



HAL
open science

Étude de l'activité du voriconazole sur des isolats de référence d'amibes libres (Genre: Acanthamoeba)

Xavier Monnié

► **To cite this version:**

Xavier Monnié. Étude de l'activité du voriconazole sur des isolats de référence d'amibes libres (Genre : Acanthamoeba). Sciences pharmaceutiques. 2019. dumas-02448086

HAL Id: dumas-02448086

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02448086>

Submitted on 22 Jan 2020

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 : 2019

THESE

**pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN
PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement le 18 octobre 2019

par

MONNIÉ Xavier

Né le 27/12/1995 à Saint-Aubin-Lès-Elbeuf

***Étude de l'activité du voriconazole sur des isolats de
référence d'amibes libres (Genre : Acanthamœba)***

Président du jury : Professeur FAVENNEC Loïc, PU-PH

Membres du jury : Docteur GUEUDRY Julie, Ophthalmologue

Docteur MULLIE Perrine, Pharmacien

Docteur RAZAKANDRAINIBE Romy, Chercheur

UNIVERSITE DE ROUEN NORMANDIE
UFR SANTE – Département PHARMACIE

Année : 2019

THESE

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN
PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 18 octobre 2019

par

MONNIÉ Xavier

Né le 27/12/1995 à Saint-Aubin-Lès-Elbeuf

Étude de l'activité du voriconazole sur des isolats de
référence d'amibes libres (Genre : Acanthamœba)

Président du jury : Professeur FAVENNEC Loïc, PU-PH

Membres du jury : Docteur GUEUDRY Julie, Ophthalmologue

Docteur MULLIE Perrine, Pharmacien

Docteur RAZAKANDRAINIBE Romy, Chercheur

**« 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 2019 - 2020

U.F.R. SANTÉ DE ROUEN

DOYEN : **Professeur Benoît VEBER**

ASSESEURS : **Professeur**
Michel
GUERBET
Professeur
Agnès LIARD
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 Jean-Marc BASTE	HCN	Chirurgie Thoracique
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	HCN	Médecine interne (gériatrie)

Mr Vincent COMPERE	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Jean-Nicolas CORNU	HCN	Urologie
Mr Antoine CUVELIER	HB	Pneumologie
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	CHB	Cancérologie

Mr Fabien DOGUET	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire
Mr Jean DOUCET	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie
Mr Bernard DUBRAY	CHB	Radiothérapie
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 (<i>surnombre</i>)	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 GUILLIN	HCN	Psychiatrie Adultes
Mr Didier HANNEQUIN	HCN	Neurologie
Mr Claude HOUDAYER	HCN	Génétique
Mr Fabrice JARDIN	CHB	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	HCN	Rhumatologie
Mme Anne-Marie LEROI	HCN	Physiologie
Mr Hervé LEVESQUE	HCN	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	HCN	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 (<i>détachement</i>)	HCN	Réanimation
Médicale Mr Marc MURAINÉ	HCN	Ophtalmologie
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	HCN	Réanimation med - Médecine d'urgence
Mr Vincent RICHARD	UFR	Pharmacologie
Mme Nathalie RIVES	HCN	Biologie développement et reproduction
Mr Horace ROMAN (<i>disponibilité</i>)	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe SABOURIN	HCN	Anatomie – Pathologie
Mr Mathieu SALAUN	HCN	Pneumologie
Mr Guillaume SAVOYE	HCN	Hépatogastrologie
Mme Céline SAVOYE–COLLET	HCN	Imagerie médicale
Mme Pascale SCHNEIDER	HCN	Pédiatrie
Mr Lilian SCHWARZ	HCN	Chirurgie Viscérale et Digestive
Mr Michel SCOTTE	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne TAMION	HCN	Thérapeutique
Mr Luc THIBERVILLE	HCN	Pneumologie
Mr Hervé TILLY (<i>surnombre</i>)	CHB	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	HCN	Pédiatrie génétique
Mr Benoît VEBER	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre VERA	CHB	Biophysique et traitement de l'image

Mr Eric VERIN	Les Herbiers	Médecine Physique et de Réadaptation
Mr Eric VERSPYCK	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier VITTECOQ	HC	Rhumatologie
Mme Marie-Laure WELTER	HCN	Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme Najate ACHAMRAH	HCN	Nutrition
Mme Noëlle BARBIER-FREBOURG	HCN	Bactériologie – Virologie
Mr Emmanuel BESNIER	HCN	Anesthésiologie - Réanimation
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
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
M. Florent MARGUET	HCN	Histologie
Mme Chloé MELCHIOR	HCN	Gastroentérologie
Mr Thomas MOUREZ (<i>détachement</i>)	HCN	Virologie
Mr Gaël NICOLAS	UFR	Génétique
Mme Muriel QUILLARD	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mme Laëtitia ROLLIN	HCN	Médecine du Travail
Mme Pascale SAUGIER-VEBER	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire TOBENAS-DUJARDIN	HCN	Anatomie
Mr David WALLON	HCN	Neurologie
Mr Julien WILS	HCN	Pharmacologie

PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

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

II - PHARMACIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Mr Jérémy BELLIEN (PU-PH)	Pharmacologie
Mr Thierry BESSON	Chimie Thérapeutique
Mr Jean COSTENTIN (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Abdelhakim EL OMRI	Pharmacognosie
Mr François ESTOUR	Chimie Organique
Mr Loïc FAVENNEC (PU-PH)	Parasitologie
Mr Jean Pierre GOULLE (Professeur émérite)	Toxicologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
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 DES UNIVERSITES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et Minérale
Mr Frédéric BOUNOURE	Pharmacie Galénique
Mr Thomas CATANHEIRO	Chimie Organique
Mr Abdeslam CHAGRAOUI	Physiologie
Mme Camille CHARBONNIER (LE CLEZIO)	Statistiques
Mme Elizabeth CHOSSON	Botanique
Mme Marie Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation pharma et économie de la santé
Mme Cécile CORBIERE	Biochimie
Mme Nathalie DOURMAP	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUC	Pharmacologie
Mme Dominique DUTERTE- BOUCHER	Pharmacologie

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 Hong LU	Biologie
Mme Marine MALLETER	Toxicologie
M. Jérémie MARTINET (MCU-PH)	Immunologie
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
Mme Caroline BERTOUX	Pharmacie

PAU-PH

M. Mikaël **DAOUPHARS**

PROFESSEUR CERTIFIE

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

ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES

Mme Alice MOISAN	Virologie
M. Henri GONDÉ	Pharmacie

ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

M. Abdel MOUHAJIR	Parasitologie
M. Maxime GRAND	Bactériologie

**LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES
PHARMACEUTIQUES**

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et minérale
Mr Thierry BESSON	Chimie thérapeutique
Mr Abdeslam CHAGRAOUI	Physiologie
Mme Elisabeth CHOSSON	Botanique
Mme Marie-Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation et économie de la santé
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Abdelhakim EL OMRI	Pharmacognosie
Mr François ESTOUR	Chimie organique
Mr Loïc FAVENNEC	Parasitologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
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 Yveline SEVRIN	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
Mme Laëtitia BOURDON	UFR	Médecine Générale
Mr Emmanuel HAZARD	UFR	Médecine Générale
Mme Lucile PELLERIN	UFR	Médecine générale

ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

PROFESSEURS

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

Mr Antoine **OUVRARD-PASCAUD** (med)

Physiologie (Unité Inserm 1076)

Mr Frédéric **PASQUET**

Sciences du langage, orthophonie

Mme Christine **RONDANINO** (med)

Physiologie de la reproduction

Mr Youssan Var **TAN**

Immunologie

Mme Isabelle **TOURNIER** (med)

Biochimie (UMR 1079)

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique DELAFONTAINE

HCN - Hôpital Charles Nicolle

HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME

CB - Centre Henri Becquerel

CHS - Centre

Hospitalier Spécialisé du Rouvray CRMPR - Centre Régional de Médecine

Physique et de Réadaptation SJ – Saint Julien Rouen

TABLE DES MATIÈRES

Liste des figures	20
Liste des tableaux	21
Introduction et Généralités	22
1. Revue générale de la littérature concernant les kératites amibiennes à <i>Acanthamoeba</i>	24
1.1 <i>Acanthamoeba spp.</i>	24
1.1.1 Premières observations.....	24
1.1.2 Phylogénie et classification.....	25
1.1.3 Structure cellulaire.....	27
1.1.4 Membrane plasmique.....	28
1.1.5 Cytosquelette.....	29
1.1.6 Génomes mitochondrial et nucléaire.....	30
1.1.7 Cycle de vie et morphologie.....	30
1.1.7.1 Trophozoïtes.....	31
1.1.7.2 Kystes.....	32
1.1.8 Distribution dans l'environnement.....	33
1.2 Kératite amibienne.....	35
1.2.1 Physiopathologie.....	35
1.2.1.1 Adhésion épithéliale.....	36
1.2.1.2 Invasion stromale.....	36
1.2.2 Épidémiologie.....	38
1.2.2.1 Non porteurs de lentilles de contact.....	39
1.2.2.2 Porteurs de lentilles de contact.....	39

1.2.2.3	Types de lentilles de contact.....	39
1.2.3	Aspects cliniques et diagnostic.....	40
1.2.3.1	Aspects cliniques.....	40
1.2.3.2	Diagnostic.....	43
1.3	Traitements de la kératite amibienne.....	45
1.3.1	Traitements médicamenteux.....	45
1.3.1.1	Les Biguanides.....	46
1.3.1.2	Les Diamidines.....	46
1.3.2	Traitements chirurgicaux.....	46
1.3.2.1	La photokératectomie thérapeutique.....	46
1.3.2.2	La greffe de cornée lamellaire.....	47
1.3.2.3	La kératoplastie transfixiante thérapeutique.....	47
1.3.2.4	Le cross-linking.....	47
1.4	Le voriconazole.....	48
1.4.1	Structure chimique.....	48
1.4.2	Pharmacodynamie.....	49
1.4.3	Pharmacocinétique.....	49
1.4.4	Contre-indications.....	50
1.4.5	Effets indésirables.....	51
1.5	Problématique et objectifs.....	51

2. Matériels et méthodes.....	53
2.1 Souches de référence.....	53
2.1.1 <i>A. polyphaga</i>	53
2.1.2 <i>A. castellanii</i>	53
2.1.3 <i>A. lenticulata</i>	53
2.2 Culture des souches.....	53
2.3 Préparation du voriconazole.....	56
2.4 Mise en contact des <i>Acanthamoeba</i> avec le voriconazole.....	57
2.5 Lecture et dénombrement au microscope.....	59

2.6	Test d'inhibition de multiplication.....	60
2.7	Analyses statistiques.....	60
3.	Résultats.....	61
3.1	<i>A. castellanii</i>	61
3.2	<i>A. polyphaga</i>	64
3.3	<i>A. lenticulata</i>	67
3.4	Comparaison des différentes CI ₅₀	70
3.5	Test d'inhibition de multiplication.....	70
4.	Discussion.....	72
	Conclusion.....	78
	Liste des abréviations.....	80
	Annexes.....	81
	Bibliographie.....	82
	Serment de Galien.....	91

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : Structure d'un trophozoïte d'*Acanthamæba* par microscopie électronique

FIGURE 2 : Cycle de vie d'*Acanthamæba spp.* selon les conditions de vie

FIGURE 3 : Cycle de vie parasitaire d'*Acanthamæba spp.*

FIGURE 4 : Schéma des différentes étapes pathogéniques de la kératite amibienne

FIGURE 5 : Représentation clinique de la kératite amibienne

FIGURE 6 : Représentations cliniques des divers stades de la kératite amibienne

FIGURE 7 : Images de microscopie confocale *in vivo* (400µm x 400µm) de kystes amibiens

FIGURE 8 : Image de kystes amibiens issus d'un prélèvement cornéen après coloration au MGG (X1000)

FIGURE 9 : Formule chimique du voriconazole

FIGURE 10 : Représentation graphique du nombre d'amibes/mL d'*A. castellanii* à 10⁴/mL en fonction de la concentration en voriconazole à 72 heures

FIGURE 11 : Représentation graphique de la CI₅₀ du voriconazole pour *A. castellanii*

FIGURE 12 : Représentation graphique du nombre d'amibes/mL d'*A. polyphaga* à 10³/mL en fonction de la concentration en voriconazole à 72 heures

FIGURE 13 : Représentation graphique de la CI₅₀ du voriconazole pour *A. polyphaga*

FIGURE 14 : Représentation graphique du nombre d'amibes/mL d'*A. lenticulata* à 10³/mL en fonction de la concentration en voriconazole à 72 heures

FIGURE 15 : Représentation graphique de la CI₅₀ du voriconazole pour *A. lenticulata*

FIGURE 16 : Représentation graphique du pourcentage de multiplication des différentes espèces d'*Acanthamæba* en fonction de la concentration en voriconazole

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : Classification taxonomique d'*Acanthamæba*

TABLEAU 2 : Composition chimique du milieu PYG

TABLEAU 3 : Tableau de préparation des concentrations de voriconazole

TABLEAU 4 : Schématisation de la plaque en fonction des concentrations en voriconazole

Introduction et Généralités

La kératite amibienne est une pathologie méconnue mais elle possède un pronostic grave. Cette pathologie est relativement récente, le premier cas ayant été décrit en 1974 [1]. Elle représente une cause rare d'infection cornéenne, cependant son incidence est croissante depuis 1980, ce qui coïncide avec l'avènement des lentilles de contact, connues pour être le principal facteur de risque dans les pays développés.

Cette infection est causée par des amibes libres du genre *Acanthamoeba*.

La croissance du port de lentilles de contact et de leur capacité à être hôte pour des pathogènes microbiens, ont abouti à un intérêt exponentiel pour ce parasite au cours des dernières années.

La prise en charge de la kératite nécessite un diagnostic précoce et un traitement adapté, du fait des potentielles lourdes séquelles visuelles. Cependant, cette prise en charge reste difficile, les signes cliniques étant souvent peu spécifiques [2].

De plus, la thérapeutique actuelle ne permet pas de répondre pleinement aux besoins, c'est pourquoi de nombreuses classes thérapeutiques font l'objet d'essais pharmacologiques et plus particulièrement les triazolés, dont le voriconazole.

Il est donc nécessaire d'avoir une connaissance de la biologie des Acanthamibes, de l'épidémiologie et la physiopathologie de cette pathologie afin de comprendre les stratégies diagnostiques et thérapeutiques.

C'est dans ce contexte que s'inscrit la démarche d'une détermination de l'activité du voriconazole sur différentes souches d'Acanthamibes *in vitro*.

Cette étude s'intéressera dans un premier temps aux Acanthamibes, puis à la kératite qu'elle entraîne, en établissant un bilan des thérapeutiques actuelles. Enfin, l'étude abordera la détermination de l'activité pharmacologique du voriconazole sur différentes souches d'Acanthamibes impliquées dans la kératite amibienne.

1. Revue générale de la littérature concernant les kératites amibiennes à *Acanthamœba*

1.1 *Acanthamœba* spp.

1.1.1 Premières observations

Les *Acanthamœba* sont des parasites, protozoaires, saprophytes, très répandus dans l'environnement. Ils sont responsables de plusieurs pathologies dermatologiques, ophtalmologiques et plus rarement neurologiques [3].

Les amibes font partie des premiers eucaryotes étudiés depuis la découverte de la microscopie. D'après l'analyse des séquences d'ARN ribosomales, il a été estimé que les amibes divergent de la « branche » principale des eucaryotes il y a environ 1 milliard d'années [4].

Plus précisément, les Acanthamibes ont été initialement découverts dans les années 1930 comme « contaminants » de cultures de levures : *Cryptococcus pararoseus*. Par la suite, le genre *Acanthamœba* a été identifié dans les années 1960 et 1970 comme parasite de l'Homme et responsable d'infections cutanées, oro-pharyngées, et dans de rares cas, d'encéphalites granulomateuses et de kératites [4].

1.1.2 Phylogénie et classification

S'il est relativement facile de distinguer le genre *Acanthamoeba* des autres amibes libres, l'identification des autres espèces au sein du genre reste souvent difficile.

Il n'existe actuellement que deux classifications pour distinguer les espèces *Acanthamoeba* : une basée sur des critères morphologiques des kystes, l'autre basée sur des critères de génétique moléculaire.

La classification taxonomique actuelle des Acanthamibes est la suivante [5] :

TABLEAU 1 : Classification taxonomique d'*Acanthamoeba* [5]

Règne	<i>Protista</i>
Embranchement	<i>Protozoa</i>
Phylum	<i>Sarcomastigophora</i>
Sous-phylum	<i>Sarcodina</i>
Super-classe	<i>Rhizopodea</i>
Classe	<i>Lobosia</i>
Sous-classe	<i>Gymnamoebia</i>
Ordre	<i>Amoebida</i>
Famille	<i>Acanthamoebidae</i>
Genre	<i>Acanthamoeba</i>

Protista : Être vivant unicellulaire, eucaryotes peut être soit animal (protozoaire) ou végétal (protophyte). Les protistes peuvent être des parasites, ectoparasite dans les organismes aquatiques, endoparasite à l'intérieur des cavités du corps ou même endocellulaire.

Protozoa : Organismes unicellulaires microscopiques et généralement cosmopolites, peuplant les milieux les plus divers. Organismes mobiles, leurs déplacements se font grâce à des cils, flagelles ou à l'aide de pseudopodes.

Sarcomastigophora : Ce phylum regroupe les protistes munis de flagelles ou de pseudopodes, comportant un seul type de noyau, leur reproduction est essentiellement asexuée.

Sarcodina : Protozoaires possédant des pseudopodes et rarement des flagelles, parfois libres

Rhizopodea : Organismes unicellulaires possédant des pseudopodes permettant la locomotion et la préhension.

Lobosia : Rhizopodes possédant des lobopodes

Gymnamoebia : Amibes nus

Amoebida : Organismes mononucléés et de formes indéterminées

Acanthamoebida : Famille d'eucaryote unicellulaire

Une première classification des espèces du genre *Acanthamæba* a été proposée en 1977 [6], sur des critères morphologiques basés sur la taille et la forme des kystes amibiens :

- Groupe I : Acanthamibes de grande taille avec un diamètre supérieur à 18µm
- Groupe II : Espèces présentant une surface très irrégulière polygonale, triangulaire ou ovale et de diamètre inférieur à 18µm
- Groupe III : Petites Acanthamibes rondes de diamètre inférieur à 18µm

Les plus présentes des espèces en pathologies humaines sont : *A. castelanii* et *A. polyphaga* ; elles se trouvent dans le groupe II, ainsi qu'*A. lenticulata* faisant partie du groupe III.

Cependant la morphologie des kystes est extrêmement dépendante des conditions de culture, ainsi cette classification présente des limites.

Avec l'avènement de la biologie moléculaire, une nouvelle classification est née en 1999.

Cette classification est fondée sur l'étude par hybridation de séquences du gène codant pour la sous-unité 18s de l'ARN ribosomal [7].

Elle permet de distinguer 20 groupes nommés de T1 à T20 [8].

Les génotypes T2, T3, T4, T5, T6, T10, T11 et T15 sont responsables de kératites amibiennes.

De plus, il a ainsi été établi que le génotype T4 est présent dans plus de 90% des cas des kératites à *Acanthamæba*. Ce génotype est également le plus répandu dans la nature [9].

1.1.3 Structure cellulaire

Le préfixe « Acanth- » d'Acanthopodes (« acanthos » signifiant « pic » en Grec ancien) désigne les structures en épine situées à la surface des Acanthamibes, ce qui leur permet de se déplacer. Ces structures contiennent un ou plusieurs vacuoles contractiles permettant une osmo-régulation par éjection d'eau en dehors de l'organisme.

Le suffixe « -amoeba » d'Acanthamibe (« amoibe » signifiant « changeant » en Grec ancien), renvoie au mouvement amiboïde de ces organismes unicellulaires.

Dans le cytoplasme, il existe d'autres types d'organites dont des lysosomes, des vacuoles digestives et de nombreuses vacuoles glycogéniques [10].

1.1.4 Membrane plasmique

La membrane plasmique est composée de protéines (33%), phospholipides (25%), lypophosphoglycanes (29%) et de stérols (19%).

Les phospholipides comprennent majoritairement de la phosphatidylcholine (45%), phosphatidyléthanolamine (33%), phosphatidylsérine (10%), phosphoinositide (6%) et de diphosphatidylglycérol (4%) [11][12].

Les acides gras membranaires les plus représentés sont l'acide oléique (50%) ainsi que des acides polyinsaturés à plus longues chaînes (30%) [13].

La membrane, comme les autres composants cellulaires, ne contient que de faibles quantités de glycolipides dont le glucose est le sucre principal (60% des glucides).

Quant aux stérols, la fraction insaponifiable de la totalité des lipides extraits des trophozoïtes d'Acanthamibes contient de l'ergostérol et du 7-dehydrostigmastérol [12].

Les trophozoïtes d'Acanthamibes possèdent de nombreuses mitochondries (FIGURE 1).

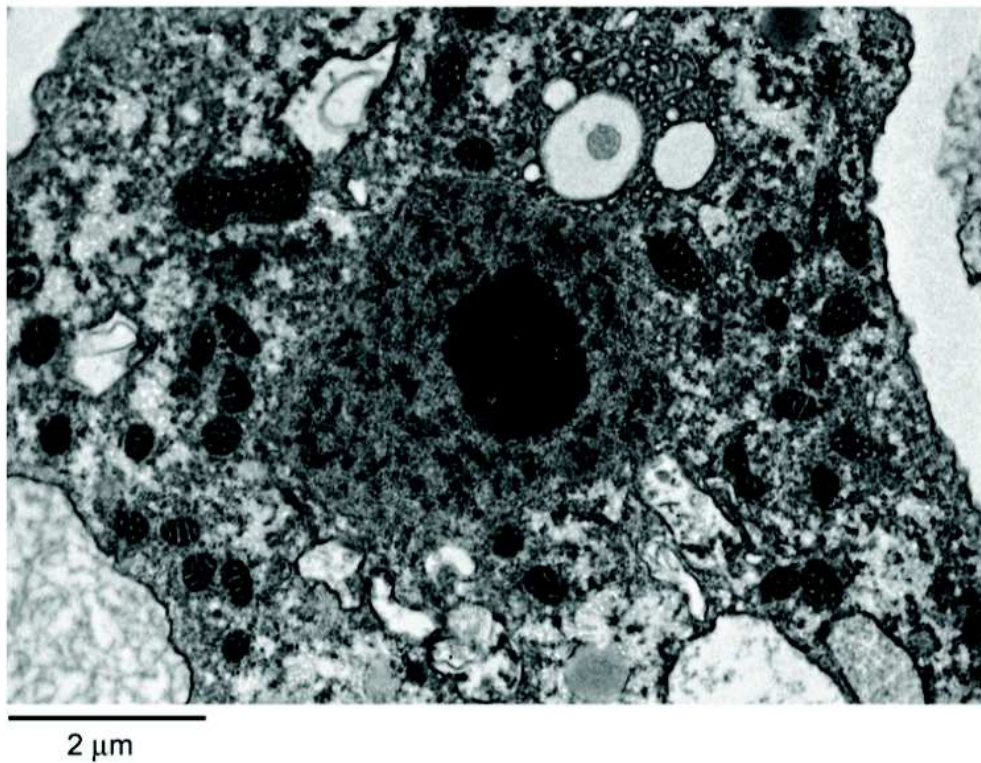


FIGURE 1 : Structure d'un trophozoïte d'Acanthamœba par microscopie électronique [3]

1.1.5 Cytosquelette

Les Acanthamibes ont fait l'objet de nombreuses études concernant leur motilité cytosquelettique.

En effet, elles sont capables de se déplacer rapidement comparativement à d'autres cellules mobiles, avec une vitesse de déplacement de $0,8\mu\text{m}/\text{seconde}$ en moyenne [14].

Leur déplacement implique la formation de pseudopodes hyalins, il s'apparente à un mouvement d'un substrat solide sur une interface eau-air.

La force d'adhésion ainsi développée est supérieure à la gravité, ce qui permet aux Acanthamibes de profiter d'un transport passif (sans détachement de l'interface eau) [15].

1.1.6 Génomes mitochondrial et nucléaire

La taille du génome mitochondrial de *A. castellanii* du génotype T4 est de 41 591 paires de bases [16].

Les Acanthamibes possèdent généralement un noyau unique représentant environ un sixième de la taille du trophozoïte, cependant il a été observé des trophozoïtes multi nucléés.

La taille du génome nucléaire d'*A. castellanii* est de $1,212 \cdot 10^8$ paires de bases [17].

L'analyse génomique d'*A. castellanii* sur les séquences codantes correspond à 200 gènes avec une moyenne de 3 exons par gène. A titre comparatif *E. histolytica* possède 1,3 exons par gène [18].

1.1.7 Cycle de vie et morphologie

Le cycle de vie des Acanthamibes comporte deux stades :

Le stade trophozoïte correspondant à l'état végétatif (diamètre : 15-50 μ m) et le stade de kyste correspondant à l'état « dormant » (diamètre 15-30 μ m).

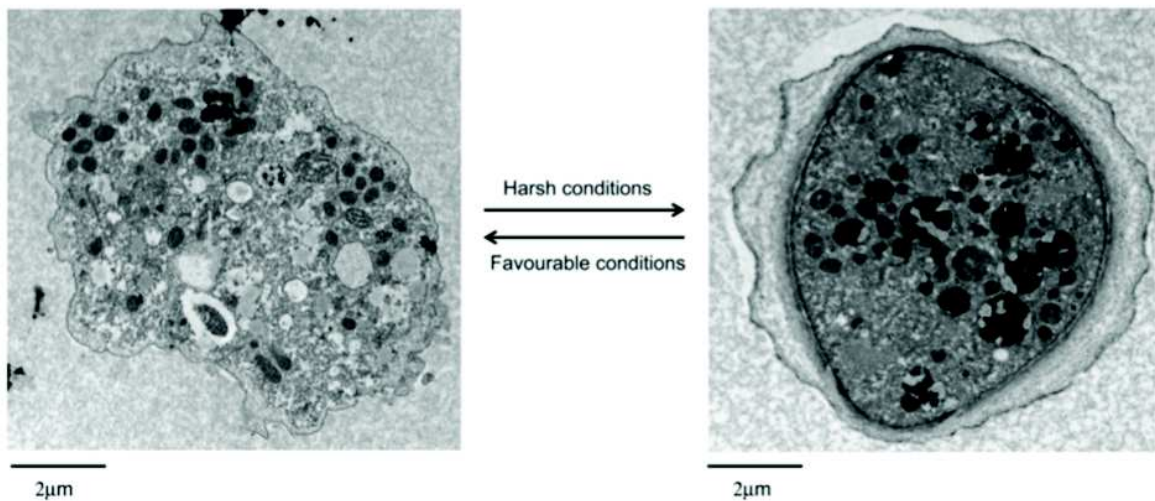


FIGURE 2 : Cycle de vie d’*Acanthamoeba* spp. selon les conditions de vie [3]

1.1.7.1 Trophozoïtes

Les trophozoïtes se nourrissent de particules organiques et se multiplient lorsque les conditions sont optimales (apport de nutriments, pH neutre, 30°C et 50-80mOsmol) [19].

Ce sont des cellules denses mononuclées et le plus souvent nucléolées. Leur cytoplasme est fin et granuleux avec de nombreux organites comme des vacuoles digestives et contractiles, les mitochondries, le réticulum endoplasmique et le complexe de Golgi.

Ils se divisent de façon asexuée, avec un temps génération variant de 8 à 24 heures en fonction de l’espèce. Il s’agit d’une fission binaire, c’est à dire qu’une cellule-mère donne deux cellules-filles.

Lorsque les conditions deviennent plus rudes, le trophozoïte devient inactif métaboliquement puis se transforme en kyste à double paroi après avoir expulsé les nutriments hors de la cellule. Ce phénomène se nomme « enkystement ».

1.1.7.2 Kystes

La paroi externe des kystes est composée de protéines et de polysaccharides alors que la paroi interne est composée de cellulose [20].

Le kyste ne possède pas de forme typique, en effet il peut être sphérique, ovalaire, en étoile [21].

La double paroi permet une grande résistance à l'environnement, aux fortes variations de températures et de pH, à la dessiccation, ainsi qu'aux anti-amibiens [22].

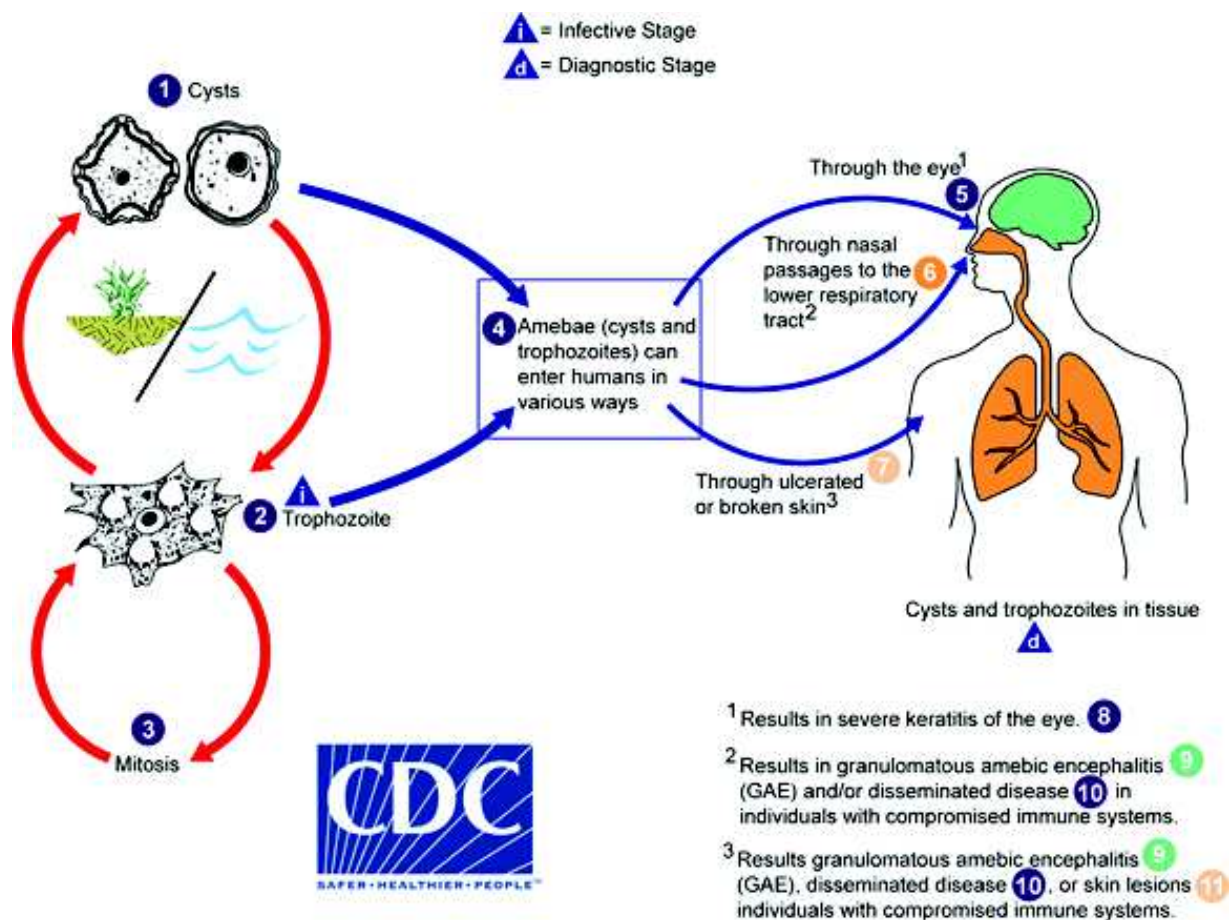


FIGURE 3 : Cycle de vie parasitaire d'*Acanthamoeba* spp. d'après Centers for Disease Control and Prevention

1.1.8 Distribution dans l'environnement

Acanthamoeba spp. ont été isolés dans divers milieux naturels comme l'eau de mer, les sédiments océaniques, les lacs d'eau salée, à l'interface eau-air, sur les plages, les sols ainsi que dans l'air [23].

Ils ont été retrouvés dans des bouteilles d'eau minérale, d'eau distillée, dans les rejets d'eau de refroidissement de centrales électriques et nucléaires, dans des jacuzzis, des

conduits de ventilation, des humidificateurs, des unités de climatisation, des pommeaux de douche, des pulvérisateurs de cuisine, sur des légumes, sur des lentilles de contact ainsi que sur des animaux sains, malades ou morts [23].

Mais aussi dans des hôpitaux, des piscines, des unités de dialyses, dans des prélèvements ORL humains, dans des selles humaines, dans l'urine et dans le liquide céphalo-rachidien [23].

C'est pourquoi il est aisé d'affirmer qu'*Acanthamoeba* est un parasite ubiquitaire dans l'environnement, qui peut être rencontré dans de nombreuses activités de la vie. En effet, en Nouvelle-Zélande, 100% de la population saine possède des anticorps anti-*Acanthamoeba* [24].

1.2 Kératite amibienne

Chez l'homme, la kératite amibienne est la pathologie majoritaire causée par *Acanthamoeba spp.*

C'est une infection oculaire rare, mais de mauvais pronostic, qui peut causer des lésions oculaires irréversibles [21].

1.2.1 Physiopathologie

La kératite amibienne à *Acanthamoeba* évolue en 3 phases : adhésion épithéliale, invasion stromale et kératonévrite [25].

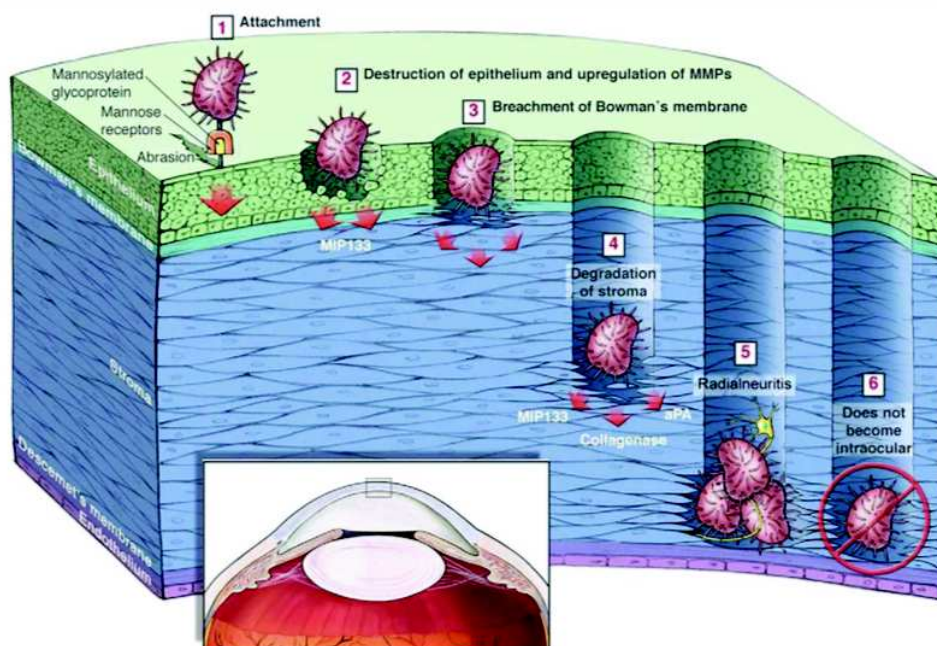


FIGURE 4 : Schéma des différentes étapes pathogéniques de la kératite amibienne

[25].

1.2.1.1 Adhésion épithéliale

La première étape est l'adhésion épithéliale. Pendant cette phase, les trophozoïtes adhèrent à l'épithélium cornéen grâce aux glycoprotéines qui interagissent avec les glycolipides épithéliaux. Les modalités de cette adhésion conditionnent fortement la pathogénicité d'*Acanthamoeba* ; la présence de mannose libre ou de *Corynebacterium xerosis*, une bactérie commensale, entraîne une augmentation de la libération des protéases lors la phase d'invasion stromale [26].

1.2.1.2 Invasion stromale

Puis vient la seconde phase qui est l'invasion stromale : les trophozoïtes sécrètent de nombreuses protéases dont la MIP133 à l'origine de la destruction de la barrière épithéliale ainsi que de la lyse du collagène après passage de la membrane de Bowman. Les trophozoïtes sécrètent la collagénase MMP ainsi que l'activateur du plasminogène.

Enfin, les trophozoïtes convergent autour des nerfs cornéens et sont responsables de kératonévrites radiaires à l'origine de douleurs importantes [25].

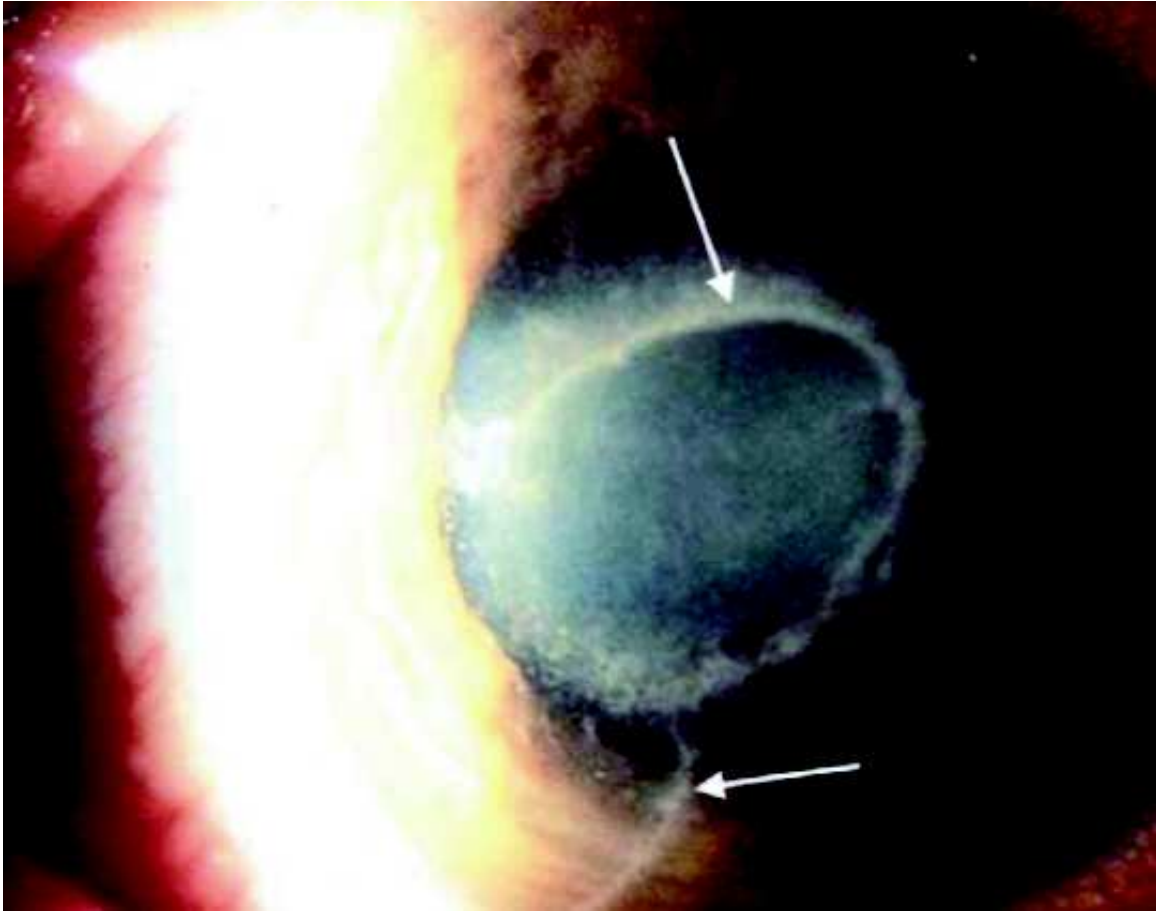


FIGURE 5 : Représentation clinique de la kératite amibienne [25]

Il a été montré qu'*Acantham eba* n'entraîne que très rarement des endophtalmies, qui se caractérisent par une hyperhémie conjonctivale et une inflammation intraoculaire dans la chambre antérieure et le vitré [27].

Les trophozoïtes sont capables de pénétrer dans la chambre antérieure de l' il mais ils sont directement pris en charge par l'immunité innée médiée par les macrophages et les polynucléaires neutrophiles [28].

Les organismes morts et les parois des kystes amibiens peuvent persister des années dans le tissu cornéen, où ils sont responsables d'une inflammation persistante dans la cornée et la sclère.

1.2.2 Épidémiologie

Il existe une grande disparité géographique de la prévalence des kératites amibiennes : 0,15/million d'habitants aux États-Unis à 1,4/million d'habitants au Royaume-Uni [29].

Plusieurs raisons peuvent expliquer cette disparité [22][30] :

- Prévalence de l'utilisation des lentilles de contact
- L'efficacité amœbicide des systèmes d'entretien des lentilles de contact
- Contamination de l'eau domestique et des piscines
- Techniques de diagnostic utilisées

Le facteur de risque le plus important est le port de lentilles de contact. Ainsi, en Inde où le port de lentilles de contact est rare, les kératites amibiennes ne représentent que 1% des cas de kératites infectieuses [31] alors que dans les pays où l'utilisation est répandue, elle représente 4 à 8% des kératites infectieuses [32].

1.2.2.1 Non porteurs de lentilles de contact

Les kératites amibiennes sont souvent négligées chez les non porteurs de lentilles de contact et sont donc diagnostiquées tardivement. Elles sont souvent associées à un traumatisme (accidentel ou chirurgical après kératoplastie transfixiante ou kératotomie radiaire) [33] et à l'exposition à l'eau ou à une contamination tellurique généralement chez les agriculteurs ou artisans [32][34][35].

1.2.2.2 Porteurs de lentilles de contact

Dans les pays à forte prévalence d'utilisation des lentilles de contact, 85 à 88% des cas de kératites amibiennes surviennent dans cette population. Cependant les kératites amibiennes représentent moins de 5% des kératites infectieuses liées au port de lentilles de contact et elles sont généralement unilatérales [36][37].

Il a été observé une augmentation de l'incidence des kératites amibiennes en été et au début de l'automne, ce qui peut s'expliquer par la présence accrue d'*Acanthamoeba* dans l'environnement en lien avec un climat plus chaud et une augmentation des activités aquatiques [22][36][38][39][40][41].

1.2.2.3 Types de lentilles de contact

Les lentilles souples sont responsables d'un risque plus élevé de kératites amibiennes que les lentilles rigides [40], ce qui est probablement lié à l'hygiène et au nettoyage

quotidien. Il a été montré que plusieurs solutions de nettoyage des lentilles ne sont ni efficaces sur les trophozoïtes ni sur les kystes d'*Acanthamoeba castellanii* [42].

La mauvaise hygiène des lentilles est davantage liée au développement de kératites amibiennes plutôt qu'aux kératites bactériennes [38][43][44][45][46].

1.2.3 Aspects cliniques et diagnostic

1.2.3.1 Aspects cliniques

Il est essentiel que le diagnostic soit posé rapidement afin de débiter au plus tôt un traitement médical. Si le début du traitement est retardé de 3 semaines ou plus, le pronostic s'assombrit [47][48].

La kératite amibienne doit être suspectée en cas de traumatisme cornéen associé à une exposition tellurique ou à de l'eau contaminée ainsi que chez les porteurs de lentilles de contact.

Au début de la contamination, l'évolution est lente et les symptômes ne sont pas typiques et s'apparentent à ceux de kératites virales, fongiques ou bactériennes. Alors que dans environ 15% des cas de kératites amibiennes, il existe une coinfection microbienne [48].

Le diagnostic doit aussi être évoqué lors de l'échec d'un traitement antibactérien ou antiviral.

Il n'existe pas de tableau clinique précis, les symptômes étant variables avec généralement douleur, larmoiement, photophobie, le plus souvent unilatéraux. Il n'existe pas de corrélation entre l'importance des signes cliniques et l'intensité de la douleur, et il est tout à fait possible qu'aucune douleur ne soit ressentie [49][50].

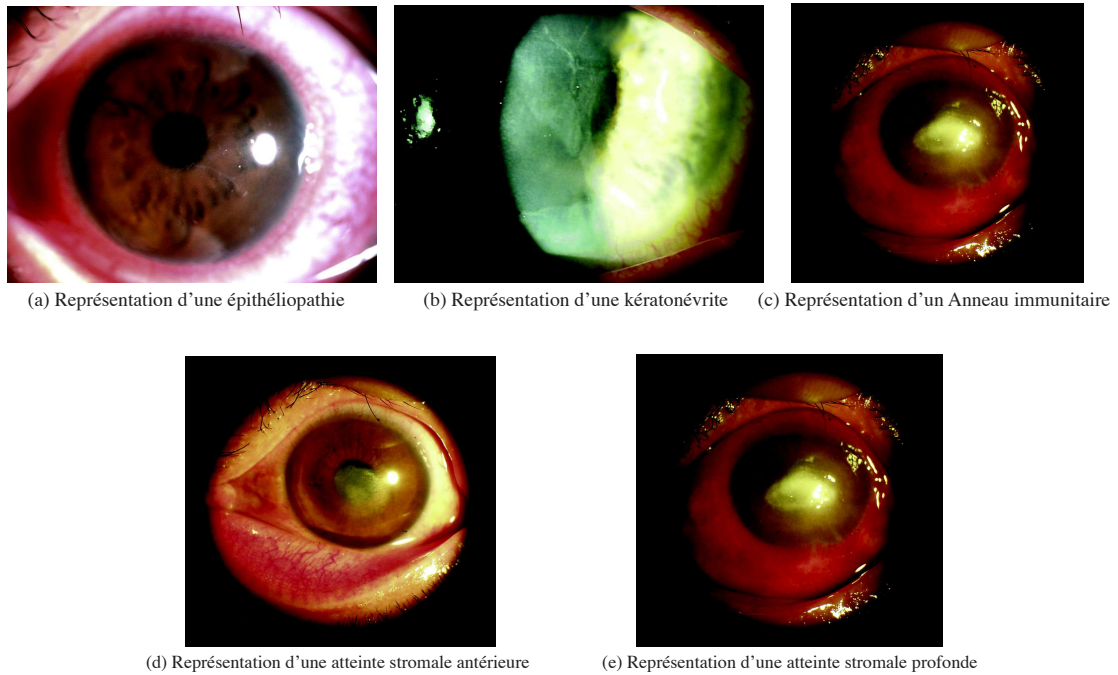


FIGURE 6 : Représentations cliniques des divers stades de la kératite amibienne [3]

Au cours du premier mois d'évolution, la kératite amibienne est caractérisée par une atteinte de l'épithélium cornéen appelée épithéliopathie (Figure 6 (a)), avec une kératite ponctuée superficielle, des pseudodendrites, des infiltrats épithéliaux ou sous-épithéliaux et des infiltrats périnerveux (Figure 6 (b)).

Dans 20% des cas, les patients présentent un anneau immunitaire (Figure 6 (c)).

L'infiltrat périnerveux est retrouvé dans plus de 63% des cas diagnostiqués dans les 6 semaines [51].

Les kératites amibiennes ont donc été classées en 5 stades de gravité [52] :

- Stade 1 : Epithélite (Figure 6 (a))
- Stade 2 : Epithélite avec kératonévrite (Figure 6 (b))
- Stade 3 : Atteinte stromale antérieure (Figure 6 (d))
- Stade 4 : Atteinte stromale profonde (Figure 6 (e))
- Stade 5 : Anneau immunitaire et sclérite (Figure 6 (c))

Passé le premier mois, la kératite amibienne se manifeste par des infiltrats en anneau, des ulcérations et une inflammation de la chambre antérieure avec parfois un hypopion. La sensibilité cornéenne est généralement réduite.

Ainsi, une évolution vers des formes sévères de la maladie est plus fréquente chez les patients pour lesquels le diagnostic a été tardif.

Les complications extracornéennes des kératites amibiennes comprennent des cataractes (20% des cas), des atrophies de l'iris, des glaucomes ainsi que des ulcérations périphériques cornéennes [53][54][55].

1.2.3.2 Diagnostic

La microscopie confocale *in vivo* est une méthode de diagnostic de la kératite amibienne permettant d'identifier les images rondes ou ovales hyper-réfléctives de 15 à 30 μm de diamètre des kystes amibiens, dont la double paroi est caractéristique. Si cette double paroi n'est pas toujours visible, dans ce cas il est difficile d'affirmer avec certitude qu'il s'agit de kyste amibien.

Il est aussi possible de visualiser un élargissement des fibres nerveuses, évocateur de kératonévrite radiaire [56].

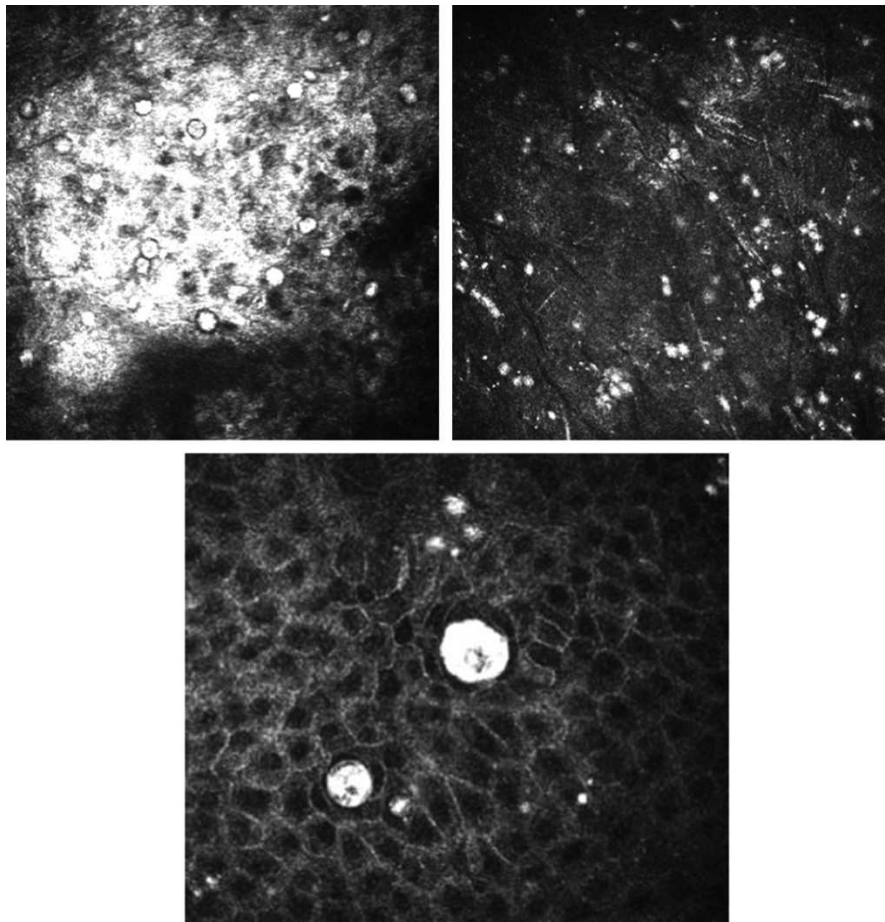


FIGURE 7 : Images de microscopie confocale *in vivo* ($400\mu\text{m} \times 400\mu\text{m}$) de kystes amibiens [3]

Le diagnostic cytologique se fait à l'aide de prélèvements cornéens par « grattage » de la cornée à l'aide de lames de bistouri.

L'examen direct sur lame est réalisé après coloration à l'hématoxyline-éosine ou au May-Grünwald-Giemsa (MGG), qui permettent de visualiser les kystes.

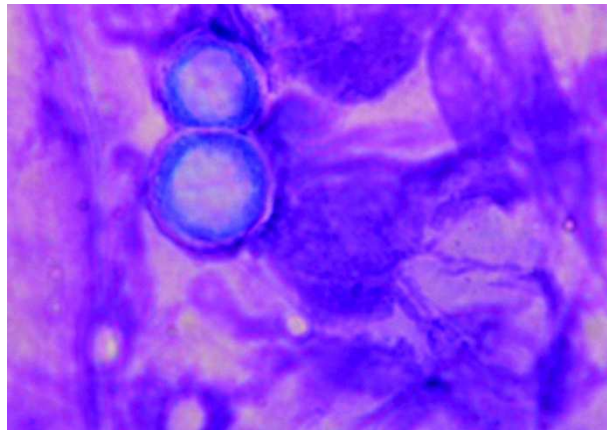


FIGURE 8 : Image de kystes amibiens issus d'un prélèvement après coloration au MGG (X1000)

Les prélèvements sont mis en culture sur gélose agar-agar, et après un délai de 48 heures à 21 jours, des formes végétatives apparaissent. Cependant, cette méthode demeure peu sensible : elle permet un diagnostic positif dans environ 50% des cas [53].

L'examen histologique utilise la coloration par l'hématoxyline-éosine ou le MGG sur des biopsies cornéennes, qui sont invasives et réservées aux cas de forte suspicion avec recherche d'Acanthamibes négatives sur grattage cornéen. La génétique moléculaire consiste principalement en la réalisation de PCR sur les produits du grattage cornéen. Elle permet l'amplification d'un fragment de l'ADN ribosomal 18S ou d'ADN mitochondrial.

Les amorces utilisées permettent une sensibilité de 80% et une spécificité de l'ordre de 100% [57][58].

Il est aussi possible de réaliser des PCR en temps réel qui permettent une corrélation entre la gravité de la maladie et le nombre de copies d'ARN 18S [59].

1.3 Traitements de la kératite amibienne

1.3.1 Traitement médical

Le traitement est débuté après avoir réalisé les prélèvements cornéens, et si les signes cliniques sont compatibles avec la pathologie. Le diagnostic est orienté par les résultats de la microscopie confocale *in vivo*.

Il est définitivement validé par la positivité des examens cytologiques, moléculaires et/ou en cultures, cependant on ne répète pas les prélèvements s'il existe une réponse positive au traitement mis en place.

Les trophozoïtes sont sensibles à la grande majorité des traitements disponibles, mais l'infection perdurant dans le temps, le parasite se transforme en kystes contre lesquels il n'existe que très peu d'agents anti-infectieux efficaces. Les diamidines et les biguanides sont les traitements les plus efficaces sur la forme kystique [60] et le traitement conventionnel comporte donc un biguanide, avec ou sans diamidine.

1.3.1.1 Les Biguanides

Dans cette famille, les deux molécules utilisées sont le polyhexaméthylène biguanide (PHMB) et la chlorhexidine. Ces deux molécules possèdent la meilleure activité kysticide sur la plupart des souches étudiées *in vitro* [61].

1.3.1.2 Les Diamidines

Les deux molécules utilisées de cette famille sont l'iséthionate de propamide (Brolène®) et l'hexamidine (Désoméline®).

Des isolats cliniques résistants ont été décrits [62]. C'est pourquoi les diamidines ne sont pas utilisées en monothérapie.

Dans des études *in vitro*, il a été montré que l'hexamidine a un effet amoebicide plus rapide que le propamide contre les formes kystiques et trophozoïtes [63].

1.3.2 Traitements chirurgicaux

1.3.2.1 La photokératectomie thérapeutique

La photokératectomie thérapeutique a été utilisée pour des kératites amibiennes de stade 1 et 2 en association avec biguanides et diamidines [64].

La méthode consiste à régulariser la surface cornéenne au laser afin de récupérer la transparence de la cornée.

1.3.2.2 La greffe de cornée lamellaire

La greffe de cornée lamellaire a été utilisée chez 11 patients avec un seul cas de récurrence [65].

Cette technique a pour avantage de ne pas ouvrir la chambre antérieure afin de limiter la pénétration intraoculaire des *Acanthamibes*.

1.3.2.3 La kératoplastie transfixiante thérapeutique

La kératoplastie transfixiante consiste à remplacer un disque cornéen central de pleine épaisseur.

Cette technique est réservée aux cas de perforation cornéenne ou d'abcès de cornée fulminants.

1.3.2.4 Le cross-linking

Le cross-linking est une nouvelle méthode thérapeutique, qui consiste à déposer un agent photosensible (ici la Riboflavine) sur la cornée puis à exposer ce produit à des rayons d'ultraviolets longs (UVA). Ce procédé aboutit à une rigidification du collagène par création de ponts chimiques entre les fibrilles de collagène. Le collagène deviendrait plus résistant aux enzymes d'*Acanthamœba* [66].

1.4 Le voriconazole

Récemment, plusieurs études se sont intéressées à l'utilisation des triazolés dans la prise en charge médicamenteuse des kératites amibiennes [67].

Plusieurs cas réfractaires ont été traités de façon empirique avec succès par l'adjonction de triazolés associés aux biguanides et aux diamidines.

1.4.1 Structure chimique

Le voriconazole (Vfend®) du laboratoire Pfizer est un antifongique azolé avec une structure triazolé.

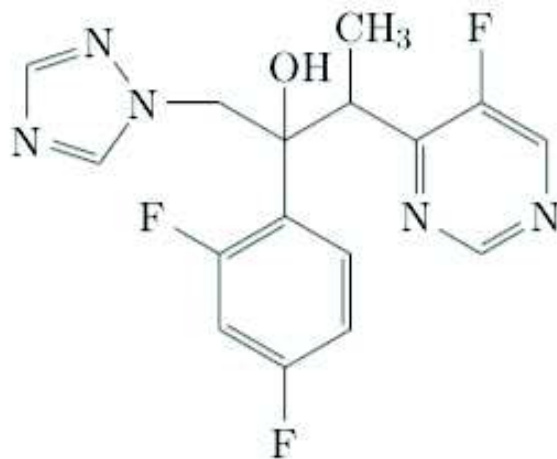


FIGURE 9 : Formule chimique du voriconazole d'après « Pharmacologie fondamentale et clinique »

1.4.2 Pharmacodynamie

Le mode d'action du voriconazole est l'inhibition de la synthèse d'ergostérol à ses différentes étapes.

L'ergostérol est le principal composant de la membrane cellulaire fongique mais aussi d'*Acanthamoeba*, il permet la régulation de la fluidité, l'asymétrie et l'intégrité de la membrane [68].

1.4.3 Pharmacocinétique

La biodisponibilité du voriconazole par voie orale est d'environ 96%, elle est diminuée en cas de prise simultanée avec un repas riche en graisse.

Le volume de distribution est d'environ 4,6 L/kg, ce qui suggère une distribution importante dans les tissus.

Le voriconazole est métabolisé au niveau hépatique par les isoenzymes 2C19, 2C9 et 3A4 du cytochrome P450.

La pharmacocinétique du voriconazole n'est pas linéaire, ce qui explique de fortes variabilités interindividuelles. De plus il existe un important polymorphisme génétique.

Le voriconazole est éliminé par métabolisation hépatique et moins de 2% est éliminé sous forme inchangée dans les urines.

Sa demi-vie d'élimination est dose dépendante et de l'ordre de 6 heures pour une dose orale de 200mg [69].

1.4.4 Contre-indications

- Hypersensibilité à la substance active
- Substrat du cytochrome P450 3A4 : Peut entraîner une augmentation de leurs concentrations plasmatiques et un allongement de l'intervalle QTc et de rares épisodes de torsades de pointes pour les molécules ci-dessous :
 - Terfénafine
 - Astémizole
 - Cisapride
 - Pimozide
 - Quinidine
- Des médicaments susceptibles de diminuer les concentrations plasmatiques de voriconazole :
 - Rifampicine
 - Carbamazépine
 - Phénobarbital
 - Efavirenz à doses élevées
 - Ritonavir à doses élevées
- Les dérivés de l'ergot de seigle
- Le Sirolimus
- Le Millepertuis

[69].

1.4.5 Effets indésirables

Les antifongiques azolés sont peu toxiques. Leur principal effet indésirable est un trouble gastro-intestinal mineur qui peut comprendre :

- Nausées ;
- Vomissements ;
- Diarrhées.

Il est également possible, dans de rares cas, de rencontrer des anomalies des enzymes hépatiques avec très rarement des hépatites [69].

1.5 Problématique et objectifs

La kératite à *Acanthamoeba* est reconnue comme étant une infection oculaire grave pouvant aboutir à une cécité définitive.

Cette pathologie comprend une grande variété de symptômes, d'évolution progressive et d'intensité variable, ce qui rend son diagnostic rarement évoqué en première intention.

Cependant le traitement de la kératite amibienne est dépendant de la précocité du diagnostic, le parasite évoluant de formes trophozoïtaires à des formes kystiques.

Il n'existe actuellement pas de recommandations consensuelles pour le traitement.

Toutefois, de récentes études tendent à montrer l'efficacité du voriconazole.

Les objectifs de cette étude sont de comparer l'activité du voriconazole sur des isolats de référence d'*Acanthamœba polyphaga*, d'*Acanthamœba castellanii* et d'*Acanthamœba lenticulata* qui sont les souches les plus fréquemment responsables de kératite amibienne.

L'activité du voriconazole sera évaluée sur la forme trophozoïte afin d'obtenir la valeur d'une dose minimale efficace permettant une transposition à un éventuel modèle *in vivo*.

2. Matériels et méthodes

2.1 Souches de référence

2.1.1 *Acanthamæba polyphaga*

Les souches d'*Acanthamæba polyphaga* utilisées sont des souches de référence (ATCC® 50495™), isolées d'une cornée humaine.

2.1.2 *Acanthamæba castellanii*

Les souches d'*Acanthamæba castellanii* utilisées sont des souches de référence (ATCC® 30234™), isolées d'une culture fongique.

2.1.3 *Acanthamæba lenticulata*

Les souches d'*Acanthamæba lenticulata* utilisées sont des souches de référence (ATCC® 50690™), isolées d'une cornée humaine.

2.2 Culture des souches

Les souches ont été mises en culture dans le milieu PYG (Peptone Yeast Glucose) qui comporte tous les nutriments nécessaires au développement des amibes.

Afin d'éviter toute contamination microbiologique exogène, et après avoir stérilisé les préparations à l'aide d'un autoclave (cycle de 121°C pendant 15 minutes), deux antibiotiques ont été ajoutés :

- Pénicilline
- Gentamycine

TABLEAU 2 : Composition chimique du milieu PYG

Réactifs	Volume pour une préparation de milieu (mL)	Masse à dissoudre pour une préparation de milieu (g)
Protéose peptone	/	20
Extrait de levure	/	1
Magnésium sulfate heptahydrate à 0,4M	10	/
Calcium chloride à 0,05M	8	/
Citrate trisodique dihydrate à 0,1M	34	/
Sodium phospahte dibasic heptahydrate à 0,25M	10	/
Potasium dihydrogène phosphate à 0,25M	10	/
Ammonium Fer II sulfate hexahydrate à 0,005M	10	/
Glucose à 2M	50	/
Pénicilline	0,217	/
Gentamycine	1,250	/
H2O	qsp 1L	/

Le milieu PYG a été préparé en suivant les concentrations présentées ci-dessus.

Le milieu a ensuite été conservé en chambre froide à +4°C jusqu'à utilisation.

A partir d'une suspension de kystes des différentes cultures, les parasites ont été culotés après centrifugation à 800g pendant 10 minutes à 20°C. Après élimination du surnageant, le culot a été suspendu dans 1mL de milieu PYG, puis vortexé avant d'être transféré dans un flacon de culture contenant 14mL de milieu PYG.

Les flacons ont ensuite été incubés à 30°C et quotidiennement vérifiés au microscope inversé.

L'entretien des cultures a été effectué toutes les 48h. Dès lors que les parasites formèrent un tapis parasitaire, un repiquage fut réalisé.

Une fois une concentration visuellement suffisante obtenue, le tapis parasitaire a été détaché du flacon par incubation sur la glace pendant 15 minutes. La suspension a ensuite été centrifugée à 800g pendant 10 minutes à +20°C et le culot a été re-suspendu dans 10mL de PYG.

Un volume de 10µL de cette suspension a ensuite été déposé dans une cellule de KOVA pour dénombrement. Le comptage a été réalisé en double sur l'intégralité de la lame à l'aide d'un microscope optique objectif X20.

Après comptage, une dilution a été établie afin d'obtenir une solution mère à 10⁴ et 10⁶ amibes/mL pour *A. polyphaga* et *A. lenticulata* et 10³ et 10⁵ pour *A. castellanii*.

2.3 Préparation du voriconazole

La spécialité utilisée est le Vfend® en poudre à reconstituer pour perfusion du laboratoire Pfizer.

Le Vfend® a été reconstitué avec 19mL d'eau pour préparation injectable, ce qui donne une solution mère de voriconazole à 10mg/mL.

Puis, une solution fille à 80mg/L a été préparée en mélangeant :

- 160µL de solution mère
- 19,84mL de PYG

Cette solution fille subira des dilutions en cascade afin d'obtenir un panel de concentrations.

De plus, les concentrations ont été initialement doublées afin d'anticiper la dilution au $\frac{1}{2}$ engendrée par la mise en contact du parasite et du voriconazole.

TABLEAU 3 : Tableau de préparation des concentrations de voriconazole

Concentration en mg/L	80	40	10	4	2	1	0,2	0,1	0,02
Volume à prélever en microlitres	/	1500	750	1200	1500	1500	600	1500	600
Volume de PYG en microlitres	/	1500	2250	1800	1500	1500	2400	1500	2400

2.4 Mise en contact des *Acanthamoeba* avec le voriconazole

Six plaques ont été préparées, dont trois pour chacune des deux concentrations de parasites utilisées. Les deux séries de 3 plaques comportaient :

- Une plaque 24 heures après mise en contact
- Une plaque 48 heures après mise en contact
- Une plaque 72 heures après mise en contact

Les concentrations finales d'amibes sont 10^3 et 10^5 amibes/mL pour *A. polyphaga* et *A. lenticulata* et 10^2 et 10^4 pour *A. castellanii*.

TABLEAU 4 : Schématisation de la plaque en fonction des concentrations en voriconazole

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	EA U	EAU	EAU	EA U	EA U	EAU	EAU	EAU	EAU	EA U		
B	EA U	40/1	40/2	20/1	20/2	5/1	5/2	2/1	2/2	EA U		
C	EA U	1/1	1/2	0,5/ 1	0,5/ 2	0,1/1	0,1/2	0,05/ 1	0,05/ 2	EA U		
D	EA U	0,01/ 1	0,01/ 2	0/1	0/2	PYG/ 1	PYG/ 2	EA U	EAU	EA U		
E	EA U	EAU	EAU	EA U	EA U	EAU	EAU	EA U				
F												
G												
H												

Ainsi 100µL des solutions mères à 10^4 et 10^6 amibes/mL (pour *A. polyphaga* et *A. lenticulata*) et 10^3 et 10^5 (pour *A. castellanii*) ont été déposées dans les différents puits à l'aide d'une pipette multi-canaux.

Puis, 100µL des solutions aux différentes concentrations ont été déposées dans les puits en question. Chaque concentration est déposée en duplicat.

Les plaques ont ensuite été placées dans une étuve à 37°C et 5% de CO₂.

2.5 Lecture et dénombrement au microscope

Après avoir respecté les temps d'incubation, une lecture a été réalisée à 24, 48 et 72 heures.

200µL de bleu de Trypan ont été ajoutés dans chaque puits.

La lecture se fait au microscope optique (grossissement x20) sur cellule de KOVA après prélèvement de 10µL des différents puits.

Le dénombrement a été réalisé en duplicat sur l'intégralité de la lame, soit 81 carrés.

Le nombre d'amibes compté X sur les 81 carrés subit cette opération :

- Nombre amibes/mL = $((32 \times X) / 81) \times 1000 \times 4$

Le nombre d'amibes compté X est ramené à un nombre compté sur 32 carrés, puis multiplié par un coefficient de 1000 pour ramener l'unité en amibes/mL.

Et enfin, ce nombre a été multiplié par 4 afin de corriger la double dilution engendrée par la mise en contact des parasites et du voriconazole puis par le bleu de Trypan.

2.6 Test d'inhibition de multiplication

Les résultats obtenus lors du dénombrement à différentes concentrations sont exprimés en pourcentage d'inhibition de multiplication (PIM), calculés selon la formule suivante :

$$\text{PIM} = \frac{\text{Nombre d'amibes dans les cultures traitées}}{\text{Nombre d'amibes dans les cultures témoin}} \times 100$$

Un témoin sans traitement a été réalisé avec un dénombrement à 24, 48 et 72 heures.

2.7 Analyses statistiques

Le test de Student a été utilisé pour les différentes comparaisons de valeur réalisées au cours de cette étude.

Les comparaisons ont été jugées significatives lorsque la *p-valeur* était strictement inférieure à 0,05.

3. RESULTATS

3.1 *Acanthamoeba castellanii*

Après la mise en contact des parasites avec le voriconazole, des dénombrements ont été réalisés à 24, 48 et 72 heures.

Après 24 heures d'incubation, les résultats obtenus ne sont pas assez significatifs. En effet, le nombre d'amibes n'est significativement pas différent ($p > 0,05$) entre les différentes concentrations.

Après 48 heures d'incubation, les résultats obtenus ne sont pas assez significatifs. En effet, le nombre d'amibes n'est significativement pas différent ($p > 0,05$) entre les différentes concentrations.

Après 72 heures d'incubation, les résultats obtenus sont exploitables. Les résultats utilisés correspondent à l'inoculum de 10^4 amibes/mL qui offrent une meilleure *p-valeur*.

Le nombre d'amibes est donc significativement différent ($p < 0,05$) entre différentes concentrations.

Les valeurs obtenues sont présentées sous la forme d'un diagramme en bâton ci-dessous.

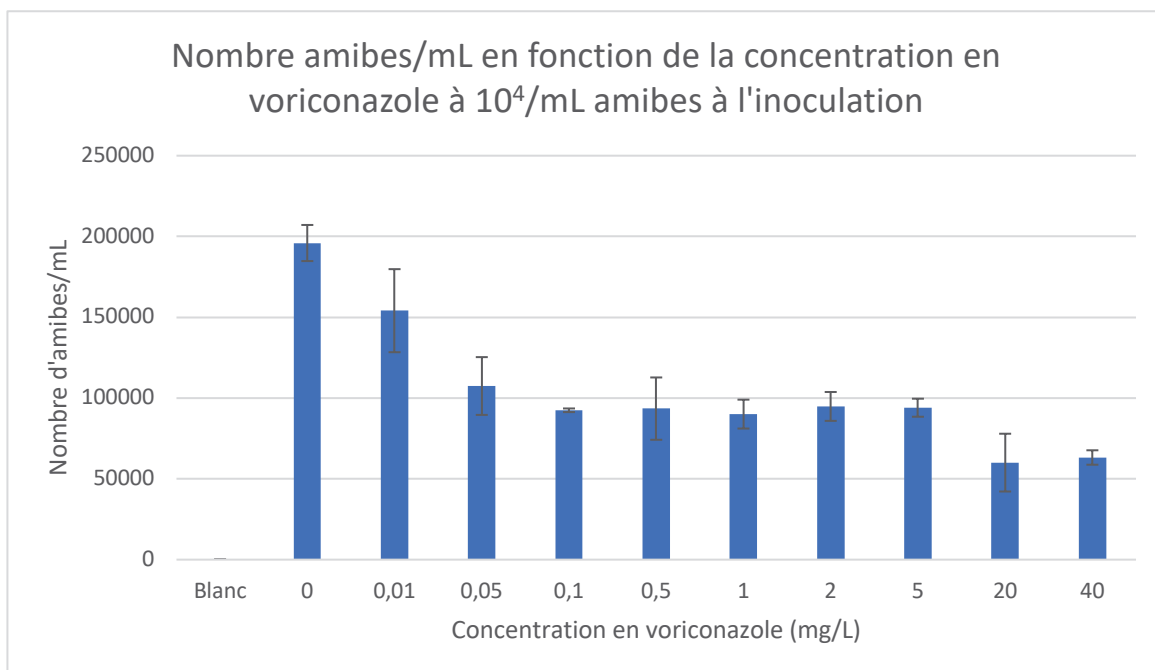


FIGURE 10 : Représentation graphique du nombre d'amibes/mL d'*A. castellanii* à 10^4 /mL en fonction de la concentration en voriconazole à 72 heures

D'après la figure ci-dessus, il est démontré que le nombre d'amibes/mL est significativement différent ($p < 0,05$) pour les concentrations allant de 0,05mg/L à 40mg/L à celui obtenu sans voriconazole correspondant au témoin.

Cependant, pour une concentration de 0,01 mg/L, le nombre d'amibes/mL n'est significativement pas différent ($p > 0,05$) à celui obtenu sans voriconazole.

Enfin, pour des valeurs allant de 0,05mg/L à 5mg/L, il n'existe pas de différence significative du nombre d'amibes/mL ($p > 0,05$).

A l'aide du logiciel AAT BIOQUEST, la CI_{50} du voriconazole a été calculée pour *A. castellanii*.

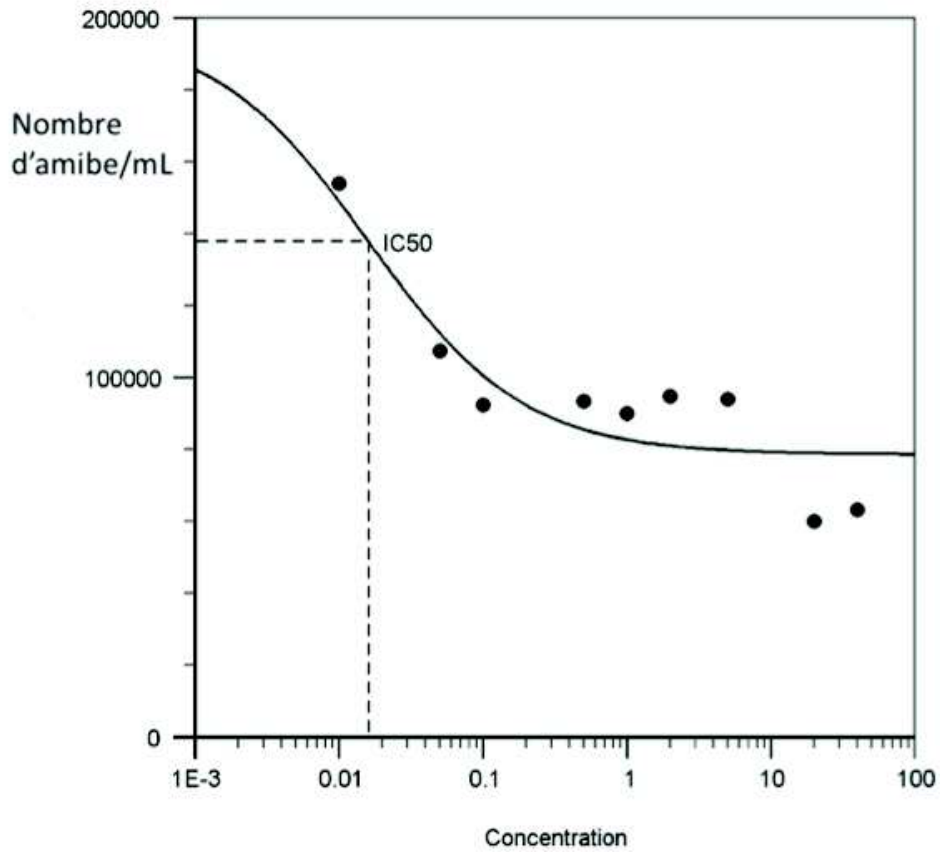


FIGURE 11 : Représentation graphique de la CI_{50} du voriconazole pour *A. castellanii*

La CI_{50} calculée est de 0,016mg/L, ce qui est cohérent avec l'analyse statistique réalisée.

En effet cette valeur est comprise dans l'intervalle montrant une différence significative avec le témoin.

3.2 *Acanthamoeba polyphaga*

Après la mise en contact des parasites avec le voriconazole, des dénombrements ont été réalisés à 24, 48 et 72 heures.

Après 24 heures d'incubation, les résultats obtenus ne sont pas assez significatifs. En effet, le nombre d'amibes n'est significativement pas différent ($p > 0,05$) entre les différentes concentrations.

Après 48 heures d'incubation, les résultats obtenus ne sont pas assez significatifs. En effet, le nombre d'amibes n'est significativement pas différent ($p > 0,05$) entre les différentes concentrations.

Après 72 heures d'incubation, les résultats obtenus sont exploitables. Les résultats utilisés correspondent à l'inoculum de 10^3 amibes/mL qui offrent une meilleure *p-valeur*.

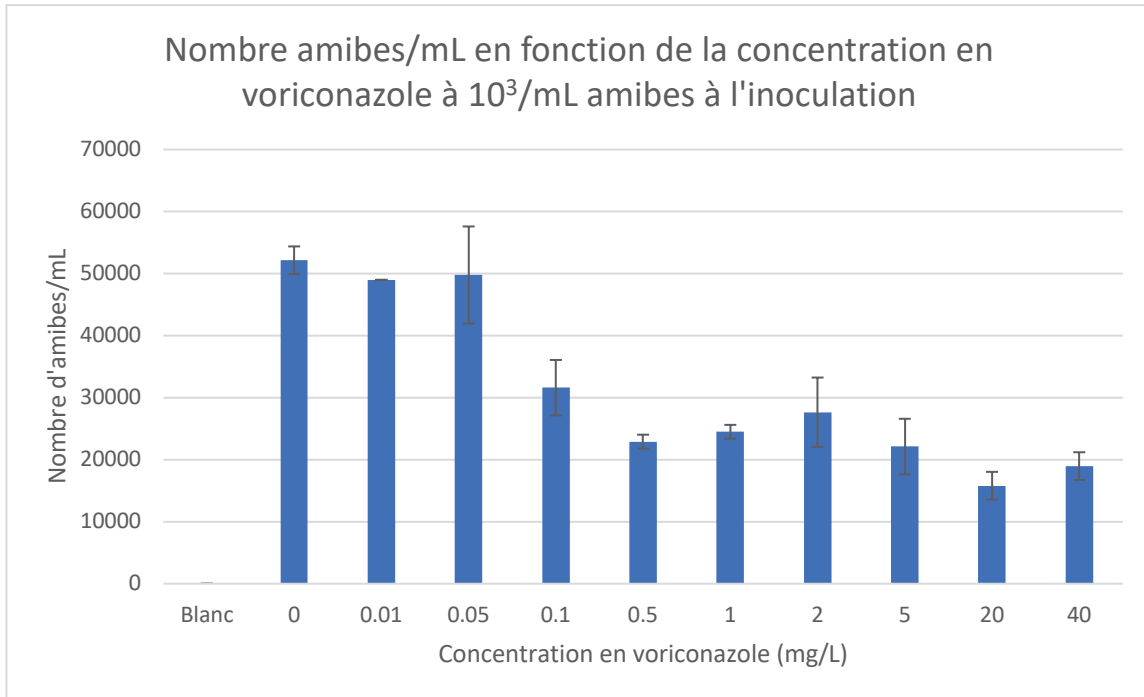


FIGURE 12 : Représentation graphique du nombre d'amibes/mL d'*A. polyphaga* à 10^3 /mL en fonction de la concentration en voriconazole à 72 heures.

D'après la figure ci-dessus, il est démontré que le nombre d'amibes/mL est significativement différent ($p < 0,05$) pour les concentrations allant de 0,5mg/L à 40mg/L à celui obtenu sans voriconazole correspondant au témoin.

De plus, pour une concentration de 0,1 mg/L, la *p-valeur* est proche de 0,05.

Alors que pour les concentrations allant de 0,01mg/L à 0,05mg/L, le nombre d'amibes/mL n'est significativement pas différent ($p > 0,05$) à celui obtenu sans voriconazole.

A l'aide du logiciel AAT BIOQUEST, la CI_{50} du voriconazole a été calculée pour *A. polyphaga*.

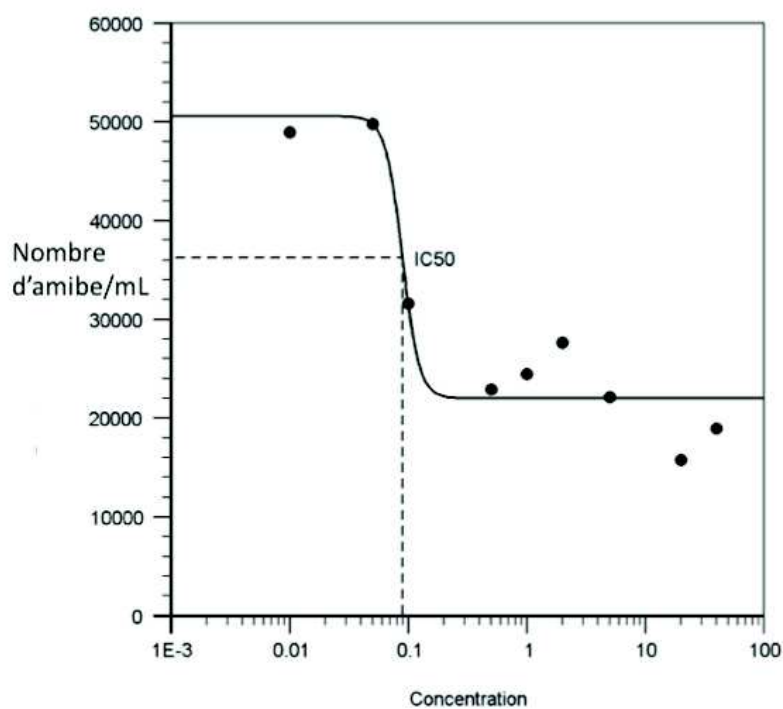


FIGURE 13 : Représentation graphique de la CI_{50} du voriconazole pour *A. polyphaga*

La CI_{50} calculée est de 0,089mg/L, ce qui est cohérent avec l'analyse statistique réalisée.

En effet cette valeur est comprise dans l'intervalle montrant une différence significative avec le témoin.

3.3 *Acanthamoeba lenticulata*

Après la mise en contact des parasites avec le voriconazole, des dénombrements ont été réalisés à 24, 48 et 72 heures.

Après 24 heures d'incubation, les résultats ne sont pas assez significatifs. En effet, le nombre d'amibes n'est significativement pas différent ($p > 0,05$) entre les différentes concentrations.

Après 48 heures d'incubation, les résultats obtenus ne sont pas assez significatifs. En effet, le nombre d'amibes n'est significativement pas différent ($p < 0,05$) entre les différentes concentrations.

Après 72 heures d'incubation, les résultats obtenus sont exploitables. Les résultats utilisés correspondent à l'inoculum de 10^3 amibes/mL qui offrent une meilleure *p-valeur*.

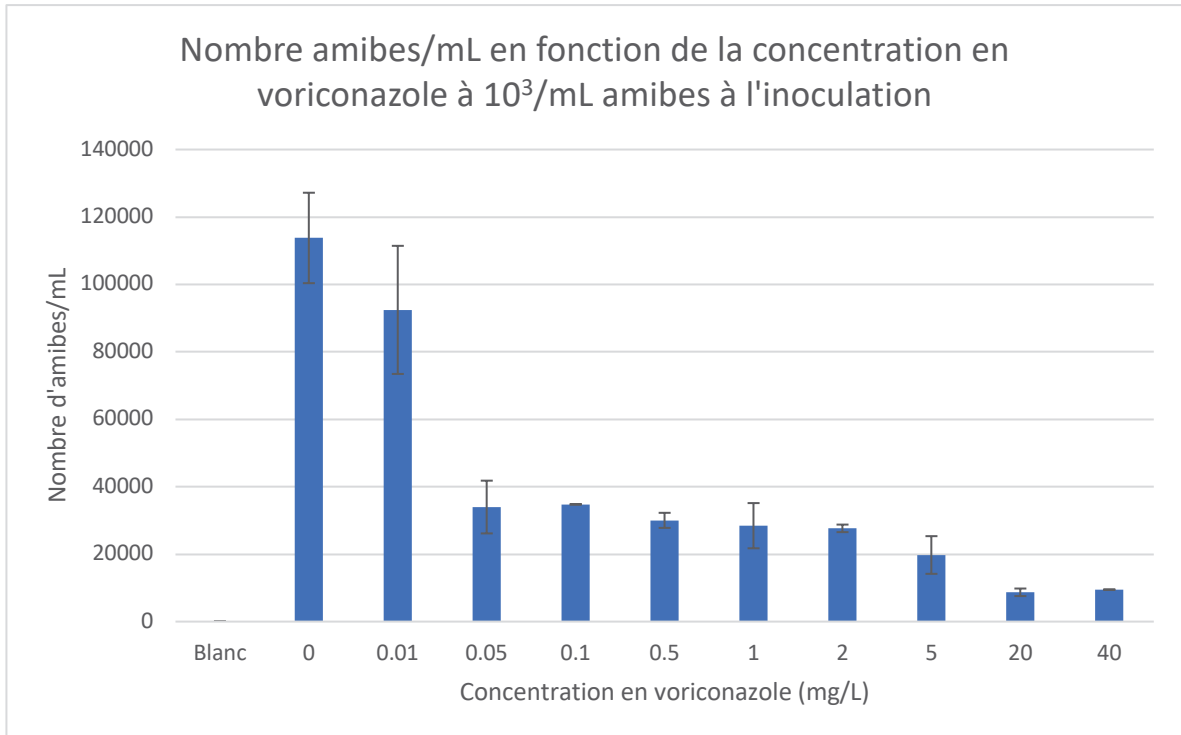


FIGURE 14 : Représentation graphique du nombre d'amibes/mL d'*A. lenticulata* à 10^3 /mL en fonction de la concentration en voriconazole à 72 heures.

D'après la figure ci-dessus, il est démontré que le nombre d'amibes/mL est significativement différent ($p < 0,05$) pour les concentrations allant de 0,05mg/L à 40mg/L à celui obtenu sans voriconazole correspondant au témoin.

Cependant, pour une concentration de 0,01 mg/L, le nombre d'amibes/mL n'est significativement pas différent ($p > 0,05$) à celui obtenu sans voriconazole.

A l'aide du logiciel AAT BIOQUEST, la CI_{50} du voriconazole a été calculée pour *A. lenticulata*.

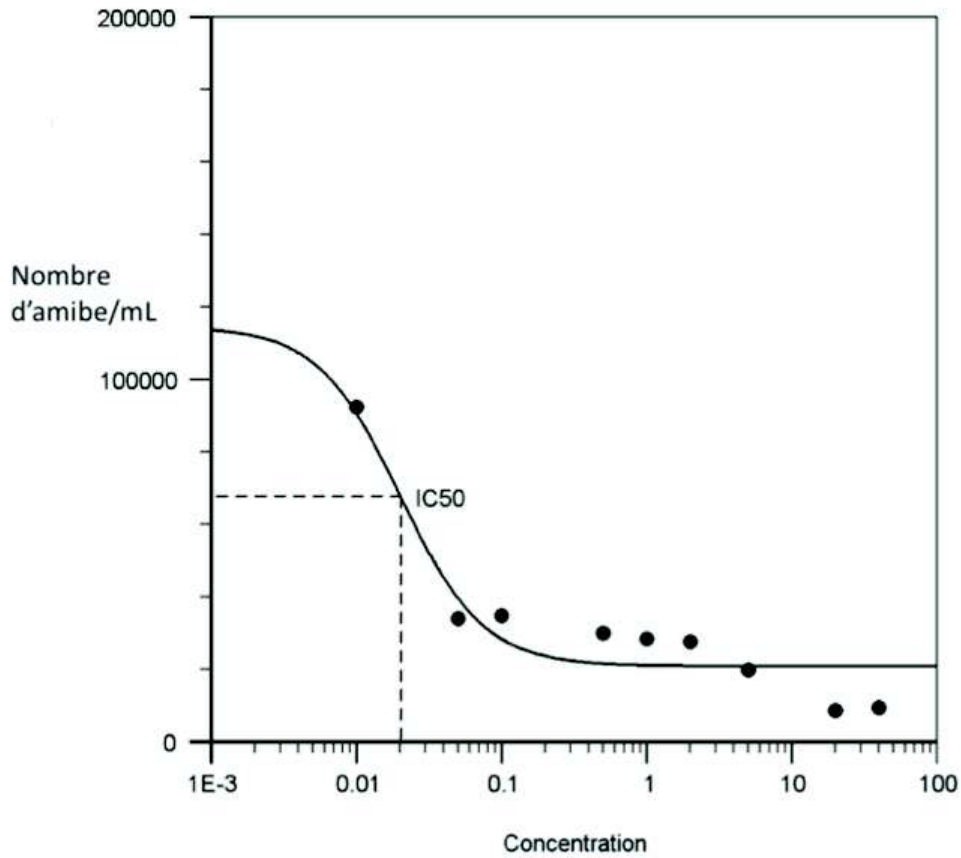


FIGURE 15 : Représentation graphique de la CI_{50} du voriconazole pour *A. lenticulata*

La CI_{50} calculée est de 0,020mg/L, ce qui est cohérent avec l'analyse statistique réalisée.

En effet cette valeur est comprise dans l'intervalle montrant une différence significative avec le témoin.

3.4 Comparaison des différentes CI₅₀

D'après les valeurs obtenues, il est démontré qu'il n'existe pas de différence significative entre les CI₅₀ d'*A. castellanii* et *A. lenticulata* ($p > 0,05$).

De plus, il existe une différence significative entre les CI₅₀ d'*A. polyphaga* et *A. castellanii* ainsi qu'entre *A. polyphaga* et *A. lenticulata* ($p < 0,05$).

3.5 Test d'inhibition de multiplication

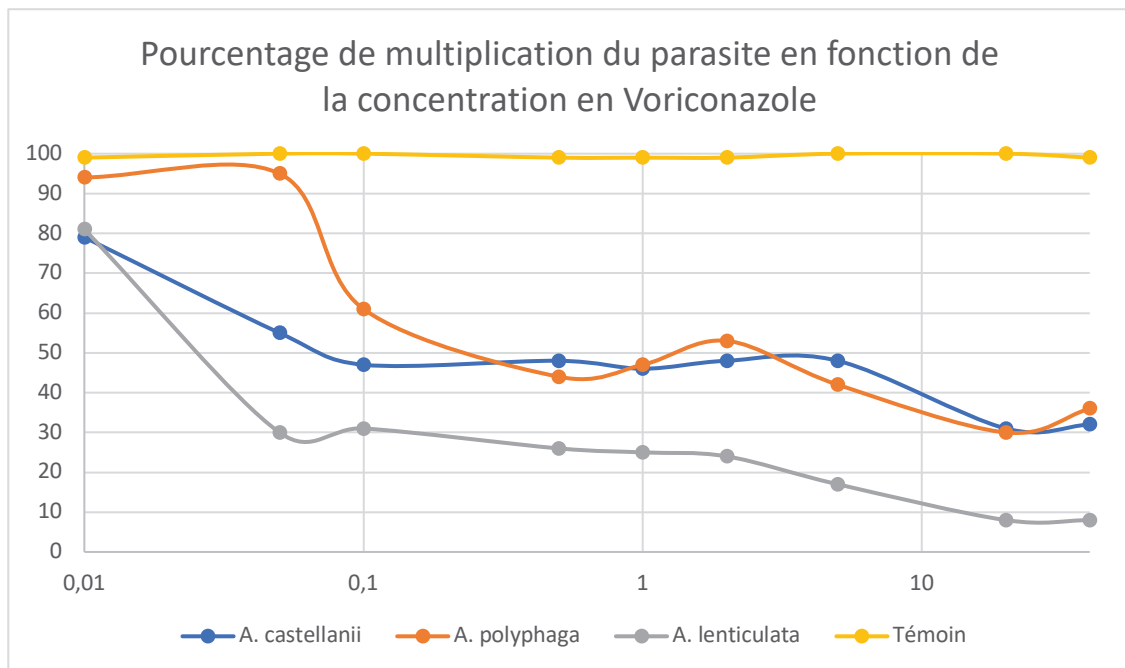


FIGURE 16 : Représentation graphique du pourcentage de multiplication des différentes espèces d'*Acanthamoeba* en fonction de la concentration en voriconazole

D'après le graphique ci-dessus, on peut voir qu'*A. lenticulata* semble plus sensible au voriconazole que les deux autres espèces.

De plus, *A. polyphaga* semble être plus résistant au voriconazole que les deux autres espèces.

Ces interprétations sont cohérentes avec les CI_{50} calculées et l'analyse statistique menée ci-dessus.

Il est intéressant de noter qu'au-delà d'une concentration de 0,1mg/L de voriconazole, la sensibilité d'*A. polyphaga* et *A. castellanii* semble proche.

4. Discussions

Les trois souches ATCC® utilisées durant cette étude correspondent aux souches les plus décrites dans la littérature dans le cadre de la kératite amibienne [70].

Les triazolés ont été utilisés de façon empirique avec succès dans les kératites amibiennes, sur 3 yeux résistants aux traitements conventionnels, traités par voriconazole à 1% en topique en plus des biguanides et diamidines [71]. Dans cette étude, les cas étaient tous porteurs de lentilles. Parmi eux, deux yeux ont été traités par topique à 1% de voriconazole toutes les deux heures avec succès. Le dernier œil a finalement nécessité un traitement par kératoplastie avec succès.

Des résultats similaires ont été publiés après l'utilisation de voriconazole *per os* à 200mg [72].

La posologie utilisée était de 200mg deux fois par jour pendant 6 semaines, puis par courtes périodes ou en continu selon les cas. L'éradication de l'infection a été obtenue après 7 à 11 mois.

Une autre étude, avec un modèle *in vitro*, a montré que le voriconazole était tout autant efficace sur différentes espèces d'*Acanthamoeba* que la chlorhexidine [73], qui constitue un des piliers du traitement actuel des kératites amibiennes à *Acanthamoeba*.

Les souches utilisées ont été isolées sur des patients du Pérou ainsi qu'une souche de référence d'*A. castellanii* [73].

Après analyse colorimétrique de l'activité des molécules, les concentrations efficaces du voriconazole se sont avérées plus faibles que pour la chlorhexidine.

De nombreuses études ont été publiées sur l'efficacité du voriconazole sur *A. polyphaga*, ceci pouvant s'expliquer par l'incidence élevée représentée par *A. polyphaga* dans le cadre des kératites amibiennes. Il était donc intéressant de se pencher sur d'autres espèces responsables de cette infection, comme *A. castellanii* et *A. lenticulata*.

L'activité du voriconazole a été testée sur la forme trophozoïte qui représente la forme végétative, dominante en cas de conditions favorables.

La forme trophozoïte a été choisie car elle s'avère être plus sensible que la forme kystique. Aucune activité kysticide n'a été rapportée après l'utilisation de doses allant jusqu'à 10mg/L de voriconazole sur des isolats cliniques [74].

En effet la forme kystique dans un modèle *in vivo* nécessite des doses plus élevées qui entraînent une augmentation de la fréquence des effets indésirables et de la toxicité.

Sur des souches de référence, l'activité kysticide a été obtenue pour des concentrations proches de 15mg/L alors que les concentrations étaient plus élevées sur des isolats cliniques [75][76].

Il est donc logique de s'intéresser dans un premier temps à la forme trophozoïte afin d'envisager par la suite une transposition à un modèle *ex vivo* puis *in vivo*.

Le retard au diagnostic de la kératite amibienne et donc la forme kystique reste aujourd'hui une vraie problématique quant à la thérapeutique à mettre en place du fait de la résistance comparativement aux pistes encourageantes liées à la forme trophozoïte.

L'étude [67] montre que l'utilisation du voriconazole à une dose inférieure ou égale à la CI_{50} entraîne un enkystement et donc une augmentation de la résistance. Plus la concentration augmente, moins ce phénomène d'enkystement a lieu.

L'utilisation d'une dose adaptée et spécifique semble donc primordiale afin de ne pas créer de résistance.

Il est intéressant de se demander si un protocole thérapeutique visant à reproduire un milieu favorable à la forme trophozoïte serait pertinent dans le but d'augmenter le rapport forme trophozoïte/forme kyste et donc d'augmenter la sensibilité du parasite au voriconazole.

Afin de réaliser les analyses statistiques, les valeurs obtenues à 72h post-traitement ont été retenues. Il n'y avait pas de différence significative entre les différentes concentrations de voriconazole utilisées et le témoin à 24 et 48 heures ($p > 0,05$).

Cette latence d'effet est cohérente avec la littérature qui mesure généralement l'efficacité au bout de 72-96h post-traitement [67] [72].

Pour le modèle *in vivo*, il y a aussi une latence d'efficacité mais qui est plus importante (plusieurs semaines). Cette différence peut s'expliquer par la biodisponibilité du médicament qui est variable ainsi que l'intervention de facteurs externes liés au modèle *in vivo*.

De plus, l'inoculum utilisé est de 10^3 amibes/mL pour *A. lenticulata* et *A. polyphaga* et de 10^4 amibes/mL pour *A. castellanii*. Ces concentrations ont été retenues car elles offraient les résultats les plus significatifs, une meilleure visibilité pour le dénombrement et par conséquent une meilleure reproductibilité.

Au vu de cette étude, le voriconazole possède une activité amœbicide. En effet, il existe une différence significative entre les valeurs obtenues avec et sans voriconazole ($p < 0,05$).

Ce constat s'applique aux 3 espèces étudiées :

- *A. castellanii*
- *A. lenticulata*
- *A. polyphaga*

Cependant les sensibilités ne sont pas les mêmes pour les 3 espèces. Les CI_{50} calculées montrent une sensibilité proche pour *A. lenticulata* (0,020mg/L)

et *A. castellanii* (0,016mg/L) ($p \text{ value} > 0,05$), ce qui, à notre connaissance n'avait pas été prouvée.

A. polyphaga semble plus résistant au voriconazole ($CI_{50} = 0,089\text{mg/L}$) que *A. castellanii*, ce qui est cohérent avec la littérature [67].

De plus, grâce à cette étude, il peut être conclu que *A. polyphaga* est plus résistant au voriconazole que *A. lenticulata* ($p < 0,05$).

Il serait donc intéressant de prouver cette même différence de sensibilité sur un modèle *in vivo*. En effet, ce constat pose la question d'une réponse variable au traitement thérapeutique par le voriconazole en fonction de l'espèce responsable de l'infection.

L'idée d'un diagnostic incluant la caractérisation de l'espèce prendrait alors tout son sens afin d'adapter les posologies de voriconazole.

D'après les résultats obtenus après calcul du pourcentage d'inhibition de multiplication (FIGURE 16), il semble qu'au-delà d'une certaine concentration en voriconazole la sensibilité d'*A. polyphaga* se rapproche de celle de *A. castellanii*, ce qui donne du poids à l'idée d'une adaptation posologique du voriconazole en fonction de l'espèce.

Au-delà du diagnostic d'espèce, il ne peut être exclu une différence de sensibilité intra-espèce qui pourrait être expliquée par le génotype de la souche.

La complexité du traitement de la kératite amibienne, expliquée par la problématique du retard au diagnostic, de la résistance du parasite et de la tolérance aux traitements utilisés, justifie l'importance de la prévention.

Du fait que 85% des cas de kératite amibienne apparaissent chez les porteurs de lentilles [36], il est primordial que la prévention s'axe sur les règles de bon usage des lentilles de contact et plus particulièrement des solutions de nettoyage (cf ANNEXE 1).

De nombreuses études montrent la faible efficacité des solutions de nettoyage [77][78] [79], en particulier les solutions type multi-usages qui s'avèrent pratiques à l'utilisation mais avec une faible couverture des germes impliqués dans les infections oculaires liées au port de lentilles de contact.

D'un point de vue réglementaire, l'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament) standardise l'étude de l'action des antiseptiques et désinfectants. Ces normes décrivent les méthodes *in vitro* évaluant la concentration minimale entraînant la réduction d'une population microbienne initiale. Elles s'appliquent aux bactéries : *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia merescens*, *Streptococcus aureus*, ainsi qu'aux champignons : *Candida albicans* et *Fusarium solani*. La norme ISO 14729 appliquée lors de la mise sur le marché d'un produit d'entretien pour lentilles de contact n'impose aucun essai anti-viral ou anti-parasitaire [80].

CONCLUSION

Les Acanthamibes sont des pathogènes découverts depuis plusieurs décennies, cependant leur diagnostic et leur prise en charge restent complexes pour les professionnels de santé.

La kératite amibienne constitue un enjeu de santé publique, en effet, elle peut être responsable de graves séquelles oculaires.

Son incidence est corrélée à l'augmentation croissante du port des lentilles de contact et un mauvais respect des règles d'hygiène et d'entretien.

Cette augmentation de l'incidence a entraîné l'élaboration de nouvelles techniques de diagnostic et la découverte de nouvelles pistes thérapeutiques.

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail, qui a pour but de comparer l'activité du voriconazole sur 3 des espèces les plus responsables de kératite amibienne.

Cette étude a permis de montrer que *A. polyphaga* est plus résistant au voriconazole que *A. castellanii* et *A. lenticulata* ; Ces deux dernières espèces possèdent une sensibilité très proche au voriconazole.

Le fait que ces 3 espèces n'aient pas la même sensibilité sur un modèle *in vitro* pose la question de l'intérêt de la détermination d'espèce lors du diagnostic de la pathologie, afin d'adapter les posologies du traitement.

Ce travail ouvre la porte à une transposition sur un modèle *ex vivo* et *in vivo*.

L'essor de nouvelles solutions thérapeutiques doit s'accompagner du renforcement des messages de prévention liés au port des lentilles et à leurs bons usages, ainsi qu'à

l'établissement de nouvelles exigences réglementaires concernant les solutions d'entretien. Il est nécessaire que leur composition évolue, pour couvrir un plus grand nombre de germes responsables d'infections oculaires, dont les amibes libres.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

°C : degré Celsius

µm : Micromètre

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

CI₅₀ : Concentration inhibitrice 50

kg : Kilogramme

mg : Milligramme

MGG : May Grünwald Giemsa

MIP-133 : Mannose-induced Protease 133

MMP : Metalloprotéinase Matricielle

ORL : Oto-Rhino-Laryngologie

PCR : Polymerase chain reaction

PHMB : Polyhexaméthylène Biguanide

PIM : Pourcentage d'Inhibition de Multiplication

PYG : Peptone Yeast Glucose

UVA : Ultraviolet A

ANNEXES

ANNEXE 1 : Bonnes pratiques d'usage des lentilles

Règles d'hygiène :

- Lavez, rincez et séchez vos mains (avec un essuie-main jetable) avant de poser ou de retirer vos lentilles
- Ne jamais utiliser l'eau du robinet pour rincer les lentilles, préférer les solutions de rinçage ou les dosettes de sérum physiologique
- Remplir et changer quotidiennement le boîtier de lentilles avec une nouvelle dose de décontaminant
- Le soir, après utilisation, il faut nettoyer les lentilles, les rincer et les décontaminer.
- Renouveler les étuis neufs régulièrement

Règles de prudence :

- Jeter immédiatement toute lentille abimée
- Ne jamais dormir avec des lentilles de port quotidien sous risque de complications oculaires graves
- Respecter la fréquence de renouvellement des lentilles indiquées sur l'ordonnance
- Proscrire le port des lentilles en cas de baignade en piscine ou sports nautiques
- Consulter tous les ans votre ophtalmologue pour un contrôle

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Naginton J, Watson PG, Playfair TJ, McGill J, Jones BR, Steele AD. Amoebic infection of the eye. *Lancet* 1974;2:1537—40.
- [2] Awwad ST, Petroll WM, McCulley JP, Cavanagh HD. Updates in *Acanthamoeba* keratitis. *Eye Contact Lens* 2007;33:1—8.
- [3]. Siddiqui, Ruqaiyyah, and Naveed Ahmed Khan. “Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*.” *Parasites & vectors* vol. 5 6. 10 Jan. 2012, doi:10.1186/1756-3305-5-6.
- [4]. Castellani A: An amoeba found in culture of yeast: preliminary note. *J Trop Med Hyg* 1930, 160.
- [5] Visvesvara, G. S. “Classification of *Acanthamoeba*.” *Reviews of Infectious Diseases*, vol. 13, 1991, pp. S369–S372.
- [6] Pussard M, Pons R. Morphologies de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* [Protozoa Amoebida]. *Pro- tistologica* 1977;13:557—610.
- [7] Stothard DR, Hay J, Schroeder-Diedrich JM, Seal DV, Byers TJ. Fluorescent oligonucleotide probes for clinical and environ- mental detection of *Acanthamoeba* and the T4 18S rRNA gene sequence type. *J Clin Microbiol* 1999;37:2687—93.
- [8] Behera, Himanshu Sekhar et al. “Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* spp. from *Acanthamoeba* meningitis/ meningoencephalitis (AME) patients in India.” *Parasites & vectors* vol. 9,1 442. 9 Aug. 2016, doi:10.1186/s13071-016-1729-5.

- [9] Arnalich-Montiel, Francisco et al. "Influence of Acanthamoeba genotype on clinical course and outcomes for patients with Acanthamoeba keratitis in Spain." *Journal of clinical microbiology* vol. 52,4 (2014): 1213-6. doi:10.1128/JCM.00031-14.
- [10] Bowers B, Korn ED: Cytochemical identification of phosphatase activity in the contractile vacuole of *Acanthamoeba castellanii*. *J Cell Biol* 1973, 59:784-91.
- [11] Dearborn DG, Korn ED: Lipophosphoglycan of the plasma membrane of *Acanthamoeba castellanii*, fatty acid composition. *J Biol Chem* 1974, 249:3342-6.
- [12] Smith FR, Korn ED: 7-Dehydrostigmaterol and ergosterol: the major sterol of an amoebae. *J Lipid Res* 1968, 9:405-8.
- [13] Ulsamer AG, Wright PL, Wetzel MG, Korn ED: Plasma and phagosome membranes of *Acanthamoeba castellanii*. *J Cell Biol* 1971, 51:193-215.
- [14] Pollard TD, Shelton E, Weihing RR, Korn ED: Ultrastructural characterization of F-actin isolated from *Acanthamoeba castellanii* and identification of cytoplasmic filaments as F-actin by reaction with rabbit heavy meromyosin. *J Mol Biol* 1970, 50:91-7.
- [15] Preston TM, Richard H, Wotton RS: Locomotion and feeding of *Acanthamoeba* at the water-air interface of ponds. *FEMS Microbiol lett* 2001, 194:143-7.
- [16] Burger G, Plante I, Lonergan KM, Gray MW: The mitochondrial DNA of the amoeboid protozoon, *Acanthamoeba castellanii*: complete sequence, gene content and genome organization. *J Mol Biol* 1995, 245:522-37.
- [17] Chelkha et al., 2018 a phylogenetic study of acanth polyphaga draft genome
- [18] Anderson IJ, Watkins RF, Samuelson J, Spencer DF, Majoros WH, Gray MW, Loftus BJ: Gene discovery in the *Acanthamoeba castellanii* genome. *Protist* 2005, 156:203-14.
- [19] Band RN, Mohrlök S: The cell cycle and induced amitosis in *Acanthamoeba*. *J Protozool* 1973, 20:654-7.

- [20] Hirukawa Y, Nakato H, Izumi S, Tsuruhara T, Tomino S: Structure and expression of a cyst specific protein of *Acanthamoeba castellanii*. *Biochim Biophys Acta* 1998, 1398:47-56.
- [21] Jacob Lorenzo-Morales Naveed A Khan, *et al.*, An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite* 2015;22:5.
- [22] Ibrahim YW, *et al.*, Factors affecting the epidemiology of *Acanthamoeba* keratitis *Ophthalmic Epidemiol* 2007 ; 14 : 53-60.
- [23] Cursons RT, Brown TJ, Keys EA, Moriarty KM, Till D: Immunity to pathogenic free-living amoebae: role of humoral antibody. *Infect Immun* 1980, 29:401-7.
- [24] Brindley N, Matin A, Khan NA: *Acanthamoeba castellanii*: high antibody prevalence in racially and ethnically diverse populations. *Expe Parasitol* 2009, 121:254-6.
- [25] Clarke DW, *et al.*, The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis. *Trends in Parasitology*, 2006;22: 175–180.
- [26] Alizadeh,H.etal.(2005)Roleofcontactlenswear,bacterialflora,and mannose-induced pathogenic protease in the pathogenesis of amoebic keratitis. *Infect. Immun.* 73, 1061–1068.
- [27] Clarke, D.W. et al. (2005) Failure of *Acanthamoeba castellanii* to produce intraocular infections. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 2472–2478.
- [28] Alizadeh H, *et al.*, Role of activated macrophages in *Acanthamoeba* keratitis. *Journal of Parasitology*, 2007;93: 1114–1120.
- [29] Khan NA. Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. *Microb Pathog* 2003;34:277—85.

- [30] Watson S, Dart JK. *Acanthamoeba* keratitis. In: Johnson GJ, Minassian D, Weale RA, West SK, editors. The epidemiology of eye disease. England: Arnold; 2003. p. 200—5.
- [31] Bharathi MJ, Ramakrishnan R, Meenakshi R, Padmavathy S, Shivakumar C, Srinivasan M. Microbial keratitis in South India: influence of risk factors, climate, and geographical variation. *Ophthalmic Epidemiol* 2007;14:61—9.
- [32] Acharya NR, Lietman TM, Margolis TP. Parasites on the rise: a new epidemic of *Acanthamoeba* keratitis. *Am J Ophthalmol* 2007;144:292—3.
- [33] Illingworth CD, Cook SD. *Acanthamoeba* keratitis. *Surv Ophthalmol* 1998;42:493—508.
- [34] Stehr-Green JK, Bailey TM, Visvesvara GS. The epidemiology of *Acanthamoeba* keratitis in the United States. *Am J Ophthalmol* 1989;107:331—6.
- [35] Sharma S, Garg P, Rao GN. Patient characteristics, diagnosis, and treatment of non-contact lens related *Acanthamoeba* keratitis. *Br J Ophthalmol* 2000;84:1103—8.
- [36] Houang E, Lam D, Fan D, Seal D. Microbial keratitis in Hong Kong: relationship to climate, environment and contact-lens disinfection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001;95:361—7.
- [37] Bharathi MJ, Ramakrishnan R, Meenakshi R, Padmavathy S, Shivakumar C, Srinivasan M. Microbial keratitis in South India: influence of risk factors, climate, and geographical variation. *Ophthalmic Epidemiol* 2007;14:61—9.
- [38] Kilvington S, Gray T, Dart J, Morlet N, Beeching JR, Frazer DG, et al. *Acanthamoeba* keratitis: the role of domestic tap water contamination in the United Kingdom. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:165—9.
- [39] Mathers WD, Sutphin JE, Lane JA, Folberg R. Correlation between surface water contamination with amoeba and the onset of symptoms and diagnosis of amoeba-like keratitis. *Br J Ophthalmol* 1998;82:1143—6.

- [40] Radford CF, Lehmann OJ, Dart JK. *Acanthamoeba* keratitis: multicentre survey in England 1992—1996. National *Acanthamoeba* Keratitis Study Group. Br J Ophthalmol 1998;82:1387—92.
- [41] Butler TK, Males JJ, Robinson LP, Wechsler AW, Sutton GL, Cheng J, et al. Six-year review of *Acanthamoeba* keratitis in New South Wales Australia: 1997—2002. Clin Experiment Ophthalmol 2005;33:41—6.
- [42] Fears, Alyssa C et al. “Comparative in vitro effectiveness of a novel contact lens multipurpose solution on *Acanthamoeba castellanii*.” *Journal of ophthalmic inflammation and infection* vol. 8,1 19. 24 Oct. 2018, doi:10.1186/s12348-018-0161-8.
- [43] Radford CF, Minassian DC, Dart JK. *Acanthamoeba* keratitis in England and Wales: incidence, outcome, and risk factors. Br J Ophthalmol 2002;86:536—42.
- [44] Joslin CE, Tu EY, Shoff ME, Booton GC, Fuerst PA, McMahon TT, et al. The association of contact lens solution use and *Acanthamoeba* keratitis. Am J Ophthalmol 2007;144:169—80.
- [45] Joslin CE, Tu EY, McMahon TT, Passaro DJ, Stayner LT, Sugar J. Epidemiological characteristics of a Chicago-area *Acanthamoeba* keratitis outbreak. Am J Ophthalmol 2006;142:212—7.
- [46] Jeong HJ, Lee SJ, Kim JH, Xuan YH, Lee KH, Park SK, et al. *Acanthamoeba*: keratopathogenicity of isolates from domestic tap water in Korea. Exp Parasitol 2007;117:357—67.
- [47]. Claerhout I, Goegebuer A, van Den BC, Kestelyn P. Delay in diagnosis and outcome of *Acanthamoeba* keratitis. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2004;242:648—53.
- [48] Bacon AS, Dart JK, Ficker LA, Matheson MM, Wright P. *Acanthamoeba* keratitis The value of early diagnosis. Ophthalmology 1993;100:1238—43.

- [49] Clarke DW, Niederkorn JY. The immunobiology of *Acanthamoeba* keratitis. *Microbes Infect* 2006;8:1400—5.
- [50] SunX,ZhangY,LiR,WangZ,LuoS,GaoM,etal.*Acanthamoeba* keratitis: clinical characteristics and management. *Ophthalmology* 2006;113:412—6.).
- [51] Bacon AS, Frazer DG, Dart JK, Matheson M, Ficker LA, Wright P. A review of 72 consecutive cases of *Acanthamoeba* keratitis, 1984-1992. *Eye* 1993;7:719—25.
- [52] Tu EY, Joslin CE, Sugar J, Shoff ME, Booton GC. Prognostic factors affecting visual outcome in *Acanthamoeba* keratitis. *Ophthalmology* 2008;115:1998—2003.
- [53] Dart JK, Saw VP, Kilvington S. *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis and treatment update 2009. *Am J Ophthalmol* 2009;148:487—99.
- [54] Murthy S, Hawksworth NR, Cree I. Progressive ulcerative keratitis related to the use of topical chlorhexidine gluconate [0,02 %]. *Cornea* 2002;21:237—9.
- [55] Herz NL, Matoba AY, Wilhelmus KR. Rapidly progressive cataract and iris atrophy during treatment of *Acanthamoeba* keratitis. *Ophthalmology* 2008;115:866—9.
- [56] Zhang X, Sun X, Jiang C, Wang Z, Zhang Y, Deng S, et al. A new in vivo confocal microscopy prognostic factor in *Acanthamoeba* keratitis. *J Fr Ophtalmol* 2014;37:130—7.
- [57] Mathers WD, Nelson SE, Lane JL, Wilson ME, Allen RC, Folberg R. Confirmation of confocal microscopy diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis using polymerase chain reaction analysis. *Arch Ophthalmol* 2000;118:178—83.
- [58] Lehmann OJ, Green SM, Morlet N, Kilvington S, Keys MF, Mathe- son MM, et al. Polymerase chain reaction analysis of corneal epithelial and tear samples in the diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:1261—5.
- [59] Ikeda Y, Miyazaki D, Yakura K, Kawaguchi A, Ishikura R, Inoue Y, et al. Assessment of real-time polymerase chain reaction

- [60] Larkin DF, Kilvington S, Dart JK. Treatment of *Acanthamoeba* keratitis with polyhexamethylene biguanide. *Ophthalmology*
- [61] Hay J, Kirkness CM, Seal DV, Wright P. Drug resistance and *Acanthamoeba* keratitis: the quest for alternative antiprotozoal chemotherapy. *Eye* 1994;8:555—63.
- [62] Kilvington S, Hughes R, Byas J, Dart J. Activities of therapeutic agents and myristamidopropyl dimethylamine against *Acanthamoeba* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:2007—9.
- [63] Perrine D, Chenu JP, Georges P, Lancelot JC, Saturnino C, Robba M. Amoebicidal efficiencies of various diamidines against two strains of *Acanthamoeba* polyphaga. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:339—42.
- [64] Kandori M, Inoue T, Shimabukuro M, Hayashi H, Hori Y, Maeda N, et al. Four cases of *Acanthamoeba* keratitis treated with phototherapeutic keratectomy. *Cornea* 2010;29:1199—202.
- [65] Por YM, Mehta JS, Chua JL, Koh TH, Khor WB, Fong AC, et al. *Acanthamoeba* keratitis associated with contact lens wear in Singapore. *Am J Ophthalmol* 2009;148:7—12.
- [66] Garduño-Vieyra L, Gonzalez-Sanchez CR, Hernandez-Da Mota SE. Ultraviolet-a light and riboflavin therapy for *Acanthamoeba* keratitis: a case report. *Case Rep Ophthalmol* 2011;2: 291—5.
- [67] Hernández-Martínez et al. (2019). Evaluation of the sensitivity to chlorhexidine, voriconazole and itraconazole of T4 genotype *Acanthamoeba* isolated from Mexico. *Experimental Parasitology*.
- [68] A.J. Carrillo-Muñoz, G. Giusiano, P.A. Ezkurra, and G. Quindós. Antifungal agents : Mode of action in yeast cells. *Rev Esp Quimioterap*, Juin 2006.
- [69] Vidal □. *Le Dictionnaire*. Edition du Vidal, quatre-vingt-quinzième édition, 2019

[70] David R Haburchak, *Acanthamoeba Infection Treatment & Management*
Updated: Aug 14, 2017, MD, MBBS, MD

[71] Bang S, Edell E, Eghrari AO, Gottsch JD. Treatment with voriconazole in 3 eyes with resistant *Acanthamoeba* keratitis. *Am J Ophthalmol* 2010;149:66—9.

[72] Tu EY, Joslin CE, Shoff ME. Successful treatment of chronic stromal *Acanthamoeba* keratitis with oral voriconazole mono- therapy. *Cornea* 2010;29:1066—8.

[73] Cabello-Vilchez, Alfonso Martín & Martín-Navarro, Carmen & López-Arencibia, Atteneri & Reyes Batlle, María & Sifaoui, Ines & Valladares, Basilio & Piñero, José & Lorenzo-Morales, Jacob. (2013). Voriconazole as a first-line treatment against potentially pathogenic *Acanthamoeba* strains from Peru. *Parasitology research*.

[74] SunadaA, KimuraK, NishiIetal. In vitro evaluations of topical agents to treat *Acanthamoeba* keratitis. *Ophthalmology* 2014; 121: 2059–65.

[75] Martin-Navarro CM, Lopez-Arencibia A, Arnalich-Montiel F et al. Evaluation of the in vitro activity of commercially available moxifloxacin and voriconazole eye-drops against clinical strains of *Acanthamoeba*. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2013; 251: 2111–7.

[76] Lovieno A, Miller D, Ledee DR et al. Cysticidal activity of antifungals against different genotypes of *Acanthamoeba*. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58: 5626–8.

[77] *J Ophthalmic Inflamm Infect*. 2018 Oct 24;8(1):19.

[78] *Eye Contact Lens*. 2019 May;45(3):164-170

[79] *Contact Lens Anterior Eye*. 2018 Dec;41(6):542-546.

[80] HILDEBRANDT C, WAGNER D, KOHLMANN T, KRAMER A. In-vitro analysis of the microbiocidal activity of 6 contact lens care solutions. BMC Infect Dis. 2012; 12: 24



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.



MONNIÉ Xavier

Étude de l'activité du voriconazole sur des isolats de référence d'amibes libres (Genre : *Acanthamœba*).

Th. D. Pharm., Rouen, 2019, 92 p.

RÉSUMÉ

La kératite amibienne est une pathologie rare et sous-diagnostiquée. La récente croissance d'utilisation des lentilles de contact entraîne une augmentation de son incidence, par manque de prévention et de produits d'entretien efficaces.

Bien que rare, la kératite amibienne n'en reste pas moins une pathologie grave et nécessite un diagnostic précoce. Un retard de prise en charge entraîne des lésions cornéennes importantes et irréversibles allant jusqu'à la cécité. Le traitement de cette pathologie n'est à ce jour pas clairement défini du fait de l'émergence de nouvelles molécules utilisées dans cette indication. Notre travail s'est donc orienté sur l'étude de l'activité du voriconazole sur des isolats de référence d'amibes libres (genre : *Acanthamœba*). Le but de cette étude étant de comparer son efficacité sur 3 espèces ayant une forte incidence (*A. castellanii*, *A. lenticulata*, *A. polyphaga*), ce qui n'avait jamais été réalisé à notre connaissance.

Après avoir réalisé une mise en contact d'un inoculum calibré du parasite à différentes concentrations de voriconazole, des dénombrements ont été réalisés à plusieurs intervalles de temps, ce qui a permis de déterminer les CI₅₀ de chaque espèce.

Le voriconazole est efficace sur les 3 espèces testées.

A. polyphaga est plus résistant au voriconazole que *A. castellanii* et *A. lenticulata*. Ces deux dernières espèces ont une sensibilité quasiment similaire au voriconazole.

MOTS CLES : Kératite amibienne – Acanthamibes – Amibes libres – voriconazole — Infection tellurique – *Acanthamœba polyphaga* – *Acanthamœba castellanii* – *Acanthamœba lenticulata*

JURY

Président : Mr FAVENNEC Loïc, Professeur

Membres : Mme GUEUDRY Julie, Ophtalmologue

Mme MULLIE Perrine, Docteur en Pharmacie

Mr RAZAKANDRAINIBE Romy, Chercheur

DATE DE SOUTENANCE : 18 octobre 2019