UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2011 N°

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECILAISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE

Conformément aux dispositions du décret n°90-810 du 10 Septembre 1990 tient lieu de

THESE

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

Mise au point d'une PCR en temps réel pour le diagnostic de kératites à *Acanthamoeba* spp

Par Mlle Muriel DUBOSSON

Née le 14/10/1981 à Saint-Julien-en Genevois (74)

Thèse soutenue publiquement à la faculté de pharmacie de Grenoble*

Le 14 Septembre 2011

DEVANT LE JURY COMPOSE DE :

Présidente du jury : Mme CORNET Muriel

Directrice de thèse : Mme MAUBON Danièle

Membres : Mme BRENIER-PINCHART Marie-Pierre
Mr CHIQUET Christophe
Mr PELLOUX Hervé
Mme PINEL Claudine

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

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
SCIENCES.TECHNOLOGIE.SANTÉ

Doyen de la Faculté : M. Christophe RIBUOT
Vice-doyen et Directeur des Etudes : Mme Delphine ALDEBERT

Année 2010-2011

PROFESSEURS A L'UFR DE PHARMACIE (n = 18)

BAKRI	Aziz	Pharmacie Galénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (TIMC-IMAG)
BOUMENDJEL	Ahcène	Chimie Organique (D.P.M.)
BURMEISTER	Wim	Biophysique (U.V.H.C.I)
CALOP	Jean	Pharmacie Clinique (TIMC-IMAG, PU-PH)
CORNET	Murielle	Parasitologie – Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH)- *À partir du 1er mai*
DANEL	Vincent	Toxicologie (SMUR SAMU / PU-PH)
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M.)
DROUET	Christian	Immunologie Médicale (TIMC-IMAG)
DROUET	Emmanuel	Microbiologie (U.V.H.C.I) -
FAURE	Patrice	Biochimie (HP2/PU-PH)
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie-Pharmacologie (HP2)
GRILLOT	René	Parasitologie – Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH
LENORMAND	Jean Luc	Ingénierie Cellulaire, Biothérapies (THEREX, TIMC, IMAG)
MOSSUZ	Pascal	Hématologie (PU-PH) - *À partir du 1er mai*
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique (D.P.M.)
SEVE	Michel	Biochimie – Biotechnologie (IAB, PU-PH)
RIBUOT	Christophe	Physiologie – Pharmacologie (HP2)
ROUSSEL	Anne-Marie	Biochimie Nutrition (L.B.F.A)
WOUESSIDJEWE	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M.)

ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES (AHU) (n=2)

BUSSER	Benoit	Biochimie (IAB, AHU-Biochimie)
MONNERET	Denis	Biochimie (HP2, AHU-Biochimie)

ENSEIGNANTS ANGLAIS (n=3)

COLLE	Pierre Emmanuel	Maître de conférence
FITE	Andrée	Professeur Certifié
GOUBIER	Laurence	professeur Certifié

Dernière mise à jour : 19/05/2011 — Rédacteur : F. GIGLIOTTI, Bureau de la Scolarité Pharmacie

UFR de Pharmacie de Grenoble

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
SCIENCES.TECHNOLOGIE.SANTÉ

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL. : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70

ATER (n= 5)

DEFENDI Frédérica	ATER	Immunologie Médicale (GREPI-TIMC)
GRATIA Séverine	½ ATER	Biochimie Biotechnologie (LBFA)
REGENT Myriam	½ ATER	Biochimie Biotechnologie (IAB)
ROSSI Caroline	ATER	Anglais Master ISM (JR)
RUFFIN Emilie	ATER	Pharmacie Galénique (Therex/TIMC, La serve)
SAPIN Emilie	ATER	Physiologie Pharmacologie (HP2)

MONITEUR ET DOCTORANTS CONTRACTUELS (n=7)

BOUCHET	Audrey	(01-10-2009 au 30-09-2012)	Biotechnologie (GIN, ESRF)
DUCAROUGE	Benjamin	(01-10-2008 au 30-09-2011)	Laboratoire HP2 (JR)
FAVIER	Mathieu	(01-10-2009 au 30-09-2012)	Laboratoire HP2 (JR)
GRAS	Emmanuelle	(01-10-2010 au 30-09-2013)	Laboratoire HP2 (JR)
HAUDECOEUR	Romain	(01-10-2008 au 30-09-2011)	Chimie Thérapeutique (DPM)
LESART	Anne-Cécile	(01-10-2009 au 30-09-2013)	Informatique C2i
POULAIN	Laureline	(01-10-2009 au 30-09-2012)	Laboratoire HP2 (JR)

PROFESSEURS ASSOCIES (PAST) (n=3)

BELLET	Béatrice	Pharmacie Clinique
RIEU	Isabelle	Qualitologie (Praticien Attaché – CHU)
TROUILLER	Patrice	Santé Publique (Praticien Hospitalier – CHU)

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »
IBS : Institut de Biologie Structurale
JR : Jean Roget
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
PRAG : Professeur Agrégé
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

Dernière mise à jour : 19/05/2011 — Rédacteur : F. GIGLIOTTI, Bureau de la Scolarité Pharmacie

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
SCIENCES.TECHNOLOGIE.SANTÉ

Doyen de la Faculté : M. Christophe RIBUOT

Vice-doyen et Directeur des Etudes : Mme Delphine ALDEBERT

Année 2010-2011

MAITRE DE CONFERENCES DE PHARMACIE (n = 34)

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie-Mycologie (L.A.P.M)
ALLENET	Benoit	Pharmacie Clinique (ThEMAS TIMC-IMAG / MCU-PH)
BATANDIER	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A)
BRETON	Jean	Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B – LAN)
BRIANCON-MARJOLLET	Anne	Physiologie Pharmacologie (HP2)
BUDAYOVA SPANO	Monika	Biophysique (I.B.S)
CAVAILLES	Pierre	Biologie Cellulaire et génétique (L.A.P.M)
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
DELETRAZ-DELPORTE	Martine	Droit Pharmaceutique
DEMEILLIERS	Christine	Biochimie (L.B.F.A)
DURMORT-MEUNIER	Claire	Biotechnologies (I.B.S)
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M)
GERMI	Raphaëlle	Microbiologie (U.V.H.C.I / MCU-PH)
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique (D.P.M)
GUIEU	Valérie	Chimie Analytique (D.P.M)
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
JOYEUX-FAURE	Marie	Physiologie - Pharmacologie (HP2)
KHALEF	Nawel	Pharmacie Galénique (TIMC-IMAG)
KRIVOBOK	Serge	Biologie Végétale et Botanique (L.C.B.M)
MOUHAMADOU	Bello	Cryptogamie, Mycologie Générale (L.E.C.A)
MORAND	Jean-Marc	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
MELO DE LIMA	Christelle	Biostatistiques (L.E.C.A)
NICOLLE	Edwige	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
PERES	Basile	Pharmacognosie (D.P.M)
PEUCHMAUR	Marine	Chimie Organique (D.P.M.)
PINEL	Claudine	Parasitologie - Mycologie Médicale (GIN / MCU-PH)
RACHIDI	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
RAVEL	Anne	Chimie Analytique (D.P.M)
RAVELET	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M)
SOUARD	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
TARBOURIECH	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I.)
VANHAVERBEKE	Cécile	Chimie Organique (D.P.M.)
VILLET	Annick	Chimie Analytique (VP Form Adjoint UJF, D.P.M.)

Dernière mise à jour : 19/05/2011

Rédacteur : F. GIGLIOTTI, Bureau de la Scolarité Pharmacie

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
SCIENCES.TECHNOLOGIE.SANTÉ

ATER : Attaches Temporaires d'Enseignement et de Recherches
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »
IBS : Institut de Biologie Structurale
JR : Jean Roger
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
PRAG : Professeur Agrégé
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

SOMMAIRE

TABLE DES ILLUSTRATIONS *10*

Liste des figures **10**

Liste des tableaux **11**

REMERCIEMENTS *12*

INTRODUCTION *14*

GENERALITES *16*

I Acanthamoeba spp. *17*

1 Morphologie – cycle **17**

1.1 Trophozoïte 17

1.2 Kyste 18

1.3 Cycle 19

2 Classification **20**

2.1 Classification morphologique 20

2.2 Classification génotypique 21

II Kératites amibiennes *23*

1 Physiopathologie **23**

2 Epidémiologie - Facteurs de risques **25**

3 Clinique **27**

4 Traitement **28**

III Diagnostic biologique des kératites amibiennes *31*

1 Prélèvement **31**

2 Examen direct **32**

3 Culture **33**

4 Diagnostic moléculaire **33**

IV La technique de PCR en temps réel ***34***

1 Principe de la PCR en temps réel **35**

2 Sondes **36**

3 Place de la PCR dans le diagnostic des KA **38**

MISE AU POINT DE LA PCR EN TEMPS REEL ***40***

I Objectif ***40***

II Matériels et méthodes ***40***

1 Souches d'*Acanthamoeba* spp **40**

1.1 Culture sur gélose NN 41

1.2 Culture en milieu liquide PYG 42

1.3 Préparation des suspensions d'amibes 42

2 Cellules humaines **43**

3 PCR en temps réel **43**

3.1 Extraction de l'ADN 43

3.1.1 Choix du prétraitement 44

3.1.2 Choix de la méthode d'extraction 45

3.2 Témoins positifs 49

3.2.1 Témoin *Acanthamoeba* 49

3.2.2 Témoin béta-globine 49

3.3 Sondes et amorces 50

3.3.1 *Acanthamoeaba* 50

3.3.2 Béta-globine 50
3.4 Amplification de l'ADN 51
3.4.1 Mélange réactionnel 51
3.4.2 Smart cycler 53
4 Validation de la méthode 54
4.1 Seuils de détection 54
4.2 Variabilité intra-essai ou répétabilité 55
4.3 Variabilité inter-essai ou reproductibilité 55
4.4 Spécificité 55
4.5 Inhibiteurs potentiels 56
4.6 Prélèvements issus de patients 57
III Résultats 59
1 Choix du prétraitement 59
2 Choix de la méthode d'extraction 60
3 Seuils de détection 62
3.1 Limite de détection 62
3.2 Linéarité 63
4 Témoin béta-globine 64
5 Répétabilité – Reproductibilité 65
6 Spécificité 66
7 Génotypes d'*Acanthamoeba* spp détectés 67
8 Inhibiteurs potentiels 70
9 Prélèvements de patients 72

IV Discussion - Perspectives *76*

1 La PCR en temps réel pour le diagnostic des KA **76**

1.1 Amorces et sonde 76

1.2 Contrôle béta-globine 77

1.3 Inhibiteurs de PCR 78

1.4 Sensibilité 78

2 Applications de notre PCR multiplex **80**

3 Perspectives **81**

CONCLUSION *83*

BIBLIOGRAPHIE *85*

ANNEXES *90*

Annexe 1 : Gélose NN **90**

Annexe 2 : Milieu PYG **91**

Annexe 3 : Milieu d'enkystement **92**

Annexe 4 : Tampon TrisHCl **92**

Annexe 5 : Procédures de diagnostic des KA par PCR **93**

Annexe 6 : Poster « Une PCR multiplex 'OneStep' pour le diagnostic des kératites amibiennes » **106**

Annexe 7 : Article « A one-step multiplex PCR for improved diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis » **107**

SERMENT DES APOTHICAIRES *128*

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Liste des figures

Figure 1 : Schéma phylogénétique des amibes libres 16

Figure 2 : Trophozoïtes 18

Figure 3 : Kystes *A. castellanii* 18

Figure 4 : Kystes *A. polyphaga* 18

Figure 5 : Cycle des *Acanthamoeba* sp 19

Figure 6 : Arbre phylogénétique des différents génotypes d'*Acanthamoeba* 21

Figure 7 : Schéma des différentes couches cellulaires de la cornée 23

Figure 8 : Cascade physiopathologique des kératites amibiennes 24

Figure 9 : Photos de kératite amibienne 28

Figure 10 : Photo d'une kératite amibienne à distance de la phase aiguë d'évolution péjorative 28

Figure 11 : ED d'un grattage cornéen après coloration MGG 32

Figure 12 : Culture *Acanthamoeba* sp 33

Figure 13 : Schéma du principe de PCR 35

Figure 14 : Principe de la sonde d'hydrolyse ou Taqman® 37

Figure 15 : Schéma récapitulatif des différents milieux de culture 41

Figure 16 : Appareil d'extraction semi-automatisé Biorobot EZ1 46

Figure 17 : Kit QIAamp DNA Mini® 47

Figure 18 : Résumé des différents choix de prétraitement et de méthode d'extraction 48

Figure 19 : Présentation des billes SmartMix® 51

Figure 20 : Tube et support de tubes pour SmarCycler® 52

Figure 21 : Appareil de PCR en temps réel SmartCycler®, centrifugeuse spécifique, support réfrigéré et logiciel d'exploitation des données 53

Figure 22 : Exemple d'échantillon de grattage cornéen au scalpel 58

Figure 23 : Résultat des expériemtations de comparaison des méthodes d'extraction 61

Figure 24 : Exemple de courbe d'amplification d'un kyste d'*Acanthamoeba polyphaga* 62

Figure 25 : Courbes de linéarité 63

Figure 26 : Tests PCR multiplex 64

Figure 27 : Exemple de courbe de dosage d'ADN.....66

Figure 28 : Graphique PCR *Acanthameoba* 1 kyste en présence de collyre.....70

Figure 29 : Graphique PCR Béta-globine 100 cellules en présence de collyre.....70

Liste des tableaux

Tableau I : Classification des espèces d'*Acanthamoeba* par Pussard et Pons 20

Tableau II : Critères de gravité des KA 30

Tableau III : Caractéristiques des différentes PCR en temps réel publiées actuellement 39

Tableau IV : Séquences des sondes et amorces d'*Acanthamoeba* et de béta-globine.....51

Tableau V : Composition du mélange réactionnel.....52

Tableau VI : Résultats comparatifs des deux prétraitements 59

Tableau VII : Moyenne et écart-type expérimentations de comparaison des méthodes d'extraction.....60

Tableau VIII : Résultats répétabilité.....65

Tableau IX : Résultats reproductibilité.....65

Tableau X : Résultats des dosages ADN et des Ct des différents microorganismes bactériens et fongiques testés.....67

Tableau XI : Résultats des génotypes testés in vitro.....68

Tableau XII : Résultats de la vérification *in silico* des génotypes d'*Acanthamoeba* 69

Tableau XIII : Résultats des dilutions d'extraits en présence de certains collyres.....71

Tableau XIV : Résultats de PCR, culture, microbiologie et renseignements cliniques des prélèvements prospectifs de grattage de cornée.....74

REMERCIEMENTS

A Muriel CORNET,

Pour avoir partagé vos connaissances, votre expérience sur le diagnostic des kératites amibiennes. Je tenais à vous remercier d'avoir accepté de présider ce jury de thèse.

A Danièle MAUBON,

Pour ta grande disponibilité, ta bonne humeur, ton enthousiasme. Un grand merci pour tous tes encouragements et ton implication qui nous ont permis de mener à bien ce projet. Je te remercie sincèrement pour ton encadrement, tes précieux conseils et ton soutien permanent.

A Monsieur Hervé PELLOUX,

Pour m'avoir fait confiance en me proposant ce projet et pour avoir accepté de faire partie des membres du jury.

A Marie-Pierre BRENIER-PINCHART,

Pour avoir partagé tes connaissances et ton expérience sur la mise au point de la technique. Merci beaucoup pour tous tes précieux conseils.

A Claudine PINEL,

Pour tous tes encouragements, ton soutien et ta bonne humeur constante. Merci pour toutes les connaissances acquises grâce au projet Mucofong.

A Monsieur Christophe CHIQUET,

Pour votre implication dans notre projet et pour m'avoir fait l'honneur d'être un des membres du jury.

A Elisabeth RENARD,

Pour votre disponibilité et votre réactivité vis-à-vis de ce projet. Je vous remercie sincèrement pour vos conseils et votre implication qui m'ont permis de recueillir tous les renseignements cliniques nécessaires pour compléter ce travail.

A l'équipe du laboratoire de l'hôpital de Voiron

Je tenais à remercier en particulier **Isa** : un grand merci à toi pour tout le temps que tu as pris pour me former, pour la réalisation de mon premier poster. Merci pour tous tes encouragements très précieux et tous les moments partagés.

Anne pour m'avoir accueilli dans ton laboratoire, pour ta gentillesse, ta bonne humeur et tes conseils qui m'ont permis de passer un semestre inoubliable.

Nadia pour toutes les connaissances que tu m'as transmises notamment en bactériologie mais aussi dans les autres secteurs.

Merci également à **Clara** et **Corinne** pour leurs conseils

Merci à **Christiane** pour ton aide, **Céline** et toute l'équipe

A l'ensemble des biologistes et techniciens qui m'ont accueilli au cours de mes quatre années d'internat et se sont impliqués dans ma formation

Aux internes qui ont partagé ces quatre ans avec moi. Un merci particulier à toi **Stéphanie**, pour tes conseils et ta disponibilité, et à toute ma promo

A ma famille

Pour m'avoir aidée et soutenue tout au long de mes études. Pour tous les moments de joie et de bonheur partagés.

A Françoise

Pout ta bonne humeur et ton soutien permanent même en des moments difficiles. Je tenais à te remercier très sincèrement pour ta disponibilité et tes précieux conseils. En espérant que le violon nous réunisse encore longtemps.

INTRODUCTION

La kératite amibienne (KA) est une pathologie infectieuse de la cornée, de découverte relativement récente : les deux premiers cas ont été rapportés aux Etats-Unis dans les années 1970.[48] Cette pathologie, liée aux amibes libres, est rare mais son incidence est en augmentation depuis la fin des années 1980. Cette tendance peut être expliquée par le développement exponentiel du port de lentilles de contact, qui constitue le facteur de risque majeur de cette atteinte oculaire.[6]

Les amibes libres généralement impliqées dans les KA appartiennent au genre *Acanthamoeba*. Il a été rarement rapporté dans la littérature des cas de KA causées par d'autres amibes libres.[34]

Le diagnostic clinique est souvent difficile du fait de l'absence de signes spécifiques en début d'infection et de sa ressemblance avec un tableau de kératite herpétique. Or, un diagnostic précoce est essentiel car il conditionne la mise en place rapide d'un traitement adapté indispensable pour éviter des complications graves.[3, 9]

Actuellement, le diagnostic biologique consiste, en général, à réaliser un examen direct à l'état frais ainsi qu'après coloration, associé à une mise en culture du prélèvement sur un milieu spécifique. Ces techniques sont longues (trois semaines de culture avant de pouvoir rendre un résultat négatif), et manquent de sensibilité. Afin de pallier à ces inconvénients, depuis une dizaine d'années, des techniques de biologie moléculaire basées, notamment, sur la mise en évidence de l'ADN du microorganisme par polymerase chain reaction (PCR) en temps réel, sont en développement.

L'objectif de ce travail de thèse était d'adapter, au sein du laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Grenoble, une PCR en temps réel afin d'augmenter la sensibilité de diagnostic des KA. En effet, jusqu'alors, la technique de mise en évidence des amibes libres dans les prélèvements consiste en un examen direct et une culture sur gélose non

nutritive recouverte d'*Escherichia coli*. Afin de développer notre technique, nous nous sommes inspirés de la PCR en temps réel décrite d'abord par l'équipe de Qvarnstrom[56] puis reprise par celle de Thompson.[70] Cette PCR a été adaptée et optimisée grâce à l'intégration d'une PCR détectant un gène humain, la béta-globine, informant sur la qualité du prélèvement, essentielle pour une bonne sensibilité de l'examen, et permettant de limiter les résultats faussement négatifs liés à un prélèvement non optimal. Cette nouvelle PCR (MAB-PCR : Multiplex *Acanthamoeba* Beta globine PCR) a été optimisée sur des cultures axéniques d'*Acanthamoeba polyphaga* puis testée sur des souches conservées au laboratoire et, prospectivement, sur des grattages cornéens issus de patients suspects de KA. La phase d'optimisation, la validité de la PCR et les résultats obtenus sur les grattages cornéens seront exposés dans ce manuscrit, après quelques généralités et rappels historiques permettant de replacer la problématique dans son contexte actuel.

GENERALITES

Les amibes libres sont des protozoaires (classification dans la figure 1) ubiquitaires (présents dans l'eau, l'air, le sol) capables de réaliser sans hôte la totalité de leur cycle cellulaire dans la nature.

Trois genres principaux d'amibes libres peuvent être impliqués en pathologie humaine : *Acanthamoeba*, *Balamuthia* et *Naegleria*. Elles sont responsables d'atteintes graves du système nerveux central : l'encéphalite granulomateuse pour les deux premiers genres ou la méningoencéphalite pour le dernier. Ces pathologies surviennent préférentiellement chez des personnes immunodéprimées. Ces amibes libres sont donc considérées comme des pathogènes opportunistes pouvant également entrainer des infections généralisées chez des patients séropositifs pour le VIH.[66]

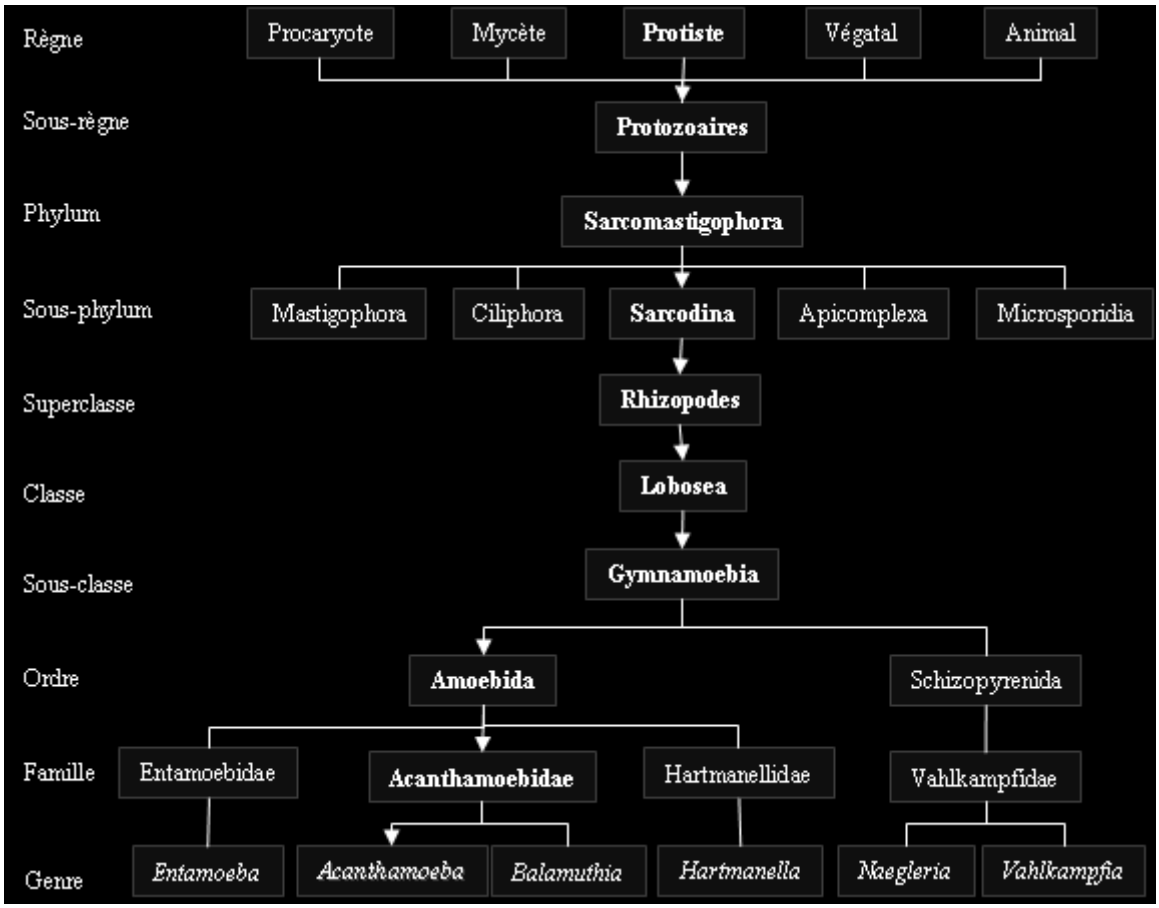


Figure 1 : Schéma phylogénétique des amibes libres (d'après Marciano-Cabral[43])

Par ailleurs, les *Acanthamoeba* spp. sont aussi responsables d'atteintes oculaires de type kératites potentiellement graves et pouvant nécessiter une kératoplastie voire une énucléation en cas de diagnostic et de traitement trop tardifs.[62, 74, 76] Dans ce cas, les patients atteints sont en général immunocompétents.

Notre étude concernant le diagnostic des KA, nous nous intéresserons donc, par la suite, uniquement à ce genre d'amibes libres.

I *Acanthamoeba* spp.

Les *Acanthamoeba* spp. sont cosmopolites et ubiquitaires de notre environnement : sol, air, eau de piscine, mais aussi dans l'eau potable (qui peut contenir jusqu'à 10 000 amibes par litre[9]). Ces protozoaires existent sous deux formes : une forme végétative également appelée trophozoïte et une forme kystique.

1 Morphologie – cycle

1.1 Trophozoïte

Le trophozoïte (figure 2) mesure de 15 à 40 µm et se caractérise par l'émission de nombreux acanthopodes fins, pseudopodes permettant le déplacement de l'amibe et son adhésion aux surfaces. Ces acanthopodes sont spécifiques du genre *Acanthamoeba*, et permettent la distinction avec les autres genres. Le trophozoïte se nourrit de bactéries, d'algues ou d'autres microorganismes présents dans son environnement. C'est la forme réplicative, par division binaire, et également la forme invasive au niveau tissulaire.[6, 11, 15]

Les conditions défavorables comme l'absence de nutriments, vont amener le trophozoïte à s'enkyster.

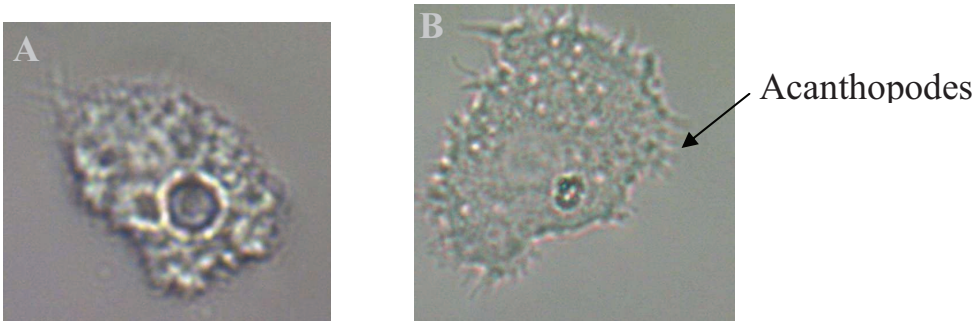


Figure 2 : Trophozoïtes au grossissement X40 (Photos M. Dubosson)
A : *A. polyphaga* B : *A. castellanii*

1.2 Kyste

Le kyste a un diamètre de 11 à 20 µm et se caractérise par la présence d'une double paroi.[27] Ces deux parois (exine ou ectokyste et intine ou endokyste) se rejoignent en plusieurs points pour former des pores ou ostioles, ce qui donne un aspect caractéristique du kyste en forme étoilée ou polygonale (figures 3 et 4).

Le kyste correspond à la forme de résistance et de dissémination : il peut survivre jusqu'à un an dans un milieu défavorable (températures ou pH extrêmes par exemple). Il résiste également à la chloration (dans les eaux de piscine notamment), à certains antibiotiques et désinfectants.[43]

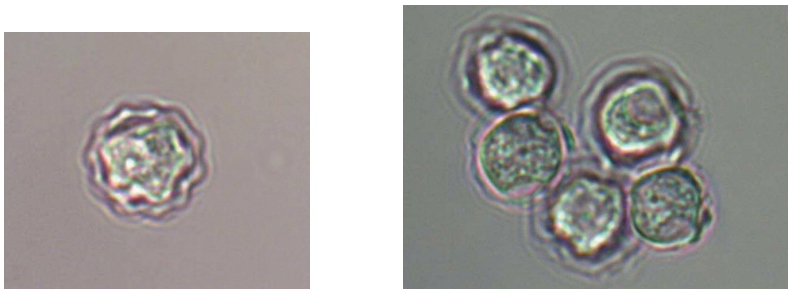


Figure 3 : Kystes *A. castellanii* (grossissement X40) (photos M. Dubosson)

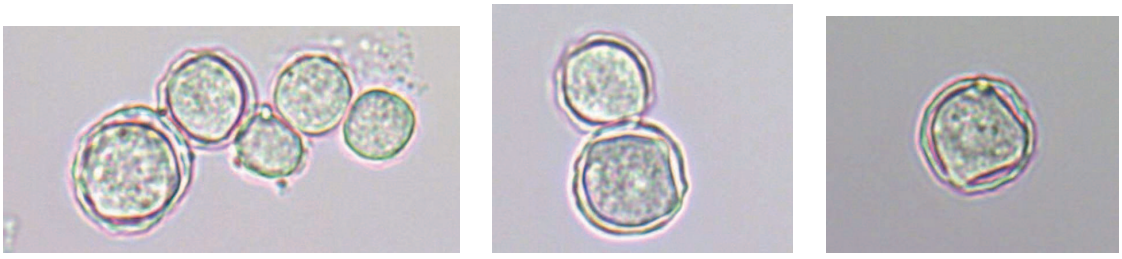


Figure 4 : Kystes *A. polyphaga* (grossissement X40) (photos M. Dubosson)

1.3 Cycle

Dans leur cycle de vie, les *Acanthamoeba* spp. existent sous deux formes : trophozoïte et kyste. Le passage d'une forme à l'autre dépend des conditions extérieures : si le milieu est défavorable (pH et/ou température extrêmes, absence de nutriments), les trophozoïtes vont s'enkyster. Inversement, si les conditions deviennent favorables, les kystes peuvent à nouveau se transformer en trophozoïtes même après plusieurs mois.

Les trophozoïtes se multiplient par division binaire et sont capables d'infecter l'homme par différentes portes d'entrée : oculaire, cutanée (au niveau d'une lésion) ou par les voies respiratoires (figure 5).

Les kystes sont la forme de résistance mais ils peuvent également entrer dans l'organisme humain par les différentes voies citées précédemment. Les deux formes sont donc susceptibles d'être retrouvées dans les tissus et donc, en ce qui nous concerne, dans les grattages cornéens.[6, 32, 43]

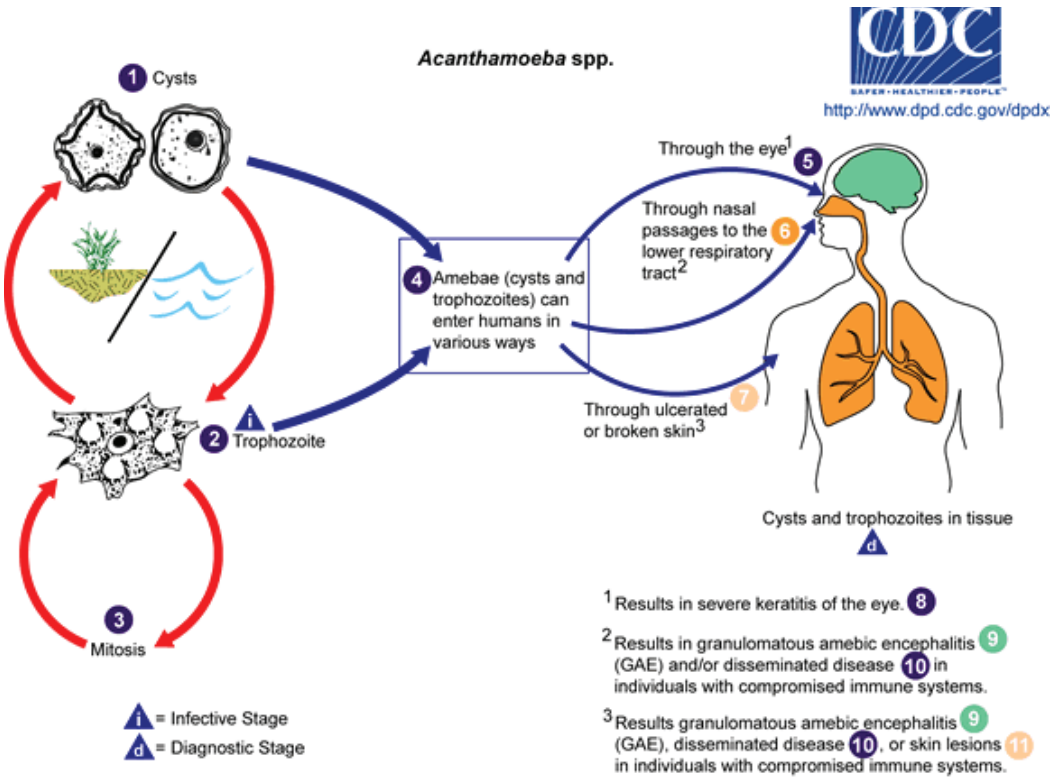


Figure 5 : Cycle des *Acanthamoeba* sp (tiré du site http://www.dpd.cdc.gov/dpdx)

2 Classification

Il existe actuellement deux classifications des *Acanthamoeba* spp. : une classification par espèces basée sur les caractères morphologiques et une par génotypes reposant sur des critères de génétique moléculaire.

2.1 Classification morphologique

Cette première classification a été décrite par Pussard et Pons en 1977[55] : elle comprenait 18 espèces du genre *Acanthamoeba* réparties en trois groupes (tableau I) en fonction des caractéristiques morphologiques des kystes.[32, 75]

Tableau I : Classification des espèces d'*Acanthamoeba* par Pussard et Pons[27]

Group I	Group II	Group III
A astronyxis	*A castellanii*	*A palastinensis*
A comandoni	*A mauritaniensis*	*A culbertsonii*
A echinulata	*A polyphaga*	*A lenticulata*
	A lugdunensis	*A pustulosa*
	A quina	*A royreba*
	A rhysodes	
	A divionensis	
	A paradivionensis	
	A griffini	
	A triangularis	

Cette classification basée sur la taille et la morphologie des kystes permet de classer facilement les amibes libres en genre. En revanche, il est beaucoup plus difficile de distinguer les espèces du fait de différences morphologiques pouvant être minimes et varier en fonction des conditions de culture.[43] Par la suite, d'autres classifications également basées sur la morphologie des kystes amibiens mais associant d'autres critères comme les mouvements, la mitose et des caractères immunologiques ont été décrites.[33, 35, 52] Actuellement, ces classifications par espèce sont délaissées au profit de celles génotypiques s'appuyant sur des critères moléculaires.

2.2 Classification génotypique

La classification génotypique est basée sur le séquençage de certaines parties hypervariables du génome des *Acanthamoeba* spp. : plusieurs régions ont été utilisées mais la plus fréquemment employée est celle codant l'ARN ribosomal 18S.[21, 69]

Actuellement, 17 génotypes ont été décrits à partir de souches provenant essentiellement de l'environnement et de prélèvements d'eau. Un arbre phylogénétique des différents génotypes d'*Acanthamoeba* spp. est présenté sur la figure 6.

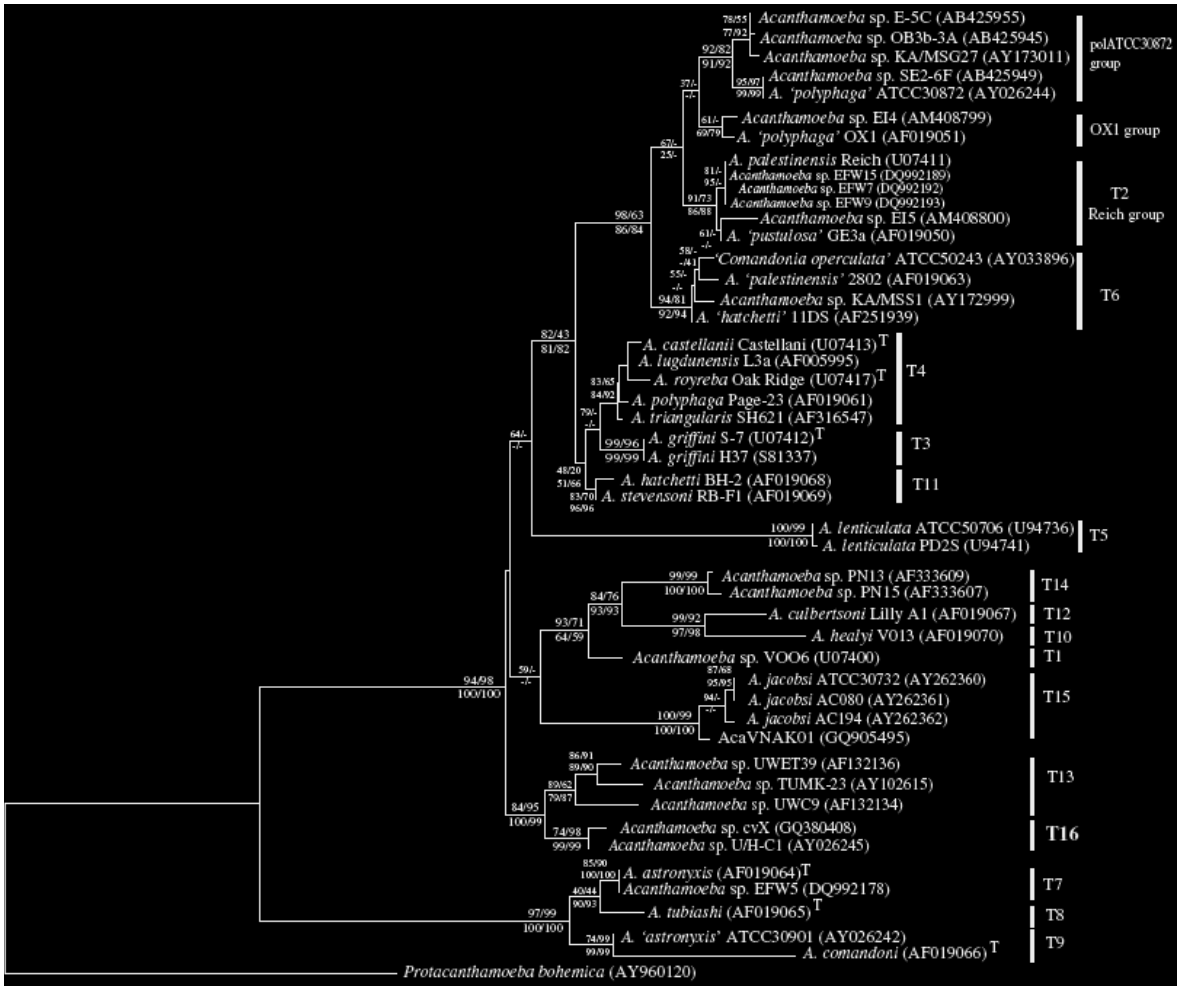


Figure 6 : Arbre phylogénétique des différents génotypes d'*Acanthamoeba* (tiré de Corsaro et al[13])

A ces 16 génotypes, s'ajoute un génotype T17 décrit, postérieurement à la publication, par l'équipe de Nuprasert[49]. Nous pouvons constater qu'à un même génotype peuvent correspondre plusieurs espèces.

Sur ces 17 génotypes, très peu ont aujourd'hui été isolés dans des KA. Dans plus de 90% des cas de KA, le génotype T4 est mis en cause. Ensuite, ce sont les génotypes T3 et T11 et, encore plus rarement, les génotypes T2, T5, T6 et T15[17, 63, 64] qui peuvent être impliqués.

II Kératites amibiennes

Les KA représentent une pathologie dont l'incidence augmente depuis les années 90 avec le développement du port des lentilles de contact. Les amibes libres responsables de cette pathologie sont, dans la très grande majorité des cas, les *Acanthamoeba* spp. De très rares cas de KA ont été décrits impliquant d'autres genres d'amibes libres, en général, en association avec des *Acanthamoeba* spp.[18, 34, 42, 51]

1 Physiopathologie

La KA est une inflammation de la cornée due à une infection par des amibes libres. La cornée est la partie la plus superficielle de l'œil, transparente, constituée de différentes couches (figure 7) : l'épithélium cornéen, qui est en contact avec le flux lacrymal et les paupières, puis la membrane de Bowman qui le sépare du stroma, la membrane de Descemet et enfin l'endothélium cornéen.

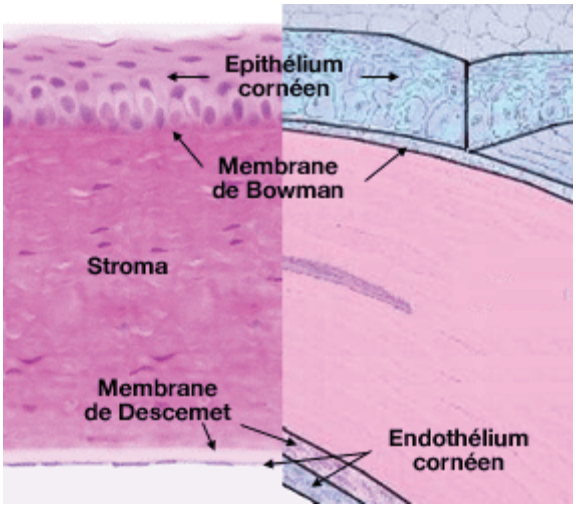


Figure 7 : Schéma des différentes couches cellulaires de la cornée (tiré de www.vetopsy.fr)

La cascade physiopathologique[11, 53, 73] des KA se déroule en plusieurs étapes comme montré sur la figure 8 :

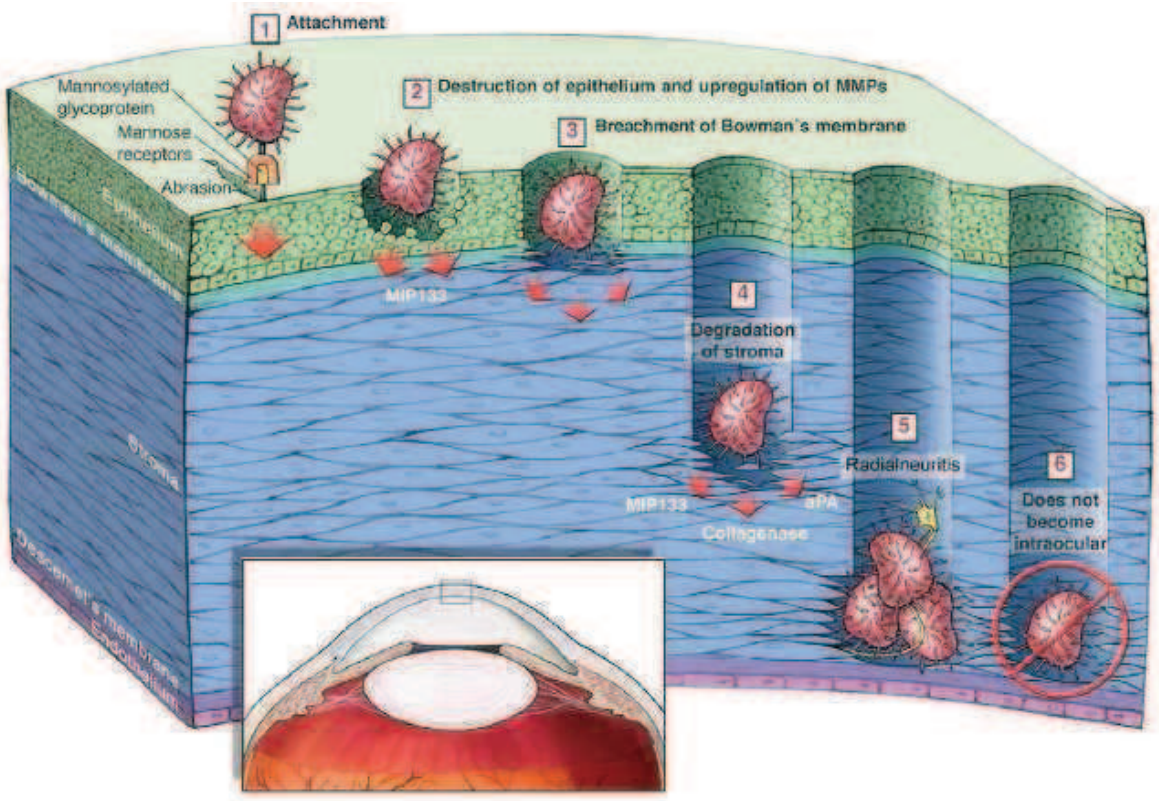


Figure 8 : Cascade physiopathologique des kératites amibiennes (tirée de Clarke et al.[11])

1 – Adhésion des trophozoïtes à l'épithélium cornéen (récepteurs spécifiques)
2 – Production de MIP, protéine cytolytique, et destruction de l'épithélium
3 – Infiltration stromale par rupture de la membrane de Bowman
4 – Dégradation du stroma cornéen grâce à la production de différentes enzymes
5 – Kératonévrite radiaire et douleur intense du à l'inflammation des nerfs oculaires
6 – Arrêt de la progression des trophozoïtes avant l'endothélium cornéen

Les formes végétatives adhèrent à l'épithélium cornéen au niveau d'une lésion (microtraumatismes générés par les lentilles ou traumatisme accidentel de la cornée) grâce à des récepteurs mannose spécifiques (mannose-binding protein MBP). Cette étape fondamentale est favorisée par le port des lentilles de contact : elles sont, d'une part, source de contamination par les protozoaires et, d'autre part, leur port régulier augmente l'expression des récepteurs MBP au niveau de l'épithélium cornéen. La liaison des trophozoïtes à ses récepteurs spécifiques MBP entraîne une production de MIP (mannose-induced protein), protéine cytolytique détruisant l'épithélium cornéen. A cette phase

précoce de la KA où seul l'épithélium cornéen est atteint, plusieurs signes non spécifiques peuvent se manifester comme une kératite ponctuée superficielle, des infiltrats épithéliaux, une pseudodendrite mimant une kératite herpétique. Un seul signe est pathognomonique de la KA mais très inconstant, la kératonévrite radiaire, qui correspond à l'infiltration des nerfs cornéens par les cellules inflammatoires et les trophozoïtes. Cette localisation autour des nerfs oculaires et la production de cytokines permet d'expliquer les douleurs disproportionnées décrites lors de la phase précoce de la KA (par rapport à l'état de la cornée).[6, 11, 27]

La production d'autres protéases (comme des collagénases, des métalloprotéases), en plus du MIP, permet le passage des amibes à travers la membrane basale puis la capsule de Bowman. Cette atteinte stromale se présente sous la forme d'infiltrats, d'hypopion, d'anneau immunitaire périkératique avec une inflammation importante.

L'abcès cornéen peut évoluer jusqu'à la perforation mais il est très rare que les trophozoïtes envahissent l'endothélium cornéen. Contrairement aux kératites infectieuses bactériennes, il est exceptionnel que les *Acanthamoeba* spp. soient responsables d'endophtalmie.[26, 47]

2 Epidémiologie - Facteurs de risques

Le premier cas de KA a été décrit relativement récemment, en 1974, aux Etats-Unis. D'autres cas sporadiques ont été décrits par la suite aux Etats-Unis puis au Royaume-Uni.[29, 67] Depuis la fin des années 1980, une augmentation de l'incidence des KA est constatée.[28] Ceci peut s'expliquer par plusieurs phénomènes :

- le développement du port des lentilles de contact
- la sensibilisation des cliniciens à cette pathologie
- les progrès réalisés dans les techniques de diagnostic.

Par ailleurs, des études montrent une grande variabilité du taux d'incidence des KA selon les pays : 1,36 cas par million de porteurs de lentilles aux Etats-Unis contre 17 à 21 cas par million de porteurs en Angleterre.[58, 63] Cette disparité géographique est probablement en partie liée à une contamination des eaux par les amibes libres de type *Acanthamoeba* spp. beaucoup plus fréquente au Royaume-Uni.[15]

En France, la KA reste rare, avec 1 cas pour 30 000 porteurs de lentilles de contact, mais son incidence est en constante augmentation.[6, 63] Elle touche des patients plutôt jeunes, avec des moyennes d'âge dans les études autour de 35 ans, et autant de femmes que d'hommes (sex ratio aux alentours de 1).[1, 57]

Le facteur de risque majeur des KA est le port de lentilles de contact. Environ 85% des cas sont retrouvés chez des porteurs de lentilles. Plusieurs raisons peuvent être évoquées :

- elles sont une source de contamination par les amibes
- elles favorisent l'adhésion des trophozoïtes sur la cornée par la surexpression de récepteurs spécifiques MBP
- elles provoquent des microtraumatismes répétés de la cornée

Cependant, les infections sont retrouvées essentiellement chez des porteurs ne respectant pas scrupuleusement les consignes d'hygiène et d'entretien des lentilles : désinfection insuffisante, préparation de solutions salines à l'eau du robinet, baignades en piscine ou en eau douce.[8, 9] Dans un rapport d'enquête de l'agence française de sécurité sanitaire des produits de santé publié en 2009,[1] 303 cas de kératites infectieuses chez des porteurs de lentilles ont été rapportés. Chez tous ces patients, au moins un critère de non respect des bonnes pratiques a pu être mis en évidence : durée d'utilisation des lentilles, de l'étui et/ou du produit de lavage, port des lentilles lors d'un bain ou d'une douche, entretien avec l'eau du robinet.

Aucune enquête épidémiologique n'a permis de mettre en évidence un risque supérieur avec certains types de lentilles de contact.[15] Cependant, il semble que les porteurs de lentilles rigides perméables au gaz soient moins fréquemment atteint que les porteurs de lentilles souples.[54] Tous les types de lentilles souples sont utilisés parmi les patients atteints de KA. Toutefois, le risque semble moindre avec les lentilles jetables journalières. Ceci est probablement lié au fait qu'aucune solution de lavage n'est utilisée.[58]

Un second facteur de risque a pu être mis en évidence à partir de l'observation des 15% de cas de KA survenant chez des non porteurs de lentilles de contact. La majorité de ces cas a été observée chez des patients ayant eu un traumatisme cornéen avec corps étranger ou non, suivi d'une exposition à du matériel souillé par exemple, baignade en piscine, contact avec des végétaux, de la terre.[27, 39, 65]

3 Clinique (figures 9 et 10)

La kératite amibienne apparait de façon brutale sans symptômes spécifiques initialement : douleur très importante souvent disproportionnée par rapport aux signes cliniques en début d'infection, photophobie, œil rouge, baisse de l'acuité visuelle, atteinte en général monoculaire. Seule la kératonévrite radiaire (infiltration des nerfs cornéens par les cellules immunitaires) semble être un signe pathognomonique de la KA mais inconstamment présent.

Cette symptomatologie aspécifique, variée, pouvant mimer une kératite herpétique entraine souvent un retard au diagnostic. De ce fait, la prise en charge thérapeutique adaptée va être tardive et pourra conduire à une aggravation de l'atteinte cornéenne. L'infection est sévère voire gravissime dans environ 15% des cas.[27]

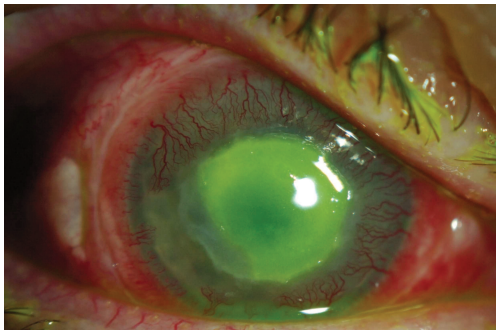
A)  B) 

Figure 9 : Photos de kératite amibienne (photos d'E. Renard)
A) Présence d'une hyperhémie conjonctivale avec des néo vaisseaux limbiques, d'une opacité cornéenne centrale prenant la fluorescéine (désépithélialisation)
B) Infiltration stromale diffuse et désépithélialisation

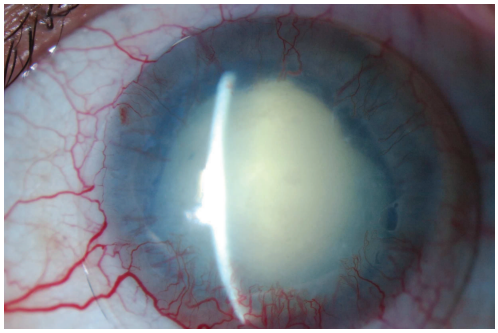


Figure 10 : Photo d'une kératite amibienne à distance de la phase aiguë d'évolution péjorative (Photo d'E. Renard)
Persistance de néo vaisseaux cornéens sur 360°, opacité cornéenne centrale blanche, dense, masquent la chambre antérieure

Au départ, l'infection ne touche que l'épithélium cornéen puis la KA se développe pour atteindre le stroma cornéen se traduisant par un anneau immunitaire. Les complications de la KA peuvent conduire à une perforation de la cornée et à la nécessité d'une kératoplastie voire d'une énucléation.[6, 9, 10]

4 Traitement

Une prise en charge thérapeutique adaptée doit être débutée le plus précocement possible afin de limiter au maximum les complications. Dans un premier temps, le traitement consiste à tuer les amibes libres et à réduire l'inflammation et la douleur. En période post infectieuse, un traitement chirurgical peut être envisagé dans le but d'une réhabilitation

visuelle. Cette chirurgie se révèle aussi être, dans certains cas, d'une bonne efficacité sur l'inflammation et les douleurs persistantes. Toutefois, dans le cas de perforation cornéenne imminente, une chirurgie « à chaud » peut être préconisée.

Pour être efficace, le traitement doit avoir une action contre les kystes d'*Acanthamoeba* spp. Or, ce sont des éléments avec une double paroi résistant à de nombreuses molécules.[14, 37] A l'opposé, les formes végétatives sont sensibles à la majorité des anti-infectieux (antibiotiques, antiseptiques, antifongiques…) et sont donc facilement éliminées. Aucune molécule n'a, à l'heure actuelle, l'autorisation de mise sur le marché pour le traitement des KA. Les molécules montrant actuellement, *in vitro*, la meilleure efficacité sont les biguanides et les diamidines. Ces deux familles médicamenteuses ont une structure pharmacologique proche.[15, 20]

Les diamidines sont représentées par l'iséthionate de propamidine (Brolène®) et l'hexamidine (Désomédine®) ; le PHMB (Poly Hexaméthylène biguanide) et la chlorhexidine sont les deux biguanides disponibles. Ces molécules agissent au niveau de la membrane cellulaire de l'amibe. Les biguanides ont aussi une action au niveau des mitochondries en bloquant leur chaîne respiratoire.[6]

Du fait du faible nombre de cas de KA, une seule étude randomisée comparant une thérapie par PHMB à un traitement par chlorhexidine a été publiée par l'équipe de Lim *et al*.[41] Une efficacité comparable des deux traitements en monothérapie a été constatée. Du fait du manque d'essai clinique comparant l'efficacité des différents protocoles, il n'y a pas de consensus pour la prise en charge des KA. Les prélèvements réalisés avant la mise en place de la thérapeutique font partie du geste thérapeutique car ils permettent de débrider l'épithélium cornéen et de favoriser la pénétration des collyres. Au niveau du traitement proprement dit, les protocoles font appel à l'une et/ou l'autre des deux classes citées précédemment :

- Si l'abcès n'est pas sévère : l'utilisation d'un collyre à base d'hexamidine 0,1% (Désomédine®) est suffisante. Celui-ci peut être associé à des collyres antibiotiques en cas de surinfection bactérienne concomitante.
- En cas d'atteinte grave (présence d'un ou plusieurs critères cités dans le tableau II), l'hexamidine 0.1% sera associée à un biguanide, le plus souvent le PHMB 0,02%. Ces collyres sont administrés à raison d'une goutte toutes les heures (y compris la nuit) pendant 48h puis seulement la journée pendant 72h. Ensuite, la décroissance des doses se fera très progressivement sur plusieurs mois en fonction de l'évolution avec une surveillance clinique d'abord hebdomadaire puis mensuelle. Le suivi est basé sur des critères d'infection, d'inflammation et de cicatrisation.

Tableau II : Critères de gravité des KA (tiré de Bourcier *et al*[5])

Critères locaux	Critères généraux
Règle des « 1-2-3 » : abcès ou kératite o accompagné d'un tyndall > 1+ o de diamètre > 2 mm o situé à moins de 3 mm de l'axe optique Sclérite, Endophtalmie associée Perforation imminente ou avérée Suspicion d'*acanthamoeba, champignon* Aggravation malgré un traitement antibiotique de 24 heures Atteintes bilatérales	• Monophtalme • Enfant • Immunodéprimé • Mauvaise observance du traitement

En cas de lésions cornéennes cicatricielles, une greffe de membrane amniotique peut être indiquée. Elle permet d'activer la ré-épithélialisation de la cornée et peut aussi avoir une action analgésique et anti-inflammatoire.

Si cette chirurgie ne suffit pas, une greffe de cornée peut être envisagée avec, cependant, un risque de récurrence de la KA sur le greffon. Ce risque est d'autant plus important que l'œil est inflammatoire.[27]

III Diagnostic biologique des kératites amibiennes

Actuellement, le diagnostic biologique des kératites amibiennes est basé sur un examen direct à l'état frais et coloré au May-Grünwald-Giemsa (MGG) rapide (kit RAL®) associé à une culture du grattage cornéen sur gélose NN recouverte d'*E. coli*.

1 Prélèvement

Le prélèvement constitue une étape capitale pour le diagnostic des KA : de la qualité du prélèvement dépend la qualité du diagnostic. En effet, plus le prélèvement est riche plus le diagnostic sera sensible donc plus le nombre de faux négatifs sera faible.

Il consiste en un grattage en profondeur, sous anesthésie locale, de l'abcès cornéen. Celui-ci peut s'effectuer à l'aide d'une aiguille, d'un scalpel ou encore d'une éponge montée, après lavage de l'œil au sérum physiologique et, autant que possible, avant toute utilisation de collyres. En cas de forte suspicion et de résultats négatifs sur le grattage, une biopsie cornéenne peut être envisagée.[73, 79]

Le matériel utilisé pour le prélèvement est alors envoyé dans les meilleurs délais au laboratoire : soit avec quelques gouttes de sérum physiologique pour la mise en culture (afin de préserver la viabilité des trophozoïtes) soit sec pour la recherche d'ADN d'*Acanthamoeba* spp. par PCR. Une lame pour l'examen direct coloré est également réalisée au lit du patient et envoyée au laboratoire avec les autres prélèvements.

Ces prélèvements pour suspicion de KA viennent, dans la plupart des cas, s'ajouter aux autres recherches de microorganismes, en particulier bactériens, viraux, et parfois fongiques : le protocole, la séquence des prélèvements et leur acheminement doivent être mis en place en étroite collaboration avec les différents services concernés afin d'optimiser les chances d'aboutir à un diagnostic de certitude.

2 Examen direct

L'examen direct (ED) à l'état frais consiste à mettre une goutte de prélèvement entre lame et lamelle puis à rechercher au microscope la présence d'amibes libres : trophozoïtes et/ou kystes.

Pour l'examen direct après coloration au MGG rapide (RAL®), la lame réalisée dans le service est fixée, colorée puis observée au microscope à la recherche de kystes ou de formes végétatives d'amibes (figure 11).

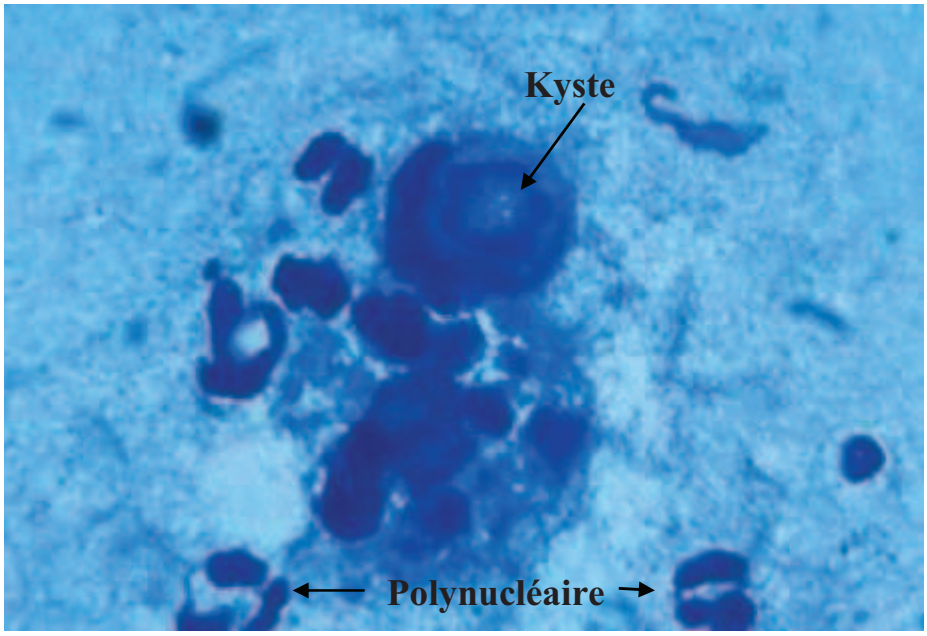


Figure 11 : ED d'un grattage cornéen après coloration MGG (Obj X100) **(Photo Cahier de Formation Bioforma N°11)**

Le prélèvement pouvant être très pauvre en *Acanthamoeba* spp, l'examen direct s'avère peu sensible. De plus, les kystes sont parfois altérés ce qui rend la lecture de l'ED difficile. Cependant, cet examen reste important car la coloration non spécifique utilisée peut également mettre en évidence d'autres microorganismes, fongiques ou bactériens ; il renseigne aussi sur la qualité du grattage. Enfin, il peut être utile dans le cadre d'une demande de PCR *Acanthamoeba*, l'extraction pouvant être faite en dernier recours à partir du matériel étalé sur la lame.

3 Culture

Le prélèvement est mis en culture sur une gélose spécifique non nutritive, milieu NN (dont la composition est donnée en annexe 1). Cette gélose a été préalablement recouverte d'une solution d'*Escherichia coli* (ATCC 25922). Elle est alors ensemencée et incubée à 27°C pendant trois semaines, délai nécessaire avant de pouvoir rendre un résultat négatif (figure 12). Une lecture des milieux de culture est réalisée deux fois par semaine au microscope inversé.

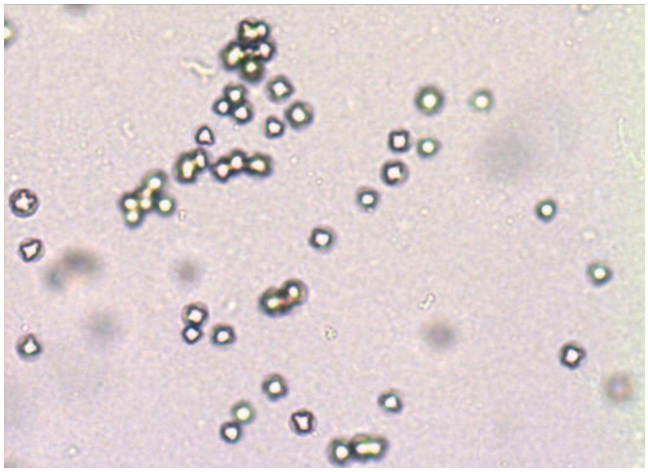
A)  **B)** 

Figure 12 : Culture *Acanthamoeba* sp. (photos M. Dubosson)
A) Gélose NN recouverte d'*E. coli*
B) Observation au microscope (X10) de kystes d'*Acanthamoeba* sp.

4 Diagnostic moléculaire

La technique habituelle de diagnostic des KA (examen direct associé à la mise en culture du prélèvement) manque de sensibilité, estimée à environ 50%[78], et nécessite du temps (jusqu'à trois semaines de culture). Or, un diagnostic rapide permet une prise en charge immédiate de la KA avec la mise en place d'un traitement efficace. Ce traitement précoce améliore significativement le pronostic visuel du patient.[3, 10, 42] Par exemple, dans une étude française publiée par Agla *et al*,[2] portant sur 8 cas recensés en deux ans dans le service d'ophtalmologie de l'Hôtel-Dieu, une meilleure acuité visuelle finale chez les

patients traités précocement a été démontrée. C'est pourquoi, depuis quelques années, des techniques de biologie moléculaire, plus rapides et plus sensibles, se sont développées.

Les méthodes mises au point comprennent essentiellement des techniques d'amplification du génome par PCR, soit standard[16, 40, 44, 61, 81] soit en temps réel.[22, 56, 59, 70] D'autres techniques telles que des profils de restriction enzymatique RFLP ou d'hybridation in situ [33, 36, 43, 68] ont également été décrites, mais ne seront pas développées dans ce manuscrit.

IV La technique de PCR en temps réel

La PCR est une technique d'amplification *in vitro* de matériel génétique, développée dans la fin des années 80. Actuellement, deux types de PCR coexistent :

- la PCR conventionnelle : le matériel génétique est amplifié dans un thermocycleur (appareil capable de chauffer et refroidir très rapidement) puis le produit d'amplification est déposé sur un gel d'électrophorèse contenant, le plus souvent, du bromure d'éthidium, agent intercalant qui fluoresce sous les UV lorsqu'il est situé entre les bases des acides nucléiques ; après migration des produits d'amplification dans le gel d'agarose, celui-ci est révélé sous les UV. L'inconvénient majeur de cette technique est le risque de contamination des échantillons lors de la manipulation des produits amplifiés.
- la PCR en temps réel : cette technique tend de plus en plus à remplacer la précédente : plus rapide, elle permet surtout de limiter le risque de contamination entre les échantillons et également de quantifier le génome initialement présent après extraction.

Dans notre travail, nous avons choisi d'utiliser une technique de PCR en temps réel sur un mode qualitatif uniquement. En effet, la quantité de prélèvement ne peut pas, pratiquement, être standardisée ; de plus, la quantification n'apporte pas de réel bénéfice au diagnostic de

KA. Le diagnostic peut être posé dès que la présence d'*Acanthamoeba* spp dans un grattage de cornée est démontré, quelque soit la quantité du microorganisme. Notre choix s'est donc porté sur cette technique principalement de par sa rapidité et son moindre risque de contamination.

1 Principe de la PCR en temps réel

La réaction se déroule dans un mélange réactionnel contenant des désoxyribonucléotides (dNTP), une polymérase (enzyme de synthèse du matériel génétique choisie thermorésistante), du magnésium et un tampon. A ce mélange sont ajoutées des amorces, courtes séquences nucléotidiques encadrant la séquence d'intérêt, et une sonde marquée, oligonucléotide permettant la détection de la séquence d'intérêt.

La PCR se déroule en plusieurs étapes (figure 13):

1. dénaturation du double brin d'ADN par chauffage
2. hybridation des amorces et de la sonde
3. synthèse de la séquence complémentaire au brin matrice
4. ce cycle de 3 étapes est répété n fois

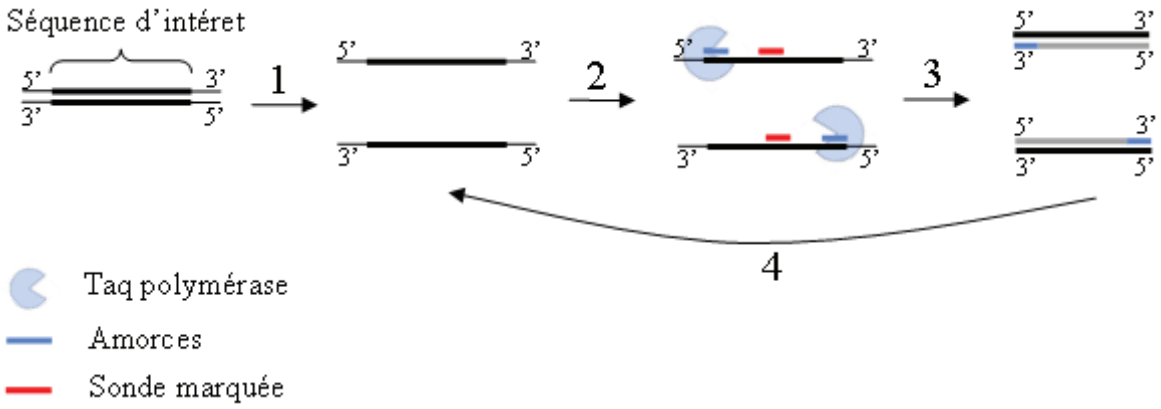


Figure 13 : Schéma du principe de PCR

La lecture de la fluorescence peut se faire lors de l'étape d'hybridation ou lors de la synthèse du brin complémentaire.

En fin de réaction, notre séquence d'intérêt est donc multipliée de façon exponentielle ce qui permet de détecter de faibles quantités d'acides nucléiques.

2 Sondes

Les sondes fluorescentes utilisées en PCR en temps réel sont basées sur le processus de transfert d'énergie par résonance de fluorescence ou FRET. Ce système met en jeu deux types de molécules : un fluorophore et un "quencher". Le fluorophore est excité par une énergie lumineuse. Il va retourner à son état initial en émettant un rayonnement fluorescent. C'est cette fluorescence émise qui est détectée par l'appareil de PCR en temps réel et qui permet de suivre la PCR. L'émission mesurée ne doit donc se produire que lorsque la sonde est hybridée spécifiquement à la séquence cible. C'est pourquoi un "quencher" est utilisé : cette molécule est capable d'absorber la fluorescence émise par le fluorophore s'ils sont suffisamment proches.

Il existe différents types de sondes fluorescentes utilisées pour la détection de l'ADN par PCR en temps réel[46] dont :

- sonde d'hydrolyse ou Taqman® (figure 14) : c'est le système que nous utilisons pour notre PCR. La sonde contient un fluorophore ou "reporter" en 5' et un "quencher" en 3'. La sonde intacte, qui n'émet pas de fluorescence (fluorophore et quencher étant proches), s'hybride avec sa séquence complémentaire spécifique. Lors de la synthèse du brin complémentaire par la polymérase, la sonde va être détruite par l'activité exonucléasique de la Taq polymérase. Le "quencher" éloigné du fluorophore n'absorbera plus la fluorescence qui sera alors

émise et détectée. L'intensité de la fluorescence, détectée au fil des cycles, est directement proportionnelle à la quantité d'ADN répliquée.

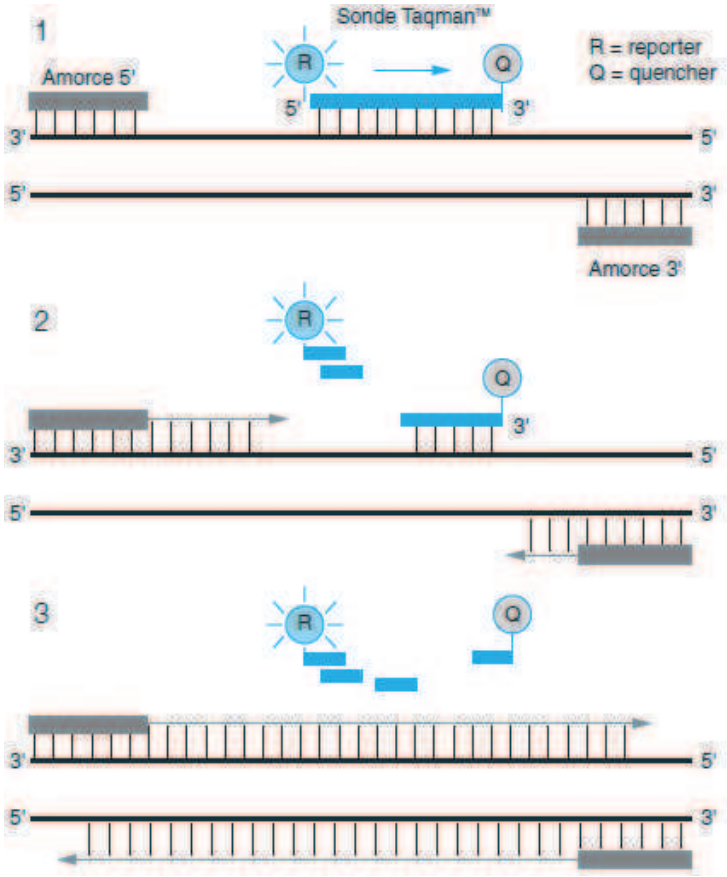


Figure 14 : Principe de la sonde d'hydrolyse ou Taqman®
(tiré de Tse *et al*, 2003[71])

- sonde d'hybridation en tandem : pour cette technique, deux sondes sont utilisées : elles sont marquées toutes les deux par un fluorophore. L'un des fluorophore est l'accepteur et l'autre le donneur : la fluorescence émise par le donneur excite l'accepteur qui émet alors une fluorescence. La détection de la fluorescence est réalisée lorsque les sondes sont hybridées car elles doivent être suffisamment proches pour que l'émission du donneur puisse exciter le fluorophore accepteur. L'intensité de fluorescence émise est proportionnelle à la quantité d'ADN répliquée.

- sonde Beacon® : cette sonde est marquée à une extrémité par un fluorochrome et à l'autre extrémité par un quencher et présente une structure particulière dite en épingle à cheveu. Cette structure rend impossible l'émission de signal (fluorochrome et quencher sont trop proches) en l'absence d'hybridation.

3 Place de la PCR dans le diagnostic des KA

L'objectif de ce travail étant d'adapter une PCR en temps réel dans notre laboratoire, les publications rapportant des protocoles de PCR standard ne sont pas mentionnées ici. Actuellement, quatre protocoles de PCR en temps réel ont été décrits.[22, 56, 59, 70] Un résumé des caractéristiques principales de ces différentes PCR en temps réel est donné dans le tableau III.

Nous pouvons constater que la séquence amplifiée se situe le plus souvent dans le gène codant l'ARN ribosomal 18S. Par ailleurs, seulement trois couples d'amorces ont été utilisés en PCR en temps réel. D'autres amorces ont été utilisées dans les protocoles de PCR standard dont, notamment, le couple JDP1/JDP2 qui est le plus utilisé pour le génotypage.[61, 64, 80] Ces amorces sont également situées dans le gène codant l'ARN ribosomal 18S.

Tableau III : Caractéristiques des différentes PCR en temps réel publiées actuellement

	Gène cible	Amorces	Méthode d'extraction	Sonde de détection/appareil	Protocole PCR	Contrôle interne	Témoin qualité du prélèvement	Limite de détection	Génotypes testés
Rivière *et al* [59]	ADN ribosomal 18S	TaqAcF et TaqAcR	Protocole tissulaire Wizard SV genomic DNA purification system	TaqAcP / AblPrism7700®	50°C 2min, 95°C 10min puis 40 cycles à 95°C 15s et 60°C 1min	Non	Non	10 trophozoïtes ou kystes/échantillon	T4
Qvarnstrom *et al* [56]	ADN ribosomal 18S	AcantF et Acant R (+ amorces pour *Balamuthia* et *Naegleria*)	Tampon de lyse + PK* puis inactivation de la PK	AcantP / Mx3000P®	50° 2min, 95°C 2min puis 40 cycles 95°C 15sec, 63°C 60sec	Non	Non	1 amibe par échantillon	T1, 4, 7 et 10 testés et détectés
Thompson *et al* [70]	ADN ribosomal 18S	Comparaison du couple TaqAcF/TaqAcR avec le couple AcantF/Acant R	Choc thermique puis extraction avec le kit MagnaPure complete DNA and RNA extraction	TaqAcP et AcantP / SmartCycler®	95°C 2min, 45 cycles : 95°C 15sec, 55°C 30sec (TaqAc) ou 60°C 30sec et 72° 30sec (Acant)	VZV	Non	2,3 trophozoïtes ou 0,7 kyste/10µL	Non défini
Goldschmidt *et al* [22]	ADN mitochondrial	*Acanthamoeba* Forward et *Acanthamoeba* Reverse	Prétraitement par la PK; inactivation de celle-ci ; extraction avec le kit MagnaPure Nucleic acid isolation	Acanthamoeba FAM-TAMRA / AblPrism7500®	95°C 20s puis 45 cycles : 95°C 3s puis 60°C 30s	PhHV (whole virus preparation of Seal Herpesvirus)	Non	1 amibe par échantillon	T3, 4, 5 et 11 testés et détectés

*PK : Protéinase K

MISE AU POINT DE LA PCR EN TEMPS REEL

I Objectif

L'objectif de ce travail est la mise en place d'une PCR pour le diagnostic de kératites amibiennes au sein du laboratoire. Nous avons adapté la PCR en temps réel décrite initialement par Qvarnstrom *et al.*[56] (en PCR multiplex) puis reprise par l'équipe de Thompson[70] (en PCR uniplex sur SmartCycler®). Notre choix s'est porté sur ces amorces spécifiques au genre *Acanthamoeba*, actuellement seules amibes libres impliquées clairement dans les kératites amibiennes. La séquence choisie permet la détection de la plupart des génotypes impliqués.

A cette PCR en temps réel effectuée sur le SmartCycler® (Cepheid) et ciblant le genre *Acanthamoeba*, nous avons associé la détection en PCR multiplex d'une partie du gène de la béta-globine. Ce témoin permet de nous informer sur la qualité du grattage cornéen (richesse cellulaire du prélèvement).

II Matériels et méthodes

1 Souches d'Acanthamoeba spp

Pour adapter et valider notre technique de PCR en temps réel, nous avons travaillé sur les souches suivantes :

- Souche de référence *Acanthamoeba polyphaga* : souche que nous avons utilisée pour toutes les expérimentations de mise au point de la technique.
- Souche de référence *Acanthamoeba castellanii*
- Quatre souches isolées au laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Grenoble provenant de grattage de cornée.

Les souches utilisées ont été cultivées en milieu liquide PYG et/ou en milieu gélosé non nutritif, gélose NN, recouverte d'*Escherichia coli*. Un résumé des avantages et inconvénients de ces deux milieux de culture est présenté sur la figure 15.

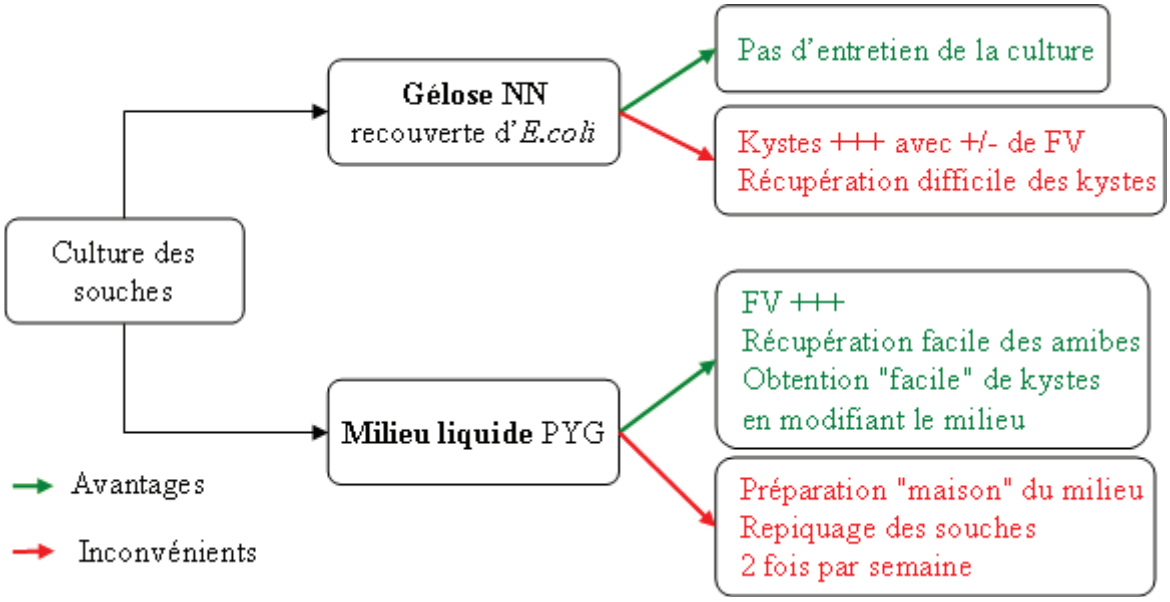


Figure 15 : Schéma récapitulatif des différents milieux de culture

1.1 Culture sur gélose NN

La composition de ce milieu et le protocole de fabrication sont détaillés en annexe 1.

Avant la mise en culture d'une souche, la gélose est recouverte d'une solution d'*Escherichia coli* et incubée au moins 2 heures à température ambiante. La boîte est alors ensemencée et incubée à 27°C.

L'avantage majeur de ce milieu est l'absence d'entretien de la culture. Cependant, il existe des inconvénients : l'obtention quasi exclusive de kystes (très peu de formes végétatives), la récupération peu aisée des kystes dans la gélose et la contamination des extraits par de l'ADN bactérien.

1.2 Culture en milieu liquide PYG

Ce milieu est également élaboré au laboratoire selon le protocole décrit en annexe 2.

Ces cultures en milieu liquide ont plusieurs avantages :

- Obtention de trophozoïtes (sans mélange avec des kystes)
- Transformation facile des formes végétatives en formes kystiques en remplaçant le milieu PYG par du milieu d'enkystement (composition en annexe 3). Après une dizaine de jours d'incubation à 27°C, l'ensemble des trophozoïtes se sont transformés en kystes.
- Récupération plus aisée des amibes : remise en suspension par grattage de la flasque de culture après une heure à +4°C, afin de diminuer l'adhésion des trophozoïtes au plastique

Cependant, ce type de culture nécessite un repiquage bi-hebdomadaire avec du milieu frais.

1.3 Préparation des suspensions d'amibes

Pour les formes végétatives, les boîtes de culture sont mises une heure à +4°C afin de décoller les trophozoïtes. Ensuite, le protocole de préparation des amibes est le même pour les trophozoïtes et les kystes.

Le tapis cellulaire est remis en suspension par grattage puis un certain volume est centrifugé. Le culot est lavé deux fois puis repris par 2mL de PBS. Un comptage en KOVA Glasstic® (Hycor) permet d'ajuster la dilution en fonction de la concentration finale désirée :

- Pour l'extraction d'un grand nombre de kystes, la dilution finale est centrifugée (3000rpm, 5 min) et le culot est extrait.

- Pour l'extraction d'un kyste isolé, une dilution à 20 kystes/mL est distribuée dans une plaque 96 puits ; la plaque est regardée au microscope inversé et le contenu du puits (50µL) est extrait directement sans centrifugation.

2 Cellules humaines

Afin de tester nos amorces et notre sonde béta-globine, nous avons extrait l'ADN de cellules humaines HFF (Human Foreskin Fibroblast) en culture. Pour cela, le tapis cellulaire a été décollé à l'aide de trypsine puis lavé. Le culot cellulaire a été repris en PBS pour comptage et extraction. Le protocole d'extraction pour les cellules est le même que celui retenu pour les amibes.

3 PCR en temps réel

3.1 Extraction de l'ADN

Nous avons essayé d'optimiser au maximum cette étape car elle est capitale pour les performances de notre technique. Cette étape est critique pour deux raisons principales :

- Comme nous l'avons vu précédemment, la forme kystique des *Acanthamoeba* spp. présente une double paroi qu'il faut lyser avant de pouvoir extraire l'ADN. Pour cela, nous procédons à une étape de prétraitement avant l'extraction proprement dite.
- De plus, le prélèvement peut être très pauvre en ADN, nous avons donc décidé d'ajouter 2µL de carrier ADN (polyA, Roche Applied Science) au début de l'extraction, ce qui permet théoriquement d'augmenter le rendement d'extraction.

La mise au point du protocole d'extraction a été effectuée sur la forme kystique, plus difficile à extraire. Le même protocole est utilisé pour les trophozoïtes et les cellules humaines.

3.1.1 Choix du prétraitement

Dans la littérature, nous retrouvons de nombreux prétraitements qui s'appuient sur trois principes différents :

- Le choc thermique[4, 70]
- L'utilisation d'un tampon de lyse : de différentes compositions, mais comprenant le plus souvent un surfactant ionique et parfois de la protéinase K[19, 56, 81]
- La lyse mécanique à l'aide de billes[64]

Dans une publication de l'équipe de Goldschmidt[23] ayant pour but de comparer différents prétraitements de kystes d'*Acanthamoeba* spp,, le protocole associant un prétraitement par le tampon ATL (Qiagen) et la protéinase K puis une extraction automatisée (MagnaPure) présentait la meilleure efficacité..

Après synthèse de la bibliographie, nous avons décidé de comparer deux prétraitements :

- L'un utilisant un tampon de lyse composé de TrisHCl, SDS et protéinase K
- L'autre utilisant le tampon de lyse tissulaire ATL du kit QIAamp DNA Mini® (Qiagen) associé à de la protéinase K et suivi d'un cycle de choc thermique (-80°C/ 95°C).

Pour ces deux prétraitements, nous avons ajouté une étape de désactivation de la protéinase K (chauffage à 95°C pendant 10min), étape décrite dans plusieurs publications.[23, 56]

3.1.1.1 Protocole de prétraitement par le tampon de lyse

Le culot de centrifugation est remis en suspension dans 100µL de PBS. 100µL de tampon de lyse (TrisHCl 20mM pH 8.3, SDS 0.5%) sont ajoutés à cette suspension, 10µL (un dixième du volume de l'échantillon) de protéinase K (Qiagen) et 2µL de carrier polyA. L'échantillon est ensuite incubé à 56°C dans un bloc chauffant sous agitation pendant 20min suivi de 10min à 95°C (désactivation de l'enzyme).

3.1.1.2 Protocole de prétraitement par choc thermique

Le culot de centrifugation est remis en suspension dans 180µL de tampon ATL, 20µL de protéinase K et 2µL de carrier polyA. Cette suspension est homogénéisée et incubée 10 min à 56°C dans un bloc chauffant sous agitation puis 10 min à 95°C (désactivation de l'enzyme). Ensuite, les échantillons sont congelés à -80°C pendant 3 min puis décongelés à 95°C pendant 2 min.

3.1.2 Choix de la méthode d'extraction

Nous avons comparé deux méthodes d'extraction : une méthode d'extraction manuelle utilisant le kit QIAamp DNA Mini® (Qiagen) selon le protocole "tissu" et une méthode semi-automatisée avec le Biorobot EZ1 (Qiagen). L'avantage de cette dernière méthode est la facilité d'utilisation, la praticabilité et la diminution des risques de contamination inter-tubes.

3.1.2.1 Extraction EZ1® (Qiagen)

L'extraction des acides nucléiques avec cet appareil (figure 16) est basée sur l'utilisation de particules magnétiques. Après ajout d'un tampon de liaison aux échantillons prétraités, la solution est mélangée à des particules magnétiques. Les acides nucléiques sont alors adsorbés à la surface de la silice. Après des étapes de lavages avec deux tampons différents et de l'éthanol, les acides nucléiques sont élués dans le tampon d'élution AVE.



Figure 16 : Appareil d'extraction semi-automatisé Biorobot EZ1 (Qiagen)

Le protocole suivi est celui décrit par le fabricant pour l'extraction des acides nucléiques à partir de tissu. Le volume d'échantillon au départ est de 200µL et l'élution est faite dans 50µL. L'extrait d'ADN est récupéré après 17min et conservé à -20°C avant amplification.

3.1.2.2 Extraction manuelle QIAamp DNA Mini® (figure 17)

L'ADN est extrait selon les recommandations du fabricant sur les échantillons prétraités.



Figure 17 : Kit QIAamp DNA Mini®

Nous avons suivi le protocole tissu à partir de l'étape d'ajout des 200µL de tampon AL. L'élution de l'ADN a été faite avec 50µL de tampon AE après une incubation de 5min à température ambiante. L'extrait est alors conservé à -20°C.

Un résumé des différents choix de prétraitement et de méthodes d'extraction est présenté dans la figure 18. La procédure d'extraction est donnée dans l'annexe 5.

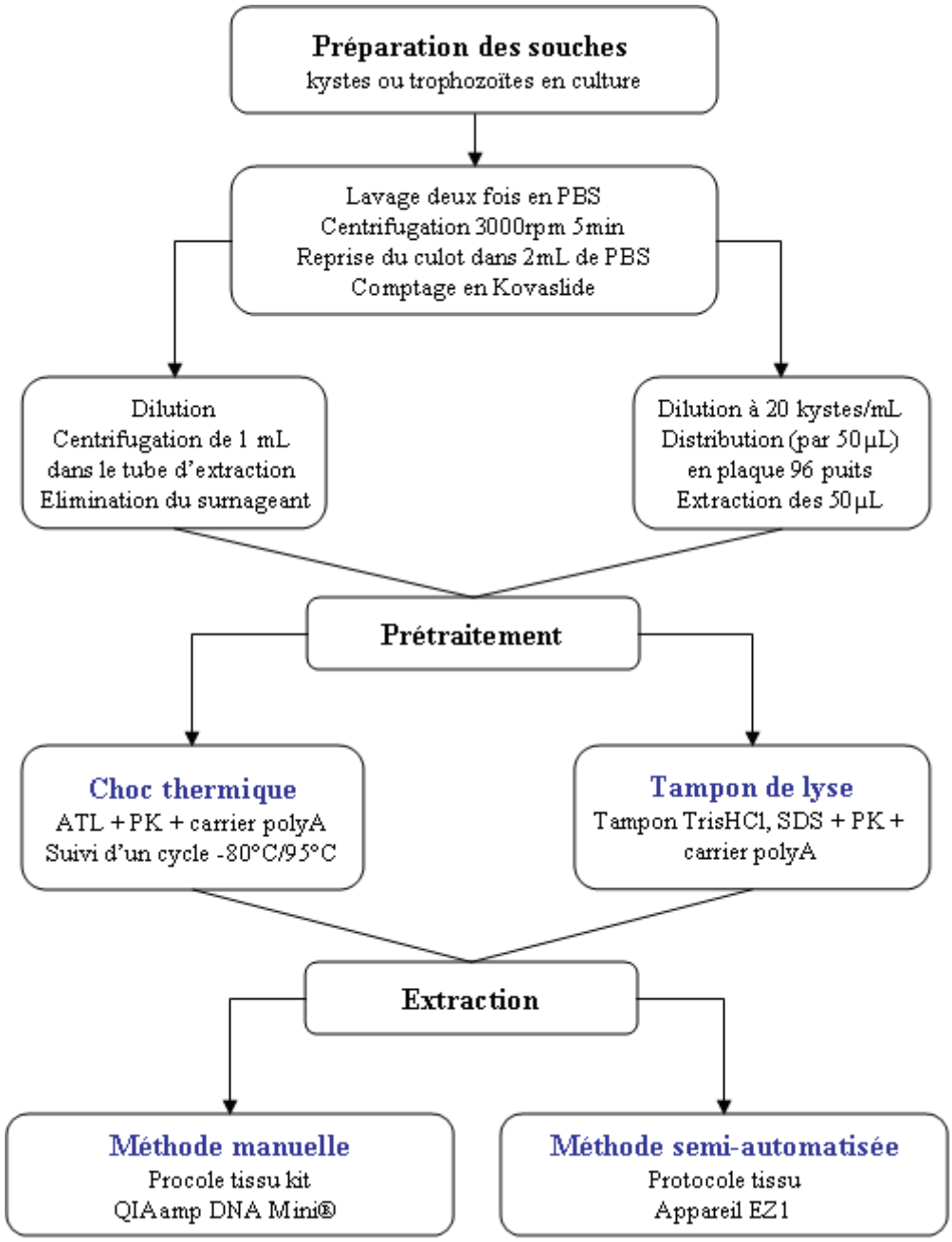


Figure 18 : Résumé des différents choix de prétraitement et de méthode d'extraction

3.2 Témoins positifs

3.2.1 Témoin *Acanthamoeba*

Ce témoin est utilisé comme contrôle positif « calibré », il va nous permettre de détecter la présence d'inhibiteur de PCR dans l'échantillon patient. Pour cela, l'échantillon du patient est passé avec 1µL de témoin positif *Acanthamoeba* et, dans la même série, un témoin positif contenant également 1µL de ce témoin *Acanthamoeba* est passé. Nous pouvons donc comparer le Ct de ce témoin positif avec celui de l'extrait patient. S'ils sont sensiblement équivalents, grâce à la faible variabilité intra-essai du test (voir ci-après), nous pouvons dire que cet extrait ne contient pas d'inhibiteur de cette PCR.

Ce témoin *Acanthamoeba* est préparé à partir d'une souche d'*Acantamoeba* sp cultivée dans un milieu liquide PYG puis laissée une semaine dans un milieu d'enkystement. Les kystes sont lavés deux fois en PBS puis centrifugés dans le tube d'extraction. Le culot est alors repris par 180µL d'ATL, 20µL de protéinase K et 2µL de carrier polyA. Le protocole d'extraction est le même que celui décrit précédemment sauf l'élution de l'ADN qui est faite avec 200µL de tampon AE.

Cet extrait est alors dilué de façon à obtenir un Ct compris entre 25 et 30 cycles puis il est conservé à -80°C pour préserver sa stabilité.

3.2.2 Témoin béta-globine

Le témoin béta-globine nous informe de la qualité du grattage et de la cellularité du prélèvement. En effet, le gène de la béta-globine est un gène humain apporté, dans notre cas, par les cellules prélevées lors du grattage de la cornée. Pour les échantillons de grattage de cornée, l'ADN est extrait et amplifié en même temps que la cible.

Par ailleurs, dans chaque série de patients, afin de vérifier que la PCR béta-globine fonctionne correctement, un témoin positif béta-globine est passé. Ce témoin positif est

obtenu après extraction d'une culture de cellules HFF. Les cellules sont traitées comme indiqué précédemment et la procédure d'extraction est la même que pour les amibes. L'extrait est dilué afin d'obtenir un Ct compris entre 25 et 30 cycles.

3.3 Sondes et amorces

3.3.1 *Acanthamoeaba*

Les amorces utilisées sont celles décrites dans la publication de l'équipe de Qvarnstrom[56] soit AcantF et AcantR (tableau IV). Ces amorces sont situées sur le gène codant l'ARN ribosomal 18S dans une région spécifique au genre *Acanthamoeba*. Ce gène est répété environ six cents fois dans une cellule.

La sonde utilisée AcantP est une sonde d'hydrolyse marquée en 5' par le fluorochrome émetteur (reporter) Cy5. De plus, cette sonde est qualifiée de LNA (locked nucleic acids), c'est-à-dire avec l'adjonction de groupements méthylène sur certaines bases, dans le but d'augmenter sa spécificité. Cette sonde est celle décrite dans la publication de l'équipe de Thompson[70] (tableau IV).

3.3.2 Béta-globine

Les amorces et la sonde de béta-globine ont été choisies grâce au logiciel Primer3[60] afin de permettre l'utilisation en multiplex avec les amorces *Acanthamoeba*.

Le choix des séquences s'est donc fait en fonction de la température d'hybridation optimum (Tm) et de l'absence d'hybridation avec les amorces et sonde d'*Acanthamoeba*. Les différentes séquences sont résumées dans le tableau IV.

Tableau IV : Séquences des sondes et amorces d'*Acanthamoeba* et de béta-globine

Gènes	Noms	Séquences 5'-3'
ADN ribosomal *Acanthamoeba*	Amorce Acant-F	CCCAGATCGTTTACCGTGAA
	Amorce Acant-R	TAAATATTAATGCCCCCAACTATCC
	Sonde Acant-P	[Cy5]TG[+C]CA[+C]CGAA[+T]A[BHQ2]
β-globine humaine	Amorce βGlob-F	TGAGTCTATGGGACGCTTGA
	Amorce βGlob-R	AAAAATTGCGGAGAAGAAAAA
	Sonde BétaG-S	[FAM]TCCTGAGACTTCCACACTGATGC[BHQ1]

3.4 Amplification de l'ADN

3.4.1 Mélange réactionnel

Pour réaliser le mélange réactionnel, nous avons choisi d'utiliser des billes lyophilisées SmartMix® (figure 19) qui contiennent les dNTP, la Hot start Taq polymérase, du chlorure de magnésium et du tampon HEPES.



Figure 19 : Présentation des billes SmartMix® (photo tirée du site www.cepheid.com)

Ces billes sont reconstituées à l'aide de tampon TrisHCl pH 9 en concentration finale de 10mM. La composition et le protocole de fabrication de ce tampon sont décrits dans l'annexe 4.

Le mélange réactionnel contient les billes SmartMix, le tampon TrisHCl à 10mM, les sondes AcantP à 0,3µM et BétaG-S à 0,2µM, et les 4 amorces chacune à la concentration de 0,4µM. Pour deux réactions, le volume final est de 50µL. Le tableau V présente les volumes de chaque solution que nous avons utilisés en fonction du nombre de patients.

Tableau V : Composition du mélange réactionnel

Nombre de patients		1	2	3	4
Nombre de tubes nécessaires		5	8	11	14
Nombre de billes	1	3	4	6	7
Tris HCl 100mM (µL)	5	15	20	30	35
Eau (µL)	12	36	48	72	84
Sonde AcantP à 5µM (µL)	3	9	12	18	21
Amorce AcantF à 10µM (µL)	2	6	8	12	14
Amorce AcantR à 10µM (µL)	2	6	8	12	14
Sonde BetaG-S à 5µM (µL)	2	6	8	12	14
Amorce BGlob-F à 10µM (µL)	2	6	8	12	14
Amorce BGlob-R à 10µM (µL)	2	6	8	12	14
ADN (µL)	20	60	80	120	140
total (µL)	50	150	200	300	350

Après homogénéisation, le mélange réactionnel est distribué sous un volume de 15µL dans les tubes spécifiques (figure 20) au SmartCycler®. Enfin 10µL de chaque extrait d'échantillon à amplifier sont ajoutés dans les tubes patients.



Figure 20 : Tube et support de tubes pour SmarCycler® (photo tirée de www.cepheid.com)

Chaque série est composée de :

- 3 tubes par échantillon : l'un des trois contient, en plus des 10µL d'extrait d'ADN, 1µL de témoin positif *Acanthamoeba* ; ce tube permet de conclure quant à la présence ou non d'inhibiteur de PCR
- 1 témoin positif qui contient 1 µL de chaque contrôle (*Acanthamoeba* et béta-globine) et 8µL d'eau distillée stérile
- 1 témoin négatif avec 10 µL d'eau distillée stérile

La procédure d'amplification est donnée dans l'annexe 5.

3.4.2 Smart cycler

L'amplification de l'ADN est réalisée sur l'automate SmartCycler® (Cepheid) (figure 21). Cet appareil présente l'avantage d'avoir 32 puits fonctionnant indépendamment les uns des autres : il est par conséquent bien adapté aux petites séries (ce qui est notre cas) et permet de lancer différentes PCR en même temps facilitant l'organisation au sein du laboratoire.



Figure 21 : Appareil de PCR en temps réel SmartCycler®, centrifugeuse spécifique, support réfrigéré et logiciel d'exploitation des données (photo tirée de www.cepheid.com)

Le protocole d'amplification comprend deux étapes :

- Activation de la Taq polymérase : chauffage à 95°C pendant deux minutes
- Suivie de 45 cycles d'amplification de 75s chacun :
    - Dénaturation de l'ADN : 15s à 95°C
    - Hybridation : 30s à 60°C
    - Extension : 30s à 72°C

La fluorescence émise par les sondes d'hydrolyse est mesurée lors de l'étape d'hybridation dans le canal 4 pour la sonde AcantS marquée par le fluorochrome Cy5 (reporter) et dans le canal 1 pour la sonde BétaGS marquée par le fluorochrome FAM (reporter).

4 Validation de la méthode

4.1 Seuils de détection

Etant donné la pauvreté supposée en matériel du prélèvement, notre procédure a été testée sur de très faibles quantités de kystes, l'objectif étant de détecter une seule forme isolée dans l'échantillon de départ. Pour cela, des dilutions de kystes d'*A. polyphaga* ont été réalisées en PBS afin d'obtenir une solution de concentration théorique égale à 20 kystes/mL. Cette dilution a ensuite été répartie dans une microplaque 96 puits sous un volume de 50µL (volume contenant théoriquement 1 seul kyste). La plaque a alors été regardée au microscope inversé. Seuls les puits contenant effectivement un kyste isolé ont été extraits puis amplifiés. Cette technique permet de certifier que les échantillons extraits contenaient réellement un kyste.

Par ailleurs, afin de vérifier la linéarité de notre PCR proprement dite, une extraction à partir de 1000 kystes ou formes végétatives d'*A. polyphaga* a été réalisée. Ces extraits contenant l'équivalent de 1000 génomes d'*A. polyphaga* ont été dilués sur une échelle de $5\log_{10}$ (soit 1000, 100, 10, 1 et 0.1 génome/échantillon).

4.2 Variabilité intra-essai ou répétabilité

Selon la définition du Cofrac,[7, 12] l'essai de répétabilité consiste à analyser un même échantillon plusieurs fois en faisant varier le moins de paramètres possibles afin de caractériser la meilleure performance de la technique. Ainsi, pour évaluer la répétabilité de notre technique (pour la cible *Acanthamoeba*), nous avons passé cinq fois dans une même série quatre concentrations de kystes (1, 10, 100 et 1000 kystes par extrait) en présence de 50 cellules HFF.

4.3 Variabilité inter-essai ou reproductibilité

L'essai de reproductibilité, selon le COFRAC,[12] consiste à analyser un même échantillon dans des conditions différentes (variations concernant l'opérateur, les lots de réactifs, les lieux et moments de réalisation). Les extraits utilisés sont les mêmes que pour la répétabilité. Chacun des extraits est passé une fois dans dix séries différentes en faisant varier l'opérateur (deux différents) et le lot de Smartmix® (3 numéros de lot).

4.4 Spécificité

Afin de vérifier la spécificité de notre PCR, nous avons testé 12 microorganismes bactériens et fongiques choisis parmi les plus fréquemment isolés dans le cadre de kératites infectieuses :

- 8 bactéries : *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Corynebacterium* sp, *Propionibacterium acnes*
- 2 levures : *Candida albicans* et *Candida parapsilosis*
- 2 champignons filamenteux : *Aspergillus fumigatus* et *Fusarium* sp

L'ADN de ces microorganismes a été obtenu à partir de cultures monomorphes identifiées par les techniques habituelles de pratique quotidienne au laboratoire de bactériologie ou mycologie. L'extraction a été réalisée selon le même protocole que pour les amibes libres hormis pour les souches fongiques pour lesquelles deux cycles de choc thermique ont été réalisés. L'ADN de chacun des extraits a été dosé au spectrophotomètre NanoDrop2000C® (ThermoFisher), confirmant le bon déroulement de l'extraction.

4.5 Inhibiteurs potentiels

Un certain nombre de collyres peuvent être utilisés avant le grattage cornéen (anesthésiants, antiseptiques, antibiotiques, antifongiques, fluorescéine) et donc être présents en quantité infime dans le prélèvement. Des auteurs ont montré que certaines de ces solutions pouvaient présenter un pouvoir inhibiteur sur la réaction de PCR.[24, 70] Notre objectif était donc de tester cette hypothèse sur notre PCR multiplex. Quatorze collyres ont été testés en présence soit d'un kyste d'*A. polyphaga* soit de 100 cellules HFF. Les collyres testés ont été choisis en concertation avec le service d'Ophtalmologie du CHU de Grenoble.

Ces 14 collyres se répartissent de la façon suivante :

- 1 anesthésiant : oxybuprocaïne
- 1 colorant : fluorescéine
- 2 antiseptiques : hexamidine (Désomédine®) et picloxydine (Vitabact®)
- 2 mydriatiques : phényléphrine (Néosynéphrine®) et tropicamide (Mydriaticum®)
- 5 antibiotiques : tobramycine/dexaméthasone (Tobradex®), rifamycine, gentamicine 15mg/mL, vancomycine 50mg/mL, ticarcilline 6mg/mL (ces 3 derniers collyres étant des préparations hospitalières)

- 2 antifongiques : voriconazole 10mg/mL, amphotéricine B 2,5mg/mL (2 préparations hospitalières)
- 1 antiamibien : PHMB 0,02% (PolyHexaMéthylèneBiguanide) (préparation hospitalière)

La quantité de collyre ajoutée avant extraction est de 8µL. Ce volume a été choisi en fonction du volume d'une goutte de collyre (40µL) et de la surface maximale de cornée prélevée estimée à environ un cinquième de la surface totale de l'œil. Cette quantité est cependant probablement largement surestimée par rapport à celle pouvant être retrouvée dans un réel grattage de cornée.

4.6 Prélèvements issus de patients

Notre technique de PCR a été évaluée sur une série prospective de patients. Pour cela, entre Mars et Août 2011, nous avons traité les échantillons de grattage de cornée en parallèle en PCR et avec les techniques habituelles de recherche des amibes libres au laboratoire. Ces prélèvements proviennent de patients venant consulter dans le service d'Ophtalmologie du CHU de Grenoble ou du CH de Chambéry et suspects de kératites amibiennes.

Ces grattages de cornée se présentent sous deux formes :

- Soit réception d'un scalpel dédié pour la PCR (figure 22) : ce scalpel arrive dans un microtube à bouchon à vis de 1,5mL (Sarstedt) sec qui est utilisé pour l'extraction, le tampon de lyse étant directement ajouté dans le tube avec le scalpel.
- Soit récupération d'une goutte du prélèvement utilisé pour la culture (scalpel, aiguille mis dans de l'eau physiologique stérile) ; l'inconvénient de ces échantillons est la dilution amenée par l'eau physiologique et la perte éventuelle de matériel de grattage.

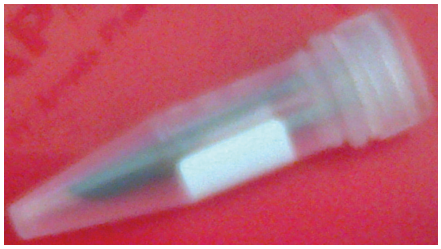


Figure 22 : Exemple d'échantillon de grattage cornéen au scalpel

Ces échantillons sont prétraités avec 180µL de tampon ATL, 20µL de protéinase K et 2µL de carrier polyA pendant 10 min à 56°C. La protéinase K est ensuite désactivée par chauffage à 95°C pendant 10 min, puis un cycle de choc thermique -80°C/95°C est effectué. Le protocole "tissu" du kit QIAamp DNA Mini® (Qiagen) est alors réalisé (à partir de l'étape d'ajout des 200µL de tampon AL). L'élution de l'ADN est réalisée avec 50µL de tampon AE. L'extrait est conservé à -20°C avant l'amplification.

Chaque extrait est passé en triplicat : 2 tubes avec 10µL d'extrait et 1 tube avec 10µL d'extrait et 1µL de témoin *Acanthamoeba* (pour vérifier l'absence d'inhibiteur de PCR). Dans chaque série, sont passés également un témoin négatif (10µL d'eau) et un témoin positif (avec 1µL de témoin *Acanthamoeba*, 1µL de témoin béta-globine et 8µL d'eau).

III Résultats

1 Choix du prétraitement

Nous avons choisi de tester deux types de prétraitement :

- le tampon de lyse tissulaire (ATL) du kit QIAamp DNA Mini® (Qiagen), protéinase K et un cycle de **choc thermique** -80°C/95°C
- un **traitement "chimique"** avec une solution comprenant du TrisHCl et du SDS associé à de la protéinase K.

Nous avons effectué six extraits (3 en méthode d'extraction manuelle et 3 en extraction semi-automatisée) de 1 kyste et les avons amplifiés en duplicat pour chacun des prétraitements. Sur les 12 PCR réalisées, 6 sont sorties positives avec le prétraitement par choc thermique alors que seulement 3 sont positives avec l'autre prétraitement. De plus, globalement, l'extrait sort plus tardivement (Ct plus élevés) avec le prétraitement "chimique" (Tableau VI).

Tableau VI : Résultats comparatifs des deux prétraitements

Type de prétraitement	Choc thermique	"Chimique"
Nombre d'échantillons positifs	6	3
Nombre total d'échantillons	12	12
Pourcentage d'échantillons positifs	50%	25%
Moyenne des Ct	35,09	37,89
Ecart-type	2,06	5,34

Devant ces résultats, bien que la différence de pourcentage d'échantillons positifs ne soit pas significative (p=0,4 avec la probabilité exacte de Fisher), nous avons opté pour le prétraitement par ATL/protéinase K suivi d'un **choc thermique** -80°C/95°C.

2 Choix de la méthode d'extraction

Nous avons comparé une méthode d'extraction semi-automatisée à l'aide de l'appareil BioRobot EZ1® (Qiagen) et une méthode manuelle avec le kit QIAamp DNA Mini® (Qiagen). La technique semi-automatisée plus rapide aurait été un avantage pour l'utilisation de routine. Néanmoins, le grattage cornéen pouvant être très pauvre en matériel et donc potentiellement en kystes d'*Acanthamoeba* spp, l'objectif prioritaire était d'assurer une limite de détection minimale. La sensibilité de détection d'un kyste a donc été évaluée avec les deux méthodes : 10 extractions ont été réalisées avec 1, 2 ou 3 kystes et 6 extractions avec 1, 2 ou 3 trophozoïtes/échantillons pour chaque technique d'extraction mais toujours avec le prétraitement par choc thermique.

Les résultats sont donnés dans le tableau VII et la figure 23.

Tableau VII : Moyenne et écart-type des expérimentations de comparaison des méthodes d'extraction

	Kystes		Trophozoïtes	
Type d'extraction	Manuelle	EZ1	Manuelle	EZ1
Moyenne des Ct	33,02	34,46	31,77	32,99
Ecart-type	3,06	2,14	0,63	0,60

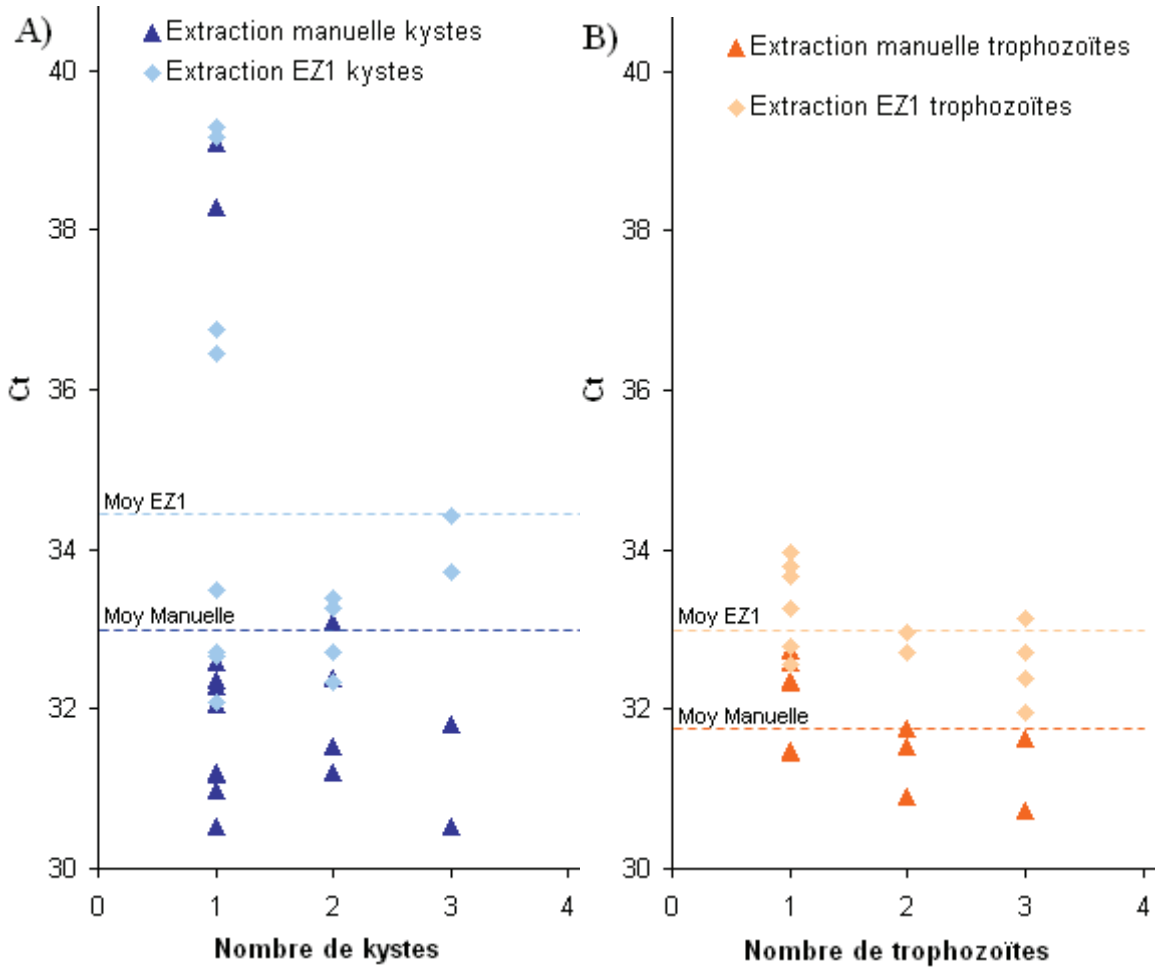


Figure 23 : Résultat des expériemtations de comparaison des méthodes d'extraction : représentation des différents Ct obtenus en fonction du nombre d'amibes (kystes en A et trophozoïtes en B) et du type d'extraction (manuelle en couleur plus foncée et EZ1 en couleur plus claire)

Sur la figure 23, nous voyons globalement que les Ct, pour les formes végétatives (en orangé) comme pour les kystes (en bleu), sont plus élevés lorsque l'extraction est réalisée par l'automate EZ1 (points les plus clairs à chaque fois). En comparant les moyennes des Ct grâce au test non paramétrique de Mann-Whitney, nous obtenons une différence significative avec, respectivement pour les formes végétatives et les kystes, des p égaux à 0,0003 et 0,006.

Par conséquent, malgré le gain de temps généré par l'automate, nous avons décidé d'utiliser la technique d'**extraction manuelle** avec le kit QIAamp DNA mini® selon le protocole tissu.

3 Seuils de détection

3.1 Limite de détection

Comme décrit précédemment, afin de déterminer la limite de détection de la technique, une dilution de kystes d'*A. polyphaga* à 20 kystes/mL a été distribuée dans une plaque 96 puits, observée au microscope inversé afin de vérifier que l'échantillon extrait contenait bien un seul kyste.

Au total, 31 puits ne contenant qu'un seul kyste ont été extraits (dans 8 expérimentations différentes) puis amplifiés selon le protocole retenu, c'est-à-dire avec un prétraitement par ATL et protéinase K suivi d'un cycle de choc thermique, et une extraction manuelle, en présence de carrier polyA, avec le kit QIAamp DNA mini®. Sur ces 31 extraits, nous avons eu 30 PCR *Acanthamoeba* positives avec un Ct moyen de 33,48±2,36. Un exemple de courbe d'amplification est donné dans la figure 24.

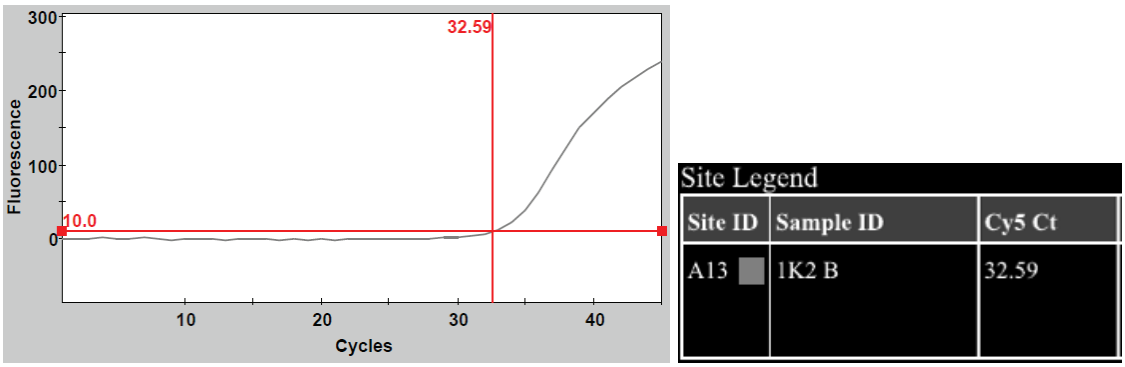


Figure 24 : Exemple de courbe d'amplification d'un kyste d'*Acanthamoeba polyphaga*

Notre technique nous permet donc d'amplifier la cible à partir de l'extraction d'**un kyste** isolé dans **97% des cas**. Notre limite de détection au sein d'un échantillon est, par conséquent, de **1 kyste**.

3.2 Linéarité

Les courbes de linéarité (figure 25) de notre PCR pour la cible *Acanthamoeba* ont été déterminées par dilution sérielle d'ADN à partir de l'extrait d'une suspension soit de 1000 kystes soit de 1000 trophozoïtes, sur une échelle de $5\log_{10}$.

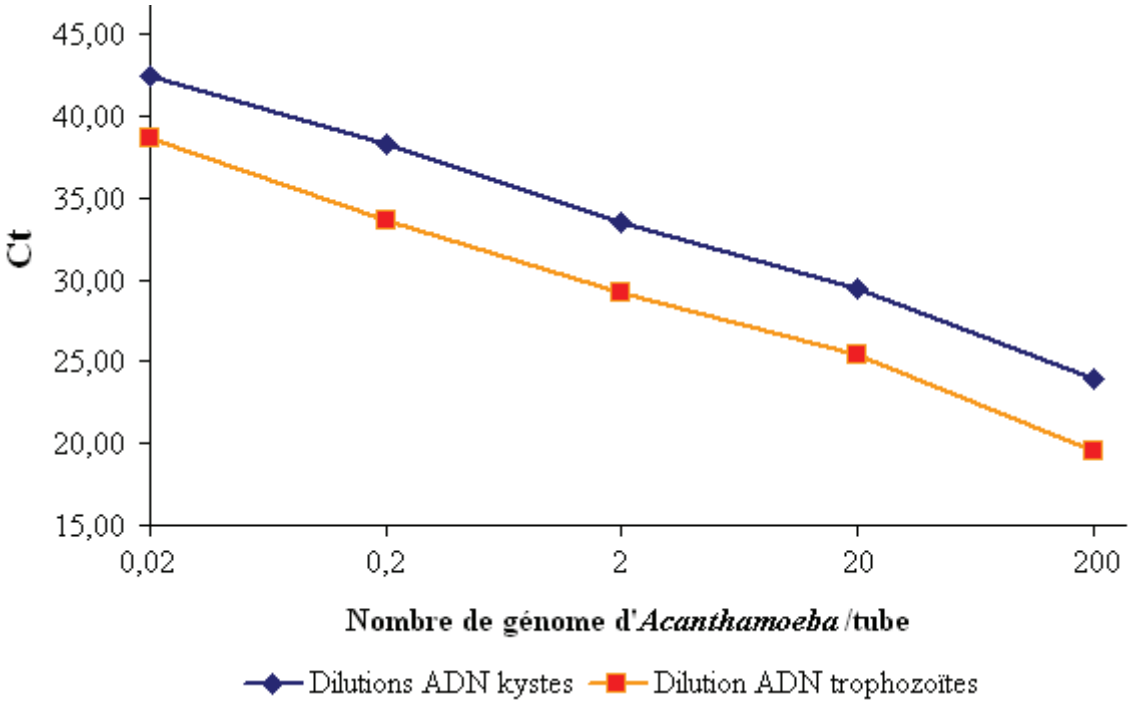


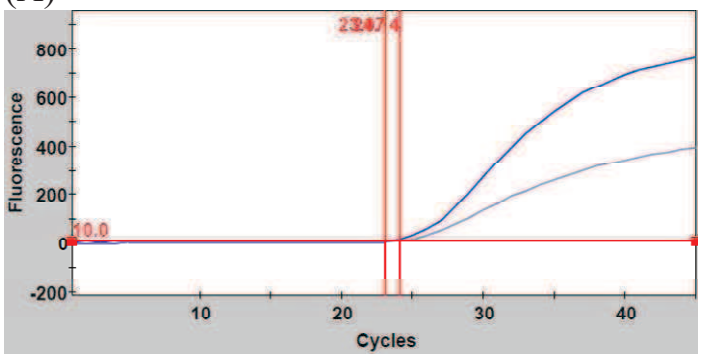
Figure 25 : Courbes de linéarité

Comme nous pouvons le voir sur la figure 25, notre PCR nous permet de détecter jusqu'à **0,1 génome** (kyste ou trophozoïte) par échantillon, soit 0,02 génome par tube de PCR, Les coefficients de corrélation (r^2) sont de 0,99 pour les kystes et 0,98 pour les formes végétatives.

4 Témoin béta-globine

L'objectif de l'inclusion en PCR multiplex d'un témoin béta-globine est de nous informer sur la qualité du prélèvement. L'influence de l'adjonction de la PCR béta-globine en multiplex a été étudiée en particulier sur la PCR *Acanthamoeba*. Le même échantillon a été amplifié en présence ou non de béta-globine. Pour les tests, le gène de la béta-globine a été apporté par l'ajout de 1 µL d'ADN humain. Les résultats sont présentés dans la figure 26.

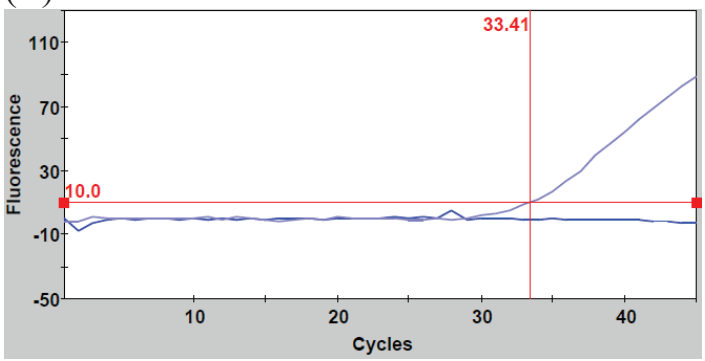
(A)



Site Legend

Site ID	Sample ID	FAM Ct
A1	BGlob	23.07
A2	BGlob+1K2 B	24.14

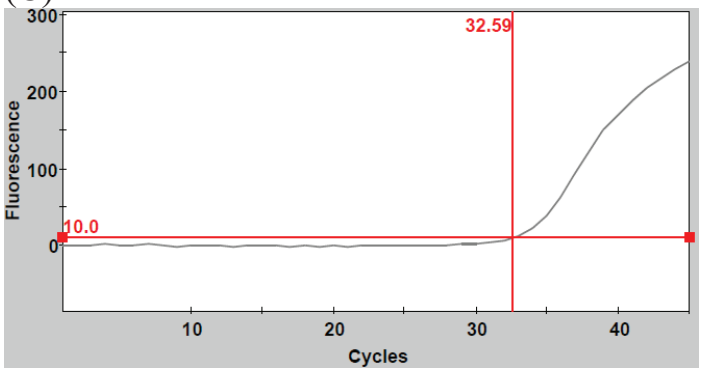
(B)



Site Legend

Site ID	Sample ID	Cy5 Ct
A1	BGlob	0.00
A2	BGlob+1K2 B	33.41

(C)



Site Legend

Site ID	Sample ID	Cy5 Ct
A13	1K2 B	32.59

Figure 26 : Tests PCR multiplex

(A) Courbe d'amplification de la béta-globine en PCR multiplex
(B) Courbe d'amplification de la cible en PCR multiplex
(C) Courbe d'amplification de la cible en PCR uniplex

L'amplification concomitante du gène béta-globine et *Acanthamoeba* engendre une variation du Ct d'environ 1 (23,07 à 24,14) pour la PCR béta-globine et inférieure à 1 (32,59 à 33,41) pour la PCR *Acanthamoeba*. Malgré cette légère perte d'efficacité, nous avons estimé que l'utilisation en multiplex de ces deux PCR était réalisable.

5 Répétabilité – Reproductibilité

Afin de déterminer la répétabilité de notre PCR, nous avons passé 4 concentrations différentes de kystes en présence de 50 cellules. Chaque extrait a été passé cinq fois dans une même série. Les résultats sont exprimés sous la forme de moyenne, écart-type et coefficient de variation de Ct dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Résultats répétabilité

Echantillon	Moyenne des Ct	Ecart-type	CV (%)
1K50C	33,80	0,31	0,90
10K50C	30,78	0,36	1,16
100K50C	27,36	0,17	0,61
1000K50C	24,87	0,93	3,74

Pour la reproductibilité, nous avons utilisé les mêmes extraits. Ils ont été passés dans dix séries différentes sur des jours différents, avec deux opérateurs et trois numéros de lots de SmartMix®. Les résultats sont exprimés sous la même forme que pour la reproductibilité dans le tableau IX.

Tableau IX : Résultats reproductibilité

Echantillon	Moyenne des Ct	Ecart-type	CV (%)
1K50C	34,04	0,59	1,72
10K50C	30,52	0,18	0,58
100K50C	27,13	0,24	0,89
1000K50C	23,29	0,18	0,78

Notre technique présente donc des **coefficients de variation de répétabilité** et de **reproductibilité inférieurs à 4%,** et même inférieurs à 2% pour les faibles concentrations de kystes**.**

6 *Spécificité*

La spécificité de notre technique a été testée sur 12 microorganismes bactériens et fongiques. Le protocole d'extraction utilisé est le même que pour les amibes hormis deux cycles de choc thermique qui ont été ajoutés pour l'extraction des souches fongiques. Par ailleurs, afin de confirmer l'efficacité de l'extraction, l'ADN de chaque extrait a été dosé au spectrophotomètre Nanodrop® (Thermofisher) (Figure 27).

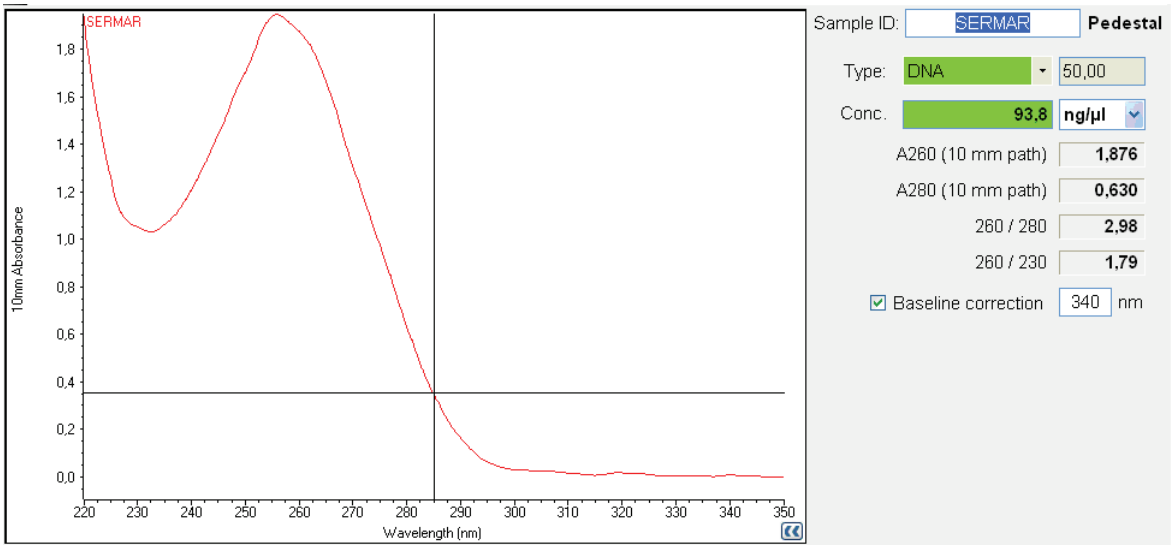


Figure 27 : Exemple de courbe de dosage d'ADN

Le résultat du dosage d'ADN ainsi que les Ct de chaque extrait obtenus avec la PCR sont présentés dans le tableau X.

Tableau X : Résultats des dosages ADN et des Ct des différents microorganismes bactériens et fongiques testés

	Dosage ADN (ng/µL)	Ct
S. aureus	66,1	0
S. epidermidis	78,8	0
P. aeruginosa	107,9	0
H. influenzae	113,1	0
S. pneumoniae	57,1	0
S. marcescens	93,8	0
Corynebacterium sp	126,7	0
P. acnes	8,3	0
C. albicans	32,4	0
C. parapsilosis	55,3	0
A. fumigatus	55,2	0
Fusarium sp	66,4	0

Nous constatons qu'il n'existe **pas d'amplification non spécifique** en présence de ces microorganismes.

7 Génotypes d'Acanthamoeba spp détectés

A ce jour, dix-sept génotypes d'*Acanthamoeba* spp. ont été décrits. La prévalence de certains génotypes dans les kératites amibiennes est importante en particulier les génotypes T4 (90%) et T3. Ces deux génotypes ont pu être testés au cours de ce travail ainsi que le génotype T6. Les différents génotypes testés sont présentés dans le tableau XI.

Tableau XI : Résultats des génotypes testés in vitro

Souches testées	Génotype	Origine
Souche de réf. *A. polyphaga*	T4	Culture
Souche de réf. *A. castellanii*	T4	Culture
Souche patient labo 3	T3	Culture
Souche patient labo 4	T6	Culture
Souche patient labo 5	T4	Culture
Souche patient labo 6	T4	Culture
Patient P4	T4	Grattage cornéen
Patient P26	T4	Grattage cornéen

Pour les autres génotypes, nous avons blasté les séquences d'ADN de notre sonde et de nos amorces avec les séquences des génotypes actuellement disponibles sur Genbank. Les résultats de ce blast sont synthétisés dans le tableau XII :

- Surlignés en bleu, les souches ayant été isolées de prélèvements oculaires : on constate que malgré la disparité des génotypes (T4, T3, T5, T11, T15), nous avons obtenu par blast une hybridation parfaite de nos sondes et amorces. Ces génotypes devraient donc être amplifiés par notre PCR.
- Surlignés en rouge, les génotypes pour lesquels nous n'obtenons pas 100% d'hybridation (T9, T13, T17). En présence de ces génotypes, notre PCR peut être mise en défaut (même si en réalité, un changement de base isolé ne devrait pas empêcher l'amplification). De plus, ces génotypes n'ont pas été décrits comme étant responsables de kératites amibiennes à ce jour.

Tableau XII : Résultats de la vérification *in silico* des génotypes d'*Acanthamoeba*

N° accès GenBank	Origine souche	Génotype	Espèce	Nbre nucléotides variants		
				AcantF	AcantR	AcantS
U07400	EGA	T1	*A castellanii*	0	0	0
U07411	Sol	T2	*A palestinensis*	0	0	0
DQ087294,1	Grattage cornée	T3	*A sp*	0	0	0
GQ905499.1	Grattage cornée	T3	*A sp*	0	0	0
S81337.1	Kératite	T3	*A griffini*	0	0	0
DQ087323.1	Lentille contact	T4	*A sp*	0	0	0
U07416.1	Sol	T4	*A castellanii*	0	0	0
U94741.1	Eau de piscine	T5	*A lenticulata*	0	0	0
FJ422546.1	Grattage cornée	T5	*A sp*	ND	0	0
AF019063.1	Eau de piscine	T6	*A palestinensis*	0	0	0
AF019064.1	Eau de laboratoire	T7	*A astronyxis*	0	0	0
AF019065.1	Eau douce	T8	*A tubiash*	0	0	0
AF019066.1	Sol	T9	*A comandoni*	3	1	1
AY026242.1	Eau douce	T9	*A astronyxis*	1	0	0
AF019067.1	Culture de cellules	T10	*A culbertsoni*	0	0	0
AF019068.1	Eau saumâtre	T11	*A hatchetti*	0	0	0
DQ087292.1	Biopsie cornée	T11	*A sp*	0	0	0
AF019070.1	EGA	T12	*A healyi*	0	0	0
AF132134.1	Isolat clinique	T13	*A sp*	1	0	0
AF333607.1	ND	T14	*A sp*	0	0	0
AY262360.1	Sédiments marins	T15	*A jacobsi*	0	0	0
GQ905495.1	Grattage cornée	T15	*A sp*	0	0	0
GQ380408.2	ND	T16	*A sp*	0	0	0
GU808277.1	Etang	T17	*A sp*	1	0	0
GU808329.1	Etang	T17	*A sp*	0	0	0

EGA = Encéphalite Grenulomateuse Amibienne

ND = Non déterminé (séquence trop courte)

Notre technique nous permet donc de **détecter**, au moins théoriquement, **la plupart des génotypes d'*Acanthamoeba*** et plus particulièrement ceux impliqués dans les kératites amibiennes.

8 Inhibiteurs potentiels

Les composants des collyres peuvent représenter des inhibiteurs potentiels de notre PCR. Afin d'évaluer ce potentiel inhibiteur, nous avons réalisé 14 extraits soit d'un kyste soit de 100 cellules en présence de l'un des 14 collyres à tester puis passé ces extraits en PCR.

Les résultats sont présentés sur les figures 28 et 29 sous la forme d'une comparaison des Ct obtenus pour chaque extrait par rapport à la moyenne des Ct ± deux écart-types (DS) pour 1 kyste ou 100 cellules (en l'absence de collyre).

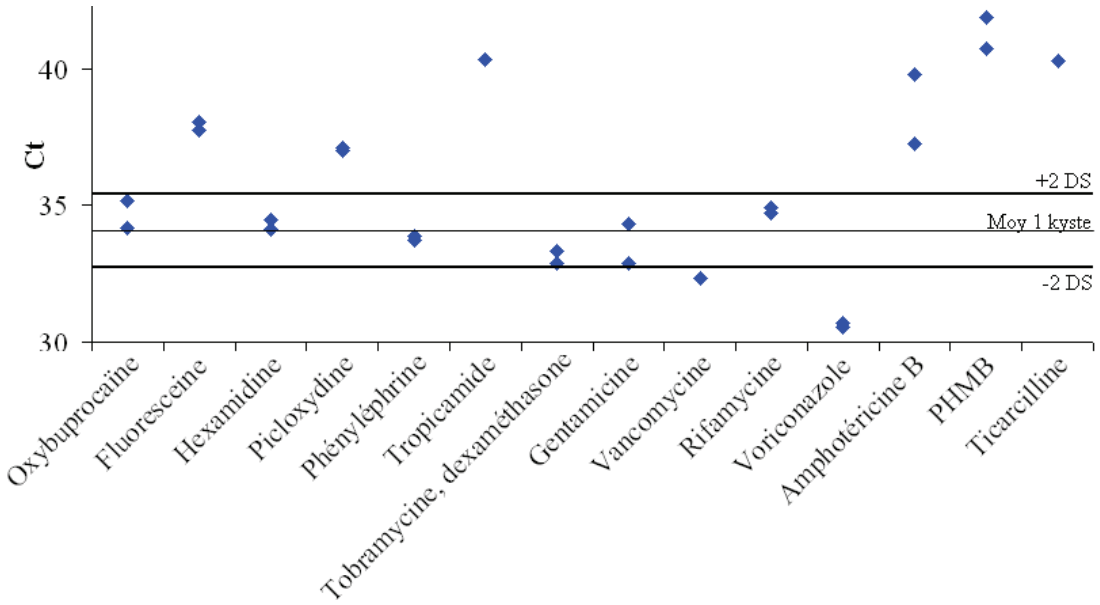


Figure 28 : Graphique PCR *Acanthameoba* 1 kyste en présence de collyre

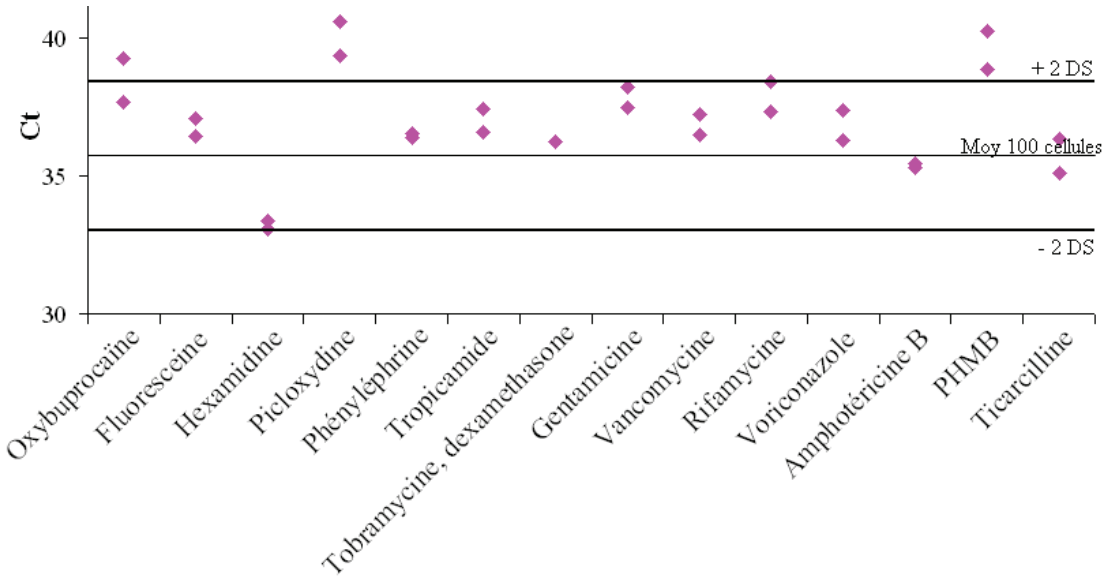


Figure 29 : Graphique PCR Béta-globine 100 cellules en présence de collyre

Nous constatons que malgré la présence en grande quantité de ces collyres, ni la PCR *Acanthamoeba*, ni la PCR béta-globine n'est totalement inhibée. Quelque soit le collyre, les deux PCR sont positives. Néanmoins, certains extraits présentent des Ct sensiblement supérieurs. Afin de confirmer l'hypothèse d'une inhibition partielle de la PCR par la molécule en cause, ces extraits ont été dilués au demi puis retestés en PCR. Cette étape de dilution permet en théorie de diluer les inhibiteurs mais dilue également l'extrait d'ADN. Si cette dilution présente un Ct équivalent, voire inférieur au Ct de l'échantillon non dilué, nous pouvons conclure que le collyre inhibe partiellement la PCR. Si le Ct est supérieur dans l'échantillon dilué, nous concluons que l'inhibition observée est la conséquence d'un phénomène sur lequel la dilution n'a pas d'influence. Les résultats des dilutions pour 4 et 2 collyres respectivement pour la PCR *Acanthamoeba* et béta-globine sont donnés dans le tableau XIII.

Tableau XIII : Résultats des dilutions d'extraits en présence de certains collyres

	Pur	1/2	
Vitabact® 100C	40,6	35,77	$Ct_{1/2} < Ct_{pur}$: **Inhibiteur partiel de la PCR béta-globine**
	39,37	37,63	
Vitabact® 1K	37,02	40	
	37,08	43,89	
Mydriaticum® 1K	40,3	38,88	$Ct_{1/2} \approx Ct_{pur}$: **Inhibiteur partiel de la PCR *Acanthamoeba***
	0	40,85	
PHMB 100C	40,25	38	$Ct_{1/2} < Ct_{pur}$: **Inhibiteur partiel de la PCR béta-globine**
	38,88	36,6	
PHMB 1K	40,72	0	
	41,87	43,7	
Ticarcilline 1K	40,29	0	
	0	0	

Nous pouvons donc dire, par exemple, que le Vitabact® et le PHMB inhibent partiellement la PCR béta-globine, le Ct étant inférieur après dilution au demi. De même, en ce qui concerne la PCR *Acanthamoeba*, nous pouvons penser que le Mydriaticum® inhibe partiellement cette PCR. Pour les autres collyres, nous ne pouvons pas conclure formellement.

En conclusion, aucune des deux PCR n'est totalement inhibée par l'un des collyres testés. Cependant, nous observons des Ct plus tardifs en présence de certaines molécules, confirmés ou non par la dilution au demi, orientent vers une **inhibition partielle** de l'une ou l'autre des PCR par ces collyres. Ce résultat souligne l'importance d'effectuer un lavage abondant de l'œil avant le prélèvement et de préciser les collyres utilisés sur le bon de demande.

9 Prélèvements de patients

Entre Mars et Août 2011, 38 grattages de cornée ont été testés avec notre PCR. Les résultats de PCR, de culture, d'examen direct et de microbiologie sont présentés dans le tableau XIV. Dans ce tableau, sont également résumés les renseignements cliniques qui ont pu être recueillis grâce à la collaboration des services d'Ophtalmologie du CHU de Grenoble et du CH de Chambéry. Pour près de 80% des prélèvements (30/38), les résultats de PCR étaient interprétables avec une qualité satisfaisante de l'échantillon (amplification du gène de la béta-globine et absence d'inhibiteur de PCR). Pour les 8 prélèvements restants (surlignés en bleu clair), aucune amplification du gène de la béta-globine n'a été obtenue malgré l'absence d'inhibiteur de PCR. Pour ces grattages, la PCR n'était pas contributive, ce qui doit inciter à faire un nouveau prélèvement en cas de persistance des symptômes.

Sur les 38 PCR réalisées sur ces grattages de cornée, 4 étaient positives (surlignés en bleu foncé) pour l'ADN d'*Acanthamoeba* spp soit 10%. Pour deux de ces prélèvements (patients 4 et 26), la quantité d'échantillon était suffisante pour pouvoir réaliser un génotypage : les souches de ces deux patients appartiennent au génotype T4. Ces quatre patients présentaient une clinique concordante avec une kératite amibienne : douleur, rougeur, abcès prenant la fluoréscéine. Pour les patients 4 et 7, l'abcès faisait moins de 1,5mm et était situé à plus de 2mm de l'axe visuel. L'information n'est pas connue pour les deux autres patients. Tous les patients étaient porteurs de lentilles de contact. Ils ont été traités par une association de collyres dont un actif contre les *Acanthamoeba* spp : la Désomédine® sauf pour le patient 38 qui a reçu du Vitabact®. L'évolution sous traitement pour ces quatre patients a été favorable après un mois sans perte d'acuité visuelle.

Tableau XIV : Résultats de PCR, culture, microbiologie et renseignements cliniques des prélèvements prospectifs de grattage de cornée

	Acanthamoeba spp						**Microbiologie**	**Caractéristiques du patient**			
	PCR multiplex				RAL	Culture		Aspect clinique	Lentilles de contact	Evolution	Diagnostic final
	Ct Ac	Ct BG	IA	Conclusion*							
1	>45	38,35	AIA	N	N	N	Stérile	ND	ND	ND	ND
2	>45	28,05	AIA	N	N	N	Stérile	Infiltration stromale, abcès avec œdème	Non	Persistance d'une ulcération GMA programmée	AC d'étiologie indéterminée
3	>45	32,64	AIA	N	N	N	*S. maltophila* *B. cereus*	Douleurs OG, baisse AV, abcès	Oui	Favorable sous Ciloxan®, Tobrex® et Désomédine®	AC d'étiologie indéterminée
4	**30,40**	**37,65**	**AIA**	**P**	**N**	**N**	**Stérile**	**OD rouge, douloureux, abcès**	**Oui**	**Favorable sous Ciloxan®, Tobrex® et Désomédine®**	**Kératite amibienne**
5	>45	28,93	AIA	N	N	N	*P. aeruginosa* *S. aureus*	Conjonctivite chronique OG KPS, blépharite chronique	Non	Amélioration sous traitement	Conjonctivite et canaliculite à *P. aeruginosa*
6	>45	>45	AIA	NC	N	N	Stérile	Paralysie faciale après AVP	Non	Prise en charge chirurgicale	Kératite itérative sur paralysie faciale
7	**38,31**	**43,22**	**AIA**	**P**	**NR**	**N**	**Stérile**	**OD rouge, larmoyant I microabcès OD et OG**	**Oui**	**Favorable sous Ciloxan®, Tobradex® et Désomédine®**	**Kératite amibienne**
8	>45	34,74	AIA	N	N	N	*P. aeruginosa*	Douleur OG, baisse AV Abcès profond, hypopion	Oui	Persistance d'une opacité cicatricielle	AC à *P. aeruginosa*
9	>45	32,88	AIA	N	N	N	Stérile	Hyperhémie importante, abcès, œdème, hypopion	Non	Persistance ulcère de cornée traité par GMA	AC grave sans germe retrouvé
10	>45	42,21	AIA	N	N	N	*S. pneumoniae*	Suspicion d'infection de prothèse	Non	ND	ND
11	>45	37,59	AIA	N	N	N	Stérile	Douleurs OD, abcès, hypopion	Non	Favorable sous traitement	Récidive d'endophtalmie aiguë sur AC
12	>45	28,49	AIA	N	N	N	*Moraxella sp*	Picotements, douleur OD, infiltrat stromal, hypopion	Non	Favorable sous traitement GMA	AC grave à *Moraxella* sp
13	>45	44,83	AIA	N	N	N	Stérile	Douleurs OG, larmoiements, microabcès, KPS	Oui	Favorable sous Ciloxan®, Tobrex® et Désomédine®	Probable kératoconjonctivite infectée
14	>45	>45	AIA	NC	N	N	*H. parainfluenzae*	Douleurs OD, cercle périkératique, infiltrat stromal	Non	Favorable sous collyres renforcés	AC grave à *H. parainfluenzae*
15	>45	>45	AIA	NC	N	N	PCR HSV positive	Douleurs, abcès, cercle périkératique	Non	Favorable après GMA décidée sur athalamie	AC herpétique grave sur probable ulcère chronique
16	>45	>45	AIA	NC	N	N	Stérile	Douleur OD, photophobie, ulcère creusant	Non	Amélioration sous collyres renforcés	AC sur dystrophie grillagée sans germe identifié
17	>45	42,55	AIA	N	NR	NR	Stérile	OD rouge et douloureux, abcès punctiforme	Oui	Amélioration à H48	AC d'étiologie indéterminée
18	>45	25,46	AIA	N	N	NR	Stérile	Douleur OG depuis 15j Abcès, hypopion, perforation	Non	Agravation sous traitement => Eviscération	AC sévère perforé sur trichiasis

	Ct Ac	Ct BG	IA	Conclusion*	RAL	Culture	Microbiologie	Aspect clinique	Lentilles	Evolution	Diagnostic final
19	>45	37,84	AIA	N	N	N	Stérile	Douleurs, baisse AV Ulcère, infiltrat stromal	Non	Favorable sous traitement mais nécessité d'une GMA	Ulcère marginal sur effet Dellen sur bulle de filtration
20	>45	32,20	AIA	N	N	N	*S. aureus*	Douleur insomniante, abcès, hypopion	Non	Diminution de l'inflammation sans récupération fonctionnelle	Endophtalmie aiguë sur AC
21	>45	35,10	AIA	N	NR	NR	Stérile	KPS, abcès central, opacité	Non	Stable sous traitement mais algique => GMA	AC grave suite à une chirurgie de la cataracte
22	>45	40,99	AIA	N	NR	NR	Stérile	Douleur OG, opacité stromale, œdème	Oui	ND	Kératite disciforme herpétique
23	>45	>45	AIA	NC	NR	N	NR	OG bulle cornéenne sous épithéliale	Non	Favorable sous Vitabact®	Kératalgie récidivante
24	>45	38,95	AIA	N	N	N	Stérile	Douleurs OG, rougeur post traumatique, infiltrat stromal	ND	Favorable sous Tobrex®, Ciloxan®	Kératite marginale
25	>45	>45	AIA	NC	N	N	NR	Abcès central OD	Oui	Favorable sous Désomédine®, Zelitrec®, Tobrex®, Vitabact®	KPS
26	**30,16**	**30,09**	**AIA**	**P**	**NR**	**NR**	**NR**	**Ulcération sous épithéliale, infiltrat et œdème stromal**	**Oui**	**Favorable sous Désomédine® et Vitabact®**	**Kératite amibienne**
27	>45	36,78	AIA	N	N	N	Stérile	ND	ND	ND	ND
28	>45	38,72	AIA	N	NR	NR	Stérile	ND	ND	ND	ND
29	>45	>45	AIA	NC	NR	NR	NR	Bulle épithéliale OG avec infiltrat	Non	Favorable sou Désomédine®, Tobrex® et Vitabact®	Kératite amibienne ? Kératalgie récidivante ?
30	>45	28,30	AIA	N	N	N	NR	Rougeur, douleur OD Kératite dendritique, infiltrats superficiels	Oui	Amélioration sous traitement	Kératite dendritique
31	>45	>45	AIA	NC	NR	NR	NR	Abcès central OG, infiltrat stromal, cercle périkératique	Oui	ND	AC d'étiologie indéterminée
32	>45	40,59	AIA	N	NR	NR	NR	Abcès central OG Aspect pseudodendritique	Non	ND	Ulcération cornéenne d'étiologie indéterminée
33	>45	26,30	AIA	N	N	N	*P. aeruginosa*	Douleurs, baisse AV, KPS, abcès annulaire, hypopion	Oui	Favorable sous collyres renforcés et Désomédine®	AC sévère à *P. aeruginosa* et *Klebsiella*
34	>45	28,23	AIA	N	N	N	*Bacillus sp*	Douleur OG, prurit, baisse AV, œdème, infiltrats, KPS	Oui	Favorable sous collyres renforcés et Désomédine®	Ulcération pseudodendritique
35	>45	39,95	AIA	N	N	NR	Stérile	Rougeur, douleur OD, abcès	Non	Favorable sous traitement	AC grave sur kératotomie radiaire
36	>45	35,41	AIA	N	NR	NR	NR	Microabcès centraux OG	Oui	ND	AC à *S. epidermidis*
37	>45	39,21	AIA	N	NR	NR	NR	ND	ND	ND	ND
38	**41,98**	**39,55**	**AIA**	**P**	**NR**	**NR**	**NR**	**Photophobie, douleurs OD Kératite filamenteuse**	**Oui**	**Favorable sous Tobrex®, Vitabact®**	**Kératite amibienne**

AIA : Absence d'inhibiteur d'amplification ; NR : Non réalisé ; ND : donnée non connue, absence de suivi
OG : Œil gauche ; OD : Œil droit ; AV : acuité visuelle ; KPS : kératite ponctuée superficielle ; AC : Abcès cornéen ; GMA : Greffe de membrane amniotique
*Interprétation de la PCR : N=négatif : absence d'ADN d'*Acanthamoeba* spp, présence de béta-globine, absence d'inhibiteurs ; P=positif : présence d'ADN d'*Acanthamoeba* spp, résultat en faveur d'une KA ; NC=non contributif : absence d'amplification du gène de la béta-globine, échantillon trop pauvre pour conclure

IV Discussion - Perspectives

1 La PCR en temps réel pour le diagnostic des KA

La kératite amibienne est une pathologie rare mais grave dont le pronostic est amélioré par une prise en charge précoce.[3, 10] Le traitement étant lourd et contraignant, un diagnostic fiable et rapide est d'une grande importance d'où le développement depuis quelques années de nouvelles techniques de diagnostic. La biologie moléculaire, malgré son coût relativement élevé et la nécessité d'un appareillage spécifique, apparait être ici une solution pour pallier le manque de sensibilité et la lenteur des techniques habituellement utilisées (examen direct et culture). Le coût supplémentaire engendré est à confronter aux bénéfices médicaux attendus : diminution du nombre de KA graves et du coût de leur prise en charge. C'est pourquoi nous avons adapté, au sein de notre laboratoire, une PCR en temps réel. Cette technique reste facile à mettre en œuvre malgré la détection de deux gènes différents et est utilisable dans tout laboratoire effectuant des analyses de biologie moléculaire standard.

1.1 Amorces et sonde

Notre PCR en temps réel utilise des amorces et une sonde déjà décrites par Qvarnstrom *et al*[56] et Thompson *et al*[70], AcantF, AcantR et AcantP. Dans la publication de Thompson *et al* comparant les deux techniques de PCR en temps réel alors décrites,[70] le couple d'amorces AcantF / AcantR semblait montrer une meilleure sensibilité que celui de l'équipe de Rivière *et al*[59] (TaqAcF / TaqAcR). Depuis, une troisième PCR en temps réel avec un autre couple d'amorces a été décrite par l'équipe de Goldschmidt[22] ciblant, cette fois, l'ADN mitochondrial. D'après les auteurs, cette cible est plus adaptée pour le diagnostic des différents génotypes impliqués dans les pathologies à *Acanthamoeba* spp. En effet, une souche ATCC (American Type Culture Collection) d'*Acanthamoeba sp* de génotype T5

détectée par leur PCR ne l'était pas avec les amorces de Qvarnstrom.[56] Cependant, en blastant les séquences de nos propres oligonucléotides, nous avons pu vérifier une homologie de séquence à 100% avec les différents génotypes d'*Acanthamoeba sp*, au moins pour ceux décrits actuellement dans les KA (essentiellement T4 puis T3, T11 et enfin T2, 5, 6 et 15). En théorie, certains T5 devraient également être amplifiés mais nous n'avions pas de souches de ce génotype à notre disposition. Par contre, nous avons pu tester notre technique sur différentes souches de génotype T4, une souche T3 et une souche T6. En outre, le génome d'*Acanthamoeba sp* est très variable et de nouveaux génotypes seront probablement encore décrits. Il est par conséquent difficile, à l'heure actuelle, d'affirmer l'exhaustivité de la détection de toutes les souches d'*Acanthamoeba sp* quelles que soient les sondes et amorces utilisées.

1.2 Contrôle béta-globine

L'avantage majeur de notre protocole, par rapport à ceux décrits jusqu'à maintenant, est la détection simultanée de la cible *Acanthamoeba* spp et d'un gène humain qui témoigne de la qualité du prélèvement. Cette PCR multiplex, grâce à l'amplification du gène de la béta-globine, permet de limiter les faux négatifs : dans notre série prospective, ce gène n'a pas été amplifié dans 18,4% des échantillons. Pour ces grattages, il n'est pas possible d'affirmer que l'absence d'ADN d'*Acantahmoeba* sp n'est pas liée à une insuffisance de prélèvement. Les résultats n'étant pas interprétables, le diagnostic de KA ne pourra pas être écarté et les cliniciens seront incités à faire un nouveau prélèvement en cas de persistance des symptômes. Cette information sur la qualité du prélèvement est particulièrement importante dans ce diagnostic du fait de ses caractéristiques : le grattage en profondeur de la cornée n'est pas aisé et, par conséquent, la quantité de matériel ramenée est souvent faible.[4, 31]

1.3 Inhibiteurs de PCR

Par ailleurs, notre protocole nous permet également de détecter des éventuels inhibiteurs de PCR dans les échantillons patients (soit pour la cible *Acanthamoeba* soit pour la béta-globine). Dans la publication de Thompson *et al,*[70] il a été montré un effet inhibiteur partiel de certains collyres, et en particulier du PHMB (principale molécule utilisée pour le traitement des KA) à faible concentration. Dans nos tests, nous avons effectivement retrouvé un faible potentiel inhibiteur partiel du PHMB mais à des concentrations relativement élevées, qui ne seront certainement jamais atteintes dans un réel grattage de cornée. Cette discordance peut être expliquée par l'utilisation de techniques d'extraction différentes, certaines étant plus à même d'éliminer les inhibiteurs de PCR. Par ailleurs, afin de limiter la présence potentielle de ces inhibiteurs de PCR, il est essentiel de bien rincer l'œil au sérum physiologique avant le prélèvement. Cette précaution est d'autant plus importante après utilisation de la fluorescéine du fait de son interaction potentielle avec les systèmes de détection des sondes fluorescentes par l'appareil de PCR.[24]

1.4 Sensibilité

Un autre point essentiel dans le développement de cette PCR est la limite de détection : les échantillons pouvant être très pauvres en amibes, il était important que notre technique permette de détecter une seule forme isolée de façon quasi-systématique. Pour répondre à cet enjeu, nous avons optimisé les phases de prétraitement et d'extraction : grâce à l'utilisation associée d'un choc thermique, ne nécessitant pas de matériel spécifique, et d'une extraction manuelle avec le kit QIAamp DNA Mini® (Qiagen) selon le protocole tissu, 30 kystes isolés sur 31 (soit 97%) ont pu être amplifiés. Ce protocole, facile à mettre en œuvre, semble même donner de meilleurs résultats que celui utilisant la protéinase K associée à une extraction MagnaPure décrit comme le plus efficace parmi ceux testés dans la publication de

Goldschmidt *et al.*[23] Avec leur protocole, ils avaient obtenu une amplification dans seulement 33% des réactions avec l'équivalent de 0.15 kyste/tube, contre 97% pour 0.2 kyste/tube dans nos essais. En linéarité, par dilution sérielle d'ADN, notre PCR permet de détecter l'équivalent de 0.1 génome d'*Acanthamoeba* spp par échantillon, soit 0,02 génome/tube de réaction PCR. Cette faible valeur (inférieure à 1) s'explique par le fait que le gène amplifié est répété environ 600 fois dans le génome des *Acanthamoeba* spp.[70, 77]

L'objectif principal du développement de cette technique au laboratoire était un gain de sensibilité pour le diagnostic de KA. Nous avons donc testé notre méthode sur une série prospective de patients : sur les 20 prélèvements traités en parallèle en culture et en PCR, 2 sont sortis positifs en PCR alors que toutes les cultures sont restées négatives. Pour ces deux patients, le contexte concordait bien avec une infection oculaire à *Acanthamoeba sp* : port de lentilles de contact, absence d'autre étiologie (recherches bactériologiques et virologiques négatives), clinique en accord avec une atteinte amibienne et évolution favorable sous traitement antiamibien. Sur l'ensemble des prélèvements passés en PCR (soit 38 grattages cornéens), 10% étaient positifs (4/38) sur une période de 4 mois. Par rapport aux données de la littérature,[2, 79, 81] notre proportion d'échantillons positifs parait élevée. Ces publications françaises rapportent des pourcentages d'échantillons positifs aux alentours de 3%. Notre fréquence de positifs peut s'expliquer par une meilleure détection d'*Acanthamoeba* spp. avec notre PCR multiplex. Il est habituel que les PCR surpassent les techniques de cultures même si celles-ci sont souvent utilisées comme gold standard.[4, 31] Or, l'épidémiologie actuelle des KA est basée sur un diagnostic biologique utilisant l'examen direct et la culture, l'incidence de cette pathologie est donc probablement largement sous-estimée. Considérant les facteurs de risque des KA, ce chiffre peut aussi être expliqué par la période couverte par l'étude (Mars à Août 2011), traversée par de grosses vagues de chaleur propices aux activités en milieu extérieur, en particulier aux baignades. Il a été montré que l'incidence des KA varie en

fonction des conditions météorologiques : l'équipe de W.D. Mathers[45] a pu montrer une augmentation de l'incidence en saison chaude qui a été attribuée à une augmentation de la prévalence des *Acanthamoeba* spp dans l'environnement à ce moment-là. Enfin, ces chiffres révèlent également les difficultés rencontrées avec les méthodes conventionnelles utilisées jusqu'alors dans le laboratoire. En effet, le délai de mise en culture est probablement délétère. Pour pallier à ce problème, certains centres utilisant la culture privilégient l'ensemencement extemporané du prélèvement (au lit du patient) directement sur la boîte de culture, diminuant ainsi le risque d'altération des microorganismes. Ce type d'organisation est intéressant mais s'avère particulièrement lourd à mettre en place, et malgré cela la sensibilité de la culture reste médiocre.

2 Applications de notre PCR multiplex

Cette technique a été développée pour le diagnostic de KA à partir de grattages de cornée (ou de biopsies) en excluant les lentilles et les liquides de rinçage de lentilles. Il est cependant toujours possible de réaliser une PCR sur les lentilles et les liquides, mais l'intérêt diagnostic est moindre. La présomption diagnostique est beaucoup plus forte si des amibes libres sont retrouvées "in situ", et diminue si elles le sont au niveau d'une lentille. La détection d'ADN d'*Acanthamoeba sp* dans un liquide de lavage est encore moins significative de KA.[4, 43] De plus, une PCR positive est la preuve de la présence d'ADN mais ne signifie en aucun cas que ce micro-organisme est vivant voire même présent (possibilité d'ADN libre). En considérant que des amibes libres soient présentes dans le liquide de rinçage, l'imputabilité de ces microorganismes dans une kératite infectieuse reste donc à prouver au cas par cas. En cas de problème d'hygiène avec la solution de lavage, la flore est souvent polymicrobienne : nombreuses bactéries, parfois champignons ou autres protozoaires, et l'imputabilité de l'amibe à elle seule dans les cas de kératites infectieuses est difficile à affirmer. Néanmoins,

en cas d'épidémie de KA avec une suspicion de contamination d'un liquide de lavage de lentilles, une PCR peut être réalisée sur celui-ci afin de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse. En 2006, une épidémie de KA aux Etats-Unis a conduit au retrait d'un produit de conservation, par précaution, devant la présence de 35 cas de KA. Parmi ces cas, 19 patients utilisaient la même solution de lavage. Par mesure de précaution, ce produit a également été retiré de la vente en France, volontairement par le fabricant.[30]

Enfin, cette technique pourrait s'appliquer à d'autres échantillons comme le liquide céphalo-rachidien pour le diagnostic de pathologies atteignant le système nerveux central (telles que l'encéphalite granulomateuse amibienne). Toutefois, avec notre PCR, seules les infections à *Acanthamoeba* spp. pourraient être diagnostiquées, et non celles liées à *Naegleria* spp. ou *Balamuthia* spp.

3 Perspectives

En l'absence d'étiologie, les ophtalmologistes traitent « à l'aveugle » les kératites infectieuses en utilisant une association de collyres (antibactérien, antiseptique) efficaces contre les amibes et qui sont suffisants si l'abcès est superficiel. Cependant, un meilleur outil diagnostic améliore la prise en charge avec possibilité d'utilisation de collyres ciblés et de désescalade des traitements. Un diagnostic fiable permet également une meilleure connaissance de l'épidémiologie des KA. Une meilleure prévention et éducation des patients vis-à-vis de cette pathologie en sont également une conséquence indirecte. Afin de permettre cette meilleure prise en charge, nous avons développé ici un outil sensible, spécifique et rapide : la technique en elle-même prend moins de 4 heures contre 3 semaines pour la culture. Son atout supplémentaire, par rapport aux PCR en temps réel développées jusqu'à maintenant, est de renseigner sur la qualité du prélèvement et par conséquent de limiter les faux négatifs.

Enfin, la question concernant la durée du traitement des KA reste d'actualité.[50] Il pourrait par conséquent être utile de tester ce nouvel outil pour le suivi du traitement en réalisant, à plusieurs reprises en cours de thérapie, de nouveaux grattages cornéens. Cette évaluation permettrait de connaitre la clairance du parasite. Cependant, notre PCR, contrairement à d'autres méthodes basées sur la détection de l'ARN, ne permet pas de savoir si l'ADN détecté provient d'un microorganisme vivant. La détection de cet ADN ne sera donc pas forcément synonyme d'infection persistante. En parallèle de ces techniques de biologie moléculaire, d'autres techniques comme la microscopie confocale *in vivo* se développent.[25, 38, 44, 72] Cette technique est encore en évaluation mais elle présente l'avantage de ne pas être invasive et pourrait donc apporter une aide pour le suivi des KA.

Cette PCR multiplex est désormais utilisée en routine dans le laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Grenoble pour le diagnostic des KA. Cependant, elle ne peut pas encore totalement remplacer le gold standard, examen direct et culture. En effet, face à la problématique liée à la grande variabilité génotypique d'*Acanthamoeba* spp., nous ne pouvons pas certifier que notre PCR amplifiera systématiquement tous les génotypes. Nous préconisons donc encore une association d'un prélèvement pour la culture, d'un étalement sur lame pour l'examen direct et d'un prélèvement pour la PCR. De plus, la culture est le seul moyen de conserver les souches de patients, pouvant toujours s'avérer utiles pour des études ultérieures.

Thèse soutenue par Mlle DUBOSSON Muriel

Titre : « Mise au point d'une PCR en temps réel pour le diagnostic de kératites à *Acanthamoeba* spp »

CONCLUSION

Ce travail a permis la mise en place, dans l'activité quotidienne du laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Grenoble, d'une technique d'amplification génomique permettant, grâce à une bonne sensibilité et spécificité, un diagnostic fiable et rapide des kératites amibiennes.

Notre PCR multiplex en temps réel présente une variabilité intra et inter-essais faible, et une bonne spécificité. Elle permet également de détecter 1 kyste isolé par échantillon et d'amplifier l'équivalent de 0,02 génome d'*Acanthamoeba* spp. Les délais d'obtention des résultats représentent un autre avantage de la PCR par rapport à la culture. La supériorité de la PCR sur la culture a été confirmée par une étude prospective sur des grattages de cornée de patients suspects de KA : sur 38 prélèvements, 4 sont positifs en PCR alors que toutes les cultures sont restées négatives. Pour ces quatre patients, l'aspect clinique, la présence d'un facteur de risque (port de lentilles de contact), l'amélioration sous traitement antiamibien et l'absence d'autre étiologie sont des arguments en faveur d'une KA. Pour deux d'entre eux, la présence d'ADN d'*Acanthamoeba* sp. a été confirmée par le génotypage. Les deux autres extraits étaient en quantité insuffisante pour procéder au génotypage. Le diagnostic par PCR surpasse en sensibilité le gold standard qui reste encore aujourd'hui l'examen direct associé à la culture.

En outre, notre méthode de diagnostic permet, en même temps que la détection de la cible, de nous informer sur la qualité du prélèvement grâce à la détection, en multiplex, de la béta globine humaine. L'avantage majeur de cette PCR, par rapport à celles décrites jusqu'ici, est

de limiter le rendu de résultats faussement négatifs. Ceci est particulièrement intéressant dans le cadre des kératites infectieuses de par la difficulté à réaliser un prélèvement riche en cellules. Dans notre échantillonnage, 18% des prélèvements se sont avérés trop pauvres en matériel pour permettre une interprétation correcte du résultat. En cas de suspicion persistante, un nouveau prélèvement est préconisé.

Au laboratoire de Parasitologie-Mycologie, cette PCR *Acanthamoeba* est désormais utilisée en routine pour le diagnostic des kératites amibiennes, en complément de la culture. Depuis son introduction, cet outil a déjà modifié nos connaissances sur l'implication des *Acanthamoeba* spp. dans les kératites infectieuses et il devrait également permettre l'ajustement des traitements anti-infectieux à large spectre, souvent utilisés en l'absence d'étiologie. La phase d'évaluation est encore débutante mais offre des perspectives intéressantes, tant sur un plan diagnostic et clinique que sur un plan épidémiologique.

Ce travail a donné lieu à une communication sous forme d'affiche lors du congrès conjoint de la Société Française de Parasitologie (Congrès de la SFP, Strasbourg, 18-20 Mai 2011) (annexe 6). Un article, reprenant les principaux résultats, a également été soumis dans la revue internationale, Investigative Ophthalmology and Visual Science (IOVS) (annexe 7).

Vu et permis d'imprimer

Grenoble, le 24/08/11

Le Doyen,

Professeur Christophe RIBUOT

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
U.F.R DE PHARMACIE
GRENOBLE 1

La Présidente de thèse

Professeur Muriel CORNET

BIBLIOGRAPHIE

1. AFSSAPS. Rapport d'enquête sur les kératites graves chez les porteurs de lentilles de contact. 2009.
2. AGLA, E., M. CORNET, V. PIERRE-KHAN*, et al.* Kératites stromales amibiennes : épidémiologie et facteurs pronostiques. J Fr Ophtalmol. 2005. **28**: p. 933-938.
3. BACON, A.S., J.K. DART, L.A. FICKER, M.M. MATHESON and P. WRIGHT. *Acanthamoeba* keratitis. The value of early diagnosis. Ophthalmology. 1993. **100**: p. 1238-1243.
4. BOGGILD, A.K., D.S. MARTIN, T.Y. LEE, B. YU and D.E. LOW. Laboratory diagnosis of amoebic keratitis: comparison of four diagnostic methods for different types of clinical specimens. J Clin Microbiol. 2009. **47**: p. 1314-1318.
5. BOURCIER, T. Abcès de cornée. Congrès SFMM, SFP, GPLF, Strasbourg, 18-20 Mai 2011. 2011. p. 47-48.
6. BOURCIER, T., O. ZAMFIR and C. CHAUMEIL. Kératites amibiennes. EMC Ophtalmologie. 2007. **21-200-D-25**
7. BUSTIN, S., V. BENES, J. GARSON*, et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem. 2009. **55**: p. 611-622.
8. CARDINE, S., T. BOURCIER, C. CHAUMEIL, O. ZAMFIR, V. BORDERIE and L. LAROCHE. Prise en charge clinique et pronostic des kératites amibiennes. Etude rétrospective à propos de 25 cas. J Fr Ophtalmol. 2002. **25**: p. 1007-1013.
9. CARRETTE, S., C. MARECHAL-COUROIS, J. HERNANDEZ, M.-P. HAYETTE, M. DEPREZ and B. DUCHESNE. A propos d'un cas de kératite à *Acanthamoeba.* Bull Soc belge Ophtalmol. 2000. **275**: p. 49-53.
10. CLAERHOUT, I., A. GOEGEBUER, C. VAN DEN BROECKE and P. KESTELYN. Delay in diagnosis and outcome of *Acanthamoeba* keratitis. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2004. **242**: p. 648-653.
11. CLARKE, D.W. and J.Y. NIEDERKORN. The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis. Trends Parasitol. 2006. **22**: p. 175-180.
12. COFRAC. Guide COFRAC LAB GTA 04 Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en biologie médicale. 2011.
13. CORSARO, D. and D. VENDITTI. Phylogenetic evidence for a new genotype of *Acanthamoeba* (Amoebozoa, Acanthamoebida). Parasitol Res. 2010. **107**: p. 233-238.
14. COULON, C., A. COLLIGNON, G. MCDONNELL and V. THOMAS. Resistance of *Acanthamoeba* cysts to disinfection treatments used in health care settings. J Clin Microbiol. 2010. **48**: p. 2689-2697.
15. DART, J., V. SAW and S. KILVINGTON. *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis and treatment update 2009. Am J Ophtalmol. 2009. **148**: p. 487-499.
16. DHIVYA, S., H.N. MADHAVAN, M. RAO CH*, et al.* 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. 2007. **100**: p. 1303-1309.
17. DI CAVE, D., R. MONNO, P. BOTTALICO*, et al. Acanthamoeba* T4 and T15 genotypes associated with keratitis infections in Italy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009. **28**: p. 607-612.
18. DUA, H.S., A. AZUARA-BLANCO, M. HOSSAIN and J. LLOYD. Non-*Acanthamoeba* amebic keratitis. Cornea. 1998. **17**: p. 675-677.

19. EDAGAWA, A., A. KIMURA, T. KAWABUCHI-KURATA, Y. KUSUHARA and P. KARANIS. Isolation and genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* and *Naegleria* species from tap-water sources in Osaka, Japan. Parasitol Res. 2009. **105**: p. 1109-1117.
20. ELDER, M.J. and J.K. DART. Chemotherapy for *Acanthamoeba* keratitis. Lancet. 1995. **345**: p. 791-792; author reply 792-793.
21. GAST, R.J., D.R. LEDEE, P.A. FUERST and T.J. BYERS. Subgenus systematics of *Acanthamoeba* : four nuclear 18S rDNA sequence types. J Eukaryot Microbiol. 1996. **43**: p. 498-504.
22. GOLDSCHMIDT, P., S. DEGORGE, D. BENALLAOUA*, et al.* New tool for the simultaneous detection of 10 different genotypes of *Acanthamoeba* available from the American Type Culture Collection. Br J Ophthalmol. 2009. **93**: p. 1096-1100.
23. GOLDSCHMIDT, P., S. DEGORGE, C. SAINT-JEAN*, et al.* Resistance of *Acanthamoeba* to classic DNA extraction methods used for the diagnosis of corneal infections. Br J Ophtalmol. 2008. **92**: p. 112-115.
24. GOLDSCHMIDT, P., H. ROSTANE, C. SAINT-JEAN*, et al.* Effects of topical anaesthetics and fluorescein on the real-time PCR used for the diagnosis of *Herpesviruses* and *Acanthamoeba* keratitis. Br J Ophthalmol. 2006. **90**: p. 1354-1356.
25. GRISE-DULAC, A., E. BRASNU, P. GOLDCHMIDT*, et al.* Apport de la microscopie confocale in vivo au diagnostic des kératities amibiennes. J Fr Ophtalmol. 2010. **33**: p. 383-390.
26. HEFFLER, K.F., T.J. ECKHARDT, A.C. REBOLI and D. STIERITZ. *Acanthamoeba* endophthalmitis in acquired immunodeficiency syndrome. Am J Ophthalmol. 1996. **122**: p. 584-586.
27. ILLINGWORTH, C.D. and S.D. COOK. *Acanthamoeba* keratitis. Surv Ophthalmol. 1998. **42**: p. 493-508.
28. ILLINGWORTH, C.D., S.D. COOK, C.H. KARABATSAS and D.L. EASTY. *Acanthamoeba* keratitis: risk factors and outcome. Br J Ophthalmol. 1995. **79**: p. 1078-1082.
29. JONES, D.B., G.S. VISVESVARA and N.M. ROBINSON. *Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba* uveitis associated with fatal meningoencephalitis. Trans Ophthalmol Soc U K. 1975. **95**: p. 221-232.
30. JOSLIN, C.E., E.Y. TU, M.E. SHOFF*, et al.* The association of contact lens solution use and *Acanthamoeba* keratitis. Am J Ophthalmol. 2007. **144**: p. 169-180.
31. KHAIRNAR, K., G.S. TAMBER, F. RALEVSKI and D.R. PILLAI. Comparison of molecular diagnostic methods for the detection of *Acanthamoeba* spp. from clinical specimens submitted for keratitis. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011. **70**: p. 499-506.
32. KHAN, N.A. *Acanthamoeba* : biology and increasing importance in human health. FEMS Microbiol Rev. 2006. **30**: p. 564-595.
33. KHAN, N.A. and T.A. PAGET. Molecular tools for speciation and epidemiological studies of *Acanthamoeba.* Curr Microbiol. 2002. **44**: p. 444-449.
34. KINNEAR, F.B. Non-*Acanthamoeba* amoebic keratitis. J Infect. 2001. **42**: p. 218-219.
35. KONG, H.H., J.H. PARK and D.I. CHUNG. Interstrain polymorphisms of isoenzyme profiles and mitochondrial DNA fingerprints among seven strains assigned to *Acanthamoeba polyphaga.* Korean J Parasitol. 1995. **33**: p. 331-340.
36. KONG, H.H., J.Y. SHIN, H.S. YU*, et al.* 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. 2002. **40**: p. 1199-1206.

37. KUMAR, R. and D. LLOYD. Recent advances in the treatment of *Acanthamoeba* keratitis. Clin Infect Dis. 2002. **35**: p. 434-441.
38. KUMAR, R.L., A. CRUZAT and P. HAMRAH. Current state of in vivo confocal microscopy in management of microbial keratitis. Semin Ophthalmol. 2010. **25**: p. 166-170.
39. LAKOMY, D., M. SOULIE, J. BADOR*, et al.* Une kératite à amibes libres chez un non porteur de lentilles de contact. Ann Biol Clin (Paris). 2005. **63**: p. 531-534.
40. LEHMANN, O.J., S.M. GREEN, N. MORLET*, et al.* Polymerase chain reaction analysis of corneal epithelial and tear samples in the diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1998. **39**: p. 1261-1265.
41. LIM, N., D. GOH, C. BUNCE*, et al.* Comparison of polyhexamethylene biguanide and chlorhexidine as monotherapy agents in the treatment of *Acanthamoeba* keratitis. Am J Ophthalmol. 2008. **145**: p. 130-135.
42. LORENZO-MORALES, J., E. MARTINEZ-CARRETERO, N. BATISTA*, et al.* Early diagnosis of amoebic keratitis due to a mixed infection with *Acanthamoeba* and *Hartmannella.* Parasitol Res. 2007. **102**: p. 167-169.
43. MARCIANO-CABRAL, F. and G. CABRAL. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. Clin Microbiol Rev. 2003. **16**: p. 273-307.
44. MATHERS, W.D., S.E. NELSON, J.L. LANE, M.E. WILSON, R.C. ALLEN and R. FOLBERG. Confirmation of confocal microscopy diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis using polymerase chain reaction analysis. Arch Ophthalmol. 2000. **118**: p. 178-183.
45. MATHERS, W.D., J.E. SUTPHIN, J.A. LANE and R. FOLBERG. Correlation between surface water contamination with amoeba and the onset of symptoms and diagnosis of amoeba-like keratitis. Br J Ophthalmol. 1998. **82**: p. 1143-1146.
46. MATHYS, V., P. LEFÈVRE, V. FONTAINE*, et al.* La PCR en temps réel : principe et application en infectiologie. EMC Antibiotiques. 2007. **9**: p. 205-211.
47. MOSHARI, A., I.W. MCLEAN, M.T. DODDS, R.E. DAMIANO and P.L. MCEVOY. Chorioretinitis after keratitis caused by *Acanthamoeba* : case report and review of the literature. Ophthalmology. 2001. **108**: p. 2232-2236.
48. NAGINGTON, J., P.G. WATSON, T.J. PLAYFAIR, J. MCGILL, B.R. JONES and A.D. STEELE. Amoebic infection of the eye. Lancet. 1974. **2**: p. 1537-1540.
49. NUPRASERT, W., C. PUTAPORNTIP, L. PARIYAKANOK and S. JONGWUTIWES. Identification of a novel T17 genotype of *Acanthamoeba* from environmental isolates and T10 genotype causing keratitis in Thailand. J Clin Microbiol. 2010. **48**: p. 4636-4640.
50. OLDENBURG, C.E., J.D. KEENAN, V. CEVALLOS*, et al.* Microbiological cure times in *Acanthamoeba* keratitis. Eye (Lond). 2011.
51. OZKOC, S., S. TUNCAY, S.B. DELIBAS*, et al.* Identification of *Acanthamoeba* genotype T4 and *Paravahlkampfia* sp. from two clinical samples. J Med Microbiol. 2008. **57**: p. 392-396.
52. PAGE, F.C. A new key to fresh water and soil *Gymnamoebae.* 1988. p. 1-122.
53. PANJWANI, N. Pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis. Ocul Surf. 2010. **8**: p. 70-79.
54. PETITHORY, J.C., F. ARDOIN-GUIDON and C. CHAUMEIL. Cahier de Formation n°11. Amibes et flagellés intestinaux. Amibes oculaires. Leur diagnostic microscopique. Bioforma. Paris. 1998. p. 206-234.
55. PUSSARD, M. and S. PONS. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). Protistologica. 1977. **8**: p. 557-598.
56. QVARNSTROM, Y., G.S. VISVESVARA, R. SRIRAM and A.J. DA SILVA. Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Acanthamoeba* spp.,

Balamuthia mandrillaris, and *Naegleria fowleri.* J Clin Microbiol. 2006. **44**: p. 3589-3595.
57. RADFORD, C.F., O.J. LEHMANN and J.K. DART. *Acanthamoeba* keratitis: multicentre survey in England 1992-6. National *Acanthamoeba* Keratitis Study Group. Br J Ophthalmol. 1998. **82**: p. 1387-1392.
58. RADFORD, C.F., D.C. MINASSIAN and J.K. DART. *Acanthamoeba* keratitis in England and Wales: incidence, outcome, and risk factors. Br J Ophthalmol. 2002. **86**: p. 536-542.
59. RIVIÈRE, D., F. SZCZEBARA, J. BERJEAUD and Y. HÉCHARD. Development of real-time PCR assay for quantification of *Acanthamoeba* trophozoïtes and cysts. J Microbiol Methods. 2006. **64**: p. 78-83.
60. ROZEN, S. and H. SKALETSKY. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ. 2000. p. 365-386.
61. SCHROEDER, J.M., G.C. BOOTON, J. HAY*, et al.* 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. 2001. **39**: p. 1903-1911.
62. SCHUSTER, F.L. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. Clin Microbiol Rev. 2002. **15**: p. 342-354.
63. SEAL, D.V. *Acanthamoeba* keratitis update-incidence, molecular epidemiology and new drugs for treatment. Eye (Lond). 2003. **17**: p. 893-905.
64. SHARIFI, N., S. BOTERO-KLEIVEN, D. OHMAN, A. BARRAGAN and J. WINIECKA-KRUSNELL. Genotypic characterization of *Acanthamoeba* spp. causing ocular infections in Swedish patients: identification of the T15 genotype in a case of protracted keratitis. Scand J Infect Dis. 2010. **42**: p. 781-786.
65. SHARMA, S., P. GARG and G.N. RAO. Patient characteristics, diagnosis, and treatment of non-contact lens related *Acanthamoeba* keratitis. Br J Ophthalmol. 2000. **84**: p. 1103-1108.
66. SISON, J.P., C.A. KEMPER, M. LOVELESS, D. MCSHANE, G.S. VISVESVARA and S.C. DERESINSKI. Disseminated *Acanthamoeba* infection in patients with AIDS: case reports and review. Clin Infect Dis. 1995. **20**: p. 1207-1216.
67. STEHR-GREEN, J.K., T.M. BAILEY and G.S. VISVESVARA. The epidemiology of *Acanthamoeba* keratitis in the United States. Am J Ophthalmol. 1989. **107**: p. 331-336.
68. STOTHARD, D.R., J. HAY, J.M. SCHROEDER-DIEDRICH, D.V. SEAL and T.J. BYERS. Fluorescent oligonucleotide probes for clinical and environmental detection of *Acanthamoeba* and the T4 18S rRNA gene sequence type. J Clin Microbiol. 1999. **37**: p. 2687-2693.
69. STOTHARD, D.R., J.M. SCHROEDER-DIEDRICH, M.H. AWWAD*, et al.* The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. J Eukaryot Microbiol. 1998. **45**: p. 45-54.
70. THOMPSON, P.P., R.P. KOWALSKI, R.M. SHANKS and Y.J. GORDON. Validation of real-time PCR for laboratory diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. J Clin Microbiol. 2008. **46**: p. 3232-3236.
71. TSE, C. and J. CAPEAU. Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. Ann Biol Clin (Paris). 2003. **61**: p. 279-293.
72. VADDAVALLI, P.K., P. GARG, S. SHARMA, V.S. SANGWAN, G.N. RAO and R. THOMAS. Role of confocal microscopy in the diagnosis of fungal and *Acanthamoeba* keratitis. Ophthalmology. 2011. **118**: p. 29-35.

73. VÉDY, S., C. RAGOT, P. HANCE, E. GARNOTEL, J. DEPINA and M. MORILLON. Diagnostic au laboratoire des parasitoses oculaires. Revue Francophone des Laboratoires. 2008. **399**: p. 63-78.
74. VISVESVARA, G., H. MOURA and F. SHUSTER. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae : *Acanthamoeba* spp, *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* and *Sappinia diploidea.* Immunol Med Microbiol. 2007. **50**: p. 1-26.
75. VISVESVARA, G.S. Classification of *Acanthamoeba.* Rev Infect Dis. 1991. **13 Suppl 5**: p. S369-372.
76. VISVESVARA, G.S. and F.L. SCHUSTER. Opportunistic free-living amoeba, Part I. Clinical Microbiology Newsletter. 2008. **30**: p. 151-158.
77. YANG, Q., M.G. ZWICK and M.R. PAULE. Sequence organization of the *Acanthamoeba* rRNA intergenic spacer: identification of transcriptional enhancers. Nucleic Acids Res. 1994. **22**: p. 4798-4805.
78. YERA, H., P. GOLDSCHMIDT, C. CHAUMEIL, M. CORNET and M. DARDÉ, *Acanthamoeba In : Liu DY Molecular detection of foodborne pathogens* 2009: Editors CRC Press Taylor&Francis Group. 639-650.
79. YERA, H., O. ZAMFIR, T. BOURCIER*, et al.* 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. 2006. **26**: p. 221-224.
80. YERA, H., O. ZAMFIR, T. BOURCIER*, et al.* The genotypic characterisation of *Acanthamoeba* isolates from human ocular samples. Br J Ophthalmol. 2008. **92**: p. 1139-1141.
81. ZAMFIR, O., H. YERA, T. BOURCIER*, et al.* Diagnostic par PCR des kératites à *Acanthamoeba* spp. J Fr Ophtalmol. 2006. **29**: p. 1034-1040.

ANNEXES

Annexe 1 : Gélose NN

Ce milieu de culture est fabriqué "maison" à partir des éléments suivants :

Chlorure de sodium NaCl :	1.2 %
Sulfate de magnésium $MgSO_4$:	0.04 %
Chlorure de calcium $CaCl_2$:	0.04 %
Phosphate dissodique Na_2HPO_4 :	1.42 %
Potassium déhydrogéno-phosphate KH_2PO_4 :	1.36 %
Agar Bacto :	15 g/L

10mL de chacune de ces solutions sont mélangés puis de l'eau permutée est ajoutée pour compléter à 1L. Ensuite, 15g d'Agar Bacto sont dissous dans ce mélange. Cette solution est alors autoclavée et coulée dans des boîtes de pétri de 55mm de diamètre. Ce milieu peut ainsi être conservé deux mois à +4°C.

Annexe 2 : Milieu PYG

Composition du milieu PYG pour 1L :

Protéose peptone	20 g
Yeast extract	1 g
Sulfate de magnésium $MgSO_4$ 0.81M	20.3 mL
Chlorure de calcium $CaCl_2$ 200mM	2 mL
Citrate de sodium 1M	3.4 mL
Sulfate de fer ammonium $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ 5mM	10 mL
Phosphate disodique Na_2HPO_4 0.25M	10 mL
Potassium déhydrogéno-phosphate KH_2PO_4 0.25M	10mL
Eau stérile	qsp 1L
Glucose 30%	91 mL

Ce milieu PYG est réalisé en deux temps :

Fabrication du milieu PY qui peut être stérilisé et se conserver à température ambiante plusieurs mois

Puis supplémentation en glucose de ce milieu PY ; la solution de glucose est stérilisée grâce à une filtration stérilisante (passage de la solution dans un filtre avec des pores de diamètre égal à 0.22µm). Ce milieu PYG ne se conserve que quelques jours.

Annexe 3 : Milieu d'enkystement

Composition du milieu d'enkystement, pour 50mL :

Sulfate de magnésium $MgSO_4$ 8mM	0.5mL
Chlorure de calcium $CaCl_2$ 0.4mM	0.2mL
Hydrogénocarbonate de sodium $NaHCO_3$ 1mM	0.5mL
Chlorure de potassium KCl 100mM	5mL
Tris 20mM	5mL
Eau stérile	qsp 50mL

Annexe 4 : Tampon TrisHCl

Protocole de fabrication du tampon TrisHCl, pour 100mL de solution :

Peser 1,21g de Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane

Ajouter environ 70mL d'eau stérile

Ajuster le pH à 9 avec de l'acide chlorhydrique HCl 1M

Compléter à 100mL avec de l'eau stérile

Annexe 5 : Procédures de diagnostic des KA par PCR

Annexe 5a : Extraction d'ADN pour la PCR *Acanthamoeba* spp

I. Objet

Extraction de l'ADN en vue de l'amplification de l'ADN d'*Acanthamoeba* spp dans un prélèvement de cornée par PCR en temps réel.

II. Domaine d'application

Extraction de l'ADN sur des prélèvements de cornée :
-Grattage de cornée à l'aide d'un scalpel sec mis directement dans le tube Sarstedt et biopsie cornéenne sont les prélèvements optimaux.
-Tout autre type de prélèvement (aiguille, écouvillon…) doit avoir fait l'objet d'une discussion préalable avec le biologiste référent.

III. Personnel

Technicien(ne)s.

IV. Matériels et réactif

- Hotte avec lampe UV (pièce N3-226).
- Pipettes P10, P20, P200 et P1000.
- Cônes avec filtres pour micropipettes de 10µL, 20µL, 200µL et 1000µL.
- Eppendorf 1,5mL.
- Centrifugeuse à température ambiante.
- Bain-marie à sec chauffant sur agitateur (Multi-bloc heater®, Lab-line) et Bain-marie à sac chauffant (VWR, Digital heatblock□□).
- Carrier poly A (Roche) (à -20°C, boite blanche dédiée, située dans le congélateur de la pièce d'extraction N3-226, tiroir n°7) :
.solution mère : reprendre le lyophilisat par 10mL d'eau stérile ; aliquoter sous 1mL.
.solution de travail : effectuer une dilution au ¼ de la solution mère ; aliquoter sous 40µL (ajouter 30µL d'eau stérile à 10µL de poly A).
- **Kit QIAGEN QIAamp DNA mini®** (conservé à température ambiante) :
.tampon ATL : à homogénéiser avant utilisation.
.tampon AL : agiter avant utilisation, conservation à température ambiante, stable 1 an.
.tampon AW1 : ajouter la quantité appropriée d'éthanol indiquée sur le flacon, après reconstitution stabilité de 1 an à température ambiante.
.tampon AW2 : ajouter la quantité appropriée d'éthanol indiquée sur le flacon, après reconstitution stabilité de 1 an à température ambiante.
.tampon AE.
.protéinase K (à maintenir à l'obscurité avec du papier d'aluminium à température ambiante).
- Ethanol absolu (rectopur) spécial PCR, conservé à température ambiante.

V. Contenu

L'extraction est réalisée en pièce N3-226 après avoir revêtu un sarrau.
Travailler avec des gants.

- Après enregistrement de l'analyse (code pcram) :
  - Mettre le bon dans la bannette PCR *Acanthamoeba* (chemise bleue « Prélèvement à extraire ») située dans la pièce de mycologie N3-253.
  - Mettre le prélèvement à -20°C en attendant l'extraction (congélateur n°6 de la pièce des congélateurs N3-215, boite blanche « PCR *Acanthamoeba* » située dans le tiroir du haut).

- Avant de débuter l'extraction :
  - Remplir la feuille de paillasse : attribuer un numéro à chaque patient (P1, P2, P3…), renseigner le nom du patient (ou coller son étiquette) et le type de prélèvement (feuilles de paillasse vierges situées dans la bannette PCR *Acanthamoeba*, chemise transparente).
  - Ouverture et mise en route de la hotte (Cf procédure).
  - Bain marie à 56°C (Multi-bloc heater®, Lab-line ; bloc chauffant correspond à la partie supérieure) : bouton LOW, position ~ 7,8.
  - Bain marie à 95°C (VWR, Digital heatblock□ □).
  - Vérifier la température et ajuster si nécessaire.

- Préparation de l'échantillon :
  - Soit le scalpel se trouve déjà dans le tube dédié à l'extraction.
  - Sinon transférer le scalpel dans le tube dédié à l'extraction.

- Etape 1 : lyse de l'échantillon
- Ajouter 180µL de tampon ATL directement dans le tube contenant le scalpel.
- Ajouter 20µL de protéinase K puis 2µL de carrier poly A.
- Vortexer 15 secondes.
- Incuber à 56°C dans un bain marie sous agitation pendant 10 minutes, centrifuger brièvement puis retirer le scalpel.
- Incuber à 95°C dans un bain marie pendant 10 minutes (étape d'inactivation de la protéinase K), centrifuger brièvement.
- Congeler l'échantillon à -80°C environ 3-4 minutes (congélateur à -80°C de la pièce des congélateurs N 3-215).
- Une fois l'échantillon congelé, étape de décongélation rapide : incuber dans un bain marie à 95°C pendant environ 2-3 minutes.

- Etape 2 : extraction de l'ADN
- Centrifuger le tube brièvement pour récupérer les gouttelettes du capuchon.
- Mettre le bloc chauffant à 70°C (VWR, Digital heatblock□ □).
- Ajouter 200µL de tampon AL dans les tubes contenant l'échantillon, vortexer durant 15 secondes pour obtenir une solution homogène.
- Incuber 10 minutes à 70°C.
- Centrifuger pour récupérer les gouttelettes du capuchon.
- Ajouter 200µL d'éthanol (96 à 100%).
- Vortexer durant 15secondes pour mélanger, puis centrifuger quelques secondes pour récupérer les gouttelettes du capuchon.
- Introduire le contenu du tube dans une colonne QIAmp.

- Fermer la colonne.
- Centrifuger 1 minute à 8000 tours/min (6000g) dans la petite centrifugeuse.
- Jeter le tube collecteur contenant le filtrat, transférer la colonne dans un nouveau tube collecteur.

- Etape 3* : *Lavage de l'ADN
- Ajouter 500µL de tampon AW1 sans mouiller le bord du tube.
- Fermer la colonne.
- Centrifuger 1 minute à 8000 tours/min (6000g).
- Jeter le tube collecteur avec affluent et placer la colonne dans un autre tube.

- Etape 4 :
- Ajouter 500µL de tampon AW2.
- Fermer la colonne.
- Centrifuger 1minute à 8000 tours/min (6000g).
- Jeter le tube collecteur avec affluent et placer la colonne dans un autre tube.
- Centrifuger 1minute à 8000 tours/min (6000g).
- Jeter le tube collecteur et placer la colonne dans un tube Eppendorf (tube final de1.5mL non fourni) : identifier le tube par le nom du patient et mettre la date d'extraction++.

- Etape 5
- Ajouter 50µL de tampon AE.
- Fermer la colonne.
- Incuber 5 minutes à température ambiante.
- Centrifuger 1 minute à 8000 tours/min (6000g).
- **JETER LA COLONNE.** L'ADN extrait se trouve maintenant dans l'éluat.
- Congeler le tube Eppendorf contenant l'ADN extrait à -20°C (dans la boite blanche « ADN extraits, Smart Cycler à faire », située dans le congélateur de la pièce d'extraction N3-226, tiroir n°7) en attendant la PCR.

- A la fin de l'extraction :
  - Nettoyage (avec des lingettes désinfectantes) et fermeture de la hotte ; mettre les UV.
  - Mettre les bons et la feuille de paillasse dans la chemise jaune « ADN extraits, Smart Cycler à faire » située dans la bannette PCR *Acanthamoeba* (pièce de mycologie N3-253).

Annexe 5b : PCR *Acanthamoeba* spp : preparation du MIX et des tubes SmartCycler

I. Objet

Décrire les étapes de préparation du mélange réactionnel (MIX) pour la détection de l'ADN d'*Acanthamoeba* spp par PCR sur automate Smart Cycler® ainsi que les étapes de réalisation de la PCR.

II. Domaine d'application

Cette technique est réalisée sur les prélèvements de grattage de cornée (scalpel) ou de biopsie cornéenne en cas de suspicion de kératite amibienne.
Tout autre type de prélèvement doit avoir fait l'objet d'une discussion préalable avec le biologiste référent.

III. Personnel

Technicien(ne)s.

IV. Matériels et réactifs

- Caisson avec lampe U.V. (pièces N3-228 et N3-226).
- Mini centrifugeuse.
- Bloc réfrigérant porte-tubes (frigo pièce N3-228).
- Bloc froid porte-tubes Smart (Frigo pièce N3-228).
- Tubes Smart Cycler (Cepheid).
- Pipettes 1P10, 1P20, 1P100, 1P200 et 1P1000.
- Cônes à filtre.
- Gants en latex.

❖ **Tris HCl 100mM**
- Peser 1,21g de Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane.
- Ajouter environ 70mL d'eau distillée stérile.
- Ajuster le pH à 9 avec de l'acide chlorhydrique HCl 1M (envrion 1,5mL).
- Compléter avec l'eau stérile pour obtenir un volume final de 100mL.
- Aliquots de 2mL à +4°C (frigo pièce N3-228).

❖ **Amorces Acant-F et Acant-R**
- Solution mère à la concentration de 100µM : Reconstitution des amorces lyophilisées (situées dans le congélateur à -20°C de la pièce de MIX N3-228, tiroir n°3) avec de l'eau PPI en quantité suffisante pour avoir une concentration de 100µM : Qté eau = qté d'amorce par tube en µmol / (100.10^{-6}).
- Répartir la totalité de la solution mère dans des aliquots de 10 µL.
- Conservation à la concentration de 100µM (aliquots de 10 µL) à – 20°C (congélateur de la pièce de MIX N3-228, tiroir n°3).
- Solution de travail à la concentration de 10 µM : Effectuer une dilution au 1/10 de la solution à 100µM (90µL d'eau stérile dans 10µL de solution à 100µM) pour obtenir 100µL de solution fille à 10µM ; mettre une croix sur le tube quand la dilution est effectuée et prête à l'usage.

❖ **Amorces βGlob-F et βGlob-R**
- Solution mère à la concentration de 100µM : Reconstitution des amorces lyophilisées (situées dans le congélateur à -20°C de la pièce de MIX N3-228, tiroir n°3) avec de l'eau PPI en quantité suffisante pour avoir une concentration de 100µM : Qté eau = qté d'amorce par tube en µmol / (100.10^{-6}).

- Répartir la totalité de la solution mère dans des aliquots de 10 µL.
- Conservation à la concentration de 100µM (aliquots de 10µl) à – 20°C (congélateur de la pièce de MIX N3-228, tiroir n°3).
- Solution de travail à la concentration de 10 µM : Effectuer une dilution au 1/10 de la solution à 100µM (90µL d'eau stérile dans 10µL de solution à 100µM) pour obtenir 100µL de solution fille à 10µM ; mettre une croix sur le tube quand la dilution est effectuée et prête à l'usage.

❖ **Sonde Acant-P**

- Solution mère à la concentration de 20µM : Reconstitution de la sonde lyophilisée (située dans le congélateur à -20°C de la pièce de MIX N3-228, tiroir n°3) avec de l'eau PPI en quantité suffisante pour avoir une concentration de 20µM : Qté eau = qté d'amorce par tube en µmol / (20.10^{-6}).
- Répartir la totalité de la solution mère dans des aliquots de 10 µL.
- Conservation à la concentration de 20µM (aliquots de 10µL) à -20°C (congélateur de la pièce de MIX N3-228, tiroir n°3).
- Solution de travail à la concentration de 5µM : Effectuer une dilution au 1/4 de la solution à 20µM (30µL d'eau stérile dans 10µL de solution à 20µM) pour obtenir 40µL de solution à 5µM ; mettre une croix sur le tube quand la dilution est effectuée et prête à l'usage.

❖ **Sonde BetaG-S**

- Solution mère à la concentration de 20µM : Reconstitution de la sonde lyophilisée (située dans le congélateur à -20°C de la pièce de MIX N3-228, tiroir n°3) avec de l'eau PPI en quantité suffisante pour avoir une concentration de 20µM : Qté eau = qté d'amorce par tube en µmol / (20.10^{-6}).
- Répartir la totalité de la solution mère dans des aliquots de 10 µL.
- Conservées à la concentration de 20µM (aliquots de 10µL) à -20°C (congélateur de la pièce de MIX N3-228, tiroir n°3).
- Solution de travail à la concentration de 5µM Effectuer une dilution au 1/4 de la solution à 20µM (30µL d'eau stérile dans 10µL de solution à 20µM) pour obtenir 40µL de solution à 5µM ; mettre une croix sur le tube quand la dilution est effectuée et prête à l'usage.

❖ **Contrôle Acanthamoeba "calibré"**

- Réserve conservée en aliquots de 1mL ou 20µL à -80°C (pièce Biothèque, NB-350 au RCB, congélateur n°9).
- Aliquots en cours conservés à -20°C sous un volume de 20µL (congélateur pièce d'extraction N3-226 tiroir du haut).

❖ **Contrôle Béta-globine**

- Réserve conservée en aliquots de 10µL à -80°C (pièce Biothèque, NB-350 au RCB, congélateur n°9).
- Aliquots en cours conservés à -20°C sous un volume de 10µL (congélateur pièce d'extraction N3-226 tiroir du haut).

V. Contenu

La préparation du Mix est réalisée dans la pièce N3-228 après avoir revêtu un **sarrau** et une **charlotte**. L'ADN est rajouté dans les tubes SMART dans la pièce N3-226.
Travailler avec des gants.

1) Sortir les tubes nécessaires de chaque produit, les mettre dans un bloc réfrigéré.

2) Calculer le nombre de tubes nécessaires :

-3 tubes par patients : passage en duplicat + un tube contrôle d'inhibition de la PCR (P1a, P1b, P1c (correspondant au patient 1+ témoin positif d'*Acanthamoeba*), P2a, P2b, P2c…).

-1 tube contrôle positif.

-1 tube contrôle négatif.

3) Faire le mélange selon les quantités du tableau suivant : Préparation du MIX pour x tubes.

Nb patients	1	2	3	4	5	6	7
Nb éch/tubes	5	8	11	14	17	20	23
Nb Billes	3	4	6	7	9	10	12
Tris HCl 100mM (µL)	15	20	30	35	45	50	60
Eau PPI	36	48	72	84	108	120	144
Sonde Acant-P à 5µM (µL)	9	12	18	21	27	30	36
Amorce Acant-F à 10µM (µL)	6	8	12	14	18	20	24
Amorce Acant-R à 10µM (µL)	6	8	12	14	18	20	24
Sonde BétaG-S à 5 µM (µL)	6	8	12	14	18	20	24
Amorce BétaG-F à 10µM (µL)	6	8	12	14	18	20	24
Amorce BétaG-R à 10µM (µL)	6	8	12	14	18	20	24
Total du Mix (µL)	90	120	180	210	270	300	360

-Mettre dans un tube Eppendorf le nombre de billes nécessaires.

-Ajouter le TrisHCl puis l'eau.

-Vortexer 8 fois par à-coups ; Centrifuger brièvement.

-Vortexer 1 fois brièvement puis centrifuger rapidement les sondes et amorces décongelées.

-Ajouter la sonde Acant-P puis les amorces Acant-F et R, la sonde BétaG-S et les amorces BétaG-F et R.

-Vortexer et centrifuger brièvement.

- Ranger à -20°C les réactifs utilisés pour la préparation du mix.

4) Prendre le bloc froid porte-tubes SMART au frigo et insérer les tubes SMART spéciaux en les prenant par la **partie filtrée en haut ou par le bouchon** (ne pas toucher la partie basse conique du tube qui correspond à la cellule de lecture de la fluorescence+++).

5) Introduire 15µL de mix dans chaque tube SMART en mettant la pipette le plus au fond du tube possible, les fermer jusqu'au **premier cran** et les identifier sur le bouchon (P1a, P1b, P1c, P2a…).

6) Nettoyer la hotte et les pipettes avec du DNA Away - Mettre les UV. Remettre le bloc réfrigéré au frigo.

7) Passer en pièce d'extraction N3-225 pour ajouter les extraits ADN (le sarrau utilisé dans la pièce de mix peut être gardé) – Amener l'eau PPI pour le témoin négatif.

8) Homogénéiser (vortex ou pipettage) les extraits d'ADN décongelés ainsi que les témoins positifs *Acanthamoeba* et Béta-globine.

9) Ajouter :
- 10µL d'extraits d'ADN dans chaque tube correspondant aux patients (3 tubes par patient : Xa, Xb, Xc…).
- Pour le 3ème tube patient, mettre en plus 1µL de témoin positif *Acanthamoeba* (Xc uniquement).
- tube témoin positif : 1µL témoin *Acanthamoeba*, 1µL témoin Béta-globine, 8µL eau ppi (celle utilisée pour le mix).
- tube témoin négatif : 10µL d'eau ppi (la même que celle utilisée pour le mix).

10) Fermer complètement les tubes SMART, jusqu'au dernier cran.

11) Aller dans la pièce où se trouve le Smart Cycler (N3-234).

12) Pour lancer l'expérience de PCR *Acanthamoeba* Spp. : PAM-COP-MOP-026.

Annexe 5C : Utilisation du logiciel du Smart Cycler pour la réalisation de la PCR *Acanthamoeba* spp

I. Objet

Utilisation du logiciel du Smart Cycler dans le cadre de la PCR *Acanthamoeba* spp.

II. Domaine d'application

Diagnostic par PCR en temps réel d'une kératite amibienne.

III. Personnel

Technicien(ne)s.

IV. Matériels et réactifs

- Smart Cycler (pièce N3-234).
- Centrifugeuse Smart Cycler (pièce N3-234).
- Logiciel Smart Cycler.
- Ordinateur.
- Imprimante.

V. Contenu

1) Allumer le Smart Cycler : mettre sous tension les modules A et B (petit bouton derrière l'appareil en haut au milieu) puis l'ordinateur.

2) Placer les tubes dans la centrifugeuse spécifique ; les centrifuger brièvement puis vérifier l'absence de bulles au niveau de la cellule de lecture.

3) Introduire les tubes dans le Smart Cycler en les enfonçant bien : les positionner selon sa liste de travail.

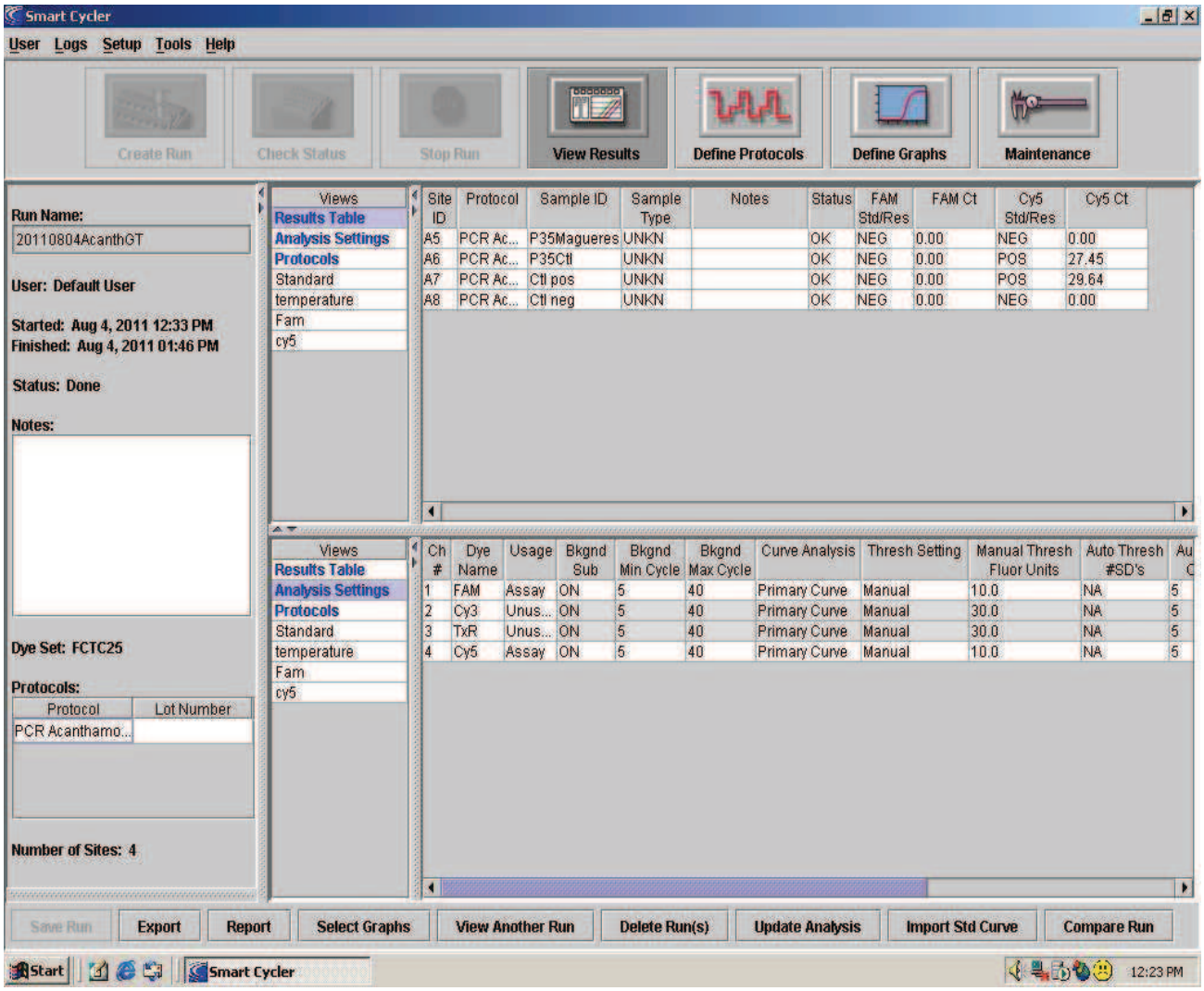
4) Lancer le RUN :

Rq : Possibilité de lancer le RUN même si l'automate SMART est déjà occupé et un RUN déjà en cours+++ ; mettre les tubes dans les puits restant disponibles.
Avant de lancer la PCR, toujours s'assurer d'avoir le nombre de places (puits) nécessaires disponibles dans l'automate SMART.

- Double-cliquer sur l'icône « **smart cycler** » 

.
- Cliquer sur « **Create Run** » et mettre le nom du run dans « **Run Name** » sous la forme : aaaammjjAcantINITIALES.
- Cliquer sur « **Add remove Sites** ».
    - Sélectionner le protocole « PCR Acanthamoeba Tm60 ».
    - Sélectionner les positions des tubes dans la colonne « Site ».
    - Cliquer sur la flèche > puis sur OK.
- Cliquer sur « **Start Run** » = Départ du cycle.
- Dans « **Views** », sélectionner « **Results Table** », entrer dans la case « Sample ID » le numéro du tube attribué au patient : P1a, P1b, P1c (P1c =P1+Témoin positif *Acanthamoeba*)
  P2a, P2b, P2c…
  Ctl pos et neg (Contrôle positif et négatif).
- Toujours dans « **Results Table** », dans « Notes » entrer le nom du patient.
- Dans l'onglet « **Analysis Settings** », dans la colonne « Usage » : choisir « Unused » dans le menu déroulant sur les canaux Cy3 et TxR et dans la colonne « Manual Thresh Fluor Units » mettre le seuil à 10.0 pour les canaux FAM et Cy5.
- Cliquer sur « **Select Graph** » : sélectionner FAM et Cy5, cliquer sur la flèche > puis OK.
- Cliquer sur « **Save Run** ».

Le Run dure environ 1h15.



5) Mettre le bloc froid porte-tubes SMART **vide** sous la hotte de la pièce d'extraction (N3-225) avec les UV le temps du RUN de PCR puis le remettre dans le frigo de la pièce de mix (N3-228).

6) A la fin du Run, lecture des résultats et impression du rapport :

Rq : pour visualiser son Run s'il n'est plus à l'écran, cliquer sur « View Another Run » et le sélectionner.

-Lecture des résultats :

Cliquer sur « **Results Table** ».
Le canal FAM correspond à la Béta-globine ; le canal Cy5 à *Acanthamoeba*.
Les valeurs attendues pour le contrôle positif béta-globine (canal FAM) sont 28±2 et pour le contrôle positif *Acanthamoeba* (canal Cy5) de 30±2.

-Visualisation des courbes : vérifier les courbes une à une et dans les 2 canaux.

Cliquer sur « **Views** ».
Cliquer sur le canal FAM puis Cy5 ou inversement.
Sélectionner les courbes en cliquant dans le tableau à droite de la courbe.

-Impression du rapport :

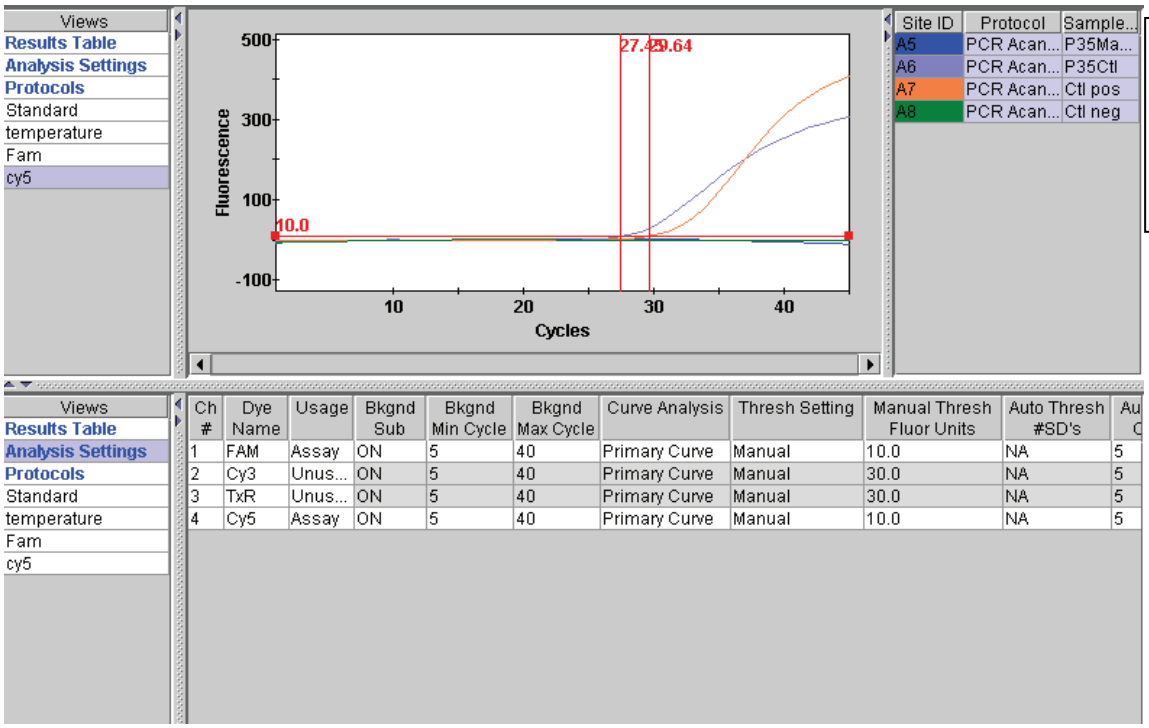
Cliquer sur le canal Cy5 puis sélectionner toutes les courbes et tous les résultats (clic droit sur le tableau à droite de la courbe).

Mettre le curseur sur le graphe puis clic droit, sélectionner « **Print** » puis « **Print graph with results table** ».

Paramétrer l'impression : dans « Properties », cliquer sur le menu « Page layout » en haut puis cocher multi-page et OK (format « paysage ») ; retour à la fenêtre précedante.

Faire OK pour lancer l'impression.

Pour le canal FAM, faire clic droit et sélectionner « **Print** » puis « **Print graph only** » ; ensuite faire pareil que pour le canal Cy5.



Sélectionner toutes les courbes par un clic droit à partir de ce tableau

Ch #	Dye Name	Usage	Bkgnd Sub	Bkgnd Min Cycle	Bkgnd Max Cycle	Curve Analysis	Thresh Setting	Manual Thresh Fluor Units	Auto Thresh #SD's	Au
1	FAM	Assay	ON	5	40	Primary Curve	Manual	10.0	NA	5
2	Cy3	Unus...	ON	5	40	Primary Curve	Manual	30.0	NA	5
3	TxR	Unus...	ON	5	40	Primary Curve	Manual	30.0	NA	5
4	Cy5	Assay	ON	5	40	Primary Curve	Manual	10.0	NA	5

7) Après impression du rapport :

-fermer le logiciel (« user » puis exit), éteindre l'ordinateur.

-Retirer les tubes SMART de l'automate (**sans les ouvrir**) à l'aide du crochet puis éteindre les modules Smart cycler A et B.

-Archiver le rapport dans le classeur « PCR *Acanthamoeba* » situé dans le bureau du biologiste référent.

Annexe 5d : PCR *Acanthamoeba* spp. : interprétations et rendu des résultats

I. Objet

Fournir des règles d'interprétation des résultats de la PCR en temps réel par Smart Cycler pour le diagnostic de la kératite amibienne.

II. Domaine d'application

Rendu des résultats de la PCR en temps réel par Smart Cycler.
Diagnostic par PCR en temps réel d'une kératite amibienne.

III. Personnel

Technicien(ne)s, biologistes.

IV. Matériels et réactifs

- Logiciel Smart Cycler (pièce N3-234).
- Ordinateur.
- Imprimante.

V. Contenu

1) Interprétation des résultats : Interprétation **qualitative**.

-Le logiciel du SMART interprète les résultats en POS (positifs) ou NEG (négatifs : > 45Cp) ; mais il faut toujours s'assurer que le résultat interprété par le logiciel soit concordant avec ce qui est observé sur les courbes d'amplification.

-Pour l'amplification de la séquence *Acanthamoeba* spp : correspond au canal Cy5 :

-Si les 2 capillaires sont positifs => **PCR POSITIVE**.

-Si un seul des 2 capillaires est positif ou incertain => A repasser dans une nouvelle manipulation.

.Si un des capillaires est positif => **PCR POSITIVE**.

.Si tous sont négatifs => **A interpréter en fonction de l'allure de la courbe d'amplification du capillaire positif ou incertain et de la discussion avec le prescripteur.**

-Si les 2 capillaires sont négatifs : regarder l'amplification de la séquence Béta-globine humaine (correspondant au canal FAM) :

.Si les capillaires sont positifs (amplification d'ADN humain) => **PCR NEGATIVE**.

.Si les capillaires sont négatifs => **PCR non contributive** (prélèvement trop pauvre ou dilué).

-Pour l'amplification du contrôle positif (canal Cy5) :

-Si amplification à 30±2 Cp : Absence d'inhibiteur d'amplification.

-Si amplification plus tardive ou absence d'amplification : discuter la présence d'inhibiteurs d'amplification.

2) Marquer les résultats et la conclusion de la PCR sur la feuille de paillasse. Archiver le bon du patient et la feuille de paillasse dans le classeur « PCR *Acanthamoeba* ».

3) Saisir les résultats dans synergie : dans « ERM », sélectionner le dossier du patient.

-Amplification de la séquence *Acanthamoeba* spp (Cy5) : rendre « positive » ou « négative » et mettre le nombre de cycles (si négative rendre 0 Cp).

-Amplification de la séquence Béta-globine humaine (FAM) : rendre « confirmée » ou « non confirmée » et mettre le nombre de cycles (si négative rendre 0 Cp).

-Préciser la présence ou l'absence d'inhibiteur d'amplification.

-Mettre une conclusion :

PCR positive	Présence d'ADN d'*Acanthamoeba* spp ; résultat en faveur d'une kératite amibienne.
PCR négative	PCR d'*Acanthamoeba* spp. négative. Très exceptionnellement, certains génotypes d'*Acanthamoeba* spp. peuvent ne pas être détectés par PCR, la culture reste alors la méthode de référence.
PCR non contributive	Absence d'amplification d'ADN humain. Prélèvement trop pauvre ou dilué. PCR non contributive. Si la suspicion persiste, envisager un nouveau prélèvement.

-Tout résultat positif doit être téléphoné et doit faire l'objet d'une discussion avec le clinicien++.

4) Validation biologique :

-Dans synergie, en « VAL » : Sélectionner Parasito-mycologie dans « Labo » puis appeler le secteur PCR dans « Dept », faire F12 sur l'analyse.
-Signer le compte-rendu de résultat.

Annexe 5e : Annexe : Protocole d'amplification d'ADN *Acanthamoeba* spp.

Nb patients	1	2	3	4	5	6	7
Nb éch	5	8	11	14	17	20	23
Nb Billes	3	4	6	7	9	10	12
Tris HCl 100mM (µL)	15	20	30	35	45	50	60
Eau	36	48	72	84	108	120	144
Sonde Acant-P à 5µM (µL)	9	12	18	21	27	30	36
Amorce Acant-F à 10µM (µL)	6	8	12	14	18	20	24
Amorce Acant-R à 10µM (µL)	6	8	12	14	18	20	24
Sonde BétaG-S à 5 µM (µL)	6	8	12	14	18	20	24
Amorce BétaG-F à 10µM (µL)	6	8	12	14	18	20	24
Amorce BétaG-R à 10µM (µL)	6	8	12	14	18	20	24
ADN (µL)	60	80	120	140	180	200	240
Total (µL)	150	200	300	350	450	500	600

-Protocole SmartCycler.
-Activation Taq polymérase : 2min à 95°C.
-45 cycles d'amplification :
- Dénaturation 15s à 95°C
- Hybridation 30s à 60°C
- Extension 30s à 72°C

-Reconstituer les amorces pour avoir une concentration à 100µmol/L :
Qté eau = qté par tube en µmol / (100.10E-6)
AcantF : Q = 0,1048 / (100.10E-6) = 1 048µL
AcantR : Q = 0.0834 / (100.10E-6) = 834µL
BGlob-F : Q = 0.1055 / (100.10E-6) = 1 055µL
BGlob-R : Q = 0.0882 / (100.10E-6) = 882µL
Effectuer une dilution au 1/10 de la solution à 100 µM (10µL de solution à 100 µM dans 90µL d'eau stérile) pour obtenir 100µL de solution fille à 10µM.

-Reconstituer la sonde pour avoir une concentration à 20 µmol/L :
Qté eau = qté par tube en µmol / (20.10E-6)
AcantP : Q = 0.0038/(20.10E-6) = 190µL
BetaG-S : Q = 0.0023/(20.10E-6) = 115 µL
Effectuer une dilution au 1/4 de la solution à 20µmol/L (10µL de solution à 20µM dans 30µL d'eau stérile) pour obtenir 40µL de solution fille à 5µM.

-Préparation du TRIS HCl 100mM :
Peser 1,21g de Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane.
Ajouter environ 70mL d'eau distillée stérile.
Ajuster le pH à 9 avec de l'acide chlorhydrique (environ 1,5mL de HCl 1M).
Compléter à 100mL avec de l'eau.

Annexe 6

Une PCR Multiplex 'OneStep' pour le diagnostic des kératites amibiennes

M Dubosson[1], D Maubon[1], E Renard[2], MP Brenier-Pinchart[1], M Cornet[1], C Chiquet[2], H Pelloux[1]

1. Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU, BP 217, 38043 Grenoble, France et Université J. Fourier, Grenoble, France
2. Service d'Ophtalmologie, CHU, BP 217, 38043 Grenoble, France

Introduction - Objectifs

Les kératites amibiennes sont des pathologies rares mais en augmentation depuis quelques années.

Les facteurs de risque les plus fréquemment décrits sont l'utilisation de lentilles de contact souillées (non respect des mesures d'hygiène préconisées ou leur port lors d'activités aquatiques) et les traumatismes cornéens. Le diagnostic de cette pathologie est souvent retardé ce qui peut entrainer des conséquences graves sur le pronostic oculaire.

Les amibes libres les plus souvent mises en cause appartiennent au genre *Acanthamoeba*, protozoaire ubiquitaire des eaux et des sols. Ce genre présente une grande variabilité génétique avec actuellement 17 genotypes décrits.

Actuellement, le diagnostic au laboratoire est fait par un examen direct et une mise en culture des prélèvements (grattage de cornée en profondeur) sur gélose non nutritive recouverte d'*Escherichia coli*. Cette technique est peu sensible et longue d'où le développement depuis quelques années de techniques de biologie moléculaire.

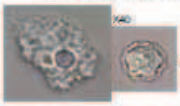
L'objectif de ce travail est l'adaptation d'une PCR en temps réel décrite initialement par Qvarnstrom *et al.* [1] puis reprise par Thompson *et al.* [2].

Nous avons associé à cette PCR la détection d'un gène humain, celui de la béta-globine, en PCR multiplex informant à la fois sur la présence éventuelle d'un inhibiteur et sur la qualité du prélèvement.

Materiel & Méthodes

- Souches
  - Souche ATCC *A. polyphaga*
  - Souche ATCC *A. castellanii*
  - 4 souches isolées au laboratoire à partir de grattage cornéen
- Cellules
  - HFF (Human Foreskin Fibroblast)

- Sondes et amorces
  - *Acanthamoeba* sp. : amorces décrites par Qvarnstrom[1] et sonde LNA décrite par Thompson[2] : amplification de la séquence codant l'ARNr18S détectant la plupart des génotypes impliqués en pathologie oculaire.
  - Béta-globine : amorces : BGlobF (5'TCAGTCTATGGGACGCTTGA3')
    BGlobR (5'AAAAATTGCGGAGAAGAAAAA3')
    sonde : BétaGS (5'[FAM]TCCTGAGACTTCCACACTGATGC[BHQ1] 3')



Culture milieu axénique PYG+/- milieu d'enkystement ou gélose NN recouverte d'*E coli*

Lavage 2 fois en PBS
Comptage en Kovasilide®
Centrifugation
Elimination du surnageant

Prétraitement par protéinase K + choc thermique (-80°C/+95°C)



Extraction selon le protocole tissu Kit QIAamp DNA Mini® (Qiagen)





Mix réalisé à partir des billes Smartmix® lyophilisées
Amplification sur SmartCycler® (Cepheid)

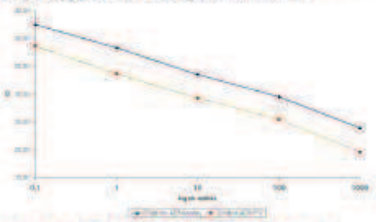
Résultats

- Seuils de détection

(A) Extraction + PCR : Après enkystement (*A. polyphaga*), réalisation d'une suspension à 20 kystes/mL → distribution de 50 µl soit 1 kyste dans une microplaque 96 puits → screening des puits au microscope inversé. Seuls les puits contenant effectivement 1 kyste sont extraits.
→ sur 31 puits contenant un seul kyste, 30 PCR *Acanthamoeba* positive.

➡ **Amplification de la cible à partir de l'extraction d'un kyste isolé dans 97 % des cas**

(B) PCR seule : à partir de dilutions sérielles d'ADN extrait d'une suspension de 1000 kystes ou trophozoïtes



➡ **Détection jusqu'à 0.1 génome (kyste ou trophozoïte)/échantillon**

- Spécificité

Extraction de l'ADN de 12 microorganismes bactériens et fongiques choisis parmi les plus fréquemment isolés dans les kératites infectieuses

	Dosage ADN (ng/µL)	Ct
S. aureus	66.1	>45
S. epidermidis	70.8	>45
P. aeruginosa	107.9	>45
H. influenzae	113.1	>45
S. pneumoniae	57.1	>45
S. marcescens	90.0	>45
Corynebacterium sp.	126.7	>45
P. acnes	8.8	>45
C. albicans	32.8	>45
C. parapsilosis	66.3	>45
A. fumigatus	66.2	>45
Fusarium sp.	66.4	>45

➡ **Absence d'amplification non spécifique en présence de ces microorganismes**

- Répétabilité

Passage 5 fois dans une même expérience de 4 niveaux de concentration de kystes (1, 10, 100 et 1000 kystes/extraits) en présence de 50 cellules

Ech	Moyenne	Ecart-type	CV (%)
1K50C	33.90	0.31	0.90
10K50C	30.78	0.36	1.16
100K50C	27.36	0.17	0.61
1000K50C	24.87	0.93	3.74

- Reproductibilité

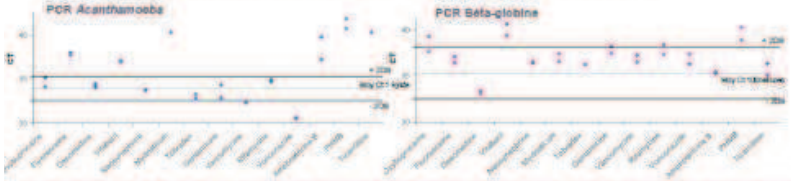
Passage des mêmes extraits dans 10 séries différentes (opérateurs et lots de Smartmix® variables)

Ech	Moyenne	Ecart-type	CV (%)
1K50C	34.04	0.59	1.72
10K50C	30.62	0.18	0.58
100K50C	27.13	0.24	0.89
1000K50C	23.29	0.18	0.78

➡ **Coefficient de variation (CV) des CT < 4%**

- Inhibiteurs potentiels

Extraction de 1 kyste ou 100 cellules en présence de 8µL de l'un des 14 collyres testés



➡ **Absence d'inhibiteur total des PCR mais risque d'inhibiteurs partiels**

→ Lavage abondant préconisé avant prélèvement et précision des collyres sur la demande
→ Utilisation d'un contrôle interne calibré afin de détecter la présence d'inhibiteurs de la PCR *Acanthamoeba* = témoin positif calibré (ADN d'*Acanthamoeba*) ajouté à l'extrait d'ADN de l'échantillon et évaluation de la variation des CT en présence de l'ADN du patient (si CT (échantillon + CI) > CT (CI seul) +3 = Présence d'inhibiteurs dans échantillon)

Conclusions - Perspectives

- PCR Multiplex "Onestep" permettant de détecter à la fois : - la cible *Acanthamoeba* sp
  - le gène de la béta-globine : informe sur la qualité du prélèvement
  - la présence éventuelle d'inhibiteurs de PCR dans le prélèvement
- Les coefficients de variation de la répétabilité et de la reproductibilité sont inférieurs à 4%
- Les seuils de détection sont de 1 kyste/échantillon extrait et de 0.1 génome en dilution d'ADN
- Perspective (en cours) : évaluation sur une série prospective de patients

(1) Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of Acanthamoeba spp., Balamuthia mandrillaris, and Naegleria fowleri. Qvarnstrom Y, Visvesvara GS, Sriram R, da Silva AJ. J Clin Microbiol. 2006 Oct;44(10):3589-95.
(2) Validation of real-time PCR for laboratory diagnosis of Acanthamoeba keratitis. Thompson PP, Kowalski RP, Shanks RM, Gordon YJ. J Clin Microbiol. 2008 Oct;46(10):3232-4.

Annexe 7

A one-step multiplex PCR for improved diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis

Danièle Maubon [1,2,*], Muriel Dubosson [1,*], Christophe Chiquet [2,3], Hélène Yera [4], Marie-Pierre Brenier-Pinchart [1,2], Muriel Cornet [1,2], Olivier Savy [5], Elisabeth Renard [3], Hervé Pelloux [1,2]

[1] Parasitology-Mycology Laboratory, Infectious Agents Department, Grenoble Teaching Hospital, F-38043 Grenoble, France

[2] Joseph Fourier University - Grenoble 1, F-38041 Grenoble, France

[3] Department of Ophthalmology, Grenoble Teaching Hospital, F-38043 Grenoble, France

[4] Parasitology-Mycology Laboratory, Cochin Hospital, AP-HP, Paris Descartes University, 75014 Paris, France

[5] Department of Ophthalmology, Hospital of Chambery, France.

Corresponding author: Danièle Maubon: Parasitology-Mycology Laboratory, Infectious Agents Department, Grenoble Teaching Hospital, F-38043 Grenoble. Phone: 33 4 76 76 54 90. Fax: 33 4 76 76 56 60. E-mail: DMaubon@chu-grenoble.fr.

* Danièle Maubon and Muriel Dubosson contributed equally to this work

Manuscript word count: 3350

Abstract (229 words)

Purpose. As the number of cases of *Acanthamoeba spp*. keratitis (AK) is constantly growing, new diagnostic tools are needed to confirm and guide ophthalmologists in this clinically problematic diagnosis. Molecular diagnosis is particularly well adapted, although only a few real-time PCR techniques have been described recently. The aim of this study was to develop a new PCR technique for the diagnosis of AK by combining the detection of *Acanthamoeba* DNA with human DNA, thus allowing an accurate interpretation of the PCR result.

Methods. Different DNA extraction procedures were compared to ensure an optimized amplification of one *Acanthamoeba* genome. The analytical parameters of this new multiplex *Acanthamoeba* beta-globin PCR (MAB-PCR) were evaluated. Fourteen eye drops were tested as potential PCR inhibitors. A prospective series of 30 corneal scrapings was subjected to MAB-PCR.

Results. The best extraction procedure associated thermal-shock pretreatment followed by a manual extraction procedure. The MAB-PCR parameters displayed excellent specificity and sensitivity, with a detection of 0.02 genome of *Acanthamoeba*. No eye drops were total PCR inhibitors. Out of 30 corneal scrapings, 20 were considered true negatives. Seven could not be interpreted because of insufficient scraping material. Three were considered true positives: every patient progressed favorably on specific and reliable treatment.

Conclusion. The MAB-PCR is an efficient and reliable tool to diagnose AK. It allows rapid diagnosis and prompt treatment of this probably underestimated etiology of infectious keratitis.

Among the etiological agents responsible for infectious keratitis, the free-living ameba of the *Acanthamoeba* spp. appears to be an emerging pathogen because of its frequent association with contact lens wear.[1-4] AK is a serious sight-threatening disease.[2] Differential diagnoses are herpes keratitis in its early aspect or fungal keratitis in its later aspect. With prognosis directly related to time to diagnosis[5, 6] and complex clinical diagnosis, rapid and specific biological diagnosis is needed.

The most commonly used diagnostic procedure is based on the association of a microscopic examination of the corneal scraping and a culture procedure. This strategy is far from being adapted to the urgency of the situation because the complete procedure requires 21 days of culture and presents a very low overall sensitivity (50% misdiagnosed cases).[7] This lack of sensitivity may stem from the culture procedure, but also the difficulty of obtaining sufficient corneal scraping material. Over the past 10 years, new diagnostic strategies have been developed for AK. Molecular biology and more precisely polymerase chain reaction (PCR) procedures amplifying *Acanthamoeba* DNA have been developed to improve AK management, but the number of these PCR procedures remains quite low.[8-12] PCR procedures have proved their efficiency in diagnosing AK, with a real benefit for patient care. However, the sensitivity in diagnosing AK with a molecular diagnostic procedure can still be unsatisfactory because of insufficient DNA material on the corneal scraping and the resistance of the cystic form to conventional DNA extraction methods.[13]

With this in mind, we multiplexed the amplification of the ARNr18S gene of *Acanthamoeba* spp. with the human beta-globin gene. The objective of this new tool was to inform clinicians on the presence of *Acanthamoeba* DNA, but also on the quality of the corneal scraping and any presence of PCR inhibitors. Different pretreatment and extraction procedures were also compared to optimize the extraction of *Acanthamoeba* cysts. MAB-PCR was tested prospectively on a series of patients with suspected AK. This study aimed to

confirm that PCR diagnosis is highly advantageous for AK diagnosis, but it also intended to contribute supplemental information on the quality of the scraping to ensure optimal use and interpretation of the PCR diagnosis in this particular context.

MATERIALS AND METHODS

Acanthamoeba strains and human cells

Table 1 describes the different *Acanthamoeba* strains tested in this study. *Acanthamoeba polyphaga* reference strain[14] was used for the DNA extraction optimization step and the validation of the PCR assay. Clinical in house isolates 1, 2, 3, and 4 from different genotype, were tested subsequently in the same manner. All strains were maintained in their vegetative form in a culture flask at 27°C in PYG media, as previously described.[15] The vegetative form was converted to the cystic form as described before.[10] All strains were genotyped analysing the ASA.S1 region of the *Acanthamoeba* ARN18 S gene.[16] Cysts or vegetative forms were numbered in a cell-counting chamber, but for isolation of only one cyst, 50 µL of a solution of 20 cysts/mL was dispensed in a 96-well plate and screened under an inverted microscope for wells containing one cyst.

Human cells were obtained from human foreskin fibroblast (HFF) monolayer culture. Individualized HFF cells were suspended after trypsinization of the monolayer and the cells were counted with a cell-counting chamber.

TABLE 1 : Genotype study of the different *Acanthamoeba* spp. isolates of the study.

Name	Genotypes
Reference strain *A. polyphaga*	T4
Culture of in house isolate 1	T3
Culture of in house isolate 2	T6
Culture of in house isolate 3	T4
Culture of in house isolate 4	T4

Sample pretreatment and DNA extraction procedure

Samples must be pretreated to ensure lysis of the cyst cell wall. Procedures are mostly based either on chemical lysis[17] or mechanical lysis based on the thermal-shock procedure.[9, 13, 18] These two procedures were compared. *Amoeba* cysts or trophozoites were suspended in 100µl of PBS, 100 µL of the detergent solution (TrisHCl 20mM and SDS 0.5%), and 10 µL of proteinase K (20 min at 56°C then 10 min at 95°C), or in 180 µL of ATL solution (Qiagen) added to 20 µL of proteinase K, incubated for 10 min at 56°C, then thermally shocked (10 min at 95°C, 3 min at −80°C, 1 min 95°C) and extracted.

Two different extraction procedures were also tested: one based on a manual procedure (Qiagen QIAamp DNA Mini kit) and another using automatic extraction (BioRobot EZ1 Workstation, with EZ1 DNA Tissue card, Qiagen). DNA was eluted in 50µL of elution buffer AE (Qiagen). PCR was performed on 12 samples containing 1 cyst submitted to each different pre-treatment, on 20 samples containing one, two, or three cysts, and 12 samples containing one, two, or three vegetative forms of *A. polyphaga*, all thermally shocked but extracted with two different procedures.

Primers and probes, PCR procedure

Table 2 describes the sequence of all primers used in the multiplex PCR assay. Primers and the hydrolysis probe (AcantF, AcantR, AcantP) were those described previously: these primers were proved to amplify the majority of *Acanthamoeba* sp. genotype involved in AK.[9, 12] A systematic BLAST was done on the 17 different genotype sequences and showed that primers and probe present 100% homology with 14 of the 17 genotypes, including all the genotypes commonly involved in eye pathologies (i.e., T4, T3, T6, and T11) (see Supplementary material).

The primers and a hydrolysis probe to amplify human DNA were designed using Primer3 Software [19] to amplify a region of the human beta-globin gene.

The PCR mix was composed of SmartMix® HM reagent (Cepheid), 10 mM of TrisHCl, 0.3 µM of AcantP, 0.2 µM of βGlob probe, and 0.4 µM of each primer and 10 µL of the DNA sample in each PCR tube. The final volume was 25 µL for one reaction. PCR amplification procedure was carried out on a SmartCycler Robot (Cepheid) and the cycling protocol was adapted to fit with both *Acanthamoeba* and beta-globin sequence amplification: 2 min at 95°C (hot-start, one cycle), followed by 45 cycles at 95°C for 15 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 30 s.

Positive control DNA for *Acanthamoeba* was obtained from 2.10^6 cysts of *A. polyphaga*-encysted culture by using the optimal pre-treatment and extraction procedure and serially diluted. The positive control for beta-globin was obtained from a suspension of 10^6 HFF cells using the same procedure.

TABLE 2. Primers and probes of the MAB-PCR

Genes	Names	Sequences 5′-3′
Acanthamoeba spp. rDNA (18S)	Primer Acant-F	CCCAGATCGTTTACCGTGAA
	Primer Acant-R	TAAATATTAATGCCCCCAACTATCC
	Probe Acant-P	[Cy5]TG[+C]CA[+C]CGAA[+T]A[BHQ2]
Human beta-globin	Primer βGlob-F	TGAGTCTATGGGACGCTTGA
	Primer βGlob-R	AAAAATTGCGGAGAAGAAAAA
	Probe βGlob -P	[FAM]TCCTGAGACTTCCACACTGATGC[BHQ1]

Validity of the PCR protocol

The validity of the MAB-PCR was assessed according to the minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. [20]

The analytical sensitivity and the limit of detection (LOD) were first determined by the number of the *Acanthamoeba* genomes detected with the overall experimental assay (including sample pretreatment and DNA extraction). As the corneal scraping can be very poor in pathogenic material, we aimed to ensure effective amplification of at least one genome of *Acanthamoeba*. We therefore isolated one cyst of *A. polyphaga* (see above-described procedure), which underwent the entire PCR assay (optimal pre-treatment and

extraction procedure followed by PCR amplification). A total of 31 isolated cysts were extracted and amplified in eight different experiments.

The linear dynamic range was evaluated over a 5 $\log_{10}$ concentration on a serial dilution from 1000 to 0.1 genomes of *A. polyphaga*, corresponding to 200 to 0.02 genome/PCR reaction tube.

To assess the analytical specificity *in vitro*, ensuring that the MAB-PCR procedure detects no unspecific targets, PCR was evaluated on different microbial pathogens that are commonly isolated in the context of infectious keratitis, i.e., for bacteria: *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Pseudomonas aeruginosa, Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Serratia marcescens, Corynebacterium* sp., *and Propionibacterium acnes*; for fungi: *Candida albicans, Candida parapsilosis, Aspergillus fumigatus*, and *Fusarium* sp. Monomorphic culture of each of these microorganisms was extracted with the manual DNA extraction kit (Qiagen QIAamp DNA Mini kit) . To ensure that a sufficient amount of DNA was extracted, DNA was quantified by spectrophotometry (NanoDrop, 2000C Thermo Scientific) and MAB-PCR was completed.

The intra-assay and inter-assay variances were completed on four different DNA concentrations obtained after extraction of 1, 10, 100, and 1000 cysts associated with 50 human cells.

Search for potential PCR inhibitors

Previous studies have shown that some eye drop solutions can interfere with the PCR procedure.[9, 21] Fourteen of the eye drops most commonly used were tested as potential inhibitors of the MAB-PCR. Considering that most of the DNA extraction kits are assumed to remove the majority of inhibitors, we chose to evaluate this inhibitor effect on samples that had gone through the whole extraction procedure (as would a real corneal scraping sample). We estimated that no more than the equivalent of 8 µL of eye drop solution could be found in

a corneal scraping. Thus, 8 µL of each tested solution was added to a PBS solution containing one isolated cyst of *A. polyphaga* and 100 human cells, and the extracted DNA sample was tested for MAB-PCR. The cycle quantification (Cq) for each sample was compared to the mean Cq of the control (either one cyst or 100 human cells). A solution was considered a total PCR inhibitor when no amplification was obtained or a partial inhibitor when the Cq was higher than the control Cq + 2 SD. All samples were tested in duplicate.

Corneal scraping samples

To test the diagnostic sensitivity of the MAB-PCR, corneal scraping samples, collected with sterile scalpel, that were usually dedicated for conventional AK diagnostic were used. When two scrapings were received, one was dedicated to the PCR and the other to conventional culture (non-nutrient agar plates overlain with a fresh suspension of *Escherichia coli* (ATCC 25922) and incubated at 30°C for up to 21 days). The pretreatment chosen was applied directly to the scalpel within the collection tube. When only one scraping was received, samples were suspended in two drops of DNA-free distilled water and split in two so that the MAB-PCR could be done. As the yield of extracted DNA was theoretically low, a DNA carrier (Poly(A), Roche Applied Science) was systematically added to the sample before using the optimal extraction procedure. Each corneal scrapping extracted DNA was tested in triplicate: a duplicate containing the sample DNA and a third tube containing sample DNA added with 1 µl of the positive *Acanthamoeba* sample as internal control for inhibitors detection.

Statistical analysis was done using Statview 5.0 software (SAS Institute, Cary, NC). Because of the small sampling size, we used non parametric tests, the Fisher exact test or the Mann-Whitney test U. *P*-values under 0.05 were considered statistically significant.

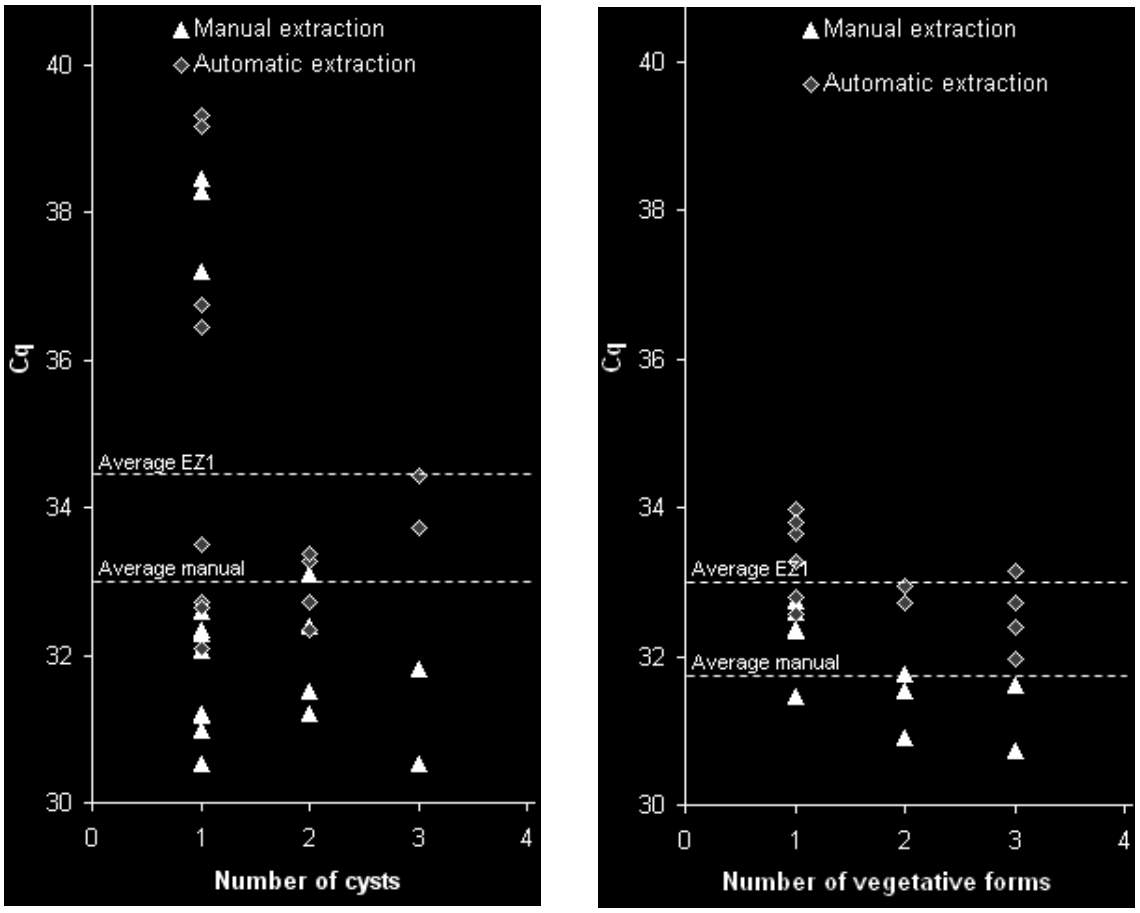
RESULTS

Sample pre-treatment and DNA extraction procedure

A positive PCR result was obtained in three of 12 (25%; mean Cq, 37.89±5.34) samples prepared with the chemical lysis solution and in six of 12 (50%; mean Cq, 35.09±2.06) samples prepared with the thermal-shock procedure. These results prompted us to choose the thermal-shock procedure as pretreatment (p=0.4, Fisher exact test).

The mean Cqs obtained after thermal choc procedure, with the manual extraction procedure and the automatic method were compared. Figure 1 shows that the mean Cq with the manual method was significantly lower than the mean Cq obtained after automatic extraction (p=0.006 and 0.0003, respectively, for cysts and vegetative forms, using the Mann-Whitney test). In the end, the best extraction procedure for *Acanthamoeba* spp. was the thermal-shock pretreatment followed by the manual DNA extraction procedure (Qiagen) ; this specific protocol was used to conduct all subsequent experiments.

FIGURE 1. Cq values with different concentrations of ameba and different extraction methods. For cysts: mean Cq for the manual method: 33.02 (±3.06) and for EZ1 automatic method: 34.46 (±2.14). For vegetative forms: mean Cq for manual method: 31.77 (±0.63) and mean Cq for EZ1 method: 32.99 (±0.6).



Validity of the PCR protocol

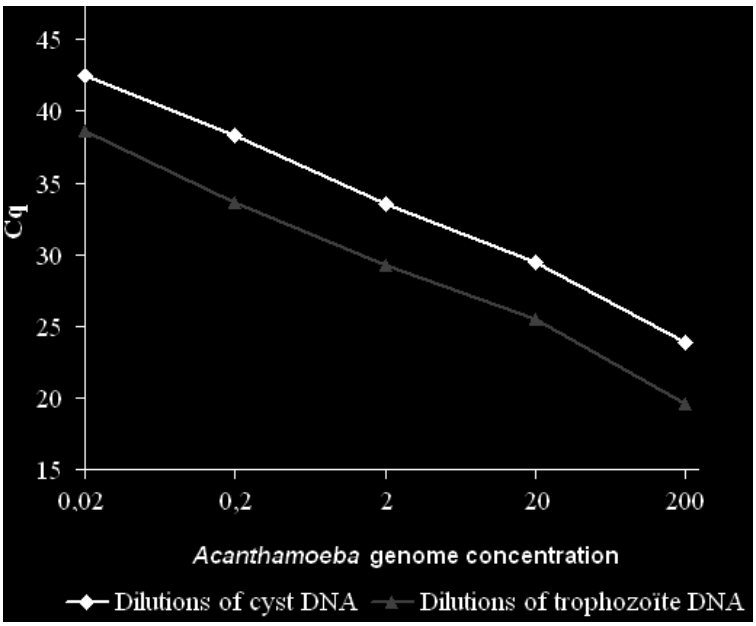
Analytical sensitivity and LOD: Of the 31 extracted samples containing one cyst, 30 samples showed a positive result with the MAB-PCR assay (mean Cq, 33.48±2.36). The analytical sensitivity of the entire PCR assay (including pretreatment and extraction) was evaluated at 97% for one cyst. The acceptable LOD of the entire assay was at least one cyst.

The *linear dynamic range* was evaluated on a serial dilution of *Acanthamoeba* DNA, extracted from a suspension containing 1000 cysts or vegetative forms of *A. polyphaga.* Figure 2A shows the linear dynamic range over a 5 $\log_{10}$ concentration of the *A. polyphaga* genome (from 200 to 0.02 genome). The correlation coefficients (r^2) were 0.99 (cysts) and 0.98 (vegetative forms).

Analytical specificity: Table 2B shows that none of the tested pathogens' DNA interfered with the MAB-PCR, confirming the good specificity of the MAB-PCR.

Table 2C shows the low rate of the *intra-assay variance and inter-assay variance*. The variation coefficient of Cq ranged from 0.61% to 3.74% for intra-assay variance and from 0.58% to 1.72% for inter-assay variance. Special attention was paid to the fact that for all amounts of human DNA, amplification of one *Acanthamoeba* genome displayed a lower Cq than the beta-globin PCR (data not shown). Clinical in house isolates (genotype T4, T3 and T6) were tested: the optimized procedure of the MAB-PCR allowed a correct amplification of each strain.

PANEL FIGURE 2. Parameters for the validation of the MAB-PCR assay
2A: Linear dynamic range (target *Acanthamoeba* spp.)



2B: Specificity of the MAB-PCR

	DNA Concentrations (ng/µL)	Cq
S. aureus	66,1	>45
S. epidermidis	78,8	>45
P. aeruginosa	107,9	>45
H. influenzae	113,1	>45
S. pneumoniae	57,1	>45
S. marcescens	93,8	>45
Corynebacterium sp	126,7	>45
P. acnes	8,3	>45
C. albicans	32,4	>45
C. parapsilosis	55,3	>45
A. fumigatus	55,2	>45
Fusarium sp	66,4	>45

2C: Evaluation of the intra-assay variance and inter-assay variance of *Acanthamoeba* amplification in the MAB-PCR

	Intra-assay variance			Inter-assay variance		
	n	Mean Cq (± SD)	CV (%)	n	Mean Cq (± SD)	CV (%)
1 Cyst + 50 human cells	5	33.8 (± 0.31)	0.90	10	34.04 (± 0.59)	1.72
10 Cysts + 50 human cells	5	30.78 (± 0.36)	1.16	10	30.52 (± 0.18)	0.58
100 Cysts + 50 human cells	5	27.36 (± 0.17)	0.61	10	27.13 (± 0.24)	0.89
1000 Cysts + 50 human cells	5	24.87 (± 0.93)	3.74	10	23.29 (± 0.18)	0.78

n: number of repetitions; SD: standard deviation; Cq: quantification cycle; CV: coefficient of variation

Search for potential PCR inhibitors

Figure 3 shows the Cq obtained with the MAB-PCR for one cyst (Fig. 3A) or 100 HFF cells (Fig. 3B) added to 8 µL of different topical eye drops. *Acanthamoeba* PCR and *beta-globin* PCR were all positive: no solution completely inhibited the PCR reaction. Still, for the *Acanthamoeba* PCR reaction, the eye drops considered partial inhibitors (Cq > mean Cq + 2 SD) were: fluorescein, picloxydine, tropicamide, amphotericin B, PHMB, and ticarcillin. For the beta-globin PCR reaction, picloxydine and PHMB were considered partial inhibitors.

PANEL FIGURE 3. Search for PCR inhibitors: Cq for one cyst (A) or 100 HFF cells (B) with different topical eye drops (duplicates). Partial inhibition was considered when Cq with the topical drops was greater than the mean Cq + 2 SD.

Fig. 3A

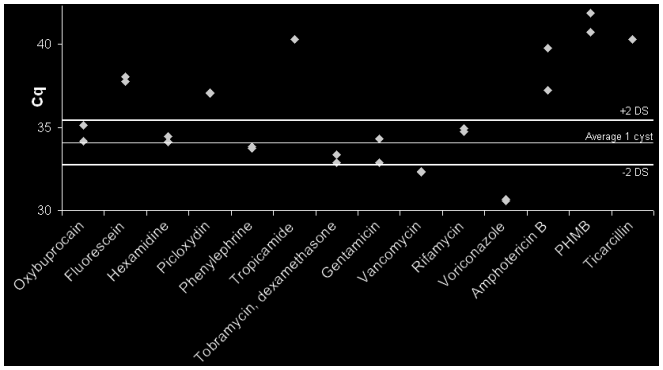
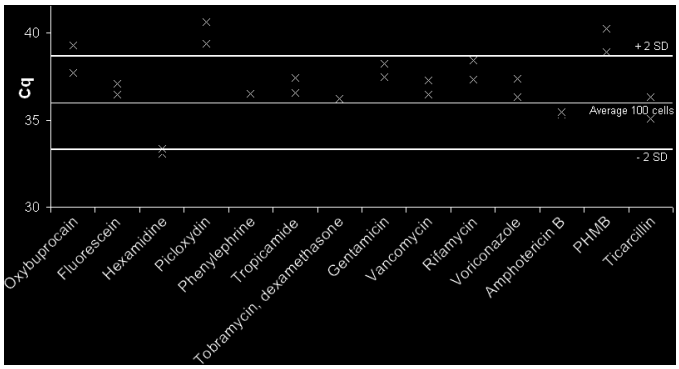


Fig. 3B



Corneal scraping samples

Thirty corneal scraping samples were tested with the MAB-PCR. Table 3 details the results and interpretation of MAB-PCR, the direct exam and the culture for amoeba, available microbiological results, and clinical characteristics. Twenty-three samples showed a positive result for the beta-globin target, confirming the presence of scraping material on the scalpel. Seven samples failed to amplify the beta-globin sequence, suggesting that the amount of DNA material was too low to detect the *Acanthamoeba* target. None of the samples tested contained potential inhibitor. On the 23 interpretable results, 20 samples showed a negative result for the *Acanthamoeba* target and three samples showed a positive result for the *Acanthamoeba* target.

Corneal scrapping 4 and 23 were genotyped as T4. DNA extraction volume of the corneal scrapping 7 appeared to be insufficient to allow genotyping.

These three patients wore contact lenses. Two patients had a corneal abscess (< 1 mm) and were given hexamidine treatment. Favourable evolution with no loss of visual acuity was noticed after one month. One patient presented pseudo-dendritic keratitis: initial loss of visual acuity was reduced under hexamidine treatment (still ongoing).

TABLE 3. Results and interpretation of MAB-PCR, the direct exam, and culture for free-living ameba and other microbiological results available, and the patients' clinical characteristics.

***Acanthamoeba* spp.**							**Microbiology**	**Patient characteristics**			
MAB-PCR					MGG	Cult		Clinical aspect	Contact lens	Outcome	Final diagnosis
	Cq Aca	Cq BG	AI	Conclusion*							
1	>45	35.4	AAI	N	ND	ND	*S. epidermidis*	Corneal central micro-abscess	Yes	LF	*S. epidermidis* corneal abscess
2	>45	28	AAI	N	N	N	SC	Corneal abscess	No	Amniotic membrane graft	Undetermined etiology
3	>45	32.6	AAI	N	N	N	*S. maltophilia* *B. cereus*	Eye pain, visual loss, abscess.	Yes	Favorable	Bacterial corneal abscess
4	**30.4**	**37.6**	**AAI**	**P**	**N**	**N**	**SC**	**Eye pain, corneal abscess , visual loss**	**Yes**	**Favorable under hexamidine , in particular**	***Acanthamoeba* keratitis**
5	>45	28.8	AAI	N	N	N	*P. aeruginosa* *S. aureus*	Conjunctivitis, superficial punctuate keratitis	No	Favorable	*P. aeruginosa* conjunctivitis
6	>45	>45	AAI	NC			SC	Keratitis on facial paralysis	No	Treatment of facial paralysis	Iterative keratitis on facial paralysis
7	**38.5**	**39**	**AAI**	**P**	**N**	**N**	**SC**	**Eye pain, bilateral corneal abcess**	**Yes**	**Favorable under hexamidine, in particular**	***Acanthamoeba* keratitis**
8	>45	34.7	AAI	N	N	N	*P. aeruginosa*	Deep corneal abscess, hypopion	Yes	Favorable	P. aeruginosa corneal abscess
9	>45	33	AAI	N	N	N	SC	Corneal abscess, hypopion	No	Amniotic membrane graft	Undetermined etiology
10	>45	42	AAI	N	N	N	*S. pneumoniae*	Suspicion of ocular prosthesis infection	No	LF	Suspicion of prosthetic lens infection
11	>45	37.6	AAI	N	N	N	SC	Eye pain, corneal abscess, hypopion	No	Favorable	Undetermined etiology
12	>45	28.5	AAI	N	N	N	*Moraxella spp.*	Eye pain, corneal abscess, hypopion	No	Amniotic membrane graft	*Moraxella* sp. corneal abscess
13	>45	44.8	AAI	NC	N	N	SC	Eye pain, micro-abscess, superficial punctuate keratitis	Yes	Favorable (ciprofloxacine +tobramycine - dexamethasone hexamidine)	Undetermined etiology
14	>45	>45	AAI	NC	N	N	*HSV* + (PCR)	Ulceration and corneal abscess	No	Amniotic membrane graft	Herpes simplex keratitis
15	>45	25.4	AAI	N	N	ND	SC	Abscess, hypopion, corneal perforation	No	Unfavorable, evisceration	Severe abscess on trichiasis
16	>45	42.5	AAI	N	ND	ND	SC	Red eye, small corneal abscess	Yes	Favorable	Undetermined etiology
17	>45	32.2	AAI	N	N	N	*S. aureus*	Eye pain, corneal abscess, hypopion	No	Incomplete recovery of vision acuity	*S. aureus* endophtalmy
18	>45	35	AAI	N	ND	ND	SC	Superficial punctuate keratitis with central abscess	No	Amniotic membrane graft	Severe corneal abscess following cataract surgery
19	>45	41	AAI	N	ND	ND	SC	Eye pain, stromal opacity, keratoconus	Yes	LF	NFI
20	>45	>45	AAI	NC	ND	N	ND	Corneal bubble	No	Favorable (picloxidin)	Undetermined etiology
21	>45	39	AAI	N	N	N	SC	Post-traumatic eye pain with stromal infiltrate	NFI	Favorable (ciprofloxacine +tobramycine - dexamethasone)	Marginal keratitis: undertemined etiology
22	>45	>45	AAI	NC	N	N	ND	Central corneal abscess	Yes	Favorable (ciprofloxacine +tobramycine - dexamethasone hexamidine+ valacyclovir)	Superficial punctuate keratitis, undetermined etiology
23	**29.9**	**30.1**	**AAI**	**P**	**N**	**N**	**SC**	**Ulcerative keratitis stromal infiltrate**	**Yes**	**Favorable under hexamidine, in particular**	***Acanthamoeba* keratitis**
24	>45	36.7	AAI	N	N	N	SC	LF	LF	LF	LF
25	>45	>45	AAI	NC	ND	ND	SC	Central corneal abscess, stromal infilttrate	Yes	LF	Undetermined etiology
26	>45	28.3	AAI	N	N	N	*HSV* + (PCR)	Red eye, dendritic keratitis	Yes	Favorable	Dentritic keratitis (HSV ?)
27	>45	40	AAI	N	ND	ND	ND	Pseudo-dendritical keratitis	No	LF	Undetermined etiology
28	>45	26.3	AAI	N	N	N	*P. aeruginosa* *Klebsiella sp.*	Eye pain, hypopion, visual loss	Yes	Favorable (ciprofloxacine +tobramycine+ ticarcilline + gentamicine +vancomycine +hexamedine)	*P. aeruginosa* and *Klebsiella sp.* severe corneal abscess
29	>45	38.7	AAI	N	ND	ND	SC	LF	LF	LF	LF
30	>45	>45	AAI	NC	ND	ND	SC	Epithelial bubble with infiltrates	No	Favorable (ciprofloxacine +tobramycine - dexamethasone hexamidine)	Undetermined etiology

*MAB-PCR interpretation: N, negative: Absence of Acanthamoeba spp. DNA, presence of scraping specimen, no amplification inhibitors; P, positive: Presence of Acanthamoeba spp. DNA in corneal scraping. Result in favor of Acanthamoeba keratitis; NC, not contributive: absence of human DNA amplification: lack of scraping material, absence of inhibitors. A new sampling is required; AAI, absence of amplification inhibitors; Cq, Quantitative cycle; MGG, May-Grunwald-Giemsa staining; HSV, herpes simplex virus. SC: Sterile Culture; LF: Patient lost to follow up.

DISCUSSION

The risk factors for AK have been partially identified and are mostly related to contact lens wear.[22] In our patient series, all patients diagnosed with AK were contact lens users. Nevertheless, recent outbreaks of AK have been described after the contamination of multipurpose contact lens solutions.[4] In France, this risk factor has not been described, but can also be a potential source of contamination. Although AK is still rare, the growing tendency of this highly morbid infection will certainly be a public health concern in the near future. Rapid and reliable diagnosis of AK is needed for both patients and surveillance of risk factors. The aim of this study was to improve the molecular diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. We confirm the effective detection of *Acanthamoeba* DNA using previously described primers and probes[9] but adapted the PCR protocol to allow a concomitant amplification of human DNA, thus informing clinicians about the scraping quality. This improved tool highly limits the risk of false-negative diagnoses, which misleads ophthalmologists and contributes to inaccurate management of the infection.

The DNA extraction step was optimized to ensure systematic amplification of the lowest concentration of *Acanthamoeba* sp that can be found in a sample, i.e., a single isolated cyst. In our hands, the extraction procedure combining thermal-shock pretreatment with a manual DNA extraction procedure appeared significantly superior to chemical lysis procedures and the EZ1-Biorobot automated extraction protocol. Our whole assay (combined pre-treatment, extraction and PCR) allowed us to amplify 30 of 31 (97%) isolated cysts (0.2 cyst/PCR tube). This extraction procedure seams to be even more efficient than the ProtK-MagnaPure protocol which allowed a DNA amplification in 33% of cases for 0.15 cyst/tube (same genotype)[13] confirming that combination of extraction procedure and amplification protocol is crucial for PCR assay efficiency. In another study, Thompson *et al*. showed that a number of eye drops could inhibit their PCR reaction.[9] The present result also indicated the

potential inhibiting power of PHMB, but at a high concentration, which is probably never reached in an actual scraping sample. In this study, eye drops did not appear to be a real problem for the amplification of the two targets. This discrepancy is probably due to the different extraction procedures and internal controls (*Acanthamoeba* cysts *vs* target DNA). Nevertheless, caution should be exercised and gentle but abundant washing of the cornea is warranted before sampling, especially if ophthalmologists use fluorescein for clinical diagnosis, because fluorescence can interfere with the acquisition system of real-time PCR assays.

In the PCR design used herein, the already described *Acanthamoeba* target[9] was associated with the detection of the *betaglobin* human gene. The concomitant amplification of this sequence guarantees the presence of scraping material. Testing a prospective series of patients with infectious keratitis, this study showed that seven samples (23%) were not amplified for human DNA, and it was impossible to confirm that the absence of the *Acanthamoeba* amplification was not the consequence of insufficient scraping material. If AK suspicion is high, a new sampling is requested. These results highlight the importance of high-quality sampling to allow PCR interpretation.

MAB-PCR performance was evaluated and it was demonstrated that the procedure displayed high sensitivity, specificity, efficacy, repeatability, and reproducibility. Finally, in a one-step procedure (the same PCR mix), reliable results were produced on the presence or the absence of *Acanthamoeba* DNA, as well as on the quality of the scraping and the presence of inhibitors. The entire procedure, including extraction and amplification, requires 3.5 h, thus allowing clinicians to adapt their treatment very rapidly with a potential positive effect on the final prognosis. [23]

Because the *Acanthamoeba* genome is highly variable, the ability of the PCR procedure to detect a broad range of genotypes potentially implicated in AK is a concern. The

recently described f-d-real-t PCR has been shown to detect a wide range of either the ATCC strain of the *Acanthamoeba* genotype.[11] Here, the primers and probes chosen also tested positively on almost all genotypes implicated in AK mainly T4, T3, T6, T11 and to a much lesser extent T7, T10, T1, and T14.[9, 12, 24] One strain belonging to genotype T5 was not amplified with these primer sets.[11] Hence, BLAST on other strains belonging to the T5 genotype showed perfect hybridization with the Acant primers and probe sequences (Supplementary material). The variability of the genome structure makes it difficult to test all the species and genotypes of *Acanthamoeba*. There is until 5% sequence difference between isolates of a same genotype.[25] In addition, knowing that one species can belong to different genotypes, no conclusion can be drawn on one isolated strain. Moreover, comparative studies on efficiency of different real-time PCR assay on real sampling can be contradictory maybe due to the use of different extraction methods.[9, 26] Since, to date, all accessible data reported that the Acant sequences could be adapted to diagnose AK. Combination of several primers sets can also be considered to increase the sensitivity of AK diagnostic.[8]

Most of the already-described PCR assay show good sensitivity and specificity for AK diagnosis, but none of them aim to evaluate sample quality concomitantly, which is clearly a limiting factor for sensitive diagnosis. In the present series, over a 3-month period, 10% of the scrapings were positive for *Acanthamoeb*a DNA, but displayed negative direct exam and culture results. These results were not considered false positive because genotyping using other primers confirmed the presence of *Acanthamoeba* DNA and because the clinical outcome was favorable with specific treatment. This confirms that, as shown with other PCR, [18, 26] the MAB-PCR outperforms the usual 'gold standard' for AK diagnostic.

Another essential question has recently been raised concerning the length of AK treatment. [27] Similar to culture, PCR follow-up of corneal scraping could be tested to evaluate the clearance of the pathogen, even if detection of *Acanthamoeba* DNA could occur in the

presence of dead microorganisms. Other AK diagnostic complementary tools, such as *in vivo* confocal microscopy,[28-30] could also be used to monitor treatment response, but this remains to be evaluated. Association to an efficient molecular diagnostic could allow the evaluation for this non invasive diagnostic of AK

Supplementary material. *In silico* analysis of the number of variations in nucleotide sequences defined when blasting Acant primers and probes on the 17 already described genotype of *Acanthamoeba* spp.

Genbank accession number	Isolation source	Genotype	Species	Number of variations in nucleotide sequences		
				AcantF	AcantR	AcantP
U07400	GAE	T1	*A. castellanii*	0	0	0
U07411	Soil	T2	*A. palestinensis*	0	0	0
DQ087294,1	**Corneal scraping**	T3	*A. sp*	0	0	0
GQ905499.1	**Corneal scraping**	T3	*A. sp*	0	0	0
S81337.1	**Keratitis**	T3	*A. griffini*	0	0	0
DQ087323.1	**Contact lens**	T4	*A. sp*	0	0	0
U07416.1	Soil	T4	*A. castellanii*	0	0	0
U94741.1	Swimming pool	T5	*A. lenticulata*	0	0	0
FJ422546.1	**Corneal scraping**	T5	*A. sp*	ND	0	0
AF019063.1	Swimming pool	T6	*A. palestinensis*	0	0	0
AF019064.1	Lab water	T7	*A. astronyxis*	0	0	0
AF019065.1	Freshwater	T8	*A. tubiash*	0	0	0
AF019066.1	Soil	T9	*A. comandoni*	*3*	*1*	*1*
AY026242.1	Freshwater	T9	*A. astronyxis*	*1*	0	0
AF019067.1	Human cell cultures	T10	*A. culbertsoni*	0	0	0
AF019068.1	Brackish water	T11	*A .. hatchetti*	0	0	0
DQ087292.1	**Corneal biopsy**	T11	*A. sp*	0	0	0
AF019070.1	GAE	T12	*A. healyi*	0	0	0
AF132134.1	Clinical isolate	T13	*A. sp*	*1*	0	0
AF333607.1	Unknown	T14	*A. sp*	0	0	0
AY262360.1	Marine sediment	T15	*A. jacobsi*	0	0	0
GQ905495.1	**Corneal scraping**	T15	*A. sp*	0	0	0
GQ380408.2	Unknown	T16	*A. sp*	0	0	0
GU808277.1	Pond	T17	*A. sp*	*1*	0	0
GU808329.1	Freshwater pond	T17	*A. sp*	0	0	0

ND, not defined (sequence too short);GAE, granulomatous amebic encephalitis.

Acknowledgements

We thank Elisabeth Kay and Brieuc Gestin (Adaptation and Pathogenesis of Microorganisms, Joseph Fourier University - Grenoble 1.) for providing the *Acanthamoeba polyphaga* reference strains and sharing their *Amoeba* spp. culture experience, and Pr Luc Foroni (Pharmacy Department of the Teaching Hospital of Grenoble) for providing PHMB and ticarcilline eye drop solutions.

References

1 Radford CF, Lehmann OJ, Dart JK. *Acanthamoeba* keratitis: multicentre survey in England 1992-6. National *Acanthamoeba* Keratitis Study Group. *Br J Ophthalmol*. 1998;82:1387-1392.

2 Illingworth CD, Cook SD. *Acanthamoeba* keratitis. *Surv Ophthalmol*. 1998;42:493-508.

3 Seal DV. *Acanthamoeba* keratitis update-incidence, molecular epidemiology and new drugs for treatment. *Eye (Lond)*. 2003;17:893-905.

4 Verani JR, Lorick SA, Yoder JS, et al. National outbreak of *Acanthamoeba* keratitis associated with use of a contact lens solution, United States. *Emerg Infect Dis*. 2009;15:1236-1242.

5 Claerhout I, Goegebuer A, Van Den Broecke C, Kestelyn P. Delay in diagnosis and outcome of *Acanthamoeba* keratitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2004;242:648-653.

6 Bacon AS, Dart JK, Ficker LA, Matheson MM, Wright P. *Acanthamoeba* keratitis. The value of early diagnosis. *Ophthalmology*. 1993;100:1238-1243.

7 Radford CF, Minassian DC, Dart JK. *Acanthamoeba* keratitis in England and Wales: incidence, outcome, and risk factors. *Br J Ophthalmol*. 2002;86:536-542.

8 Yera H, Zamfir O, Bourcier T, et al. 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*. 2006;26:221-224.

9 Thompson PP, Kowalski RP, Shanks RM, Gordon YJ. Validation of real-time PCR for laboratory diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *J Clin Microbiol*. 2008;46:3232-3236.

10 Rivière D, Szczebara F, Berjeaud J, Héchard Y. Development of real-time PCR assay for quantification of *Acanthamoeba* trophozoïtes and cysts. *J Microbiol Methods*. 2006;64:78-83.

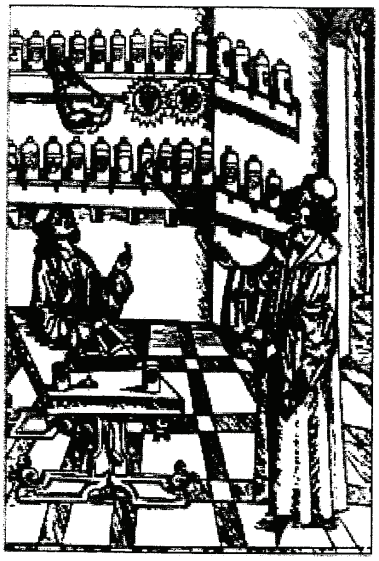
11 Goldschmidt P, Degorge S, Benallaoua D, et al. New tool for the simultaneous detection of 10 different genotypes of *Acanthamoeba* available from the American Type Culture Collection. *Br J Ophthalmol*. 2009;93:1096-1100.

12 Qvarnstrom Y, Visvesvara GS, Sriram R, da Silva AJ. Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*. *J Clin Microbiol*. 2006;44:3589-3595.

13 Goldschmidt P, Degorge S, Saint-Jean C, et al. Resistance of *Acanthamoeba* to classic DNA extraction methods used for the diagnosis of corneal infections. *Br J Ophtalmol*. 2008;92:112-115.
14 Fallon RJ, Rowbotham TJ. Microbiological investigations into an outbreak of Pontiac fever due to Legionella micdadei associated with use of a whirlpool. *Journal of Clinical Pathology*. 1990;43:479-483.
15 Schuster FL. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15:342-354.
16 Yera H, Zamfir O, Bourcier T, et al. The genotypic characterisation of *Acanthamoeba* isolates from human ocular samples. *Br J Ophthalmol*. 2008;92:1139-1141.
17 Zamfir O, Yera H, Bourcier T, et al. Diagnostic par PCR des kératites à *Acanthamoeba* spp. *J Fr Ophtalmol*. 2006;29:1034-1040.
18 Boggild AK, Martin DS, Lee TY, Yu B, Low DE. Laboratory diagnosis of amoebic keratitis: comparison of four diagnostic methods for different types of clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 2009;47:1314-1318.
19 Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. *Humana Press, Totowa, NJ*. 2000;365-386.
20 Bustin S, Benes V, Garson J, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55:611-622.
21 Goldschmidt P, Rostane H, Saint-Jean C, et al. Effects of topical anaesthetics and fluorescein on the real-time PCR used for the diagnosis of *Herpesviruses* and *Acanthamoeba* keratitis. *Br J Ophthalmol*. 2006;90:1354-1356.
22 Dart J, Saw V, Kilvington S. *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis and treatment update 2009. *Am J Ophtalmol*. 2009;148:487-499.
23 Cardine S, Bourcier T, Chaumeil C, et al. Prise en charge clinique et pronostic des kératites amibiennes. Etude rétrospective à propos de 25 cas. *J Fr Ophtalmol*. 2002;25:1007-1013.
24 Yera H, Goldschmidt P, Chaumeil C, Cornet M, Dardé M. *Acanthamoeba* In: Liu DY. Molecular detection of foodborne pathogens. *Editors CRC Press Taylor&Francis Group*. 2009;639-650.
25 Schroeder JM, Booton GC, Hay J, et al. 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*. 2001;39:1903-1911.
26 Khairnar K, Tamber GS, Ralevski F, Pillai DR. Comparison of molecular diagnostic methods for the detection of *Acanthamoeba* spp. from clinical specimens submitted for keratitis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;70:499-506.
27 Oldenburg CE, Keenan JD, Cevallos V, et al. Microbiological cure times in *Acanthamoeba* keratitis. *Eye (Lond)*. 2011;
28 Kumar RL, Cruzat A, Hamrah P. Current state of in vivo confocal microscopy in management of microbial keratitis. *Semin Ophthalmol*. 2010;25:166-170.
29 Vaddavalli PK, Garg P, Sharma S, et al. Role of confocal microscopy in the diagnosis of fungal and *Acanthamoeba* keratitis. *Ophthalmology*. 2011;118:29-35.
30 Grise-Dulac A, Brasnu E, Goldchmidt P, et al. [*In vivo* confocal microscopy: a new tool for the diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis]. *J Fr Ophtalmol*. 2010;33:383-390.

SERMENT DES APOTHICAIRES

Faculté de Pharmacie de Grenoble



Serment des Apothicaires

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

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

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

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

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobe et méprisé de mes confrères si j'y manque.