

ANNEE 2008

N°12

**MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenu devant un Jury interrégional

Le 30 avril 2008

Par Melle BROSSAUD Julie

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 23 janvier 2003 tient lieu de :

**THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN
PHARMACIE**

Intérêts et limites du diagnostic de kératite amibienne par PCR en temps réel au laboratoire de Parasitologie/Mycologie du C.H.U de Nantes

Président : M. Patrice LE PAPE, Professeur de Parasitologie/Mycologie – Pharmacie

Membres du Jury :

M. Alain PECHEREAU, Professeur d'Ophtalmologie Clinique – Médecine

M. Bertrand VABRES, Praticien Hospitalier en Ophtalmologie Clinique

M. Florent MORIO, Assistant Hospitalo-Universitaire de Parasitologie – Médecine

M. Michel MIEGEVILLE, Maître de Conférence de Parasitologie/Mycologie – Médecine
(directeur de thèse)

TABLES DES MATIERES

Introduction.....	8
Généralités	10
I ACANTHAMOEBA ET LES PATHOLOGIES ASSOCIEES.....	11
I.1 Description de l'amibe.....	11
I.1.1 Définition et historique	11
I.1.2 Position taxonomique	12
I.1.3 Habitat et Ecologie	15
I.1.4 Cycle de vie et caractéristiques morphologiques	15
I.1.5 Interaction <i>Acanthamoeba</i> -bactérie : l'endosymbiose	18
I.1.6 Pouvoir pathogène chez l'homme	19
• Encéphalite chronique granulomateuse G.A.E (Granulomatous Amebic Encephalitis).....	20
• Infections oculaires	20
• Autres infections	21
I.2 Les kératites amibiennes.....	21
I.2.1 Rappels anatomiques de l'œil.....	21
I.2.2 Manifestations cliniques de la kératite amibienne.....	22
I.2.3 Diagnostic différentiel	25
I.2.4 Eléments de physiopathologie et d'immunologie	26
I.2.5 Epidémiologie et facteurs de risque.....	29
I.2.6 Mesures préventives	31
I.2.7 Traitement.....	33
• Les traitements médicamenteux.....	33
• Le traitement chirurgical.....	34
II LES TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC	35
II.1 La microscopie confocale.....	35
II.2 Nature des prélèvements.....	36
II.3 L'examen direct.....	37
II.4 Techniques anatomopathologiques.....	37
II.5 La culture	38
II.5.1 Les milieux utilisés	38
• Milieux de base	38
• Milieux spécifiques.....	39
II.5.2 Le mode opératoire	39
II.6 Les méthodes de diagnostic moléculaire	40
II.6.1 Rappels sur la technique de PCR.....	41

II.6.2	Détection du génome d' <i>Acanthamoeba</i> dans le cadre du diagnostic de kératite amibienne	44
•	L'extraction.....	44
•	L'amplification	45
•	Résultats et performances	45
II.7	Le diagnostic de kératite amibienne au C.H.U de Nantes	46
Matériels et méthodes		48
I	MATERIELS : LES ECHANTILLONS PATIENTS.....	50
II	METHODES.....	51
II.1	Identification d' <i>Acanthamoeba</i> par culture	51
II.2	Identification d' <i>Acanthamoeba</i> par technique de PCR	51
II.2.1	Les témoins	51
II.2.2	La méthode d'extraction de l'ADN	52
II.2.3	L'amplification	52
•	L'appareillage	52
•	Les amorces	54
•	Le mélange réactionnel	54
II.2.4	L'électrophorèse en gel d'agarose	55
II.2.5	Le séquençage.....	56
Résultats.....		57
I	OPTIMISATION DES CONDITIONS DE PCR	58
I.1	Essais préliminaires	58
I.2	Optimisation des conditions d'extraction.....	59
I.3	Optimisation de la concentration en MgCl ₂	60
I.4	Optimisation de la température d'hybridation.....	62
II	VALIDATION DE LA TECHNIQUE DE PCR.....	63
II.1	Essai de répétabilité	63
II.2	Essai de reproductibilité	64
II.3	Détermination de la sensibilité	65
II.3.1	Sensibilité de la PCR.....	65
II.3.2	Sensibilité de l'extraction	65
II.4	Détermination de la spécificité	66
III	EVALUATION DES PERFORMANCES DES PCR SUR DES ECHANTILLONS	
PATIENTS : ETUDE RETROSPECTIVE		67
III.1	Résultats des prélèvements positifs en culture	69
III.2	Résultats des prélèvements négatifs en culture	69
III.3	Résultats des prélèvements délicats d'interprétation en culture.....	70
IV	APPLICATION DE LA TECHNIQUE DE PCR EN TEMPS REEL DANS LE	
DIAGNOSTIC DE KERATITE : ETUDE PROSPECTIVE		70
Discussion.....		73

I	CHOIX DE LA TECHNIQUE.....	74
II	ANALYSE DES RESULTATS DE LA PCR NELSON : CRITERES D'EXCLUSION DE CE COUPLE D'AMORCES	75
III	ANALYSE DES RESULTATS DE LA PCR JDP : VALIDATION DE LA TECHNIQUE DANS LE DIAGNOSTIC DE KERATITE AMIBIENNE.....	76
	III.1 L'extraction.....	76
	III.2 L'amplification	77
IV	RESULTATS DE L'ETUDE PROSPECTIVE : INTERETS DE LA PCR JDP POUR LE DIAGNOSTIC DE KERATITE AMIBIENNE	79
	IV.1 Le délai de rendu des résultats.....	79
	IV.2 La sensibilité et la valeur prédictive de la méthode	79
V	PERSPECTIVE POUR LE DIAGNOSTIC DE KERATITE AMIBIENNE AU LABORATOIRE DE PARASITOLOGIE.....	80
	Annexes	83
	Revue de la littérature	99

TABLE DES FIGURES

Figure n° 1 : Place du genre <i>Acanthamoeba</i> dans la classification des protistes.....	12
Figure n°2 : Le trophozoïte.	16
Figure n° 3 : Différents stades permettant le passage du kyste au trophozoïte.....	17
Figure n° 4 : Le kyste.....	18
Figure n° 5 : Oeil infecté par <i>Acanthamoeba</i>	24
Figure n° 6 : Cascade pathogénique d'une kératite à <i>Acanthamoeba</i>	28
Figure n° 7 : Schéma du principe de la PCR par la technologie SYBR Green®	43
Figure n° 8 : Exemple de détermination de Tm sur une courbe de fusion	44
Figure n° 9 : Exemple de détermination d'un Ct sur une courbe de fluorescence	53

LISTE DES TABLEAUX

Tableau n° 1 : Classification des espèces d' <i>Acanthamoeba</i> proposée par Pussard et Pons	13
Tableau n° 2 : Composition du mix utilisé pour les PCR	55
Tableau n° 3 : Composition du mix utilisé par le Laboratoire des Quinze-Vingt pour le diagnostic de kératite amibienne par PCR.....	58
Tableau n° 4 : Résultats de l'optimisation des conditions d'extraction.....	60
Tableau n° 5 : Résultats de l'optimisation de la concentration en MgCl ₂	61
Tableau n° 6 : Résultats de l'optimisation de la température d'hybridation.	62
Tableau n° 7 : Résultats de l'étude de répétabilité.....	63
Tableau n° 8 : Résultats de l'étude de reproductibilité	64
Tableau n° 9 : Résultats de la détermination de la sensibilité de la PCR	65
Tableau n° 10 : Résultats de la détermination de la spécificité de la PCR	66
Tableau n° 11 : Résultats de la PCR et de la culture lors de l'étude rétrospective.....	68
Tableau n° 12 : Résultats de la PCR et de la culture lors de l'étude prospective.	71

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE N° 1 : Consignes données aux patients porteurs de lentilles de contact par le service d'Ophtalmologie du C.H.U de Nantes	84
ANNEXE N° 2 : Mode opératoire de prise en charge des prélèvements pour le diagnostic de kératite amibienne Bioforma 1998 : Cahier de Formation – Amibes et flagellés intestinaux.....	85
ANNEXE N° 3 : Amorces utilisées pour le diagnostic d' <i>Acanthamoeba</i> par PCR	88
ANNEXE N° 4 : Diagnostic de kératite amibienne par culture. : Extrait du GBEA de parasitologie C.H.U de Nantes	89
ANNEXE N° 5 : Mode opératoire de préparation des milieux Agar	90
ANNEXE N° 6 : Protocole de prise en charge des prélèvements pour la recherche d'amibes libres.....	91
ANNEXE N° 7 : Conditionnement des prélèvements ophtalmologiques en vue de leur extraction par le coffret Nucleospin® Tissue.....	92
ANNEXE N° 8 : Extraction d'ADN à partir des prélèvements ophtalmologiques	93
ANNEXE N° 9 : Place des amorces JDP et Nelson sur le gène de l'ARN ribosomal de la sous-unité 18S.....	94
ANNEXE N° 10 : Gel réalisé à partir de la PCR Nelson	95
ANNEXE N° 11 : Gel réalisé à partir de la PCR JDP	96
ANNEXE N° 12 : Données cliniques	97

Introduction

La kératite amibienne touche principalement les **porteurs de lentilles de contact** dans les pays industrialisés. C'est une pathologie rare en dépit des deux millions de porteurs de lentilles de contact en France, trente millions aux Etats-Unis. Si les principaux agents pathogènes responsables de ces kératites sont les protozoaires du **genre *Acanthamoeba sp.*** de rares cas de kératites à *Hartmanella sp.* et *Vahlkampfia sp.* sont également décrits (Kinnear 2001; Kinnear 2003; Lorenzo-Morales, Martinez-Carretero et al. 2007). Les découvertes et les avancées réalisées en ce qui concerne cette pathologie depuis sa première description en 1974, permettent à la fois d'optimiser sa prise en charge clinique et thérapeutique et d'améliorer son pronostic. Néanmoins, la prévention de ces affections reste primordiale ; les professionnels de santé ont un rôle important et doivent y être sensibilisés. Elle peut être bien traitée lorsqu'un traitement est rapidement mis en place dès le début des symptômes.

Néanmoins, sa morbidité demeure importante avec une grave perte visuelle dans plus de 15% des cas. Ils subsistent en effet des lacunes dans la prise en charge des patients : il s'agit d'une pathologie de **diagnostic difficile**, souvent confondue avec des kératites bactériennes ou virales. Les techniques de culture d'amibes en laboratoire sont longues et délicates. Elles ne peuvent aider le clinicien à poser son diagnostic rapidement et à adapter sa thérapeutique.

Notre étude a porté sur le développement et l'évaluation d'une **technique de PCR** (Polymerase Chain Reaction) pour la détection du génome du protozoaire *Acanthamoeba* dans les prélèvements ophtalmologiques. Après une revue bibliographique de la littérature scientifique et médicale à propos du genre *Acanthamoeba* et des kératites amibiennes, nous présenterons les étapes de notre travail : la mise au point et l'optimisation des conditions de réalisation de la PCR, sa validation technique et son évaluation lors d'une étude rétrospective puis prospective. Nous montrerons que cette méthode permet une détection plus sensible et plus reproductible du parasite et surtout de rendre un résultat plus rapidement au clinicien. Elle pourrait constituer un complément intéressant aux techniques habituelles d'isolement par la culture.

Généralités

I ACANTHAMOEBA ET LES PATHOLOGIES ASSOCIEES

I.1 Description de l'amibe

I.1.1 Définition et historique

Les *Acanthamoeba* sont des **protozoaires saprophytes** très répandus dans l'environnement. Le terme de « amoeba » fait référence au mouvement amiboïde de ces unicellulaires, c'est-à-dire à leur déplacement par pseudopodes. Le préfixe « acanth-» signifie « pic » en grec et désigne les acanthopodes, structures en épine à la surface des amibes. Ce sont des **amibes** considérées comme **libres** car elles sont capables d'accomplir la totalité de leur cycle dans la nature en se nourrissant de bactéries, de levures ou d'autres microorganismes (Khan 2006).

En 1931, Volkonsky individualise le genre *Acanthamoeba*. Il le distingue du genre *Hartmannella* par ses kystes caractéristiques à double paroi dont la couche externe est irrégulière et présente des pores sur leur surface (Volkonsky 1931). La découverte du caractère pathogène d'*Acanthamoeba* est relativement tardive. Ce n'est qu'en 1958, que Culbertson (Culbertson, Ensminger *et al.* 1965) met en évidence la pathogénie de ces amibes dans un modèle animal. Il découvre que le genre *Acanthamoeba* peut être responsable d'encéphalites (Wilhelmus and Jones 1991). Les premiers cas de **kératites amibiennes** à *Acanthamoeba* sont décrits aux Etats-Unis en 1974 par Nagington (Nagington and Richards 1976).

Depuis, le nombre de cas de kératites à *Acanthamoeba* décrit dans la littérature ne cesse de croître avec une nette augmentation depuis les années 1980 du fait de l'expansion du port de lentilles de contact.

C'est une pathologie de découverte relativement récente qui connaît une extension quasi-épidémique depuis les années 1980 du fait de la vulgarisation des lentilles de contact.
--

I.1.2

Position taxonomique

La Society of Protozoologist classe en 1985 le genre *Acanthamoeba* dans le règne des Protista, le sous-règne des Protozoa, le phylum des Sarcomastigophora, la classe des Lobosea, l'ordre des Amoebida et **la famille des *Acanthamoebidae***, à côté des genres *Entamoeba* et *Hartmannella* (Visvesvara 1991; Marciano-Cabral and Cabral 2003) (figure n°1).

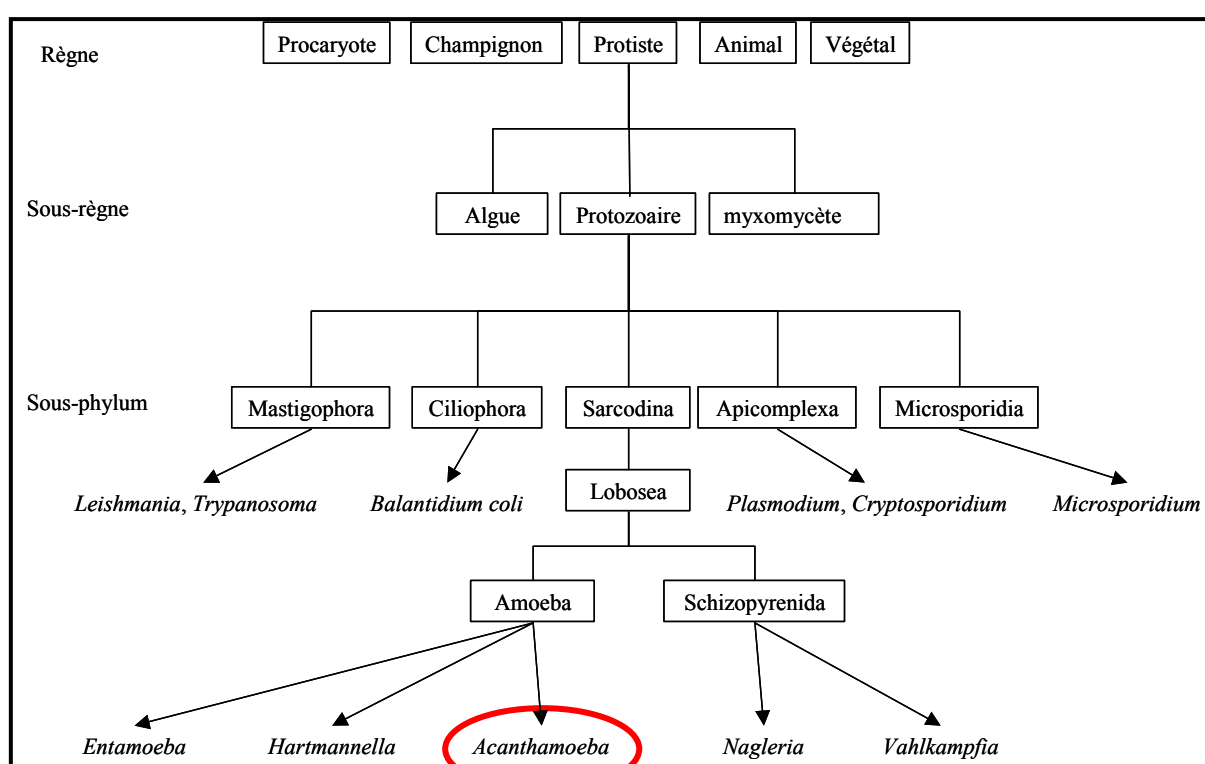


Figure n° 1 : Place du genre *Acanthamoeba* dans la classification des protistes (adapté de (Khan 2006)).

Nota Bene : Les microsporidies (*Microsporidium*, sous-phylum des Microsporidia) ont été récemment reclassées dans le règne des Fungi.

S'il est relativement simple de distinguer le genre *Acanthamoeba* des autres amibes libres - notamment grâce à ses acanthopodes - l'identification des différentes espèces au sein du genre reste souvent difficile. En effet, plus de 24 espèces d'*Acanthamoeba* sont

identifiées selon des critères morphologiques (Marciano-Cabral and Cabral 2003; Visvesvara, Moura et al. 2007).

En 1977, Pussard et Pons proposent une première classification fondée sur des **critères morphologiques** de taille et de forme des kystes de l'amibe. Ils définissent trois groupes (Pussard and Pons 1977) :

- Le groupe I est caractérisé par des amibes de grande taille dont les kystes ont un diamètre supérieur à 18 µm ;
- Le groupe II regroupe les espèces présentant une surface très irrégulière polygonale, triangulaire ou ovale et de diamètre inférieur à 18 µm ;
- Le groupe III comprend de petites amibes rondes de diamètre identique au groupe II (Visvesvara 1991; Illingworth and Cook 1998).

Les espèces les plus souvent impliquées dans les pathologies humaines sont situées dans le groupe II, excepté *A. culbertsoni* classé dans le groupe III.

Groupe I	Groupe II	Groupe III
<i>A. astronyxis</i>	<i>A. castellanii</i>	<i>A. palastinensis</i>
<i>A. comandoni</i>	<i>A. mauritaniensis</i>	<i>A. culbertsoni</i>
<i>A. echinulata</i>	<i>A. polyphaga</i>	<i>A. lenticulata</i>
<i>A. tubiashi</i>	<i>A. lugdunensis</i>	<i>A. pustulosa</i>
	<i>A. quina</i>	<i>A. royreba</i>
	<i>A. rhysodes</i>	
	<i>A. divionensis</i>	
	<i>A. paradivionensis</i>	
	<i>A. griffini</i>	
	<i>A. triangularis</i>	
	<i>A. hatchetti</i>	

Tableau n° 1 : Classification des espèces d'*Acanthamoeba* proposées par Pussard et Pons (Khan 2006)

Cette classification présente cependant des limites et l'identification des espèces apparaît souvent problématique. La morphologie des kystes peut changer en fonction des conditions de culture. Elle est donc complétée par différents auteurs pour y inclure des **critères cultureux, immunologiques et biochimiques** du parasite (Costas and Griffiths 1985).

Les techniques de biologie moléculaire ont beaucoup apporté pour la mise en évidence du genre permettant un diagnostic plus rapide et une identification plus objective. Ainsi, une nouvelle classification est établie par Stothard en 1999. Elle se fonde sur l'étude du gène nucléaire de **l'ARN ribosomal de la sous-unité 18S** grâce à une technique d'hybridation *in situ* (FISH), et permet de distinguer 12 groupes nommés de T1 à T12 (Stothard, Hay *et al.* 1999). Les trois groupes morphologiques établis par Pussard et Pons peuvent être reliés à ce nouveau schéma :

- Les génotypes T7, T8 et T9 correspondent aux espèces du groupe I ;
- Les génotypes T3, T4 et T11 à celles du groupe II ;
- Les génotypes T1, T2, T5, T6, T10 et T12 à celles du groupe III.

Le génotypage de plusieurs séries de prélèvements d'origines biologiques différentes a permis de relier cette nouvelle classification à l'épidémiologie constituant ainsi une aide pour différencier les espèces pathogènes des non-pathogènes (Khan 2006). Par exemple, la kératite à *Acanthamoeba* est majoritairement due à des espèces du groupe T4 puisqu'elle est reliée dans plus de 90% des cas à ce génotype. On retrouve plus rarement des espèces du groupe T3 ou T11 responsables de cette pathologie (Stothard, Hay *et al.* 1999; Schroeder, Booton *et al.* 2001; Zhang, Sun *et al.* 2004).

Le genre <i>Acanthamoeba</i> appartient à la famille des <i>Acanthamoebidae</i> .

I.1.3

Habitat et Ecologie

La répartition géographique de ces protozoaires semble **cosmopolite**. Les infections à *Acanthamoeba* sont en effet décrites sur tous les continents. C'est aux Etats-Unis et au Royaume-Uni qu'est décrit le plus grand nombre d'infections, probablement car elles y sont davantage recherchées. Des études ont montré que ces parasites sont capables de s'adapter aux conditions environnementales les plus difficiles (froid, obscurité, milieu pauvre) puisqu'ils ont été retrouvés dans le sol et l'eau de l'Antarctique (Brown, Cursons *et al.* 1982).

Les *Acanthamoeba* sont **des parasites ubiquitaires** isolés de l'eau (eau douce, eau de mer, eau des piscines, eau du robinet, eau minérale, eau de dialyse), de l'air – même conditionné –, du sol, des végétaux, des poissons et des mammifères. En France, les eaux du réseau d'eau potable peuvent renfermer entre 0 et $4,5 \times 10^3$ amibes par litre (Carrette, Marechal-Courtois *et al.* 2000). En effet, les kystes – forme de résistance – ne sont pas détruits par les traitements de l'eau de boisson ou des piscines (De Jonckheere 1991)

L'homme est donc en **contact permanent** avec ces parasites. Ils ont été mis en évidence dans des prélèvements de nez, de gorge, de la cornée, et au niveau intestinal et cutané. Tous les tissus humains peuvent être colonisés (Mergeryan 1991).

Acanthamoeba est un saprophyte de l'homme, omniprésent dans son environnement quotidien.

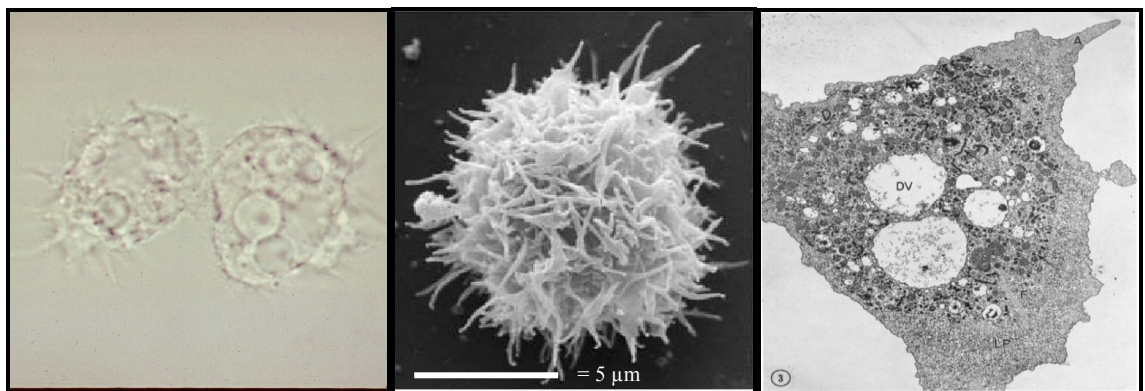
I.1.4

Cycle de vie et caractéristiques morphologiques

Ce parasite opportuniste est caractérisé par sa capacité à se présenter sous deux formes en fonction des conditions extérieures : un **stade trophozoïte** correspondant à la phase active du parasite (nutrition, division, déplacement) et un **stade de latence** sous forme **kystique** (Byers, Kim *et al.* 1991; Marciano-Cabral and Cabral 2003).

Le **trophozoïte** (figure n°2) mesure de 25 à 40 μm . Il est caractérisé par l'émission de pseudopodes lui permettant de se déplacer et de phagocyter les bactéries, les algues, les levures ou les autres microorganismes de l'environnement. Il est aussi doué de pinocytose pour absorber les nutriments et les liquides. Enfin, de fines projections à la surface du trophozoïte appelées **acanthopodes** jouent un rôle dans son adhérence (Illingworth and Cook 1998; Khan 2003). La cellule possède généralement un seul noyau proéminent avec un large nucléosome central ainsi qu'une grande vacuole. Les cellules peuvent cependant parfois présenter en culture plusieurs noyaux (Marciano-Cabral and Cabral 2003).

Le trophozoïte – la forme infestante du protozoaire – est responsable de la cascade pathogénique décrite chez l'homme.



(A)

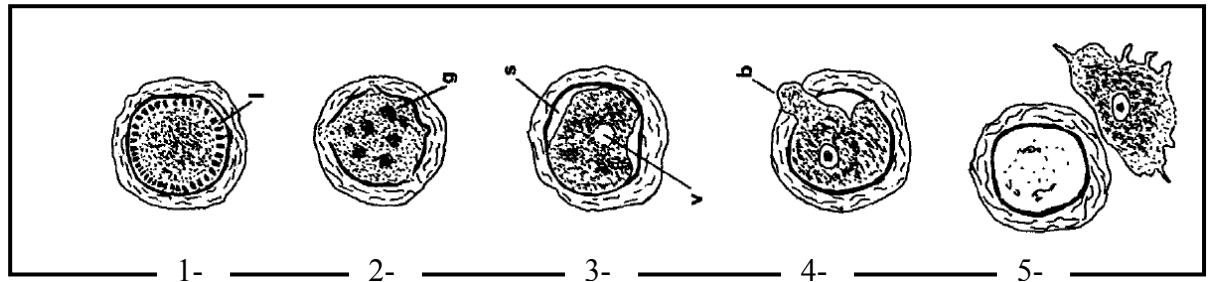
(B)

(C)

Figure n°2 : Le trophozoïte.

Ces photos montrent un trophozoïte en microscopie optique (A) Grossissement : x 100 ([http : //www.med.chem.com](http://www.med.chem.com)), un trophozoïte en microscopie électronique (B) (Khan 2006), une coupe de trophozoïte en microscopie électronique (B) Grossissement : x 8180 (Bowers and Korn 1968).

La transformation du trophozoïte en kyste survient quand les conditions du milieu deviennent défavorables, c'est-à-dire lorsqu'il y a un manque de nutriments, une augmentation de la température ou une osmolarité importante (Khan 2003). La figure 3 illustre cette transformation.



1- kyste mature 2- kyste activé 3- pré-émergence précoce 4- pré-émergence tardive 5- émergence complète

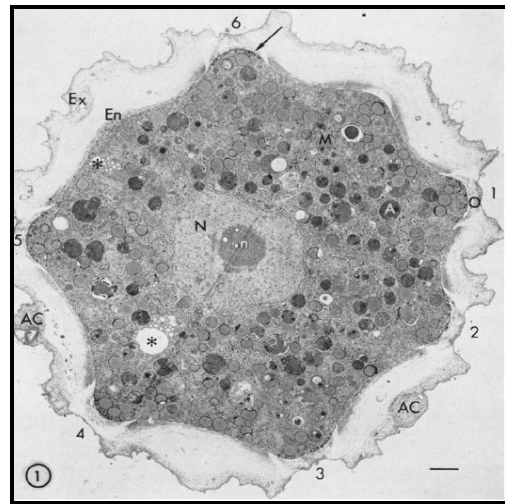
Figure n° 3 : Différents stades permettant le passage du kyste au (Mattar and Byers 1971; Khunkitti, Lloyd et al. 1998):

Le **kyste** (figure n°4) mesure de 13 à 20 μm suivant les espèces. Il est caractérisé par une double paroi cytoplasmique cellulosique : l'**ectokyste**, également appelé exine (paroi externe) d'aspect souvent plissé ou mamelonné et l'**endokyste** ou intine (paroi interne) de forme polygonale ou étoilée.

La double paroi n'est pas toujours facile à voir en microscopie optique car les deux membranes peuvent être plus ou moins espacées en fonction de l'espèce. Des pores fermés par un opercule se situent aux sommets des branches de l'endokyste, à l'endroit où les deux parois se rejoignent. Cette structure explique la capacité du kyste à résister à la dessiccation, aux températures extrêmes, et à divers antibiotiques, désinfectants et procédés de chloration. Le kyste peut à nouveau se transformer en trophozoïte dès que les conditions deviennent plus clémentes, même après plusieurs années d'enkystement (Visvesvara 1991; Marciano-Cabral and Cabral 2003; Khan 2006). Cette résistance particulière du kyste aux agressions extérieures en fait la forme de dissémination du parasite.



(A)



(B)

Figure n° 4 : Le kyste.

Ces photos montrent un kyste en microscopie optique. Grossissement : x 100 (A) ([http : //www.med.chem.com](http://www.med.chem.com)), une coupe d'un kyste en microscopie électronique. Grossissement : x 7620 (Bowers and Korn 1969).

Grâce à sa capacité de transformation en kyste, *Acanthamoeba* est une espèce très résistante aux variations de son environnement.

I.1.5 Interaction *Acanthamoeba*-bactérie : l'endosymbiose

L'amibe est capable d'endosymbiose avec les bactéries de l'environnement. *Acanthamoeba* peut transporter par **internalisation** différentes espèces bactériennes. Le terme d'endosymbiose suppose un phénomène d'interactions **bénéfiques mutuelles**.

D'une part, le protozoaire utilise les bactéries comme source de nourriture, favorisant sa prolifération. Ainsi, en milieu aquatique, l'amibe est principalement retrouvée à l'interface air-eau, zone de densité bactérienne maximale.

D'autre part, certaines bactéries sont dépendantes du protozoaire pour leur multiplication et leur dissémination. Celui-ci a alors un **rôle de réservoir et/ou de vecteur**

de bactéries dont certaines sont responsables de pathologies humaines. L'interaction avec *Legionella pneumophila* est la plus décrite. La bactérie se multiplie dans les phagosomes du protozoaire, à l'abri des agressions extérieures (chaleur, variations de pH et d'osmolarité, antiseptiques). Sa prolifération au sein du cytoplasme amibien augmente ses capacités d'invasion des macrophages et de prolifération chez l'hôte, majorant son caractère infectieux. Sur un modèle proche, beaucoup d'autres bactéries pathogènes sont en endosymbiose avec *Acanthamoeba* : *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium leprae*, *Burkholderia cepacia*, *Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae*, *Listeria sp.*, *Vibrio cholerae*. Ces associations jouent un rôle majeur dans la propagation de ces pathologies humaines mais aussi dans leur résistance à l'action des traitements antibiotiques (Marciano-Cabral and Cabral 2003; Khan 2006).

Acanthamoeba a un **rôle de réservoir et/ou de vecteur** de bactéries responsables de pathologies humaines.

I.1.6 Pouvoir pathogène chez l'homme

En dépit de son caractère ubiquitaire, les infections humaines à *Acanthamoeba* sont rares. Il existe en effet de nombreux facteurs qui entrent en jeu dans la survenue d'un état pathologique chez l'homme :

- la quantité de kystes et/ou de formes végétatives ainsi que leur proportion dans l'environnement ;
- la virulence et la pathogénie des espèces.

Ces deux facteurs sont surtout fonction de la richesse microbiologique, de l'humidité, de la température et des nutriments présents dans le milieu.

- Enfin certaines caractéristiques intrinsèques, exogènes ou endogènes, de l'individu en contact (Mergeryan 1991).

- Encéphalite chronique granulomateuse G.A.E (Granulomatous Amebic Encephalitis)

C'est une pathologie caractérisée par une infection **chronique et progressive** du système nerveux central (S.N.C). La contamination se fait par voie pulmonaire. Après inhalation des amibes par voie nasale, elles migrent vers le S.N.C soit par voie hématogène soit directement à travers l'épithélium olfactif. La période d'incubation est encore mal connue ; elle pourrait aller de quelques semaines à quelques mois. Cette infection touche des patients atteints de pathologies sévères : hémopathie, lupus systémique, diabète, cirrhose, tuberculose et V.I.H. Il existe certains facteurs de prédisposition comme l'alcoolisme, la toxicomanie, les traitements anticancéreux ou stéroïdiens, la radiothérapie et la transplantation d'organe. L'**immunodépression** est donc le principal facteur favorisant la survenue de la G.A.E bien qu'elle ait été décrite dans de rares cas chez des sujets immunocompétents. La **symptomatologie** est **peu spécifique**. Des céphalées, des nausées, des vomissements, de la fièvre, une léthargie, une raideur méningée, des déficits neurologiques focales ou encore de la pression intracrânienne sont les signes cliniques les plus souvent rapportés.

- Infections oculaires

A côté de ces infections sévères du patient immunodéprimé, *Acanthamoeba* est responsable, chez les patients immunocompétents, d'infections oculaires à type de kératites dites amibiennes. C'est la principale infection oculaire décrite puisque les infections non-cornéennes sont très rarement observées. Par exemple, un cas d'endophtalmie avec dissémination du parasite dans l'humeur aqueuse et le corps vitré est rapporté chez un immunodéprimé. L'incidence des kératites, dont l'épidémiologie est liée à l'utilisation des lentilles de contact, est de ce fait en nette augmentation depuis ces trente dernières années (Illingworth and Cook 1998).

Les infections oculaires sont détaillées ci-dessous.

- Autres infections

Chez les patients V.I.H stade SIDA, *Acanthamoeba* peut être responsable d'infections cutanées et d'infections généralisées parfois foudroyantes (Marciano-Cabral and Cabral 2003).

<i>Acanthamoeba</i> est responsable chez l'immunodéprimé d'encéphalite chronique granulomateuse et chez l'immunocompétent de kératite.

I.2 Les kératites amibiennes

Ce sont des atteintes de la cornée dues à des amibes libres, et principalement au protozoaire du genre *Acanthamoeba*.

I.2.1 Rappels anatomiques de l'œil

L'œil est constitué de quatre compartiments : la cornée, la chambre antérieure contenant l'humeur aqueuse, le cristallin et la chambre postérieure contenant le corps vitré. L'ensemble du globe oculaire est limité par une coque de tissu conjonctif fibreux, dense, opaque et vascularisé : la sclérotique. Elle est ouverte en avant au niveau de la cornée, avec laquelle elle se continue. Elle est prolongée en arrière par la dure-mère du nerf optique. L'intérieur de la sclérotique est tapissé par la choroïde support de la rétine.

La cornée est une lame de tissu conjonctif dense, orientée, transparente et avasculaire, revêtue sur chacune de ses faces par un épithélium. La cornée ne contient pas de vaisseaux sanguins. Sa nutrition est assurée par imbibition à partir de l'humeur aqueuse.

L'épithélium antérieur, pavimenteux stratifié non kératinisé, repose par sa face basale sur une membrane basale distincte de la membrane de Bowman. Sa surface apicale, tapissée de microplis, retient un film aqueux de larmes humidifiant en permanence la cornée.

L'épithélium postérieur, pavimenteux simple – ou endothélium –, repose sur une membrane basale épaissie : la membrane de Descemet.

Le stroma, constitué de collagène, dense, occupe 90 % de la cornée entre les deux épithéliums. Il est limité en avant par la membrane de Bowman et en arrière par la membrane de Descemet.

L'innervation sensitive de la cornée (par le nerf trijumeau, V) est très importante au niveau du stroma. L'épithélium antérieur est pourvu de très nombreuses terminaisons nerveuses libres, ce qui explique la sensibilité extrême de la cornée.

Plusieurs facteurs rendent compte de la **transparence de la cornée** :

- la régularité et la finesse de l'épithélium antérieur, non kératinisé ;
- l'absence de vaisseaux sanguins et lymphatiques (après une plaie de la cornée, le développement d'une vascularisation est un mécanisme de défense qui a comme effet négatif majeur d'être responsable d'altérations de la transparence de la cornée) ;
- l'organisation du stroma cornéen et en particulier de ses microfibrilles de collagène. Les microfibrilles de collagène sont en effet groupées en lamelles empilées parallèlement, condition essentielle au maintien de la transparence de la cornée.

I.2.2 Manifestations cliniques de la kératite amibienne

Les manifestations cliniques débutent généralement par une sensation de corps étranger dans l'œil avec irritation et rougeur oculaire. Une photophobie y est très souvent associée. La symptomatologie évolue ensuite de manière progressive vers une **douleur franche et intense**. Elle doit faire évoquer la kératite amibienne. L'œdème palpébral est fréquent (Claerhout and Kestelyn 1999; Carrette, Marechal-Courtois et al. 2000).

Très tôt, on constate l'apparition d'une injection ciliaire avec **chémosis**. L'épithélium présente alors des microlésions, des irrégularités et **une opacité**. Puis le tableau se complique **d'infiltrats du stroma cornéen en anneau**, de lésions épithéliales dendriformes et enfin d'une néovascularisation. La kératonévrite radiaire, avec infiltration suivant la distribution des nerfs cornéens, paraît presque pathognomonique. L'uvéite antérieure est possible (Rabinovitch, Weissman *et al.* 1991; Claerhout and Kestelyn 1999) (figure n°5).

Quelles que soient les lésions observées – relativement variables selon les cas –, **l'évolution est lente et insidieuse** avec des périodes de rémission transitoire. Cette infection devient chronique contrairement aux infections bactériennes souvent aiguës ou subaiguës. L'évolution mène inexorablement à une **chute d'acuité visuelle**.

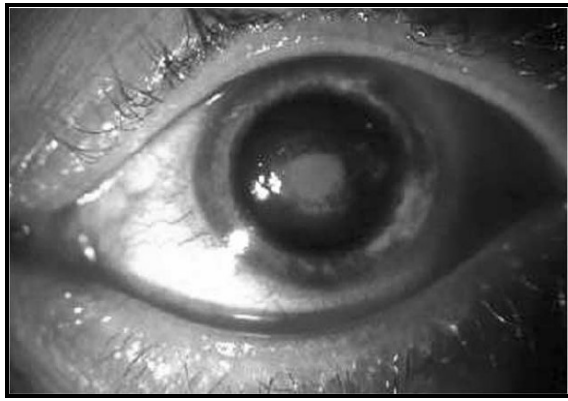
La pathologie évolue souvent selon quatre étapes:

Etape 1 : apparition d'hyperhémie, de photophobie, d'irritation avec sensation de corps étranger, et kératite ponctuée superficielle, mais l'épithélium cornéen est parfois intact ;

Etape 2 : des lésions pseudodendritiques se développent. On observe un début d'infiltrat stromal sous la forme de minuscules lésions blanches ou de lésions irrégulières plus ou moins grises. La douleur est intense ;

Etape 3 : les lésions superficielles augmentent avec un infiltrat stromal péri-lésionnel qui s'étend. Cet infiltrat peut former un anneau partiel ou complet. De minuscules lésions blanches sont souvent observées en dehors de l'anneau d'infiltrat stromal ;

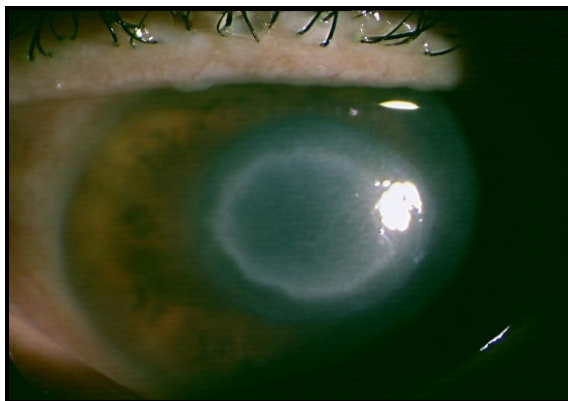
Etape 4 : l'abcès cornéen s'étend au centre de la cornée. Un double anneau d'infiltrat peut alors être observé. Il y a diminution progressive du stroma cornéen et formation d'un descemetocèle associé parfois à un iritis et à un hypopion (Debbasch, Chaumeil *et al.* 1999).



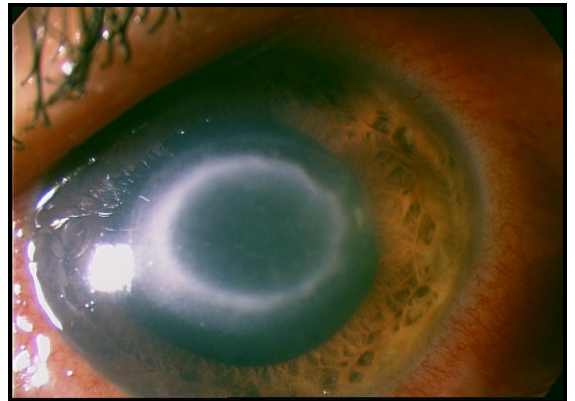
(A)



(B)



(C)



(D)

Figure n° 5 : Oeil infecté par *Acanthamoeba*.

Ces photos montrent une ulcération épithéliale (A) (Khan 2003), un infiltrat du stroma cornéen avec néovascularisation (B), un infiltrat du stroma cornéen en anneau (C et D) (iconographie du service d'Ophtalmologie du C.H.U de Nantes).

Le pronostic peut être grave : après traitement médicamenteux ou chirurgical, l'acuité visuelle reste inférieure à 3/10^e dans plus de 15 % des cas. Une bonne récupération visuelle est directement liée à la précocité du diagnostic et à l'efficacité du traitement (Radford, Lehmann *et al.* 1998; Cardine, Bourcier *et al.* 2002; Agla, Cornet *et al.* 2005).

La manifestation clinique la plus caractéristique est la présence d'infiltrats du stroma cornéen en anneau avec une baisse d'acuité visuelle.

I.2.3

Diagnostic différentiel

Le diagnostic de cette pathologie est souvent problématique car, devant une kératite, la cause amibienne est rarement évoquée en premier. Ceci entraîne un retard souvent considérable dans la prise en charge thérapeutique. Notons que ce **délai de prise en charge** contribue de façon très importante au pronostic de la pathologie (Claerhout, Goegebuer *et al.* 2004). Les trophozoïtes sont en effet majoritaires au niveau des lésions par rapport aux kystes en début d'infection. Puis cette proportion s'inverse dans les stades plus avancés de la pathologie. Or, les traitements de la kératite amibienne sont beaucoup plus efficaces sur les trophozoïtes que sur les kystes (Stothard, Hay *et al.* 1999). Ce retard de diagnostic trouve plusieurs explications :

- le tableau clinique **ressemble beaucoup** à celui d'une **kératite herpétique** surtout en début d'infection lorsque le patient ne présente que des lésions épithéliales pseudo-dendritiques et des signes cliniques encore peu spécifiques (Claerhout, Goegebuer *et al.* 2004);
- **tous les signes cliniques ne sont pas** nécessairement **présents**, en particulier l'infiltrat en anneau (Claerhout and Kestelyn 1999) ;
- dans les stades plus avancés, c'est la surinfection bactérienne qui complique le diagnostic (Marciano-Cabral and Cabral 2003).

Deux études illustrent cette erreur de diagnostic et ces conséquences.

Dans l'étude de Debbasch (Debbasch, Chaumeil *et al.* 1999), parmi les 28 kératites amibiennes, 8 ont été initialement diagnostiquées comme une kératite herpétique et 12 autres comme une conjonctivite. Ainsi, le délai entre les premiers signes cliniques et le diagnostic de kératite amibienne varie de 5 à 120 jours.

L'étude Agla menée en 2005 confirme ces observations : elle donne un délai moyen de 64 jours (allant de 8 jours à 8 mois) entre les premiers symptômes et le diagnostic de kératite stromale amibienne. L'origine amibienne de la kératite n'a été suspectée d'emblée chez aucun des 23 patients de l'étude. C'est le diagnostic de kératite virale, bactérienne ou mycosique, qui est proposé au départ. Une prise en charge pour kératite herpétique est initialement instaurée chez tous les patients (Agla, Cornet *et al.* 2005).

Ces deux articles montrent qu'aujourd'hui encore, il existe un délai important entre les premiers signes cliniques et la prise en charge thérapeutique correcte du patient.

L'erreur de diagnostic la plus fréquente est la confusion avec une kératite herpétique. Elle est responsable d'un réel problème de délai de diagnostic et donc d'un retard à la prise en charge thérapeutique de cette pathologie.

I.2.4 Éléments de physiopathologie et d'immunologie

Le caractère ubiquitaire d'*Acanthamoeba* contraste avec la rareté des kératites amibiennes. Beaucoup d'études cherchent donc à comprendre quelle succession d'événements explique la pathogénie de certaines souches mais aussi dans quelles circonstances survient l'infection.

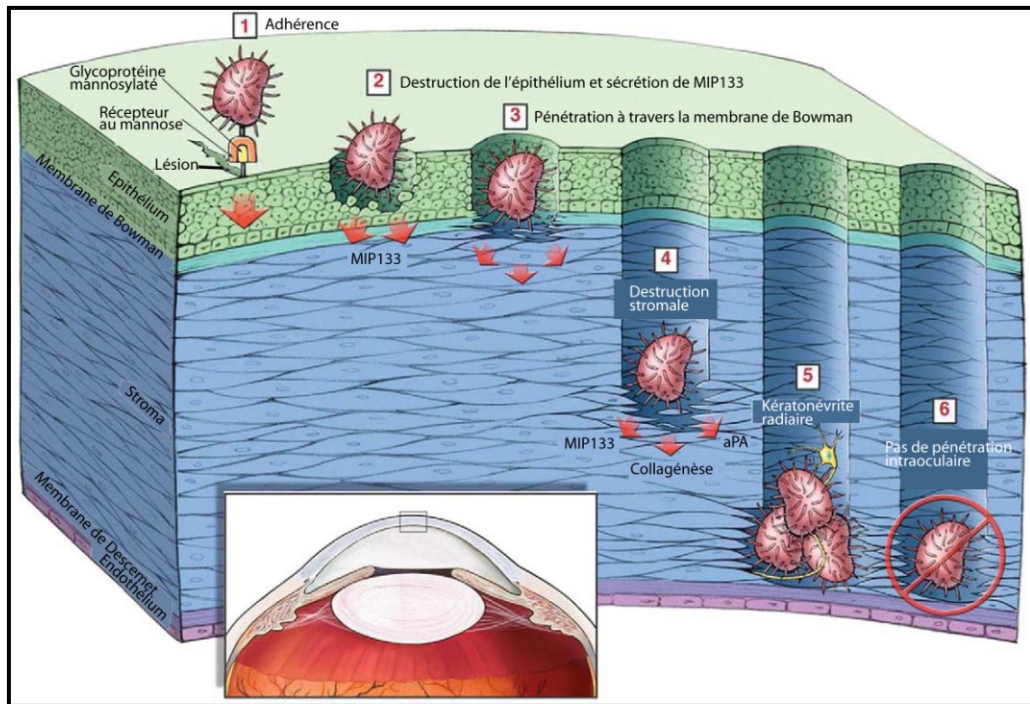
Plusieurs auteurs évoquent une **cascade pathogénique** se déroulant dans un ordre bien déterminé au cours de laquelle le parasite pénètre la cornée et entraîne une kératite (Niederkorn, Alizadeh et al. 1999; Khan 2003) (figure 6).

La première étape est **l'adhérence** de l'amibe sur les cellules hôtes. Il est maintenant bien démontré que la liaison cellule épithéliale/amibe est médiée par une adhésine appelée MBP (mannose-binding protein ou protéine liant le mannose) de 110 à 130 kDa. Cette protéine est localisée au niveau de la membrane du parasite (Garate, Cubillos et al. 2005). La MBP interagit avec une mannose glycoprotéine de la membrane des cellules épithéliales cornéales (Yang, Cao et al. 1997). La forte fréquence des génotypes T3, T4 et T11 en pathologie humaine pourrait s'expliquer par leur capacité d'adhérence bien supérieure aux autres génotypes. Celle-ci serait favorisée par la présence de bactéries, sous la forme de biofilm notamment, mais aussi lors d'une effraction préalable de la couche cellulaire.

En 2005, Alizadeh suggère que la paroi de certaines bactéries riches en mannose activerait la cascade pathogénique en offrant de nombreux sites de liaison à la MBP. De

même la présence de microlésions à la surface de la cornée augmenterait la mannosylation des protéines de l'épithélium et pourrait ainsi favoriser l'adhérence du parasite (van Klink, Alizadeh et al. 1993; Alizadeh, Neelam et al. 2005). La production de protéases (sérines protéases surtout mais aussi élastases, phospholipases A) est alors mise en évidence, en particulier la MIP133. Elle est responsable de l'effet cytotoxique de l'amibe par dégradation du collagène permettant la pénétration dans la membrane de Browman et l'invasion des tissus (Hurt, Neelam et al. 2003).

La seconde phase du processus infectieux correspond d'une part à **la phagocytose** des cellules épithéliales et cornéales de l'hôte et d'autre part à l'**apoptose** induite par les sérines protéases. *Acanthamoeba* envahit ainsi la cornée. Mais elle est rarement responsable d'endophtalmie contrairement aux infections oculaires bactériennes. Clarke l'explique en partie : le parasite est tout à fait capable de traverser la membrane de Descemet, mais l'immunité cellulaire (réponse neutrophile importante) au sein de l'humeur aqueuse stoppe totalement la progression de l'infection en intraoculaire (Clarke, Alizadeh et al. 2005).



1 : Les trophozoïtes adhèrent grâce à des glycoprotéines mannosylaté surexprimées au niveau de l'épithélium cornéen lors de micro-lésions. **2 :** Les trophozoïtes sécrète de la MIP133, protéinase entraînant une cytolysé des cellules épithéliales *in vitro*. **3 :** Les trophozoïtes traversent la membrane de Bowman et lysent le collagène. **4 :** La production de plusieurs protéases (MIP133, collagénase MMP et un activateur du plasminogène, le aPA) par les trophozoïtes leur permet de dissoudre le stroma cornéen. **5 :** Les trophozoïtes s'enroulent souvent autour des cellules nerveuses produisant des keratonevrites radiaires et une douleur intense. **6 :** La kératite évolue rarement au-delà de l'endothélium. Elle n'entraîne pas d'infection intraoculaire.

Figure n° 6 : Cascade pathogénique d'une kératite à *Acanthamoeba* (Clarke and Niederkorn 2006).

Le **rôle de la réaction immunitaire** de l'hôte est donc crucial dans cette pathologie. En effet le caractère ubiquitaire de cette amibe libre dans l'environnement est illustré en immunologie par le fort pourcentage de personnes possédant des anticorps dirigés contre *Acanthamoeba* (environ 80% de la population). En revanche, ils ne protègent pas d'une éventuelle future infection oculaire. **L'immunité locale** due aux immunoglobulines G et A contenues dans les larmes semble jouer un rôle majeur dans la protection contre l'adhérence du parasite aux cellules épithéliales de la cornée. Ainsi, en dépit d'un contact très fréquent avec *Acanthamoeba*, la kératite reste une pathologie rare. Pour trois raisons :

- seul les biotypes T4 et T11 sont pathogènes ;
- l'action mécanique des paupières limite le temps de contact parasite/hôte ;
- enfin, l'immunité locale empêche la première étape du processus physiopathologique.

Cependant, une fois que l'amibe a réussi à se fixer aux cellules cornéales, les anticorps deviennent inefficaces dans la lutte contre l'infection. **L'immunité cellulaire** médiée par les polynucléaires neutrophiles et surtout les macrophages limite alors la progression du parasite (Nieder Korn, Alizadeh et al. 1999).

Les mécanismes de développement d'une infection oculaire à *Acanthamoeba* sont multiples ; la virulence et la capacité d'adhérence du parasite sont parmi les plus importants.

I.2.5 Epidémiologie et facteurs de risque

La kératite amibienne reste une pathologie rare bien que son incidence ait considérablement augmenté au milieu des années 1980 (Illingworth, Cook et al. 1995; Radford, Lehmann et al. 1998; Debbasch, Chaumeil et al. 1999). L'incidence annuelle est variable d'une étude à l'autre et surtout d'un pays à l'autre. Elle se situe autour de 1 à 1,5 par million d'habitants dans la population tout venant. Par contre, l'incidence dans la population des porteurs de lentilles est d'environ 20 cas par million (Sharma, Garg et al. 2000; Radford, Minassian et al. 2002; Pasricha, Sharma et al. 2003; Bharathi, Srinivasan et al. 2007).

En effet, dans les pays industrialisés, le port de lentilles de contact constitue le facteur de risque de survenue de cette pathologie. L'augmentation quasi-épidémique du nombre de cas s'explique par l'expansion de l'utilisation des **lentilles de contact**. Ainsi, les infections amibiennes surviennent dans environ 90% des cas chez des porteurs de lentilles. Tous les types de lentilles peuvent être incriminés. Les lentilles de contact souples seraient cependant un facteur de risque supplémentaire par rapport aux lentilles rigides car

l'adhérence des amibes y est plus facile (Lindsay, Watters et al. 2007) . Les autres patients atteints et non porteurs de lentilles décrivent un traumatisme de la cornée dans les jours précédents le début des symptômes. Il peut s'agit de traumatismes minimes, parfois avec un corps étranger – qu'il soit végétal ou inerte –, et cela dans des contextes très variés.

Dans une étude multicentrique menée de 1992 à 1996, des pratiques à risques sont mises en évidence (Radford, Lehmann et al. 1998). Il s'agit d'une part de **la baignade avec les lentilles**, que ce soit en piscine, en mer, ou en eaux douces comme dans les lacs ou les rivières. D'autre part, **le mauvais entretien des lentilles** est très souvent incriminé. Les personnes interrogées dans l'étude utilisent en effet de l'eau non stérile pour l'entretien de leurs lentilles, en particulier l'eau du robinet. Radford suspecte que l'eau du robinet soit l'un des modes de contamination majeur (Radford, Minassian et al. 2002; Kilvington, Gray et al. 2004). D'autres ne respectent pas le protocole de désinfection ou utilisent des produits périmés. Enfin les lentilles jetables sont gardées par certains patients bien au-delà du délai préconisé par le fabricant. Une décroissance du nombre de cas enregistrés apparaît à partir de 1995 grâce à un effort d'éducation des patients et de sensibilisation aux règles d'hygiène indispensables à l'utilisation de lentilles (Radford, Lehmann et al. 1998; Radford, Minassian et al. 2002). Toutefois, dans certaines études très récentes, plusieurs auteurs craignent une nouvelle recrudescence du nombre de cas de kératites amibiennes incriminant la qualité des produits d'entretien des lentilles de contact (Joslin, Tu et al. 2006).

La mise en évidence des facteurs de risque est très importante : elle justifie et oblige à améliorer les règles d'hygiène. De nombreux articles sont publiés à ce sujet dans la littérature. Les explications sont multiples. Beaucoup de facteurs sont en cause :

- Dans un premier temps, la lentille fut considérée comme simple **vecteur du parasite** après sa contamination. Elle permet effectivement son adhérence et augmente le temps de contact avec la cornée. Ainsi, les lentilles souples sont suspectées d'être un meilleur vecteur que les autres types de lentilles de contact (Morton, McLaughlin et al. 1991; Niederkorn, Alizadeh et al. 1999; Bergeaud 2000).
- Ensuite, on s'est aperçu que la présence d'un **biofilm bactérien** favorise l'infection. Les bactéries servent de nourriture et permettent la multiplication des amibes. Certains auteurs parlent même d'une véritable co-contamination. Alizadeh

pense que certaines bactéries pourraient favoriser l'activation de la cascade pathogénique (Bottone, Madayag et al. 1992; Alizadeh, Neelam et al. 2005).

- Enfin, la lentille est responsable de **microtraumatismes** à la surface **de la cornée** lors des poses et déposes. Ils facilitent son adhérence à l'hôte et lui permettent de la pénétrer (van Klink, Alizadeh et al. 1993).

Dans les pays en voie de développement l'épidémiologie est différente : les traumatismes et l'exposition à des eaux fortement contaminées sont les principales causes de kératites à *Acanthamoeba*. (Sharma, Garg et al. 2000; Radford, Minassian et al. 2002; Pasricha, Sharma et al. 2003; Bharathi, Srinivasan et al. 2007)

L'étude épidémiologique de la survenue de cette pathologie permet de mettre en évidence de nombreux facteurs de risque principalement liés au port de lentilles de contact.

I.2.6 Mesures préventives

La prévention de la survenue de kératite amibienne consiste essentiellement en l'éducation des porteurs de lentilles de contact. L'équipe médicale et para-médicale doit faire comprendre au patient l'importance du respect des quelques règles d'hygiène suivantes :

- Bien **se laver les mains** à l'eau et au savon et les sécher convenablement avant toute manipulation de lentilles ;
- Concernant le nettoyage des lentilles :
 - Nettoyer régulièrement le boîtier des lentilles avec le liquide de conservation des lentilles, l'essuyer et le laisser sécher ouvert. Le changer fréquemment ;
 - Ne jamais nettoyer des lentilles avec l'eau du robinet ;
 - Nettoyer quotidiennement les lentilles avec un produit d'entretien approprié ;

- Respecter la date de péremption et le délai maximum d'utilisation après ouverture du flacon ;
- Utiliser un oxydant pour nettoyer les lentilles souples ;
- Respecter la **durée d'utilisation** de la lentille comme précisée dans la notice ;
- Ne pas mettre de lentilles sous une douche, dans les piscines ou en eau douce (jacuzzi, lac...) ;
- En cas de gêne ou de douleur (même augmentant au dépôt des lentilles) : ôter les lentilles, consulter un ophtalmologiste rapidement ;
- Toujours posséder une paire de lunettes correctrices adaptée en complément des lentilles ;

Les recommandations données aux porteurs de lentilles de contact au C.H.U de Nantes sont présentées en annexe n°1.

L'efficacité anti-amibienne des produits d'entretien des lentilles lors d'une utilisation normale (selon les recommandations du fabricant) semble plutôt limitée. Si ces solutions sont efficaces sur les trophozoïtes, les kystes sont eux résistants car le temps de contact recommandé par le fabricant est souvent trop bref. Le manque d'étude standardisée rend toutefois difficile la comparaison des produits entre eux. Ces produits limitent au moins la formation d'un biofilm bactérien, paramètre important dans la survenue d'une kératite amibienne (Hiti, Walochnik et al. 2002; Joslin, Tu et al. 2007).

La prévention de la kératite amibienne repose sur le respect des règles d'hygiène d'utilisation et d'entretien des lentilles de contact.

Le traitement des kératites amibiennes est aujourd'hui avant tout médicamenteux ; la chirurgie ne devra être envisagée qu'en cas d'échec thérapeutique majeur. Mais ce traitement est **difficile**, souvent long. Son efficacité est surtout dictée par la **précocité de sa mise en place** par rapport à l'apparition des symptômes. On voit l'importance d'un diagnostic étiologique rapide. Lorsque le patient est pris en charge dès le début de l'infection, le parasite se trouve majoritairement sous la forme de trophozoïtes au niveau des couches superficielles de la cornée. Le traitement peut donc être efficace car les trophozoïtes sont plus sensibles à la thérapeutique que les kystes. Et rares sont alors les problèmes de diffusion de la molécule sur le site de l'infection.

Dans les stades avancés de la pathologie, les trophozoïtes ont le temps de progresser vers les couches profondes du tissu cornéal et de s'y enkyster. Les traitements les atteindront difficilement et seront alors incapables de tuer les kystes. La durée du traitement devra de ce fait s'étendre à plusieurs mois voire à un an. La pathologie est dès lors considérée comme potentiellement récidivante avec un risque de rechute non négligeable car les kystes peuvent se réactiver.

Les échecs thérapeutiques peuvent trouver plusieurs explications : soit un manque de pénétration de l'agent actif, soit une durée de traitement insuffisante, voire une résistance acquise au traitement (Illingworth and Cook 1998; Bergeaud 2000; Marciano-Cabral, Han et al. 2003).

- Les traitements médicamenteux

Différents types de chimiothérapies sont utilisées comme amiboecides :

- les **diamidines**, c'est-à-dire la propamidine BROLENE® et l'héxamidine DESOMEDINE® ;
- les **imidazolées**, le clotrimazole et le miconazole étant utilisés sous forme de collyre, les autres anti-parasitaires peuvent être administrés par voie orale ;
- les **antiseptiques locaux** comme la chlorhexidine et la polyhexaméthylène biguanide (PHMB).

- Des **antibiotiques** sont dans certains cas associés à ces traitements. Ils préviennent une surinfection bactérienne, d'autant qu'une activité synergique avec les diamidines sur les amibes est décrite. Les principaux antibiotiques utilisés sont la néomycine et la polymyxine B.

Une corticothérapie est mise en place après plusieurs semaines de traitement amoebicide pour diminuer l'opacité cornéenne et la néovascularisation.

Ces molécules sont fréquemment utilisées en association afin de limiter l'émergence de résistance et d'obtenir une éventuelle synergie. Le traitement le plus couramment mis en place consiste actuellement en l'association d'une diamidine (hexamidine) avec un antiseptique (PHMB ou chlorhexidine) plus ou moins couplé à de la néomycine en cas de surinfection bactérienne (Carrette, Marechal-Courtois et al. 2000; Khan 2006). A Nantes, les prescriptions associent le plus souvent la Desomédine® et l'atropine avec éventuellement le PHMB et un antibiotique.

- Le traitement chirurgical

Il s'agit d'une **kératoplastie**. Elle est rarement réalisée en phase aiguë (greffe à chaud) sauf lors d'une perforation cornéenne car les récives après greffe sont fréquentes. L'administration de PHMB avant et après l'intervention améliorerait alors le pronostic de la greffe. La greffe de cornée vise plus généralement à rétablir une acuité visuelle après opacification définitive de la cornée. (Illingworth and Cook 1998; Claerhout and Kestelyn 1999).

Le pronostic des kératites amibiennes et l'efficacité de leur traitement sont dictés par la précocité de leur diagnostic et de la mise en place du traitement.
--

II LES TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

La présence chez un patient de signes cliniques caractéristiques et d'un ou de plusieurs facteurs de risque doit faire évoquer le diagnostic de kératite amibienne. Une confirmation en laboratoire spécialisé est cependant indispensable. Elle peut être faite par un examen en microscopie confocale, un examen anatomopathologique, une culture ou la mise en évidence du génome d' *Acanthamoeba*.

II.1 La microscopie confocale

La microscopie confocale est une **technique d'imagerie** dont le condensateur et l'objectif du microscope sont focalisés sur les mêmes zones de tissu. Elle permet l'observation de structures transparentes ou partiellement opaques à un niveau cellulaire et ce dans les différentes couches du tissu. L'étude des plans cellulaires peut se faire *in vivo* ou *in vitro*.

Compte tenu de son **caractère non invasif**, elle est intéressante dans le diagnostic de pathologies ophtalmologiques. Elle donne en effet des images de la surface cornéenne parallèle à la face antérieure de la cornée et situées à des profondeurs variables allant de la couche superficielle des cellules épithéliales à la membrane de Descemet.

Dans les kératites amibiennes, les kystes d'*Acanthamoeba* apparaissent comme des structures rondes de 10 à 25 µm, très contrastées. On distingue **la double paroi caractéristique** du genre ainsi que des indentations évoquant les pores à la jonction de l'endokyste et de l'exokyste. Les trophozoïtes peuvent être observés mais ils sont moins caractéristiques : leur taille est variable et leurs pseudopodes difficilement visibles. La kératonévrite radiaire est évoquée devant des fibres nerveuses irrégulières et renflées due probablement à une infiltration amoéboïde.

Grâce à cette technique, la kératite amibienne peut être suspectée rapidement, dès la consultation. Un traitement approprié est donc immédiatement mis en place. La microscopie confocale permet également le suivi de l'évolution de la pathologie. Mais cette

technique nécessite un matériel coûteux et un personnel expérimenté ; elle est réservée à quelques **équipes spécialisées** (Pfister, Cameron et al. 1996; Ganem 1999; Parmar, Awwad et al. 2006).

Malgré son intérêt unanime dans le diagnostic de kératite amibienne, l'utilisation de la microscopie confocale reste limitée à quelques équipes spécialisées.

II.2 Nature des prélèvements

La mise en évidence du protozoaire au niveau de la cornée est souvent difficile. Un **grattage profond** des lésions et de leur périphérie est préconisé pour améliorer les chances de positivité du prélèvement. Idéalement, il doit être réalisé à l'aide d'un vaccinostyle pour la mise en culture (Cardine, Bourcier et al. 2002; Schuster 2002).

Cet examen peut toutefois être faussement négatif du fait de la difficulté de prélèvement. Il est donc indispensable chez les porteurs de lentilles de faire une recherche des amibes, en parallèle de la culture de cornée, tant sur **les lentilles** et que dans **le liquide de conservation** (Debbasch, Chaumeil et al. 1999). Néanmoins, lorsque l'un de ces matériaux est positif avec une cornée négative, la kératite amibienne n'est que suggérée. Le parasite peut en effet être retrouvé dans plusieurs boîtiers de lentilles sans que le patient ne présente aucune symptomatologie (Marciano-Cabral and Cabral 2003).

En revanche, une culture du grattage de cornée négative ne doit pas faire exclure le diagnostic pour autant ; une **biopsie** peut alors être envisagée (Illingworth and Cook 1998).

II.3 L'examen direct

L'examen direct peut être pratiqué sur les biopsies de cornée ou sur les grattages. Après étalement sur plusieurs lames porte-objet, lorsque cela est possible, le prélèvement est fixé (formaldéhyde, méthanol, *etc...*).

- Il existe des méthodes non spécifiques et très simples à mettre en œuvre comme la **coloration de Gram** ou la **coloration au MGG** (May-Grundwald Giemsa). Mais l'interprétation reste délicate ; l'aspect des kystes est très proche de celui d'une levure ou des cellules mononuclées.
- Des nombreuses techniques plus spécifiques sont décrites dans la littérature :
 - le **calcofluor blanc**, spontanément fluorescent, se fixe sur les polymères polysaccharidiques de la paroi des kystes d'amibes. Ceux-ci apparaissent alors en vert sur un fond contrasté par du Bleu Evans au microscope à fluorescence.
 - **L'immunofluorescence indirecte** ou la **technique immunopéroxydase** sont également utilisées. Elles consistent à utiliser un anticorps anti-*Acanthamoeba* et un conjugué anti-IgG couplé soit à un fluorophore, soit à une peroxydase.

(Claerhout and Kestelyn 1999)

Bien que considérées comme spécifiques, ces techniques nécessitent un œil expérimenté. Elles peuvent révéler d'autres pathogènes notamment fongiques. Elles sont réservées aux **laboratoires spécialisés** (Illingworth and Cook 1998; Claerhout and Kestelyn 1999; Marciano-Cabral and Cabral 2003). De plus, la sensibilité de la méthode reste faible, autour de 20 % (Lehmann, Green et al. 1998; Yera, Zamfir et al. 2007).

II.4 Techniques anatomopathologiques

Un examen anatomopathologique peut également constituer une aide au diagnostic.

Il est réalisé sur **un grattage cornéen ou sur une biopsie**. Après une fixation du prélèvement dans la paraffine, des coupes sont préparées et colorées par différentes

méthodes : hématoxyline éosine safran H.E.S., acide périodique Schiff P.A.S., coloration de Wright, coloration de Gomori-Grocott ou encore coloration au trichrome.

L'examen histopathologique montre un infiltrat leucocytaire associée à une **nécrose du stroma**. La cornée est amincie avec une disparition ou une nécrose de l'épithélium antérieur. La membrane de Bowman est interrompue. Les kystes et les trophozoïtes peuvent être retrouvés au niveau des zones de nécrose. Les premiers sont facilement identifiables grâce à leur double paroi, quelque soit la coloration utilisée. Les seconds montrent un noyau proéminent et des organelles basophiles ; ils sont parfois confondus avec des histiocytes et des kératocytes.

La sensibilité de ces techniques est néanmoins largement influencée par la qualité du prélèvement (Kinota, Wong et al. 1993; Claerhout and Kestelyn 1999).

II.5 La culture

Dans son environnement naturel, *Acanthamoeba* se nourrit de levures, de divers protozoaires, de bactéries et de particules organiques. Pour cultiver l'amibe, il faut donc lui fournir artificiellement ces substrats. Néanmoins, ces microorganismes ne doivent pas prendre le pas sur le développement de l'amibe. C'est pourquoi on utilise des milieux contenant peu ou pas de nutriments additionnés classiquement d'une espèce bactérienne non encapsulée.

II.5.1 Les milieux utilisés

- Milieux de base

Dans le cadre d'un diagnostic de kératite amibienne, il convient d'utiliser une **culture dite monoxénique**. *Acanthamoeba* est placé dans un milieu agar pauvre en nutriments : milieu PYG (Peptone Yeast Glucose) avec peptone 0,05 %, extrait de levure 0,05 % et glucose 0,1 % auquel sont ajoutées des bactéries vivantes ou tuées. Les bactéries de choix

sont les bacilles à Gram négatif sans capsule (*Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Escherichia coli*). Un milieu liquide peut également être utilisé (NaCl 0,9%) (Schuster 2002; Marciano-Cabral and Cabral 2003).

La culture sur milieux commerciaux montre de bons résultats avec le BCYE (Buffered Charcoal-Yeast Extract Agar) et TSA (Tryptic Soy Agar) additionné de sang de cheval. Les particules de Charcoal et les érythrocytes stimuleraient la phagocytose, la croissance et la division cellulaire des trophozoïtes (Penland and Wilhelmus 1997).

- Milieux spécifiques

Pour améliorer les performances de croissance ou pour faciliter l'identification des espèces, différents milieux plus complexes ont été mis au point. Des vitamines, acides aminés, nucléotides, *etc...* sont ajoutés au milieu de base. Byers crée les milieux DGM-21A et DGM-21B pour permettre une croissance optimale d'*Acanthamoeba* (temps de génération de 13 à 16 heures et une concentration en cellule de 2×10^6 à 3×10^6) (Byers, Akins et al. 1980; Schuster 2002).

II.5.2 Le mode opératoire

Les biopsies, les grattages et les lentilles sont déposés au centre de la gélose ou inoculés lorsque le milieu est liquide. Les liquides de conservation sont centrifugés ou filtrés avec ensemencement du culot ou du filtre.

L'incubation peut se faire entre **22 et 35° C sous atmosphère humide**, 30° C étant la température optimale. Les boîtes de gélose sont généralement fermées par du parafilm pour éviter la dessiccation. Les amibes migrent progressivement en utilisant les bactéries comme nourriture. Puis les trophozoïtes se transforment en kystes lorsque la quantité de bactéries devient trop faible. Une nappe est alors visible à l'œil nu après quelques jours ou semaines de culture. L'observation des cultures se fait directement par microscopie inversée. Une culture doit être observée tous les jours pendant les quinze premiers jours puis deux fois par semaine pendant les quinze jours suivants. Lorsque le prélèvement est fortement positif, les

trophozoïtes et/ou les kystes sont visibles rapidement, c'est-à-dire entre 48 et 72 heures après l'ensemencement. Un résultat négatif ne peut être rendu au clinicien qu'au bout de **quatre semaines** (Illingworth and Cook 1998; Marciano-Cabral and Cabral 2003). L'identification du genre *Acanthamoeba* repose sur la mobilité lente des trophozoïtes par les pseudopodes, la présence d'acanthopodes, la présence de vacuoles contractiles dans le cytoplasme, la formation de kystes. L'identification de l'espèce nécessite une étude approfondie des caractéristiques morphologiques et culturelles de l'amibe isolée qui reste l'apanage des laboratoires spécialisés (Pussard and Pons 1977; Illingworth and Cook 1998).

La **sensibilité** de la méthode de diagnostic varie beaucoup selon les publications : de 7 à 95,2 % (Penland and Wilhelmus 1997; Pasricha, Sharma et al. 2003; Yera, Zamfir et al. 2007). Ce manque de sensibilité a conduit de nombreuses équipes de recherche à développer les méthodes de diagnostic moléculaire.

Un exemple de mode opératoire est donné dans le Bioforma 1998 : Cahier de Formation – Amibes et flagellés intestinaux (annexe n°2).

Les examens directs et la culture dans le cadre du diagnostic de kératite amibienne sont les techniques utilisées dans la grande majorité des laboratoires. Elles sont longues, délicates et nécessitent des observateurs expérimentés.

II.6 Les méthodes de diagnostic moléculaire

Face à l'importance d'un diagnostic rapide pour obtenir un meilleur pronostic de cette pathologie, des techniques de biologie moléculaire commencent à être mises au point dès 1992 (Vodkin, Howe et al. 1992). Elles tentent de palier au manque de sensibilité de la culture des prélèvements de cornée, de rapidité des rendus de résultats au clinicien et de précision dans le typage de l'espèce en cause.

La technique de PCR est la plus utilisée. D'autres méthodes sont également décrites (Restriction Fragment Length Polymorphism ou RFLP, Fluorescence InSitu Hybridation ou FISH, séquençage, ELISA...).

II.6.1 Rappels sur la technique de PCR

La PCR est une réaction de polymérisation en chaîne permettant l'amplification d'une séquence d'ADN d'intérêt grâce à une **Taq polymérase**. Elle est réalisée dans un mélange réactionnel ou mix. Il comprend l'extrait d'ADN, la Taq polymérase, les amorces et les quatre désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP) en excès dans une solution tampon. Du **MgCl₂** est ajouté au mix. En effet, sa concentration conditionne l'hybridation des deux brins d'ADN car l'ion Mg^{2+} interagit avec les charges négatives de la chaîne d'ADN, limitant les formes de répulsion entre les brins. L'augmentation de la concentration de MgCl₂ diminue la spécificité des amorces et augmente la sensibilité de la PCR. Il est donc important de faire varier ce paramètre lors de l'optimisation des conditions d'amplification.

Les tubes contenant le mélange réactionnel sont soumis à des cycles de température réitérés plusieurs dizaines de fois dans le bloc chauffant d'un thermocycleur.

Chaque cycle comprend trois étapes : la dénaturation, l'hybridation et l'élongation. La **dénaturation** s'effectue à une température voisine de 95° C. À cette température, les ADN double-brin se séparent en ADN simple-brin (ADN monocaténares). L'**hybridation** s'effectue à une température variable, déterminée par le T_m des amorces utilisées de manière à ce qu'elles s'hybrident sur les brins d'ADN matriciel. Plus la température d'hybridation est élevée, plus l'hybridation sera sélective, donc plus elle sera spécifique. L'étape d'**élongation** se réalise à 72° C, température optimale pour la synthèse d'ADN par la Taq polymérase. L'enzyme se lie aux ADN monocaténares à la suite des amorces. Les régions de l'ADN matriciel en aval des amorces sont ainsi sélectivement synthétisées. Au cycle suivant, les fragments synthétisés servent à leur tour de matrice et au bout de quelques cycles, l'espèce prédominante correspond à la séquence d'ADN comprise entre les régions où les amorces s'hybrident.

La **détection** et l'analyse des produits d'amplification d'une PCR (la ou les séquences d'ADN d'intérêt) peuvent être réalisées par électrophorèse sur gel d'agarose ou d'acrylamide. Ils sont séparés selon leur nombre de paires de bases et ensuite repérés par transluminescence grâce au bromure d'éthidium, agent intercalant visible en ultraviolet.

Une autre méthode de détection consiste à utiliser de la fluorescence émise par des fluorophores pour mesurer en continu durant toute l'amplification la quantité d'ADN présent dans le tube réactionnel. Il s'agit alors d'une **PCR en temps réel** qui réalise une détection, non plus en point final, mais tout au long de la réaction d'amplification. Cette technique a l'avantage de limiter les contaminations post-PCR car les tubes ne sont plus ouverts au moment du dépôt en gel d'électrophorèse. Elle est également beaucoup plus rapide puisque l'amplification et la détection sont réalisées en même temps. Enfin, elle permet de réaliser une quantification de l'ADN de départ.

Différentes chimies ont été développées :

- Le système FRET®
- Les sondes d'hydrolyse ou sondes TaqMan®
- La technologie SYBR Green® (chimie retenue pour notre étude)

Cette dernière utilise des molécules de SYBR Green® qui s'intercalent entre deux brins d'ADN (figure n°7). Sa forme libre est très faiblement fluorescente, alors que sa forme liée à l'ADN lui permet d'émettre, après excitation, une fluorescence intense.

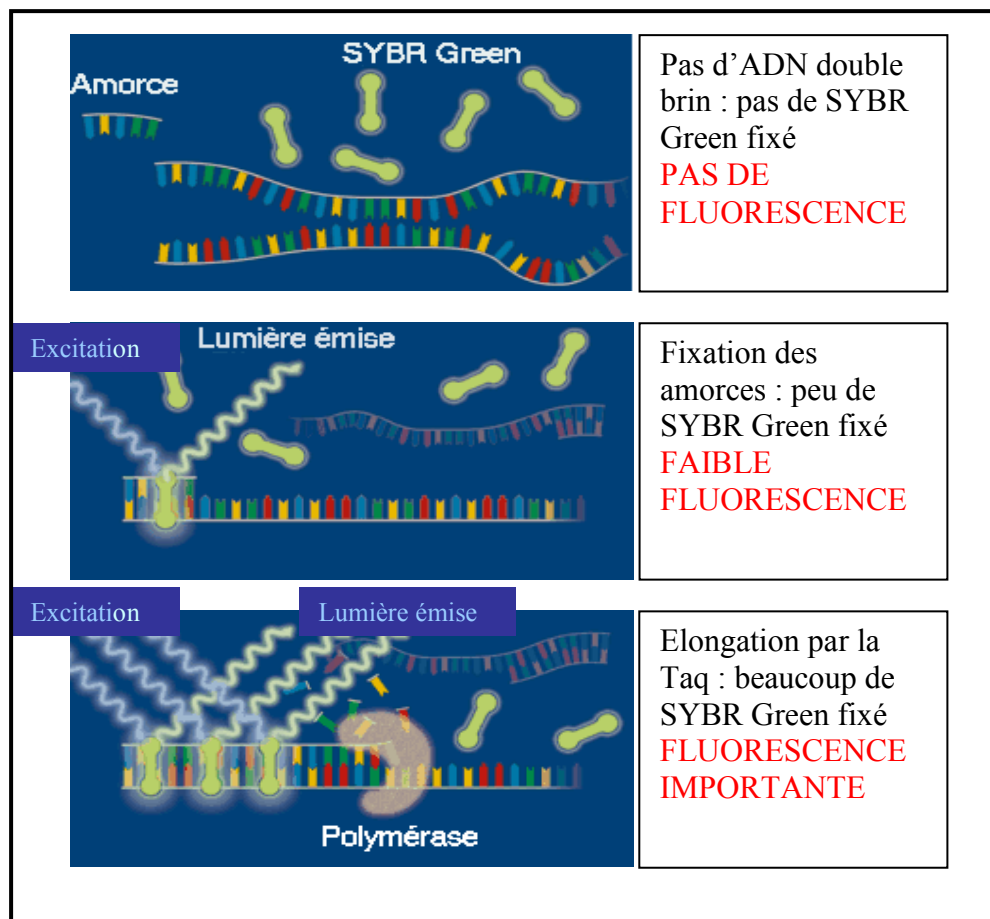


Figure n° 7 : Schéma du principe de la PCR par la technologie SYBR Green®

Cette technique n'est pas spécifique à 100% puisque le fluorophore peut se lier au niveau d'autres doubles brins d'ADN, présents dans notre tube de réaction. Ainsi des dimers de primers (amorces hybridées entre elles) sont classiquement détectés en fin d'amplification dans les tubes négatifs. En pratique, c'est notre couple d'amorces qui définit la spécificité de la technique. Pour palier au manque de spécificité de la technologie SYBR Green®, on réalise en fin d'amplification **une courbe de fusion** : la température de la réaction est augmentée progressivement de 60 à 100°C et on enregistre la fluorescence. On définit alors le **T_m (melting temperature)** comme étant la température pour laquelle un brin d'ADN se trouve à 50% sous forme double brin et à 50% sous forme simple brin. Il est caractéristique du brin d'ADN dénaturé car fonction de sa composition en base (ATGC). Si une mutation survient sur un brin d'ADN, même d'un seul nucléotide, son T_m sera différent (figure n 8).

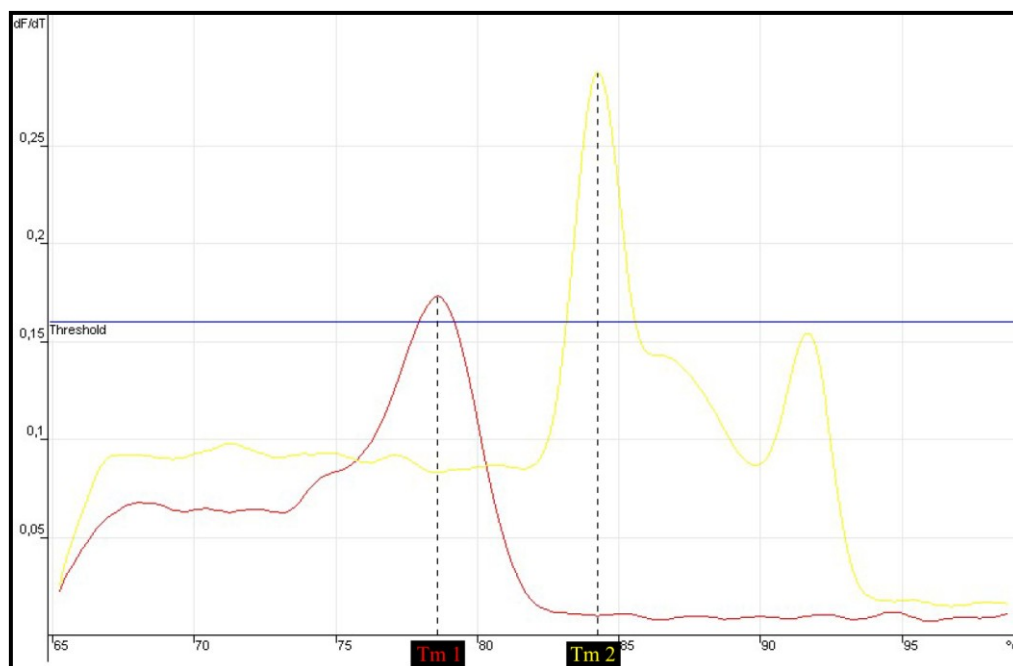


Figure n° 8 : Exemple de détermination de Tm sur une courbe de fusion

II.6.2 Détection du génome d'*Acanthamoeba* dans le cadre du diagnostic de kératite amibienne

• L'extraction

Trois principales **techniques d'extraction** sont utilisées dans la littérature.

La première est celle utilisée par Schroeder en 2001 : elle consiste à prélyser les cellules d'amibes grâce au tampon UNISSET et du phénol-chloroform-isoamyl alcool puis à réaliser une technique d'extraction d'ADN de cellules eucaryotes classiques (précipitation à l'éthanol, reprise de l'ADN dans l'eau distillée) (Schroeder, Booton et al. 2001). La deuxième méthode, couple une prélyse par la protéinase K à 56° C pendant 2 à 16 heures et une extraction utilisant un kit commercial (Booton, Kelly et al. 2002; Qvarnstrom, Visvesvara et al. 2006). Enfin, Mathers propose une prélyse des cellules avec du NaOH 0.1M à 100°C pendant 3 à 5 minutes (Mathers, Nelson et al. 2000; Zamfir, Yera et al. 2006).

Goldschmidt vient récemment de montrer que ces méthodes ne sont pas équivalentes et que la prélyse à l'aide de protéinase K suivie d'une extraction est la plus efficace.

- L'amplification

Plusieurs techniques ont été développées pour détecter l'amibe. Le **gène nucléaire de l'ARN ribosomal de la sous-unité 18S est le plus utilisé** comme cible des amorces aussi bien dans le diagnostic de kératites que dans les G.A.E. Sa taille est d'environ 2300 paires de bases (Ledee, Hay et al. 1996). Il s'agit d'un **gène multi-copie**, répété approximativement 600 fois au sein de chaque cellule (Qvarnstrom, Visvesvara et al. 2006). Le gène de l'ARN ribosomal de la sous-unité 16S peut également être le support de détection. Mais pour l'instant, à notre connaissance, ce dernier n'est décrit que pour la mise en évidence d'*Acanthamoeba* dans les G.A.E (Ledee, Booton et al. 2003).

Nous avons listé les principales amorces décrites (annexe n°3). Le couple d'amorce JDP1 et JDP2 est utilisé par le plus grand nombre d'équipes. Il est développé par Schroeder en 2001 (Schroeder, Booton et al. 2001). Selon l'auteur, ces amorces sont capables de **détecter tous les génotypes d'*Acanthamoeba* connus**.

Les équipes réalisent majoritairement des PCR classiques avec révélation en gel d'agarose. Seulement trois auteurs ont mis au point une PCR en temps réel avec sonde. Aucune publication ne décrit de diagnostic avec la technologie SYBR Green®.

- Résultats et performances

La **spécificité** vis-à-vis d'autres genres varie d'un couple d'amorces à un autre. Par exemple, les séquences amplifiées par les amorces Nelson sont communes à plusieurs amibes – le genre *Balamuthia*, *Hartmannella*, *Naegleria* – pouvant donc donner des réactions croisées (Schroeder, Booton et al. 2001; Zamfir, Yera et al. 2006). Les amorces JDP1 et JDP2 conçues par Schroeder amplifient une région qu'il appelle ASA.S1 (pour *Acanthamoeba*-specific-amplimer S1). Cette région n'est présente dans aucun des contrôles bactériens (*Pseudomonas*), fongiques (*Fusarium* et *Helminthes*), amibiens (*Hartmannella*, *Naegleria*, *Leptomyxa*, et *Balamuthia*) et humains (culture de cellules humaines HeLa)

utilisés par l'auteur. Pasricha le confirme et obtient une spécificité de 97,8 % par rapport à la culture (Pasricha, Sharma et al. 2003).

La **sensibilité** de la technique de PCR permet la détection de quelques trophozoïtes ou kystes à moins de un selon les publications (Schroeder, Booton et al. 2001; Qvarnstrom, Visvesvara et al. 2006; Riviere, Szczebara et al. 2006; Yera, Zamfir et al. 2007; Goldschmidt, Degorge et al. 2008). Cependant, la performance des différentes amorces par rapport au diagnostic clinique n'est pas équivalente. Ainsi, la comparaison de la PCR avec le diagnostic par microscopie confocale montre une sensibilité respectivement de 54%, 54% et 85% pour les amorces Vodkin, Lehmann et Nelson (Mathers, Nelson et al. 2000). Yera, associant les PCR Nelson et JDP, détecte le génome d'*Acanthamoeba* dans 94% de cas de kératites amibiennes (Yera, Zamfir et al. 2007). L'étude de l'intérêt de la PCR par rapport à la culture donne des résultats disparates. Par exemple, pour les amorces JDP, Drivya ne compte que 27% de sensibilité alors que Pasricha donne 84,2% (Pasricha, Sharma et al. 2003; Dhivya, Madhavan et al. 2007).

Les auteurs sont néanmoins unanimes dans toutes les publications pour constater **l'intérêt de la PCR par rapport à la culture** dans le diagnostic de kératite amibienne, tant par son gain en sensibilité qu'en délai de rendu des résultats (Lehmann, Green et al. 1998; Pasricha, Sharma et al. 2003; Yera, Zamfir et al. 2007).

La technique de PCR dans le diagnostic de kératite amibienne permet une détection rapide et sensible d'*Acanthamoeba*.

II.7 Le diagnostic de kératite amibienne au C.H.U de Nantes

Lors d'une suspicion de kératite amibienne chez un patient vu en consultation, deux prélèvements de cornée à l'écouvillon sont réalisés : l'un envoyé au laboratoire de Bactériologie, l'autre au laboratoire de Parasitologie pour la recherche par culture d'amibes libres. Pour les porteurs de lentilles de contact, leurs lentilles, leur étui ainsi que le produit d'entretien sont souvent envoyés pour une recherche amibienne. Les biopsies ne sont que très rarement réalisées et jamais en première intention. L'examen anatomo-pathologique ne

fait donc pas partie du bilan diagnostique initial. Le service d'Ophtalmologie ne dispose pas d'appareillage permettant un diagnostic par microscopie confocale.

Au laboratoire de Parasitologie, aucun examen direct n'est effectué sur les prélèvements. Le diagnostic de kératite amibienne par culture monoxénique sur gélose Agar est réalisé depuis 2001. Les écouvillons, les lentilles et le produit d'entretien sont ensemencés selon le mode opératoire de l'annexe n°4. Les milieux solides d'Agar sont préparés au laboratoire (annexe n°5). Les boîtes de culture sont examinées une fois par semaine au microscope inversé par deux personnes différentes. Pour chaque boîte la surface de la gélose doit être minutieusement balayée dans son intégralité. La lecture de l'ensemble des prélèvements en cours au laboratoire nécessite donc plusieurs heures. Elles sont observées pendant un mois minimum au bout duquel un résultat négatif peut être rendu au clinicien. Exception faite des rares prélèvements fortement positifs, la majorité des ensemencements sont gardés un mois voire plus en cas de doute ou de lecture discordante. Seul le diagnostic de genre est réalisé au laboratoire sur des critères morphologiques. C'est donc une analyse longue et relativement fastidieuse. Aucune technique de biologie moléculaire n'a pour l'instant été utilisée au laboratoire.

Au C.H.U de Nantes, le diagnostic de kératite amibienne repose sur l'examen clinique et sur la recherche par culture d'<i>Acanthamoeba</i>.
--

Matériels et méthodes

Le but de notre étude est de mettre en place une technique de PCR au laboratoire de Parasitologie pour la détection rapide du génome d'*Acanthamoeba* dans le cadre du diagnostic des kératites amibiennes. Pour cela nous avons utilisé deux couples d'amorces décrites dans la littérature : JDP et Nelson. Cette PCR est réalisée en temps réel avec une technologie SYBR Green®. La seconde partie de cette thèse détaille les étapes de mise au point et d'optimisation, de validation et de comparaison avec la culture de la technique de PCR. Nous en déterminerons ainsi les intérêts et les limites.

I MATRIELS : LES ECHANTILLONS PATIENTS

Les échantillons proviennent de **patients vus en consultation d’Ophtalmologie** au C.H.U de Nantes. Ils ont été reçus au laboratoire de Parasitologie pour une recherche de kératite amibienne entre octobre 2006 et mars 2008. Ainsi, 28 patients répartis en 61 prélèvements sont inclus dans notre étude, soit :

- 12 liquides de conservation ;
- 26 lentilles ou étuis de lentilles ;
- 23  couvillons de cornée.

Sept patients présentent une kératite   *Acanthamoeba* objectiv e par la culture. Tous sont porteurs de lentilles de contact souples. Sur les 28 patients de notre étude, 26 sont porteurs de lentilles de contact. Pour 25 patients il s’agit de lentilles souples et un patient de lentilles rigides.

Un protocole de prise en charge des prélèvements a permis d’en congeler une partie pour la réalisation de la PCR rétrospectivement puis prospectivement sans diminuer la qualité de la mise en culture (annexe n 6). Trois types de prélèvements sont classiquement envoyés au laboratoire : les lentilles des patients et leur étui, le liquide de lavage des lentilles et les écouvillons des cornées. Pour les écouvillons, seuls prélèvements non divisibles, la PCR est effectuée sur ceux envoyés en Bactériologie.

61 prélèvements provenant de 28 patients sont inclus dans notre étude.

II METHODES

II.1 Identification d'*Acanthamoeba* par culture

Pour notre étude, nous n'avons en rien modifié le mode opératoire habituel du laboratoire de la culture d'amibes libres (annexe n°4). Les résultats utilisés pour la comparaison avec la PCR en rétrospectif et prospectif sont ceux rendus aux cliniciens.

II.2 Identification d'*Acanthamoeba* par technique de PCR

II.2.1 Les témoins

Dans le but de s'assurer du bon déroulement des différentes étapes du diagnostic par PCR, des témoins négatifs, positifs et d'inhibitions sont nécessaires.

Un témoin d'extraction négatif contenant 100µL d'eau PPI est inclus dans chaque série – aussi bien lors de la mise au point de la technique qu'avec les échantillons patients – pour s'assurer qu'il n'y ait pas de contamination intra-série et que tous les échantillons retrouvés positifs contiennent effectivement du génome d'*Acanthamoeba*.

Les témoins positifs sont constitués d'une suspension d'environ 100 kystes. Ils sont obtenus à partir de 10 µL d'une même suspension-mère de 10 kystes/µL et placés dans 90 µL d'eau PPI. La suspension-mère est réalisée par écouvillonnage d'une culture sur boîte d'*Acanthamoeba* et numérotée grâce à une cellule de Kova. Ce témoin est utilisé comme contrôle positif d'extraction et d'amplification. Il s'agit d'un *Acanthamoeba polyphaga* identifié par séquençage avec 99 % d'homologie pour une séquence de 438 paires de bases.

Les témoins « un kyste » sont utilisés dans la mise au point de la PCR. Ils sont constitués d'un seul kyste d'*Acanthamoeba* prélevé sous un microscope inversé à partir d'une culture sur boîte. Ce prélèvement est réalisé grâce à une micro-pipette obtenue par double effilure d'une pipette Pasteur en verre. Il est placé dans 100 µL d'eau PPI.

Les témoins d'inhibition servent à contrôler que le prélèvement ne contient pas de produit empêchant toute amplification, le risque étant de rendre un résultat faussement

négatif. Pour cela, 1µL d'extrait d'ADN d'*Acanthamoeba* est mélangé à l'extrait patient et amplifié en parallèle de l'extrait seul. Un témoin d'inhibition négatif révèle la présence d'un inhibiteur dans le prélèvement. Aucun résultat ne pourra être rendu sur ce prélèvement.

Chaque extraction d'échantillon patient s'accompagne de l'extraction d'un témoin négatif et d'un témoin positif en parallèle. A chaque série de PCR, un témoin négatif et un témoin positif sont amplifiés. Chaque amplification d'extrait patient est couplée à un témoin inhibiteur.

II.2.2 La méthode d'extraction de l'ADN

L'extraction du génome de l'amibe à partir des prélèvements nécessite trois étapes :

- la récupération des kystes ou trophozoïtes éventuellement présents sur l'écouvillon, la lentille ou dans le liquide de conservation. Le protocole mis en place tente de récupérer un maximum d'amibes (annexe n°7) ;
- la prélyse effectuée à 56°C pendant deux à trois heures par la protéinase K du coffret Nucleospin® Tissue (Macherey-Nagel Hoerd, France) (annexe n°8) ;
- l'extraction proprement dite grâce au coffret Nucleospin® Tissue (annexe n°9).

II.2.3 L'amplification

• L'appareillage

Un Rotorgene 3000® (Crobett Research, Australia) permet de réaliser les PCR au laboratoire. L'automate est constitué de deux unités :

- un thermocycleur qui assure les changements de température grâce à un système d'air pulsé ;
- un spectrofluorimètre de type LED (Light Emitting Diode) qui mesure la fluorescence émise.

Cette fluorescence mesurée à chaque cycle d'amplification est proportionnelle à la quantité d'ADN générée pendant la PCR. Pour faciliter l'exploitation des résultats, on exprime le nombre de cycles non pas en fonction de la fluorescence (ou quantité d'ADN) mais en fonction du log de la fluorescence. Seule la phase exponentielle étant représentative du nombre de copies initial d'ADN, on définit un seuil arbitraire ou threshold, au début de la phase exponentielle, pour lequel le signal d'amplification de tous les ADN de l'expérience sortent du bruit de fond (figure n°9). Ce moment correspond à un certain nombre de cycles et est appelé temps Ct (threshold cycle). Ce Ct sera directement fonction du nombre de copies d'ADN initialement présent dans le milieu réactionnel (plus la quantité de départ est importante, plus Ct est petit)

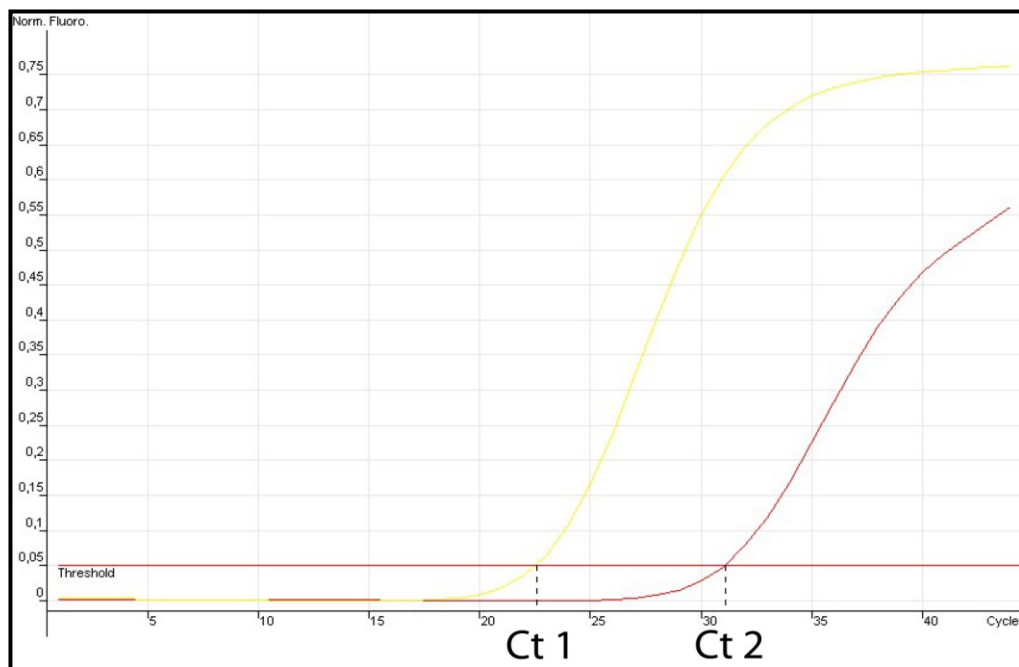


Figure n° 9 : Exemple de détermination d'un Ct sur une courbe de fluorescence

- Les amorces

Deux couples d'amorces sont utilisés et testés pour le diagnostic de kératite amibienne. Elles amplifient toutes les deux une portion du gène nucléaire de l'ARN ribosomal de la sous-unité 18S (annexe n 9) :

- les amorces JDP décrites par Schoeder. Le logiciel Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) permet de supposer qu'elles sont spécifiques du genre *Acanthamoeba* car toutes les propositions d'alignement correspondent à ce genre (Schroeder, Booton et al. 2001).

JDP1 5' GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA 3'	450 paires de bases
JDP2 5' TCTCACAAGCTGCTAGGGAGTCA 3'	

- Les amorces Nelson décrites par Mathers. Elles semblent peu spécifiques du genre car Blast propose des possibilités d'alignement avec le génome de nombreux autres genres (Mathers, Nelson et al. 2000).

5' GTT TGA GGC AAT AAC AGG T 3'	230 paires de bases
5' GAA TTC CTC GTT GAA GAT 3'	

- Le mélange réactionnel

La PCR en temps réel est réalisée grâce au SYBR[ ] Premix Ex Taq de chez Takara, Lonza. Il est commercialisé sous une forme prête à l'emploi contenant une concentration *a priori* optimale de MgCl₂, de désoxynucléotides et de Taq Polymérase.

Il n'y a donc à ajouter au mix que les amorces, l'eau et l'extrait d'ADN.

Le mix est constitué ainsi :

	volumes	concentration finale
SYBR Green®	10 µL	1 X
Amorces sens (10µM)	0,4 µL	0,2 µM
Amorces anti-sens (10µM)	0,4 µL	0,2 µM
eau	4,2 µL	
ADN	5 µL	

Tableau n° 2 : Composition du mix utilisé pour les PCR

Les cycles d'amplification de PCR utilisés sont :

- 50° C pendant deux minutes ;
- 95° C pendant trois minutes ;
- puis 45 cycles comprenant :
 - une dénaturation à 95°C pendant 15 secondes ;
 - une hybridation à 58°C pour JDP et à 57°C pour Nelson pendant 30 secondes ;
 - une élongation à 72 °C pendant 30 secondes ;
- enfin 50°C pendant une minute.

La PCR est réalisée en temps réel grâce à la technologie SYBR Green® sur un Rotorgene 3000® soit avec les amorces JDP, soit avec les amorces Nelson.

II.2.4 L'électrophorèse en gel d'agarose

A la suite de certaines de nos PCR en temps réel, nous avons eu besoin de connaître la composition de notre produit d'amplification par électrophorèse. Nous utilisons un gel à 2,5 %. Les fragments amplifiés avec les amorces Nelson font environ 230 paires de bases. Ceux obtenus avec les amorces JDP sont d'environ 450 paires de bases.

Le principe du séquençage – ou détermination de la séquence nucléotidique d'un brin d'ADN – repose sur l'incorporation au cours d'une amplification par PCR de didéoxynucléotides (ddNTP). Ces nucléotides particuliers n'ont pas de groupement hydroxyle sur leur carbone 3'. La liaison phosphodiester avec un autre nucléotide est donc impossible. En fin de PCR, le produit d'amplification est constitué d'un ensemble de brins d'ADN dont la taille ne diffère que d'un nucléotide.

Dans notre étude, nous avons utilisé un ABI PrismR 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Cet appareil analyse les brins d'ADN séquencés grâce à une technologie de fluorescence. Ainsi, quatre fluorochromes différents marquent les ddNTP A, T, C et G. Par migration capillaire, les fragments sont séparés selon leur taille et passent ensuite devant un détecteur de fluorescence qui enregistre l'ordre de passage des quatre fluorochromes.

Après analyse par un logiciel d'interprétation, le Seq Scape V 2.5, on obtient un chromatogramme représentant la séquence nucléotidique du brin d'ADN étudié. Le logiciel Blast permet d'identifier les espèces correspondant à cette séquence.

Résultats

I OPTIMISATION DES CONDITIONS DE PCR

I.1 Essais préliminaires

Pour mettre en place notre technique de PCR, nous nous sommes appuyés sur le protocole utilisé au laboratoire de Biologie du Centre National d’Ophtalmologie des Quinze-Vingt à Paris pour le diagnostic des kératites amibiennes par PCR.

Il préconise une prélyse à la soude 1 N pendant 5 minutes à 100°C. Puis une extraction de l’ADN avec le QIA Amp DNA Mini Kit[®].

Le mix est constitué selon le tableau suivant :

	volumes	concentration finale
Tampon 10X	5 µL	1X
MgCl ₂ 25 mM	5 µL	2,5 mM
Amorces sens (10µM)	1 µL	0,2 µM
Amorces anti-sens (10µM)	1 µL	0,2 µM
DNTP (A, T, G, C) 20mM total	2 µL	800 µM
Ampli Taq Gold 5U/µL (Applera)	0,6 µL	3 U
eau	25,4 µL	
ADN	10 µL	

Tableau n° 3 : Composition du mix utilisé par le Laboratoire des Quinze-Vingt pour le diagnostic des kératites amibiennes par PCR

Enfin une amplification de 44 cycles comprenant 3 paliers :

- 94° C pendant 30 secondes
- 58°C pendant 40 secondes
- 72°C pendant 40 secondes

Les paliers sont précédés de 5 minutes à 94° C et suivis de 15 minutes à 72° C.

La révélation est faite en gel à 2,5 % d’agarose en tampon TBE.

Les deux amorces JDP et Nelson sont alors testées en même temps.

Le protocole parisien a tout d'abord été suivi à la lettre. Les premiers essais se sont avérés infructueux et ce malgré quelques modifications apportées par la suite :

- extraction de trophozoïtes et non de kystes (les kystes étant beaucoup plus résistants);
- prélyse avec la protéinase K du coffret Nucléospin[®] tissue et non à la soude 1N ;
- modification de la température d'hybridation (55°C au lieu de 58°C) suite à la publication de Zamfir en novembre 2006(Zamfir, Yera et al. 2006).

Aucun de ces changements n'a permis d'obtenir un produit de PCR. Nous décidons alors d'effectuer nos PCR en temps réel avec un technologie SYBR Green[®] car elle permet un gain de temps important et minimise les sources d'erreur et de contamination. La mise au point serait ainsi facilitée.

Un produit de PCR est alors obtenu dès le premier essai pour les deux amorces. Nous décidons donc de conserver cette technologie : les conditions de notre PCR étant une adaptation en temps réel de la PCR classique faite par l'équipe d'Hélène Yera et de Zamfir (Zamfir, Yera et al. 2006; Yera, Zamfir et al. 2007).

I.2 Optimisation des conditions d'extraction

Nous nous sommes demandés quelles conditions d'extraction permettaient d'obtenir le maximum de génome amibien. Nous avons donc testé deux types de prélyse : celle utilisée par Yera avec de la soude 1N à 100°C (Yera, Zamfir et al. 2007) et celle préconisée par le mode opératoire du coffret Nucléospin[®] Tissue avec l'incubation à 56°C avec la Protéinase K.

D'autre part, les kystes d'amibes étant capables de résister à un environnement particulièrement agressif, nous avons pensé que la forme kystique résistait peut-être beaucoup plus à la prélyse que la forme trophozoïte. Pour cela, nous avons effectué les deux types de prélyse sur un échantillon contenant en majorité des trophozoïtes (écouvillonnage d'une culture fraîche d'*Acanthamoeba*) et sur un échantillon contenant principalement des

kystes (écouvillonnage d'une culture ancienne d'*Acanthamoeba*). Nous avons choisi de réaliser la PCR avec les amorces JDP (tableau n°4).

	Prélyse NaOH 1N		Prélyse Protéinase K	
	Kystes (Ct)	Trophozoïtes (Ct)	Kystes (Ct)	Trophozoïtes (Ct)
Essai n°1	25,04	24,33	21,38	17,14
Essai n°2	25,45	25,13	21,39	17,44
Essai n°3	24,21	24,9	21,45	17,75

Tableau n° 4 : Résultats de l'optimisation des conditions d'extraction

Au vu de ces résultats, nous avons retenu la prélyse conseillée par le mode opératoire Nucleospin® Tissue. Par ailleurs, il apparaît qu'à partir des formes kystiques, la quantité d'ADN obtenue est moins importante. La validation de la technique de diagnostic par PCR se fera toujours sur une suspension de kystes car elle est plus facilement réalisable et manipulable.

La prélyse Nucléospin® utilisant la Protéinase K pendant deux heures à 56°C semble plus efficace que la prélyse à la soude 1 N à 100°C pendant 5 minutes dans nos conditions opératoires.

I.3 Optimisation de la concentration en MgCl₂

Le SYBR Green® Takara contient *a priori* la concentration optimale de MgCl₂. Nous avons préféré nous en assurer en testant un même extrait d'un témoin « un kyste » avec différentes concentrations de MgCl₂. La concentration initiale dans le SYBR Green® Takara n'est pas connue précisément (information non divulguée par le fabricant). Elle se

situé aux alentours de 1 mM. Nous avons réalisé trois PCR en ajoutant respectivement 0, 0,03 et 0,06 mmol de $MgCl_2$. Les Ct obtenus sur cinq essais différents sont présentés dans le tableau n°5.

	Ct en fonction de la concentration en $MgCl_2$					
	PCR JDP			PCR Nelson		
	Sans ajout de $MgCl_2$	+ 0,03 mmol de $MgCl_2$	+ 0,06 mmol de $MgCl_2$	Sans ajout de $MgCl_2$	+ 0,03 mmol de $MgCl_2$	+ 0,06 mmol de $MgCl_2$
Essai n°1	32,43	33,42	35,71	31,12	29,81	32,10
Essai n°2	31,48	33,78	35,32	31,08	31,06	33,13
Essai n°3	33,97	33,81	36,91	31,23	32,63	30,90
Essai n°4	35,93	32,38	34,47	33,28	31,37	34,07
Essai n°5	31,78	32,72	35,01	31,33	31,20	30,17

Tableau n° 5 : Résultats de l'optimisation de la concentration en $MgCl_2$

Pour une PCR effectuée avec les amorces JDP, la concentration initiale en $MgCl_2$ permet d'obtenir une détection plus précoce (Ct un peu plus faibles).

Pour les amorces Nelson, les différentes concentrations en $MgCl_2$ ne semblent pas modifier significativement les Ct. La concentration la plus faible sera utilisée car elle minimise les amplifications non spécifiques fréquentes avec ce couple d'amorce.

La concentration optimale en $MgCl_2$ pour l'amplification avec JDP et Nelson est celle du mix initial de SYBR Green[®] sans ajout de $MgCl_2$.

I.4 Optimisation de la température d'hybridation

L'extrait d'un témoin « un kyste » est utilisé pour connaître la température optimale d'hybridation. Nous avons testé trois températures avec les amorces JDP et Nelson sur cinq passages successifs. Voici les Ct obtenus pour trois températures différentes (tableau n°6) :

	PCR JDP			PCR Nelson		
	58°C	60°C	62°C	53°C	55°C	57°C
Essai n°1	30,41	29,74	30,11	30,99	31,04	33,52
Essai n°2	29,59	29,63	29,60	29,05	32,13	33,00
Essai n°3	30,35	29,45	29,60	29,92	30,20	33,26
Essai n°4	29,97	29,54	30,22	30,16	30,43	32,21
Essai n°5	30,01	29,24	30,04	29,36	31,41	34,44

Tableau n° 6 : Résultats de l'optimisation de la température d'hybridation.

La température d'hybridation influence peu le Ct obtenu avec les amorces JDP. La température de 58°C est retenue car elle permet en principe d'obtenir une meilleure sensibilité.

Avec le couple d'amorces Nelson, l'hybridation à 53°C et 55°C donne les meilleurs Ct mais la spécificité est trop faible à ces températures. La température de 57°C est donc retenue.

La température d'hybridation est de 58°C pour la PCR JDP et de 57°C pour les amorces Nelson.
--

II VALIDATION DE LA TECHNIQUE DE PCR

II.1 Essai de répétabilité

L'étude de répétabilité a consisté à passer dans la même série, c'est-à-dire au cours d'une même amplification, cinq fois le même extrait de témoin positif d'environ 100 kystes et le même extrait de témoin « un kyste ». Les coefficients de variation (CV) sont calculés à partir des Ct ainsi obtenus. Ils permettent d'apprécier la répétabilité de la PCR (tableau n°7).

	PCR JDP		PCR Nelson	
	100 kystes	1 kyste	100 kystes	1kyste
Essai n°1	29,56	30,41	28,49	32,58
Essai n°2	29,93	29,59	27,79	31,23
Essai n°3	29,93	30,35	28,49	32,51
Essai n°4	29,68	29,97	28,75	31,17
Essai n°5	29,74	30,01	28,77	30,79
Ecart-type	0,16	0,33	0,42	0,83
CV (%)	0,54	1,10	1,47	2,62

Tableau n° 7 : Résultats de l'étude de répétabilité.

L'amplification avec les amorces JDP et Nelson donne des CV inférieurs à 5 % aussi bien pour des prélèvements riches que pauvres en kystes. La PCR JDP et Nelson présente une bonne répétabilité.

Avec des CV inférieurs à 5%, notre PCR est répétable.

II.2 Essai de reproductibilité

L'étude de reproductibilité a consisté à passer dans cinq séries différentes, cinq fois le même extrait de témoin positif 100 kystes et le même extrait de témoin « un kyste ». Les coefficients de variation (CV) sont calculés à partir des Ct ainsi obtenus. Ils permettent d'apprécier la reproductibilité de la PCR (tableau n°8).

	PCR JDP		PCR Nelson	
	100 kystes	1 kyste	100 kystes	1 kyste
Essai J1	29,76	29,92	27,87	31,82
Essai J2	29,70	29,86	28,89	32,19
Essai J3	29,88	30,27	29,37	31,97
Essai J4	29,64	29,76	28,48	33,15
Essai J5	29,28	30,08	28,97	31,77
Ecart-type	0,10	0,22	0,57	0,57
CV (%)	0,34	0,74	1,98	1,76

Tableau n° 8 : Résultats de l'étude de reproductibilité

L'amplification avec les amorces JDP et Nelson donne des CV inférieurs à 5 %. La PCR JDP et Nelson présente une bonne reproductibilité.

Avec des CV inférieurs à 5%, notre PCR est reproductible.

II.3 Détermination de la sensibilité

II.3.1 Sensibilité de la PCR

Pour tester la sensibilité de la PCR, le témoin positif a été dilué dans l'eau PPI au 1/50, 1/100 et 1/1000. Chaque dilution est testée au cours de dix PCR. La prise d'essai étant de 5 µL d'extrait d'ADN, la sensibilité de la PCR est donc testée sur 0,2 ; 0,05 et 0,005 kyste (la détection peut être faite au-delà d'un kyste car le gène est présent environ 600 fois au sein du génome amibien). Le tableau n°9 représente le nombre de PCR positives par rapport au nombre de PCR totales réalisées.

	PCR JDP	PCR Nelson
0,2 kyste	10/10	10/10
0,05 kyste	10/10	8/10
0,005 kyste	1/10	0/10

Tableau n° 9 : Résultats de la détermination de la sensibilité de la PCR

Notre PCR présente une bonne sensibilité pour un diagnostic de kératite amibienne puisque son seuil de sensibilité est de 0,05 kyste pour les amorces JDP et de 0,2 kyste pour les amorces Nelson par prise d'essai de 5 µL.

II.3.2 Sensibilité de l'extraction

Puisque la sensibilité de l'amplification descend bien au-delà du kyste, elle ne constitue *a priori* pas l'étape pouvant limiter la performance de notre technique. Pour évaluer cette performance sur la globalité de la technique, nous avons extrait et amplifié successivement dix témoins « un kyste ». Cinq des dix témoins ont donné un produit

d'amplification et cinq sont revenus négatifs, quelque soit les amorces utilisées. Par la technique de micromanipulation des kystes, nous sommes certains de n'avoir qu'un seul kyste dans la prise d'essai mais à l'inverse nous ne pouvons pas vérifier qu'il y ait bien été déposé. Ces résultats semblent refléter le caractère aléatoire de notre technique.

La sensibilité de la PCR est respectivement de 0,05 kyste et 0,2 kyste après amplification par les amorces JDP et Nelson. En prenant en compte l'ensemble de la technique, 50% des témoins « un kyste » sont amplifiés par PCR.

II.4 Détermination de la spécificité

Nous avons passé en PCR cinq fois le même extrait des différents pathogènes susceptibles d'être retrouvés au niveau oculaire ou de donner une réaction croisée avec *Acanthamoeba* pour apprécier la spécificité de nos deux amorces. Le tableau n°10 représente le nombre de PCR positives par rapport au nombre de PCR réalisées.

	PCR JDP	PCR Nelson (Tm en °C)
<i>Candida albicans</i>	0/5	5/5 (Tm = 87,8)
<i>Toxoplasma gondii</i>	0/5	3/5 (Tm = 85,2)
<i>Herpes simplex</i>	0/5	0/5
<i>Hartmannella vermiformis</i> (ATCC)	0/5	5/5 (Tm = 79)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC)	0/5	0/5
<i>Serratia marcescens</i>	0/5	0/5

Tableau n° 10 : Résultats de la détermination de la spécificité de la PCR

Dans la littérature, les genres *Naegleria*, *Leptomyxa*, *Balamuthia*, *Fusarium*, *Aspergillus* ainsi qu'une algue du genre *Selenastrum*, ont également été testés avec les amorces JDP. Ils n'ont donné aucun produit d'amplification (Schroeder, Booton et al. 2001; Sharma, Pasricha et al. 2004). Le couple d'amorces JDP est très spécifique du genre *Acanthamoeba*. Par contre le couple d'amorces Nelson est capable d'amplifier d'autres pathogènes : *Candida albicans*, *Toxoplasma gondii*, *Hartmanella vermiformis*.

La spécificité des amorces JDP est très bonne. A l'inverse, les amorces Nelson sont très peu spécifiques d'*Acanthamoeba*.

Les amorces JDP sont très spécifiques du genre *Acanthamoeba* alors que les amorces Nelson ne le sont pas.

Afin d'évaluer les performances de ces deux PCR dans le rendu de résultats par rapport à ceux de la culture habituellement réalisée au laboratoire, nous avons réalisé une étude rétrospective avant d'établir le protocole définitif de diagnostic de kératite amibienne par PCR.

III EVALUATION DES PERFORMANCES DES PCR SUR DES ECHANTILLONS PATIENTS : ETUDE RETROSPECTIVE

L'étude rétrospective consiste à analyser en PCR **les prélèvements de 13 patients différents, c'est-à-dire 23 échantillons**, reçus au laboratoire entre octobre 2006 et août 2007. Les résultats de la culture étaient déjà connus lors de la réalisation de la PCR. Les amorces JDP sont d'abord testées puis les amorces Nelson à 57°C (tableau n°11). Les températures de 55° et 53°C ont été dans un premier temps utilisées pour l'amplification avec les amorces Nelson. Le nombre d'amplifications non spécifiques obtenues chez les patients nous a obligé à augmenter la température jusqu'à 57°C (seuls les résultats à 57°C sont présentés dans ce travail).

Nous avons effectué la PCR sur des patients connus comme étant positifs en culture pour apprécier les rendus de résultats, puis les patients connus comme négatifs, et enfin les prélèvements pour lesquels la culture avait donné lieu à des doutes ou des difficultés d'interprétation en particulier les prélèvements n°1, 2, 3 et 4.

Patient n°	Echantillon n°	Nature des prélèvements	JDP (Tm en °C)	Nelson (Tm en °C)	Culture
I	1	Produit d'entretien	-	≠ (86)	≠
	2	Lentille gauche	-	-	≠
	3	Etui	-	≠ (85,5)	≠
	4	Ecouvillon de cornée	-	≠ (86)	≠
II	5	Produit d'entretien	-	-	-
III	6	Ecouvillon de cornée droite	-	-	-
	7	Lentille gauche	+ (83,9)	+ (90,1)	-
IV	8	Ecouvillon de cornée gauche	+ (83,9)	+ (90,2)	+
	9	Lentille	-	-	-
	10	Produit d'entretien	+ (83,9)	+ (90,3)	-
V	11	Ecouvillon de cornée	-	≠ (86,2)	-
	12	Produit d'entretien	-	-	-
VI	13	Lentille + étui	+ (83,7)	+ (90,1)	+
	14	Produit d'entretien	-	-	-
	15	Ecouvillon de cornée droite	-	-	-
VII	16	Ecouvillon de cornée	-	-	-
VIII	17	Lentille	+ (83,6)	+ (90,0)	+
	18	Produit d'entretien	-	-	-
IX	19	Ecouvillon de cornée	-	-	-
X	20	Ecouvillon de cornée	-	-	-
XI	21	Ecouvillon de cornée	+ (84,4)	+ (89,9)	+
XII	22	Ecouvillon de cornée	+ (84,8)	+ (88,0)	+
XIII	23	Produit d'entretien	+ (83,8)	+ (86,5)	+

+ : Présence d'*Acanthamoeba*, - : culture négative, ≠ : Présence d'un microorganisme différent d'*Acanthamoeba*

Tableau n° 11 : Résultats de la PCR et de la culture lors de l'étude rétrospective.

III.1 Résultats des prélèvements positifs en culture

Tous les prélèvements positifs en culture sont positifs en PCR avec les amorces JDP et Nelson (prélèvements n°8, 13, 17, 21, 22 et 23). Les T_m moyens sont respectivement de 84°C (83,6°C - 84,8°C) et de 89,1°C (86,5°C - 90,2°C). Les T_m sont beaucoup plus dispersés avec les amorces Nelson qu'avec les amorces JDP. Pour les prélèvements n°22 et 23, les T_m de 88°C et 86,5°C, très différents de celui du témoin positif à 90,1°C, nous ont amené à vérifier qu'il s'agissait effectivement d'*Acanthamoeba*. Dans les deux cas l'électrophorèse en gel montrait une bande à environ 230 paires de base (annexe n°10). Le séquençage du n°22 a identifié un *A. hatchetti* avec 99% d'homologie pour un fragment de 262 paires de bases. Le n°23 n'a pas pu être séquencé car il contient un mélange de plusieurs amplicons.

Il est intéressant de noter que le prélèvement n°13 est nettement positif en PCR JDP avec un Ct de 28,79 alors que ce prélèvement contenait très peu d'amibes, la réponse de la culture n'avait pu être rendue au clinicien qu'après 36 jours d'observation.

III.2 Résultats des prélèvements négatifs en culture

Sur les 13 prélèvements négatifs en culture, 10 sont également rendus négatifs avec les deux amorces ; trois sont discordants. Les échantillons n°7 et 10 sont positifs avec les deux couples d'amorces. Les T_m sont respectivement de 83,9°C et 83,7°C pour JDP et 90,1°C et 90,2°C pour Nelson. Après amplification par JDP, le gel d'électrophorèse montre des bandes d'environ 450 paires de bases (annexe n°11). Le séquençage donne pour les deux échantillons *Acanthamoeba polyphaga* ou *Acanthamoeba sp.* S4 avec 100% d'homologie pour un amplicon de 449 paires de bases.

Pour le prélèvement n°11, seule la PCR Nelson est positive avec un T_m à 86,2°C. Le gel d'électrophorèse révèle une bande migrant vers 200 paires de bases (annexe n°10). Le séquençage a permis d'identifier une microalgue *Picochlorum oculatum* (avec 88 % d'homologie pour un fragment de 159 paires de bases) dénuée *a priori* de tout pouvoir pathogène.

III.3 Résultats des prélèvements délicats d'interprétation en culture

Les cultures des prélèvements n°1 à 4 provenant d'un même patient se sont avérées difficiles à interpréter. Au terme d'un mois d'observation, il n'était possible d'identifier sur la gélose que de très rares cellules de morphologie proche des amibes libres mais ne présentant pas les caractéristiques du genre *Acanthamoeba*. Elles ont été répondues au bout de 44 jours de culture : « présence d'amibes libres ». La PCR JDP ne donne aucun produit d'amplification pour ces prélèvements. Il ne s'agit donc pas de prélèvements positifs à *Acanthamoeba*. Avec la PCR Nelson les prélèvements n°1, 3 et 4 sont positifs. Les Tm sont respectivement de 86°C, 85,5°C et 86°C. Sur le gel d'électrophorèse, les produits de PCR migrent un peu avant 230 paires de bases (annexe n°10). Le séquençage permet d'identifier pour le prélèvement n°1 un *Cercomonas plasmodialis* (avec 99% d'homologie pour un fragment de 302 paires de bases), pour le n°3 un *Phalansterium solitarium* (avec 96 % d'homologie pour un fragment de 275 paires de bases), pour le n°4 un *Hibbertia volubilis* (avec 98% d'homologie pour un fragment de 257 paires de bases). Les deux premiers genres sont des protozoaires proches d'*Acanthamoeba* présents dans l'eau, *H. volubilis* est une plante grimpante !

Les résultats de la validation et de l'évaluation des PCR nous ont amené à supprimer les amorces Nelson et à n'utiliser que **les amorces JDP** pour le diagnostic de kératite amibienne par PCR. En effet, l'amplification par le couple d'amorce Nelson donne trop de résultats non spécifiques.

IV APPLICATION DE LA TECHNIQUE DE PCR EN TEMPS REEL DANS LE DIAGNOSTIC DE KERATITE : ETUDE PROSPECTIVE

L'étude prospective a consisté à passer en PCR – **uniquement avec les amorces JDP** – **les prélèvements de 15 patients différents, c'est-à-dire 38 échantillons**, reçus au

laboratoire entre septembre 2007 et mars 2008. Les résultats de la culture ne sont pas connus lors de la réalisation de la PCR (tableau n°12).

Patient n°	Echantillon n°	Nature des prélèvements	JDP (Tm en °C)	Culture
XIV	24	Produit d'entretien n°1	-	-
	25	Produit d'entretien n°2	-	-
	26	Lentille	-	-
	27	Lentille	-	-
XV	28	lentille droite	-	-
	29	lentille gauche	+ (84)	-
XVI	30	lentille-étui droite	-	-
	31	lentille-étui gauche	-	-
	32	Produit d'entretien	-	-
XVII	33	cornée droite	-	-
XVIII	34	cornée gauche	-	-
	35	lentille n°1 droite	-	-
	36	lentille n°1 gauche	-	-
	37	lentille n°2 droite	-	-
	38	lentille n°2 gauche	-	-
XIX	39	cornée droite	-	-
	40	cornée gauche	-	-
	41	lentille n°1 droite	-	-
	42	lentille n°1 gauche	-	-
	43	lentille n°2 droite	-	-
	44	lentille n°2 gauche	-	-
XX	45	Lentille gauche	-	-
	46	Produit d'entretien	-	-
XVII	47	Cornée	-	-
XXI	48	Cornée	-	-
	49	Lentille	+ (83,5)	+
XXII	50	Cornée	-	-
XXIII	51	Cornée	-	-
XIV	52	Cornée	-	-
	53	Lentille-étui gauche	-	-
	54	Lentille-étui droite	-	-
XXV	55	Cornée droite	-	-
	56	Produit d'entretien	-	-
XXVI	57	Lentille-étui droite	-	-
	58	Lentille-étui gauche	-	-
	59	Cornée	-	-
XXVII	60	Cornée	-	-
XXVIII	61	Cornée	-	-

Tableau n° 12 : Résultats de la PCR et de la culture lors de l'étude prospective.

Sur les 37 prélèvements retrouvés négatifs en culture, 36 le sont également en PCR. Le prélèvement n°29, négatif en culture, est très faiblement positif en JDP avec un Ct à 34,5 et un Tm à 84°C. Le gel d'électrophorèse effectué sur le produit d'amplification montre une bande à environ 450 paires de bases (annexe n°11). Le séquençage identifie à *Acanthamoeba griffini* (avec 99% d'homologie pour un fragment de 411 paires de bases).

Un prélèvement est positif à la fois en culture et en PCR : le n°49. Le Tm est de 83,5°C.

Discussion

Le but de notre étude est de mettre en place au laboratoire de Parasitologie-Mycologie du Centre Hospitalo-Universitaire de Nantes, une technique de PCR pour la détection rapide du génome d'*Acanthamoeba* dans le cadre du diagnostic de kératite amibienne puis d'en déterminer les intérêts et les limites et ce, en comparaison avec la méthode utilisée en routine, l'identification par la culture. Pour cela nous avons utilisé deux couples d'amorces décrites dans la littérature : JDP et Nelson. Cette PCR est réalisée en temps réel avec une technologie SYBR Green®.

I CHOIX DE LA TECHNIQUE

Notre travail de mise au point de cette PCR a débuté par le choix des amorces. Face au nombre important de techniques de PCR décrites dans la littérature (annexe n°3), notre choix s'est porté sur les amorces Nelson et JDP pour plusieurs raisons :

- Les amorces JDP sont plus souvent utilisées;
- Elles semblent donner des meilleurs résultats en terme de sensibilité par rapport à la culture et au diagnostic clinique (Pasricha, Sharma et al. 2003);
- L'association des amorces Nelson et JDP permettrait d'obtenir une meilleure sensibilité (Yera, Zamfir et al. 2007);
- Les amorces Nelson pourraient avoir un intérêt dans la mise en évidence d'autres amibes, n'appartenant pas au genre *Acanthamoeba*.

D'autre part, cette technique a été développée selon une méthode de PCR en temps réel avec une technologie SYBR Green® plutôt qu'une PCR classique (les publications décrivent une PCR classique avec révélation en gel d'agarose pour ces deux couples d'amorces) car elle présente de multiples avantages :

- Diminution des risques de contamination en post-amplification grâce à la révélation en temps réel (il n'y a pas de manipulation des amplicons pour les dépôts sur gel d'électrophorèse) ;

- Rapidité d'obtention des résultats puisque les étapes d'amplification et de révélation sont simultanées.

Après une validation technique des PCR Nelson et JDP, une étude rétrospective a permis d'affiner notre protocole en comparant les résultats des deux PCR à ceux de la culture. Elle nous a conduit à **retenir uniquement la PCR JDP pour ce diagnostic**. Ensuite, dans l'étude prospective, la PCR JDP est évaluée par rapport à la culture.

II ANALYSE DES RESULTATS DE LA PCR NELSON : CRITERES D'EXCLUSION DE CE COUPLE D'AMORCES

Si la validation technique de cette PCR montre une bonne reproductibilité et répétabilité avec un coefficient de variation inférieur à 5% pour des prélèvements pauvres et riches en kystes, la **spécificité** est apparue beaucoup plus **faible** par rapport à ce que la littérature laissait envisager. Lors de la validation technique, nous avons mis en évidence une amplification avec les témoins *Candida albicans*, *Hartmannella vermiformis* et *Toxoplasma gondii*. Malgré cet évident manque de spécificité, nous avons voulu évaluer cette PCR dans le but obtenir une aide au diagnostic des cultures douteuses et mettre en évidence d'autres pathogènes. Ainsi, dans le cas des prélèvements n°1 à 4, nous pensions identifier d'autres amibes libres différentes d'*Acanthamoeba* grâce à ce couple d'amorces. L'étude rétrospective confirme le manque de spécificité de nos résultats de validation technique. L'analyse des prélèvements négatifs de l'étude rétrospective montre que les amorces Nelson conduisent à de nombreuses amplifications non spécifiques dues à des microorganismes de l'environnement non pathogènes. Les résultats de la PCR Nelson sont ininterprétables sans électrophorèse en gel et séquençage de ces produits d'amplification. Dans la littérature, seul Zamfir évoque un problème de faux positif (Zamfir, Yera et al. 2006). Mathers travaille à 65°C ; il doit ainsi certainement s'affranchir de toute réaction croisée (Mathers, Nelson et al. 2000).

De plus, contrairement à ce qu'annonce Yera *et al.*, la PCR Nelson **ne semble pas apporter une meilleure sensibilité** dans nos conditions expérimentales (Yera, Zamfir et al. 2007). La validation technique a, d'une part, montré que la sensibilité de la PCR Nelson est moins bonne que la PCR JDP (0,2 kyste contre 0,05 kyste pour une prise d'essai de 5µL).

D'autre part, dans notre étude rétrospective toutes les PCR positives avec les amorces Nelson le sont également avec JDP. C'est la raison pour laquelle seule la PCR JDP est évaluée lors de l'étude prospective par rapport à la culture et que la PCR Nelson n'a pas été retenue.

III ANALYSE DES RESULTATS DE LA PCR JDP : VALIDATION DE LA TECHNIQUE POUR LE DIAGNOSTIC DE KERATITE AMIBIENNE

III.1 L'extraction

Dans la littérature, les auteurs utilisent des techniques de conditionnement, de prélyse et d'extraction de leurs échantillons très différentes. Nous avons essayé d'évaluer dans nos conditions expérimentales la performance de notre étape pré-analytique c'est-à-dire l'extraction du génome amibien à partir d'un prélèvement. Elle est en effet d'une grande importance pour récupérer le maximum d'ADN et obtenir la meilleure sensibilité. Pour cela, nous avons utilisé la méthode décrite par Schroeder : une suspension contenant un seul kyste prélevé sous microscope inversé sur une gélose à l'aide d'une micropipette (Schroeder, Booton et al. 2001). Nous obtenons un produit d'amplification pour cinq suspensions sur les dix réalisées. Par la technique de micromanipulation des kystes, nous sommes certains de n'avoir qu'un seul kyste dans la prise d'essai. Ainsi, cette expérience montre que la performance de notre technique est suffisante pour permettre l'extraction et l'amplification d'un seul kyste, résultats concordant avec ceux décrits par Schroeder *et al.*. A l'inverse nous ne pouvons pas vérifier qu'un kyste ait bien été déposé dans la prise d'essai. Les essais négatifs signent plutôt le caractère aléatoire de la méthode qu'une extraction défailante. Goldschmidt *et al.* annoncent des résultats comparables : les auteurs obtiennent un produit d'amplification sur une suspension de trois kystes dans environ un cas sur trois (Goldschmidt, Degorge et al. 2008).

Nous avons également cherché à connaître quelle méthode de prélyse donne les meilleurs résultats, c'est-à-dire permet de libérer le maximum de génome à partir des kystes

(particulièrement résistants aux agents de lyse). La prélyse à la protéinase K semble beaucoup plus efficace dans nos conditions expérimentales. C'est ce que confirme l'équipe de Goldsmith dans la publication de janvier 2008. Les auteurs montrent qu'une prélyse à 56°C avec de la protéinase K pendant au moins deux heures suivie d'une extraction est la seule technique capable de mettre en évidence un nombre très faible de kystes (Goldschmidt, Degorge et al. 2008).

L'analyse de prélèvements connus comme étant positifs, réalisée au début de notre étude rétrospective, nous a permis d'affiner les protocoles de conditionnement et d'extraction des échantillons. Citons par exemple le cas du prélèvement n°13 en particulier. Il a été analysé une première fois sans donner aucun produit d'amplification. Une seconde extraction a été réalisée en vortexant pendant **une minute** les lentilles, en récupérant le maximum de liquide des étuis et en vortexant longtemps les échantillons après l'addition d'éthanol. Le génome d'*Acanthamoeba* est alors mis en évidence dans ces extraits. La sensibilité de la PCR semble conditionnée par cette étape de récupération des microorganismes et de leur génome à partir du prélèvement. Il apparaît donc essentiel de vortexer pendant **une minute** les lentilles et les écouvillons afin de décrocher un maximum de protozoaires et de centrifuger le maximum de liquide de conservation. Toutes les extractions de notre travail ont été réalisées selon cette méthode.

III.2 L'amplification

L'extraction dans son ensemble est, somme toute, l'étape limitante de **la sensibilité de la PCR** puisque l'amplification peut être faite avec 0,05 kyste pour une prise d'essai de 5 µL. En effet, le nombre de copies du gène d'intérêt au sein d'un kyste ou d'un trophozoïte est estimé à 600 copies. Cela explique que la sensibilité puisse être aussi basse. Selon les conditions opératoires, les auteurs donnent une sensibilité de 0,25 ng à 1 pg d'ADN du parasite (Schroeder, Booton et al. 2001; Dhivya, Madhavan et al. 2007).

Notre étude rétrospective montre que la technique moléculaire pourrait être plus sensible que la culture. En effet, les cas n° 7 et 10 sont positifs en PCR alors que leur mise en culture est restée négative. Pour le prélèvement n°10, correspondant à un liquide de

conservation de lentille, le patient présente des signes cliniques en faveur d'une kératite amibienne. L'écouvillon de cornée de ce patient (prélèvement n°8) est également positif. Par contre, le patient dont les lentilles de contact n°7 sont positives en PCR, ne présente pas de kératite évoquant une amibe. Nous supposons qu'une erreur de manipulation pré-analytique ait pu survenir. En effet les prélèvements n°7 et 9 correspondent tous les deux à des lentilles de contact, enregistrées au laboratoire le même jour (16 août 2007) à la même heure (8 heures). Le séquençage des amplicons n°7, 8 et 10 donne la même séquence. Nous ne pouvons donc pas exclure que les lentilles n°7 et 9 ait été inversées à un moment.

La littérature est unanime pour dire que la sensibilité de la PCR JDP est supérieure à celle de la culture (Pasricha, Sharma et al. 2003; Yera, Zamfir et al. 2007). Seul Dhivya annonce des résultats nettement moins bons avec les amorces JDP. Cet auteur utilise un coffret d'extraction Biogene, CA sans prélyse et sa température d'hybridation est de 65°C. Ces deux éléments expliquent peut-être leurs différences de résultats (les températures d'hybridation varient de 58 à 60°C selon les publications) (Dhivya, Madhavan et al. 2007). Par ailleurs, pour les rares cas de PCR négatives avec une culture positive répertoriés dans la littérature, il n'est pas possible d'exclure la présence d'inhibiteurs dans le prélèvement car aucun auteur ne mentionne l'utilisation de témoins d'inhibition.

La spécificité de la méthode, conditionnée par la température d'hybridation des amorces, **est satisfaisante** dans nos conditions d'expérimentation. Nous n'avons pas trouvé de réaction croisée avec les principaux agents pathogènes oculaires : *Candida albicans*, *Toxoplasma gondii*, *Herpes simplex*, *Hartmannella vermiformis* (ATCC), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC), *Serratia marcescens*. Schroeder était arrivé aux mêmes conclusions. Il a testé en plus les genres *Naegleria*, *Leptomyxa*, *Balamuthia* ; une algue du genre *Selenastrum* ; un *Fusarium* (Schroeder, Booton et al. 2001). Sharma par contre obtient une amplification non spécifique avec le genre *Hartmannella* et *Balamuthia* (Sharma, Pasricha et al. 2004). Nous n'avons pas testé la spécificité vis-à-vis des genres *Naegleria* et *Balamuthia* car ils nécessitent des conditions de manipulations délicates du fait des pathologies qu'ils peuvent entraîner.

Dans nos conditions expérimentales, la PCR est apparue parfaitement **reproductible et répétable** aussi bien avec des prélèvements riches en amibes (CV = 0,54% et 0,34%

avec un témoin contenant environ 100 kystes) qu'avec des prélèvements pauvres (CV = 1,1% et 0,74% avec un témoin « un kyste »).

IV RESULTATS DE L'ETUDE PROSPECTIVE : INTERETS DE LA PCR JDP POUR LE DIAGNOSTIC DE KERATITE AMIBIENNE

Notre étude a permis de démontrer l'intérêt de réaliser le diagnostic de kératite à *Acanthamoeba* par PCR en temps réel avec le couple d'amorces JDP. Plusieurs arguments peuvent être avancés :

IV.1 Le délai de rendu des résultats

Le premier argument – celui qui a particulièrement motivé notre travail – est le délai de rendu des résultats aux cliniciens. Pour les 61 prélèvements de notre étude, le délai de **réponse moyen par culture** était de **30 jours**. Pour les prélèvements positifs, cette moyenne est de 25 jours (9 jours pour le plus rapide et 44 jours pour le plus long). La PCR offre la possibilité d'indiquer aux médecins s'il y a **présence ou non d'*Acanthamoeba* en 2 à 4 jours**, ce qui constitue un délai de rendu des résultats significativement amélioré. Cet argument est d'autant plus fort que l'on connaît le bénéfice pour le pronostic quand un traitement est mis en place rapidement.

IV.2 La sensibilité et la valeur prédictive de la méthode

- La PCR est plus sensible que la culture. En effet, en plus des échantillons n°7 et 10 de l'étude rétrospective, le prélèvement n°29 est positif en PCR, négatif en culture et identifié par séquençage *Acanthamoeba griffini*. La symptomatologie décrite chez le patient n'est pas en faveur d'une kératite amibienne. Cependant, quelques auteurs rapportent la mise en évidence d'*Acanthamoeba* dans les boîtiers de lentilles de

contact de personnes ne présentant aucun symptôme (Larkin, Kilvington et al. 1990; Kong, Shin et al. 2002). Il est possible qu'en réalisant cette PCR en routine en parallèle de la culture se pose le problème de **diagnostic présomptif** : faut-il traiter un(e) patient(e) ayant une PCR positive sur les prélèvements de lentilles de contact, d'étui des boîtiers ou les liquides de conservation sans signe clinique associé ?

- Malgré notre faible cohorte d'échantillons positifs, **la valeur prédictive de notre PCR semble bonne**. Elle est positive pour six patients sur les sept patients présentant une forte suspicion clinique et elle est négative pour 20 patients sur les 21 présentant une suspicion faible de kératite amibienne ;
- Elle permet une détection spécifique d'*Acanthamoeba* même si le prélèvement est contaminé ou contient un autre microorganisme qui empêche la culture de l'amibe. Par exemple, les prélèvements n°30 et 31 ont été envahis par un *Fusarium*, le n°51 envahis par un *Penicillium*.

V PERSPECTIVE POUR LE DIAGNOSTIC DE KERATITE AMIBIENNE AU LABORATOIRE DE PARASITOLOGIE

Cette étude a montré que **la culture reste un bon outil de diagnostic** de kératite amibienne. En effet, mis à part le cas du prélèvement n°29, la PCR n'a pas révélé d'autre patient positif à *Acanthamoeba* en dehors de ceux déjà diagnostiqués au laboratoire. Même si la culture apparaît parfois moins sensible, elle n'est néanmoins pas passée à côté d'une kératite amibienne lorsqu'elle était suspectée à l'examen clinique. Seule la clinique du patient XVIII pouvait faire suspecter une kératite amibienne sans que la culture ou la PCR n'aient pu mettre en évidence le parasite (une *Serratia marcescens* a été retrouvée au niveau de l'œil gauche). Cette **bonne corrélation clinico-biologique** contraste avec la médiocre sensibilité de la culture souvent annoncée dans la littérature (Penland and Wilhelmus 1997; Yera, Zamfir et al. 2007). Nous expliquons cette différence par notre délai de rendu de résultat d'un mois minimum. Il est certainement essentiel dans la sensibilité de la méthode et garant d'un faible nombre de faux négatifs en culture. Beaucoup de prélèvements sont en effet douteux au terme de quatre semaines de culture et ne se positivent réellement qu'au-delà d'un mois (3 prélèvements sur les 7 positifs en culture).

Or, dans les études, les cultures ne sont souvent observées que durant quinze jours voire parfois sur une durée inférieure.

De plus, la culture reste un outil indispensable pour mettre en évidence un autre pathogène non suspecté par le clinicien et pour permettre une investigation de sensibilité de souche si survenait un problème de résistance thérapeutique d'une espèce chez un patient.

Pour toutes ces raisons, la culture traditionnelle ne peut être remplacée par la PCR. En revanche, la PCR apparaît comme un bon complément à la culture du fait du délai de rendu des résultats significativement réduit. Dans ce cadre, il nous semble intéressant de poursuivre la détection du génome d'*Acanthamoeba* par PCR dans le diagnostic de kératite amibienne en routine, selon le protocole présenté dans cette thèse.

Une dernière remarque doit être faite : parmi les huit patients trouvés positifs à *Acanthamoeba* en culture ou en PCR, le diagnostic biologique est posé pour quatre d'entre eux sur des lentilles de contact, des boîtiers ou des liquides de conservation alors que les écouvillons de cornée sont négatifs (patients VI, XIII, XV et XXII). Pour améliorer encore la pertinence et la sensibilité du diagnostic biologique de kératite amibienne, ne serait-il pas nécessaire de **réaliser des prélèvements plus invasifs à type de grattage cornéen** ? En effet la majorité des équipes recommande et utilise ce mode prélèvement pour la recherche d'amibes libres (Khan 2006; Visvesvara, Moura et al. 2007)

Devant l'importance de poser un diagnostic précoce pour le pronostic visuel du patient, le laboratoire de Parasitologie-Mycologie du C.H.U de Nantes a développé une méthode de diagnostic par PCR en temps réel permettant une mise en évidence sensible, reproductible, spécifique et surtout rapide du genre *Acanthamoeba* dans les prélèvements ophtalmologiques. Nous avons pu le démontrer grâce à cette étude rétrospective et prospective menée sur 61 échantillons. La PCR sera maintenant réalisée en routine en parallèle de la culture.

ABREVIATIONS

ASA.S1: Acanthamoeba- specific-amplimer S1

ATCC

BCYE : Buffered Charcoal-Yeast Extract Agar

Ct: Cycling threshold

CV : Coefficient de variation

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

FISH: Fluorescence InSitu Hybridation

FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfert

G.A.E: Granulomatous Amebic Encephalitis

GBEA: Guide de bonne exécution des analyses

HES: hématoxyline éosine safran

MBP: mannose-binding protein

MGG: May-Grundwald Giemsa

Nr : non renseigné

PAS : l'acide périodique Schiff

Pb : paires de bases

PCR : Polymerase Chain Reaction

PPI : Pour Préparation Infectable

PYG : Peptone Yeast Glucose

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

SIDA : Syndrome d'Immunodéficience Acquise

S.N.C: Système Nerveux Central

TCA: Tryptic Soy Agar

Tm: melting Temperature

V.I.H: Virus de l'Immunodéficience Humaine

Annexes

ANNEXE N° 1 : Consignes données aux patients porteurs de lentilles de contact par le service d'Ophtalmologie du C.H.U de Nantes

Informations avant adaptation de lentilles de contact

♦ Précautions particulières

- Ne jamais garder une lentille si l'œil est rouge et/ou douloureux ;
- Ne jamais utiliser de l'eau du robinet pour nettoyer ou rincer les lentilles ;
- Ne pas se baigner en piscine avec ses lentilles ;
- Ne jamais dormir avec ses lentilles sans l'accord de votre ophtalmologiste ;
- Ne jamais remettre une lentille endommagée ;
- Vérifier que les collyres utilisés sont compatibles avec le port de lentilles de contact.

♦ Consignes importantes

Il est important de respecter les indications données par votre ophtalmologiste :

- Ne porter que la lentille prescrite (marque, type, paramètres indiqués sur l'ordonnance) ;
- Respecter la fréquence de renouvellement ;
- Respecter la durée du port ;
- Respecter les modalités d'entretien conseillées ;
- Respecter les règles d'hygiène expliquées par votre ophtalmologiste ;
- Respecter les précautions particulières énoncées.

ANNEXE N° 2 : Mode opératoire de prise en charge des prélèvements pour le diagnostic de kératite amibienne BIOFORMA 1998 : CAHIER DE FORMATION – AMIBES ET FLAGELLES INTISTINAUX

◆ PRÉLÈVEMENT :

La recherche d'amibes est pratiquée sur le grattage cornéen péri-lésionnel. Un examen direct est effectué ainsi qu'une mise en culture du prélèvement. Les amibes sont présentes au niveau des lésions mais elles sont souvent localisées en profondeur et sont parfois peu nombreuses. Le prélèvement doit donc être effectué sous lampe à fente par un ophtalmologiste, en grattant assez profondément en périphérie des lésions. Les résultats obtenus peuvent être faussement négatifs si le grattage ne contenait pas d'amibes ; c'est pourquoi, chez les porteurs de lentilles de contact, la recherche d'amibes sera également pratiquée systématiquement sur les lentilles et le culot de centrifugation du liquide de conservation contenu dans le boîtier. Si nécessaire (résultats négatifs, extension des lésions....), une biopsie cornéenne peut être effectuée.

Une partie du fragment comprenant de l'épithélium et surtout du stroma est mise en culture, l'autre partie est incluse en paraffine, des coupes sont effectuées afin de rechercher la présence d'amibes sur lames après coloration.

- Lorsque des examens bactériologique, mycologique ou virologique sont nécessaires, ensemercer d'abord le Sabouraud chloramphénicol puis mettre un anesthésique local (Novésine® ou Oxybuprocaine®) et effectuer les prélèvements de virologie, bactériologie et en dernier le grattage pour la culture d'amibes.

- Prélever au niveau de la lésion (à l'aide d'une éponge montée stérile et d'écouvillons) et ensemercer les milieux suivants :

- Sabouraud Chloramphénicol sans Actidione
- Schaedler + extrait globulaire
- gélose chocolat polyvitex
- milieu de transport pour la culture virale

◆ RECHERCHE D'AMIBES :

Gratter assez profondément sous lampe à fente à l'aide d'un vaccinostyle stérile et mettre celui-ci dans un tube stérile fermé. Si l'ensemencement est différé au lendemain, mettre une goutte d'eau distillée stérile au fond du tube, passer celui-ci longuement au vortex et enlever le vaccinostyle ; mettre le tube bouché à 4°C. Gratter à nouveau et étaler le produit du grattage délicatement sur une ou plusieurs lames de microscope. En cas de kératite, le protocole est le même mais au lieu d'un vaccinostyle on utilisera une éponge montée stérile afin de ne pas provoquer de lésion. Récupérer les lentilles et le boîtier utilisés par le patient.

◆ EXAMEN DIRECT DE FROTTIS COLORÉS :

Les colorations utilisées pour l'examen direct seront fonction du contexte et du nombre de lames réalisées. Lorsque l'on a une seule lame : une coloration à l'acridine orange permet de visualiser les kystes et les trophozoïtes ainsi que les bactéries; sur la même lame peut ensuite être effectuée une coloration de May-Grünwald-Giemsa qui permettra d'examiner la cytologie, de voir les bactéries et les kystes d'amibes. Selon le résultat et la symptomatologie, la deuxième lame peut être utilisée pour faire un Gram, un P.A.S.

◆ MISE EN ÉVIDENCE DES AMIBES PAR CULTURE ET EXAMEN À L'ÉTAT FRAIS :

- Mise en culture

- Grattage d'ulcère :

- * Milieu de culture

- Préparer de l'Agar (Agar bactériologique ex : type A Biokar diagnostic) à 2 % (p/vol.) dans de l'eau distillée stérile, le porter à ébullition au bain-marie pendant 3 à 4 heures. Couler la gélose en petites boîtes de pétri, l'épaisseur doit être de 2 mm. Les garder à 4 °C.

- * Préparer une suspension d'*Escherichia coli* (bien dissocier les colonies), dans 10 ml de NaCl 9 ‰, la suspension doit être très légèrement opalescente. Agiter au vortex et porter à ébullition au bainmarie pendant 15 minutes, vortexer. Garder le tube à 4°C, vortexer avant chaque utilisation.

* Sortir une gélose pour culture d'amibes du réfrigérateur ainsi que la suspension de colibacilles. Lorsqu'elles sont à température ambiante, vortexer la suspension de colibacilles, déposer au centre de la gélose une petite goutte de suspension de germes tués et frotter dedans le vaccinostyle ayant servi au grattage de l'ulcère, ne pas trop écorcher la gélose. Fermer la boîte avec un parafilm et la mettre à 30°C, sans la retourner le premier jour (les jours suivants, elle sera placée dans l'étuve couvercle en bas pour que la condensation se fasse sur la gélose).

- Boîtier de lentilles :

* Après les examens de bactériologie, mettre le liquide du boîtier dans un tube à centrifuger stérile, écouvillonner les parois et décharger l'écouvillon dans le tube, centrifuger à 1 500 trs/mn pendant 20 minutes.

* Mettre 5 ml de NaCl 9 ‰ stérile dans un petit flacon pour culture cellulaire et ajouter le culot de centrifugation du liquide de boîtier plus une goutte de suspension d'*Escherichia coli* tuées. Incuber à 30°C.

- Lentilles :

Mettre 5 ml de NaCl 9 ‰ c dans un flacon (*idem* précédent) plus une goutte d'*E. coli* tuées, y ajouter les lentilles. Incuber à 30°C.

- Biopsie :

* Un morceau de la biopsie comportant du stroma est mis en culture dans un petit flacon pour culture cellulaire avec 5ml de NaCl 9 ‰ stérile et une goutte de suspension d'*E. coli* tuées. Incuber à 30°C.

• Lecture

La lecture se fait à l'état frais, immédiatement après l'ensemencement. Les flacons sont regardés immédiatement au microscope inversé ; puis la lecture des cultures est ensuite faite tous les jours pendant 15 jours au microscope inversé avant de conclure à un résultat négatif.

Si l'on observe la présence de champignons ou de levures dans les petits flacons dès l'examen direct, ajouter au flacon 12 µl de solution à 1 mg/ml d'Amphotéricine B pour 5 ml de solution dans le petit flacon. (ne pas en ajouter davantage, l'Amphotéricine B risque d'empêcher le développement des amibes).

ANNEXE N° 3 : Amorces utilisées pour le diagnostic d'*Acanthamoeba* par PCR

AMORCES	CIBLE	TAILLE AMPLICON	TYPE DE PCR	APPLICATION	AUTEUR
JDP1 (GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA) JDP2 (TCTCACAAGCTGCTAGGGAGTCA).	18S rRNA gene DNA	430-450 pb	classique	kératite/GAE	(MacLean, Hafez et al. 2007) (Meersseman, Lagrou et al. 2007) (De Jonckheere 2007) (Dhivya, Madhavan et al. 2007) (Yera, Zamfir et al. 2007) (Zhang, Sun et al. 2004) (Pasricha, Sharma et al. 2003) (Schroeder, Booton et al. 2001)
Nelson (GTT TGA GGC AAT AAC AGG T) (GAA TTC CTC GTT GAA GAT)	18S rRNA gene DNA	223 pb	classique	kératite	(Mathers, Nelson et al. 2000) (Zamfir, Yera et al. 2006)
Vodkin: ACARNA (1383TCC CCT AGC AGC TTG TGI400) (1655GTT AAG GTC TCG TTC GTT AI673)	18S rRNA gene DNA	283 pb	classique	kératite	(Vodkin, Howe et al. 1992) (Lehmann, Green et al. 1998) (Lorenzo-Morales, Martinez-Carretero et al. 2007)
Lehmann (2379GTT TGA GGC AAT AAC AGG T2397) 2615CCT AGT AAG CGC GAG TC2632	18S rRNA gene DNA	253 pb	classique	kératite	(Lehmann, Green et al. 1998)
AcantF900 (CCC AGA TCG TTT ACC GTG AA) AcantR1100 (TAA ATA TTA ATG CCC CCA ACT ATC C) AcantP1000 (CTGCC ACC GAA TAC ATT AGC ATG G)	18S rRNA gene DNA	180 pb	temps réel	GAE	(Qvarnstrom, Visvesvara et al. 2006)
TaqAcF1 (CGACCAGCGATTAGGAGACG), TaqAcR1 (CCGACGCCAAGGACGAC) sonde : TaqAcP1 (TGAATACAAAACACCACCATCGGCGC)	18S rRNA gene DNA	nr	temps réel	environnement	(Riviere, Szczebara et al. 2006)
Ami6F1 (CCAGCTCCAATAGCGTATATT) Ami6F2 (CCAGCTCCAAGAGTGTATATT) Sonde Ami9R (GTTGAGTCGAATTAAGCCGC)	18S rRNA gene DNA	nr	temps réel	environnement	(Thomas, Herrera-Rimann et al. 2006)
Aca16Sf1010 (TTATATTGACTTGTACAGGTGCT) Aca16Sr1180 (CATAATGATTTGACTTCTTCTCCT)	16S rRNA gene DNA	161 pb	classique	GAE	(Yagi, Schuster et al. 2007; Yagi, Schuster et al. 2008) (Shirwadkar, Samant et al. 2006)

ANNEXE N° 4 : Diagnostic de kératite amibienne par culture. : Extrait du GBEA de parasitologie C.H.U de Nantes

Le diagnostic de kératite amibienne se fait par culture sur gélose Agar additionnée de 2 ou 3 gouttes de suspension d'*Enterobacter*.

- ◆ Ensemencement des cornées : deux stries sont réalisées avec l'écouvillon puis il est déposé sur une boîte Agar.

- ◆ Ensemencement des lentilles : elles sont juste déposées sur la gélose

- ◆ Ensemencement des produits d'entretien : les liquides sont centrifugés à 1500 tr/min pendant 20 minutes puis le culot de centrifugation est déposé au centre de la boîte Agar.

Les boîtes sont fermées hermétiquement à l'aide de parafilm et incubées un mois minimum à 30°C.

ANNEXE N° 5 : Mode opératoire de préparation des milieux Agar

	Quantité	Fournisseur
Agar	10 g	BD
Eau distillée	500mL	

◆ Technique

Additionné l'Agar à l'eau distillée.

Bien mélanger et porter à ébullition 1 à 2 minutes.

Diminuer la température aux environ de 50-55 ° C.

Ajuster le pH pour obtenir le pH final conseillé par le fournisseur.

◆ Répartition en boîtes de Pétri

Placer un flacon au milieu de la casserole d'eau et faire bouillir.

Lorsque le milieu est bien réfrigéré (homogène) le mettre au bain-marie à 50°C.

Répartir le milieu stérilement en boîte de Pétri.

Identifier et dater.

Contrôler la stérilité 24 heures à 37°C.

ANNEXE N° 6 : Protocole de prise en charge des prélèvements pour la recherche d'amibes libres

♦ Sur les liquides (flacon) :

Centrifuger le maximum de liquide dans un cône à ailettes (10 mL) à 1500 tr/min pendant 20 min.

Conserver 400 µL du culot pour :

- Ensemencer 200 µL du culot pour culture d'amibe
- Congeler 200µL du culot dans un tube sérothèque + tout le surnageant + le reste du liquide

♦ Sur les lentilles :

Couper toutes les lentilles en deux (ciseaux stériles si possible):

- Une moitié est utilisée pour la culture d'amibe
- Congeler l'autre moitié dans un tube à hémolyse

Pour le liquide des cupules à lentilles, faire 2 centrifugations pour traiter séparément l'œil droit et l'œil gauche.

♦ Sur les écouvillons :

Si un seul écouvillon est fourni par le service, seule la culture est faite

Si deux écouvillons sont fournis :

- Un écouvillon est utilisé pour la culture d'amibe
- Congeler l'autre écouvillon dans un tube à hémolyse

La boîte de prélèvements à congeler se trouve dans le congélateur mycologie, tiroir n°3.

ANNEXE N° 7 : Conditionnement des prélèvements ophtalmologiques en vue de leur extraction par le coffret Nucleospin® Tissue.

♦ Les lentilles de contact :

Vortexer 1 minute minimum dans 1mL d'eau PPI

Centrifuger à 3000 tr/min pendant 8 minutes

♦ Les étuis (liquide contenu dans les cupules des boîtiers de lentilles) :

Centrifuger à 3000 tr/min pendant 8 minutes

Les deux culots de centrifugation sont poolés pour obtenir un volume d'échantillon d'environ 100 µL en respectant la latéralité.

♦ Les écouvillons de cornée

Vortexer 1 minute minimum dans 1mL d'eau PPI

Bien exprimer l'écouvillon sur les bords du tube

Centrifuger à 3000 tr/min pendant 8 minutes

100µL du culot sont conservés pour l'extraction

♦ Les liquides de lavage (ou liquide de conservation)

Un maximum de liquide est centrifugé à 3000 tr/min pendant 8 minutes

Le culot est poolé avec les 200 µL de culot obtenu par la technicienne

Centrifuger le tout une nouvelle fois pour ne conserver que 100µL du culot

ANNEXE N° 8 : Extraction d'ADN à partir des prélèvements ophtalmologiques

(par le coffret Nucleospin®Tissue)

◆ Pré-lyse

Les 100µL de prélèvement obtenus à partir du prélèvement de départ sont vortexés avec 180 µL de solution tampon T1 et 25 µL de protéinase K.

Incuber à 56°C pendant 2 à 3 heures.

◆ Lyse

Ajouter 200µL de réactif B3 et vortexer vigoureusement.

Incuber à 70°C pendant 10 minutes.

Précipitation par l'éthanol.

Ajouter 210µL d'éthanol absolu. Vortexer vigoureusement.

Transférer chaque échantillon sur une colonne préalablement placée sur un tube collecteur. Centrifuger à 8000 tr/min pendant une minute.

◆ Lavages

Laver une première fois la colonne avec 500µL du tampon BW. Centrifuger à 8000 tr/min pendant une minute.

Laver une deuxième fois la colonne avec 600µL du tampon B5. Centrifuger à 8000 tr/min pendant une minute.

Le tube collecteur est changé à chaque lavage.

◆ Sécher la membrane de silice

Réaliser une troisième centrifugation de la colonne à 8000 tr/min pendant une minute.

◆ Eluer l'ADN

Transférer la colonne dans un Eppendorf.

Ajouter sur la colonne 100µL de tampon BE préalablement chauffé à 70°C.

Incuber 1 minute à température ambiante.

Centrifuger la colonne à 8000 tr/min pendant une minute.

ANNEXE N° 9 : Place des amorces JDP et Nelson sur le gène de l'ARN ribosomal de la sous-unité 18S

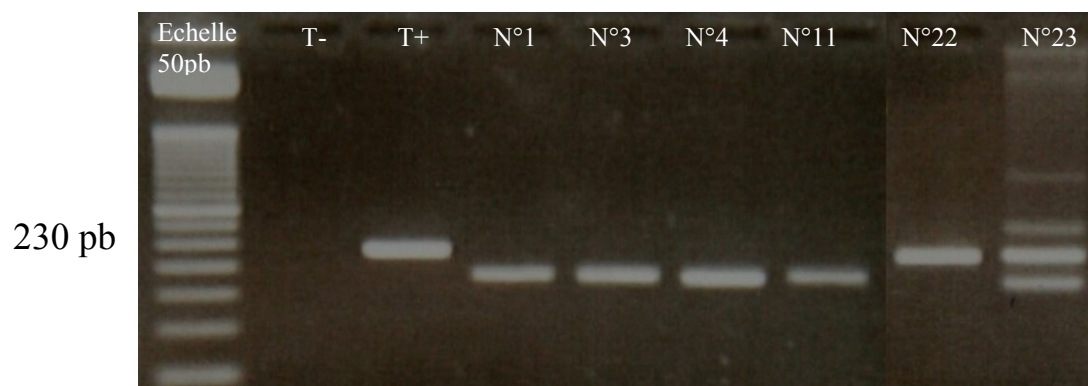
>gi|115394105|gb|DQ992193.1| Acanthamoeba sp. EFW9 18S ribosomal RNA gene, partial sequence

AACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTATAAGC
TTGTTTATACGGCGAGACTGCGGATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTCTCTTTGTTCTT
CTTTTACCTACTTGGATAACCGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCGCAAGGTCCCGAGCGCGGAGG
GTAGGGCTTCACGGTTCTATCCTTGATGCGCAGAGGGATGTATTTATTAGGTTAAACAACCAGCATTTT
ACAATCAATCTGGTGATTCATAGTAACCTTTTCGGATCGCATTTCATGCCCTCCTTGTGGGGGCGGCGA
CGATTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTCGTAACGGGT
AACGGAGAATTAGGGTTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAATGGCTACCACTTCTAAGGAAGGCAG
CAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACAGGCGCTCGA
TAAGAGTCTTGAATTGGAATGAGTACAATTTAAACCCCTTAACGAGTAACAATTGGAGGGCAAGTCTGG
TGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGT
TGGATCTAGGGACGCGCATTATTTAAGCATCCGTGTCATTGGGTCAAACCTGGTGACTGCGTGGTGTGC
GGGCTCGGTCCATTAGTCATCCACAAGGGTGATTAGTGTGTTAACCGGCCCGCCCGTCCCCTCCTTCT
GGATTCCGTTCTGCTATTGAGTTAGTGGGGACGTACAGGGAGCTGTATCATTGGCCTTCACGGGCC
AGTGGTACAGTTTCTGG**GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA**AAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCAGATTC
AATTTTCTGCCACCGAATACATTAGCATGGGATAATGGAATAGGACCCTGTCTCTCTATCTTCAGTTGGT
TAACTTGTAGAGGATCAGGGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGCATTAAATATTTAATTGTAGAGGT
GAAATTCCTGGATTTATGAAAGATTAACCTCTGCGAAAGCATCTGCCAAGGATGTTTTATTAATCAAGAA
CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCGACCAGCGA
TTAGGAGACGTTGAATACAAACACCACCATACATAATTAGTACATGGCCAGTCAAATGGTTGTGTATT
GTTTGTGTATGGCACCGGTGAAT**TGACTCCCCTAGCAGCTTGTGAGA**AATCATAAGTCTTTGGGTTCCGG
GGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCT
GCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAACTTACCAGGTCCGGACAACAGCCTTGCTAGTAAGGATTGA
CAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTG
TCTGGTTAATTCGGTTAACGAACGAGACCTTAACCTGCTAAATATGCCGCGCTAACTCGTCCATCAAAAC
TCATATGTGACTCACGCGGTTTCGCTGCATATTAGTGCTGCCAGCAATGGTGGTGTTAATATGCCGGCAG
GGCCCGGGTTCATGTGAGCGGTAGAGTTCCGGCGTCTGTGCTTCTTAGAGGGACTGCTGCGCGCCTAGC
CAGCGGAAG**GTTTGAGGCAATAACAGGT**CTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACA
CTGATTAATCCAACGAGTCCGCTTCAATCGAGGCGTAATATGCGTGGGGTCAAACCTATGTATGTTGCT
GTCTTGATCGCGCCTGGGCCGATAGGTCCGGGTAATCTTTGCAAATTTAATCATCGGGTGCTGGGGAT
AGATCATTGTAATTATTG**ATCTTCAACGAGGAATTCCT**AGTAAGCGCGAGTCATCAGCTCGCGTTGATTA
CGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCTGCTCCTACCGATTGAATGGTCCGGTGAAATCCTCGGAG
CCGTGGCCTCTACGCAATCTGGGCAACCGGGTGTGAGGTCAACGGTGGTGTGCAAACATCACCTATT
TGGCGGCGAAGTCGATTGAACCTTACCATTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTG
AACCGAATGCTTAACCAGGCTGCAGAAGGATCAACAAA

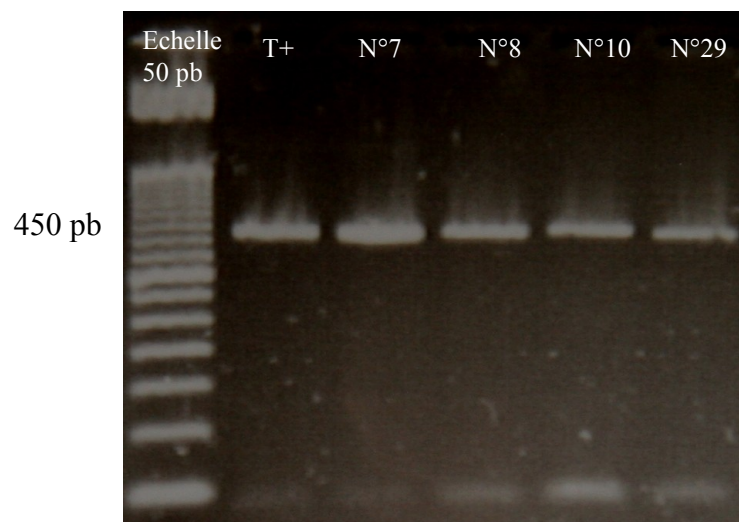
Amorces JDP

Amorces Nelson

ANNEXE N° 10 : Gel réalisé à partir de la PCR Nelson



ANNEXE N° 11 : Gel réalisé à partir de la PCR JDP



ANNEXE N° 12 : Données cliniques

N : suspicion de kératite amibienne faible

O : suspicion de kératite amibienne forte

D : droit

G : gauche

Ac : *Acanthamoeba*

Patient n°	signes cliniques	Facteurs de risque	Suspicion d'amibe	Résultats bactériologiques	Résultats bactériologiques
I	Douleurs, baisse d'acuité visuelle hyperhémie conjonctivale infiltrat sous épithélial	Lentilles de contact souples	N	Stériles	présence d'amibe libre autre que Ac.
II	/	Lentilles de contact	/	Stériles	Absence Ac.
III	baisse d'acuité visuelle abcès cornéen, infiltrat stromal précipités rétro-descémétiques diffus Hypopion	Lentilles de contact rigides	N	œil D : pyo œil G : stérile	Absence Ac.
IV	Douleurs, baisse d'acuité visuelle hyperhémie conjonctivale, abcès cornéen, cercle périphérique, infiltrat épithélial,	Lentilles de contact souples	O	œil G : stérile Matériel : S. marcescens	Ac positif
V	baisse d'acuité visuelle abcès cornéen stromal périphérique	Lentilles de contact souples	N	Stériles	Absence Ac.
VI	Douleurs, baisse d'acuité visuelle kératite interstitielle, infiltrat stromal dif	Lentilles de contact souples journalières gardées 30J, lavées eau robinet	O	Stériles	Ac positif
VII	/	Cicatrice cornée amibienne	N	œil D : stérile	Absence Ac.
VIII	Douleurs, baisse d'acuité visuelle infiltrat sous épithélial, ulcération	Lentilles de contact souples produit entretien périmé en 2004	O	Stériles	Ac. positif
IX	/	/	/	Stériles	Absence Ac.
X	/	Traumatisme oculaire	N	stériles	Absence Ac.
XI	Douleurs, baisse d'acuité visuelle ulcère cornéen, infiltrat stromal oedème stomale et cornéen	Lentilles de contact souples	O	matériel: pyo+S. maltophilia Œil : Stérile	Ac positif
XII	Douleurs, baisse d'acuité visuelle abcès cornéen, œdème stromal infiltration stomale diffuse	Lentilles de contact souples	O	Stériles	Ac positif
XIII	Douleurs abcès cornéen, hypopion	Lentilles de contact souples	N	œil G : stérile Matériel : Pyo	Ac positif
XIV	Douleurs abcès cornéen, hypopion hyperémie conjonctivale	Lentilles de contact souples	N	œil G: pyo+ M. Morganii	Absence Ac.

XV	Photophobie, infiltrat diffus	Lentilles de contact souples	N	Ceil : Stérile Matériel : S. marcescens	Absence Ac.
XVI	/	Lentilles de contact souples	N	Oeil G: pyo + S. marcescens	Absence Ac.
XVII	douleurs, baisse d'acuité visuelle abcès cornéen, infiltrat cornéo-limbique kératite sous-épithéliale	Lentilles de contact souples	N	Stériles	Absence Ac.
XVIII	/	Lentilles de contact souples	O	œil : S. marcescens	Absence Ac.
XIX	/	Lentilles de contact souples	N	cornée: stérile matériel : pyo	absence Ac.
XX	/	Lentilles de contact souples	N	Stériles	Absence Ac.
XXI	Douleur, photophobie, larmoiement, baisse d'acuité visuelle. Ulcération épithéliale infiltrat stromal	Lentilles de contact lavées eau robinet	O	Stériles	Ac positif
XXII	Baisse d'acuité visuelle, abcès cornéen, infiltrat stromal, nécrose, hypopion	Lentilles de contact souples	N	Stériles	Absence Ac.
XXIII	/	Lentilles de contact	/	Stériles	Absence Ac.
XXIV	/	Lentilles de contact souples	N	S. marcescens + K. oxytoca	Absence Ac.
XXV	/	Lentilles de contact souples	N	K. oxytoca	Absence Ac.
XXVI	/	Lentilles de contact souples	N	Delftia acidovorans	Absence Ac.
XXVII	/	Lentilles de contact	N	stériles	Absence Ac.
XXVIII	Abcès et œdème cornéen, néovascularisation, ulcère conjonctival, chémosis	Lentilles de contact	N	Stériles	Absence Ac.

Revue de la littérature

- Agla, E. K., M. Cornet, et al. (2005). "[Acanthamoeba stromal keratitis: epidemiology and prognosis factors]." J Fr Ophtalmol **28**(9): 933-8.
- Alizadeh, H., S. Neelam, et al. (2005). "Role of contact lens wear, bacterial flora, and mannose-induced pathogenic protease in the pathogenesis of amoebic keratitis." Infect Immun **73**(2): 1061-8.
- Bergeaud, S. e. C., M. (directeur de thèse) (2000). "Les kératites à *Acanthamoeba* : épidémiologie, diagnostic et traitement." thèse d'exercice: Pharmacie.
- Bharathi, J. M., M. Srinivasan, et al. (2007). "A study of the spectrum of Acanthamoeba keratitis: a three-year study at a tertiary eye care referral center in South India." Indian J Ophthalmol **55**(1): 37-42.
- Booton, G. C., D. J. Kelly, et al. (2002). "18S ribosomal DNA typing and tracking of Acanthamoeba species isolates from corneal scrape specimens, contact lenses, lens cases, and home water supplies of Acanthamoeba keratitis patients in Hong Kong." J Clin Microbiol **40**(5): 1621-5.
- Bottone, E. J., R. M. Madayag, et al. (1992). "Acanthamoeba keratitis: synergy between amebic and bacterial cocontaminants in contact lens care systems as a prelude to infection." J Clin Microbiol **30**(9): 2447-50.
- Bowers, B. and E. D. Korn (1968). "The fine structure of Acanthamoeba castellanii. I. The trophozoite." J Cell Biol **39**(1): 95-111.
- Bowers, B. and E. D. Korn (1969). "The fine structure of Acanthamoeba castellanii (Neff strain). II. Encystment." J Cell Biol **41**(3): 786-805.
- Brown, T. J., R. T. Cursons, et al. (1982). "Amoebae from antarctic soil and water." Appl Environ Microbiol **44**(2): 491-3.
- Byers, T. J., R. A. Akins, et al. (1980). "Rapid growth of Acanthamoeba in defined media; induction of encystment by glucose-acetate starvation." J Protozool **27**(2): 216-9.
- Byers, T. J., B. G. Kim, et al. (1991). "Molecular aspects of the cell cycle and encystment of Acanthamoeba." Rev Infect Dis **13 Suppl 5**: S373-84.
- Cardine, S., T. Bourcier, et al. (2002). "[Clinical management and prognosis in Acanthamoeba keratitis: a retrospective study of 25 cases]." J Fr Ophtalmol **25**(10): 1007-13.
- Carrette, S., C. Marechal-Courtois, et al. (2000). "[Report of a case of Acanthamoeba keratitis]." Bull Soc Belge Ophtalmol **275**: 49-53.
- Claerhout, I., A. Goegebuer, et al. (2004). "Delay in diagnosis and outcome of Acanthamoeba keratitis." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **242**(8): 648-53.
- Claerhout, I. and P. Kestelyn (1999). "Acanthamoeba keratitis: a review." Bull Soc Belge Ophtalmol **274**: 71-82.
- Clarke, D. W., H. Alizadeh, et al. (2005). "Failure of Acanthamoeba castellanii to produce intraocular infections." Invest Ophthalmol Vis Sci **46**(7): 2472-8.
- Clarke, D. W. and J. Y. Niederkorn (2006). "The pathophysiology of Acanthamoeba keratitis." Trends Parasitol **22**(4): 175-80.
- Costas, M. and A. J. Griffiths (1985). "Enzyme composition and the taxonomy of Acanthamoeba." J Protozool **32**(4): 604-7.
- Culbertson, C. G., P. W. Ensminger, et al. (1965). "The Isolation of Additional Strains of Pathogenic Hartmanella Sp. (Acanthamoeba): Proposed Culture Method for Application to Biological Material." Am J Clin Pathol **43**: 383-7.
- De Jonckheere, J. F. (1991). "Ecology of Acanthamoeba." Rev Infect Dis **13 Suppl 5**: S385-7.
- De Jonckheere, J. F. (2007). "Molecular identification of free-living amoebae of the Vahlkampfiidae and Acanthamoebidae isolated in Arizona (USA)." Eur J Protistol **43**(1): 9-15.

- Debbasch, C., C. Chaumeil, et al. (1999). "[2-year retrospective study of 344 patients presenting for corneal lesion and who were examined for free amebas]." J Fr Ophthalmol **22**(8): 848-52.
- Dhivya, S., H. N. Madhavan, et al. (2007). "Comparison of a novel semi-nested polymerase chain reaction (PCR) with a uniplex PCR for the detection of *Acanthamoeba* genome in corneal scrapings." Parasitol Res **100**(6): 1303-9.
- Ganem, S. (1999). "[Confocal microscopy and the cornea]." J Fr Ophthalmol **22**(2): 262-5.
- Garate, M., I. Cubillos, et al. (2005). "Biochemical characterization and functional studies of *Acanthamoeba* mannose-binding protein." Infect Immun **73**(9): 5775-81.
- Goldschmidt, P., S. Degorge, et al. (2008). "Resistance of *Acanthamoeba* to classic DNA extraction methods used for the diagnosis of corneal infections." Br J Ophthalmol **92**(1): 112-5.
- Hiti, K., J. Walochnik, et al. (2002). "Viability of *Acanthamoeba* after exposure to a multipurpose disinfecting contact lens solution and two hydrogen peroxide systems." Br J Ophthalmol **86**(2): 144-6.
- Hurt, M., S. Neelam, et al. (2003). "Pathogenic *Acanthamoeba* spp secrete a mannose-induced cytolytic protein that correlates with the ability to cause disease." Infect Immun **71**(11): 6243-55.
- Illingworth, C. D. and S. D. Cook (1998). "*Acanthamoeba* keratitis." Surv Ophthalmol **42**(6): 493-508.
- Illingworth, C. D., S. D. Cook, et al. (1995). "*Acanthamoeba* keratitis: risk factors and outcome." Br J Ophthalmol **79**(12): 1078-82.
- Joslin, C. E., E. Y. Tu, et al. (2006). "Epidemiological characteristics of a Chicago-area *Acanthamoeba* keratitis outbreak." Am J Ophthalmol **142**(2): 212-7.
- Joslin, C. E., E. Y. Tu, et al. (2007). "The association of contact lens solution use and *Acanthamoeba* keratitis." Am J Ophthalmol **144**(2): 169-180.
- Khan, N. A. (2003). "Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections." Microb Pathog **34**(6): 277-85.
- Khan, N. A. (2006). "*Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health." FEMS Microbiol Rev **30**(4): 564-95.
- Khunkitti, W., D. Lloyd, et al. (1998). "*Acanthamoeba castellanii*: growth, encystment, excystment and biocide susceptibility." J Infect **36**(1): 43-8.
- Kilvington, S., T. Gray, et al. (2004). "*Acanthamoeba* keratitis: the role of domestic tap water contamination in the United Kingdom." Invest Ophthalmol Vis Sci **45**(1): 165-9.
- Kinnear, F. B. (2001). "Non-*Acanthamoeba* amoebic keratitis." J Infect **42**(3): 218-9.
- Kinnear, F. B. (2003). "Cytopathogenicity of *acanthamoeba*, *vahlkampfia* and *hartmannella*: quantative & qualitative in vitro studies on keratocytes." J Infect **46**(4): 228-37.
- Kinota, S., K. W. Wong, et al. (1993). "Changing patterns of infectious keratitis: overview of clinical and histopathologic features of keratitis due to *acanthamoeba* or atypical mycobacteria, and of infectious crystalline keratopathy." Indian J Ophthalmol **41**(1): 3-14.
- Kong, H. H., J. Y. Shin, et al. (2002). "Mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphism (RFLP) and 18S small-subunit ribosomal DNA PCR-RFLP analyses of *Acanthamoeba* isolated from contact lens storage cases of residents in southwestern Korea." J Clin Microbiol **40**(4): 1199-206.
- Larkin, D. F., S. Kilvington, et al. (1990). "Contamination of contact lens storage cases by *Acanthamoeba* and bacteria." Br J Ophthalmol **74**(3): 133-5.

- Ledee, D. R., G. C. Booton, et al. (2003). "Advantages of using mitochondrial 16S rDNA sequences to classify clinical isolates of *Acanthamoeba*." Invest Ophthalmol Vis Sci **44**(3): 1142-9.
- Ledee, D. R., J. Hay, et al. (1996). "*Acanthamoeba griffini*. Molecular characterization of a new corneal pathogen." Invest Ophthalmol Vis Sci **37**(4): 544-50.
- Lehmann, O. J., S. M. Green, et al. (1998). "Polymerase chain reaction analysis of corneal epithelial and tear samples in the diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis." Invest Ophthalmol Vis Sci **39**(7): 1261-5.
- Lindsay, R. G., G. Watters, et al. (2007). "*Acanthamoeba* keratitis and contact lens wear." Clin Exp Optom **90**(5): 351-60.
- Lorenzo-Morales, J., E. Martinez-Carretero, et al. (2007). "Early diagnosis of amoebic keratitis due to a mixed infection with *Acanthamoeba* and *Hartmannella*." Parasitol Res **102**(1): 167-9.
- MacLean, R. C., N. Hafez, et al. (2007). "Identification of *Acanthamoeba* sp. in paraffin-embedded CNS tissue from an HIV+ individual by PCR." Diagn Microbiol Infect Dis **57**(3): 289-94.
- Marciano-Cabral, F. and G. Cabral (2003). "*Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans." Clin Microbiol Rev **16**(2): 273-307.
- Marciano-Cabral, F., K. Han, et al. (2003). "Interaction of an *Acanthamoeba* human isolate harboring bacteria with murine peritoneal macrophages." J Eukaryot Microbiol **50** Suppl: 516-9.
- Mathers, W. D., S. E. Nelson, et al. (2000). "Confirmation of confocal microscopy diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis using polymerase chain reaction analysis." Arch Ophthalmol **118**(2): 178-83.
- Mattar, F. E. and T. J. Byers (1971). "Morphological changes and the requirements for macromolecule synthesis during excystment of *Acanthamoeba castellanii*." The Journal of Cell Biology **49**: 507-519.
- Meersseman, W., K. Lagrou, et al. (2007). "Rapidly fatal *Acanthamoeba* encephalitis and treatment of cryoglobulinemia." Emerg Infect Dis **13**(3): 469-71.
- Mergeryan, H. (1991). "The prevalence of *Acanthamoeba* in the human environment." Rev Infect Dis **13** Suppl 5: S390-1.
- Morton, L. D., G. L. McLaughlin, et al. (1991). "Adherence characteristics of three strains of *Acanthamoeba*." Rev Infect Dis **13** Suppl 5: S424.
- Nagington, J. and J. E. Richards (1976). "Chemotherapeutic compounds and *Acanthamoebae* from eye infections." J Clin Pathol **29**(7): 648-51.
- Niederkorn, J. Y., H. Alizadeh, et al. (1999). "The pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis." Microbes Infect **1**(6): 437-43.
- Parmar, D. N., S. T. Awwad, et al. (2006). "Tandem scanning confocal corneal microscopy in the diagnosis of suspected *acanthamoeba* keratitis." Ophthalmology **113**(4): 538-47.
- Pasricha, G., S. Sharma, et al. (2003). "Use of 18S rRNA gene-based PCR assay for diagnosis of *acanthamoeba* keratitis in non-contact lens wearers in India." J Clin Microbiol **41**(7): 3206-11.
- Penland, R. L. and K. R. Wilhelmus (1997). "Comparison of axenic and monoxenic media for isolation of *Acanthamoeba*." J Clin Microbiol **35**(4): 915-22.
- Pfister, D. R., J. D. Cameron, et al. (1996). "Confocal microscopy findings of *Acanthamoeba* keratitis." Am J Ophthalmol **121**(2): 119-28.
- Pussard, M. and R. Pons (1977). "Morphologies de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida)." Protistologica **13**: 557-610.

- Qvarnstrom, Y., G. S. Visvesvara, et al. (2006). "Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*." *J Clin Microbiol* **44**(10): 3589-95.
- Rabinovitch, T., S. S. Weissman, et al. (1991). "Acanthamoeba keratitis: clinical signs and analysis of outcome." *Rev Infect Dis* **13 Suppl 5**: S427.
- Radford, C. F., O. J. Lehmann, et al. (1998). "Acanthamoeba keratitis: multicentre survey in England 1992-6. National Acanthamoeba Keratitis Study Group." *Br J Ophthalmol* **82**(12): 1387-92.
- Radford, C. F., D. C. Minassian, et al. (2002). "Acanthamoeba keratitis in England and Wales: incidence, outcome, and risk factors." *Br J Ophthalmol* **86**(5): 536-42.
- Riviere, D., F. M. Szczebara, et al. (2006). "Development of a real-time PCR assay for quantification of *Acanthamoeba* trophozoites and cysts." *J Microbiol Methods* **64**(1): 78-83.
- Schroeder, J. M., G. C. Booton, et al. (2001). "Use of subgenic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of acanthamoebae from humans with keratitis and from sewage sludge." *J Clin Microbiol* **39**(5): 1903-11.
- Schuster, F. L. (2002). "Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas." *Clin Microbiol Rev* **15**(3): 342-54.
- Sharma, S., P. Garg, et al. (2000). "Patient characteristics, diagnosis, and treatment of non-contact lens related *Acanthamoeba* keratitis." *Br J Ophthalmol* **84**(10): 1103-8.
- Sharma, S., G. Pasricha, et al. (2004). "Acanthamoeba keratitis in non-contact lens wearers in India: DNA typing-based validation and a simple detection assay." *Arch Ophthalmol* **122**(10): 1430-4.
- Shirwadkar, C. G., R. Samant, et al. (2006). "Acanthamoeba encephalitis in patient with systemic lupus, India." *Emerg Infect Dis* **12**(6): 984-6.
- Stothard, D. R., J. Hay, et al. (1999). "Fluorescent oligonucleotide probes for clinical and environmental detection of *Acanthamoeba* and the T4 18S rRNA gene sequence type." *J Clin Microbiol* **37**(8): 2687-93.
- Thomas, V., K. Herrera-Rimann, et al. (2006). "Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network." *Appl Environ Microbiol* **72**(4): 2428-38.
- van Klink, F., H. Alizadeh, et al. (1993). "The role of contact lenses, trauma, and Langerhans cells in a Chinese hamster model of *Acanthamoeba* keratitis." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **34**(6): 1937-44.
- Visvesvara, G. S. (1991). "Classification of *Acanthamoeba*." *Rev Infect Dis* **13 Suppl 5**: S369-72.
- Visvesvara, G. S., H. Moura, et al. (2007). "Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*." *FEMS Immunol Med Microbiol* **50**(1): 1-26.
- Vodkin, M. H., D. K. Howe, et al. (1992). "Identification of *Acanthamoeba* at the generic and specific levels using the polymerase chain reaction." *J Protozool* **39**(3): 378-85.
- Volkonsky, M. (1931). "Hartmannella castellanii Douglas et classification des Hartmanelles." *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale* **72**: 317-339.
- Wilhelmus, K. R. and D. B. Jones (1991). "Program planning for research on *Acanthamoeba*." *Rev Infect Dis* **13 Suppl 5**: S446-50.
- Yagi, S., F. L. Schuster, et al. (2007). "Demonstration of presence of acanthamoeba mitochondrial DNA in brain tissue and cerebrospinal fluid by PCR in samples

- from a patient who died of granulomatous amebic encephalitis." J Clin Microbiol **45**(6): 2090-1.
- Yagi, S., F. L. Schuster, et al. (2008). "Demonstration of Balamuthia and Acanthamoeba mitochondrial DNA in sectioned archival brain and other tissues by the polymerase chain reaction." Parasitol Res **102**(2): 211-7.
- Yang, Z., Z. Cao, et al. (1997). "Pathogenesis of Acanthamoeba keratitis: carbohydrate-mediated host-parasite interactions." Infect Immun **65**(2): 439-45.
- Yera, H., O. Zamfir, et al. (2007). "Comparison of PCR, microscopic examination and culture for the early diagnosis and characterization of Acanthamoeba isolates from ocular infections." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **26**(3): 221-4.
- Zamfir, O., H. Yera, et al. (2006). "[Diagnosis of Acanthamoeba spp. keratitis with PCR]." J Fr Ophtalmol **29**(9): 1034-40.
- Zhang, Y., X. Sun, et al. (2004). "Identification of 18S ribosomal DNA genotype of Acanthamoeba from patients with keratitis in North China." Invest Ophthalmol Vis Sci **45**(6): 1904-7.

Nom – Prénoms : BROSSAUD Julie

Titre de la thèse : Intérêts et limites du diagnostic de kératite amibienne par PCR en temps réel au laboratoire de Parasitologie/Mycologie du C.H.U de Nantes.

Résumé de la thèse :

La kératite amibienne touche principalement les porteurs de lentilles de contact dans les pays industrialisés. C'est une pathologie rare en dépit des deux millions de porteurs de lentilles de contact en France, trente millions aux Etats-Unis. Le protozoaire du genre *Acanthamoeba sp.* est le principal agent pathogène responsable de kératites amibiennes.

Néanmoins, sa morbidité demeure importante avec une grave perte visuelle dans plus de 15% des cas. Ils subsistent en effet des lacunes dans la prise en charge des patients : il s'agit d'une pathologie de diagnostic difficile.

Notre étude a porté sur la mise au point et l'évaluation d'une technique de PCR pour la détection du protozoaire *Acanthamoeba* dans les prélèvements ophtalmologiques. Nous montrerons que cette méthode permet une détection plus sensible et plus reproductible du parasite et surtout de rendre un résultat plus rapidement au clinicien.

Mots Clés : KERATITE AMIBIENNE, LENTILLES DE CONTACT, ACANTHAMOEBA SP., PCR EN TEMPS REEL

JURY :

PRESIDENT : M. Patrice LE PAPE, Professeur de Parasitologie – Mycologie, Faculté de Pharmacie de Nantes

ASSESEURS :

M. Alain PECHEREAU, Professeur d'Ophtalmologie Clinique, Faculté de Médecine de Nantes

M. Bertrand VABRES, Praticien Hospitalier en Ophtalmologie Clinique, C.H.U de Nantes

M. Florent MORIO, Assistant Hospitalo-Universitaire de Parasitologie – Mycologie, Faculté de Médecine de Nantes

M. Michel MIEGEVILLE, Maître de Conférence de Parasitologie – Mycologie, Faculté de Médecine de Nantes

Adresse de l'auteur : 13 rue de Bel-Air 44600 Saint-Nazaire.