus Staphylococcus aureus Staphylococcus aureus
22	Hanche	Descollement septique Dépote de PTH (remplacée/ spacer)	Liquide synovial 2 - DHX tissu interposition os/prothèse 3 - DHX tissu contact fémur	negative positive negative	S. epidermidis		pur pur pur	AB Coagulé AB AB			Staphylococcus aureus + staphylococcus auricularis staphylococcus epidermidis + staphylococcus a
23	Hanche	Descollement septique Dépote de PTH (remplacée/ spacer)	3 - DHX péri-prothétique 4 - DHX autour tige fémorale	negative negative			pur pur	AB AB			staphylococcus epidermidis 2 types de staphylococcus epidermidis
24	Genou	arthrite septique tardive ATB pré-op	Liquide synovial 1 - DHX mb synoviale 2 - DHX mb synoviale	positive positive positive	S. parasang unis ? S. pneumo negative S. pneumo negative		? pur pur	AB Non réalisé AB AB			Stérile Stérile Stérile
25	Hanche	Descollement aseptique Prélèvements systématiques	Liquide synovial 3 - DHX Capsule 7 - DHX Fond du cotyle	negative negative negative			pur pur pur	AB coagulé AB AB			Stérile Stérile Stérile

1. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med* 2004;351(16):1645–54.
2. Kurtz S, Ong K, Lau E, Mowat F, Halpern M. Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. *J Bone Joint Surg Am* 2007;89(4):780–5.
3. Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF). Recommandations de pratique clinique Infections ostéo-articulaires sur matériel (prothèse, implant, ostéo-synthèse)(texte long). *Médecine Mal Infect* 2009;
4. Fihman V, Hannouche D, Bousson V, et al. Improved diagnosis specificity in bone and joint infections using molecular techniques. *J Infect* 2007;55(6):510–7.
5. Malekzadeh D, Osmon DR, Lahr BD, Hanssen AD, Berbari EF. Prior use of antimicrobial therapy is a risk factor for culture-negative prosthetic joint infection. *Clin Orthop* 2010;468(8):2039–45.
6. Corvec S, Portillo ME, Pasticci BM, Borens O, Trampuz A. Epidemiology and new developments in the diagnosis of prosthetic joint infection. *Int J Artif Organs* 2012;35(10):923–34.
7. Roux A-L, Sivadon-Tardy V, Bauer T, et al. Diagnosis of prosthetic joint infection by beadmill processing of a periprosthetic specimen. *Clin Microbiol Infect* 2011;17(3):447–50.
8. Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, et al. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med* 2007;357(7):654–63.
9. De Man FHR, Graber P, Lüem M, Zimmerli W, Ochsner PE, Sendi P. Broad-range PCR in selected episodes of prosthetic joint infection. *Infection* 2009;37(3):292–4.
10. Dempsey KE, Riggio MP, Lennon A, et al. Identification of bacteria on the surface of clinically infected and non-infected prosthetic hip joints removed during revision arthroplasties by 16S rRNA gene sequencing and by microbiological culture. *Arthritis Res Ther* 2007 ;9(3):R46.
11. <http://www.atih.sante.fr/>.
12. Perennec-Olivier M, Jarno P. Surveillance des infections du site opératoire, France, 2011 [Internet]. 2012; Available from: <http://www.invs.sante.fr>
13. Eveillard M, Mertl P, Tramier B, Eb F. Effectiveness of gentamicin-impregnated cement in the prevention of deep wound infection after primary total knee arthroplasty. *Infect Control Hosp Epidemiol Off J Soc Hosp Epidemiol Am* 2003;24(10):778–80.
14. Eveillard M, Mertl P, Canarelli B, 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 2001;30(38):1868–75.
15. Debarge R, Nicolle MC, Pinaroli A, Ait Si Selmi T, Neyret P. [Surgical site infection after total knee arthroplasty: a monocenter analysis of 923 first-intention implantations]. *Rev Chir Orthopédique Réparatrice Appar Mot* 2007;93(6):582–7.
16. Dumaine V, Jeanne L, Paul G, et al. [Surveillance of operative site infections in an orthopedic and traumatology surgery department: an example of methodology]. *Rev Chir Orthopédique Réparatrice Appar Mot* 2007;93(1):30–6.
17. Lecuire F, Gontier D, Carrere J, Giordano N, Rubini J, Basso M. [Ten-year surveillance of nosocomial surgical site infections in an orthopedic surgery department]. *Rev Chir Orthopédique Réparatrice Appar Mot* 2003;89(6):479–86.
18. Lentino JR. Prosthetic Joint Infections: Bane of Orthopedists, Challenge for Infectious Disease Specialists. *Clin Infect Dis* 2003;36(9):1157–61.

19. Grammatico-Guillon L, Baron S, Gettner S, et al. Surveillance hospitalière des infections ostéo-articulaires en France : analyse des données médico-administratives, PMSI 2008. *Bull Epidémiologie Hebd* 2013;(4-5):39–44.
20. Klouche S, Sariali E, Mamoudy P. Total hip arthroplasty revision due to infection: a cost analysis approach. *Orthop Traumatol Surg Res OTSR* 2010;96(2):124–32.
21. Desplaces N, Carsenti H. Diagnostic microbiologique de l'infection sur prothèse articulaire. *Diagn L'infection Sur Prothèse Articul* 2002;2:39–46.
22. Peel TN, Cheng AC, Buising KL, Choong PFM. Microbiological aetiology, epidemiology, and clinical profile of prosthetic joint infections: are current antibiotic prophylaxis guidelines effective *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56(5):2386–91.
23. Sperling JW, Kozak TK, Hanssen AD, Cofield RH. Infection after shoulder arthroplasty. *Clin Orthop* 2001;(382):206–16.
24. 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* 1999;20(6):402–7.
25. Berbari EF, Hanssen AD, Duffy MC, et al. Risk factors for prosthetic joint infection: case-control study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 1998;27(5):1247–54.
26. Borens O, Nussbaumer F, Baalbaki R, Trampuz A. [Update on implant related infections in orthopaedic surgery. Diagnosis and treatment]. *Rev Médicale Suisse* 2009;5(230):2563–8.
27. Zimmerli W, Waldvogel FA, Vaudaux P, Nydegger UE. Pathogenesis of foreign body infection: description and characteristics of an animal model. *J Infect Dis* 1982;146(4):487–97.
28. Dunne WM Jr. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately *Clin Microbiol Rev* 2002;15(2):155–66.
29. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284(5418):1318–22.
30. Ader F, Bernard L. [Pathophysiology of infection on orthopedic biomaterials]. *Presse Médicale Paris Fr* 1983 2005;34(7):533–6.
31. Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* 2000;182(10):2675–9.
32. De Kievit TR, Iglewski BH. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun* 2000;68(9):4839–49.
33. Ghigo JM. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* 2001;412(6845):442–5.
34. Costerton JW. Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents* 1999;11(3-4):217–221; discussion 237–239.
35. Rhoads DD, Wolcott RD, Percival SL. Biofilms in wounds: management strategies. *J Wound Care* 2008;17(11):502–8.
36. Monroe D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLoS Biol* 2007;5(11):e307.
37. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol* 2009;11(7):1034–43.
38. Kodjikian L, Roques C, Campanac C, et al. [Staphylococcus epidermidis biofilms on intraocular lens surface: review of the literature]. *J Français Ophtalmol* 2005;28(2):224–30.



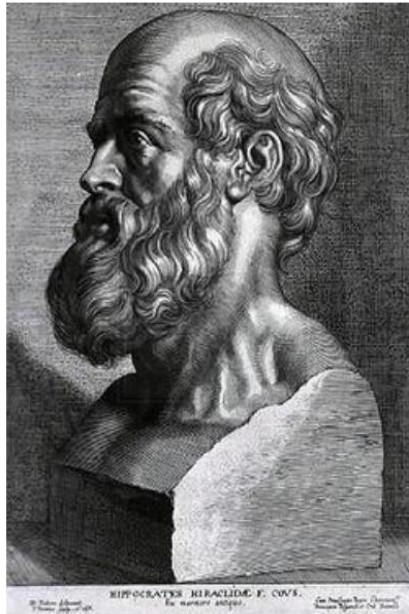
39. Donlan RM. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002;8(9):881–90.
40. Bernard L. Mécanismes physiopathologiques des infections sur matériel orthopédique. *Rev Rhum* 2006;73(4):327–31.
41. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 2002;56:187–209.
42. Lawrence JR, Korber DR, Hoyle BD, Costerton JW, Caldwell DE. Optical sectioning of microbial biofilms. *J Bacteriol* 1991;173(20):6558–67.
43. Costerton JW. The etiology and persistence of cryptic bacterial infections: a hypothesis. *Rev Infect Dis* 1984;6 Suppl 3:S608–616.
44. Olson ME, Ruseska I, Costerton JW. Colonization of n-butyl-2-cyanoacrylate tissue adhesive by *Staphylococcus epidermidis*. *J Biomed Mater Res* 1988;22(6):485–95.
45. Rani SA, Pitts B, Beyenal H, et al. Spatial patterns of DNA replication, protein synthesis, and oxygen concentration within bacterial biofilms reveal diverse physiological states. *J Bacteriol* 2007;189(11):4223–33.
46. Trampuz A, Osmon DR, Hanssen AD, Steckelberg JM, Patel R. Molecular and antibiofilm approaches to prosthetic joint infection. *Clin Orthop* 2003;(414):69–88.
47. Leid J. Bacterial Biofilms Resist Key Host Defenses. *Microbe* 2009;4(2):66–70.
48. Leid JG, Shirtliff ME, Costerton JW, Stoodley P. Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Infect Immun* 2002;70(11):6339–45.
49. Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 2010;35(4):322–32.
50. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001;358(9276):135–8.
51. Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Microbiol* 2007;5(1):48–56.
52. Landini P, Antoniani D, Burgess JG, Nijland R. Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010;86(3):813–23.
53. Ellington JK, Reilly SS, Ramp WK, Smeltzer MS, Kellam JF, Hudson MC. Mechanisms of *Staphylococcus aureus* invasion of cultured osteoblasts. *Microb Pathog* 1999;26(6):317–23.
54. Rasigade J. Biofilm and bacterial intracellular persistence in the pathophysiology of chronic bone and joint infections. *Lett Infect* 2012;27(3):110–5.
55. Reilly SS, Hudson MC, Kellam JF, Ramp WK. In vivo internalization of *Staphylococcus aureus* by embryonic chick osteoblasts. *Bone* 2000;26(1):63–70.
56. Valour F, Trouillet-Assant S, Rasigade J-P, et al. *Staphylococcus epidermidis* in orthopedic device infections: the role of bacterial internalization in human osteoblasts and biofilm formation. *PloS One* 2013;8(6):e67240.
57. Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, et al. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol* 2006;4(4):295–305.
58. Von Eiff C, Peters G, Becker K. The small colony variant (SCV) concept -- the role of staphylococcal SCVs in persistent infections. *Injury* 2006;37 Suppl 2:S26–33.
59. Vaudaux P, Kelley WL, Lew DP. *Staphylococcus aureus* small colony variants: difficult to diagnose and difficult to treat. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2006;43(8):968–70.

60. Sendi P, Rohrbach M, Graber P, Frei R, Ochsner PE, Zimmerli W. Staphylococcus aureus small colony variants in prosthetic joint infection. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2006;43(8):961–7.
61. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* 1999;37(6):1771–6.
62. Lew DP, Waldvogel FA. Osteomyelitis. *Lancet* 2004;364(9431):369–79.
63. Pea F. Penetration of antibacterials into bone: what do we really need to know for optimal prophylaxis and treatment of bone and joint infections *Clin Pharmacokinet* 2009;48(2):125–7.
64. Edmiston CE Jr, Goheen MP, Seabrook GR, et al. Impact of selective antimicrobial agents on staphylococcal adherence to biomedical devices. *Am J Surg* 2006;192(3):344–54.
65. Esposito S, Leone S. Prosthetic joint infections: microbiology, diagnosis, management and prevention. *Int J Antimicrob Agents* 2008;32(4):287–93.
66. Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, et al. Diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2013;56(1):e1–e25.
67. Waldvogel FA, Medoff G, Swartz MN. Osteomyelitis: A Review of Clinical Features, Therapeutic Considerations and Unusual Aspects. *N Engl J Med* 1970;282(4):198–206.
68. 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* 1996;78(4):512–23.
69. Segawa H, Tsukayama DT, Kyle RF, Becker DA, Gustilo RB. Infection after total knee arthroplasty. A retrospective study of the treatment of eighty-one infections. *J Bone Joint Surg Am* 1999;81(10):1434–45.
70. Zimmerli W, Ochsner PE. Management of infection associated with prosthetic joints. *Infection* 2003;31(2):99–108.
71. Laffer RR, Graber P, Ochsner PE, Zimmerli W. Outcome of prosthetic knee-associated infection: evaluation of 40 consecutive episodes at a single centre. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 2006;12(5):433–9.
72. Giulieri SG, Graber P, Ochsner PE, Zimmerli W. Management of infection associated with total hip arthroplasty according to a treatment algorithm. *Infection* 2004;32(4):222–8.
73. Cyteval C, Bourdon A. Imaging orthopedic implant infections. *Diagn Interv Imaging* 2012;93(6):547–57.
74. Rabin DN, Smith C, Kubicka RA, et al. Problem prostheses: the radiologic evaluation of total joint replacement. *Radiogr Rev Publ Radiol Soc North Am Inc* 1987;7(6):1107–27.
75. Cyteval C, Hamm V, Sarrabère MP, Lopez FM, Maury P, Taourel P. Painful infection at the site of hip prosthesis: CT imaging. *Radiology* 2002;224(2):477–83.
76. Love C, Palestro CJ. Radionuclide imaging of infection. *J Nucl Med Technol* 2004;32(2):47–57; quiz 58–59.
77. Trampuz A, Zimmerli W. Prosthetic joint infections: update in diagnosis and treatment. *Swiss Med Wkly* 2005;135(17-18):243–51.
78. Berbari E, Mabry T, Tsaras G, et al. Inflammatory blood laboratory levels as markers of prosthetic joint infection: a systematic review and meta-analysis. *J Bone Joint Surg Am* 2010;92(11):2102–9.

79. Peel TN, Buising KL, Choong PFM. Prosthetic joint infection: challenges of diagnosis and treatment. *ANZ J Surg* 2011;81(1-2):32–9.
80. Bottner F, Wegner A, Winkelmann W, Becker K, Erren M, Götze C. Interleukin-6, procalcitonin and TNF-alpha: markers of peri-prosthetic infection following total joint replacement. *J Bone Joint Surg Br* 2007;89(1):94–9.
81. Larsen LH, Lange J, Xu Y, Schönheyder HC. Optimizing culture methods for diagnosis of prosthetic joint infections: a summary of modifications and improvements reported since 1995. *J Med Microbiol* 2012;61(Pt 3):309–16.
82. Hughes JG, Vetter EA, Patel R, et al. Culture with BACTEC Peds Plus/F bottle compared with conventional methods for detection of bacteria in synovial fluid. *J Clin Microbiol* 2001;39(12):4468–71.
83. 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* 2004;117(8):556–62.
84. Ghanem E, Parvizi J, Burnett RSJ, et al. Cell count and differential of aspirated fluid in the diagnosis of infection at the site of total knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 2008;90(8):1637–43.
85. Parvizi J, Jacovides C, Adeli B, Jung KA, Hozack WJ, Mark B, Coventry Award: Synovial C-reactive Protein: A Prospective Evaluation of a Molecular Marker for Periprosthetic Knee Joint Infection. *Clin Orthop* 2012;470(1):54–60.
86. Parvizi J, McKenzie JC, Cashman JP. Diagnosis of periprosthetic joint infection using synovial C-reactive protein. *J Arthroplasty* 2012;27(8 Suppl):12–6.
87. Atkins BL, Athanasou N, Deeks JJ, et al. Prospective evaluation of criteria for microbiological diagnosis of prosthetic-joint infection at revision arthroplasty. The OSIRIS Collaborative Study Group. *J Clin Microbiol* 1998;36(10):2932–9.
88. Tunney MM, Patrick S, Gorman SP, et al. Improved detection of infection in hip replacements. A currently underestimated problem. *J Bone Joint Surg Br* 1998;80(4):568–72.
89. Holinka J, Bauer L, Hirschl AM, Graninger W, Windhager R, Presterl E. Sonication cultures of explanted components as an add-on test to routinely conducted microbiological diagnostics improve pathogen detection. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc* 2011;29(4):617–22.
90. 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* 2010;48(4):1208–14.
91. Diagnostic microbiologique des infections osseuses et articulaires. In: REMIC : Société Française de Microbiologie. p. 165 – 170.
92. 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* 2008;47(11):1403–9.
93. Johnson AJ, Zywiell MG, Stroh DA, Marker DR, Mont MA. Should gram stains have a role in diagnosing hip arthroplasty infections? *Clin Orthop* 2010;468(9):2387–91.
94. Berbari EF, Marculescu C, Sia I, et al. Culture-negative prosthetic joint infection. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2007;45(9):1113–9.
95. Dupont C, Sivadon-Tardy V, Bille E, et al. Identification of clinical coagulase-negative staphylococci, isolated in microbiology laboratories, by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry and two automated systems. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 2010;16(7):998–1004.

96. Günthard H, Hany A, Turina M, Wüst J. *Propionibacterium acnes* as a cause of aggressive aortic valve endocarditis and importance of tissue grinding: case report and review. *J Clin Microbiol* 1994;32(12):3043–5.
97. [http://www.labomoderne.com/documents/mde/labomoderne2012\\_p0849.pdf](http://www.labomoderne.com/documents/mde/labomoderne2012_p0849.pdf).
98. Pin C, Rolfe MD, Muñoz-Cuevas M, et al. Network analysis of the transcriptional pattern of young and old cells of *Escherichia coli* during lag phase. *BMC Syst Biol* 2009;3:108.
99. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnol Read Mass* 1992;24:17–27.
100. Lévy P-Y, Fenollar F. The role of molecular diagnostics in implant-associated bone and joint infection. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 2012;18(12):1168–75.
101. 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* 2006;44(3):1018–28.
102. Tunney MM, Patrick S, Curran MD, et al. Detection of Prosthetic Hip Infection at Revision Arthroplasty by Immunofluorescence Microscopy and PCR Amplification of the Bacterial 16S rRNA Gene. *J Clin Microbiol* 1999;37(10):3281–90.
103. Panousis K, Grigoris P, Butcher I, Rana B, Reilly JH, Hamblen DL. Poor predictive value of broad-range PCR for the detection of arthroplasty infection in 92 cases. *Acta Orthop* 2005;76(3):341–6.
104. Vandercam B, Jeumont S, Cornu O, et al. Amplification-based DNA analysis in the diagnosis of prosthetic joint infection. *J Mol Diagn JMD* 2008;10(6):537–43.
105. Marín M, Garcia-Lechuz JM, Alonso P, et al. Role of universal 16S rRNA gene PCR and sequencing in diagnosis of prosthetic joint infection. *J Clin Microbiol* 2012;50(3):583–9.
106. Gomez E, Cazanave C, Cunningham SA, et al. Prosthetic joint infection diagnosis using broad-range PCR of biofilms dislodged from knee and hip arthroplasty surfaces using sonication. *J Clin Microbiol* 2012;50(11):3501–8.
107. Titécat M, Loïez C, Senneville E, et al. Evaluation of rapid *mecA* gene detection versus standard culture in staphylococcal chronic prosthetic joint infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012;73(4):318–21.
108. Bradbury T, Fehring TK, Taunton M, et al. The fate of acute methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* periprosthetic knee infections treated by open debridement and retention of components. *J Arthroplasty* 2009;24(6 Suppl):101–4.
109. Hsieh P-H, Lee MS, Hsu K-Y, Chang Y-H, Shih H-N, Ueng SW. Gram-negative prosthetic joint infections: risk factors and outcome of treatment. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2009;49(7):1036–43.
110. Aboltins CA, Dowsey MM, Buising KL, et al. Gram-negative prosthetic joint infection treated with debridement, prosthesis retention and antibiotic regimens including a fluoroquinolone. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 2011;17(6):862–7.
111. Waldman BJ, Hostin E, Mont MA, Hungerford DS. Infected total knee arthroplasty treated by arthroscopic irrigation and débridement. *J Arthroplasty* 2000;15(4):430–6.
112. Sia IG, Berbari EF, Karchmer AW. Prosthetic joint infections. *Infect Dis Clin North Am* 2005;19(4):885–914.
113. Berbari EF, Osmon DR, Duffy MCT, et al. Outcome of Prosthetic Joint Infection in Patients with Rheumatoid Arthritis: The Impact of Medical and Surgical Therapy in 200 Episodes. *Clin Infect Dis* 2006;42(2):216–23.

114. Zeller V, Desplaces N. Antibiotherapy of bone and joint infections. *Rev Rhum* 2006;73:183–90.
115. Widmer AF, Frei R, Rajacic Z, Zimmerli W. Correlation between in vivo and in vitro efficacy of antimicrobial agents against foreign body infections. *J Infect Dis* 1990;162(1):96–102.
116. Drancourt M, Stein A, Argenson JN, Zannier A, Curvale G, Raoult D. Oral rifampin plus ofloxacin for treatment of Staphylococcus-infected orthopedic implants. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37(6):1214–8.
117. Zimmerli W, Widmer AF, Blatter M, Frei R, Ochsner PE. Role of rifampin for treatment of orthopedic implant-related staphylococcal infections: a randomized controlled trial. Foreign-Body Infection (FBI) Study Group. *JAMA J Am Med Assoc* 1998;279(19):1537–41.
118. Stengel D, Bauwens K, Sehouli J, Ekkernkamp A, Porzsolt F. Systematic review and meta-analysis of antibiotic therapy for bone and joint infections. *Lancet Infect Dis* 2001;1(3):175–88.
119. Barberán J, Aguilar L, Carroquino G, et al. Conservative treatment of staphylococcal prosthetic joint infections in elderly patients. *Am J Med* 2006;119(11):993.e7–10.
120. Senneville E, Poissy J, Legout L, et al. Safety of prolonged high-dose levofloxacin therapy for bone infections. *J Chemother Florence Italy* 2007;19(6):688–93.
121. Aboltins CA, Page MA, Buising KL, et al. Treatment of staphylococcal prosthetic joint infections with debridement, prosthesis retention and oral rifampicin and fusidic acid. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 2007;13(6):586–91.
122. Zeller V, Dzeing-Ella A, Kitzis M-D, Ziza J-M, Mamoudy P, Desplaces N. Continuous Clindamycin Infusion, an Innovative Approach to Treating Bone and Joint Infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(1):88–92.
123. Widmer AF, Wiestner A, Frei R, Zimmerli W. Killing of nongrowing and adherent Escherichia coli determines drug efficacy in device-related infections. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35(4):741–6.
124. Martinez-Pastor JC, Munoz-Mahamud E, Vilchez F, et al. Outcome of Acute Prosthetic Joint Infections Due to Gram-Negative Bacilli Treated with Open Debridement and Retention of the Prosthesis. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(11):4772–7.
125. Smith K, Perez A, Ramage G, Gemmell CG, Lang S. Comparison of biofilm-associated cell survival following in vitro exposure of methicillin-resistant Staphylococcus aureus biofilms to the antibiotics clindamycin, daptomycin, linezolid, tigecycline and vancomycin. *Int J Antimicrob Agents* 2009;33(4):374–8.
126. Byren I, Rege S, Campanaro E, et al. Randomized controlled trial of the safety and efficacy of Daptomycin versus standard-of-care therapy for management of patients with osteomyelitis associated with prosthetic devices undergoing two-stage revision arthroplasty. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56(11):5626–32.
127. Crompton JA, North DS, McConnell SA, Lamp KC. Safety and efficacy of daptomycin in the treatment of osteomyelitis: results from the CORE Registry. *J Chemother Florence Italy* 2009;21(4):414–20.
128. Bauer HM, Ting Y, Greer CE, et al. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA J Am Med Assoc* 1991;265(4):472–7.
129. <http://umr558-sud-str1.univ-Lyon.fr/lebibi/lebibi.cgi>.



## **SERMENT D'HIPPOCRATE**

*En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'HIPPOCRATE,*

*Je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.*

*Je donnerais mes soins gratuitement à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au dessus de mon travail. Je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.*

*Admis dans l'intimité des maisons, mes yeux n'y verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.*

*Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.*

*Je garderai le respect absolu de la vie humaine.*

*Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.*

*Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.*

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

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