



HAL
open science

Utilisation du MALDI-TOF pour la caractérisation d'isolats cliniques d'Acanthamoeba spp. de génotype T4 responsables de kératite amibienne

Isabelle Souron

► **To cite this version:**

Isabelle Souron. Utilisation du MALDI-TOF pour la caractérisation d'isolats cliniques d'Acanthamoeba spp. de génotype T4 responsables de kératite amibienne. Sciences pharmaceutiques. 2018. dumas-01932741

HAL Id: dumas-01932741

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01932741v1>

Submitted on 23 Nov 2018

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

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

UNIVERSITE DE ROUEN NORMANDIE
UFR SANTE – Département PHARMACIE

Année 2018

N°

THESE

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
et mémoire de DES de biologie médicale

Présentés et soutenus publiquement le 16 octobre 2018

par

SOURON Isabelle

Née le 17/06/1990 à Paris 13

**Utilisation du MALDI-TOF pour la caractérisation d'isolats cliniques
d'*Acanthamoeba* spp. de génotype T4 responsables de kératite amibienne**

Président du jury	M. Loïc FAVENNEC	PU-PH de parasitologie, UFR Santé de l'Université de Rouen Normandie
Membres du jury	M. Romy RAZAKANDRAINIBE	Ingénieur post-doctorant, chef de projet clinique, CHU Rouen
	M. Marc MURAINÉ	PU-PH d'ophtalmologie, UFR Santé de l'Université de Rouen Normandie
	Mme Christine IMBERT	Professeur des Universités, Faculté de Médecine et de Pharmacie de l'Université de Poitiers
	M. Gilles GARGALA	MCU-PH de parasitologie, UFR Santé de Rouen
	M. Damien COSTA	AHU de parasitologie, UFR Santé de Rouen

REMERCIEMENTS

J'adresse mes remerciements

Au Professeur Loïc Favennec, qui m'a accueillie par trois fois dans son service. C'est un véritable plaisir de découvrir la parasitologie dans une ambiance aussi chaleureuse,

Au Docteur Gilles Gargala, toujours disponible pour discuter de cas cliniques intéressants. Vous êtes une source intarissable de connaissances, que vous prenez le temps de nous communiquer avec calme et gentillesse. C'est grâce à des enseignants chercheurs comme vous que j'exercerai mon métier avec passion,

Au Professeur Marc Muraine, qui me fait l'honneur de faire partie de mon jury de thèse. Je vous en remercie,

Au Professeur Christine Imbert qui a accepté d'être membre de mon jury de thèse. Je vous en remercie,

Au Dr Romy Razakandraine qui m'a épaulée dans ce projet. Je te remercie de ta disponibilité et de ta gentillesse tout au long de cette aventure et te souhaite le meilleur pour la suite,

Au Dr Damien Costa, qui a intégré ce jury de thèse. Je te remercie,

Au Dr Anne-Cécile Normand et au Professeur Renaud Piarroux, qui nous ont accueillis dans le laboratoire de parasitologie de la Pitié-Salpêtrière. Je vous adresse tous mes remerciements pour avoir consacré autant de temps à l'interprétation de nos résultats et ce dans une ambiance chaleureuse,

Au Docteur Denis Leméteil qui nous fait découvrir le monde merveilleux de l'observation microscopique des parasites. Votre savoir s'apparente à celui d'un druide et j'ai eu l'immense chance de tomber dans votre marmite de potion magique,

A toute l'équipe de parasitologie. Le temps est passé vite en votre compagnie,

A tous mes co-internes, et en particulier à Bénédicte, Cynthia, Kevin, Julien, Aurélie S. et Aurélie R. avec qui j'ai fait mes premiers pas d'interne ; et enfin à Pauline, je te souhaite de t'épanouir dans ta vie professionnelle ;

A Stéphanie David, avec qui j'ai vécu au rythme trépidant de l'Europe. Je te souhaite une très belle carrière de biologiste médicale car tu le mérites tant par tes qualités médicales qu'humaines,

A mes parents, qui m'ont donné la chance de faire ces études et qui m'ont toujours laissé la liberté de tracer mon chemin. J'espère être digne de vous,

A Béatrice, Dominique et Jean-Baptiste, ma sœur et mes deux frères qui m'ont accompagnée durant toutes ces années. Nous avons pris nos premières mousses ensemble, il est maintenant temps de voguer vers le large.

« L'Université de Rouen et l'UFR de Médecine et de Pharmacie de Rouen n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans cette thèse. Ces opinions sont propres à leurs auteurs. »

ANNEE UNIVERSITAIRE 2017 - 2018

U.F.R. SANTÉ DE ROUEN

DOYEN :

Professeur Pierre FREGER

ASSESEURS :

Professeur Michel GUERBET

Professeur Benoit VEBER

Professeur Guillaume SAVOYE

I - MEDECINE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mr Frédéric ANSELME	HCN	Cardiologie
Mme Gisèle APTER	Havre	Pédopsychiatrie
Mme Isabelle AUQUIT AUCKBUR	HCN	Chirurgie plastique
Mr Fabrice BAUER	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya BEKRI	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Ygal BENHAMOU	HCN	Médecine interne
Mr Jacques BENICHOU	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mr Olivier BOYER	UFR	Immunologie
Mme Sophie CANDON	HCN	Immunologie
Mr François CARON	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe CHASSAGNE (<i>détachement</i>)	HCN	Médecine interne (gériatrie) – Détachement
Mr Vincent COMPERE	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Jean-Nicolas CORNU	HCN	Urologie
Mr Antoine CUVELIER	HB	Pneumologie
Mr Pierre CZERNICHOW (<i>sumombre</i>)	HCH	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Nicolas DACHER	HCN	Radiologie et imagerie médicale
Mr Stéfan DARMONI	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
Mr Pierre DECHELOTTE	HCN	Nutrition
Mr Stéphane DERREY	HCN	Neurochirurgie
Mr Frédéric DI FIORE	CB	Cancérologie

Mr Fabien DOGUET	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire
Mr Jean DOUCET	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie
Mr Bernard DUBRAY	CB	Radiothérapie
Mr Philippe DUCROTTE	HCN	Hépatogastro-entérologie
Mr Frank DUJARDIN	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologique
Mr Fabrice DUPARC	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mr Eric DURAND	HCN	Cardiologie
Mr Bertrand DUREUIL	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène ELTCHANINOFF	HCN	Cardiologie
Mr Manuel ETIENNE	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Thierry FREBOURG	UFR	Génétique
Mr Pierre FREGER	HCN	Anatomie - Neurochirurgie
Mr Jean François GEHANNO	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel GERARDIN	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille GERARDIN	HCN	Pédopsychiatrie
M. Guillaume GOURCEROL	HCN	Physiologie
Mr Dominique GUERROT	HCN	Néphrologie
Mr Olivier GULLIN	HCN	Psychiatrie Adultes
Mr Didier HANNEQUIN	HCN	Neurologie
Mr Fabrice JARDIN	CB	Hématologie
Mr Luc-Marie JOLY	HCN	Médecine d'urgence
Mr Pascal JOLY	HCN	Dermato – Vénérologie
Mme Bouchra LAMIA	Havre	Pneumologie
Mme Annie LAQUERRIERE	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent LAUDENBACH	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Joël LECHEVALLIER	HCN	Chirurgie infantile
Mr Hervé LEFEBVRE	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry LEQUERRE	HB	Rhumatologie
Mme Anne-Marie LEROI	HCN	Physiologie
Mr Hervé LEVESQUE	HB	Médecine interne
Mme Agnès LIARD-ZMUDA	HCN	Chirurgie Infantile
Mr Pierre Yves LITZLER	HCN	Chirurgie cardiaque
Mr Bertrand MACE	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. David MALTETE	HCN	Neurologie
Mr Christophe MARGUET	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle MARIE	HB	Médecine interne
Mr Jean-Paul MARIE	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Loïc MARPEAU	HCN	Gynécologie - Obstétrique

Mr Stéphane MARRET	HCN	Pédiatrie
Mme Véronique MERLE	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre MICHEL	HCN	Hépatogastro-entérologie
M. Benoit MISSET	HCN	Réanimation Médicale
Mr Jean-François MUIR (<i>sumombre</i>)	HB	Pneumologie
Mr Marc MURAINÉ	HCN	Ophthalmologie
Mr Philippe MUSETTE	HCN	Dermatologie - Vénérologie
Mr Christophe PEILLON	HCN	Chirurgie générale
Mr Christian PFISTER	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe PLANTIER	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier PLISSONNIER	HCN	Chirurgie vasculaire
Mr Gaëtan PREVOST	HCN	Endocrinologie
Mr Jean-Christophe RICHARD (<i>détachement</i>)	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Vincent RICHARD	UFR	Pharmacologie
Mme Nathalie RIVES	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Horace ROMAN	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe SABOURIN	HCN	Anatomie - Pathologie
Mr Guillaume SAVOYE	HCN	Hépatogastrologie
Mme Céline SAVOYE-COLLET	HCN	Imagerie médicale
Mme Pascale SCHNEIDER	HCN	Pédiatrie
Mr Michel SCOTTE	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne TAMION	HCN	Thérapeutique
Mr Luc THIBERVILLE	HCN	Pneumologie
Mr Christian THUILLEZ (<i>sumombre</i>)	HB	Pharmacologie
Mr Hervé TILLY	CB	Hématologie et transfusion
M. Gilles TOURNEL	HCN	Médecine Légale
Mr Olivier TROST	HCN	Chirurgie Maxillo-Faciale
Mr Jean-Jacques TUECH	HCN	Chirurgie digestive
Mr Jean-Pierre VANNIER (<i>sumombre</i>)	HCN	Pédiatrie génétique
Mr Benoît VEBER	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre VERA	CB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric VERIN	HB	Service Santé Réadaptation
Mr Eric VERSPYCK	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier VITTECOQ	HB	Rhumatologie
Mme Marie-Laure WELTER	HCN	Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme Noëlle BARBIER-FREBOURG	HCN	Bactériologie – Virologie
Mme Carole BRASSE LAGNEL	HCN	Biochimie
Mme Valérie BRIDOUX HUYBRECHTS	HCN	Chirurgie Vasculaire
Mr Gérard BUCHONNET	HCN	Hématologie
Mme Mireille CASTANET	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie CHASTAN	HCN	Neurophysiologie
Mme Sophie CLAEYSSENS	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Moïse COEFFIER	HCN	Nutrition
Mr Serge JACQUOT	UFR	Immunologie
Mr Joël LADNER	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste LATOUCHE	UFR	Biologie cellulaire
Mr Thomas MOUREZ	HCN	Virologie
Mr Gaël NICOLAS	HCN	Génétique
Mme Muriel QUILLARD	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mme Laëtitia ROLLIN	HCN	Médecine du Travail
Mr Mathieu SALAUN	HCN	Pneumologie
Mme Pascale SAUGIER-VEBER	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire TOBENAS-DUJARDIN	HCN	Anatomie
Mr David WALLON	HCN	Neurologie

PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

Mr Thierry WABLE	UFR	Communication
Mme Mélanie AUVRAY-HAMEL	UFR	Anglais

II - PHARMACIE

PROFESSEURS

Mr Thierry BESSON	Chimie Thérapeutique
Mr Roland CAPRON (PU-PH)	Biophysique
Mr Jean COSTENTIN (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr François ESTOUR	Chimie Organique
Mr Loïc FAVENNEC (PU-PH)	Parasitologie
Mr Jean Pierre GOULLE (Professeur émérite)	Toxicologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mme Isabelle LEROUX - NICOLLET	Physiologie
Mme Christelle MONTEIL	Toxicologie
Mme Martine PESTEL-CARON (PU-PH)	Microbiologie
Mr Rémi VARIN (PU-PH)	Pharmacie clinique
Mr Jean-Marie VAUGEOIS	Pharmacologie
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

MAITRES DE CONFERENCES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et Minérale
Mr Jérémy BELLIEN (MCU-PH)	Pharmacologie
Mr Frédéric BOUNOURE	Pharmacie Galénique
Mr Abdeslam CHAGRAOUI	Physiologie
Mme Camille CHARBONNIER (LE CLEZIO)	Statistiques
Mme Elizabeth CHOSSON	Botanique
Mme Marie Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Cécile CORBIERE	Biochimie
Mr Eric DITTMAR	Biophysique
Mme Nathalie DOURMAP	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUC	Pharmacologie
Mme Dominique DUTERTE- BOUCHER	Pharmacologie
Mr Abdelhakim ELOMRI	Pharmacognosie
Mr Gilles GARGALA (MCU-PH)	Parasitologie

Mme Nejla EL GHARBI-HAMZA	Chimie analytique
Mme Marie-Laure GROULT	Botanique
Mr Hervé HUE	Biophysique et mathématiques
Mme Laetitia LE GOFF	Parasitologie – Immunologie
Mme Hong LU	Biologie
M. Jérémie MARTINET (MCU-PH)	Immunologie
Mme Marine MALLETER	Toxicologie
Mme Sabine MENAGER	Chimie organique
Mme Tiphaine ROGEZ-FLORENT	Chimie analytique
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Malika SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Christine THARASSE	Chimie thérapeutique
Mr Frédéric ZIEGLER	Biochimie

PROFESSEURS ASSOCIES

Mme Cécile GUERARD-DETUNCQ	Pharmacie officinale
Mr Jean-François HOUIVET	Pharmacie officinale

PROFESSEUR CERTIFIE

Mme Mathilde GUERIN	Anglais
----------------------------	---------

ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

Mme Anaïs SOARES	Bactériologie
-------------------------	---------------

ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

Mme Anne-Sophie CHAMPY	Pharmacognosie
M. Jonathan HEDOUIN	Chimie Organique
Mme Barbara LAMY-PELLETER	Pharmacie Galénique

LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et minérale
Mr Thierry BESSON	Chimie thérapeutique
Mr Roland CAPRON	Biophysique
Mme Marie-Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation et économie de la santé
Mme Elisabeth CHOSSON	Botanique
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Abdelhakim ELOMRI	Pharmacognosie
Mr Loïc FAVENNEC	Parasitologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mr François ESTOUR	Chimie organique
Mme Isabelle LEROUX-NICOLLET	Physiologie
Mme Martine PESTEL-CARON	Microbiologie
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mr Rémi VARIN	Pharmacie clinique
M. Jean-Marie VAUGEOIS	Pharmacologie
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

III – MEDECINE GENERALE

PROFESSEUR MEDECINE GENERALE

Mr Jean-Loup **HERMIL** (PU-MG) UFR Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCE MEDECINE GENERALE

Mr Matthieu **SCHUERS** (MCU-MG) UFR Médecine générale

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTE

Mr Emmanuel **LEFEBVRE** UFR Médecine Générale

Mme Elisabeth **MAUVIARD** UFR Médecine générale

Mr Philippe **NGUYEN THANH** UFR Médecine générale

Mme Marie Thérèse **THUEUX** UFR Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTES

Mr Pascal **BOULET** UFR Médecine générale

Mr Emmanuel **HAZARD** UFR Médecine Générale

Mme Marianne **LAINÉ** UFR Médecine Générale

Mme Lucile **PELLERIN** UFR Médecine générale

Mme Yveline **SEVRIN** UFR Médecine générale

ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

PROFESSEURS

Mr Serguei FETISSOV (med)	Physiologie (ADEN)
Mr Paul MULDER (phar)	Sciences du Médicament
Mme Su RUAN (med)	Génie Informatique

MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sahil ADRIOUCH (med)	Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)
Mme Gaëlle BOUGEARD-DENOYELLE (med)	Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)
Mme Carine CLEREN (med)	Neurosciences (Néovasc)
M. Sylvain FRAINEAU (med)	Physiologie (Inserm U 1096)
Mme Pascaline GAILDRAT (med)	Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)
Mr Nicolas GUEROUT (med)	Chirurgie Expérimentale
Mme Rachel LETELLIER (med)	Physiologie
Mme Christine RONDANINO (med)	Physiologie de la reproduction
Mr Antoine OUVRARD-PASCAUD (med)	Physiologie (Unité Inserm 1076)
Mr Frédéric PASQUET	Sciences du langage, orthophonie
Mme Isabelle TOURNIER (med)	Biochimie (UMR 1079)

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique DELAFONTAINE

HCN - Hôpital Charles Nicolle

CB - Centre Henri Becquerel

CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation

HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME

CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray

SJ - Saint Julien Roue

Table des matières

LISTE DES TABLEAUX	15
LISTE DES FIGURES	16
GLOSSAIRE	17
INTRODUCTION	18
I. LES ACANTHAMIBES : GENERALITES	20
I.1 PRESENTATION GENERALE	20
I.2 CLASSIFICATION MORPHOLOGIQUE ET GENOTYPIQUE	21
<i>Classification morphologique</i>	21
<i>Classification génotypique</i>	22
I.3 ECOLOGIE DES ACANTHAMOEBA SPP.	23
I.4 CYCLE DE VIE ET MORPHOLOGIE D'ACANTHAMOEBA	24
<i>Les trophozoïtes</i>	25
<i>Forme kystique</i>	27
I.5 NUTRITION D'ACANTHAMOEBA	28
I.6 PATHOGENICITE HUMAINE	28
<i>I.6.1 La Kératite Amibienne (AK)</i>	29
<i>I.6.2 Autres pathologies liées à Acanthamoeba spp.</i>	41
I.7 PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS	45
II. MATERIELS ET METHODES	47
II.1 SOUCHES DE REFERENCE ET ISOLATS CLINIQUES	47
II.2 CULTURE DES SOUCHES	48
II.3 GENOTYPAGE DES SOUCHES	48
II.4 CARACTERISATION PROTEOMIQUE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI-TOF	51
<i>II.4.1 Préparation des échantillons et extraction protéique</i>	51
<i>I.4.2 Paramètres utilisés sur spectromètre de masse MALDI-TOF</i>	52
III. RESULTATS	53
III.1 GENOTYPAGE	53
III.2 ANALYSE SPECTRALE DES SOUCHES PAR SPECTROMETRIE MALDI-TOF	54
<i>III.2.1 En fonction du protocole d'extraction</i>	54
<i>III.2.2 En fonction du stade du parasite</i>	55
<i>III.2.3 En fonction du parasite (parasite, genre, espèce, génotype)</i>	56
<i>III.2.4 Répétabilité et reproductibilité</i>	62
<i>III.2.5 En fonction du temps de culture</i>	62
IV DISCUSSION	65
V. PERSPECTIVES	71
VI CONCLUSION	72
BIBLIOGRAPHIE	73
WEBOGRAPHIE	83
SERMENT DE GALIEN	84

Liste des tableaux

Tableau 1: Classification des acanthamibes sur des critères morphologiques	21
Tableau 2: Pathogénicité d'<i>Acanthamoeba</i> en fonction du génotype	23
Tableau 3: Facteurs de risque associés à la kératite amibienne (AK)	30
Tableau 4 : Récapitulatif des souches incluses dans l'étude	47
Tableau 5: Profil d'amplification du PCR séquençage sur le thermocycleur	50
Tableau 6: Protocoles d'extraction protéique des échantillons testés dans l'étude	51
Tableau 7: Tableau récapitulatif des résultats des spectres obtenus avec les 2 extractions	54
Tableau 8: Tableau croisé dynamique des scores d'identification obtenus avec le logiciel MSI en confrontant les spectres des souches de référence d'<i>Acanthamoeba</i>.	57
Tableau 9: Scores obtenus en analysant les spectres d'<i>Acanthamoeba</i> espèce contre espèce	58
Tableau 10: Résultats obtenus en comparant les spectres des patients avec la banque de référence	59
Tableau 11: Pics communs aux souches d'<i>Acanthamoeba</i> étudiées	61
Tableau 12: Protocoles d'extraction protéique des échantillons	68
Tableau 13: Comparaison des pics retrouvés dans les spectres des souches d'<i>Acanthamoebae</i> dans la littérature	69

Liste des figures

Figure 1: Dendogramme phylogénétique d' <i>Acanthamoeba</i> basé sur l'étude de l'ADNr 18S.....	22
Figure 2: Schéma de la structure d'une amibe.....	25
Figure 3: Acanthopodes d' <i>Acanthamoeba</i> par microscopie électronique à balayage.....	25
Figure 4: Processus d'enkystement d' <i>Acanthamoeba</i>	26
Figure 5: Formes variables d'endokystes d' <i>Acanthamoeba</i> par microscopie à contraste d'interférence...	27
Figure 6: Cycle de vie d' <i>Acanthamoeba</i>	29
Figure 7: Représentation schématique de la cascade pathogénique de la kératite amibienne.....	31
Figure 8: Photos des différents stades observés dans une kératite amibienne.....	33
Figure 9: Images évocatrices de kystes amibiens en microscopie confocale <i>in vivo</i> (HRTII-RCM).....	35
Figure 10: Images évocatrices de trophozoïtes amibiens en microscopie confocale <i>in vivo</i> (HRTII-RCM) : structures à contours irréguliers dans le stroma cornéen [70]......	35
Figure 11: Kystes amibiens colorés au MGG.....	36
Figure 12: Protocole de traitement de la kératite amibienne à l'hôpital des XV-XX de Paris.....	40
Figure 13: Coupe frontale des hémisphères cérébraux montrant des nécroses corticales et sous-corticales d'un cas humain mortel d'encéphalite granulomateuse amibienne.....	42
Figure 14: Lésions cutanées sur le front (A) et sur le bras (B) lors d'une infection disséminée à <i>Acanthamoeba</i> chez un patient atteint d'une leucémie lymphoïde chronique.....	43
Figure 15: Images au microscope optique de kystes de <i>Vermamoeba vermiformis</i> sur gélose agar non nutritive.....	44
Figure 16: Automate séquenceur ABIprism 3100 Genetic Analyzers (Applied Biosystems).....	50
Figure 17: Révélation des amplicons des huit souches d'amibes sur gel d'agarose contenant du Midori et exposé sous lampe UV.....	53
Figure 18: Comparaison des spectres de <i>Vermamoeba vermiformis</i> et d' <i>Acanthamoeba</i> (<i>A. castellanii</i> , <i>A.</i> <i>hatchetti</i> et <i>A. polyphaga</i>) par spectrométrie de masse MALDI-TOF.....	57
Figure 19: Analyse graphique des spectres de trois souches de référence d' <i>Acanthamoeba</i> (<i>A. castellanii</i> , <i>A. hatchetti</i> et <i>A. polyphaga</i>).....	60
Figure 20: Analyse graphique des spectres de la souche de référence de <i>A. lenticulata</i>	60
Figure 21: Analyse graphique des spectres des trois souches d' <i>Acanthamoeba</i> de patients.....	61
Figure 22: Spectres d' <i>Acanthamoeba polyphaga</i> à J1, J3 et J5 sur MALDI-TOF.....	62
Figure 23: Spectres d' <i>Acanthamoeba hatchetti</i> à J1, J3 et J5 sur MALDI-TOF.....	63
Figure 24: Spectres d' <i>Acanthamoeba castellanii</i> à J1, J3 et J5 sur MALDI-TOF.....	63

Glossaire

ADNr	Acide DésoxyRibonucléique ribosomal
ARN	Acide Ribonucléique
ATCC	American Type Culture Collection
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
Da	Dalton
ddNTP	Didésoxyribonucléotides
GAE	Encéphalite Granulomateuse Amibienne
HES	Hématoxyline-Eosine
KA	Kératite Amibienne
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien
MALDI-TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight Mass Spectrometry
MGG	May-Grünwald-Giemsa
mL	Millilitres
mOsmol	MilliOsmoles
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PHMB	Polyhexaméthylène Biguanide
PIGMER	Postgraduate Institute of Medical Education and Research
PYG	Peptone Yeast Glucose
UV	Ultraviolets
°C	Degrés Celsius
µm	Micromètres

Introduction

La kératite à *Acanthamoeba* représente à l'heure actuelle un défi diagnostique pour les cliniciens, de par la sévérité des symptômes pouvant aller jusqu'à la cécité, et de par le faible arsenal diagnostique capable de mettre en évidence ce parasite. Avec un premier cas décrit en 1974 [1], l'incidence de la kératite amibienne (KA) n'a cessé de croître depuis plusieurs décennies allant de pair avec le port de lentilles de contact, principal facteur de risque de KA dans les pays développés. Des cas de KA sont également décrits chez des non-porteurs de lentilles. La recrudescence de cette pathologie a en effet fait l'objet d'investigations poussées des agences de santé, à l'image du Centers for Disease Control and Prevention (CDC) qui, en 2007, a ouvert une enquête rétrospective ayant pour but d'identifier les facteurs prédisposants et d'étudier l'épidémiologie des cas rapportés aux Etats-Unis [2].

La KA est reconnue par la majorité des ophtalmologistes comme une infection oculaire rare dont la prise en charge diagnostique et thérapeutique est difficile. Sur le plan clinique, les manifestations peuvent être très variées, peu spécifiques avec des symptômes évoluant progressivement vers une gêne et une inflammation oculaires associées à des douleurs intenses de type névrite radiale. Le pronostic visuel peut alors être menacé, certaines lésions pouvant conduire à la cécité définitive et même parfois nécessiter une énucléation. Le diagnostic est rarement évoqué en première intention, les symptômes s'apparentant à ceux de kératites herpétiques, bactériennes ou fongiques. Sur le plan biologique, le diagnostic de l'infection cornéenne à *Acanthamoeba* spp. repose sur la mise en culture longue de prélèvements cornéens (produits de grattage de cornée, biopsies) et/ou de fluide de lentilles de contact. Des méthodes diagnostiques de biologie moléculaire par amplification génique ou Polymerase Chain Reaction (PCR) sont également utilisées mais des données récentes de la littérature ont montré des résultats incertains de caractérisation rapide de génotypes pathogènes [3]. Toutes ces méthodes de laboratoire sont peu adaptées à la détection rapide d'espèces pathogènes et/ou potentiellement résistantes au traitement. La KA pouvant entraîner de lourdes séquelles visuelles, il est par conséquent impératif de développer de nouveaux outils diagnostiques permettant d'établir un diagnostic précoce et d'instaurer un traitement adapté.

Le Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) ayant démontré ses performances dans l'identification de micro-

organismes pathogènes cultivables [4], le projet consiste à appliquer cette technologie à l'identification parasitaire d'*Acanthamoeba* spp. . Rapide et automatisé, le MALDI-TOF MS permet la production de spectres spécifiques d'isolats en quelques minutes, une identification fiable nécessitant pour chaque micro-organisme le recours à une base de données validée et complète des empreintes peptidiques des souches de référence.

Les objectifs de ce projet sont de deux ordres :

- Réaliser par MALDI-TOF la caractérisation protéomique d'isolats de référence d'*Acanthamoeba* spp . et initier la création d'une banque de données spectrales ;
- Etablir l'efficacité de cette méthode pour la détection et la caractérisation d'isolats cliniques d'*Acanthamoeba* pathogènes.

I. Les Acanthamibes : Généralités

I.1 Présentation générale

Les amibes sont des eucaryotes unicellulaires de la grande famille des protozoaires et appartenant à la famille des Rhizopodes. Elles se déplacent en effectuant des mouvements dits « amiboïdes ». Des mouvements d'extension et de rétractation des pseudopodes leur permettent de se déplacer en rampant sur un support. On distingue deux groupes d'amibes en fonction de leur habitat : les amibes libres et les amibes parasites.

Les amibes libres sont ubiquitaires dans l'environnement, se nourrissant de bactéries, de levures et d'autres micro-organismes, elles sont capables de mener une existence autonome sans la présence d'un hôte. Les amibes parasites, par contre, sont incapables de vivre de façon autonome à l'extérieur d'un hôte, à l'image d'*Entamoeba histolytica*. Les amibes parasites se développent essentiellement dans le tube digestif de l'homme et sont l'agent étiologique de l'amibiase. Toutefois, ces amibes peuvent survivre au sein de l'environnement naturel, mais ne peuvent pas s'y multiplier.

Parmi les amibes libres, *Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* et *Sappinia diploidea* sont capables d'amphizoïdie, c'est-à-dire qu'elles peuvent mener tantôt une vie complètement autonome dans l'environnement, tantôt être parasites chez l'animal et l'homme. Bien que le nombre de cas d'infections causées par les amibes libres soit faible, les pathologies associées peuvent être très graves (kératite amibienne, amibiase cutanée, et encéphalite) [5] [6].

Responsable de la kératite amibienne, *Acanthamoeba* spp. se distingue des autres amibes libres par la présence de pseudopodes appelés acanthopodes: en grec, le préfixe « Acanth » signifie pic et décrit chez *Acanthamoeba* des structures en épines à la surface des amibes, permettant le déplacement, la phagocytose mais également l'adhésion. *Acanthamoeba* spp. présente deux formes morphologiques différentes au cours de son cycle de vie : le trophozoïte et le kyste. Le trophozoïte est la forme infestante, répliquative, mobile et responsable d'infections chez l'homme. Le kyste ou forme de résistance représente la forme métaboliquement inactive de l'amibe.

I.2 Classification morphologique et génotypique

Classification morphologique

Les mouvements amiboïdes impliquent que ces amibes ne possèdent pas de forme cellulaire stable. Par conséquent, les caractéristiques morphologiques distinctives sont très limitées et l'identification et la classification des amibes sur des critères morphologiques sont hasardeuses [7] [8] [9] [10] [11] [12] [13]. En 1977, Pussard et Pons [14] ont proposé une clé dichotomique pour la détermination des espèces d'*Acanthamoeba* basée sur la morphologie de la paroi kystique, ainsi 3 groupes ont été décrits (Tableau 1).

Tableau 1: Classification des acanthamibes sur des critères morphologiques

[11,15]

	Groupe I	Groupe II	Groupe III
Caractéristiques	-Kystes de taille supérieure ou égale à 18 µm -Endokyste étoilé -Ectokyste sphérique lisse.	-Kystes de taille inférieure à 18 µm -Endokyste polygonal ou étoilé -Ectokyste irrégulier ou ridé.	-Kystes de taille inférieure à 18 µm -Endokyste arrondi ou légèrement angulaire -Ectokyste fin et lisse, voire légèrement ridé.
Nombre connu d'espèces	4	11	5
Espèces	<i>A. astronyxis</i> , <i>A. comandoni</i> , <i>A. echinulata</i> , <i>A. tubiashi</i>	<i>A. mauritanensis</i> , <i>A. castellanii</i> <i>A. polyphaga</i> , <i>A. quina</i> , <i>A. divionensis</i> , <i>A. triangularis</i> , <i>A. lugdunensis</i> , <i>A. griffini</i> , <i>A. rhyodes</i> , <i>A. paradivionensis</i> , <i>A. hatchetti</i>	<i>A. palestinensis</i> , <i>A. culbertsoni</i> , <i>A. royreba</i> , <i>A. lenticulata</i> , <i>A. pustulosa</i>

Cette classification a largement été utilisée mais l'identification des espèces demeure problématique car la morphologie des kystes change en fonction des conditions de cultures [15]. De plus, la variabilité morphologique des kystes pour une même souche est importante rendant ainsi l'identification des espèces difficilement possible.

Classification génotypique

La classification basée sur des critères morphologiques seuls s'avère ainsi peu fiable, des méthodes moléculaires se sont développées. L'étude des isoenzymes a montré un polymorphisme au sein d'une même groupe selon la classification de Pussard et Pons. La classification phylogénétique des acanthamibes repose désormais sur le séquençage de l'ADNr (Acide Désoxyribonucléique ribosomal) 18S. A travers l'analyse des variations de séquences, vingt génotypes d'*Acanthamoeba* (T1-T20) ont été établis : T1-T12 [16], T13 [17], T14 [18], T15 [19], T16 [20], T17 [21], T18 [22], T19 [23] et T20 [24] (Figure 2). Les génotypes T21 et T22 ne sont pas mentionnés sur la figure 2 car les séquences n'ont pas encore été décrites dans des publications mais les informations disponibles démontrent l'existence de ces deux autres génotypes d'*Acanthamoeba* (Numéros d'ordre CDEZ00000000.1 et KX840327.1).

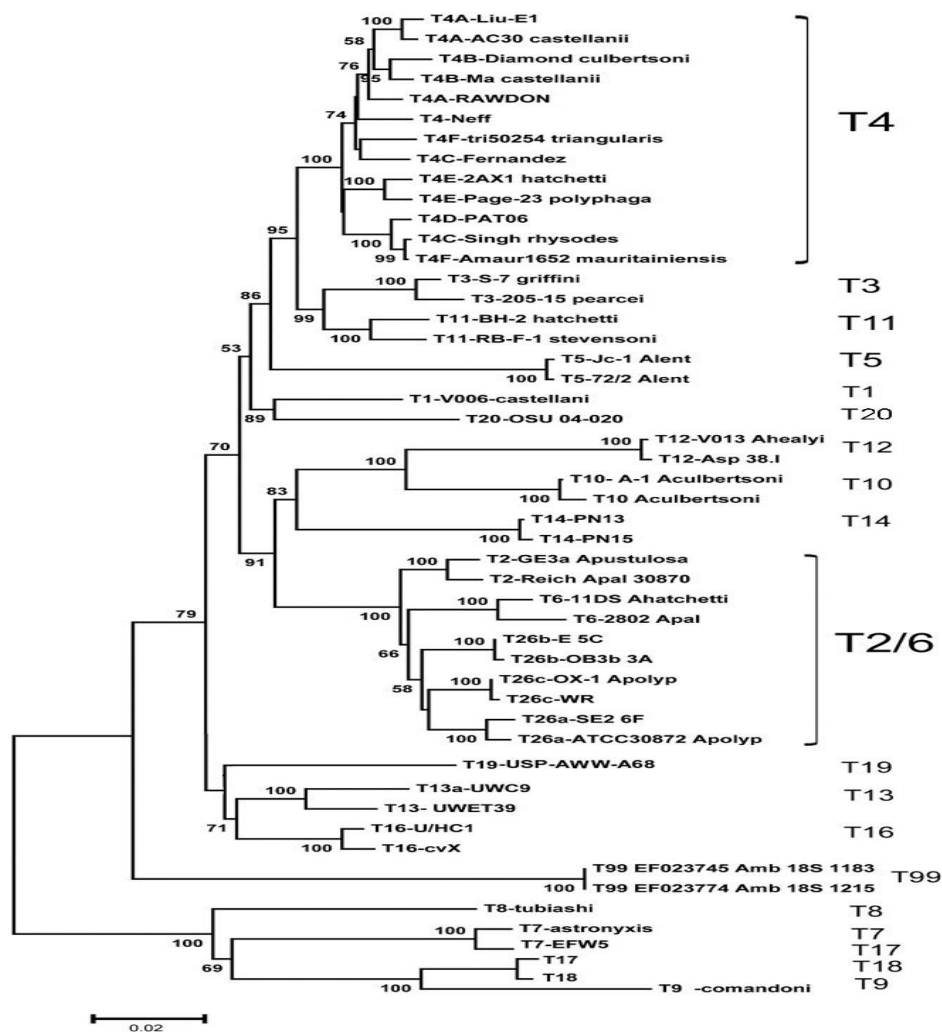


Figure 1: Dendrogramme phylogénétique d'*Acanthamoeba* basé sur l'étude de l'ADNr 18S

(<https://u.osu.edu/Acanthamoeba/phylogenetic-relationships-among-Acanthamoeba/>)

Certains géotypes d'*Acanthamoeba* sont associés à une pathogénicité humaine, en particulier le géotype T4 associé à des cas d'encéphalites et de kératites humaines (Tableau 2).

Tableau 2:Pathogénicité d'*Acanthamoeba* en fonction du géotype

[6]

Groupe	Géotype	Espèces	Pathogénités
III	T1	<i>A. palestinensis</i> Reich	Encéphalite granulomateuse
III	T2	<i>A. lenticulata</i>	Kératite
II	T3	<i>A. griffinii</i>	
II	T4	<i>A. polyphaga</i>	Kératite
		<i>A. hatchetti</i>	Kératite
		<i>A. castellanii</i>	Kératite
III	T5	<i>A. hatchetti</i>	Kératite
III	T6	<i>A. palestinensis</i>	Kératite
		<i>A. healyi</i>	Kératite
I	T7	<i>A. astronyxis</i>	Aucune pathologie associée décrite
I	T8	<i>A. tubiashii</i>	Aucune pathologie associée décrite
I	T9	<i>A. comandoni</i>	Aucune path. associée décrite
III	T10	<i>A. culerstoni</i>	Aucune path. associée décrite
II	T11	<i>A. hatchetti</i>	Kératite

I.3 Ecologie des *Acanthamoeba* spp.

Les *Acanthamoeba* spp. sont des protozoaires ubiquitaires, naturellement et largement répandus dans la nature [25] [26], Ils peuvent être retrouvés dans des environnements très différents : mer, sédiments océaniques [27], plages, rivières et lacs [28], sol [29], poussière et dans l'air [30]. Ils ont également été isolés de bouteilles d'eau minérale [31] et d'eau déminéralisée, de tours de refroidissement de centrales nucléaires et électriques [32], de piscines [33] mais aussi sur des légumes [34], et d'animaux (poissons, reptiles, ...) [35].

En France, les eaux potables peuvent renfermer entre 10^3 à 10^4 amibes par litre, résistant à la chloration et ozonisation, l'exposition humaine aux amibes est fréquente. Ainsi, des amibes peuvent être isolées dans divers échantillons d'origine humaine (sécrétions pulmonaires, sinus maxillaire, autogreffes de mandibules, lésions cutanées, selles) et des lentilles de contact.

Leur présence a également été rapportée dans des hôpitaux dont au niveau des services de dialyse [36], et des unités dentaires [37]. Les *Acanthamoeba* sont capables d'endosymbiose avec les autres micro-organismes et peuvent ainsi servir d'hôtes pour des bactéries pathogènes telles que *Legionella spp.*, *Francisella tularensis*, *Mycobacterium massiliense* [38] [39] [40] et pour certains virus tels Echovirus [41]. Véritable cheval de Troie, *Acanthamoeba spp.* présente ainsi un risque sanitaire en milieu hospitalier ou thermal. Au vu de la répartition cosmopolite de ces parasites et de leur large distribution dans l'environnement, il n'est pas surprenant de retrouver des anticorps anti-*Acanthamoeba* chez la majorité des individus sains, comme le rapporte Cursons *et al.* [42].

1.4 Cycle de vie et Morphologie d'*Acanthamoeba*

La structure d'*Acanthamoeba* correspond à la structure de base des amibes (Figure 3). L'étude par microscopie électronique de son organisation cellulaire rapporte la présence de différents compartiments et organites:

- la membrane plasmique ou plasmalemme qui sépare le cytoplasme du milieu extérieur;
- le cytoplasme constitué de l'ectoplasme : partie périphérique du cytoplasme qui va intervenir dans la formation de pseudopodes; et de l'endoplasme : partie centrale granuleuse de l'amibe contenant les organites ;
- un noyau : proéminent et central il contient le matériel génétique de l'amibe ;
- des vacuoles alimentaires dont le rôle est la digestion ;
- des vacuoles contractiles : vacuoles permettant d'évacuer l'eau en excès dans le cytoplasme et d'assurer l'osmorégulation;
- des pseudopodes : extensions cytoplasmiques responsables du mouvement amiboïde.

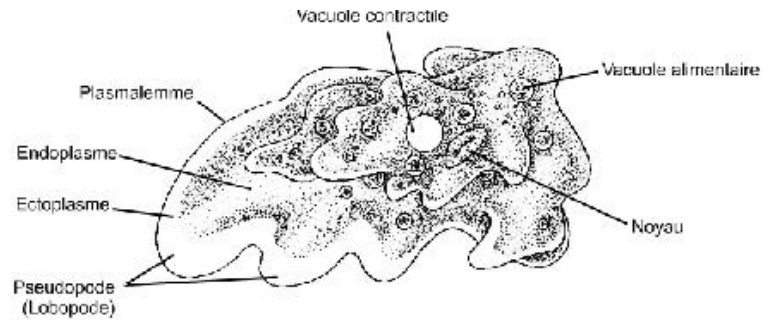


Figure 2: Schéma de la structure d'une amibe

(<http://cefsk.ca/jacinthe/biologie20/unite3/diversite20.html>)

Acanthamoeba spp. présente deux formes cellulaires distinctes en fonction des conditions environnementales : (a) le trophozoïte, forme libre métaboliquement active (nutrition, division et déplacement) et (b) la forme kyste correspondant à la forme de résistance.

Les trophozoïtes

Les trophozoïtes sont la forme majoritaire lorsque les conditions de croissance sont optimales. La taille des trophozoïtes varie de 15 à 50 micromètres (μm) de diamètre et possèdent des structures en épine à leur surface, les acanthapodes (« acanth » signifie pic en grec) responsables de leur déplacement (Figure 4).

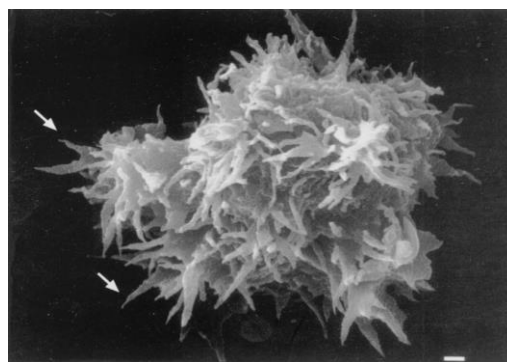


Figure 3: Acanthapodes d'Acanthamoeba par microscopie électronique à balayage

[43]

Les trophozoïtes présentent une organisation cytoplasmique typique d'une cellule eucaryote. Ils comportent un noyau unique, dense et largement nucléolé occupant une

place centrale ; le cytoplasme est fin et granuleux et contient de nombreux organites : complexe de Golgi, réticulum endoplasmique, mitochondries, vacuoles digestives et contractiles, ... [44]. Ils se divisent de façon asexuée, le temps de génération variant de 8 à 24 heures en fonction de l'isolat et selon une fission binaire, une cellule-mère donnant naissance à deux cellules-filles [45].

Lorsque les conditions deviennent défavorables (nourriture venant à manquer, hyper- ou hypoosmolarité, températures et pH extrêmes), le processus d'enkystement est enclenché (Figure 5), le trophozoïte se transformant alors en kyste. Le trophozoïte devient métaboliquement inactif ; l'excès de nourriture, d'eau et de particules est expulsé et le trophozoïte se condense en une première structure arrondie, le pré-kyste qui mûrit ensuite en kyste doté d'une double paroi qui permet au parasite de survivre à des conditions environnementales hostiles. Il s'agit d'un processus réversible, le kyste pouvant se transformer de nouveau en trophozoïte lorsque les conditions redeviennent favorables.

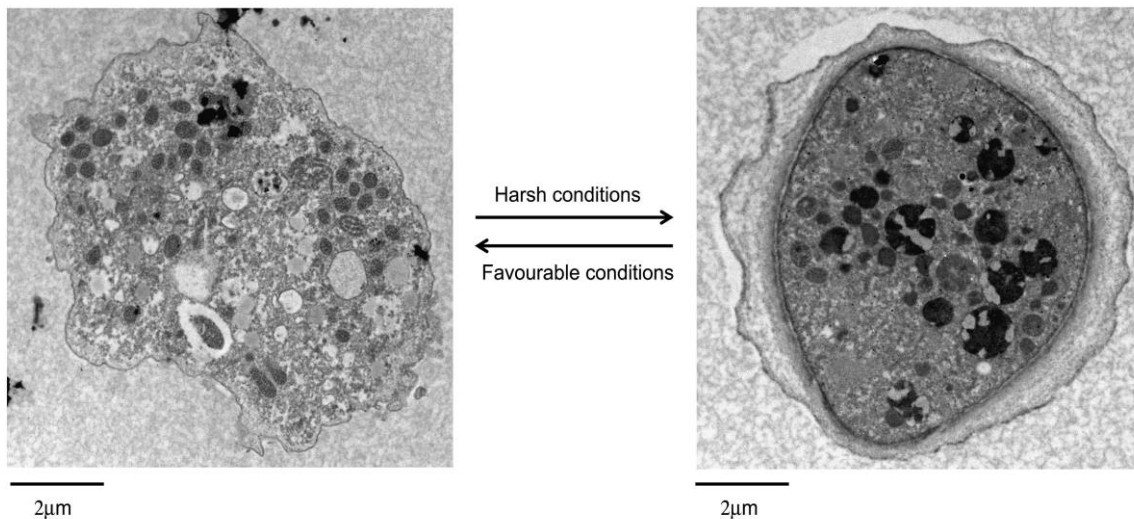


Figure 4: Processus d'enkystement d'*Acanthamoeba*.

Images par microscopie électronique à balayage de trophozoïte (à gauche) en conditions favorables et de kyste (à droite) en conditions défavorables [46]

Les chiffres rapportés par Bowers *et al.* [47] montrent le phénomène de condensation lors de l'enkystement de la souche Neff d'*A.castellanii* : le diamètre du parasite diminue, la souche Neff voit son volume cellulaire diminuer de 80%, sa surface de 65% ; son noyau, quant à lui, perd 40% de son volume et son nucléole 75%.

Forme kystique

Le kyste d'*Acanthamoeba* est ainsi plus petit que le trophozoïte, avec une taille variable comprise entre 15 et 30 μm de diamètre selon l'isolat, et se caractérise par la présence d'une double paroi qui lui confère sa grande résistance dans l'environnement. La paroi du kyste mature est constituée d'une couche externe ou ectokyste, et d'une couche interne ou endokyste. L'ectokyste contient des protéines et des polysaccharides [48] alors que l'endokyste est composé de cellulose. L'endokyste peut adopter une forme variable : il peut être ovale, sphérique, polygonal ou encore étoilé (Figure 6 [49]). Le kyste est uninucléé et possède un noyau rond et central. Il possède également des pores nommés ostioles, situés à la jonction de l'exokyste et de l'endokyste, qui permettent de détecter les variations des conditions environnementales. Grâce à sa morphologie, le kyste d'*Acanthamoeba* représente la forme de résistance du parasite, sa double paroi lui assurant une extrême résistance à de fortes variations de températures, à la dessiccation, aux agressions chimiques et médicamenteuses ainsi qu'à de fortes variations de pH [50,51]. Il peut rester viable plusieurs années dans l'environnement, faisant ainsi perdurer le potentiel pathogène d'*Acanthamoeba* et la transmission des infections [52].

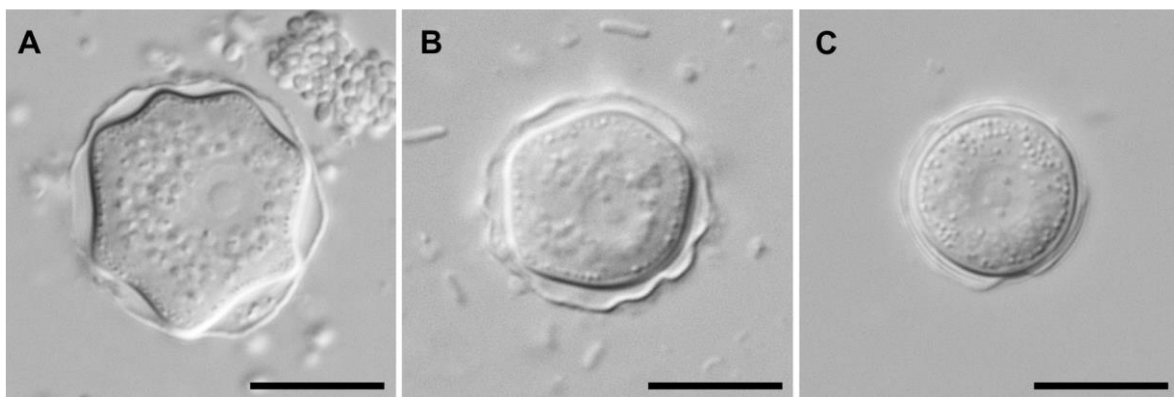


Figure 5: Formes variables d'endokystes d'*Acanthamoeba* par microscopie à contraste d'interférence.

Echelle graphique : 10 μM [49]

I.5 Nutrition d'*Acanthamoeba*

L'alimentation des *Acanthamoebae* se compose de bactéries [53], d'algues, de champignons [54] et d'autres protistes présents sur des surfaces favorisant la formation de biofilms [55], dans divers environnements, et même parfois à l'interface air-eau [56]. Ils se nourrissent selon deux mécanismes différents :

-la phagocytose qui leur permet d'internaliser et d'ingérer des particules et des micro-organismes. Il s'agit d'un processus particulier d'endocytose au cours duquel les pseudopodes vont faciliter la captation de la particule ou du micro-organisme cible qui va être ingéré(e), déclenchant alors la libération d'une substance toxique et la formation d'une vacuole digestive : les éléments sont phagocytés ensemble dans une vésicule, formant ainsi des phagosomes qui vont fusionner avec des lysosomes dans le cytoplasme et permettre la digestion des nutriments ;

-la pinocytose qui est un processus d'endocytose non spécifique, continu lors de la croissance cellulaire. Elle permet d'ingérer, par invagination de la membrane, de grandes quantités de liquides et d'éléments nutritifs dissouts.

Les *Acanthamoebae* peuvent ainsi subvenir à leurs besoins nutritionnels en autonomie. Elles possèdent en outre la capacité d'héberger d'autres micro-organismes, tels que *Legionella* spp. , leur assurant une survie prolongée et une résistance accrue à l'action de certains antibiotiques et antiseptiques [57].

I.6 Pathogénicité humaine

Les Acanthamibes sont impliquées dans plusieurs pathologies humaines. Au cours de leur cycle évolutif, ils peuvent en effet pénétrer dans l'organisme humain par trois voies différentes, expliquant leur implication dans trois principales pathologies humaines (Figure 7) :

-par voie oculaire : à l'origine de **Kératites Amibiennes** (KA) sévères, survenant essentiellement chez des individus sains porteurs de lentilles de contact ;

-par voies respiratoire et cutanée : après pénétration par le tractus respiratoire ou par une lésion de la peau, les *Acanthamoebae* peuvent être à l'origine d'**Amibiases Cutanées**

(AC) et par dissémination hémotogène atteindre le système nerveux central entraînant des cas d'Encéphalites Granulomateuses Amibiennes (GAE) et d'infections disséminées, survenant essentiellement sur terrain débilisé chez des patients immunodéprimés.

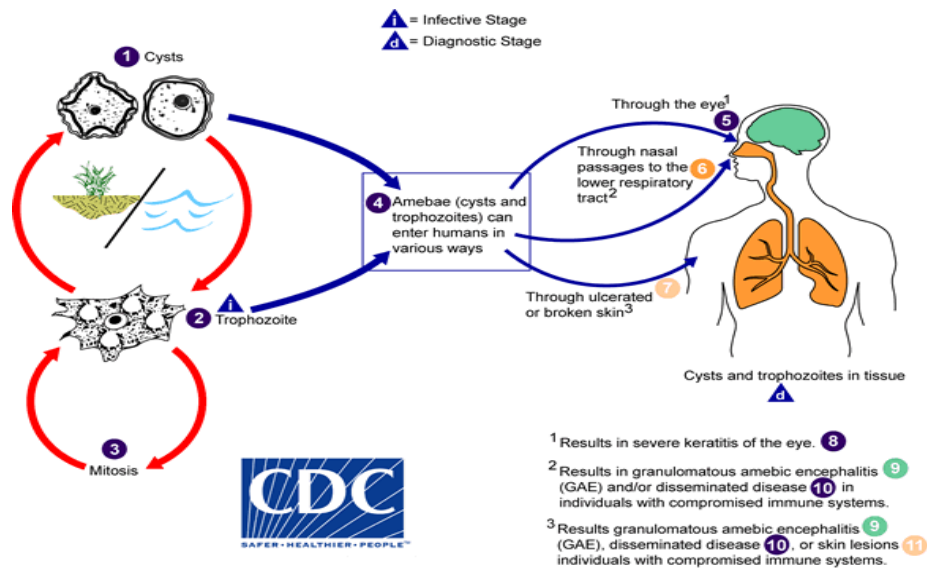


Figure 6: Cycle de vie d'Acanthamoeba

(<https://www.cdc.gov/parasites/Acanthamoeba/pathogen.html>)

D'autres infections humaines à *Acanthamoeba* ont également été rapportées, parmi lesquelles figurent des cas d'otites, de myocardites, de pneumonies, ...

I.6.1 La Kératite Amibienne (AK)

o Epidémiologie

La kératite amibienne est une infection oculaire rare mais sévère, de mauvais pronostic. Elle représente aujourd'hui la pathologie la plus fréquente à *Acanthamoeba* spp..

Rapportée pour la première fois en 1974 par Nagington *et al.* [1] au Royaume-Uni et en 1975 par Jones *et al.* aux Etats-Unis [58], son incidence n'a cessé de croître à travers le monde, le port de lentilles de contact constituant le principal facteur de risque de kératite amibienne . Les chiffres recueillis dans la littérature montrent une incidence plus forte dans les pays développés : le nombre de kératites amibiennes est estimé entre 17.53 et 19.50 cas par million de porteurs de lentilles au Royaume-Uni contre 1,65 à 2.01 cas par million de porteurs de lentilles aux Etats-Unis [59]. En France, 1 cas pour 30 000 porteurs

de lentilles de contact est rapporté en 2007 mais ce chiffre est en constante augmentation [60]. La distribution des *Acanthamoebae* étant ubiquitaire, des cas d'AK ont été décrits dans le monde entier, notamment au Mali [61] et au Ghana [62]. Ces chiffres sont liés à l'exposition à des facteurs de risque (port de lentilles, facteurs environnementaux : températures, ...) mais également à la capacité à détecter l'infection.

- **Facteurs de risque**

La kératite amibienne survient principalement chez des patients immunocompétents. Différents facteurs de risque ont été identifiés, le principal facteur de risque étant le port de lentilles de contact associé à un contact avec de l'eau contaminée [63]. Ils sont répertoriés dans le tableau 3 ci-dessous.

Tableau 3: Facteurs de risque associés à la kératite amibienne (AK) [6]

① Manipulation de lentilles de contact avec des mains sales
② Lavage des lentilles de contact avec de l'eau du robinet ou du sérum physiologique « artisanal »
③ Port de lentilles de contact prolongé au-delà de la durée recommandée
④ Port de lentilles de contact lors de baignades
⑤ Lavage oculaire et/ou ou baignade au contact d'eau contaminée en présence d'un traumatisme cornéen
⑥ Réutilisation de lentilles de contact sans l'entretien approprié
⑦ Durée d'incubation des lentilles de contact dans une solution désinfectante inférieure au temps recommandé
⑧ Utilisation de désinfectants chlorés moins efficaces sur les <i>Acanthamoebae</i>

Il ressort de ce tableau que le port de lentilles de contact constitue bien le principal facteur de risque de kératite amibienne, par la formation d'un biofilm favorisant l'adhésion et la croissance des amibes libres. Cependant, 15 à 20% des cas de kératites amibiennes surviennent chez des non porteurs de lentilles, secondairement à un traumatisme oculaire associé à une exposition à de la terre, de la poussière ou de l'eau contaminée.

- Physiopathologie

L'infection oculaire à *Acanthamoeba* évolue en trois temps : l'adhésion épithéliale, l'invasion stromale et enfin la kératonévrite.

L'adhésion épithéliale est le premier stade de l'infection : les trophozoïtes adhèrent à l'épithélium cornéen par interaction de leurs glycoprotéines avec les glycolipides épithéliaux (Figure 8). S'ensuit l'invasion du stroma cornéen : les trophozoïtes sécrètent une protéase, la MIP133, entraînant la destruction de la barrière épithéliale, puis traversent la membrane de Bowman et lysent le collagène. La production de plusieurs protéases – la MIP133, la collagénase MMP et l'activateur du plasminogène, le Apa – par les trophozoïtes contribue à la destruction du stroma cornéen. Enfin, les trophozoïtes viennent se grouper autour des nerfs cornéens, entraînant des kératonévrites radiaires très douloureuses. L'intensité de la douleur ne serait pas corrélée à la surface de tissu détruit. D'après les études menées *in vitro*, la douleur ressentie serait probablement la résultante de deux éléments combinés, à savoir les réponses chimiotactiques se produisant lors de l'infiltration des cellules nerveuses et l'action destructrice des protéases produites par les trophozoïtes sur le stroma cornéen.

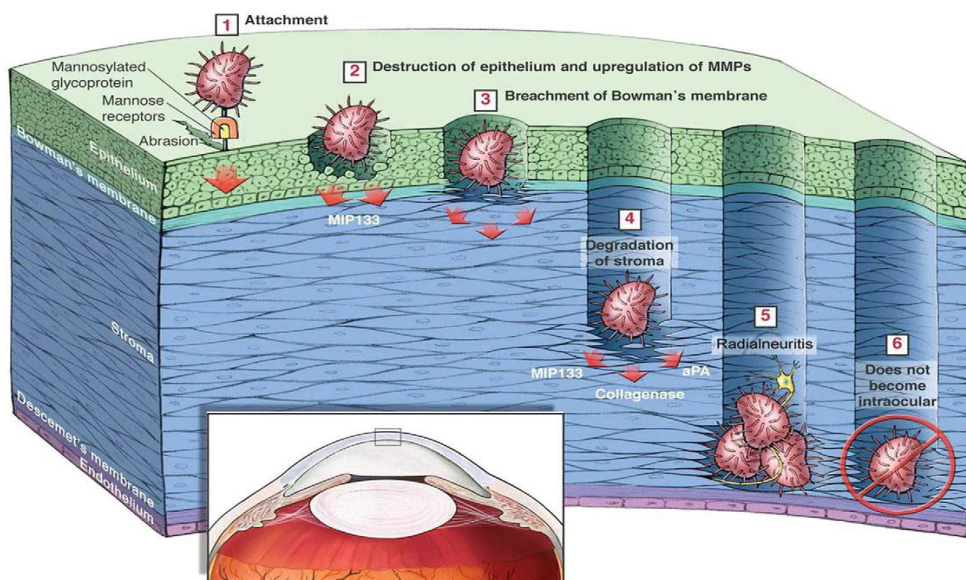


Figure 7: Représentation schématique de la cascade pathogénique de la kératite amibienne

[64].

La cascade pathogénique de la kératite amibienne s'arrêterait avant l'invasion de l'endothélium cornéen et la chambre antérieure de l'œil. Très peu de cas

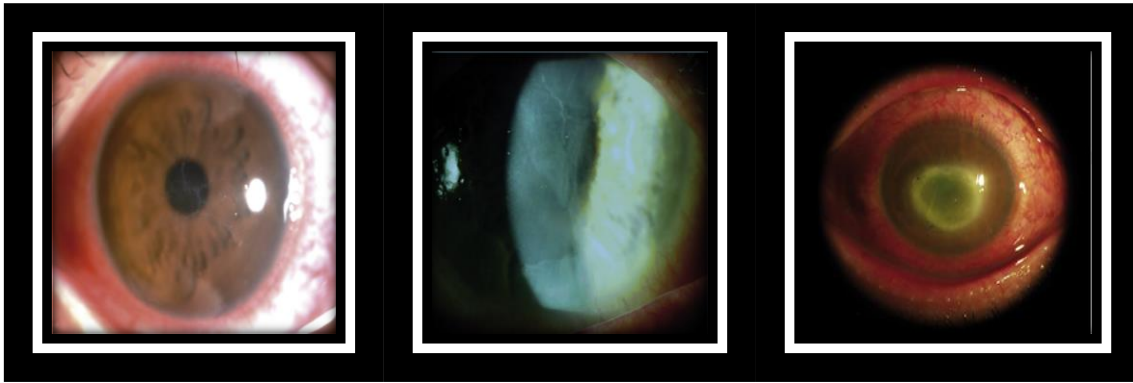
d'endophtalmies à *Acanthamoeba* ont été décrits [65] et encore moins se sont avérés être le résultat de la progression naturelle des trophozoïtes d'*Acanthamoeba* dans l'endothélium cornéen. Il a plus précisément été montré que les trophozoïtes d'*Acanthamoeba* peuvent entrer dans la chambre antérieure de l'œil mais sont immédiatement éliminés par un infiltrat de polynucléaires neutrophiles. Lors d'expérimentations sur des modèles animaux [66], il s'est d'ailleurs avéré que la résolution de kératites amibiennes dépendait essentiellement de l'efficacité de la réponse immunitaire innée médiée par les macrophages et les polynucléaires neutrophiles.

- Clinique

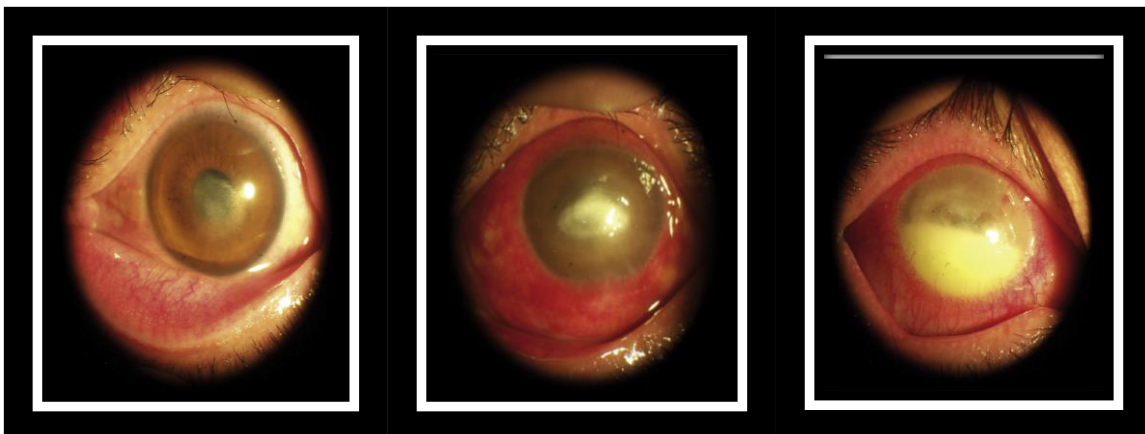
La présentation clinique de la kératite amibienne peut être assez variable et le diagnostic compliqué par une co-infection bactérienne, virale ou fongique.

Dans la majorité des cas, les signes cliniques décrits correspondent à une douleur oculaire très intense, souvent unilatérale – elle peut cependant être bilatérale chez les porteurs de lentilles de contact- associée à la sensation de corps étranger dans l'œil, un larmoiement, une rougeur oculaire et une photophobie. Un œdème palpébral et une baisse de l'acuité visuelle sont fréquemment rapportés. Le diagnostic est souvent confondu avec celui de kératite herpétique ou d'infection à adénovirus mais les éléments évocateurs pour le clinicien sont la douleur exacerbée associée au port de lentilles de contact [6] chez un patient immunocompétent. L'intensité de la douleur peut souvent sembler disproportionnée par rapport aux signes cliniques présents dans les kératites amibiennes débutantes ; cependant, elle est parfois absente, ce qui n'exclut pas pour autant le diagnostic de kératite amibienne.

La présentation clinique de l'abcès cornéen amibien évolue avec le temps lorsque le diagnostic est retardé (Figure 9). Au premier mois, l'affection se caractérise par une atteinte épithéliale comprenant une kératite ponctuée superficielle, des pseudodendrites, des infiltrats épithéliaux et sous-épithéliaux et des infiltrats périnerveux à l'origine de la kératonévrite, quasi pathognomoniques de la kératite amibienne et retrouvés dans plus de 63% des cas rapportés dans les six semaines. Un anneau cornéen immunitaire est décrit dans 20% des cas. Au-delà du premier mois, le stroma cornéen ayant largement diminué, la progression amibienne peut se manifester par une ulcération et une inflammation de la chambre antérieure, parfois associées à un hypopion.



(a)	(b)	(c)
Épithélite	Kératonévrite	Anneau immunitaire



(d)	(e)	(f)
Atteinte stromale antérieure	Atteinte stromale profonde	Atteinte stromale profonde avec hypopion

Figure 8: Photos des différents stades observés dans une kératite amibienne

(a) (b) (c) (d) (e) (f). Les différents stades montrent la progression des trophozoïtes d'*Acanthamoeba*, débutant par une ulcération de l'épithélium cornéen puis une infiltration stromale et une atteinte de la chambre antérieure de l'œil. [67]

Lors d'errance diagnostique prolongée ou de prise en charge tardive, le stroma cornéen étant très aminci, la kératite amibienne peut évoluer vers une perforation de la cornée. Le pronostic visuel est défavorable et le risque d'évolution vers la cécité. Des complications

extracornéennes (cataracte, glaucome, atrophie de l'iris, néovascularisation) peuvent également survenir lors de kératites amibiennes sévères [68]. Si le tableau clinique s'aggrave en cours de traitement, une surinfection bactérienne doit être recherchée.

- **Diagnostic de la kératite amibienne**

Un diagnostic précoce et l'instauration rapide d'un traitement adapté conditionnent la résolution des kératites amibiennes. Une errance diagnostique de trois semaines met en jeu le pronostic visuel du patient.

D'un point de vue clinique, la kératite amibienne doit être systématiquement suspectée chez les porteurs de lentilles de contact, en cas de traumatisme cornéen associé à une exposition tellurique ou à de l'eau contaminée, et en cas d'échec d'un traitement antibactérien et antiviral (anti-Herpes notamment), même si les prélèvements reviennent positifs à un premier micro-organisme. Des infections polymicrobiennes ont en effet été rapportées, à l'image d'un cas d'abcès cornéen à *Acanthamoeba* et *Fusarium oxysporum* décrit chez une femme tunisienne suite à la mauvaise manipulation de ses lentilles [69].

L'examen par microscopie confocale *in vivo* permet de mettre en évidence deux types d'images évocatrices des kystes et des trophozoïtes amibiens. Il repose sur l'analyse *in vivo* des différentes structures cornéennes à l'échelon cellulaire. Les kystes amibiens prennent l'aspect d'images hyperréfléctives rondes ou ovales, de 15 à 20 μm de diamètre, bien limitées, avec une double paroi (Figure 10) [70]. Le second type d'images correspondant aux trophozoïtes montre des structures mesurant de 15 à 45 μm de diamètre avec des contours irréguliers évocateurs de pseudopodes (Figure 11). Des images évocatrices de kératonévrite radiaire sont également visualisées. Selon les données de la littérature, la microscopie confocale *in vivo* montrerait une sensibilité proche de 100% et une spécificité de 84% [71] [72]. Elle présente l'avantage d'être non invasive, rapide et d'orienter rapidement le diagnostic. Cependant, lorsque l'image caractéristique de la double paroi est absente, il est difficile de différencier les images hyperréfléctives des kystes de celles de leucocytes, de champignons ou encore de débris cellulaires. A l'heure actuelle, la microscopie confocale *in vivo* est considérée comme un outil utile au diagnostic des kératites amibiennes en complément des méthodes de laboratoire : des images fortement évocatrices de kystes amibiens permettent d'orienter le diagnostic et d'instaurer rapidement un traitement adapté, en attendant le résultat du

laboratoire et/ou lorsque la PCR est négative ou ininterprétable, améliorant ainsi le pronostic visuel. Elle permet également de détecter des co-infections, notamment fongiques.

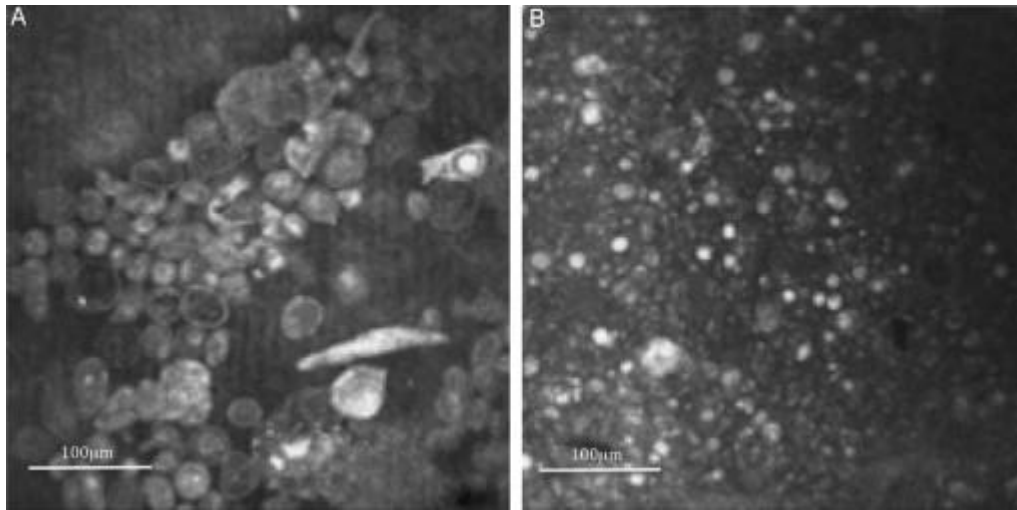


Figure 9: Images évocatrices de kystes amibiens en microscopie confocale in vivo (HRTII-RCM)

[70]

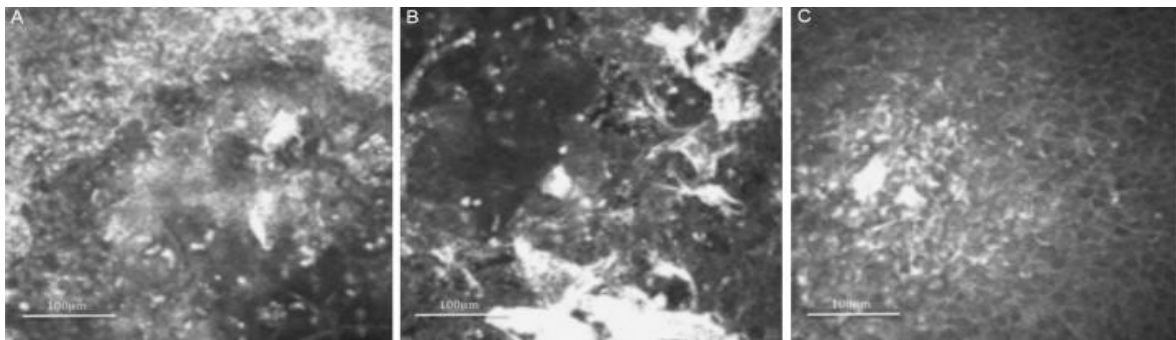


Figure 10: Images évocatrices de trophozoïtes amibiens en microscopie confocale in vivo (HRTII-RCM) : structures à contours irréguliers dans le stroma cornéen [70].

Le diagnostic de référence de la kératite amibienne repose sur l'examen biologique de prélèvements de cornée obtenus par grattage profond ou par biopsie. Quatre types d'analyses sont réalisés au laboratoire sur ces prélèvements : l'examen direct, l'analyse histologique, la culture et la recherche d'ADN d'*Acanthamoeba* par PCR.

La qualité du grattage cornéen est primordiale pour que le prélèvement soit contributif. Le prélèvement est réalisé sous lampe à fente à l'aide de vaccinostyles ou de lames de scalpels stériles, en grattant la cornée en profondeur, à la périphérie des lésions. Plusieurs vaccinostyles sont habituellement utilisés : un vaccinostyle est utilisé pour faire des

étalements sur lame pour l'examen direct, un deuxième est destiné à la culture et enfin un dernier vaccinostyle est conservé dans un tube stérile en vue de la réalisation d'une PCR. Une biopsie cornéenne, plus invasive, est parfois envisagée en cas de forte suspicion diagnostique non documentée sur les produits de grattage cornéen. Les boîtiers de lentilles, leurs liquides de conservation, les solutions désinfectantes et les lentilles elles-mêmes sont également analysés mais la présence d'*Acanthamoeba* sur ces échantillons ne permet pas de poser le diagnostic de kératite amibienne si le parasite n'est pas retrouvé dans les prélèvements cornéens.

L'examen microscopique direct sur lame permet la visualisation de kystes amibiens après coloration au May-Grünwald-Giemsa (MGG) (Figure 12). Ils apparaissent colorés en violet, de taille variable, parfois polygonaux, avec un centre plus clair et une double paroi ; un infiltrat inflammatoire à polynucléaires neutrophiles y est souvent associé. Cependant, lorsque les kystes sont altérés, la lecture de l'examen direct peut s'avérer difficile. Lors de l'analyse histologique, les biopsies cornéennes, une fois coupées et incluses, sont observées au microscope après coloration au MGG ou à l'Hématoxyline-Eosine (HES). Ces techniques de coloration possèdent une sensibilité bien inférieure aux techniques de biologie moléculaire [57].

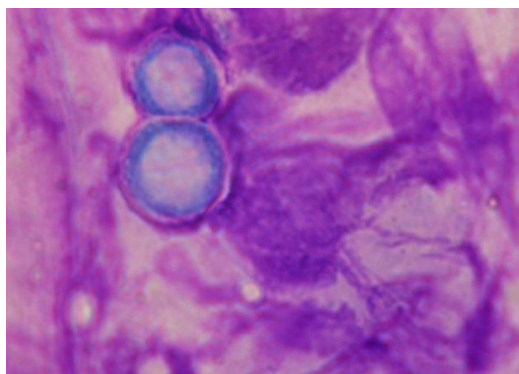


Figure 11: Kystes amibiens colorés au MGG

(Grossissement x 1000)

[67]

La culture des prélèvements cornéens permet l'isolement d'*Acanthamoeba*. De nombreux milieux, notamment des milieux liquides, des milieux contenant de l'agar recouvert de suspensions bactériennes ou différents types de cellules de mammifères, permettent la croissance d'*Acanthamoeba* [43]. En pratique, les produits de grattage sont mis en culture en présence de bactéries : ils sont déchargés à l'aide d'un vaccinostyle sur des géloses à

base d'agar pauvre ou dans des petits flacons pour culture cellulaire contenant 5 mL de NaCl à 0.9%, en présence de suspensions bactériennes d'*Escherichia coli* (ou encore d'*Enterobacter aerogenes* ou de *Pseudomonas*) vivants ou tués. L'incubation se fait sur une durée prolongée (15 à 30 jours selon les laboratoires) et à 30°C. Les cultures sont observées quotidiennement au microscope inversé aux objectifs x20 et x40, en maintenant les boîtes fermées pour empêcher tout risque de contamination. La bonne hydratation des cultures est également vérifiée et une goutte de suspension bactérienne sera ajoutée si besoin. Les trophozoïtes pourront être observés dès le 3^{ème} jour ; les kystes, eux, seront retrouvés entre le 7^{ème} et le 30^{ème} jour. Les lentilles de contact et les culots de centrifugation des liquides de conservation des lentilles peuvent aussi être mis en culture. L'isolement d'*Acanthamoeba* à partir des prélèvements cornéens pose le diagnostic de kératite amibienne, ce qui n'est pas le cas si *Acanthamoeba* n'est isolé qu'à partir des lentilles de contact, de leurs boîtiers, ou de leurs liquides de conservation. Une contamination des boîtiers de lentilles est en effet rapportée chez 5 à 20 % des porteurs asymptomatiques de lentilles de contact. [57]. La sensibilité de la culture, comme celle de l'examen microscopique, pour le diagnostic de la kératite amibienne est faible, évaluée entre 30 et 60%, et d'autant plus faible que les patients ont reçu une antibiothérapie préalable ayant une activité plus ou moins amoebicide [57]. Une culture axénique permet aussi la croissance d'*Acanthamoeba* sur un milieu PYG contenant 2% de protéase peptone, 0.2% d'extrait de levures et 0.1 M de glucose [73].

La biologie moléculaire est maintenant utilisée pour le diagnostic de kératite amibienne. La PCR est directement réalisée sur le produit de grattage cornéen ou la biopsie cornéenne, conservé(e) dans un tube stérile sans ADN ni ARN (Acide Ribonucléique) et immédiatement congelé(e) à -80° C. Elle consiste en l'amplification de l'ADN ribosomal 18S du genre *Acanthamoeba* ou d'ADN mitochondrial. Yera *et al.*, 2012 [57] apporte quelques précisions sur la détection du génome d'*Acanthamoeba* par PCR :

- Des PCR conventionnelles ciblant différentes régions de l'ADNr 18S ont été développées pour diagnostiquer les kératites amibiennes. La PCR directement effectuée sur le prélèvement cornéen a démontré une bonne sensibilité diagnostique de kératite amibienne, évaluée entre 80 et 94% ; elle peut être augmentée par l'utilisation de plusieurs couples d'amorces. Les amorces utilisées pour la PCR conçues par Mathers *et al.*

[74] ont montré une sensibilité de plus de 80% et une spécificité de 100% pour le diagnostic de kératite amibienne dans l'étude de Lehmann *et al.* [75]

-Deux PCR en temps réel TaqMan® ont été utilisées pour le diagnostic de kératite amibienne. La première PCR temps réel est une PCR adaptée à la détection d'*Acanthamoeba* spp. dans les échantillons oculaires, à partir d'une PCR multiplex initialement développée pour la détection de l'amibe et capable de détecter *N.fowleri* et *B. mandrillaris* dans des prélèvements cérébraux [76]. La deuxième PCR temps réel, validée pour les biopsies fixées au formol puis incluses et déparaffinées, cible l'ADNr mt (mitochondrial) 16S d'*Acanthamoeba* spp. et est capable de détecter tous les génotypes de l'American Type Culture Collection (ATCC) [77].

- La plupart des souches d'*Acanthamoeba* spp. peut être détectée dans des échantillons cliniques et environnementaux par une PCR conventionnelle qui cible la région ASA.S1 de l'ADNr 18S d'*Acanthamoeba* spp. avec les amorces JDP1 et JDP2. Cette PCR permet d'identifier le génotype de l'isolat détecté par séquençage et analyse de la région variable DF3 présente dans ASA.S1.

- Des inhibiteurs de PCR ont été identifiés : les collyres utilisés lors de l'examen ophtalmologique (fluorescéine et oxybuprocaine) et le traitement amoebicide Polyhexaméthylène Biguanide (PHMB) ont démontré leur effet inhibiteur dans la détection du génome d'*Acanthamoeba* spp. par PCR. Un rinçage oculaire abondant avec du sérum physiologique avant tout prélèvement cornéen est conseillé à l'ophtalmologiste, ainsi que la réalisation du geste avant l'initiation d'un traitement amoebicide.

-Lors de l'étape d'extraction, il est conseillé de traiter les échantillons avec de la protéinase K pour faciliter la lyse de la double paroi des kystes [78].

○ Traitement de la kératite amibienne

Les objectifs du traitement de la kératite amibienne sont l'éradication des kystes et des trophozoïtes d'*Acanthamoeba* ainsi que la résolution de la réaction inflammatoire. Les trophozoïtes sont sensibles à la plupart des traitements à la différence des kystes amibiens, dont la présence est à l'origine de kératites amibiennes persistantes. Le

protocole conventionnel associe les diamidines et les biguanides reconnus à l'heure actuelle comme les traitements amoebicides les plus efficaces. Des échecs thérapeutiques sont cependant rapportés ; plusieurs hypothèses sont avancées [67]: il est possible que les concentrations intrastromales thérapeutiques ne soient pas atteintes, que les médicaments se lient à certains tissus ou soient inactivés *in vivo* ou bien que les micro-organismes soient plus résistants *in vivo* qu'*in vitro* ; une co-infection bactérienne, fongique ou virale (herpétique par exemple) doit également être recherchée.

Le traitement de la kératite amibienne repose sur un traitement médicamenteux local bien codifié associant des collyres anti-amibiens appartenant à deux familles d'antiseptiques : un biguanide ayant des propriétés amoebicide et kysticide (chlorexidine à 0.02 % ou PHMB à 0.02%) et une diamidine (iséthionate de propamidine à 0.1% Brolene®, hexamidine à 0.1% Desomedine®) [79]. Il est efficace lorsque le diagnostic est précoce. Le protocole d'administration est modulé en fonction de l'atteinte clinique : de façon générale, une dose d'attaque est administrée toutes les heures pendant 48h puis un traitement dégressif est prescrit sur plusieurs mois (Figure 13) [80]. La durée du traitement est prolongée en cas d'atteinte sévère afin d'éviter les rechutes souvent liées à la présence de kystes amibiens. Le recours à des agents imidazolés est réservé aux cas à risque de dissémination, avec une administration par voie générale (fluconazole, voriconazole, kétoconazole ou itraconazole) en raison d'une forte toxicité locale. Connus pour leur action antifongique, ils ont été utilisés de façon empirique dans le traitement des kératites amibiennes. Une étude menée en 2009 par Bang *et al.* [81] rapporte en effet l'amélioration de 3 patients traités par voriconazole en topique à 1% en association aux biguanides et diamidines. Par ailleurs, la prescription de corticoïdes dans la kératite amibienne est controversée : leur administration est habituellement inutile dans les cas pris en charge de façon précoce ; toutefois, une inflammation persistante répond souvent favorablement à l'administration de corticostéroïdes topiques, même à faible dose, en complément du traitement anti-amibien.

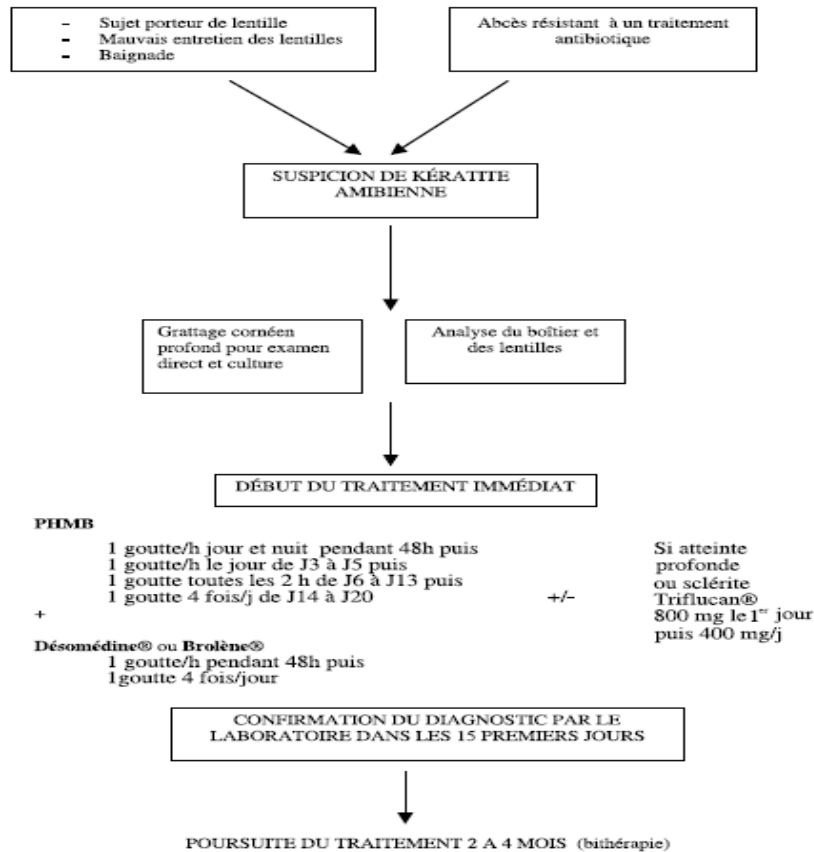


Figure 12: Protocole de traitement de la kératite amibienne à l'hôpital des XV-XX de Paris

[80]

Certaines kératites amibiennes sévères entraînent des cicatrices cornéennes menaçant le pronostic visuel et nécessitent un traitement chirurgical :

Une prise en charge chirurgicale peut avoir lieu :

-la kératoplastie transfixiante ou greffe de cornée n'est plus recommandée comme traitement de la phase aiguë de la kératite amibienne. Elle est indiquée uniquement en cas de perforation cornéenne ou d'abcès amibien fulminant. Elle doit être réalisée à la taille minimale requise pour venir substituer les tissus ulcérés et nécrotiques. Le risque de rejet de greffe est important, survenant essentiellement dans les 2 semaines suivant la chirurgie lorsqu'elle est réalisée sur un œil inflammatoire, et des greffes à répétition sont parfois nécessaires en cas de récurrence de la kératite amibienne. Des récurrences tardives peuvent également survenir plusieurs mois après la chirurgie. Le traitement anti-amibien doit donc être administré avant la chirurgie et poursuivi en post-opératoire à des doses permettant de minimiser ou d'éviter les signes de toxicité. Même si les kératoplasties

thérapeutiques sont rarement utilisées, les kératoplasties transfixiantes (qui permettent le changement de toute l'épaisseur de la cornée) ou lamellaires à visée optique sont souvent réalisées en cas de kératite amibienne laissant des cicatrices cornéennes à l'origine d'une baisse importante de l'acuité visuelle ;

-un débridement épithélial est un geste thérapeutique pratiqué lorsque l'atteinte est uniquement intraépithéliale. Il est réalisé lors du grattage épithélial et favorise la pénétration des collyres.

1.6.2 Autres pathologies liées à *Acanthamoeba* spp.

A la différence de la kératite amibienne, les autres pathologies liées à *Acanthamoeba* surviennent essentiellement chez des patients immunodéprimés. L'encéphalite amibienne granulomateuse (GAE) et l'acanthamoebiose cutanée sont les deux pathologies dues à *Acanthamoeba* les plus fréquemment décrites chez des sujets immunodéprimés ; d'autres atteintes plus rares (pulmonaires notamment) sont décrites dans la littérature.

L'encéphalite amibienne granulomateuse est une infection rare, de mauvais pronostic, se développant habituellement dans un contexte d'immunodépression (HIV, transplantés d'organes, diabète non équilibrés, ...) [82]. L'atteinte cérébrale résulte d'une dissémination du parasite par voie hématogène à partir d'une porte d'entrée à distance (poumon, sinus, peau), ou par voie lymphatique (peau). Sur le plan clinique, la période d'incubation est variable et pourrait durer des semaines voire des mois [38]. L'apparition des signes cliniques est progressive. A la phase d'état, la symptomatologie clinique est très polymorphe, traduisant la présence des amibes dans de multiples régions du cerveau et du cervelet (Figure 14). Les signes cliniques les plus fréquemment décrits sont : des céphalées, une raideur de nuque, des nausées et vomissements, une fébricule, des troubles psychologiques, des troubles visuels, des difficultés d'élocution, des déficits sensitivomoteurs, des convulsions, des troubles de la conscience ou encore un coma. A l'imagerie (TDM cérébral), des lésions multifocales prenant le contraste sont souvent retrouvées dans les zones corticales et sous-corticales, ainsi que des lésions d'aspect pseudotumoral, un œdème et une hydrocéphalie avec un épaississement des méninges. Le liquide céphalo-rachidien (LCR) est purulent, à prédominance lymphocytaire et l'analyse biochimique du LCR montre une hypoglycorachie modérée associée à une légère hyperprotéinorachie. Un examen direct, une culture ou encore une PCR peuvent être

réalisées sur le LCR ou les biopsies cérébrales. La GEA est plus ou moins efficacement traitée par avec une combinaison de molécules associant des dérivés azolés, la miltéfosine, le sulfadiazine, le cotrimoxazole ou encore l'amphotéricine B. Une exérèse chirurgicale des lésions cérébrales peut être pratiquée afin de limiter l'inoculum. En l'absence de traitement efficace, les symptômes évoluent plusieurs semaines, voire plusieurs mois, jusqu'au décès du patient.

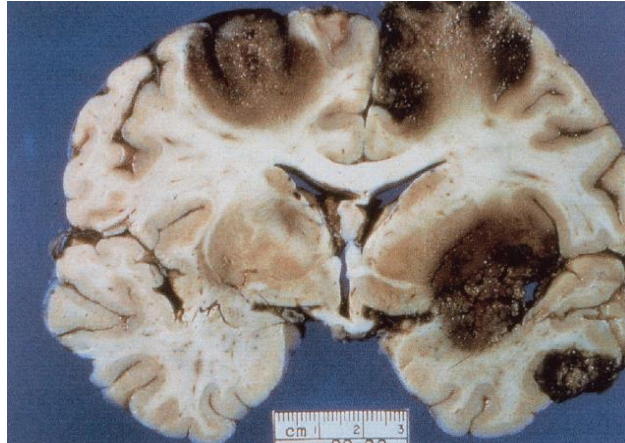


Figure 13: Coupe frontale des hémisphères cérébraux montrant des nécroses corticales et sous-corticales d'un cas humain mortel d'encéphalite granulomateuse amibienne

[83]

L'acanthamoebiose cutanée s'observe chez des patients immunodéprimés (transplantés, patients infectés par le VIH, diabétiques ayant subi un traumatisme cutané, ...). Les lésions cutanées décrites siègent préférentiellement au niveau du tronc et des membres ; leur taille est variable, de quelques millimètres à quelques centimètres voire plus, ainsi que leur aspect, les lésions pouvant former des papulonodules et des nodules érythémateux qui vont progressivement nécroser (Figure 15). Elles sont le plus souvent le signe d'appel d'une infection disséminée. Ces lésions sont habituellement traitées par l'application locale de gluconate de chlorhexidine ou de kétoconazole en crème [84].

La sérologie peut présenter un intérêt dans le dépistage d'infections cutanées, cérébrales ou disséminées à *Acanthamoeba* : les titres sériques d'anticorps anti-*Acanthamoeba* sont mesurés par immunofluorescence indirecte en utilisant comme antigènes des amibes ou des antigènes extraits d'amibes fixés sur des lames. L'interprétation sérologique repose sur l'intensité du titre des anticorps et/ou le suivi de la cinétique des anticorps : des titres élevés d'anticorps (du 1/256 au 1/1024) ou une ascension significative du titre des anticorps sont en faveur d'une infection évolutive, tandis que des taux sériques

d'anticorps relativement faibles (inférieurs à 1/80) sont habituellement retrouvés chez des sujets exposés à *Acanthamoeba* dans l'environnement. Toutefois, chez les patients immunodéprimés, la sérologie ne permet pas d'infirmer le diagnostic [57].

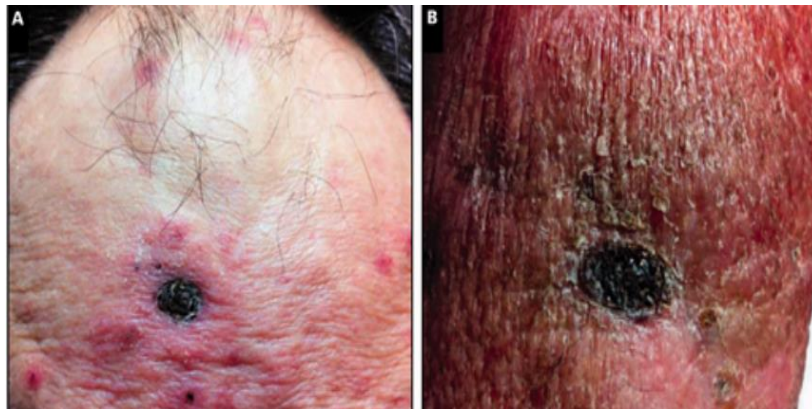


Figure 14: Lésions cutanées sur le front (A) et sur le bras (B) lors d'une infection disséminée à *Acanthamoeba* chez un patient atteint d'une leucémie lymphoïde chronique

[85]

D'autres localisations sont rapportées dans les infections à *Acanthamoeba*. Des cas de sinusites [86], de pneumonies [87], d'otites [88], d'infections disséminées [89] sont décrits dans la littérature chez des patients immunodéprimés.

1..1. *Vermamoeba vermiformis* : une autre amibe libre responsable de kératite amibienne

Vermamoeba vermiformis appartient aux amibes libres et peut être responsable de kératites amibiennes, au même titre que les *Acanthamoebae*. Anciennement dénommé *Hartmanella vermiformis*, il a fait l'objet d'une reclassification taxonomique en 2011, devenant ainsi *Vermamoeba vermiformis*, l'unique espèce représentant le genre *Vermamoeba* [90]. Cette amibe libre possède un caractère ubiquitaire ; elle est fréquemment retrouvée dans les eaux douces (rivières, lacs, lacs artificiels, piscines, ...) et représente l'amibe prédominante dans l'eau du robinet [91].

Vermamoeba vermiformis existe également sous deux formes : trophozoïte et kyste. Chez cette espèce, le kyste possède une double paroi mais l'ectokyste et l'endokyste peuvent fusionner [92]. A la différence du genre *Acanthamoeba*, qui possède des filopodes (pseudopodes fileux) et dont le kyste peut adopter une forme polygonale recouverte d'épines, *Vermamoeba vermiformis* présente des lobopodes et sa forme kystique une paroi lisse et sphérique.

Le premier cas de kératite caus e par *Vermamoeba vermiformis* est décrit en 2013, chez une patiente de vingt-deux ans, porteuse de lentilles, présentant un tableau de kératite unilatérale gauche [93]. Les symptômes incluent une douleur à l'œil, une rougeur, une vision floue, une sensibilité à la lumière et une sensation de corps étranger dans l'œil. L'observation au microscope confocal montre de nombreuses zones d'opacité non spécifique dans les régions stromales et sous-épithéliales antérieures mais aucune structure évocatrice de trophozoïte ou de kyste amibien. Au laboratoire, la culture des lentilles de contact, de leur boîtier et de leur solution désinfectante est réalisée sur une gélose agar non nutritive   1.5% recouverte d'une suspension d'*Escherichia coli* inactivée par la chaleur ; ce milieu est incubé à température ambiante pendant quatorze jours et observé quotidiennement au microscope optique. La culture s'est positiv e après un mois, aucune bactérie ni champignon n'ayant été isolé par ailleurs. A l'examen microscopique des cultures, la morphologie des kystes et des trophozoïtes (Figure 16) a permis d'identifier *Vermamoeba vermiformis* comme agent pathogène de la kératite. Un diagnostic moléculaire est venu conforter ce résultat : après extraction de l'ADN contenu dans les kystes, une PCR utilisant les amorces NA1 et NA2 a été effectuée, suivie d'une électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5% des produits de PCR avec révélation sous lampe UV. L'analyse par séquençage et BLAST (Basil Local Alignment Search Tool) a confirmé la présence de *Vermamoeba vermiformis* dans les kystes. Le traitement de la kératite   *Vermamoeba vermiformis* repose sur l'administration de PHMB à 0.02%.

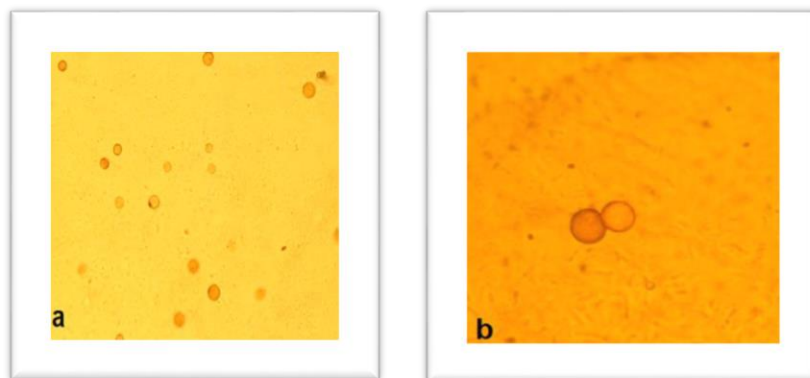


Figure 15: Images au microscope optique de kystes de *Vermamoeba vermiformis* sur gélose agar non nutritive.

Objectif x 400 (a) et x 1000 (b). [93]

I.7 Problématique et objectifs

La kératite à *Acanthamoeba* est désormais reconnue comme une infection oculaire invalidante qui menace le pronostic visuel (lésions pouvant conduire à la cécité définitive voire nécessiter une énucléation). La maladie est associée à une grande variété de symptômes, débutant de façon indolente et évoluant progressivement, avec gêne et inflammations oculaires, photophobie et douleurs intenses de névrite radiale, voire manifestations neurologiques plus étendues. Le diagnostic demeure souvent problématique, car rarement évoqué en première intention. En effet, aux stades précoces de l'infection, les lésions rappellent celles de kératites virales (herpès simplex) ou bactériennes, tandis qu'à un stade avancé, le tableau clinique peut évoquer une kératite fongique. Cependant, tout retard pris pour le diagnostic et le traitement de la kératite amibienne engage de manière décisive le pronostic visuel, et un diagnostic précoce est crucial chez ces patients.

En vue du diagnostic, la méthode consensuelle actuelle repose sur la mise en cultures longues des prélèvements de grattage cornéen et/ou de fluide de lentilles de contact. Des méthodes diagnostiques par amplification génique (PCR) sont utilisées mais elles ne permettent pas actuellement la caractérisation rapide des géotypes pathogènes (en particulier *Acanthamoeba castellanii* T4, T9 et T11). Ainsi, pour le clinicien, les méthodes de laboratoire actuelles sont encore peu adaptées à la détection d'espèces pathogènes et/ou potentiellement résistantes au traitement. Bien que la plupart des ophtalmologistes utilisent des associations d'agents anti-amibiens telles que biguanides et diamidines, des rechutes sont fréquemment observées et des résistances aux anti-amibiens ont été rapportées. Au stade précoce de l'infection, les formes trophozoïtes d'*Acanthamoeba* spp. sont majoritaires au niveau de la lésion par rapport aux formes kystiques, puis cette proportion s'inverse dans les stades plus avancés de la maladie. Les formes trophozoïtes sont sensibles à la plupart des agents chimiothérapeutiques disponibles alors que très peu de ces agents ont un effet kysticide. En vue d'améliorer le pronostic visuel, la combinaison d'agents efficaces doit être couplée avec le développement de méthodes diagnostiques beaucoup plus rapides.

Le MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization–Time Of Flight) s'est récemment avéré être un outil performant pour la caractérisation de micro-organismes pathogènes cultivables. Cette méthodologie paraît en effet, plus rapide, moins coûteuse mais d'un niveau de précision comparable à celle des méthodes d'amplifications géniques. Des spectres spécifiques d'isolats peuvent être produits en quelques minutes, une identification fiable nécessitant pour chaque micro-organisme le recours à une base de données validée et complète des empreintes peptidiques des souches de référence.

Les objectifs de cette étude sont de réaliser par MALDI-TOF une caractérisation protéomique d'isolats de référence d'*Acanthamoeba* spp., et (1) d'initier la création d'une banque de données spectrales, et (2) d'établir l'efficacité de cette méthode pour la détection et la caractérisation d'isolats cliniques d'*Acanthamoeba* pathogènes.

II. Matériels et Méthodes

II.1 Souches de référence et isolats cliniques

Au total, huit souches ont été incluses dans cette étude (Tableau 4). Cinq d'entre elles correspondent à des souches de référence, avec quatre souches d'*Acanthamoeba* : ATCC® 30234™ *A. castellanii*, ATCC® 50495™ *A. polyphaga*, ATCC® PRA-113™ *A. hatchetti*, ATCC® 50690™ *A. lenticulata* ; et une souche de *Vermamoeba* ATCC®50802™ *Vermamoeba vermiformis*. Les trois autres isolats proviennent d'échantillons cliniques obtenus par grattage cornéen de patients symptomatiques présentant un tableau évocateur de kératite amibienne au CHU de Rouen.

Tableau 4 : Récapitulatif des souches incluses dans l'étude

Souche	Référence ou Clinique	Origine
ATCC® 30234™ <i>Acanthamoeba castellanii</i>	Référence	Isolé d'une culture fongique
ATCC® 50495™ <i>Acanthamoeba polyphaga</i>	Référence	Isolé d'une cornée humaine
ATCC®PRA-113™ <i>Acanthamoeba hatchetti</i>	Référence	Isolat clinique humain
ATCC® 50690™ <i>Acanthamoeba lenticulata</i>	Référence	Isolé d'une cornée humaine
ATCC® 50802™ <i>Vermamoeba vermiformis</i>	Référence	Isolé d'une conduite d'eau d'une unité dentaire en Allemagne
Patient 1 <i>Acanthamoeba castellanii</i>	Clinique	Grattage cornéen
Patient 2 <i>Acanthamoeba polyphaga</i>	Clinique	Grattage cornéen
Patient 3 <i>Acanthamoeba</i> spp.	Clinique	Grattage cornéen

II.2 Culture des souches

Toutes les souches ont été mises en culture selon un mode axénique dans du milieu PYG (Peptone Yeast Glucose) contenant tous les nutriments nécessaires à la croissance des amibes. Des antibiotiques ont été ajoutés afin d'éviter toute contamination bactérienne ou fongique (Corning® Antibiotic-Antimycotic Solution, Corning™ 3004CI : 10 000IU Pénicilline, 10 000 µg/mL Streptomycine, 25 µg/mL Amphotéricine B). Les cultures ont ainsi été incubées à 30°C et observées quotidiennement au microscope inversé.

Les trophozoïtes observés au microscope inversé ont été étudiés à J1, J3 et J5. Le protocole pour les récupérer de leur milieu PYG comprend les étapes suivantes. Les fioles sont d'abord placées dans la glace pendant 15 minutes afin de faciliter le décolllement des trophozoïtes puis grattées mécaniquement à l'aide d'une raclette. La suspension parasitaire est ensuite transférée dans un tube à fond conique Falcon® et centrifugée pendant 10 minutes à une vitesse de 1600 g à 20°C. Puis, le surnageant est éliminé et le culot remis en suspension dans du PBS (Phosphate Buffered Saline). La suspension finale est enfin transférée dans un microtube Eppendorf® et conservée à +4°C, en vue de l'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Les kystes sont obtenus en mettant les amibes en suspension dans le PBS qui favorise le processus d'enkystement. Les kystes sont observés au microscope inversé. Le protocole pour les recueillir du PBS est similaire à celui des trophozoïtes, à l'exception de l'étape d'incubation dans la glace, qui n'est pas pratiquée pour les kystes. La suspension finale est aussi transférée dans un microtube Eppendorf® et conservée à +4°C.

II.3 Génotypage des souches

L'extraction de l'ADN, son amplification par PCR puis le séquençage utilisant une Big-Dye PCR ont permis l'étude génotypique des huit souches d'amibes.

L'extraction est réalisée selon les recommandations fournies avec le kit EZ1® DNA Tissue Kit (Qiagen). Un prétraitement des échantillons est effectué avant l'extraction de l'ADN proprement dite. Le prétraitement englobe toutes les étapes qui permettent la lyse de la membrane parasitaire ou paroi kystique. Il permet la dégradation des lipides, des

polysaccharides et des protéines. Lors de la première étape, 180 µL de tampon G2 (tampon de lyse) sont ajoutés aux échantillons. Puis viennent s'ajouter 20 µL de protéinase K qui assure la déprotéinisation. Le mélange est ensuite vortexé et incubé 15 minutes à 56°C. Les échantillons sont alors prêts pour l'extraction. L'extraction d'ADN est réalisée par l'automate EZ1 Advanced XL (Qiagen) selon le programme « DNA Tissue Kit ». Les extraits obtenus sont congelés et conservés à -20°C.

L'amplification des extraits obtenus se fait selon une PCR classique utilisant les amorces Acanth18sF892C et Acanth18sRJD2. Le mélange réactionnel nécessaire à l'amplification se compose de : dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), d'amorces sens et anti-sens, de Taq Polymerase qui est l'enzyme permettant la synthèse du brin complémentaire de l'ADN, du tampon de la Taq Polymerase et enfin d'eau dépourvue de DNase et de RNase. Les produits d'amplification sont ensuite révélés sous rayons ultraviolets grâce à un agent intercalant présent dans le gel d'électrophorèse, le Midori, qui a la capacité de se lier à l'ADN double brin et de fluorescer sous UV.

Le séquençage des amplicons repose sur la méthode de Sanger : le principe consiste à synthétiser le brin complémentaire à l'aide d'amorces sens et anti-sens, de dNTP, de ddNTP (didésoxyribonucléotides) fluorescents et d'une ADN polymérase. Ces ddNTP une fois incorporés au brin d'ADN bloquent la poursuite de l'élongation. De nombreux brins d'ADN de tailles variables, tous terminés par un ddNTP fluorescent sont ainsi obtenus puis séparés en fonction de leur taille. La lecture de la séquence peut alors avoir lieu.

En pratique, quatre étapes se succèdent pour obtenir la caractérisation génotypique des souches par séquençage :

-Une purification post-amplification par l'enzyme ExoSAP-IT PCR Product Cleanup permet d'éliminer les résidus contaminants (dNTPS, ADN simple brin et amorces) ;

-Une PCR séquençage ou Big-Dye PCR qui utilise une stratégie de marquage de terminaison. Le mélange réactionnel contient 0.7 µL de Taq Big Dye, 1.5 µL de tampon 5X Big Dye, 1 µL d'amorces sens Acanth18sF892C et anti-sens Acanth18sRJD2 à 3.2 µM, 1 µL du produit PCR purifié et 5.8 µL d'eau dépourvue de RNase et DNase. L'amplification d'ADN est réalisée selon le protocole décrit dans le tableau 5 :

Tableau 5: Profil d'amplification du PCR séquençage sur le thermocycleur

Phases	Température (°C)	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	96	1 min	1
Dénaturation	96	10 s	40
Hybridation et élongation	65	2 min	

-Une purification des produits de réaction de séquence sur résine Sephadex® G-50 Super fine permet d'éliminer les nucléotides non incorporés et les amorces en excès. Elle se fait sur colonnes de résine Sephadex® G50 dans des plaques MultiScreen ; la limite d'exclusion de la résine G50 est d'environ 20 bases ;

- Les réactions de séquence une fois purifiées sont analysées sur l'automate ABIprism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) (Figure 17). Les séquences obtenues sont inspectées et contrôlées par le logiciel 4Peaks puis comparées avec les séquences sur GeneBank avec BLAST.



Figure 16: Automate séquenceur ABIprism 3100 Genetic Analyzers (Applied Biosystems)

II.4 Caractérisation protéomique par spectrométrie de masse MALDI-TOF

II.4.1 Préparation des échantillons et extraction protéique

Les cultures sont systématiquement observées au préalable au microscope inversé, afin d'observer les caractères morphologiques et les stades des amibes présents dans les fioles. L'objectif est de standardiser le recueil des amibes pour obtenir des spectres homogènes.

Deux protocoles de préparation et d'extraction protéique des échantillons sont testés dans l'étude. Ils sont décrits dans le tableau 6.

Tableau 6: Protocoles d'extraction protéique des échantillons testés dans l'étude

Protocole 1	Protocole 2
<ul style="list-style-type: none">-Lavage de la suspension d'amibes avec 1 mL de PBS. Centrifugation à 5000 g pendant 1 minute et élimination du surnageant. L'étape est répétée une seconde fois ;-Reprise du culot dans 1 mL d'eau distillée ;-Centrifugation à 5000g pendant 1 minute ;-Élimination du surnageant et ajout de 300 µL d'éthanol à 70% ;-Centrifugation à 13000g pendant 10 minutes ;-Séchage à l'air pour laisser l'éthanol s'évaporer ;-Reprise du culot avec 20 µL d'acide formique et 20 µL d'acétonitrile ;-Ajout de billes de verre et mélange au vortex ;-Centrifugation à 13000g pendant 1 minute ;-Dépôt de 1 µL de surnageant sur la cible (plaque de 96 places Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). Séchage à l'air libre ;-Ajout de 1 µL de matrice acide α-cyano-4-hydroxycinnamique. Séchage à l'air libre.	<ul style="list-style-type: none">-Lavage de la suspension d'amibes avec 1 mL de PBS. Centrifugation à 5000 g pendant 1 minute et élimination du surnageant. L'étape est répétée une seconde fois ;-Ajout de 300 µL d'eau distillée et de 900 µL d'éthanol absolu à la suspension d'amibes ;-Centrifugation à 13000g pendant 10 minutes ;-Élimination du surnageant et séchage à l'air libre ;-Ajout de 20 µL d'acide formique à 70% et de 20 µL d'acétonitrile et mélange au vortex ;-Dépôt de 1 µL de surnageant sur la cible (plaque de 96 places Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). Séchage à l'air libre ;- Ajout de 1 µL de matrice acide α-cyano-4-hydroxycinnamique. Séchage à l'air libre

Pour chaque protocole, chaque échantillon est déposé sur quatre spots de la plaque.

I.4.2 Paramètres utilisés sur spectromètre de masse MALDI-TOF

Les spectres sont acquis sur un spectromètre de masse Microflex MALDI-TOF (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany), à l'aide du logiciel Flex Control (Bruker Daltonik GmbH, Germany), dans la gamme de masse allant de 2000 à 20000 Da. Les profils protéiques sont obtenus avec 240 tirs de laser sur chaque puits, ciblant six régions différentes du puits avec une fréquence de 40 tirs par pulse. Les spectres subissent ensuite un traitement avec le logiciel Flex analysis (version 3.3, Bruker Daltonik), qui consiste à soustraire la ligne de base et à lisser les spectres.

III. Résultats

III.1 Génotypage

Pour s'assurer de la bonne amplification des extraits des huit souches d'amibes, les amplicons sont révélés sur un gel d'agarose contenant le Midori comme agent intercalant et exposé sous lampe UV (Figure 18).

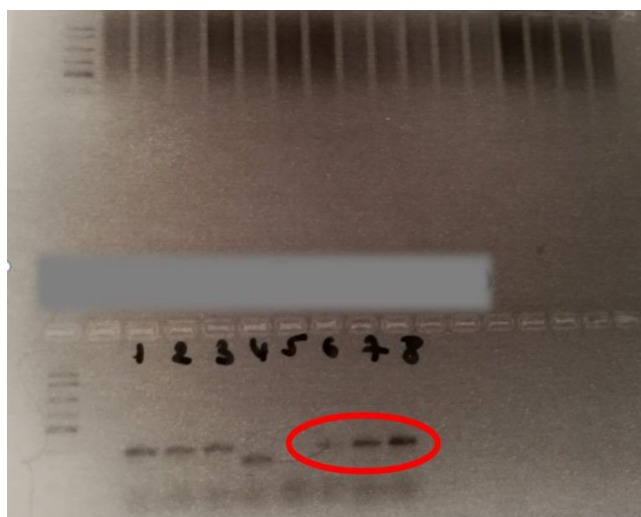


Figure 17: Révélation des amplicons des huit souches d'amibes sur gel d'agarose contenant du Midori et exposé sous lampe UV

(1 : ATCC® 30234™ *A. castellanii*, 2 : ATCC® 50495™ *A. polyphaga*, 3 : ATCC® PRA-113™ *A. hatchetti*, 4 : ATCC® 50802 *V. vermiformis* ; 5 : ATCC®50690™ *A. lenticulata*, 6 : patient 1 ; 7 : patient 2 ; 8 : patient 3)

La révélation des amplicons confirme l'amplification de tous les extraits amibiens et montre une différence de migration entre les souches d'*Acanthamoeba* et celle de *Vermamoeba vermiformis*.

Après avoir comparé les séquences obtenues sur Genbank avec Blast, les sept souches d'*Acanthamoeba* ont toutes révélé leur appartenance au génotype T4, et la souche de *Vermamoeba* a bien été identifiée comme un isolat de *Vermamoeba vermiformis*.

III.2 Analyse spectrale des souches par spectrométrie MALDI-TOF

III.2.1 En fonction du protocole d'extraction

Deux protocoles de préparation et d'extraction protéique des échantillons ont été testés. Les spectres sont classés selon l'aspect de leurs tracés en spectres exploitables, spectres de qualité moyenne et spectres non exploitables. Les résultats sont répertoriés dans le tableau 7 ci-dessous.

Tableau 7: Tableau récapitulatif des résultats des spectres obtenus avec les 2 extractions

Nb de spectres exploitables (+ moyens)	Extraction 1				Extraction 2			
	J1	J3	J5	Kystes	J1	J3	J5	Kystes
ATCC®30234™ <i>A.castellanii</i>	0	1 (+1)	1 (+2)	0	4	1 (+2)	1 (+3)	0
ATCC®50495™ <i>A.polyphaga</i>	0	4	4	0	4	2 (+1)	4	0
ATCC® PRA-113™ <i>A.hatchetti</i>	0	4	3 (+1)	0	4	1 (+3)	1 (+3)	0
ATCC™ 50690™ <i>A.lenticulata</i>	0	0	0	0	3	4	4	0
Patient 1	0	3 (+1)	3 (+1)	0	4	4	1 (+3)	0
Patient 2	4	4	4	0	4	4	4	0
Patient 3	4	3 (+1)	4	0	4	4	4	0
ATCC®50802™ <i>V.vermiformis</i>	0	4	3 (+1)	0	4	4	4	0
Total	8	23 (+3)	22 (+5)	0	31	24 (+6)	23 (+9)	0
Jour-Extraction								
Total Extraction		53 (+8)		0	78 (+15)		0	

Sur la totalité des 256 spectres, 102 spectres n'ont pas été conservés car la mauvaise qualité de leurs tracés empêchait toute interprétation. L'analyse est donc réalisée sur 154 spectres incluant 86 spectres de souches de référence et 68 spectres de souches de patients.

Les données répertoriées dans le tableau 7 montrent :

-avec l'extraction 1 : à J1, seuls 8 spectres sur 32 sont exploitables et ne concernent que deux souches, à savoir celles des patients 2 et 3. A J3, sur les 32 dépôts (4 dépôts pour chacune des 8 souches), 23 spectres exploitables sont obtenus et 3 de qualité moyenne ; il est à souligner que pour *A. lenticulata*, tous les spectres ont été éliminés à J3 car leur tracé ne permettait aucune interprétation. A J5, 22 spectres sont exploitables et 5 de qualité moyenne ; de plus, de même qu'à J3, tous les spectres de *A. lenticulata* ont été éliminés. En ce qui concerne les kystes, aucun spectre n'est exploitable ;

-avec l'extraction 2 : à J1, 31 spectres sur 32 sont exploitables. A J3, sur les 32 dépôts, 24 spectres exploitables sont obtenus et 6 de qualité moyenne. A J5, 23 spectres sont exploitables et 9 de qualité moyenne. En ce qui concerne les kystes, aucun spectre n'est exploitable.

Au total, sur les 96 spectres de trophozoïtes étudiés à J1, J3 et J5, l'extraction 2 permet l'obtention de 78 spectres exploitables et 15 de qualité moyenne versus 53 spectres exploitables et 8 spectres de qualité moyenne avec l'extraction 1. Pour les kystes, aucun spectre exploitable n'est obtenu, qu'il s'agisse de l'extraction 1 ou de l'extraction 2.

Le protocole de préparation et d'extraction protéique des échantillons retenu est par conséquent le protocole 2.

III.2.2 En fonction du stade du parasite

Comme évoqué ci-dessus, les données montrent l'obtention de spectres exploitables pour les trophozoïtes. Pour les kystes, les tracés des spectres étant de mauvaise qualité, aucun spectre n'a pu être retenu.

III.2.3 En fonction du parasite (parasite, genre, espèce, génotype)

Les spectres sont analysés « banque contre banque ». Pour ce faire, ils sont soumis à une analyse par le logiciel MSI qui confronte les spectres banque contre banque et définit des scores d'identification grâce à un algorithme créé par le Professeur Renaud Piarroux.

En analysant les spectres banque contre banque :

- Contre une banque fongique contenant plus de huit cents références spectrales de levures et de champignons filamenteux, les scores d'identification sont très faibles n'excédant pas une valeur de 13, sachant qu'un seuil à 20 est retenu pour considérer comme fiable une identification fongique au regard bien évidemment de l'aspect macroscopique et microscopique des colonies. La discrimination *Acanthamoeba* versus champignon est par conséquent très bonne ;
- Contre une banque de Leishmanies, les scores d'identification sont également très faibles atteignant au maximum la valeur de 13. L'intérêt de cette confrontation consiste à étudier la capacité de discrimination d'un protozoaire à l'autre. Les résultats montrent que les profils protéomiques des *Acanthamoebae* permettent, au sein des protozoaires, une excellente discrimination avec *Leishmania* ;
- Au niveau du genre : avec un score de 100, l'algorithme montre une excellente discrimination au genre entre *Vermamoeba* d'un côté et *Acanthamoeba* de l'autre. Les résultats sont répertoriés dans le tableau croisé dynamique ci-dessous (tableau 8) :

Tableau 8: Tableau croisé dynamique des scores d'identification obtenus avec le logiciel MSI en confrontant les spectres des souches de référence d'*Acanthamoeba*.

x	AC1	AC3	AC5	AP1	AP3	AP5	AH1	AH3	AH5	VV1
AC1	100	37,66	45,47	49,7	34,07	53,78	33,11	54,57	33,3	0
AC3	37,3	100	37,88	33,16	29,32	33,67	20,02	30,15	22,47	0
AC5	44,15	33,9	100	38,48	28,87	34,96	36,35	36,99	36,26	0
AP1	47,78	34,31	38,51	100	49,59	60,61	68,27	61,95	39,09	0
AP3	32,16	26,94	29,8	49,36	100	49,06	48,3	45,88	40,8	0
AP5	49,35	32,71	38,16	60,81	49,04	100	42,21	62,2	40,74	0
AH1	33,11	20,02	36,35	65,08	48,29	40,83	100	52,3	39,99	0
AH3	44,19	27,58	37,17	64,08	47,79	60,6	53,28	100	41,51	0
AH5	30,78	25,19	33,55	36,66	39,26	39,74	39,99	40,7	100	0
VV1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100

(AC: *A. castellanii*, AP: *A. polyphaga*, AH : *A. hatchetti*) et de *Vermamoeba* (VV : *V. vermiformis*) (les chiffres 1, 3 et 5 correspondent à l'étude des trophozoïtes à J1, J3 et J5 de culture)

Les spectres des 2 genres d'amibes libres *Vermamoeba* et *Acanthamoeba*, qui sont visualisés dans la figure 19, ne présentent en effet pas de similarité graphique et aucun pic en commun.

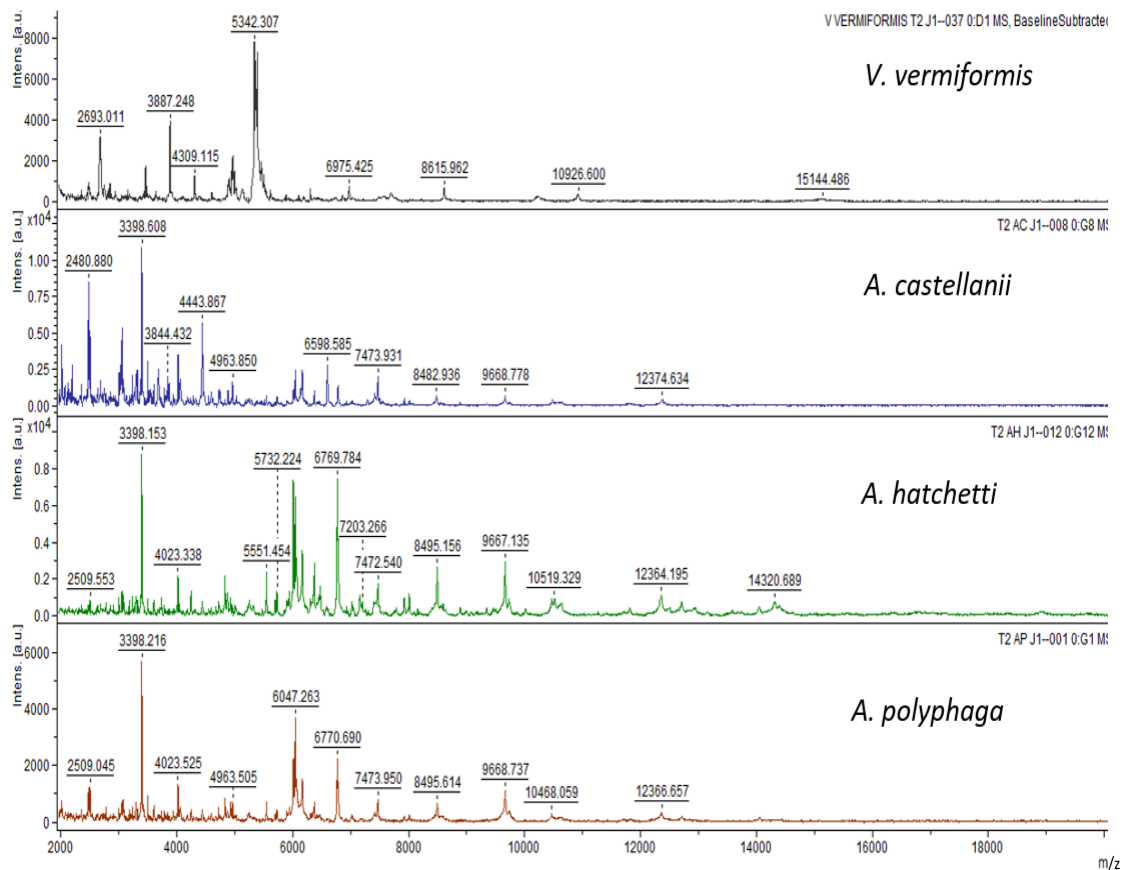


Figure 18: Comparaison des spectres de *Vermamoeba vermiformis* et d'*Acanthamoeba* (*A. castellanii*, *A. hatchetti* et *A. polyphaga*) par spectrométrie de masse MALDI-TOF

-Au niveau de l'espèce : en confrontant les souches de référence d'*Acanthamoeba* les unes contre les autres, le logiciel MSI obtient des scores très élevés entre les espèces d'*Acanthamoeba*. Les intervalles présentés dans le tableau 9 sont définis en comparant les espèces d'*Acanthamoeba* à J1, J3 et J5 : ainsi, les spectres d'*A.castellanii* à J1 sont comparés à ceux d'*A. hatchetti* à J1 (score = 33.11), puis les spectres d'AC à J3 sont comparés à ceux d'AH à J3 (score 1 = 30.15 AC/AH et score 2 = 27.58 AH/AC) et de même à J5 (score AC/AH = 36.26 et score AH/AC = 33.55) et l'intervalle est alors défini à partir de tous les scores à J1, J3 et J5, soit un intervalle compris entre 27 et 37.

Tableau 9: Scores obtenus en analysant les spectres d'*Acanthamoeba* espèce contre espèce

Espèce 1 / Espèce 2	Score
<i>A. Castellanii</i> / <i>A. hatchetti</i>	27 < Score < 37
<i>A. Castellanii</i> / <i>A.polyphaga</i>	26 < Score < 50
<i>A. Polyphaga</i> / <i>A. hatchetti</i>	Scores > 39
<i>A. lenticulata</i> / <i>A. polyphaga</i>	30 < Score < 37
<i>A. lenticulata</i> / <i>A.hatchetti</i>	20 < Score < 34
<i>A. lenticulata</i> / <i>A. castellanii</i>	25 < Score < 38

Les valeurs élevées obtenues permettent d'avancer que les profils protéomiques des *Acanthamoebae* possèdent probablement un pattern commun mais ces profils ne permettent pas une bonne discrimination à l'espèce, et ce quel que soit le jour de recueil des trophozoïtes.

La comparaison des spectres des patients avec la banque de référence donne les résultats suivants (tableau 10).

Tableau 10: Résultats obtenus en comparant les spectres des patients avec la banque de référence

Isolat clinique	J1	J3
Patient 1 <i>A.castellanii</i>	<i>A.polyphaga</i> (Score > 30)	Plusieurs espèces ([19-23])
Patient 2 <i>A.polyphaga</i>	<i>A.polyphaga</i> ([31-42])	<i>A.hatchetti</i> ([31-49])
Patient 3 <i>Acanthamoeba</i> spp.	<i>A. polyphaga</i> ([36-38]) <i>A.castellanii</i> ([27-30])	<i>A. polyphaga</i> (Score = 30) <i>A.lenticulata</i> (Score = 30)

-Pour le patient 1 (identifié en *A. castellanii* par biologie moléculaire) : le profil protéomique identifie *A. polyphaga* à J1 (score > 30) et donne plusieurs espèces à J3;

-pour le patient 2 (identifié en *A. polyphaga* par biologie moléculaire) : le profil protéomique identifie *A. polyphaga* à J1 (score : [31-42]) et *A. hatchetti* à J3 (score : [31-49]) ;

-pour le patient 3 (identifié en *Acanthamoeba* spp. par biologie moléculaire) : le profil protéomique donne 2 identifications à J1 en *A. polyphaga* (score = [36-38]) et *A. castellanii* ([27-30]) ainsi qu'à J3 en *A. polyphaga* (score = 30) et *A.lenticulata* (score = 30).

Les résultats obtenus avec les patients conduisent au constat déjà établi en comparant les souches de référence entre elles : en effet, au vu des discordances entre la biologie moléculaire et la spectrométrie de masse, il semblerait de nouveau que l'identification au rang d'espèce par spectrométrie de masse MALDI-TOF ne soit pas fiable.

L'analyse graphique des spectres par le logiciel Flex Analysis révèle la présence de pics communs aux 7 souches d'*Acanthamoeba* étudiées (Figures 20, 21 et 22).

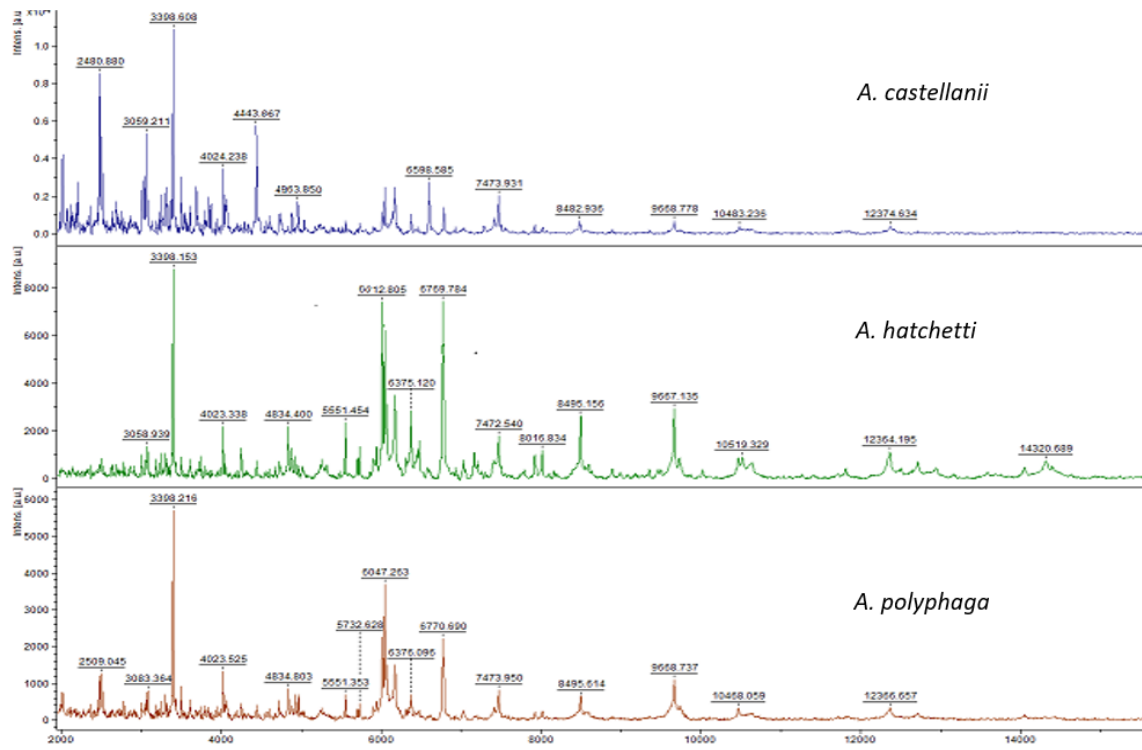


Figure 19: Analyse graphique des spectres de trois souches de référence d'*Acanthamoeba* (*A. castellanii*, *A. hatchetti* et *A. polyphaga*)

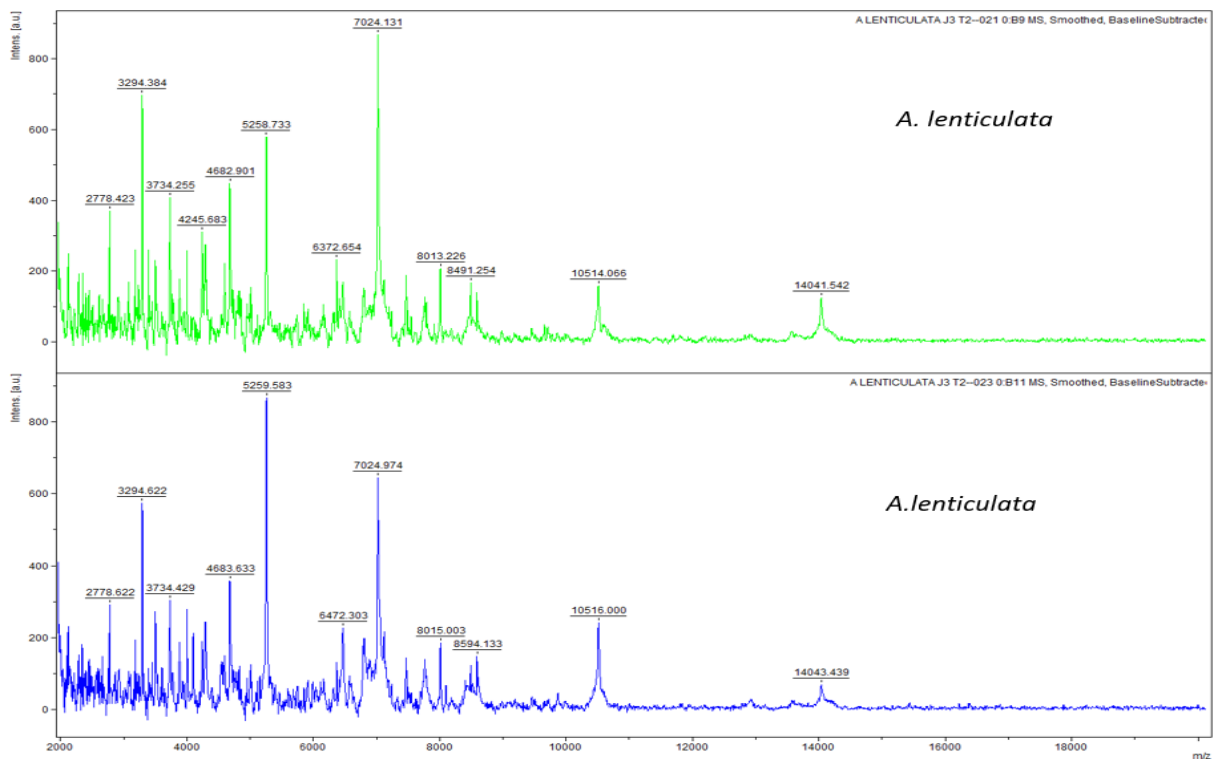


Figure 20: Analyse graphique des spectres de la souche de référence de *A. lenticulata*

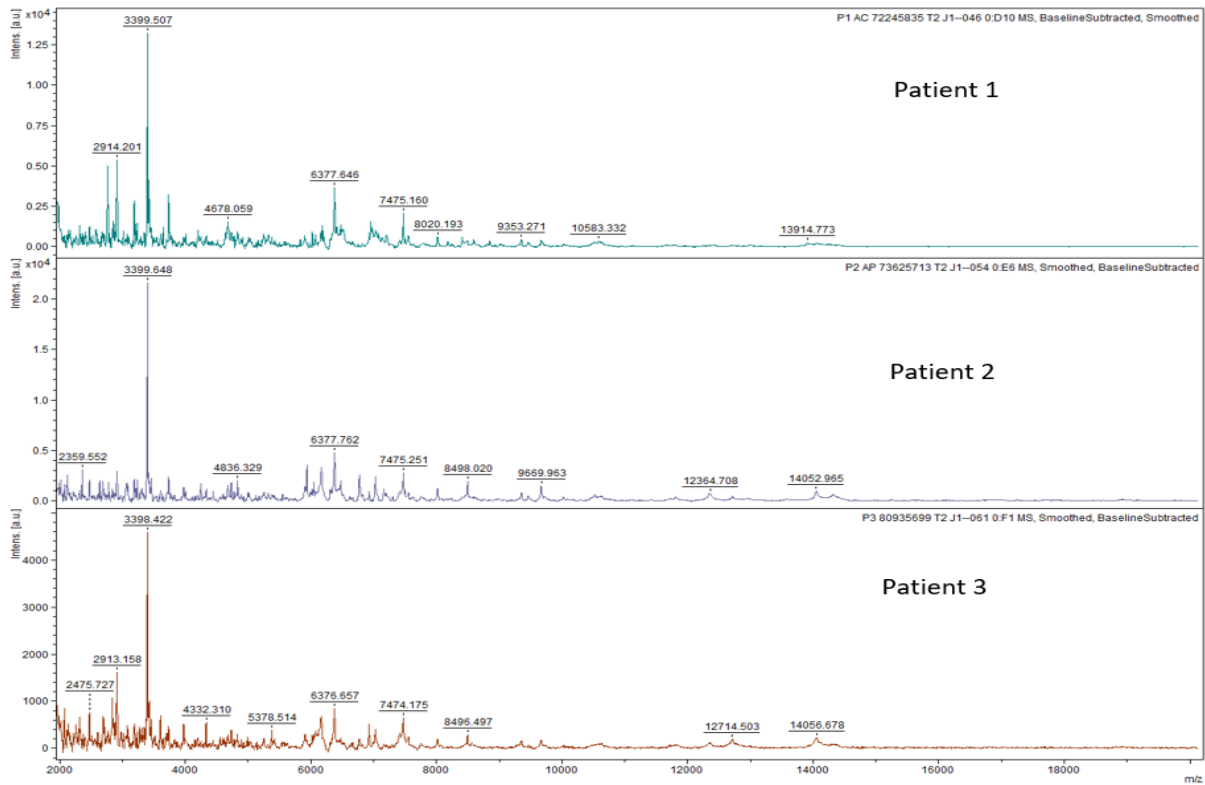


Figure 21: Analyse graphique des spectres des trois souches d’*Acanthamoeba* de patients

Plusieurs pics sont retrouvés dans les isolats d’*Acanthamoeba* étudiés. Parmi eux, trois pics sont communs à tous les isolats et correspondent aux pics 3398, 6375 et 7475 Da. Les pics les plus fréquemment retrouvés sont recensés dans le tableau 11.

Tableau 11: Pics communs aux souches d’*Acanthamoeba* étudiées

m/z (Da)	3059	3398	4024	4834	5551	6375	7475	8495	9668
<i>A.castellanii</i>	X	X	X	X	X	X	X		X
<i>A.hatchetti</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>A.polyphaga</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>A.lenticulata</i>		X				X	X	X	
Patient 1		X				X	X		
Patient 2	X	X		X	X	X	X	X	X
Patient 3		X				X	X	X	

-Au niveau du génotype : toutes les souches testées appartiennent au génotype T4 et possèdent des spectres présentant visuellement un tracé assez similaire. Cependant, l'étude n'inclut que des isolats de génotype T4 et l'identification d'un « pattern » avec des pics spécifiques au génotype T4 nécessiterait de comparer les souches de génotype T4 avec des isolats d'autres génotypes.

III.2.4 Répétabilité et reproductibilité

Les isolats étudiés ont été déposés à raison de quatre spots sur une plaque et les manipulations à J1, J3 et J5 ont été répétées plusieurs fois afin de s'assurer de la constance des résultats obtenus. Les spectres obtenus montrent des tracés très similaires d'un dépôt à l'autre sur une même plaque ainsi que lors de la répétition des manipulations. Ces données prouvent la répétabilité et la reproductibilité de la technique et permettent d'envisager la perspective de créer une banque de spectres d'*Acanthamoeba*.

III.2.5 En fonction du temps de culture

Les trophozoïtes d'*Acanthamoeba* sont testés à partir de culture axénique à J1, J3 et J5.

Les spectres des trois souches de référence *A. polyphaga*, *A. hatchetti* et *A. castellanii* à ces différents temps de culture sont visualisés ci-dessous.

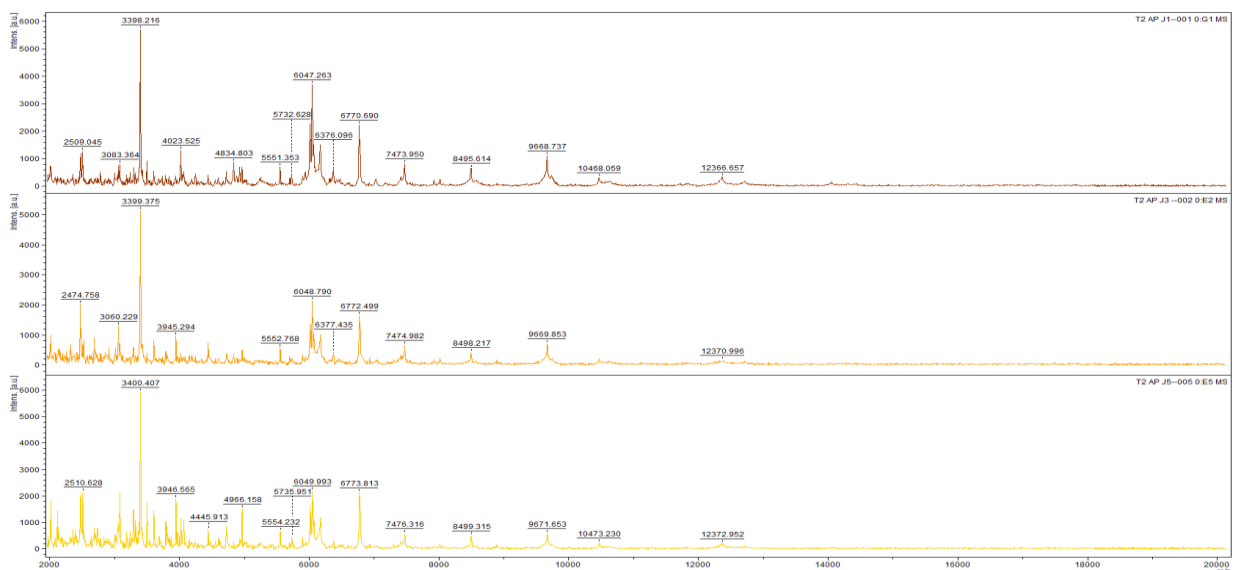


Figure 22: Spectres d'*Acanthamoeba polyphaga* à J1, J3 et J5 sur MALDI-TOF

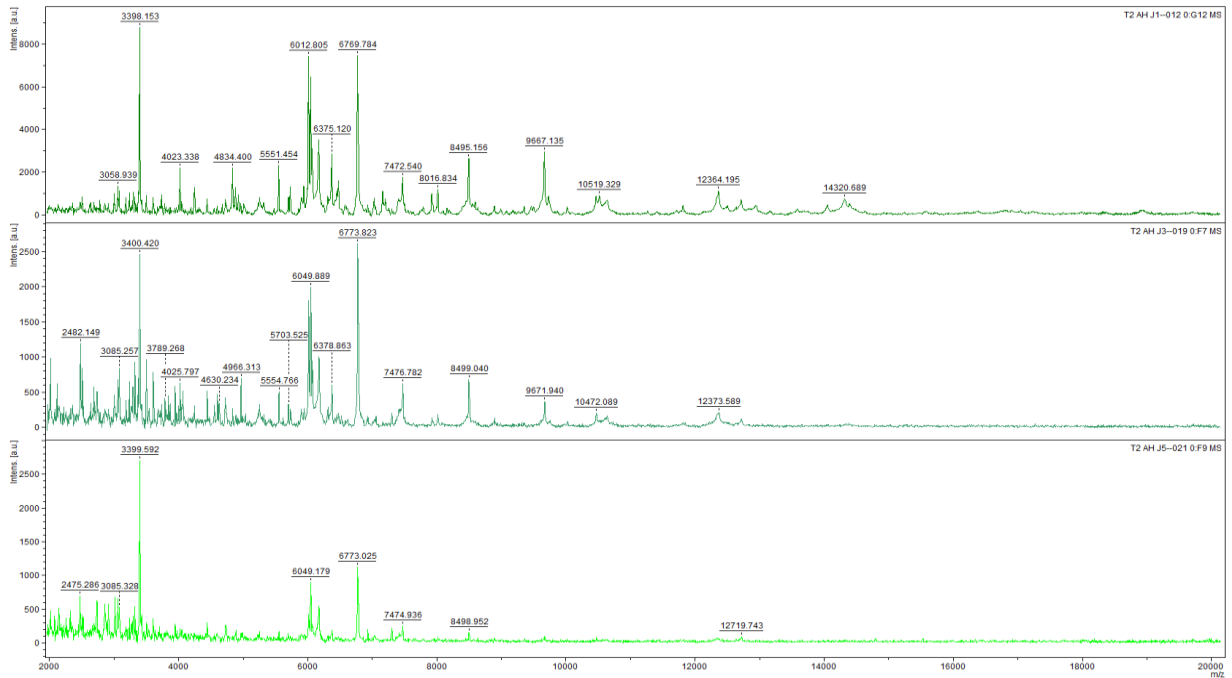


Figure 23: Spectres d'*Acanthamoeba hatchetti* à J1, J3 et J5 sur MALDI-TOF

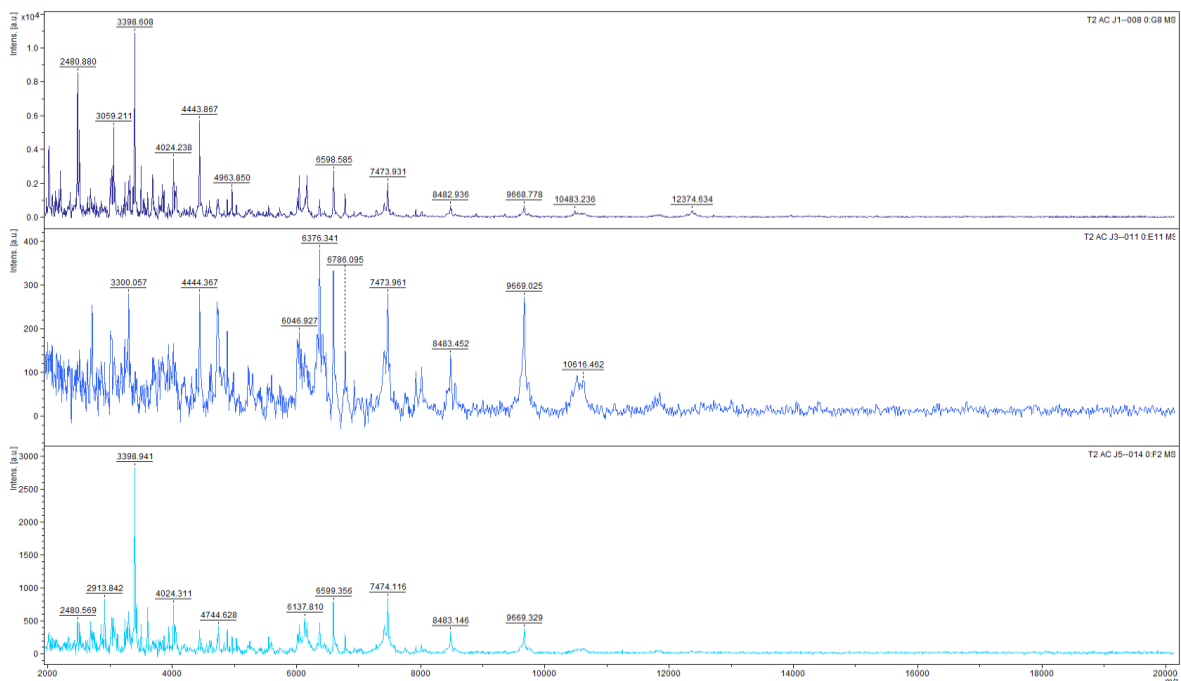


Figure 24: Spectres d'*Acanthamoeba castellanii* à J1, J3 et J5 sur MALDI-TOF

L'analyse spectrale à J1, J3 et J5 souligne deux aspects :

- Les pics communs à tous les Acanthamibes recensés dans l'étude sont déjà présents à J1.
- Il n'existe pas de différence majeure d'expression des pics entre les trois dates de recueil.

Le MALDI-TOF démontre ici ses performances d'identification d'*Acanthamoeba* à J1, J3 et J5. Cependant, étant donné l'importance d'une identification rapide du micro-organisme, le temps de culture retenu pour étudier les trophozoïtes d'*Acanthamoeba* serait en routine le temps J1 avec un recueil des trophozoïtes à partir d'une culture axénique sur milieu PYG.

IV Discussion

La kératite amibienne est une infection oculaire engageant le pronostic visuel en cas de retard à la prise en charge. Un diagnostic précoce de cette pathologie est donc crucial et nécessite de développer des outils diagnostiques rapides au laboratoire, de concert avec les cliniciens.

En effet, en raison de difficultés techniques et d'une méconnaissance de la pathologie, la kératite amibienne est sous-diagnostiquée [94]. L'examen microscopique direct des grattages cornéens donne des résultats immédiats, cependant sa faible sensibilité entraîne une errance dans la prise en charge. Grâce à l'essor de la biologie moléculaire, l'amplification de l'ADNr 18S des *Acanthamoebae* est venue renforcer le diagnostic biologique de la kératite amibienne [95] [96] mais nécessite des étapes supplémentaires notamment de séquençage [97] [98] qui s'avèrent être chronophages et onéreuses.

La spectrométrie de masse MALDI-TOF, qui a démontré ses performances dans l'identification bactérienne et fongique jusqu'à devenir une technique standard d'identification dans les laboratoires de bactériologie et de mycologie, est reconnue pour sa simplicité d'utilisation, sa rapidité d'analyse et la fiabilité de ses résultats [99]. Cette technique s'étend petit à petit au domaine de la parasitologie : quelques parasites ont ainsi été identifiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF, parmi lesquels des vecteurs d'arthropodes [100], *Leishmania* spp. [101], *Trypanosoma* spp. [102] ou encore l'amibe libre *Naegleria* spp. [103].

La littérature rapporte encore peu d'études sur l'utilisation du MALDI-TOF pour les *Acanthamoebae*. La première étude menée par Chierico *et al.* en 2016 [104] inclut 15 isolats cliniques collectés chez des patients présentant un tableau clinique évocateur de kératite amibienne en Italie ; ces isolats appartiennent à trois génotypes T3, T4 et T15. Une autre étude menée par Megha *et al.* en 2017 [105] inclut, quant à elle, 25 isolats d'*Acanthamoebae* collectés sur une période de quinze ans dans le service de parasitologie de l'institut PIGMER (Postgraduate Institute of Medical Education and Research) à Chandigarh en Inde ; ces 25 isolats proviennent de 20 échantillons cliniques, correspondant à 16 cas de kératite amibienne, 3 cas de GAE et 1 cas d'acanthamoebose cutanée, et de 5 échantillons environnementaux d'eau recueillie à Chandigarh. Les 25 isolats relèvent de différents génotypes : T3, T4, T5, T10 et T11.

C'est au regard de ces deux études que les résultats obtenus sont analysés point par point :

-les conditions expérimentales initiales diffèrent de celles observées dans les deux études décrites dans la littérature : en effet, dans ces deux études, les cultures d'*Acanthamoeba* sont réalisées de façon monoxénique sur des géloses contenant de l'agar et recouvertes d'une suspension bactérienne d'*E.coli*. Afin d'obtenir des spectres avec un bruit de fond minimal pour l'analyse par spectrométrie de masse, une étape préalable de purification est nécessaire : la purification repose dans l'étude italienne sur l'inactivation d'*E.coli* par la chaleur alors que dans l'étude indienne trois méthodes sont testées, parmi lesquels l'inactivation par la chaleur à 60°C pendant 30 min, l'exposition à des rayons UV pendant 20 min, et enfin la filtration sur membrane avec des filtres Millipore constitués de pores de 5 µm et qui sera finalement retenue. A la différence de ces deux études, la culture réalisée à Rouen est une culture axénique, c'est-à-dire exempte de tout type de micro-organismes, dans du milieu PYG, le but étant de s'affranchir de tout risque de bruit de fond ;

-les protocoles de préparation des échantillons et d'extraction protéique présentent de nombreuses similarités (Tableau 12). Le protocole d'extraction 2 qui a finalement été retenu dans notre projet est basé sur celui décrit par Chierico *et al.* [104] en 2016, en apportant quelques légères modifications avec notamment l'ajout de deux lavages au PBS au début du traitement des échantillons ;

- les différents stades du parasite sont pris en compte dans les trois études. Chierico *et al.* [104] rapporte trois temps T0, T1 et T2 correspondant au temps 0 puis 3 jours (T1) et 7 jours après (T2). Au microscope, le temps T0 se caractérise par la prédominance de kystes (80%) tandis qu'à T1 et T2 la proportion de trophozoïtes augmente jusqu'à atteindre 70% des formes. En analysant les souches à ces trois temps, une perte de spécificité de « groupe » (3 groupes sont définis, le groupe 1 correspondant au génotype T15, le groupe 2 au génotype T4 et le groupe 3 au génotype T3) est remarquée à T1 et T2 dans quelques isolats. Compte tenu de l'uniformité morphologique des kystes et de la stabilité des spectres à T0, le temps T0, marqué par une majorité de kystes (80%) a finalement été retenu dans l'étude italienne. Dans l'étude de Megha *et al.* [105] en 2017, les cultures sont observées au microscope du premier (D1) au 5^{ème} jour (D5) : les cultures d'*Acanthamoeba* montrent à J1 et à J5 une prédominance de kystes (> 90%) alors qu'à J3

les trophozoïtes (environ 70%) sont les formes majoritaires. Les spectres obtenus à D1 et D5 sont de bonne qualité à la différence des spectres obtenus à D3 difficilement interprétables du fait de la présence d'*E.coli* ingéré par les trophozoïtes. Le D1 a également été retenu dans cette étude pour identifier rapidement l'amibe. Par conséquent, les deux groupes d'études ont choisi le premier jour de culture marqué par la prédominance de kystes. Dans notre projet rouennais, les cultures axéniques sur milieu PYG ont permis l'étude des trophozoïtes à J1, J3 et J5 en s'affranchissant de la présence d'un autre micro-organisme comme *E. coli* : les spectres obtenus à ces trois temps possèdent le même pattern commun et ne montrent pas de différences significatives. Le protocole n'a par contre pas permis l'obtention de spectres exploitables pour les kystes. Le processus d'enkystement étant réversible, l'alternative consiste à provoquer leur dékystement pour accéder à leur profil protéomique. Au final, dans notre étude, le temps J1 a également été retenu pour obtenir rapidement l'identification du parasite mais cette fois-ci, les spectres d'*Acanthamoeba* à J1 correspondent à des spectres de trophozoïtes.

-L'analyse graphique des spectres révèle visuellement un motif commun présent chez tous les *Acanthamoebae*. Chierico *et al.* [104] précise que la majorité des pics se situe entre 2000 et 11 000 Da avec une plus forte densité de pics entre 2500 et 8000 Da. Cette observation concorde avec les figures des spectres d'*Acanthamoebae* étudiés au CHU de Rouen.

- Des pics spécifiques au genre ou au génotype sont identifiés dans la littérature. Chierico *et al.* [104] en 2016 note la présence de pics communs à plusieurs souches du même génotype. Parmi les 4 souches de génotype T4, 3 d'entre elles présentent une forte homologie, en partageant des pics communs à 5937, 8450 et 9711 Da ; la dernière souche partage un seul pic à 4175 Da retrouvé chez une autre souche du même génotype. Pour le génotype T3, sur les 4 souches, 2 d'entre elles partagent des pics à 5410 et 7535 Da et les 2 autres souches montrent des pics communs à 2495, 5162,6745 et 10326 Da absents chez les deux premières souches évoquées. Enfin, pour le génotype T15, toutes les souches possèdent sur leurs spectres 3 pics en commun à 3320, 4749 et 9492 Da ; parmi ces 5 souches de génotype T15, 2 d'entre elles partagent 2 pics communs à 2280 et 5180 Da tandis que les 3 autres possèdent 2 pics communs à 3831 et 4036 Da. Il est à noter que 4 des 5 souches de génotype T15 partagent un pic en commun avec un isolat de génotype

T4 à 5780 Da. En 2017, Megha *et al.* [105] va plus loin en identifiant des pics spécifiques de genre et de génotype.

Tableau 12: Protocoles d'extraction protéique des échantillons

Protocole Megha <i>et al.</i> [105]	Protocole Chierico <i>et al.</i> [104]
<ul style="list-style-type: none"> -2 lavages de la suspension d'amibes avec 1 mL de PBS. -Reprise du culot dans 1 mL d'eau distillée ; -Centrifugation à 5000g pendant 5 minutes ; -Eliminer le surnageant. Culot remis en suspension avec de l'éthanol 70% ; -Centrifugation à 13000g pendant 10 minutes ; -Séchage à l'air pour laisser l'éthanol s'évaporer ; - Culot repris :20 µL d'acide formique et 20 µL d'acétonitrile ; -Ajout de billes de verre (taille 1 µm) et mélange au vortex ; -Centrifugation à 13000g pendant 5 minutes -Dépôt de 1 µL de surnageant sur la cible. Séchage à l'air libre. -Ajout de 1 µL de matrice acide α-cyano-4-hydroxycinnamique. Séchage à l'air libre 	<ul style="list-style-type: none"> -Ajout de 300 µL d'eau distillée et de 900 µL d'éthanol absolu à la suspension d'amibes et homogénéiser ; -Élimination du surnageant et séchage à l'air libre ; -Ajout de 20 µL d'acide formique à 70% et de 20 µL d'acétonitrile en homogénéisant; -Dépôt de 1 µL de surnageant sur la cible (plaque de 96 places Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). Séchage à l'air libre. - Ajout de 1 µL de matrice acide α-cyano-4-hydroxycinnamique. Séchage à l'air libre

Plusieurs pics (2039, 2205, 2261, 2302, 2359, 2457, 3751,3879, 3987, 3936, 3854, 4000, 4016, 4143, 4194, 4380,4089, 4056, 7174 Da) sont en effet retrouvés dans tous les isolats d'*Acanthamoeba* et ainsi définis comme des pics spécifiques de genre. En ce qui concerne les génotypes, une signature de pics est identifiée pour le complexe T3-T4-T11 (Figure 26) : 2075, 2512, 2534, 2980 et 3733 Da. Les pics spécifiques de génotype sont décrits à 2190 et 7877 Da pour le génotypeT4, 9738 et 9753 Da pour T5, 4422 et 5565 Da pour T10, et enfin 2560 et 3537 Da pour T11. Au sein du même génotype, les résultats montrent des pics communs différents entre les souches cliniques et environnementales. Enfin,

dans notre étude rouennaise qui n'inclut que des souches de génotype T4, les isolats présentent tous en commun les pics 3398, 6375 et 7475 Da ; d'autres pics communs à plusieurs isolats (3059, 4024, 4834, 5551, 8495 et 9668 Da) sont également retrouvés.

Tableau 13: Comparaison des pics retrouvés dans les spectres des souches d'*Acanthamoeba* dans la littérature

strains	genotype	2280	2495	3320	3831	4036	4749	4175	5180	5162	5410	5780	5937	6653	6745	7535	8450	9492	9711	10326
OPBG_2	T4							x				x								
OPBG_17	T4												x				x		x	
OPBG_18	T4												x				x		x	
OPBG_12	T4							x					x				x		x	
OPBG_6	T3										x					x				
OPBG_7	T3										x					x				
OPBG_1	T3		x							x						x				x
OPBG_8	T3		x							x						x				x
OPBG_10	T15	x		x			x		x			x							x	
OPBG_4	T15	x		x			x		x										x	
OPBG_5	T15			x	x	x	x					x							x	
OPBG_3	T15			x	x	x	x					x							x	
OPBG_9	T15			x	x	x	x					x							x	

Génotypes	Pics spécifiques obtenus avec MALDI-TOF MS
T3 – kératites	2512, 2995, 3651, 3723, 3733, 3853 et 4165 Da
T3 - échantillons d'eau	2020, 2097, 2750, 3096, 3128 et 4369 Da
T4	2190 et 7877 Da
T5	9738 et 9753 Da
T10	4422 et 5565 Da
T11	2560 et 3537 Da
T3, T4, T11 complex	2075, 2512, 2534, 2980 et 3733 Da
Kératite amibienne	2020, 2534, 2750, 3090, 3128, 3924, 4369 Da
Encéphalite granulomateuse amibienne	3264, 3406, 4066, 4208 et 4246 Da
Amibiase cutanée	2630, 2887, 3001 et 5167 Da

Sources : en haut : Chierico et al., 2016 [104] et en bas: Megha et al., 2017 [105]

En mettant en parallèle ces trois études, il est aisé de remarquer que les pics définis comme spécifiques de genre ou de génotype sont totalement différents d'une étude à l'autre. Cette différence pourrait s'expliquer par le recrutement des souches : les isolats

provenant de différents types d'échantillons et de différentes zones géographiques, les spectres obtenus présentent une grande hétérogénéité d'une étude à l'autre.

-L'identification au rang d'espèce par spectrométrie de masse MALDI-TOF s'est avérée difficile au CHU de Rouen. Cependant, la classification des *Acanthamoebae* en espèces repose sur des caractères morphologiques variables en fonction des conditions de culture, ce qui la rend peu fiable. La classification qui fait maintenant autorité est fondée sur l'étude génomique des *Acanthamoebae* et définit plus de vingt génotypes. L'identification au rang d'espèce n'est d'ailleurs abordée ni dans l'étude italienne, ni dans l'étude indienne. Elles ne prennent en considération que les génotypes d'*Acanthamoebae* et envisagent la perspective de déterminer le génotype directement par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Au final, en démontrant ses performances dans l'identification des *Acanthamoebae*, la spectrométrie de masse MALDI-TOF devient un nouvel outil diagnostique des acanthamoeboses, moins chronophage et moins onéreux que le séquençage.

V. Perspectives

Les premiers résultats obtenus au CHU de Rouen constituent un point de départ pour la création d'une banque spectrale d'*Acanthamoebae* sur spectromètre de masse MALDI-TOF. Les perspectives à moyen et à long terme consistent à :

- développer la bibliothèque de spectres d'*Acanthamoebae* avec les spectres de référence ou MSP (Main Spectrum Profile) de chaque souche ;
- définir une valeur seuil de score garantissant la fiabilité de l'identification ;
- enrichir la banque de données de souches appartenant à d'autres géotypes, afin de pouvoir identifier directement le géotype à partir du profil protéomique de l'isolat ;
- créer une banque de spectres représentative de l'écologie acanthamibienne locale, à des fins épidémiologiques et thérapeutiques : identification de l'origine d'une épidémie, anticipation de la pathogénicité et de la chimiosensibilité d'un isolat en fonction de son profil protéomique, ... ;
- élargir l'application de la technique à l'identification d'autres protozoaires.

VI Conclusion

La spectrométrie de masse MALDI-TOF est une méthode fiable, rapide et peu onéreuse qui démontre ses performances dans l'identification de souches d'*Acanthamoeba*. Elle permet de définir des profils protéomiques d'amibes et ainsi de créer des banques de spectres de référence pouvant être utilisées pour l'identification d'isolats cliniques et environnementaux.

La spectrométrie de masse MALDI-TOF constitue un nouvel outil de laboratoire intéressant lors de suspicion de kératite amibienne. Elle présente trois intérêts majeurs : un intérêt diagnostique, en garantissant une identification fiable et rapide du parasite ; un intérêt thérapeutique, en anticipant la pathogénicité et la chimiosensibilité des isolats ; et enfin un intérêt épidémiologique, en documentant les épidémies et en identifiant les spécificités géographiques des souches d'*Acanthamoebae*.

Bibliographie

1. Nagington J, *et al.*, Amoebic infection of the eye. *Lancet* 1974 ;2:1537-1540.
2. Verani JR, *et al.*, National outbreak of *Acanthamoeba* keratitis associated with use of a contact lens solution, United States. *Emerg Infect Dis.* 2009 ; 15: 1236-1242.
3. Corsaro D, *et al.*, *Acanthamoeba* misidentification and multiple labels: redefining genotypes T16, T19, and T20 and proposal for *Acanthamoeba micheli* sp. nov. (genotype T19). *Parasitol. Res.* 2015 ; 114 : 2481–2490.
4. Clark AE, *et al.*, Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 2013 ; 26 : 547–603.
5. Trabelsi H, *et al.*, Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical review. *Pathol. Biol.* 2012 ; 60 : 399–405.
6. Khan NA, *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev.* 2006; 30: 564– 595.
7. Adl SM, *et al.*, The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol* 2005;52:399–451.
8. Walochnik J, *et al.*, Die Parasiten des Menschen aus der Sicht der Koevolution. *Denisia* 20, zugleich Kataloge der Oberösterreichischen Landesmuseen, 2007 ;1: 323.
9. Culbertson CG, *et al.*, Experimental infection of mice and monkeys by *Acanthamoeba*. *Am J Pathol*, 1959 ;35: 185-197.
10. Pushkarew BM, Über die Verbreitung der Süßwasserprotozoen durch die Luft. *Arch Protistent* 1913 ;23: 323–362.

11. Page FC, Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. J Protozool 1967; 14: 709–724.
12. Castellani A, An amoeba found in culture of a yeast: preliminary note. J. Trop. Med. Hyg., 1930; 33:160.
13. Volkonsky M, *Hartmanella castellanii* Douglas, et classification des hartmannelles. Arch Zool Exp Gen 1931; 72: 317–339.
14. Pussard M, *et al.*, Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (*Protozoa, Amoebida*). Protistologica 1977; 13:557–598.
15. Sawyer TK, *et al.*, A proposed new family. *Acanthamoebidae* n. fam. (order *Amoebida*), for certain cyst-forming filose amoebae. Trans. Am. Microsc. Soc. 1975; 94: 93–98.
16. Stothard DR, *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: 45–54.
17. Horn M, *et al.*, Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. related to the *Paramecium caudatum* symbiont *Caedibacter caryophilus*. Environ Microbiol 1999; 1: 357– 367.
18. Gast RJ, Development of an *Acanthamoeba*-specific reverse dot-blot and the discovery of a new ribotype. J Eukaryot Microbiol 2001; 48: 609–615.
19. Hewett MK, *et al.*, Identification of a new *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type, corresponding to the species *Acanthamoeba jacobsi* Sawyer. Acta Protozool 2003; 42: 325– 329.
20. Corsaro D, *et al.*, Phylogenetic evidence for a new genotype of *Acanthamoeba* (*Amoebozoa Acanthamoebida*). Parasitol Res 2010; 7: 233 – 238.
21. Nuprasert W, *et al.*, Identification of a novel T17 genotype of *Acanthamoeba* from environmental isolates and T10 genotype causing keratitis in Thailand. J Clin Microbiol 2010; 48: 4636 – 4640.

22. Qvarnstrom Y, *et al.*, Characterization of a new pathogenic *Acanthamoeba* species, *A. byersi* n. sp., isolated from a human with fatal amoebic encephalitis. *J Eukaryot Microbiol.* 2013; 60: 626 – 633.
23. Magnet A, *et al.*, Novel *Acanthamoeba* 18S RNA Gene Sequence Type from an Environmental Isolate. *Parasitol. Res.* 2014; 113: 2845–2850.
24. Fuerst PA, *et al.*, Phylogenetic analysis and the evolution of the 18S rRNA gene typing system of *Acanthamoeba*. *J Eukaryot Microbiol.* 2015;62:69–84.
25. Mergeryan H, The prevalence of *Acanthamoeba* in the human environment. *Rev. Infect. Dis.* 1991; 13: 390 –391.
26. De Jonckheere JF, Ecology of *Acanthamoeba*. *Rev Infect Dis*, 1991; 13: 385 - 387.
27. Liu H, *et al.*, Genetic diversity of *Acanthamoeba* isolated from ocean sediments. *Korean J Parasitol*, 2006; 44: 117-125.
28. Befinger M, *et al.*, Occurrence of amphizoic amoebae in Lake Zarnowieckie. *Bull Inst Marit Trop Med Gdynia*, 1986; 37: 275-286.
29. Sawyer TK, Free-living pathogenic and nonpathogenic amoebae in Maryland soils. *Appl Environ Microbiol*, 1989; 55 : 1074- 1077.
30. Kingston D, *et al.*, Isolation of amoebae from the air. *J Med Microbiol*, 1969; 2: 27-36.
31. Rivera F, *et al.*, Bottled mineral waters polluted by protozoa in Mexico. *J Protozool*, 1981; 28: 54- 56.
32. Berk SG, *et al.*, Occurrence of infected amoebae in cooling towers compared with natural aquatic environments: implications for emerging pathogens. *Environ Sci Technol*, 2006; 40: 7440- 7444.
33. Fabres LF, *et al.*, Isolation and identification of *Acanthamoeba* spp. from thermal swimming pools and spas in Southern Brazil. *Acta Protozool.*2016 ; 61: 221-227.

34. Napolitano JJ, Isolation of amoebae from edible mushrooms. *Appl Environ Microbiol*, 1982 ;44 : 255- 257.
35. Dykova I, *et al.*, *Acanthamoeba* strains isolated from organs of freshwater fishes. *J.Parasitol.* 1999; 85: 1106–1113.
36. Dendena F, *et al.*, Free living amoebae: Detection, morphological and molecular identification of *Acanthamoeba* genus in the hydraulic system of an hemodialysis unit in Tunisia. *Parasite* 2008; 15: 137– 142.
37. Trabelsi H, *et al.*, Free-living amoebae (FLA): morphological and molecular identification of *Acanthamoeba* in dental unit water. *Parasite* 2010; 17: 67– 70.
38. Visvesvara GS, *et al.*, Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; 50:1–20.
39. Berger P, *et al.*, Amoeba-associated microorganisms and diagnosis of nosocomial pneumonia. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 248–255.
40. Adékambi T, *et al.*, Amoebal coculture of “*Mycobacterium massiliense*” sp. nov. from the sputum of a patient with hemoptoic pneumonia. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5493–5501.
41. Schuster FL, *et al.*, Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol* 2004; 34: 1001–1027.
42. Cursons RT, *et al.*, Immunity to pathogenic free-living amoebae: role of humoral antibody. *Infect Immun* 1980; 29: 401–407.
43. Marciano-Cabral F, *et al.*, *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16:274.
44. Bowers B, *et al.*, The fine structure of *Acanthamoeba castellanii*. I. The trophozoite. *J. Cell Biol.* 1968;39: 95–111.

45. Khan NA, *Acanthamoeba*: biology and pathogenesis. 2009: 72.
46. Siddiqui R, *et al.*, Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. Parasit Vectors. 2012; 5: 1-6.
47. Bowers B, *et al.*, The fine structure of *Acanthamoeba castellanii* (Neff strain). II. Encystment. J Cell Biol, 1969 ;41: 786-805.
48. Chavez-Munguia B, *et al.*, Ultrastructural study of encystation and excystation in *Acanthamoeba castellanii*. J Eukaryot Microbiol, 2005;52: 153-158.
49. Jacob Lorenzo-Morales Naveed A Khan, *et al.*, An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. Parasite 2015;22:5.
50. Ibrahim YW, *et al.*, Factors affecting the epidemiology of *Acanthamoeba* keratitis Ophthalmic Epidemiol 2007 ; 14 : 53-60.
51. Brown TJ, *et al.*, Pathogenic free-living amoebae (PFLA) from frozen swimming areas in Oslo, Norway. Scand. J. Infect. Dis. 1977;9: 237–240.
52. Mazur T, *et al.*, The duration of the cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. Trop Med Parasitol 1995 ;46: 106–108.
53. Weekers PHH, *et al.*, Effects of grazing by the free-living soil amoebae, *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga*, and *Hartmannella vermiformis* on various bacteria. Appl Environ Microbiol 1993;59:2317–2319.
54. Allen PG, *et al.*, Phagocytosis in *Acanthamoeba*: 1. A mannose receptor is responsible for the binding and phagocytosis of yeast. J Cell Physiol 1990;145:508–513.
55. Brown MRW, *et al.*, Unexplored reservoirs of pathogenic bacteria: protozoa and biofilms. Trends Microbiol 1999 ;7: 46–50.
56. Preston TM, *et al.*, Locomotion and feeding of *Acanthamoeba* at the water–air interface of ponds. FEMS Letters 2001 ;194: 143–147.

57. Yera H, *et al.*, Amibes libres : *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia*. Biologie Médicale. EMC, 2012 ;7: 4.
58. Jones BR, *et al.*, *Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba* uveitis associated with fatal meningoencephalitis. Trans. Ophthalmol. Soc. U. K. 1975;95: 221–232.
59. Cheung N, *et al.*, Hammersmith K. Emerging trends in contact lens-related infections. Curr Opin Ophthalmol. 2016 ;27 : 327-332.
60. Bourcier T, *et al.*, Kératites amibiennes. EMC Ophtalmologie 2007;21:200-225.
61. Quinio D, *et al.*, *Acanthamoeba* keratitis: Search for a health carrier in Mali. Méd Trop, 2000; 60: 61-63.
62. Leck AK, *et al.*, *Acanthamoeba* keratitis in Ghana. Br J Ophthalmol, 2002; 86 :1187-1188.
63. Illingworth CD, *et al.*, *Acanthamoeba* keratitis: risk factors and outcome. Br. J. Ophthalmol. 1995 ; 79: 1078–1082.
64. Clarke DW, *et al.*, The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis. Trends in Parasitology, 2006;22: 175–180.
65. Clarke DW, *et al.*, Failure of *Acanthamoeba castellanii* to produce intraocular infections. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2005 ;46 :2472–2478.
66. Alizadeh H, *et al.*, Role of activated macrophages in *Acanthamoeba* keratitis. Journal of Parasitology, 2007;93: 1114–1120.
67. Bouheraoua N, *et al.*, Kératites amibiennes. Journal Français d’Ophtalmologie, 2014;37: 640–652.
68. Herz NL, *et al.*, Rapidly Progressive Cataract and Iris Atrophy during Treatment of *Acanthamoeba* Keratitis. Ophthalmology, 2008 ;115:866–869.
69. Ben Salah S, *et al.*, Les kératites amibiennes : à propos de deux premiers cas tunisiens. Bull Soc Pathol Exot 2007;100: 41-42.

70. Grise-Dulac A, *et al.*, Apport de la microscopie confocale *in vivo* au diagnostic des kératites amibiennes. Journal Français d'Ophtalmologie, 2010 ;33: 383-390.
71. Bourcier T, *et al.*, Heidelberg retina tomograph II findings of *Acanthamoeba* keratitis Ocul Immunol Inflamm 2005; 13: 487-492.
72. Kanavi MR, *et al.*, Sensibility and specificity of confocal scan in the diagnosis of infectious keratitis Cornea 2007; 26: 782-786.
73. Visvesvara GS, *et al.*, Comparative studies on related free-living and pathogenic amebae with special reference to *Acanthamoeba*. J. Protozool. 1975; 22: 245–256.
74. Mathers WD, *et al.*, Confirmation of confocal microscopy diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis using polymerase chain reaction analysis. Arch Ophthalmol. 2000; 118: 178–183.
75. Lehmann OJ, *et al.*, Polymerase chain reaction analysis of corneal epithelial and tear samples in the diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. Invest Ophthalmol VisSci 1998; 39: 1261–1265.
76. Thompson PP, *et al.*, Validation of Real-Time PCR for Laboratory Diagnosis of *Acanthamoeba* Keratitis. Journal of Clinical Microbiology, 2008 ;46 : 3232–3236.
77. Goldschmidt P, *et al.*, New tool for the simultaneous detection of 10 different genotypes of *Acanthamoeba* available from the American Type Culture Collection. British Journal of Ophthalmology, 2009;93: 1096–1100.
78. Goldschmidt P, *et al.*, Resistance of *Acanthamoeba* to classic DNA extraction methods used for the diagnosis of corneal infections. British Journal of Ophthalmology, 2007; 92: 112–115.
79. Bourcier T, *et al.*, How to prescribe local antifungal and anti-amoebicide topical drugs. J Fr Ophtalmol 2007; 30: 431– 435.

80. Cardine S, *et al.*, Prise en charge clinique et pronostic des kératites amibiennes. J Fr Ophthalmol, 2002; 25: 1007- 1013.
81. Bang S, *et al.*, Treatment With Voriconazole in 3 Eyes With Resistant *Acanthamoeba* Keratitis. American Journal of Ophthalmology, 2010; 149: 66–69.
82. Visvesvara GS, *et al.*, Pathogenic and opportunistic free living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2007; 50: 22-24.
83. Martinez AJ, Acanthamoebiasis and immunosuppression. Case report. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 1982; 41: 548–557.
84. Schuster F, Opportunistic amoebae: challenges in prophylaxis and treatment. Drug Resistance Updates, 2004 ;7 : 41–51.
85. Morrison AO, *et al.*, Disseminated *Acanthamoeba* Infection Presenting With Cutaneous Lesions in an Immunocompromised Patient. American Journal of Clinical Pathology, 2016 ; 145: 266–270.
86. Juan A, *et al.*, Successful Treatment of Sinusitis by *Acanthamoeba* in a Pediatric Patient After Allogeneic Stem Cell Transplantation. The Pediatric Infectious Disease Journal, 2016 ;35: 1350–1351.
87. Lanocha NK-BD, *et al.*, The occurrence *Acanthamoeba* (free living amoeba) in environmental and respiratory samples in Poland. Acta Protozoologica, 2009; 48 : 271-279.
88. Dunand VA, *et al.*, Parasitic sinusitis and otitis in patients infected with human immunodeficiency virus: report of five cases and review. Clin Infect Dis. 1997; 25:267- 272.
89. Brondfield MN, *et al.*, Disseminated *Acanthamoeba* infection in a heart transplant recipient treated successfully with a miltefosine-containing regimen: Case report and review of the literature. Transplant Infectious Disease, 2017;19: 1-22.

90. Smirnov AV, *et al.*, A revised classification of naked lobose amoebae (*Amoebozoa: Lobosa*). *Protist.*, 2011; 162: 545-570.
91. Kuiper MW, *et al.*, Quantitative Detection of the Free-Living Amoeba *Hartmannella vermiformis* in Surface Water by Using Real-Time PCR. *Appl. Environ. Microbiol. Am. Soc. Microbiol.*, 2006; 72: 5750-5756.
92. Smirnov AV, *et al.*, New data on the cyst structure of *Hartmannella vermiformis* Page, 1967 (*Lobosea, Gymnamoebia*). *Protistology*, 1999;1: 82-85.
93. Abedkhozasteh H, *et al.*, First Report of *Hartmannella* keratitis in a Cosmetic Soft Contact Lens Wearer in Iran. *Iranian J Parasitol.* 2013; 8: 481-485.
94. Di Cave D, *et al.*, *Acanthamoeba* T4 and T15 genotypes associated with keratitis infections in Italy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2009 ;28: 607–612.
95. Schroeder JM, *et al.*, Use of subgenomic 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;5: 1903– 1911.
96. Gatti S, *et al.*, Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* strains from corneal infections in Italy. *J. Med. Microbiol.* 2010; 59: 1324–1330.
97. Boggild AK, *et al.*, Laboratory diagnosis of amoebic keratitis: comparison of four diagnostic methods for different types of clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2009;47: 1314–1318.
98. Goldschmidt P, *et al.*, Rapid detection and simultaneous molecular profile characterization of *Acanthamoeba* infections. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2012; 74: 137–141.
99. Karger A, Current developments to use linear MALDI-TOF spectra for the identification and typing of bacteria and the characterization of other cells/organisms related to infectious diseases. *PROTEOMICS - Clinical*

Applications, 2016 ;10: 982–993.

100. Yssouf A, *et al.*, Emerging tools for identification of arthropod vectors. *Future Microbiol* 2016 ; 11: 549–566.
101. Lachaud L, *et al.* Identification of *Leishmania* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry using a free web-based application and a dedicated mass-spectral library. *J Clin Microbiol* 2017; 55: 2924–2933.
102. Avila CC, *et al.* Direct identification of trypanosomatids by matrix-assisted laser desorption ionization—time of flight mass spectrometry (DIT MALDI-TOF MS). *J Mass Spectrom* 2016; 51: 549–557.
103. Moura H, *et al.* Detection of biomarkers of pathogenic *Naegleria fowleri* through mass spectrometry and proteomics. *J Eukaryot Microbiol* 2015; 62: 12–20.
104. Chierico DF, *et al.* Identification and typing of free-living *Acanthamoeba* spp. by MALDI-TOF MS Biotyper. *Exp. Parasitol* 2016; 170: 82–89.
105. Megha K, *et al.* Protein profiling of *Acanthamoeba* species using MALDI-TOF MS for specific identification of *Acanthamoeba* genotype. *Parasitology Research*, 2018; 117: 729–736.

WEBographie

1. Biologie 20 CEF. Unité 3 : diversité de la vie. Classification des protozoaires. [En ligne]. 2004. <http://cefsk.ca/jacinthe/biologie20/unite3/diversite20.html> (Consulté le 08.10.2018)
2. CDC. Centers of Disease Control and Prevention. Parasites -*Acanthamoeba* — Granulomatous Amebic Encephalitis (GAE); Keratitis [En ligne]. 5 juin 2017. <https://www.cdc.gov/parasites/Acanthamoeba/pathogen.html> (Consulté le 08.10.2018)
3. OSU. The Ohio State University. 2017. *Acanthamoeba* and free-living amoebae The molecular analysis and understanding of *Acanthamoeba* and related forms [en ligne] Mars 2017
<https://u.osu.edu/Acanthamoeba/phylogenetic-relationships-among-Acanthamoeba/> (Consulté le 08.10.2018)

SERMENT DE GALIEN



SERMENT DE GALIEN

Je jure 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.

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma Profession.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

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

Que je sois méprisé de mes Confrères si je manque à mes engagements.



SOURON Isabelle

Utilisation du MALDI-TOF pour la caractérisation d'isolats cliniques d'*Acanthamoeba* spp. de génotype T4 responsables de kératites amibiennes.

Th. D. Pharm., Rouen, 2018, 84 p.

RESUME

La kératite à *Acanthamoeba* (AK), une maladie infectieuse cornéenne rare mais grave, très invalidante, et complexe, est causée par *Acanthamoeba* spp., un protozoaire libre qui est présent dans l'air, le sol et l'eau. Cette infection oculaire, très douloureuse et potentiellement dévastatrice provoque une altération importante de la vision du patient et peut conduire à la cécité en l'absence de traitement. Le cycle de vie du parasite comprend une étape kystique (dormance) et un stade trophozoïte mobile actif et infectieux. Du fait de la résistance des kystes vis-à-vis des principales molécules utilisées dans le traitement, l'infection peut être persistante. Dans ce contexte, une identification rapide et précise des *Acanthamoeba* spp., est cruciale. Le MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization –Time Of Flight) s'est récemment avéré être un outil performant pour la caractérisation de micro-organismes pathogènes cultivables. Cette méthodologie paraît en effet, plus rapide, moins coûteuse mais d'un niveau de précision comparable à celles des méthodes d'amplifications géniques. Son application s'étend peu à peu au diagnostic parasitologique. Depuis 2016, des tentatives d'identification des acanthamibes par spectrométrie de masse MALDI-TOF ont été décrites dans la littérature. L'objectif de ce travail est d'établir une base de données spectrales en vue de l'identification d'isolats cliniques de ce parasite.

Quatre souches de références (*Acanthamoeba castellanii*, *A.polyphaga*, *A.hatchetti*, *A.lenticulata*) ; *Vermamoeba vermiformis* et 3 isolats cliniques ont été utilisés lors de cette étude. La comparaison entre les empreintes spectrales obtenues après différents temps de culture axénique (J1, J3 et J5) des souches de référence d'*Acanthamoeba* et des autres isolats a montré une excellente discrimination au niveau du genre (*Acanthamoeba* versus *Vermamoeba*). En revanche, l'identification au rang d'espèce par MALDI-TOF n'est pas fiable. Ces résultats soulignent l'importance d'une classification génotypique des isolats. En effet, l'analyse graphique des spectres révèle visuellement un motif commun présent chez toutes les souches d'acanthamibes. Cette étude a permis de décrire de pics non encore décrits dans la littérature, communs aux souches de génotype T4 inclus dans cette étude (pics 3398, 6375 et 7475 Da).

La spectrométrie de masse MALDI-TOF constitue donc un nouvel outil de laboratoire intéressant lors de suspicion de kératite amibienne. En garantissant une identification fiable et rapide du parasite, elle contribue à la prise en charge précoce des patients.

MOTS CLES : *Acanthamoebae* – kératite amibienne – MALDI-TOF – Spectres- Génotype

JURY

Président du jury	M. Loïc FAVENNEC	PU-PH de parasitologie, UFR Santé de l'Université de Rouen Normandie
Membres du jury	M. Romy RAZAKANDRAINIBE	Ingénieur post-doctorant, chef de projet clinique, CHU Rouen
	M. Marc MURAINÉ	PU-PH d'ophtalmologie, UFR Santé de de l'Université de Rouen Normandie
	Mme Christine IMBERT	Professeur des Universités, Faculté de Médecine et de Pharmacie de l'Université de Poitiers
	M. Gilles GARGALA	MCU-PH de parasitologie, UFR Santé de Rouen
	M. Damien COSTA	AHU de parasitologie, UFR Santé de Rouen

DATE DE SOUTENANCE : 16 octobre 2018