

UNIVERSITE DE LIMOGES

Faculté de Médecine



ANNEE 2008

THESE N° 3109 / 1

ETUDE DE L'APPORT DE LA PCR DANS LE DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE DES ABCES DE CORNEE ET DES ENDOPHTALMIES

THESE POUR LE

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement le :
31 Mars 2008

par

Amélie SABATIER

Née le 22 Juin 1977 à Clamart (92)



EXAMINATEURS DE LA THESE :

Mr. le Professeur J.P. ADENIS.....	Président
Mr. le Professeur J.P. BESSEDE	Juge
Mr. le Professeur F. DENIS	Juge
Mr. le Professeur M.C. PLOY.....	Juge
Mr. le Docteur F. GARNIER	Membre invité
Mr. le Docteur P.Y. ROBERT	Membre invité

**UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE MEDECINE**

DOYEN DE LA FACULTE:

Monsieur le Professeur VANDROUX Jean-Claude

ASSESSEURS:

Monsieur le Professeur LASKAR Marc
Monsieur le Professeur VALLEIX Denis
Monsieur le Professeur PREUX Pierre-Marie

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS:

* C.S = Chef de Service

ACHARD Jean-Michel	PHYSIOLOGIE
ADENIS Jean-Paul * (C.S)	OPHTALMOLOGIE
ALAIN Sophie	BACTERIOLOGIE, VIROLOGIE
ALDIGIER Jean-Claude (C.S)	NEPHROLOGIE
ARCHAMBEAUD-MOUVEROUX Françoise (C.S)	MEDECINE INTERNE
ARNAUD Jean-Paul (C.S)	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
AUBARD Yves (C.S)	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
BEDANE Christophe (C.S)	DERMATOLOGIE-VENEREOLOGIE
BERTIN Philippe FF (C.S)	THERAPEUTIQUE
BESSEDE Jean-Pierre (C.S)	OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
BONNAUD François (C.S)	PNEUMOLOGIE
BONNETBLANC Jean-Marie	DERMATOLOGIE-VENEREOLOGIE
BORDESSOULE Dominique (C.S)	HEMATOLOGIE ET TRANSFUSION
CHARISSOUX Jean-Louis	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
CLAVERE Pierre (C.S)	RADIOTHERAPIE
CLEMENT Jean-Pierre (C.S)	PSYCHIATRIE ADULTES
COGNE Michel (C.S)	IMMUNOLOGIE
COLOMBEAU Pierre	UROLOGIE
CORNU Elisabeth	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
COURATIER Philippe	NEUROLOGIE
DANTOINE Thierry	GERIATRIE ET BIOLOGIE DU VIEILLISSEMENT
DARDE Marie-Laure (C.S)	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE
DE LUMLEY WOODYEAR Lionel (C.S)	PEDIATRIE
DENIS François (C.S)	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
DESCOTTES Bernard (C.S)	CHIRURGIE DIGESTIVE
DESSPORT Jean-Claude	NUTRITION
DUDOGNON Pierre (Sur 31/08/2009)	MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION
DUMAS Jean-Philippe (C.S)	UROLOGIE
DUMONT Daniel (C.S)	MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL
FEISS Pierre (C.S)	ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
FEUILLARD Jean (C.S)	HEMATOLOGIE
GAINANT Alain (C.S)	CHIRURGIE DIGESTIVE
GAROUX Roger (C.S)	PEDOPSYCHIATRIE
GASTINNE Hervé (C.S)	REANIMATION MEDICALE
JAUBERTEAU-MARCHAN Marie-Odile	IMMUNOLOGIE
LABROUSSE François (C.S)	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUE
LACROIX Philippe	MEDECINE VASCULAIRE
LASKAR Marc (C.S)	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
LIENHARDT-ROUSSIE Anne	PEDIATRIE
MABIT Christian	ANATOMIE
MARQUET Pierre	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE

MATHONNET Muriel
MAUBON Antoine (C.S)
MELLONI Boris
MERLE Louis (C.S)
MONTEIL Jacques
MOREAU Jean-Jacques (C.S)
MOULIES Dominique (C.S)
NATHAN-DENIZOT Nathalie
PARAF François
PILLEGAND Bernard (Surnombre 31/08/2008)
PIVA Claude (Surnombre 31/08/2008)
PLOY Marie-Cécile
PREUX Pierre-Marie
RIGAUD Michel (Surnombre 31/08/2010)
SALLE Jean-Yves
SAUTEREAU Denis (C.S)
SAUVAGE Jean-Pierre
STURTZ Franck
TEISSIER-CLEMENT Marie-Pierre
TREVES Richard
TUBIANA-MATHIEU Nicole (C.S)
VALLAT Jean-Michel (C.S)
VALLEIX Denis
VANDROUX Jean-Claude (C.S)
VERGNENEGRE Alain (C.S)
VIDAL Elisabeth (C.S)
VIGNON Philippe
VIROT Patrice (C.S)
WEINBRECK Pierre (C.S)
YARDIN Catherine (C.S)

CHIRURGIE DIGESTIVE
 RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
 PNEUMOLOGIE
 PHARMACOLOGIE
 BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE
 NEUROCHIRURGIE
 CHIRURGIE INFANTILE
 ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
 ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUE
 GASTRO ENTEROLOGIE, HEPATHOLOGIE
 MEDECINE LEGALE ET DROIT DE LA SANTE
 BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
 EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE DE LA SANTE ET PREVENTION
 BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
 MEDECINE PHYSIQUE ET READAPTATION
 GASTRO-ENTEROLOGIE, HEPATOLOGIE
 OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
 BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
 ENDOCRINOLOGIE, DIABETE ET MALADIES METABOLIQUES
 RHUMATOLOGIE
 CANCEROLOGIE
 NEUROLOGIE
 ANATOMIE – CHIRURGIE GENERALE
 BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE
 EPIDEMIOLOGIE-ECONOMIE DE LA SANTE-PREVENTION
 MEDECINE INTERNE
 REANIMATION MEDICALE
 CARDIOLOGIE
 MALADIES INFECTIEUSES
 CYTOLOGIE ET HISTOLOGIE

MAITRE DE CONFERENCES DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS

AJZENBERG Daniel	Parasitologie et Mycologie
ANTONINI Marie-Thérèse (CS)	Physiologie
BOUTEILLE Bernard	Parasitologie - Mycologie
CHABLE Hélène	Biochimie et Biologie Moléculaire
DAVIET Jean-Christophe	Médecine physique et réadaptation
DRUET-CABANAC Michel	Médecine et Santé au Travail
DURAND-FONTANIER Sylvaine	Anatomie – Chirurgie Digestive
ESCLAIRE Françoise	Biologie Cellulaire
JULIA Annie	Hématologie
LE GUYADER Alexandre	Chirurgie Thoracique et Cardio-Vasculaire
MOUNIER Marcelle	Bactériologie – virologie – hygiène hospitalière
PETIT Barbara	Anatomie et cytologie pathologiques
PICARD Nicolas	Pharmacologie Fondamentale
QUELVEN-BERTIN Isabelle	Biophysique et Médecine Nucléaire
RONDELAUD Daniel	Cytologie et Histologie
TERRO Faraj	Biologie Cellulaire
VERGNE-SALLE Pascale	Thérapeutique
VINCENT François	Physiologie

P.R.A.G.

GAUTIER Sylvie	Anglais
-----------------------	---------

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS

BUCHON Daniel	Médecine générale
BUISSON Jean-Gabriel	Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS

DUMOITIER Nathalie	Médecine Générale
PREVOST Martine	Médecine Générale

A Monsieur le Professeur Jean-Paul ADENIS

Professeur des universités
Ophtalmologie
Ophtalmologiste des hôpitaux
Chef de service

Nous vous remercions de présider ce jury.

Merci de nous avoir accueillie dans votre service et de nous avoir transmis vos connaissances en ophtalmologie. Pour cela, nous espérons rester digne de la confiance que vous nous avez accordée. Puisse cette thèse vous assurer de notre profond respect.

A Monsieur le Professeur Jean-Pierre BESSEDE

Professeur des universités
Oto-rhino-laryngologie
Oto-rhino-laryngologiste des hôpitaux
Chef de service

Nous garderons un excellent souvenir de notre passage dans votre service.

Votre rigueur chirurgicale sera pour nous toujours un exemple.

*Nous vous adressons, par ce travail, nos sincères remerciements et vous assurons de notre
entière reconnaissance.*

A Monsieur le Professeur François DENIS

Professeur des universités
Bactériologie Virologie Hygiène
Biologiste des hôpitaux
Chef de service

Vous nous faites un grand honneur de siéger à ce jury.

Merci de nous avoir permis de réaliser ce travail dans votre service avec l'aide de votre équipe. Puisse alors cette thèse vous assurer de notre profond respect et de notre gratitude.

A Madame le Professeur Marie-Cécile PLOY

Professeur des universités
Bactériologie Virologie Hygiène
Biologiste des hôpitaux

Vous avez accepté de juger ce travail sans réellement nous connaître.

Nous vous remercions de l'honneur que vous nous faites en acceptant de siéger à ce jury.

Soyez assurée de notre reconnaissance et de notre respect.

A Monsieur le Docteur Fabien GARNIER

Bactériologie Virologie Hygiène
Biologiste des hôpitaux
Praticien hospitalier

Par tes connaissances et ta disponibilité, tu m'as beaucoup guidée dans une spécialité que j'ai appris à apprécier même si je n'arrive à en saisir toutes les finesses.

Tes compétences et ta rigueur resteront pour moi un modèle.

Trouve ici l'expression de mon entière reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Pierre-Yves ROBERT

Ophtalmologie
Ophtalmologiste des hôpitaux
Praticien hospitalier

Ton enseignement, ta disponibilité et ta confiance sont pour moi un soutien de chaque jour.

Pour cela je te remercie de ta présence constructive.

J'aurais aimé que cette thèse soit la première que tu juges en tant que professeur ; puisse-t-elle ouvrir la voie aux nombreuses autres à venir.

Sois assuré de ma reconnaissance et mon respect.

A mes PH, Christine et Nicolas, qui m'ont permis de progresser

A mes Chefs, Thierry, Rémi, Fabien et Laëtitia

A mes co-internes, Laëtitia (la même...), Guillaume, Stéphanie, Yohann,
Sans oublier Denis, Maxime et Céline

Mes amis que ma venue à Limoges m'a permis de connaître : Delphine, Anne, Vincent,
Anne-Fred, Alex et Muriel, Gaël, Pierre, Virginie, et tous ceux qui font que j'ai envie de venir
tous les matins à l'hôpital

A mes amis de toujours, Hélène, Séverine, Audrey

A Mr Barthélémy et Mme Brakbi qui m'ont donné la passion de l'ophtalmologie (ainsi qu'à
toute leur équipe)

A tous les membres du service d'ophtalmologie de Limoges, les consultations,
l'hospitalisation, le secrétariat et le bloc

A l'équipe de bactériologie, Delphine, Carole, Marie

Aux patients qui m'ont tant appris

A toi Eric, et à Ethan, dont j'aurais bien glissé quelques photos...

A ma famille, mes parents et Antoine, qui savent toujours être là quelles que soient les
circonstances

Aux laboratoires Bauch et Lomb, Essilor, MSD, Pfizer, Théa

SOMMAIRE

1. Introduction

2. Généralités

2.1. Les abcès de cornée

2.2. Les endophtalmies

2.3. Les étiologies bactériennes

2.4. Diagnostic bactériologique usuel

2.5. La PCR

2.6. Diagnostic des infections oculaires par PCR

3. Matériel et méthodes

4. Résultats

5. Discussion

6. Conclusion

7. Bibliographie

1. INTRODUCTION

Les abcès de cornée et les endophtalmies sont deux infections qui touchent l'œil, et qui sont potentiellement graves sur le plan fonctionnel, avec un risque de perte de la vision. Ces deux pathologies nécessitent une prise en charge en urgence : c'est une urgence à la fois diagnostique et thérapeutique. Leur pronostic reste encore bien souvent réservé.

On dénombre 500 000 cas annuels de kératites bactériennes dans le monde, environ 5 000 en France. Leur fréquence est en augmentation croissante du fait de l'utilisation très largement répandue des lentilles de contact. L'augmentation est de plus de 400% sur les 40 dernières années [1]. Néanmoins, on constate une diminution de cette tendance de par la mise à disposition des fluoroquinolones topiques [2].

Au début du vingtième siècle, la fréquence des infections endoculaires post-chirurgicales était d'environ 10% [3]. Une nette amélioration a été constatée dans les années 50, le taux d'infections postopératoires passant à environ 1%. Dans les années 70-80, des pourcentages de 0,05% à 0,3% ont été avancés [4-8]. Il apparaît nettement que la fréquence des endophtalmies postopératoires a diminué depuis le début du siècle. La seule étude française prospective à grande échelle, concernant les endophtalmies postopératoires de cataractes, donne un pourcentage de 0,3% [9]. Les taux les plus bas d'endophtalmie reviennent aux endophtalmies post-vitrectomie [10], le vitré étant le lieu de prolifération privilégié des micro-organismes.

Nous avons choisi d'étudier ces deux affections -abcès de cornée et endophtalmies- parce qu'elles sont courantes en pratique ophtalmologique quotidienne, mettent en jeu le pronostic visuel et posent des problèmes en terme d'adaptation de traitement en l'absence d'identification bactérienne. L'approche conventionnelle du diagnostic microbiologique est la culture. Cette dernière est de faible sensibilité de par la petite quantité des prélèvements et du faible inoculum. La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une méthode récente de biologie moléculaire. Etant donnée sa sensibilité, elle semblait adaptée à augmenter le taux des positifs dans nos prélèvements. Nous avons donc voulu comparer les résultats obtenus par culture à ceux obtenus par biologie moléculaire, ces deux techniques étant appliquées à notre pratique locale de prélèvements.

2. GENERALITES

2.1. LES ABCES DE CORNEE

Egalement désignés sous le terme de kératites bactériennes, il s'agit d'une inflammation et d'une infiltration stromale aiguë, conduisant progressivement à la destruction du tissu.

2.1.1. La clinique

○ Signes fonctionnels :

Le maître symptôme est la douleur, le plus souvent intense et d'apparition brutale, associée fréquemment à une baisse d'acuité visuelle, une photophobie, et un larmolement. La baisse d'acuité visuelle est variable en fonction de l'importance du larmolement et de la localisation de l'abcès. L'apparition de ces signes peut être progressive sur un œil déjà pathologique.

○ Signes cliniques :

L'examen à la lampe à fente retrouve une hyperhémie conjonctivale et surtout un infiltrat stromal inflammatoire localisé associé à un ulcère épithélial. La lésion est caractérisée par sa taille supérieure ou inférieure à 2 mm, et sa localisation par rapport à l'axe optique. Unique ou multiple, l'abcès peut être associé à un hypopion qui est alors stérile (sous réserve que la membrane de Descemet soit intacte, cas le plus fréquent).

Annexe 1 : Critères de gravité d'une kératite bactérienne selon l'AFSSAPS 2004.

Critères locaux :	Critères généraux :
<ul style="list-style-type: none">• Tyndall > 1+• Diamètre > 2 mm• Situé à < 3 mm de l'axe optique• Sclérite• Perforation imminente ou avérée• Endophtalmie associée• Aggravation malgré antibiothérapie depuis > 24h	<ul style="list-style-type: none">• Monophtalme• Enfant• Opéré : greffe de cornée ou chirurgie réfractive• Immunodéprimé• Mauvaise observance

○ Evolution :

Le danger majeur est le risque de perforation, souvent précédé d'un descemétocèle.

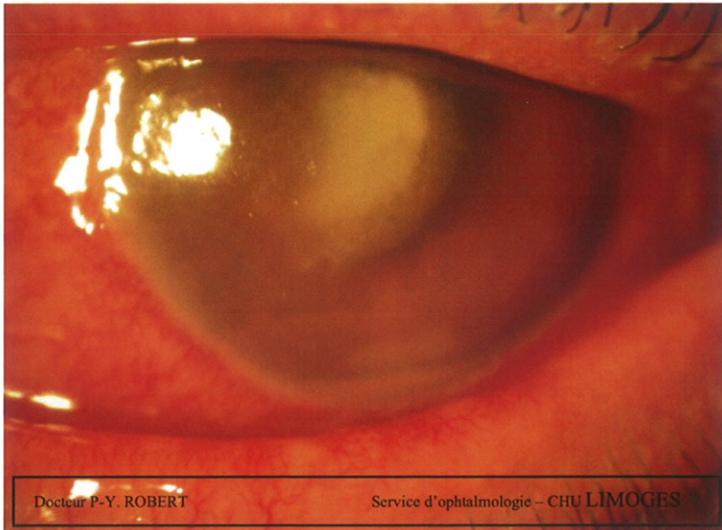
Certains ulcères, paracentraux ou limbiques, peuvent évoluer et s'étendre progressivement à l'aire pupillaire, entraînant une baisse d'acuité visuelle irréversible par la formation d'une taie centrale [11-13]. Une kératite bactérienne est une urgence diagnostique et thérapeutique (annexe 1).

2.1.2. Les facteurs de risque

- Facteurs de risque locaux :
 - le port de lentille de contact
 - la dysfonction lacrymale (syndrome sec)
 - les anomalies palpébrales (lagophtalmie, paralysie faciale, ectropion mécanique, exophtalmie, blépharite...)
 - les kératopathies (cause neuroparalytique, kérato-conjonctivite allergique, rosacée...)
 - l'automédication illicite (la corticothérapie locale inadaptée précipite les symptômes)
 - les traumatismes cornéens (avec ou sans corps étranger, brûlure cornéo-conjonctivale...)
 - la chirurgie (post-kératoplastie, sur suture cornéenne, post-chirurgie réfractive...)

- Les facteurs de risque généraux :
 - l'âge
 - le diabète
 - le SIDA
 - l'alcoolisme chronique
 - les traitements immunosuppresseurs
 - la polyarthrite rhumatoïde
 - la dénutrition

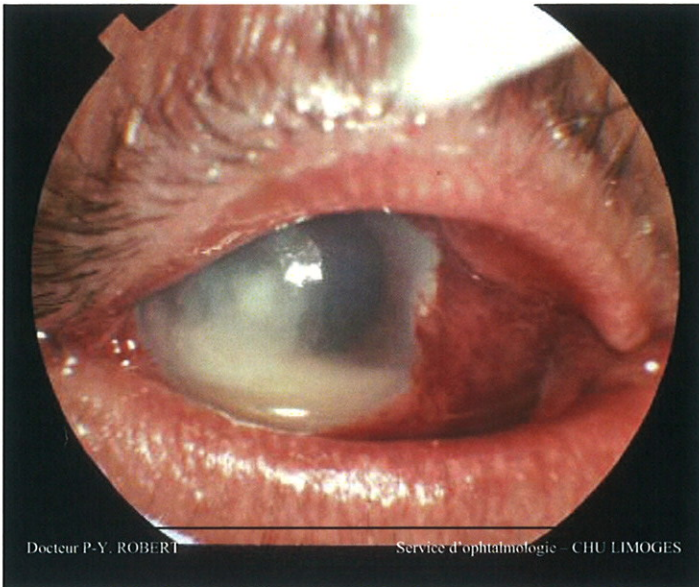
Sur le plan épidémiologique, la répartition des différents facteurs de risque est semblable dans toutes les études menées dans les pays développés. Un facteur de risque est en général identifié dans plus de 93% des cas : le port de lentilles de contact (50%), une kératopathie chronique (25%), un traumatisme cornéen (8,8%), une immunodépression générale (8,8%), une chirurgie cornéenne (7,3%) [14]. Notons qu'à titre indicatif, au sud de l'Inde, 65,4% des abcès sont d'origine traumatique [15].



Docteur P-Y. ROBERT

Service d'ophtalmologie - CHU LIMOGES

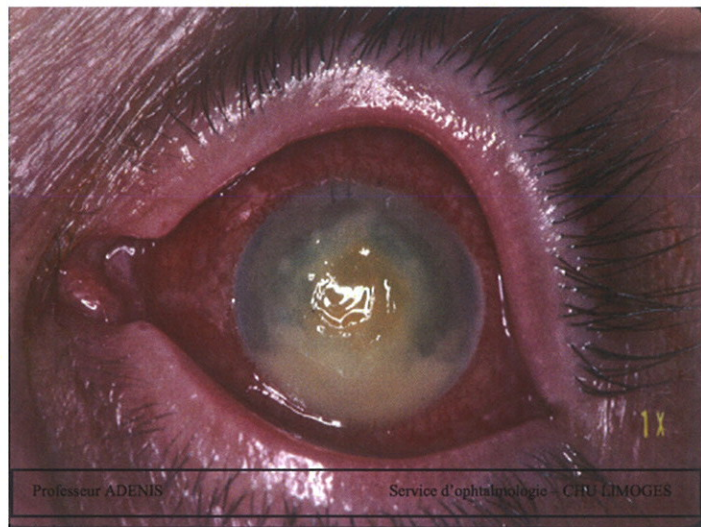
Abcès de cornée à hypopion



Docteur P-Y. ROBERT

Service d'ophtalmologie - CHU LIMOGES

Abcès de cornée à hypopion



Professeur ADENIS

Service d'ophtalmologie - CHU LIMOGES

Endophtalmie aigue postopératoire

2.2. LES ENDOPHTALMIES

2.2.1. La clinique

○ Signes fonctionnels :

Pour les endophtalmies postopératoires, dans les suites de l'opération, le patient doit progressivement récupérer un œil blanc et indolore avec une amélioration visuelle. Une douleur brutale, une photophobie et un œil rouge doivent amener le patient à consulter en urgence son ophtalmologiste et une endophtalmie doit être évoquée jusqu'à preuve du contraire. Toute inflammation postopératoire, immédiate ou à distance, doit faire redouter une endophtalmie. Deux éléments de mauvais pronostic sont à rechercher : la perte de la perception lumineuse et la disparition du réflexe photomoteur.

○ Délai d'apparition des signes fonctionnels :

Les premiers signes apparaissent généralement dans les 24 à 48 heures suivant l'intervention, le début est relativement brutal et l'aggravation rapide [16]. Toute intervention oculaire nécessite une surveillance postopératoire rigoureuse. Selon Royer en 1971, « l'examen précoce à la lampe à fente de l'œil est, dans les 48 heures après l'intervention, la mesure la plus efficace pour une détection et un traitement utile des infections oculaires postopératoires » [17]. Actuellement, il est admis que le pic d'apparition des endophtalmies aiguës postopératoires est à 3 à 6 jours et les recommandations cliniques vont vers la suppression de l'examen à J+1.

○ Signes cliniques :

L'examen retrouve une hyperhémie conjonctivale, avec réaction ciliaire. L'œdème palpébro-conjonctival témoigne d'une inflammation importante. L'examen du segment antérieur fait état d'un Tyndall de l'humeur aqueuse, éventuellement un hypopion, des précipités rétrodescémétiques, des plis descémétiques, de la fibrine et des membranes cyclitiques, un œdème cornéen épithélial. La pupille encombrée par des exsudats est bloquée par des synéchies postérieures (irido-ICP), la tension intra-oculaire est parfois rebelle par la présence de synéchies irido-cornéennes. On s'attachera à examiner les incisions opératoires (la présence éventuelle d'un Seidel ou d'une suture) et les paupières (bord libre, sécrétions dans les culs de sac). L'examen du segment postérieur objective un trouble vitréen, indispensable pour le diagnostic : son absence doit faire reconsidérer l'hypothèse d'une endophtalmie. Le

fond d'œil est souvent inaccessible en raison des membranes barrant son accès. L'échographie en mode B objective alors l'aspect de hyalite et éventuellement le cloisonnement vitréen.

2.2.2. Facteurs de risque

- Le contexte :
 - postopératoire (cataracte, glaucome, vitrectomie)
 - post-traumatique
 - endogène

- Facteurs de risque :
 - le diabète
 - la corticothérapie au long cours
 - les immunosuppresseurs
 - les pathologies néoplasiques
 - les foyers septiques (escarre, ulcère chronique)
 - les antécédents d'endophtalmie

2.3. LES ETIOLOGIES BACTERIENNES

2.3.1. Des abcès de cornée

Herman [18] et Jones [19] insistent sur la nécessité de réaliser des prélèvements multiples dès les années 70, et ce avant le début du traitement.

Les bactéries classiquement retrouvées dans les abcès de cornée sont résumées dans l'annexe 2 selon l'étude de Liesegang [20].

Grayson [21] différencie les cas où la cornée est apparemment saine de ceux où la cornée est modifiée, favorisant ainsi le développement de germes saprophytes des larmes et des culs de sac.

- Sur une cornée apparemment saine, sans syndrome sec et non traitée, on retrouve par ordre de fréquence : *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella*, streptocoque hémolytique et *Klebsiella pneumoniae*.
- Sur une cornée pathologique (affection herpétique, médications locales multiples, abrasion épithéliale, anesthésie cornéenne...), *Staphylococcus aureus* est la cause la plus fréquente, alors qu'il ne se développe que très rarement sur une cornée

apparemment saine. Sont rencontrés ensuite, par ordre de fréquence : *Staphylococcus epidermidis*, Streptocoque hémolytique, *Pseudomonas*, *Proteus*, et *Enterobacter*.

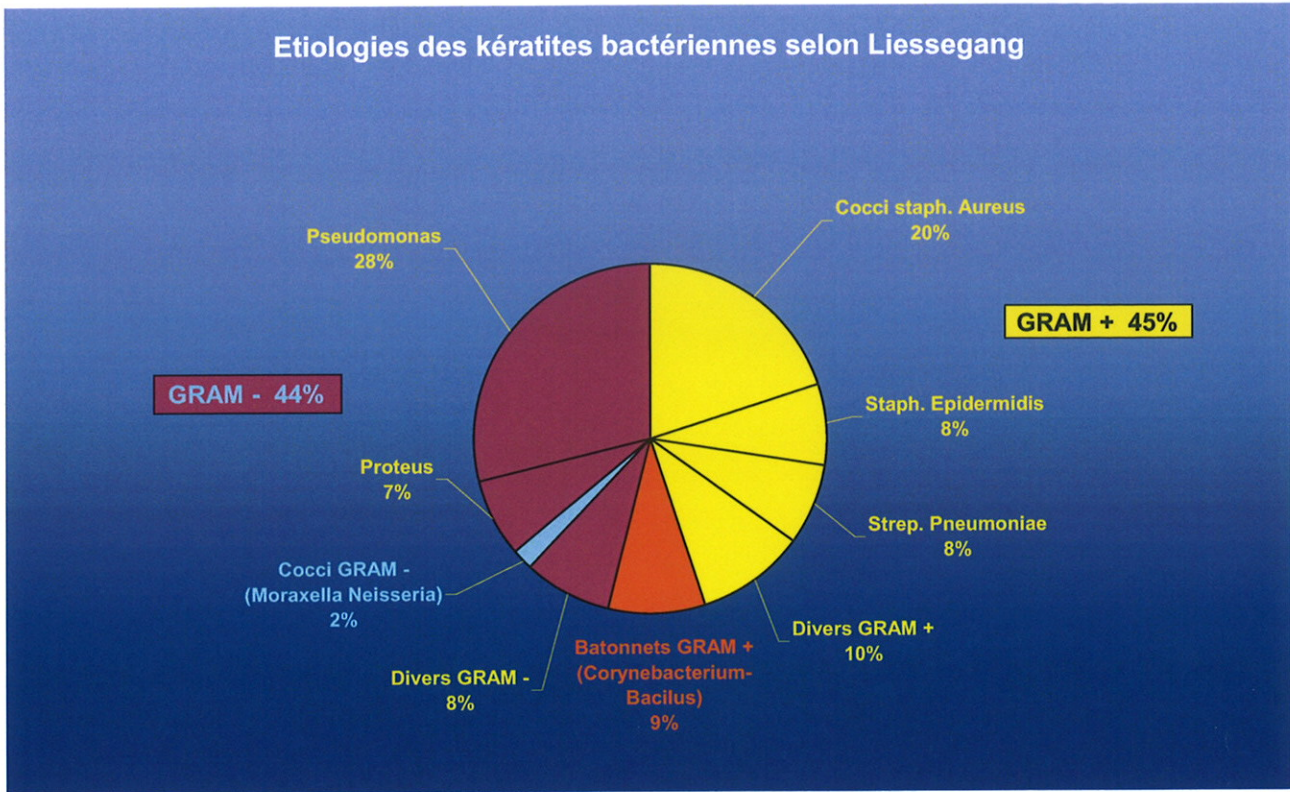
En cas de port de lentilles de contact, l'espèce la plus souvent incriminée est *P. aeruginosa* (44,4%). Au total, 59,3% des cultures des prélèvements cornéens sont positives avec des bacilles à Gram négatif et 41,6% avec des cocci à Gram positif, les bacilles Gram positif n'étant retrouvés que très rarement. Il est à noter que les cultures sont majoritairement pures, mais qu'il existe des cas de cultures poly-microbiennes [14].

2.3.2. Des endophtalmies

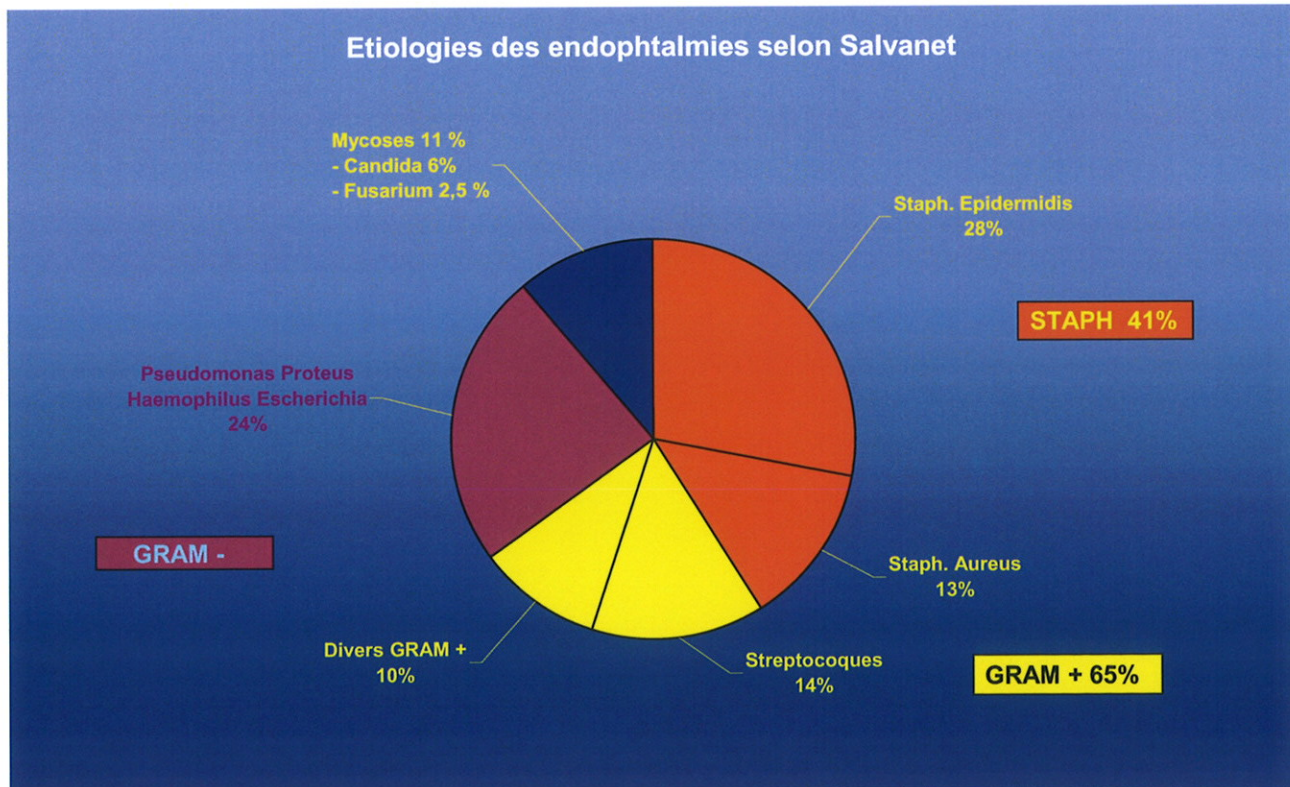
Les principales bactéries responsables sont des bactéries à Gram positif dans 56 à 90% des cas, à Gram négatif dans 7 à 36 % des cas, et des champignons dans 2 à 11 % des endophtalmies. Selon Salvanet-Bouccara [22], les germes à Gram positif représentent 65% des cas avec pour les plus fréquents : *S. epidermidis* (28%), *S. aureus* (13%), suivis de *Streptococcus* (12%), dont *S. pneumoniae* (2%). Les germes à Gram négatif représentent 24% des cas avec notamment : les Enterobacteries (dont *Proteus* 6%), *Pseudomonas* (5%) et *Haemophilus* (3%).

(Voir annexe 3)

Annexe 2 : Etiologies des kératites bactériennes selon Liesegang. [20]



Annexe 3 : Etiologies des endophtalmies selon Salvanet. [22]



2.4. DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE USUEL

En pratique courante, un examen direct d'un frottis sur lame (coloration de Gram) et une culture sont utilisés.

L'examen direct, s'il est positif, permet de préciser la morphologie et les affinités tinctoriales des agents bactériens et donc d'orienter immédiatement le diagnostic bactériologique (exemple : cocci à Gram positif en amas => suspicion de *Staphylococcus*). L'examen direct n'est positif que si la densité bactérienne est suffisamment élevée. Son caractère négatif ne permet en aucun cas d'éliminer une infection. Cet examen direct apporte aussi des informations sur la réaction cellulaire associée ; dans le cadre d'une infection bactérienne, elle est à polynucléaires neutrophiles.

Le choix des milieux de culture et les conditions de culture sont déterminés pour pouvoir isoler des bactéries de culture facile mais aussi les germes plus exigeants. Une fois les germes isolés en culture, une identification et un antibiogramme sont réalisés. Le résultat est rendu en catégories S, I ou R, associé à des concentrations minimales inhibitrices (CMI en mg/l). Ceci permet donc de faire le meilleur choix d'antibiotique avec la CMI la plus basse.

Concernant la sensibilité de la culture, l'identification des agents pathogènes chez les sujets atteints d'abcès de cornée pose le problème du taux des négatifs obtenu par les techniques standards de diagnostic. Ce taux est estimé entre 40 et 60% [23].

Pour les endophtalmies, dans les années 80, on retrouvait des chiffres aux alentours de 75% de cultures positives dans les prélèvements intraoculaires d'yeux suspects d'endophtalmie [24, 25]. Il semblerait que ce chiffre soit revu à la baisse selon Therese [26] qui, après une étude sur 5 ans, retrouve 46,5% de cultures positives, incluant les étiologies mycosiques. L'une des explications apportées est l'utilisation grandissante des antibiotiques aussi bien en prophylaxie qu'en per et postopératoire.

Les causes des échecs de cultures peuvent être associées à la mise préalable sous antibiotique(s) [27, 28], mais aussi au caractère non homogène des liquides intraoculaires [29]. Dans le cadre des prélèvements pour endophtalmie, des études expérimentales montrent que le vitré est cloisonné [30], et la possible localisation des germes responsables dans le sac capsulaire. Pour les kératites bactériennes, l'échec vient d'une abrasion insuffisante du matériel, ou d'un prélèvement trop superficiel. Enfin, la quantité du prélèvement étant en

général faible, les différents milieux utilisés ne peuvent être ensemencés qu'avec un trop faible inoculum pour obtenir une culture positive.

Le résultat définitif d'une culture n'est jamais rendu avant 5 jours afin de permettre à toutes les bactéries, dont celles à multiplication lente, de pousser. Un résultat provisoire est certes annoncé à 48h. Ce délai de résultat n'est pas adapté à l'urgence thérapeutique des affections telles qu'abcès de cornée ou endophtalmies où le pronostic visuel est mis en jeu [31].

2.5. LA PCR

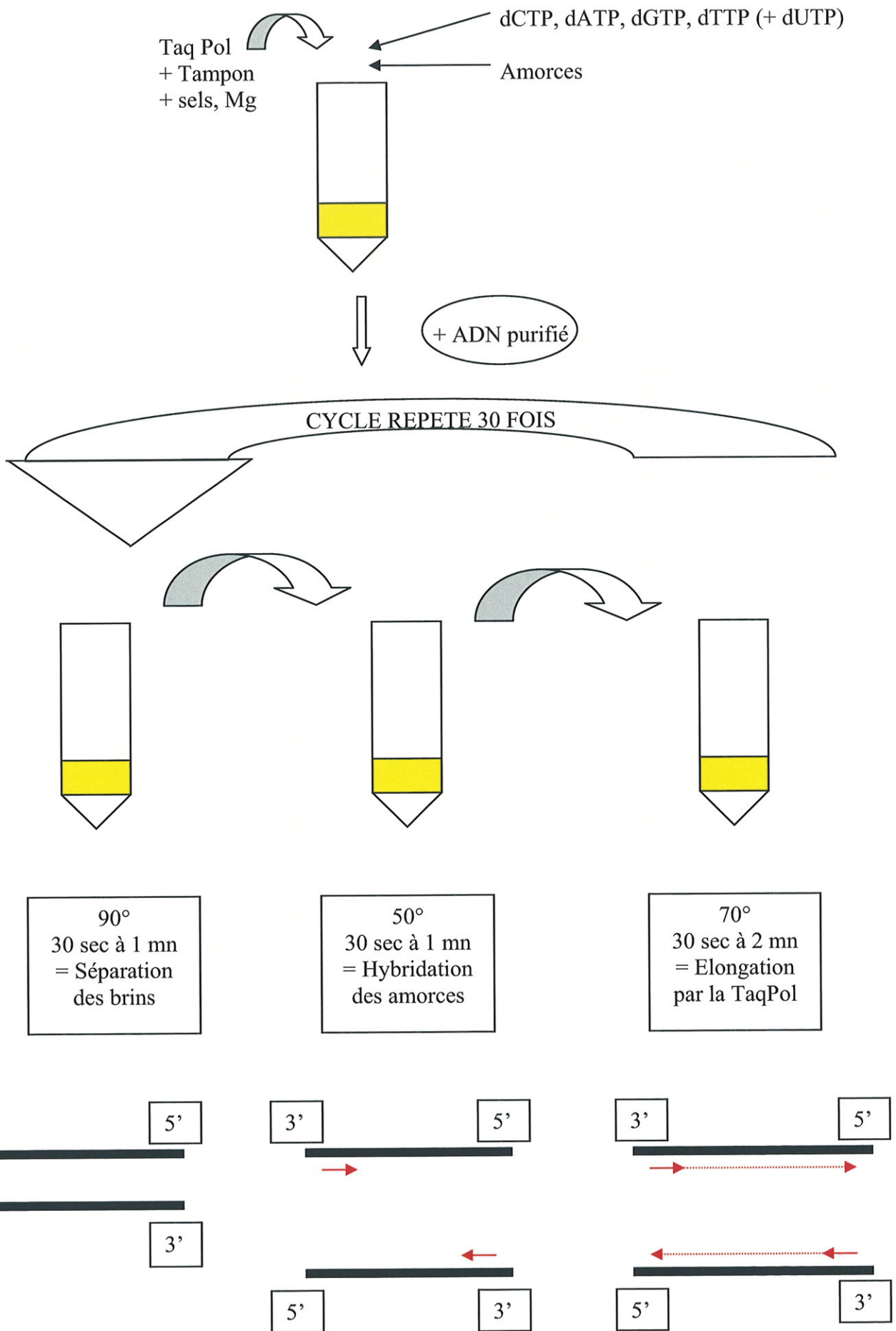
2.5.1. Principe

La PCR est une technique d'amplification élective *in vitro* mise au point en 1985 par Saiki et coll [32, 33]. Elle permet d'obtenir des dizaines, voire des centaines de nanogrammes d'un fragment d'ADN dont on n'a que des quantités infimes au départ. Cette méthode repose sur la synthèse enzymatique d'ADN par la *Taq* polymérase à partir de deux amorces oligodésoxynucléotidiques complémentaires des extrémités 5'-OH opposées des deux brins du fragment d'ADN à amplifier (annexe 4). La PCR consiste en une série de cycles comportant chacun trois étapes : la dénaturation des matrices, l'hybridation et l'élongation des amorces par la *Taq* polymérase. La répétition de ces cycles 30 à 40 fois conduit à l'amplification des séquences nucléotidiques comprises entre les deux amorces. La quantité d'ADN est donc doublée après chaque cycle. Le facteur théorique d'amplification est 2^a , a étant le nombre de cycles. En pratique, le rendement de la réaction n'est pas de 100% mais d'environ 85%. Le fragment à amplifier peut être de taille variable mais le rendement diminue très rapidement avec l'augmentation de la taille. Entre autres raisons de l'atteinte d'un plateau, on peut citer la dimérisation des amorces, l'apparition de sous-produits de réaction ayant un pouvoir inhibiteur (pyrophosphate), l'épuisement et la dénaturation des composants de la réaction, la compétition entre les amorces et les fragments d'ADN amplifié qui peuvent s'hybrider entre eux ou avec la cible plutôt qu'avec les amorces, et ce d'autant plus que leurs concentrations varient en sens inverse au cours de la réaction.

2.5.2. Avantages et inconvénients

La PCR est une méthode rapide et très sensible. En effet, une seule molécule d'ADN peut être amplifiée par un facteur de 10 millions en quelques heures.

Annexe 4 : Représentation schématique de la technique de PCR.



Cette technique a été rendue plus spécifique par l'utilisation de la *Taq* polymérase, polymérase thermostable, extraite d'une bactérie vivant dans les sources chaudes (80-90°) : *Thermus aquaticus*. Ceci permet d'éviter la destruction de cette enzyme à chaque cycle de dénaturation.

L'inconvénient majeur est le risque de contamination par les produits d'amplification parasite qui seraient éventuellement issus de l'hybridation non spécifique des amorces à l'ADN endogène et/ou par de l'ADN exogène. Pour lutter contre les ADN exogènes, il est indispensable de prendre certaines précautions : contrôle négatif, pipettes avec embouts à filtre, réactifs aliquotés, pièces séparées pour traiter les incubations et les produits d'amplification (à chaque ouverture de tube des milliers de copies peuvent contaminer l'atmosphère de la pièce), matériel spécifique à chaque pièce, la distribution de l'ADN devant être réalisée en dernier.

Pour minimiser encore les risques de contamination, on peut utiliser une enzyme : l'UDG (Uracil-DNA Glycosylase). En effet, toutes les amplifications effectuées dans le laboratoire sont réalisées avec du dUTP, à la place du dTTP. Il y a donc un marquage très spécifique de la cible amplifiée. L'UDG reconnaît tout fragment d'ADN ayant incorporé du dUTP (fragment amplifié) et va le détruire. Elle est ensuite détruite dès le premier cycle de dénaturation car thermosensible. L'ADN qui est ensuite synthétisé ne sera pas détruit.

2.5.3. Optimisation des conditions de PCR

Une optimisation des conditions d'utilisation de la technique PCR est nécessaire pour chaque couple d'amorces. En effet, certaines difficultés peuvent être rencontrées : faible taux d'amplification, formation de dimères d'amorces entrant en compétition avec l'amplification du produit désiré, amplifications non spécifiques dues à un mauvais appariement des amorces, présence de composés inhibiteurs de la *Taq* polymérase, fragment à amplifier à fort contenu en GC.

Certains paramètres influent sur la spécificité, la fidélité et le rendement de la PCR :

- la concentration en enzyme : la quantité de *Taq* polymérase varie de 1 à 1,5 unités pour 100 µl de volume réactionnel. Si la concentration d'enzyme est trop élevée, la spécificité diminue, si elle est trop basse, le rendement est insuffisant,
- les désoxynucléosides triphosphates (dNTPs) : les quatre dNTPs, adénosine (A), cytosine (C), guanosine (G) et thymidine (T) triphosphates doivent être utilisés à des concentrations identiques pour réduire les risques d'erreurs lors de la synthèse du

fragment. Les concentrations optimales se situent entre 20 et 200 μM pour chaque dNTP. De faibles concentrations améliorent la spécificité et la fidélité de la PCR,

- la concentration en ions Mg^{2+} : elle est très importante car elle conditionne de nombreux paramètres tels que la stabilité de l'hybridation des amorces, la température de dissociation des deux brins, l'activité et la fidélité de la *Taq* polymérase. Les échantillons à amplifier peuvent en effet contenir des agents chélateurs de cations divalents qui diminuent ainsi la concentration en ions Mg^{2+} libres,
- la concentration d'amorces : une concentration trop élevée diminue la spécificité de la réaction par appariements multiples sur l'ADN cible tandis qu'une concentration trop faible affecte le rendement. Les concentrations optimales varient entre 0,1 et 0,5 μM ,
- la température d'hybridation des amorces : en théorie cette température doit être inférieure de 5°C à 10°C au T_m (Température Moyenne de fusion) des amorces qui peut être déterminée par la formule simplifiée : $T_m = 4(\text{G}+\text{C}) + 2(\text{A}+\text{T})$. Cette formule n'est valable que pour des amorces ne dépassant pas 25 nucléotides. Une augmentation de la température d'hybridation des amorces accroît la spécificité de la réaction,
- le temps d'élongation : il doit prendre en compte la taille des fragments à amplifier,
- le nombre de cycles : il dépend de la concentration de l'ADN cible et de la taille des fragments à amplifier,
- le tampon : pour que le pH reste stable et optimal à l'action de la *Taq* polymérase,
- la concentration en sels : on utilise du KCl, la température d'hybridation des acides nucléiques étant fonction de la concentration en sel. Une augmentation de la concentration facilite l'hybridation et stabilise les hybrides. D'un autre côté, une haute force ionique inhibe la *Taq* polymérase.

2.5.4. Choix des amorces

○ Aspect théorique

Ce choix détermine la spécificité de la réaction. Il existe plusieurs règles pour choisir les amorces :

- la taille des deux amorces doit être identique, aux alentours de 20 pb,
- le GC% doit être voisin de 50%,
- les amorces ne doivent pas contenir un enchaînement répété d'un même nucléotide (surtout G ou C),
- les amorces ne doivent pas présenter de structures secondaires,

- les amorces ne doivent pas être complémentaires entre elles (pas d'hybrides entre amorces),
- les T_m des deux amorces ne doivent pas être trop éloignées l'une de l'autre.

Les amorces utilisées sont courtes et les possibilités qu'elles s'hybrident ailleurs qu'au niveau de leur cible n'est pas négligeable. On estime qu'1% seulement des amorces s'hybrident à leur place, les autres s'hybrident n'importe où de manière non spécifique. Normalement, les amplifications qui en résultent ne sont pas détectables car non exponentielles. Les amplifications parasites ne sont pas prévisibles et dépendent de la séquence des amorces utilisées.

○ Types d'amorces

Deux types d'amorces peuvent être utilisés :

- les amorces spécifiques : la séquence nucléotidique de ces amorces est strictement complémentaire à la séquence de l'ADN cible,
- les amorces dégénérées : du fait de la dégénérescence du code génétique, certains acides aminés peuvent être codés par plusieurs codons. Il est possible de définir, à partir de motifs conservés en acides aminés, des amorces nucléotidiques dégénérées, c'est-à-dire ayant plusieurs nucléotides à la même position. Ces amorces sont ainsi susceptibles de s'hybrider à des séquences nucléotidiques codant pour des protéines apparentées [34]. Quand plusieurs codons différents codent pour un même acide aminé, il est possible d'introduire de l'inosine à l'emplacement des nucléotides variables. L'inosine s'apparie avec les bases A, C, G, ou T. Ces appariements sont plus stables que les mauvais appariements entre les autres bases [35].

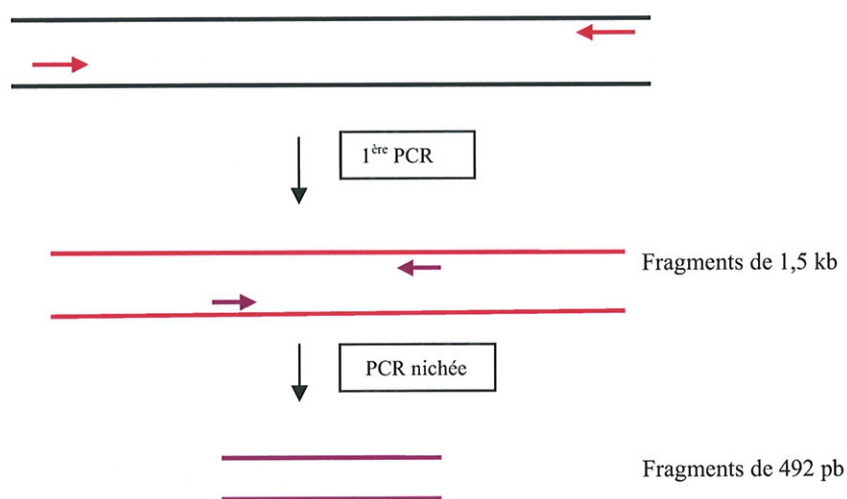
2.5.5. La PCR universelle

La PCR est dite universelle car elle permet d'amplifier un gène ou un fragment de gène qui est commun à toutes les bactéries, à savoir le gène codant l'ARN 16S ribosomal. L'ARN 16S est un constituant de la petite sous-unité 16S du ribosome. Ce gène a été découvert chez *E. Coli* et est entrecoupé de régions variables et de régions conservées [36, 37]. Les séquences hautement conservées de ce gène codant l'ARN 16S ribosomal sont communes à toutes les bactéries, et les séquences variables interposées permettent la différenciation d'une espèce par rapport à une autre [38].

2.5.6. La PCR nichée

La PCR nichée consiste à réaliser deux PCR successives en utilisant des couples d'amorces différents, le deuxième couple d'amorces encadrant une séquence incluse dans celle qui est amplifiée par le premier couple d'amorces, comme cela est illustré par l'annexe 5. Ainsi, si la bande correspondant à la première amplification est artéfactuelle, lors de la deuxième PCR, les amorces du 2^{ème} couple ne pourront pas s'hybrider et il n'y aura pas d'amplification. Cette technique permet d'augmenter dans le même temps la sensibilité, donc le taux d'amplification. Elle est particulièrement souhaitée quand la quantité de cible de départ est faible, comme c'est le cas dans notre étude.

Annexe 5 : Représentation schématique de la PCR nichée.



2.6. DIAGNOSTIC DES INFECTIONS OCULAIRES PAR PCR

Les petits volumes de prélèvements sont mal adaptés aux cultures puisqu'un inoculum minimal est nécessaire afin d'obtenir une culture positive, et ce d'autant plus que plusieurs milieux sont ensemencés.

La technique de PCR a prouvé qu'elle était particulièrement bien adaptée aux toutes petites quantités d'ADN présentes dans les prélèvements oculaires [39-43], notamment dans les pathologies virales où l'on sait qu'un nombre limité de virus peut être impliqué (HSV 1 et 2, VZV, CMV) et donc qu'un nombre réduit d'amorces est suffisant pour l'identification spécifique de tous ces virus.

Pour ce qui est des infections bactériennes telles que les abcès de cornée et les endophtalmies, le problème est différent parce qu'il existe un grand nombre de bactéries potentiellement responsables. C'est pourquoi la PCR utilisée est universelle et a pour cible le gène d'ADN codant l'ARN ribosomal de la sous-unité 16S [38, 44, 45]. Cette PCR universelle a déjà fait ses preuves pour un certain nombre de prélèvements dans d'autres pathologies : salive, sérum et biopsie pour la maladie de Whipple, liquide céphalorachidien en cas de méningite bactérienne, ou encore les valves dans les endocardites.

En ce qui concerne les kératites bactériennes, la revue de littérature sur les principales études intégrant la biologie moléculaire dans le diagnostic bactériologique des abcès de cornée est relativement pauvre. En revanche, elle a été particulièrement bien étudiée pour les kératites virales. On peut résumer les études sur les séries de kératites bactériennes selon le tableau récapitulatif suivant :

Etudes	Population étudiée	Techniques utilisées	Résultats
Knox et al., 1998 [23]	11 prélèvements de kératites bactériennes documentées par la culture + 17 prélèvements de kératites autres que bactériennes	PCR nichée universelle Prélèvements successifs pour cultures bactériennes / fongiques / virales et PCR	- 1 culture poly-bactérienne : PCR+ pour 1 espèce - 8/10 PCR universelle+, conformes à la culture - 1/10 PCR+ avec autres amorces (<i>S. aureus</i>) - 100% PCR – dans les 17 tests négatifs
Lohmann et al., 2000 [46]	16 yeux : 12 formes atypiques, et 4 formes bactériennes typiques	Sérologies (HSV, VZV, Borrelia) sur 12 prélèvements atypiques ; Culture et PCR	- pour les 4 abcès bactériens typiques : <i>P. aeruginosa</i> en culture et PCR - pour les 12 autres : PCR+ dans 11/12 (5 virus, 6 bactéries) et culture + dans 2/12 (2 bactéries), conformes à PCR

Rudolph et al., 2004 [47]	4 patients avec kératites sévères dont résultats cultures peu probables	PCR universelle Prélèvements différents : 1 pour cultures, 1 pour PCR	PCR + dans les 4 cas
---------------------------	---	--	----------------------

Dans ces articles, on note que différents prélèvements ont été nécessaires à la réalisation de l'étude comparative des cultures avec la PCR. C'est une situation imposée par la clinique même des abcès de cornée et par la technique de prélèvements qui ne peuvent être, en aucun cas, scindés en plusieurs parties. De plus, l'étude majeure de Knox fait état de prélèvements sélectionnés d'après leur résultat de culture positif et donc leur étiologie bactérienne affirmée. En cas de négativité de la PCR universelle, des PCR spécifiques sont menées avec pour cible la bactérie isolée en culture.

Par ailleurs, les couples d'amorces sont à chaque fois différents, ce qui de notre avis, n'influence pas les résultats de ces PCR universelles, s'agissant d'amorces complémentaires aux séquences hautement conservées du gène codant l'ARN 16S ribosomal.

Pour les endophtalmies, lorsqu'on reprend les principales études en PCR pan-bactérienne dans les endophtalmies aiguës et/ou chroniques, on retrouve moins de 10 références. Elles sont résumées dans le tableau ci-après inspiré d'un tableau modifié de Chiquet et coll.[48] :

Études	Population étudiée	Techniques utilisées	Résultats
Hykins et al., 1994 [39]	23 patients, endophtalmies chroniques	PCR avec amorces universelles et d'autres pour <i>P. acnes</i>	PCR + pour 14% des contrôles et 74% des endophtalmies chroniques avec les amorces pan-bactériennes PCR + pour 35% des endophtalmies chroniques avec une amorce <i>P. acnes</i> (0% pour les contrôles)
Lohmann et al., 1998 [49]	16 patients (16 HA et 16 HV) 14 endophtalmies aiguës et 2 chroniques	PCR universelle et séquençage	- culture + 43% - PCR HV + 87% - PCR HA + 100% - temps d'obtention des résultats : 6h
Therese et al., 1998 [26]	55 patients, 58 échantillons (28 HA , 30 HV), endophtalmies aiguës et chroniques, bactériennes et fongiques	Culture et PCR nichée avec amorces ADNr 16S pan-bactérienne et PCR pour <i>P. acnes</i>	- culture + 46,5% (bactéries 34,5% et champignons 12%) - 5% faux positifs avec amorces pan-bactériennes, 0% avec amorces <i>P.acnes</i> - la PCR pan-bactérienne permet l'identification de 63,8% des germes (100% corrélation avec culture) et identifie 44,7% des germes dans les prélèvements à culture négative. Augmente l'identification des germes de 46,5 à 75,8%.
Okhravi et al., 2000 [50]	25 patients, 37 prélèvements (15 HA et 22 HV), endophtalmies aiguës	Culture et PCR nichée avec amorces ADNr 16S pan-bactériennes puis séquençage	- culture + dans 30% HA et 68% HV - 100% de produites d'amplification 30/37 séquencés dont 8 séquences non identifiables corrélation 100% avec culture - 5% faux positifs

Anand et al., 2000 [51]	55 patients (17 HA, 40 HV), endophtalmies postopératoires, post-traumatiques ou endogènes, aiguës ou chroniques	Culture et PCR universelle pour la détection du Gram	- culture + 56% - PCR + 91% A permis d'identifier le germe pour les 25 prélèvements négatifs en culture Pas de différence entre l'HA et le vitré pour la PCR
Lohmann et al., 2000 [46]	25 patients (25 HA et 25 HV), endophtalmies chroniques	Culture bactérienne et mycologique PCR universelle ADNr 16S bactérien et 18S fongique	- PCR HA + 84% (culture + 0%) - PCR HV + 92% (culture + 24%) - 20% d'étiologies fongiques (<i>A. israelii</i>)
Chiquet et al., 2007 [52]	30 patients, 30 HA et 16 HV, endophtalmies aiguës ou retardées postopératoires	Culture PCR 91E-13BS	- culture + 32% ; PCR HA + 61% L'association des 2 dans HA : 71% + - prélèvements vitréens après antibiothérapies intra-vitréennes : culture + 18% et PCR + 62%

HA = humeur aqueuse
HV = humeur vitré

La plupart des études concernant les endophtalmies intéressent les formes chroniques, dont le diagnostic est particulièrement difficile, et qui sont souvent purement inflammatoires sans infection bactérienne. Notons que la plupart de ces études (Chiquet, Okhravi, Therese, Anand, ...) ont pris un groupe témoin négatif afin de s'assurer de la spécificité de la méthode. Il en ressort que la PCR universelle est plus sensible que la culture, mais les résultats sont contradictoires quant au rendement respectif de l'humeur aqueuse et de l'humeur vitrée. L'originalité de l'étude d'Okhravi [50] est la recherche d'une réaction inflammatoire protéique en chambre antérieure, un taux élevé de protéines étant attendu en cas d'infection et donc d'inflammation et non en cas de colonisation ou de contamination de la PCR. Il a appliqué cette recherche de protéines aux prélèvements dont la PCR était négative ou dont le séquençage des produits d'amplification était ininterprétable.

3. MATERIEL ET METHODE

3.1. LES PATIENTS

Ont été inclus tous les patients qui se sont présentés au CHU de Limoges entre le 1^{er} mai 2004 et le 1^{er} mai 2006 avec, à leur arrivée, des signes cliniques d'abcès de cornée ou d'endophtalmie aiguë postopératoire. La prise en charge a été réalisée par l'équipe du service d'ophtalmologie du Professeur ADENIS. Les prélèvements ont été traités par le laboratoire de bactériologie du Professeur DENIS. Le recrutement des patients s'étend sur toute la région du Limousin, une partie de la Charente, du Lot, de l'Indre et de la Dordogne.

Les critères de sélection des patients :

- pour les abcès de cornée, ont été inclus tous les patients en présentant les signes cliniques et qui se sont présentés dans le service d'ophtalmologie durant la période d'étude. Aucune sélection concernant la gravité initiale n'a été réalisée.
- pour les endophtalmies, nous n'avons inclus que des cas d'endophtalmies postopératoires (cataracte, glaucome, vitrectomie). Il ne s'est présenté durant la période d'étude, aucun cas d'endophtalmie post-traumatique, ni d'endophtalmie endogène.

3.2. LA COLLECTE DES PRELEVEMENTS

Les prélèvements ont été réalisés en urgence, par différents praticiens, dans l'heure suivant l'admission du patient selon les modalités suivantes.

3.2.1. Pour les abcès de cornée

Les prélèvements ont été réalisés à la lampe à fente, sous conditions stériles (gants) par grattage cornéen (avec lame bistouri de 15, vaccinostyle, ou éponge), au niveau de la lésion et sur ses bords systématiquement. Le grattage devait être profond après élimination des débris nécrotiques et fibrineux. Ce débridement mécanique de l'abcès constituait, en outre, le premier temps thérapeutique puisqu'il permettait de diminuer la charge bactérienne et d'augmenter la pénétration des antibiotiques. Chaque prélèvement était réalisé en double,

éventuellement associé à des prélèvements destinés aux autres laboratoires (parasitologie, mycologie, parfois virologie). Ceci était réalisé sous collyre anesthésique. Les prélèvements étaient adressés dans un tube sec au laboratoire de bactériologie. L'un d'entre eux était traité en urgence par culture, l'autre conservé à - 80° pour la biologie moléculaire.

Nous avons ainsi recueilli 24 prélèvements cornéens.

3.2.2. Pour les endophtalmies

Sous conditions stériles strictes, au bloc opératoire d'ophtalmologie, sous microscope opératoire plafonnier, la PCA (Ponction de Chambre Antérieure) était réalisée au limbe supérieur, à l'aide d'une poire d'aspiration donnée directement au laboratoire, ou bien d'une seringue à tuberculine avec une aiguille 30G, déchargée dans un tube eppendorf. Le geste était réalisé sous anesthésie topique, avec perfusion d'antalgiques +/- Atarax®. Ainsi, 0,1 à 0,2 ml d'humeur aqueuse était prélevé. Cependant, ce prélèvement pouvait être rendu difficile par l'importance de la réaction inflammatoire intraoculaire.

En cas de prélèvement vitréen, il était réalisé au vitréotome à la pars plana après boutonnière conjonctivale, une seule sclérotomie. Le vitré pur aspiré était récupéré dans des micro-tubes. Ceci était réalisé sous une courte anesthésie générale. Le choix entre les deux types de prélèvements dépendait de l'accessibilité et de la disponibilité de l'anesthésiste. En aucun cas le geste ne devait retarder l'antibiothérapie intra-vitréenne.

Pour le protocole, ont été réalisés deux prélèvements pour chaque patient, l'un était destiné à une étude bactériologique de routine, l'autre pour la biologie moléculaire (dans ce cas, ils étaient conservés à - 80° jusqu'à leur prise en charge).

Nous avons ainsi recueilli 28 humeurs aqueuses et 11 humeurs vitrées.

3.3. LE DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE USUEL

Tous les prélèvements ont été pris en charge en urgence (dans les 30 mn après leur arrivée au laboratoire). Ont été utilisés une coloration de Gram pour l'examen direct sur frottis, et 5 milieux de culture différents : une gélose CLED en aérobiose, une gélose au sang et une gélose chocolat sous 5 % de CO₂, une gélose au sang en anaérobiose et un bouillon de Schaedler, le tout placé à 37°C. Les lectures ont été réalisées à 24 h, 48h et au 5^{ème} jour.

Toutes les souches isolées ont fait l'objet d'une identification et d'un antibiogramme.

3.4. LA BIOLOGIE MOLECULAIRE

3.4.1. L'extraction de l'ADN

Elle a été réalisée sur micro-colonnes de silice à l'aide du « KIT QIAGEN » selon les recommandations du fabricant. La quantité de prélèvement initial a été ramenée à 200 µL par l'ajout de PBS. Après incubation avec 20 µL de protéase et 200 µL de tampon de lyse à 56°C pendant 10 mn, nous avons ajouté 200 µL d'éthanol absolu afin de précipiter l'ADN. Le tout a été alors déposé sur une colonne QIAGEN puis plusieurs cycles de lavages ont été réalisés en accord avec les recommandations du laboratoire commercialisant le kit. Finalement, l'ADN a été récupéré de la colonne sous l'effet d'un tampon d'élution. Nous avons utilisé un volume d'élution de 50 µL, inférieur à celui recommandé par le fabricant (200 µL) étant donné les faibles quantités de prélèvements utilisés. L'ADN extrait était alors prêt pour l'étape de PCR. L'extraction était réalisée sous hotte, la PCR a été réalisée dans une autre pièce.

L'ADN extrait n'étant pas utilisé immédiatement, il était conservé à - 20°C.

3.4.2. La PCR

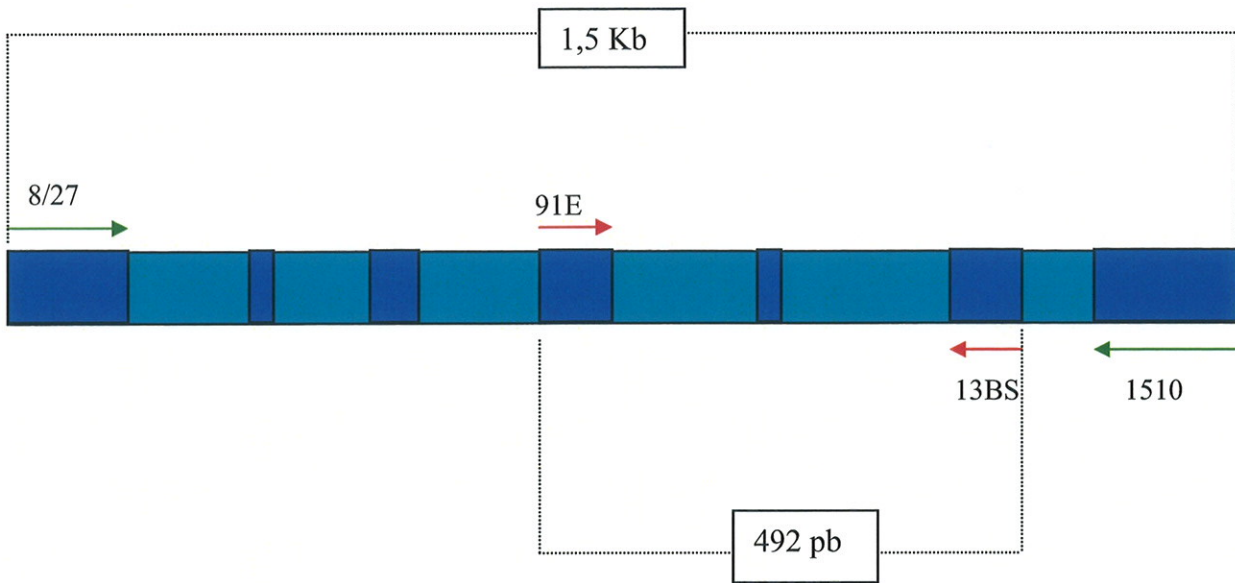
○ Le choix des amorces

Nous avons utilisé les amorces décrites dans la littérature et dont les séquences sont énoncées dans l'annexe 6. Les amorces 8-27 et 1510-1492 amplifient un fragment de 1,5 kb. Pour la PCR nichée, les amorces 91E et 13BS permettent d'obtenir un fragment plus petit de 492 pb, interne au précédent (annexe 7).

Annexe 6 : Tableau avec séquences oligodésoxynucléotidiques des 4 amorces utilisées.

AU 8/27	5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3'
AU 1510/1492	5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3'
91E	5' TCA AA(GT) GAA TTG ACG GGG GC 3'
13BS	5' GCC CGG GAA CGT ATT AC 3'

Annexe 7 : Schéma du gène de l'ARN 16S ribosomal.



- Régions hautement conservées
- Régions variables

- Le bloc PCR

L'appareil utilisé est un thermocycler PERKIN 2400 ou 2700.

- La première PCR

a) Le mélange réactionnel de la première PCR

Pour chaque prélèvement, nous avons utilisé 10 µL d'ADN purifié auxquels nous avons ajouté le mélange réactionnel suivant :

- | | |
|----------------------------------|--------|
| - Tampon 10X | 5,0 µl |
| - MgCl ₂ ¹ | 1,5 µl |
| - d NTP ² | 4,0 µl |
| - Amorce 8/27 ³ | 0,5 µl |
| - Amorce 1510/1492 ³ | 0,5 µl |
| - Taq polymérase ⁴ | 0,4 µl |
| - UDG ⁵ | 0,5 µl |

¹ à 25 mM

² mélange d'ATP, dCTP, dGTP à 0,2 mM chacun, et dUTP à 0,4 mM

³ à 20 pmol/L

⁴ QIAGEN, ref : 201205

⁵ ROCHE, ref : 1444 646

Chaque série de 4 prélèvements à amplifier a été encadrée par un témoin négatif (afin de déceler les possibles contaminations) et bien sûr d'un témoin positif (garant du bon fonctionnement de notre réaction, 2 µl). Le témoin négatif contenait notamment tous les réactifs inclus dans chaque série.

b) Le programme ARN 16S-8/27-1510 :

- première dénaturation : 3 mn à 94°C,
- dénaturation : 30 sec à 94°C,
- hybridation des amorces : 1 mn à 59°C,
- élongation : 1 mn à 72°C,
- extension finale : 10 mn à 72°C,
- et pour finir, 4°C à l'infini.

Nous avons réalisé 35 cycles.

o La PCR nichée (interne)

Sur chaque réaction de la 1^{ère} PCR, a été réalisée une PCR nichée, à l'aide des amorces 91E-13BS. Un µl de la première PCR a été utilisé avec le mélange réactionnel ci-joint et le programme ci-après. Chaque échantillon était entouré de témoins négatifs, et chaque série de prélèvements finissait par un témoin positif.

a) Le mélange réactionnel de la 2^{ème} PCR

Les solutions employées sont :

- | | |
|----------------------------------|--------|
| - Tampon 10X | 5,0 µl |
| - MgCl ₂ ⁶ | 5,0 µl |
| - d NTP ⁷ | 4,0 µl |
| - Amorce 91E ⁸ | 0,5 µl |
| - Amorce 13BS ⁸ | 0,5 µl |
| - Taq polymérase ⁹ | 0,4 µl |
| - Pas d'UDG | |

b) Le programme utilisé

- première dénaturation : 10 mn à 94°C,
- dénaturation : 30 sec à 94°C,
- hybridation des amorces : 30 sec à 55°C,
- élongation : 30 sec à 72°C,
- extension finale : 10 mn à 72°C,
- puis 4°C à l'infini.

Nous avons réalisé 35 cycles.

⁶ à 25 mM

⁷ dATP, dCTP, dGTP à 0,2 mM

⁸ à 20pmol/L

⁹ QIAGEN, ref : 201205

3.4.3. Analyse des produits d'amplification sur gel

Chaque produit d'amplification a été analysé par électrophorèse en champ constant en gel d'agarose à 0,8% en présence de bromure d'éthidium à 0,5 mg/L. Nous avons fait migrer 5 μ L d'amplifiât à 100V pendant 30 mn.

Le principe repose sur le fait que les acides nucléiques sont des macromolécules polyanioniques uniformément chargées, que l'on peut donc faire migrer dans un champ électrique. La charge relative étant constante, le système de discrimination utilisé est l'effet de filtration sur gel. La vitesse de migration d'une molécule d'acide nucléique sera fonction de deux paramètres : sa masse moléculaire, donc le nombre de bases ou de paires de bases, et la concentration du gel. L'ADN migre vers le positif.

La révélation est possible grâce au BET. Le bromure d'éthidium est une drogue intercalante, présentant donc un risque cancérigène. Elle se glisse entre les bases des acides nucléiques. Spontanément non fluorescente, elle présente une fluorescence orange lorsqu'elle est intercalée entre les bases des acides nucléiques. On l'introduit donc dans l'agarose avant que le gel ne soit coulé. Après migration et sous illumination par des UV courts, vers 300 nm, l'ADN est visualisé sous forme de bandes. Il est alors possible de prendre des photographies avec un film très sensible.

La taille en paires de bases (pb) des produits d'amplification est appréciée comparativement à un marqueur de poids moléculaire de taille connue (123 pb), placé à chaque extrémité des puits du gel.

3.4.4. Séquençage et identification

Chaque produit d'amplification obtenu a été purifié sur colonne puis séquencé. La PCR de séquençage comporte 3 étapes de 25 cycles : une étape de dénaturation à 96°C de 10 sec, une étape d'hybridation à 50°C de 5 sec et une étape de polymérisation à 60°C de 4 mn. Ensuite, les produits de séquençage sont purifiés par le kit DYEX SPIN (QIAGEN, ref 63106) et analysés avec l'appareil de séquençage automatique ABI PRISM 3100 (Perkin-Elmer Applied Biosystem). Les séquences sont comparées à l'ensemble des séquences génomiques disponibles dans la banque de données Genbank BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Ce

programme réalise les alignements de séquence et les arbres phylogénétiques qui permettent l'identification la plus probable avec un pourcentage de similitudes.

3.5. LA RECHERCHE D'INHIBITEURS DE PCR

L'absence d'inhibiteurs de PCR (d'inhibiteurs de la Taq Polymérase notamment) a été contrôlée sur les produits d'extraction de l'ADN des prélèvements, par l'amplification d'un fragment interne au gène de la bêta2 - globuline humaine. Cette étape permet également de tester l'efficacité d'extraction d'ADN.

L'amplification de ce fragment de gène de la bêta2 - globuline humaine a été réalisée à l'aide des amorces :

- Bglo1 (ACACAACCTGTGTGTTCACTAGC) et
- Bglo2 (CAACTTCATCCACGTTCCACC).

Ces amorces permettent d'amplifier un fragment de 110 pb.

Le mélange réactionnel est le suivant :

- | | |
|-----------------------------------|--------|
| - Tampon 10X | 5,0 µl |
| - MgCl ₂ ¹⁰ | 1,5 µl |
| - d NTP ¹¹ | 4,0 µl |
| - Amorce Bglo1 ¹² | 0,5 µl |
| - Amorce Bglo2 ¹² | 0,5 µl |
| - Taq polymérase ¹³ | 0,4 µl |
| - UDG ¹⁴ | 0,5 µl |

Le programme utilisé est celui qui suit:

- première dénaturation : 10 mn à 94°C,
- dénaturation : 30 sec à 94°C,
- hybridation des amorces : 30 sec à 55°C,
- élongation : 30 sec à 72°C,
- extension finale : 10 mn à 72°C,
- et pour finir, 4°C à l'infini.

Nous avons réalisé 30 cycles.

¹⁰ à 25 mM

¹¹ mélange d'ATP, d'CTP, d'GTP à 0,2 mM chacun, et d'UTP à 0,4mM

¹² à 20pmol/L

¹³ QIAGEN, ref : 201205

¹⁴ ROCHE, ref :1444 646

3.6. L'EVALUATION

Nous avons vu que les prélèvements étaient réalisés en double exemplaires. Soulignons qu'il s'agissait donc de deux prélèvements différents qui étaient répartis de façon aléatoire : l'un était destiné à la culture, l'autre à la biologie moléculaire.

Pour chaque prélèvement, nous avons relevé le sexe et l'âge des patients, le type de prélèvement (cornée, humeur aqueuse ou vitré), les résultats de la culture, ceux de la 1^{ère} PCR (8/27-1510, le grand fragment), de la PCR nichée (91E-16BS, le petit fragment), et enfin, les résultats éventuels du séquençage en cas de résultat positif pour le grand et/ou le petit fragment. Pour les abcès de cornée, nous avons de plus recensé ceux qui avaient bénéficié d'une antibiothérapie topique préalable au prélèvement, sans pouvoir néanmoins la préciser par manque de données.

Les résultats ont été présentés dans un tableau EXCEL permettant des analyses statistiques par tableaux croisés dynamiques et par appel aux fonctions de dénombrement et de calcul multicritères.

4. RESULTATS

Tous les résultats sont récapitulés dans le tableau l'annexe 8.

Annexe 8 : Tableau général des résultats.

N°	Né(e) le	Age	Sexe	Type prlmt	Culture	PCR 8/27- 1510	Séquençage PCR 8/27-1510	PCR 91E-13BS	Séquençage PCR 91E-13BS
1	1987	18	F	C	neg	neg	NE	neg	NE
2	1920	85	F	C	neg	neg	NE	neg	NE
3	1983	22	F	C	neg	neg	NE	neg	NE
4	1969	36	M	C	neg	neg	NE	neg	NE
5	1988	17	M	C	neg	neg	NE	neg	NE
6	1951	54	M	C	neg	neg	NE	neg	NE
7	1923	82	F	C	neg	pos	Ininterprétable	pos	Ininterprétable
8	1932	73	F	C	neg	neg	NE	neg	NE
9	1988	17	F	C	neg	neg	NE	neg	NE
10	1942	63	F	C	neg	neg	NE	neg	NE
11	1981	24	M	C	neg	neg	NE	neg	NE
12	1949	56	F	C	neg	pos	Ininterprétable	pos	Ininterprétable
13	1917	88	M	C	neg	pos	Ininterprétable	pos	Ininterprétable
14	1943	62	M	C	neg	neg	NE	neg	NE
15	1978	27	M	C	neg	neg	NE	neg	NE
16	1915	90	F	C	neg	neg	NE	pos	Ininterprétable
17	1916	89	F	C	neg	neg	NE	pos	Ininterprétable
18	1922	83	M	C	neg	neg	NE	pos	Ininterprétable
19	1936	69	M	C	<i>P. aeruginosa</i>	neg	NE	pos	<i>P. aeruginosa</i>
20	1940	65	M	C	<i>P. aeruginosa</i>	neg	NE	neg	NE
21	1923	82	M	C	SCN	neg	NE	neg	NE
22	1948	57	M	C	SCN	neg	NE	neg	NE
23	1951	54	M	C	SCN	neg	NE	pos	Ininterprétable
24	1983	22	F	C	<i>S. epidermidis</i>	pos	Ininterprétable	neg	NE
25	1935	70	M	HA	neg	neg	NE	neg	NE
26	1914	91	F	HA	neg	neg	NE	neg	NE
27	1919	86	F	HA	neg	neg	NE	neg	NE
28	1920	85	F	HA	neg	neg	NE	neg	NE
29	1945	60	F	HA	neg	pos	<i>S. epidermidis</i>	neg	NE
30	1932	73	F	HA	neg	neg	NE	neg	NE
31	1953	52	M	HA	neg	neg	NE	neg	NE

N°	Né(e) le	Age	Sexe	Type prlmt	Culture	PCR 8/27-1510	Séquençage PCR 8/27-1510	PCR 91E-13BS	Séquençage PCR 91E-13BS
32	1928	77	M	HA	neg	neg	NE	neg	NE
33	1929	76	M	HA	neg	neg	NE	neg	NE
34	1931	74	M	HA	neg	neg	NE	neg	NE
35	1968	37	F	HA	neg	neg	NE	pos	Ininterprétable
36	1925	80	F	HA	neg	neg	NE	neg	NE
37	1937	68	M	HA	neg	neg	NE	neg	NE
38	1949	56	F	HA	neg	neg	NE	neg	NE
39	1936	69	M	HA	neg	neg	NE	neg	NE
40	1924	81	M	HA	neg	pos	Ininterprétable	pos	Ininterprétable
41	1928	77	M	HA	neg	neg	NE	pos	<i>S. aureus</i>
42	1932	73	F	HA	neg	neg	NE	neg	NE
43	1939	66	M	HA	neg	pos	Ininterprétable	neg	NE
44	1930	75	M	HA	<i>S. aureus</i>	neg	NE	neg	NE
45	1927	78	M	HA	<i>S. epidermidis</i>	pos	<i>S. epidermidis</i>	neg	NE
46	1927	78	F	HA	<i>S. epidermidis</i>	pos	<i>S. epidermidis</i>	pos	<i>S. epidermidis</i>
47	1923	82	F	HA	<i>S. epidermidis</i>	neg	NE	neg	NE
48	1928	77	M	HA	<i>S. epidermidis</i>	pos	<i>S. epidermidis</i>	pos	<i>S. epidermidis</i>
49	1925	80	F	HA	<i>S. pneumoniae</i>	pos	<i>S. pneumoniae</i>	pos	<i>S. pneumoniae</i>
50	1912	93	F	HA	SCN	neg	NE	neg	NE
51	1943	62	M	HA	<i>St. mitis</i>	pos	<i>S. pseudopneumoniae</i>	pos	<i>S. pseudopneumoniae</i>
52	1956	49	M	HA	<i>St. mitis</i>	pos	<i>S. pneumoniae</i>	pos	<i>S. pneumoniae</i>
53	1922	83	F	HV	neg	pos	<i>Staph sp</i>	neg	NE
54	1931	74	F	HV	neg	neg	NE	neg	NE
55	1946	59	F	HV	neg	pos	<i>Strepto sp</i>	pos	<i>S. pseudopneumoniae</i>
56	1933	72	F	HV	neg	neg	NE	pos	<i>S. epidermidis</i>
57	1948	57	F	HV	neg	pos	<i>S. pseudopneumoniae</i>	pos	<i>S. pseudopneumoniae</i>
58	1916	89	F	HV	neg	neg	NE	neg	NE
59	1937	68	F	HV	neg	neg	NE	neg	NE
60	1940	65	F	HV	neg	neg	NE	neg	NE
61	1942	63	F	HV	neg	neg	NE	neg	NE
62	1928	77	F	HV	neg	neg	NE	neg	NE
63	1947	58	M	HV	<i>S. epidermidis</i>	pos	<i>S. capitis</i>	pos	<i>S. capitis</i>

Type de prélèvement : C = cornée / HA = humeur aqueuse / HV = humeur vitrée
neg = négatif / pos = positif / prlmt = prélèvement
NE = non effectué

Les numéros des échantillons auxquels se rapportent les germes cités seront précisés entre parenthèses, à leur suite.

4.1. POPULATION

Notre série comptait 63 prélèvements, 24 pour abcès de cornée et 39 pour endophtalmies. On retrouvait 34 femmes et 29 hommes d'âge moyen 65,5 ans (17-93).

Les 24 prélèvements de cornée étaient répartis entre 11 femmes et 13 hommes, d'âge moyen 55,6 ans (17-90).

Parmi les prélèvements pour endophtalmie, on comptait 28 spécimens d'humeur aqueuse et 11 d'humeur vitrée. On totalisait 23 femmes et 16 hommes, d'âge moyen 71,5 ans (37-93).

4.2. SPECIFICITE de la PCR UNIVERSELLE

La spécificité de la technique de PCR avec des amorces universelles bactériennes ayant déjà été testée (spécificité de 95% [26]), il ne nous est pas apparu nécessaire de prendre un groupe témoin négatif. En effet, dans son étude de 1998, Therese a pris 20 spécimens contrôles (humeur aqueuse et vitré) à partir de patients non infectés (après chirurgie de décollement de rétine, vitrectomies diverses). Sur ces 20 prélèvements, un seul était positif par la PCR nichée universelle (5%) bien que correspondant à une situation clinique non infectée. De plus, il a testé les souches des différentes bactéries habituellement retrouvées dans les endophtalmies et a réalisé une PCR nichée avec des amorces universelles. Il a obtenu un fragment de taille attendue dans chaque cas.

La même année, Knox étudiait lui aussi l'intérêt de la PCR, mais pour les kératites bactériennes [23]. Pour s'assurer de la spécificité de sa méthode, il l'a appliquée à 12 souches de bactéries connues, avec succès. De plus, il l'a également appliquée à 17 prélèvements cornéens pour des pathologies non bactériennes, et tous sont restés négatifs.

4.3. RESULTATS GLOBAUX

4.3.1. Résultats des cultures bactériennes

Sur l'ensemble des prélèvements, une culture positive a été obtenue dans 16 cas sur 63 ; ceci représente 25,4% d'identification par culture bactérienne.

Les cultures étaient réparties de la façon suivante :

- 6 *S. epidermidis* (n° 24, 45, 46, 47, 48, 63),
- 4 SCN (n° 21, 22, 23, 50),

- 1 *S. aureus* (n° 44),
- 2 *P. aeruginosa* (n° 19 et 20),
- 2 *S. mitis* (n° 51 et 52),
- 1 *S. pneumoniae* (n° 49).

4.3.2. Les PCRs

Au cours de notre étude, chaque témoin négatif inséré entre les réactions de PCR est bien resté négatif, ce qui suggère l'absence de contamination des réactifs.

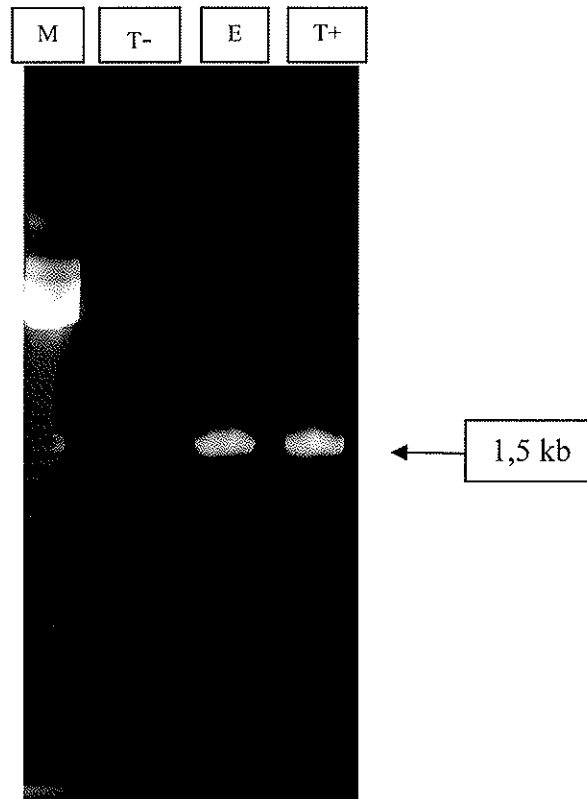
Pour le témoin positif, la PCR a permis d'amplifier un fragment de taille attendue à chaque fois, ce qui indique une absence de problème technique pour toutes les PCR réalisées au cours de notre étude.

- La première PCR (grand fragment)

Après extraction de l'ADN des 63 échantillons, une PCR à l'aide des oligonucléotides 8/27-1510 a été réalisée sur chacun d'eux.

La PCR est dite positive lorsqu'un fragment de 1,5 kb est observé après étude électrophorétique de chacune des réactions, comme cela est illustré par l'annexe 9 ci-après.

Annexe 9 : Electrophorèse en gel d'agarose des réactions d'amplification réalisées lors de la 1^{ère} PCR à l'aide des amorces 8/27-1510. E, échantillon ; M, marqueur ; T-, témoin négatif ; T+, témoin positif ; kb, kilobases.



Un fragment de 1,5 kb a été retrouvé pour 17 des 63 échantillons de notre étude. Ils étaient répartis de la façon suivante :

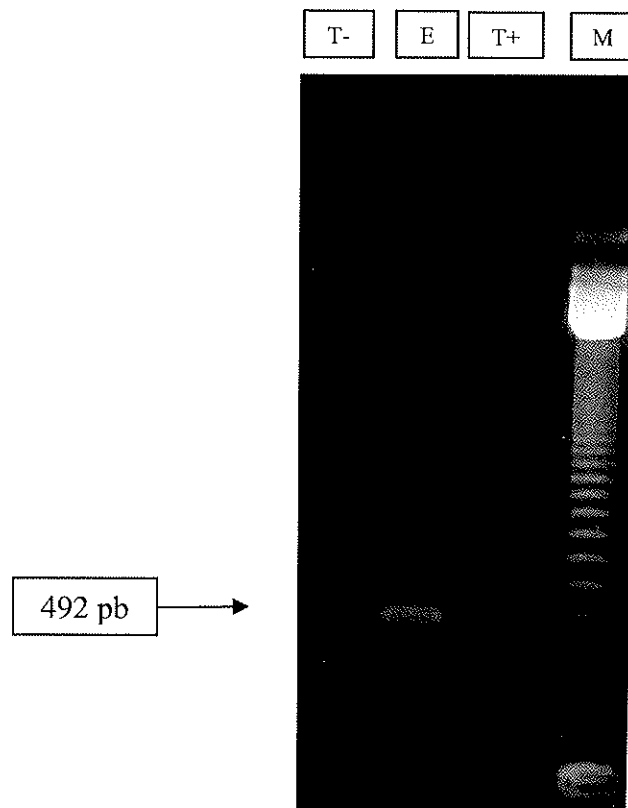
- 4 parmi les 24 prélèvements de cornée (n° 7, 12, 13, 24),
- 9 sur les 28 prélèvements d'humeur aqueuse (n° 29, 40, 43, 45, 46, 48, 49, 51, 52),
- 4 sur les 11 prélèvements vitréens (n° 53, 55, 57, 63).

Parmi ces 17 fragments, 9 ont été obtenus à partir d'échantillons dont la culture était négative, soit les 7, 12, 13, 29, 40, 43, 53, 55 et 57.

o La PCR nichée (petit fragment)

Chaque réaction de la 1^{ère} PCR a ensuite été utilisée comme matrice pour réaliser la PCR nichée à l'aide des amorces 91E-13BS. Chaque réaction a été ensuite analysée après migration électrophorétique sur gel et toute réaction ayant un fragment d'environ 492 pb était considérée comme positive, comme cela est illustré dans l'annexe 10.

Annexe 10 : Electrophorèse en gel d'agarose des réactions d'amplification réalisés lors de la PCR nichée à l'aide des amorces 91E-13BS. E, échantillon ; M, marqueur ; T-, témoin négatif ; T+, témoin positif ; pb, paires de bases.



Sur les 63 prélèvements initiaux, un produit amplifié de taille attendue a été obtenu dans 20 cas, soit:

- 8/24 pour les cornées (n° 7, 12, 13, 16, 17, 18, 19 et 20),
- 8/28 pour les humeurs aqueuses (n° 35, 40, 41, 46, 48, 49, 51 et 52),
- 4/11 pour les prélèvements de vitré (n° 55, 56, 57 et 63).

La PCR nichée a permis l'amplification d'un fragment dans 12 cas d'échantillons à culture négative (soit les 7, 12, 13, 16, 17, 18, 35, 40, 41, 55, 56, 57) dont 6 cas d'échantillons à grand fragment négatif (soit les 16, 17, 18, 35, 41, 56).

4.3.3. Le séquençage

Tous les fragments obtenus par PCR ont été séquencés, soit 37 fragments. Les séquences alors obtenues ont permis une identification bactérienne dans 22 cas, soit 59,5% d'identifications cohérentes. Lorsque nous comparons les identifications retrouvées à partir du grand fragment et celles à partir de la PCR nichée (8 cas), ce sont les mêmes pour les 2 PCR dans chacun de cas. Nous avons ensuite comparé les identifications aux résultats obtenus par culture quand celle-ci était positive, situation retrouvée dans les 6 cas.

Le germe mis en évidence par PCRs était identique à celui identifié par culture bactérienne dans 3 des 6 cas (n°46, 48, 49). Dans les 3 autres cas, les différentes identifications étaient les suivantes :

- 51 : *S. mitis* en culture pour *S. pseudopneumoniae* en PCR,
- 52 : *S. mitis* en culture pour *S. pneumoniae* en PCR,
- 63 : *S. epidermidis* en culture pour un *S. capitis* en PCR.

Fait remarquable, dans 3 échantillons (n° 29, 45 et 53), le séquençage des fragments obtenus par la première PCR a permis une identification bactérienne alors que la PCR nichée n'a rien donné. Pour le cas 45, il s'agit de *S. epidermidis* identique à celui retrouvé en culture. Pour les 2 autres cas, l'identification fait état de 1 *S. epidermidis* et de 1 *Staphylococcus sp* dont les cultures étaient négatives.

4.3.4. Récapitulatif

Les résultats de l'ensemble de la série sont résumés dans le tableau de l'annexe 11.

Annexe 11 : Tableau des résultats des bactéries identifiées, en fonction des différentes méthodes.

	Nombre	Culture		PCR Grand fragment		PCR Nichée	
		Positive	Négative	Positif	Négatif	Positive	Négative
Au moins 1 prélèvement positif	22	16		7	9	6	1
			6	4	2	2	2
Tous prélèvements négatifs	41		41		41		41
Total	63	16	47	11	52	11	52

L'analyse des résultats du tableau de l'annexe 11 nous permet de relever que notre série fait état de :

- 16 identifications bactériennes par culture, soit un taux de 25,4 % d'identification,
- 11 identifications bactériennes par grand fragment, soit un taux de 17,5 % d'identification,
- 11 identifications bactériennes par PCR nichée, soit un taux de 17,5 % d'identification.

La 1^{ère} PCR a permis une identification bactérienne pour 2 prélèvements supplémentaires, négatifs en culture et en PCR nichée (n° 29 et 53).

La PCR nichée a permis d'identifier 2 bactéries supplémentaires par rapport à la culture et à la 1^{ère} PCR (n° 41 et 56).

Si la culture seule a une sensibilité de 25,4 %, associée à une 1^{ère} PCR universelle, le taux passe à 31,7 %, et lorsque toutes deux sont associées à une PCR nichée, la sensibilité atteint 34,9 %.

4.4. DETAILS DES RESULTATS PAR PATHOLOGIES

4.4.1. Les abcès de cornée

Sur les 24 prélèvements, on recense :

- 6 cultures positives parmi lesquelles on a pu mettre en évidence 2 *P. aeruginosa* (n° 19 et 20), 3 SCN (n° 21, 22 et 23) et 1 *S. epidermidis* (n° 24),
- 4 fragments de taille attendue pour la 1^{ère} PCR, sans aucun séquençage valide
- 8 fragments de taille attendue avec la PCR nichée, une seule séquence correcte a pu être obtenue, et elle est identique à celle de la culture : *P. aeruginosa* (n° 19),

Le séquençage des fragments obtenus par PCR n'a été possible que dans 8%.

A noter : dans 3 cas, on obtient un fragment de taille attendue à la fois avec la 1^{ère} PCR et la PCR nichée, mais sans identification possible. Ce sont les prélèvements 7, 12 et 13 qui nous intéresseront plus loin lors de la discussion.

Au total, pour les abcès de cornée de cette étude, il semblerait que la culture soit la plus sensible (avec 25% de résultats positifs).

Un paramètre indépendant a également été analysé pour les abcès de cornée : il s'agit de l'antibiothérapie topique préalable. L'information a pu être recueillie dans 21 cas sur 24 (annexe 12). On retrouvait 10 patients qui avaient bénéficié d'une antibiothérapie préalable susceptible d'avoir stérilisé le site de grattage cornéen lors des prélèvements. Parmi eux, 2 ont eu une culture positive (1 *P. aeruginosa*, et 1 SCN). Sur les 11 patients n'ayant pas eu d'antibiothérapie préalable, 3 ont eu une culture positive. Nous n'avons pas pu récupérer les noms des antibiotiques utilisés en pré-prélèvements, les patients arrivant le plus souvent sans leurs anciennes ordonnances.

Annexe 12 : Influence de l'antibiothérapie topique préalable sur les résultats bactériologiques des abcès de cornée. Rq : le « fragment de taille attendue » regroupe les deux PCR.

	<i>Culture +</i>	<i>Culture -</i>	<i>Fragment de taille attendue</i>	<i>Identification</i>
Antibiothérapie +	2	8	4	0
Antibiothérapie -	3	8	4	0
Pas d'information	1	2	1	1

Le traitement préalable par antibiothérapie topique ne semble pas influencer les résultats : il y a autant de cultures positives que de négatives, et les identifications par PCR n'en sont pas plus importantes. Notre série est trop petite pour pouvoir avancer des résultats significatifs.

4.4.2. Les endophtalmies

o Humeurs aqueuses

Sur les 28 prélèvements étudiés, on a :

- 9 cultures positives : 4 *S. epidermidis* (n° 45, 46, 47 et 48), 2 *S. mitis* (n° 51 et 52), 1 *S. aureus* (n° 44), 1 SCN (n° 50), et 1 *S. pneumoniae* (n° 49),
- 9 fragments de taille attendue avec la 1^{ère} PCR, dont 7 ont permis une identification bactérienne par séquençage : 4 identiques à la culture (n° 45, 46, 48 et 49), 2 légèrement différents (n° 51 et 52) et une nouvelle identification (1 *S. epidermidis*, n°29),
- 8 fragments de taille attendue avec la PCR nichée, dont 6 donnent une identification bactérienne par séquençage : 5 sont identiques au séquençage du grand fragment et on retrouve une nouvelle identification (1 *S. aureus*, n°41). Sur les 5 séquences concordantes des PCRs, 3 sont identiques à la culture (n° 46, 48 et 49) et 2 légèrement différents (n° 51 et 52).

On note que le séquençage des fragments obtenus par PCR, quelle qu'elle soit est de 76,5%. La sensibilité de la culture seule est de 32 %, associée à la 1^{ère} PCR elle est de 35,7 %, et elle reste de 35,7% avec la PCR nichée, sauf que les identifications par les 2 PCRs ne concernent pas les mêmes patients. Par contre, lorsqu'on associe les 3 (culture, 1^{ère} PCR, PCR nichée), on passe à 39,2 %.

- Humeurs vitrées

Pour les 11 prélèvements, on fait état de :

- 1 seule culture positive : *S. epidermidis* (n° 63),
- 4 fragments de taille attendue avec la 1^{ère} PCR, toutes les séquences ont permis une identification bactérienne : 1 *Staphylococcus sp* (n° 53), 1 *Streptococcus sp* (n° 55), 1 *S. pseudopneumoniae* (n° 57) et 1 *S. capitis* (n° 63). Un correspond à la culture positive.
- 4 fragments de taille attendue avec la PCR nichée, dont un ne correspond ni à la culture ni à la 1^{ère} PCR (n° 56). Toutes les séquences ont permis une identification bactérienne : 1 *S. epidermidis* (n° 56), 2 *S. pseudopneumoniae* (n° 55 et 57) et 1 *S. capitis* (n° 63).

Il apparaît que tous les fragments obtenus après PCR ont permis une identification bactérienne après séquençage.

La culture a une sensibilité de 9 % qui passe à 36,3 % par l'apport de la 1^{ère} PCR ou de la PCR nichée, mais à 45,4 % si on associe les 3. L'apport de la PCR par rapport à la culture est tout à fait remarquable ici, notamment si on associe les 2 PCRs.

4.5. RESULTATS DE LA RECHERCHE D'INHIBITEURS

Au cours de notre étude, les prélèvements initiaux étaient conservés à -80° jusqu'à l'extraction de l'ADN, puis une fois l'extraction réalisée, les produits obtenus étaient placés à -20°. Comme décrit dans la littérature, ces modes de conservation induisent l'élimination des éventuels inhibiteurs de PCR présents dans les prélèvements.

Néanmoins, afin de prouver ces données sur notre série, nous avons réalisé une PCR visant à amplifier un fragment de gène de la bêta2- microglobuline. Cette PCR a été appliquée à tous les prélèvements dont la PCR était négative.

Au total, nous avons appliqué cette technique sur 17 prélèvements, après l'extraction d'ADN :

- Sur 6 prélèvements cornéens : les 1, 3, 5, 6, 9 et 10,
- Sur 6 prélèvements d'humeur aqueuse : les 25, 28, 30, 34, 36 et 39,
- Sur 5 prélèvements vitréens : les 54, 58, 59, 61 et 62.

Toutes les PCR étaient positives, ce qui prouve l'absence d'inhibiteurs dans les extractions d'ADN, ou du moins leur élimination grâce aux techniques de conservation.

5. DISCUSSION

Nous avons émis l'hypothèse que l'amplification d'un fragment de gène codant l'ARN 16S par PCR pouvait apporter un intérêt dans le diagnostic bactériologique des abcès de cornée et des endophtalmies. Pour cela, nous avons étudié les résultats de la culture traditionnelle, puis ceux de la biologie moléculaire avec une 1^{ère} PCR universelle, suivie d'une PCR nichée. Leur complémentarité apparaît intéressante pour optimiser la détection des micro-organismes responsables des deux principales infections oculaires cécitantes des pays développés, les abcès de cornée et les endophtalmies.

Il est à souligner que nous avons réalisé cette étude sans modifier nos pratiques locales de prélèvement. Nous avons réalisé 2 prélèvements différents, un seul et même prélèvement ne pouvait être séparé en deux étant donné l'infime quantité de matériel prélevé, notamment pour les abcès de cornée.

5.1. LA POPULATION

Il s'agit d'une étude prospective, où les patients inclus dans la série présentaient les critères cliniques d'abcès de cornée ou d'endophtalmie, les étiologies étant très majoritairement bactériennes sous nos latitudes. En aucun cas nous n'avons de preuve bactériologique de nos diagnostics cliniques.

Dans une étude comme celle de Knox [23], première série de kératites utilisant le gène codant l'ARN 16S, les patients inclus ont un diagnostic clinique d'abcès bactérien, confirmé par une culture bactérienne positive. Notre série, plus large (24 pour 11 cas), ne présente aucune présélection des patients par une culture positive. La série de Kérautret [14] concerne les abcès cornéens hospitalisés, donc graves selon les critères de l'AFSSAPS, ceux de notre série sont à la fois suivis en consultation ou dans le service. L'étiologie bactérienne largement suspectée peut, dans certaines situations, se révéler être une cause fongique ou éventuellement amibienne. C'est d'ailleurs pour cette raison que nous réalisons habituellement plusieurs prélèvements pour les différents laboratoires.

Pour le groupe des endophtalmies, il s'agissait dans la série d'endophtalmies aiguës postopératoires, et leur étiologie est très majoritairement bactérienne, à l'inverse des endophtalmies chroniques, exclues des critères de sélection. Néanmoins, lors du premier

examen du patient à l'inclusion, l'hypothèse d'une inflammation intraoculaire postopératoire peut toujours être évoquée par principe, bien que cela ne change pas la prise en charge, étant donné que toute inflammation intraoculaire doit être traitée comme une endophtalmie jusqu'à preuve du contraire. Dans ces cas d'inflammation intraoculaire, il est impératif de différencier les causes infectieuses, de l'inflammation due au traumatisme de la chirurgie [53]. Parmi les causes courantes d'inflammation postopératoire, on retrouve les manipulations per-opératoires nombreuses, la conformation de l'implant, son matériau, le « toxic lens syndrom », et l'uvéite phacogénique. La détermination d'une endophtalmie infectieuse ou stérile dicte la prise en charge thérapeutique et le pronostic visuel final. La preuve d'une responsabilité bactérienne, ou infectieuse en général, est donc nécessaire dans les premières heures de la prise en charge [54]. Néanmoins, ce taux d'inflammation postopératoire par rapport à une endophtalmie documentée n'est pas chiffré.

L'âge des patients atteints de kératite infectieuse est conforme à la littérature : 56,6 ans ; 39 ans pour Bourcier [55] et 44 ans pour Kérautret [14]. Il en est de même pour les endophtalmies : 71,5 ans ; 69,2 dans la série de Chiquet [52].

Comme on pouvait s'y attendre, les patients atteints d'abcès de cornée sont donc plus jeunes que ceux ayant une endophtalmie.

5.2. LES GERMES RETROUVES

Notre étude sur les abcès de cornée montre que les *P. aeruginosa* et les SCN (dont *S. epidermidis*) sont les espèces les plus fréquentes, respectivement dans 33 % et 66 % des bactéries isolées. Ce taux de SCN très élevé suggère la possibilité d'une contamination du prélèvement par les bactéries de la flore commensale conjonctivale. Le *P. aeruginosa* correspond généralement à une infection bactérienne vraie et est largement incriminé dans les ports de lentilles de contact [56], mais ce critère n'a pas été étudié dans cette série dont le but est le diagnostic microbiologique sans considérer les facteurs de risque. Le taux de 33% de notre série est proche de celui de 28% avancé par Liessegang [20]. En général dans les abcès de cornée, un seul micro-organisme est responsable des lésions cornéennes, mais on retrouve une flore poly-microbienne dans 8 à 15% des prélèvements [23], essentiellement associée au port de lentille de contact [55]. L'éventualité d'un prélèvement poly-microbien peut amener à un résultat du séquençage du fragment obtenu par PCR ininterprétable. On retrouve dans notre série d'abcès de cornée, 3 prélèvements pour lesquels la culture est négative mais la 1^{ère}

PCR comme la PCR nichée retrouvent un fragment de taille attendue, de 1,5 kb et 492 pb respectivement (cas n° 7, 12, 13). Chacun de ces deux fragments n'a pas permis une identification, mais étant donné une positivité des deux PCR on peut supposer qu'il s'agit de prélèvements poly-microbiens, soit 12,5%.

Dans les endophtalmies incluses dans la série, et dont l'étiologie est strictement postopératoire, on a 8 SCN (50%) dont 7 *S. epidermidis*. On note également d'autres cocci à Gram positif (2 *S. aureus* et 1 *Staphylococcus sp.*, soit 18,7% et 5 Streptocoques, soit 31%). Il n'apparaît aucun germe à Gram négatif. Lorsque l'on compare ces chiffres à ceux avancés par Salvanet pour les endophtalmies toutes étiologies confondues [22], le taux de *S. epidermidis* est d'uniquement 28%, celui des *S. aureus* de 13% et celui des Streptocoques de 14%. L'ensemble des germes à Gram positifs représente 65%, le reste étant réparti entre les germes à Gram négatifs et les étiologies mycosiques. Ces chiffres sont éloignés de ceux de notre série car ils regroupent toutes les étiologies, quelles que soient les circonstances de survenue. D'après l'étude américaine EVS (*Endophthalmitis Vitrectomy Study*) pour les endophtalmies aiguës postopératoires de cataracte, il est retrouvé une prédominance de SCN (70%), d'autres cocci à Gram positif (24%, dont *S. aureus*, Streptocoques), puis des germes à Gram négatif (*Haemophilus influenzae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas*) [57, 58]. Enfin, en France, dans l'étude multicentrique du groupe FRIENDS, le pourcentage de staphylocoques à coagulase négative est moins élevé (47%), les autres cocci à Gram positif (comme les streptocoques) représentent 50% [59]. Notre série est donc tout à fait conforme à la littérature française.

5.3. LA SENSIBILITE DE LA CULTURE

Que ce soit pour les abcès de cornée ou les endophtalmies, tous prélèvements confondus, la culture a une sensibilité proche de 25% dans notre série. Si notre étude retrouve un taux de 75% de négatifs, c'est probablement le fait du manque de rigueur de notre part dans les prélèvements d'une part et du problème de double prélèvement d'autre part, la répartition entre les deux se faisant de manière aléatoire au laboratoire de bactériologie à la réception des échantillons.

Lorsqu'on reprend 2 études françaises, sur les kératites bactériennes, menées à l'hôpital des XV-XX [55] et au CHU de Bordeaux [14], le prélèvement cornéen a permis d'isoler une bactérie dans environ 50% des cas. Pour nos scarifications, elles sont déposées dans des tubes secs avant traitement par le laboratoire de bactériologie. Un prélèvement fait sur lame porte-

objet pour examen direct après coloration de Gram et un ensemencement direct à la lampe à fente apporteraient certainement un meilleur rendement. C'est d'ailleurs ce qui est décrit dans les séries publiées [14, 23, 55]. Si les prélèvements ne sont pas ensemencés immédiatement, les écouvillons peuvent être placés dans des milieux de transport (Portagerm,...). D'autre part, étant donné le nombre relativement restreint de bactéries responsables des abcès de cornée, il est peut-être possible de réduire le nombre de milieux de culture, pour les patients de nos consultations standards ; une demande spécifique pouvant être faite au laboratoire en cas d'abcès cornéen au retour d'une zone tropicale par exemple.

Dans les endophtalmies bactériennes aiguës postopératoires, la culture des prélèvements oculaires permet un résultat dans approximativement 22 à 30% des prélèvements d'humeur aqueuse [9, 60, 61]. Notre série fait état de 32% de cultures positives dans les prélèvements d'humeur aqueuse. Pour les prélèvements vitréens, les laboratoires s'accordent à faire état de 40 à 69% de positivité en culture [57, 61-65] ; notre série retrouve un taux radicalement plus faible, de 9%, mais notre série de prélèvements de vitré est particulièrement restreinte et non significative. Il est néanmoins légitime de remettre en cause notre technique de prélèvement vitréen. Nous n'avons réalisé que des prélèvements au vitréotome à travers une sclérotomie unique par une boutonnière conjonctivale. La ponction à l'aiguille sans anesthésie est reconnue pour avoir un bon rendement microbiologique sans induire significativement plus de complications que le prélèvement au vitréotome [57]. Pour ce qui est des prélèvements d'humeur aqueuse, la technique originelle a été décrite par Forster en 1974 [66] : après une incision cornéenne périphérique non perforante, on introduit une aiguille fine en prenant bien soin de ne pas léser l'endothélium et le cristallin ; le recueil de 0,1 à 0,2 ml d'humeur aqueuse est immédiatement ensemencé sur différents milieux de culture. C'est le protocole réalisé dans le service, hormis la mise en culture au lit du patient qui augmenterait encore peut être le taux de positifs dans les prélèvements d'humeur aqueuse.

Une autre raison à la négativité des cultures peut être liée au faible volume du prélèvement, la séquestration de la bactérie sur des surfaces solides (implant intraoculaire, capsule cristalliniennne, masses cristalliniennes restantes, germes enrobés d'un biofilm, fibrine et polysaccharides), par la compartimentation des milieux intraoculaires (connue en vitréen, due aux membranes en chambre antérieure), l'utilisation d'antibiotiques avant le prélèvement (topiques dans les abcès de cornée, intra-camérulaire en per-opératoire de chirurgie de cataracte) et le fait que l'ensemencement du 2^{ème} prélèvement a un inoculum plus faible.

Classiquement les cultures pour endophtalmies sont plus rentables sur prélèvements vitréens que sur humeurs aqueuses [25, 67, 68]. Un prélèvement vitréen est donc théoriquement mieux indiqué lorsqu'une endophtalmie est suspectée. Il est apparu que l'humeur aqueuse était plus à même à éliminer une infection que le vitré [69]. Néanmoins dans notre étude, le rendement des cultures est largement supérieur pour les humeurs aqueuses (32,14%) que vitrées (9,09%). Si on réalise des prélèvements d'humeur aqueuse systématiques en fin d'intervention pour un ensemble de patients aléatoires, la grande majorité des patients ne développent pas d'endophtalmie malgré la positivité des prélèvements, ce qui témoigne de la capacité des milieux intraoculaires à se débarrasser des germes [70]. Cette capacité est diminuée en cas d'immunodépression (diabète, corticothérapie).

Dans notre série d'abcès de cornée, l'antibiothérapie topique préalable au prélèvement ne semble pas influencer les résultats de la culture. Maske [71] a montré que les prélèvements se révèlent encore positifs dans un grand nombre de cas malgré l'antibiothérapie préalable. Même si elle n'est pas souhaitable, en aucun cas l'antibiothérapie préalable ne doit empêcher le prélèvement bactériologique. A l'inverse, pour Galentine [72], les résultats sont significativement compromis dans les cas où les patients ont reçu une antibiothérapie préalable.

5.4. INTERPRETATION DE LA PCR

L'intérêt de la PCR dans le diagnostic bactériologique des endophtalmies a été rapporté pour la première fois en ophtalmologie en 1994 [39] et en 1998 pour les abcès de cornée [23].

La PCR présente les avantages suivants : (i) technique adaptée pour les échantillons de faible volume, ce qui est souvent la règle en ophtalmologie, (ii) grande sensibilité avec la possibilité de détecter un nombre faible de copies d'ADN, (iii) excellente spécificité. De plus, la PCR universelle présente une approche large et unique pour toutes les bactéries et sans a priori du germe. Les inconvénients de la PCR sont les contaminations possibles à toutes les étapes, une interprétation qui requiert une confrontation clinique et microbiologique, et la difficulté d'identification des bactéries génétiquement proches. De plus, l'éventualité de prélèvements poly-bactériens peut être à l'origine de séquences nucléotidiques ininterprétables.

Le problème de l'identification des bactéries génétiquement proches a été soulevé pour les staphylocoques et les streptocoques. En effet, les résultats ont fait état de légères discordances

entre la culture et la biologie moléculaire. Mais cela ne concernait que des bactéries très proches, avec par exemple *S. mitis* et *S. pseudopneumoniae* de l'échantillon 51, *S. mitis* et *S. pneumoniae* de l'échantillon 52 et *S. epidermidis* et *S. capitis* de l'échantillon 63. Pour ces bactéries proches, l'ARN 16S n'est pas le plus discriminant. On peut donc considérer qu'il y a concordance.

Une PCR positive traduit la présence en quantité suffisante d'ADN cible dans l'échantillon ; mais son extrême sensibilité peut produire des faux-positifs en amplifiant l'ADN d'un agent contaminant qu'il soit viable ou pas.

Pour mémoire, un cas de faux-positifs a été rapporté par Sharma [73]: un certain nombre de préparations commercialisées de Taq Polymérase serait victime d'une contamination intrinsèque, à savoir l'ADN d'une bactérie inconnue, d'où l'intérêt d'utiliser une Taq traitée (8 methoxypsoralen + ultra-violet).

Un résultat négatif n'exclut pas un diagnostic d'origine infectieuse ; il faut tenir compte des limites de sensibilité des PCR en général et des PCR pan-bactériennes par rapport à des PCR spécifiques qui seraient effectuées à l'aide d'amorces ciblant une séquence connue pour une espèce bactérienne suspectée.

Le coût élevé de la PCR, un technicien formé et le temps nécessaire à la réalisation obligent bien souvent à ne réaliser cette technique en routine que dans certaines indications bien définies et dans des unités de recherche. La PCR nichée en augmente encore le coût.

Se sont présentés lors de l'analyse des résultats, des situations où la PCR grand fragment était positive et permettait une identification, alors que la PCR nichée était négative. Ces configurations ne sont pas logiques et donc difficiles à interpréter malgré leur légitimité. Peut être qu'une quantité trop importante d'ADN a faussé les résultats de la PCR nichée en « inhibant » la réaction. Les résultats de ces prélèvements restent pour nous actuellement un mystère, car par manque de matériel et de temps, nous n'avons pas poussé plus avant les investigations.

Malgré les difficultés d'interprétation que nous avons rencontrées, la PCR semble apporter une plus grande sensibilité au diagnostic bactériologique des endophtalmies en particulier, quand toutefois elle est couplée à la culture, ce qui est moins le cas pour les abcès de cornée. Nous avons néanmoins été confrontés à un biais, le partage aléatoire des deux prélèvements initiaux.

6. CONCLUSION

Nous avons émis l'hypothèse que l'utilisation de l'amplification par PCR avec séquençage du fragment obtenu, interne au gène codant l'ARN 16S ribosomal pouvait augmenter la sensibilité du diagnostic bactériologique des abcès de cornée et des endophtalmies. La comparaison des résultats à ceux de la culture standard a montré qu'il s'agissait d'une technique sensible pour la détection d'ADN pathogène, et que l'association des deux techniques était plus efficace. Il est probable que cette association appliquée aux techniques de routine du diagnostic des endophtalmies et abcès de cornée permette de modifier la prise en charge des patients atteints de ces infections graves. L'avantage non négligeable de la PCR est sa rapidité d'obtention. Néanmoins, son coût reste un frein à son expansion et les risques de contaminations doivent être considérés et faire l'objet d'un soin attentif. Cette technique reste à être validée en pratique clinique de routine, notamment pour les cas difficiles : endophtalmies chroniques, inflammations du segment postérieur non étiquetées, suspicion de germes non cultivables, et en mycologie où les délais de culture sont très longs. En aucun cas la biologie moléculaire ne permet de s'affranchir des cultures qui lorsqu'elles sont positives permettent de réaliser un antibiogramme et également de déterminer les sensibilités aux antibiotiques.

A l'avenir, il serait intéressant de renouveler l'expérience à partir d'un seul et même prélèvement mis directement dans un bouillon d'enrichissement au lit du patient.

7. BIBLIOGRAPHIE

1. Bourcier, T., Chaumeil, Ch., Borderie, V., Laroche, L., *Infections cornéennes. Diagnostic et traitement*. 2004.
2. O'Brien, T.P., et al., *Efficacy of ofloxacin vs cefazolin and tobramycin in the therapy for bacterial keratitis. Report from the Bacterial Keratitis Study Research Group*. Arch Ophthalmol, 1995. **113**(10): p. 1257-65.
3. Axenfeld, T., *The bacteriology of the eye*. 1908. **95**.
4. Berler, D.K., *Endophthalmitis in 10 032 cataract operations*. J. Ocul. Ther. Surg., 1982.
5. Jaffe, N.S., *Endophthalmitis - In: cataract surgery and its complications, 3th edition*. N.S. Jaffe, C.V. Mosby, St Louis, 1981.
6. Allen, H.F., *Symposium post-operative endophthalmitis. Introduction: incidence and etiology*. Ophthalmology, 1978.
7. Javitt, J.C., et al., *National outcomes of cataract extraction. Endophthalmitis following inpatient surgery*. Arch Ophthalmol, 1991. **109**(8): p. 1085-9.
8. Kattan, H.M., et al., *Nosocomial endophthalmitis survey. Current incidence of infection after intraocular surgery*. Ophthalmology, 1991. **98**(2): p. 227-38.
9. Fisch, A., et al., *Epidemiology of infective endophthalmitis in France. The French Collaborative Study Group on Endophthalmitis*. Lancet, 1991. **338**(8779): p. 1373-6.
10. Cohen, S.M., et al., *Endophthalmitis after pars plana vitrectomy. The Postvitrectomy Endophthalmitis Study Group*. Ophthalmology, 1995. **102**(5): p. 705-12.
11. Wilhelmus, K.R., *The red eye. Infectious conjunctivitis, keratitis, endophthalmitis, and periocular cellulitis*. Infect Dis Clin North Am, 1988. **2**(1): p. 99-116.
12. Wilhelmus, K.R., *Bacterial keratitis*. J.S. Pepose, G.N Holland, and K.R. Wilhelmus (ed.), Ocular infection and immunity. Mosby Year Book Inc., St-Louis, Mo, 1996. **p. 970-1031**.
13. Arlo, C.T., *Bacterial keratitis: preferred practice pattern*. Program and abstracts of the Annual Meeting fo the American Academy fo Ophthalmology, 1995. **p.321**.
14. Kerautret, J., L. Raobela, and J. Colin, [*Serious bacterial keratitis: a retrospective clinical and microbiological study*]. J Fr Ophtalmol, 2006. **29**(8): p. 883-8.
15. Bharathi, M.J., et al., *Microbial keratitis in South India: influence of risk factors, climate, and geographical variation*. Ophthalmic Epidemiol, 2007. **14**(2): p. 61-9.
16. Theodore, F.H., *Bacterial Endophthalmitis After Cataract Surgery*. Int Ophthalmol Clin, 1964. **4**: p. 839-59.
17. Royer, J., *Prophylaxie des infections oculaires post-opératoires*. Ann. Ther. Clin. Ophtalmol., 1971: p. 22, 359-370.
18. Herman, P.E., *General principes of antimicrobial therapy*. Mayo Clin. Proc., 1977: p. 52-603.
19. Jones, D.B., *Early diagnosis and therapy of bacterial corneal ulcers*. Int Ophthalmol Clin, 1973. **13**(4): p. 1-29.

20. Liesegang, T.J. and R.K. Forster, *Spectrum of microbial keratitis in South Florida*. Am J Ophthalmol, 1980. **90**(1): p. 38-47.
21. Grayson, M., *Diseases of the cornea*. The C.V.Mosby Co., St-Louis, 1979. **552p**.
22. Salvagnet-Bouccara, A., et al., [*Bacterial endophthalmitis. Ophthalmological results of a national multicenter prospective survey*]. J Fr Ophtalmol, 1992. **15**(12): p. 669-78.
23. Knox, C.M., V. Cevallos, and D. Dean, *16S ribosomal DNA typing for identification of pathogens in patients with bacterial keratitis*. J Clin Microbiol, 1998. **36**(12): p. 3492-6.
24. Bohigian, G.M. and R.J. Olk, *Factors associated with a poor visual result in endophthalmitis*. Am J Ophthalmol, 1986. **101**(3): p. 332-41.
25. Rowsey, J.J., et al., *Endophthalmitis: current approaches*. Ophthalmology, 1982. **89**(9): p. 1055-66.
26. Therese, K.L., A.R. Anand, and H.N. Madhavan, *Polymerase chain reaction in the diagnosis of bacterial endophthalmitis*. Br J Ophthalmol, 1998. **82**(9): p. 1078-82.
27. Adenis, J.P., Denis F. et coll., *L'endophthalmie. Pénétration intra-oculaire des agents antimicrobiens*. 1988. **1 volume**.
28. Adenis, J.P., Denis F. et coll., *Infections et inflammations du segment antérieur de l'oeil*. 1989. **1 volume**.
29. Battelier, L., *Examen biologique des liquides de vitrectomie*. Rev. Frcse. Labo., 1990.
30. Liotet, S., *Intérêt de l'étude des liquides de vitrectomie*. Rev. Frcse. Labo., 1990.
31. Liotet, S., Morin, Y., *Guide pratique des examens de laboratoire en ophtalmologie*. 1988.
32. Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986. **51 Pt 1**: p. 263-73.
33. Saiki, R.K., et al., *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. Science, 1985. **230**(4732): p. 1350-4.
34. Evers, S., et al., *Evolution of structure and substrate specificity in D-alanine:D-alanine ligases and related enzymes*. J Mol Evol, 1996. **42**(6): p. 706-12.
35. Kawase, Y., et al., *Studies on nucleic acid interactions. I. Stabilities of mini-duplexes (dG2A4XA4G2-dC2T4YT4C2) and self-complementary d(GGGAAXYTTCCC) containing deoxyinosine and other mismatched bases*. Nucleic Acids Res, 1986. **14**(19): p. 7727-36.
36. Chen, K., et al., *Broad range DNA probes for detecting and amplifying eubacterial nucleic acids*. FEMS Microbiol Lett, 1989. **48**(1): p. 19-24.
37. Weisburg, W.G., et al., *16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study*. J Bacteriol, 1991. **173**(2): p. 697-703.
38. Relman, D.A., *The identification of uncultured microbial pathogens*. J. Infect. Dis., 1993. **168**: p. 1-8.
39. Hykin, P.G., et al., *The diagnosis of delayed post-operative endophthalmitis by polymerase chain reaction of bacterial DNA in vitreous samples*. J Med Microbiol, 1994. **40**(6): p. 408-15.
40. Cunningham, E.T., Jr., et al., *Acquired immunodeficiency syndrome--associated herpes simplex virus retinitis. Clinical description and use of a polymerase chain reaction--based assay as a diagnostic tool*. Arch Ophthalmol, 1996. **114**(7): p. 834-40.

41. Knox, C.M., et al., *Polymerase chain reaction-based assays of vitreous samples for the diagnosis of viral retinitis. Use in diagnostic dilemmas.* Ophthalmology, 1998. **105**(1): p. 37-44; discussion 44-5.
42. McCann, J.D., et al., *A sensitive and specific polymerase chain reaction-based assay for the diagnosis of cytomegalovirus retinitis.* Am J Ophthalmol, 1995. **120**(2): p. 219-26.
43. Short, G.A., et al., *A polymerase chain reaction-based assay for diagnosing varicella-zoster virus retinitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome.* Am J Ophthalmol, 1997. **123**(2): p. 157-64.
44. Jalava, J., et al., *Bacterial 16S rDNA polymerase chain reaction in the detection of intra-amniotic infection.* Br J Obstet Gynaecol, 1996. **103**(7): p. 664-9.
45. McCabe, K.M., et al., *Amplification of bacterial DNA using highly conserved sequences: automated analysis and potential for molecular triage of sepsis.* Pediatrics, 1995. **95**(2): p. 165-9.
46. Lohmann, C.P., H.J. Linde, and U. Reischl, *Improved detection of microorganisms by polymerase chain reaction in delayed endophthalmitis after cataract surgery.* Ophthalmology, 2000. **107**(6): p. 1047-51; discussion 1051-2.
47. Rudolph, T., et al., *16S rDNA PCR analysis of infectious keratitis: a case series.* Acta Ophthalmol Scand, 2004. **82**(4): p. 463-7.
48. Chiquet, C., Benito Y., Croize J., Romanet J-P., Vandenesch F., Maurin M., *Diagnostic microbiologique des endophtalmies aiguës.* JFO, 2007. **30**(10): p. 1049-1059
49. Lohmann, C.P., et al., *Diagnosis of infectious endophthalmitis after cataract surgery by polymerase chain reaction.* J Cataract Refract Surg, 1998. **24**(6): p. 821-6.
50. Okhravi, N., et al., *PCR-based evidence of bacterial involvement in eyes with suspected intraocular infection.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000. **41**(11): p. 3474-9.
51. Anand, A.R., H.N. Madhavan, and K.L. Therese, *Use of polymerase chain reaction (PCR) and DNA probe hybridization to determine the Gram reaction of the infecting bacterium in the intraocular fluids of patients with endophthalmitis.* J Infect, 2000. **41**(3): p. 221-6.
52. Chiquet, C., et al., *Polymerase chain reaction identification in aqueous humor of patients with postoperative endophthalmitis.* J Cataract Refract Surg, 2007. **33**(4): p. 635-41.
53. Forster, R.K., *Endophthalmitis. Diagnostic cultures and visual results.* Arch Ophthalmol, 1974. **92**(5): p. 387-92.
54. Okhravi, N., P. Adamson, and S. Lightman, *Use of PCR in endophthalmitis.* Ocul Immunol Inflamm, 2000. **8**(3): p. 189-200.
55. Bourcier, T., et al., *Bacterial keratitis: predisposing factors, clinical and microbiological review of 300 cases.* Br J Ophthalmol, 2003. **87**(7): p. 834-8.
56. Liesegang, T.J., *Contact lens-related microbial keratitis: Part I: Epidemiology.* Cornea, 1997. **16**(2): p. 125-31.
57. Han, D.P., et al., *Microbiologic yields and complication rates of vitreous needle aspiration versus mechanized vitreous biopsy in the Endophthalmitis Vitrectomy Study.* Retina, 1999. **19**(2): p. 98-102.
58. Irvine, W.D., et al., *Endophthalmitis caused by gram-negative organisms.* Arch Ophthalmol, 1992. **110**(10): p. 1450-4.
59. Chiquet C., L.P., Benito Y., Cornut PL., Palombi K., Thuret G., et al. , *Bacterial identification using PCR in a large series of acute post-cataract endophthalmitis.* In : ARVO meeting. 2006: p. # 5295; 2006; Fort Lauderdale, USA; 2006.

60. *Results of the Endophthalmitis Vitrectomy Study. A randomized trial of immediate vitrectomy and of intravenous antibiotics for the treatment of postoperative bacterial endophthalmitis. Endophthalmitis Vitrectomy Study Group.* Arch Ophthalmol, 1995. **113**(12): p. 1479-96.
61. Ng, J.Q., et al., *Management and outcomes of postoperative endophthalmitis since the endophthalmitis vitrectomy study: the Endophthalmitis Population Study of Western Australia (EPSWA)'s fifth report.* Ophthalmology, 2005. **112**(7): p. 1199-206.
62. *Microbiologic factors and visual outcome in the endophthalmitis vitrectomy study.* Am J Ophthalmol, 1996. **122**(6): p. 830-46.
63. Donahue, S.P., et al., *Vitreous cultures in suspected endophthalmitis. Biopsy or vitrectomy?* Ophthalmology, 1993. **100**(4): p. 452-5.
64. Kunimoto, D.Y., et al., *Microbiologic spectrum and susceptibility of isolates: part I. Postoperative endophthalmitis. Endophthalmitis Research Group.* Am J Ophthalmol, 1999. **128**(2): p. 240-2.
65. Sharma, S., et al., *Sensitivity and predictability of vitreous cytology, biopsy, and membrane filter culture in endophthalmitis.* Retina, 1996. **16**(6): p. 525-9.
66. Forster, R.K., *Etiology and diagnosis of bacterial postoperative endophthalmitis.* Ophthalmology, 1978. **85**(4): p. 320-6.
67. Barza, M., et al., *Evaluation of microbiological diagnostic techniques in postoperative endophthalmitis in the Endophthalmitis Vitrectomy Study.* Arch Ophthalmol, 1997. **115**(9): p. 1142-50.
68. Puliafito, C.A., et al., *Infectious endophthalmitis. Review of 36 cases.* Ophthalmology, 1982. **89**(8): p. 921-9.
69. Maylath, F.R. and I.H. Leopold, *Study of experimental intraocular infection. I. The recoverability of organisms inoculated into ocular tissues and fluids. II. The influence of antibiotics and cortisone, alone and combined, on intraocular growth of these organisms.* Am J Ophthalmol, 1955. **40**(1): p. 86-101.
70. Brasseur, G., *Pathologie du vitré.* Rapport de la Société Française d'Ophtalmologie, 2003: p. 330-337.
71. Maske, R., J.C. Hill, and S.P. Oliver, *Management of bacterial corneal ulcers.* Br J Ophthalmol, 1986. **70**(3): p. 199-201.
72. Galentine, P.G., et al., *Corneal ulcers associated with contact lens wear.* Arch Ophthalmol, 1984. **102**(6): p. 891-4.
73. Sharma, S., et al., *Reliability of nested polymerase chain reaction in the diagnosis of bacterial endophthalmitis.* Am J Ophthalmol, 2002. **133**(1): p. 142-4.

TABLE DES MATIÈRES

1. INTRODUCTION	14
2. GENERALITES	15
2.1. LES ABCES DE CORNEE	15
2.1.1. LA CLINIQUE	15
2.1.2. LES FACTEURS DE RISQUE	16
2.2. LES ENDOPHTALMIES	18
2.2.1. LA CLINIQUE	18
2.2.2. FACTEURS DE RISQUE	19
2.3. LES ETIOLOGIES BACTERIENNES	19
2.3.1. DES ABCES DE CORNEE	19
2.3.2. DES ENDOPHTALMIES	20
2.4. DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE USUEL	22
2.5. LA PCR	23
2.5.1. PRINCIPE	23
2.5.2. AVANTAGES ET INCONVENIENTS	23
2.5.3. OPTIMISATION DES CONDITIONS DE PCR	25
2.5.4. CHOIX DES AMORCES	26
2.5.5. LA PCR UNIVERSELLE	27
2.5.6. LA PCR NICHEE	28
2.6. DIAGNOSTIC DES INFECTIONS OCULAIRES PAR PCR	29
3. MATERIEL ET METHODE	32
3.1. LES PATIENTS	32
3.2. LA COLLECTE DES PRELEVEMENTS	32
3.2.1. POUR LES ABCES DE CORNEE	32
3.2.2. POUR LES ENDOPHTALMIES	33
3.3. LE DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE USUEL	33
3.4. LA BIOLOGIE MOLECULAIRE	34
3.4.1. L'EXTRACTION DE L'ADN	34
3.4.2. LA PCR	34
○ Le choix des amorces	34
○ Le bloc PCR	35
○ La première PCR	35
○ La PCR nichée (interne)	36
3.4.3. ANALYSE DES PRODUITS D'AMPLIFICATION SUR GEL	37
3.4.4. SEQUENÇAGE ET IDENTIFICATION	37
3.5. LA RECHERCHE D'INHIBITEURS DE PCR	38
3.6. L'EVALUATION	39
4. RESULTATS	40
4.1. POPULATION	42
4.2. SPECIFICITE DE LA PCR UNIVERSELLE	42

4.3. RESULTATS GLOBAUX	42
4.3.1. RESULTATS DES CULTURES BACTERIENNES	42
4.3.2. LES PCRS	43
○ La première PCR (grand fragment).....	43
○ La PCR nichée (petit fragment)	44
4.3.3. LE SEQUENÇAGE	46
4.3.4. RECAPITULATIF	46
4.4. DETAILS DES RESULTATS PAR PATHOLOGIES	47
4.4.1. LES ABCES DE CORNEE.....	47
4.4.2. LES ENDOPHTALMIES.....	48
○ Humeurs aqueuses.....	48
○ Humeurs vitrées.....	49
4.5. RESULTATS DE LA RECHERCHE D'INHIBITEURS	49
<u>5. DISCUSSION.....</u>	<u>51</u>
5.1. LA POPULATION	51
5.2. LES GERMES RETROUVES.....	52
5.3. LA SENSIBILITE DE LA CULTURE	53
5.4. INTERPRETATION DE LA PCR.....	55
<u>6. CONCLUSION.....</u>	<u>57</u>
<u>7. BIBLIOGRAPHIE</u>	<u>58</u>

SERMENT D'HIPPOCRATE

*En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle
aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.*

*Je dispenserai mes soins sans distinction de race, de religion d'idéologie ou de situation
sociale.*

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

*Je serai reconnaissant envers mes maîtres, et solidaire moralement de mes confrères.
Conscient de mes responsabilités envers les patients, je continuerai à poursuivre mon savoir.*

*Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir de l'estime des
hommes et de mes condisciples, si je le viole et que je me parjure, puisse-je avoir un sort
contraire.*

TITRE – Etude de l'apport de la PCR dans le diagnostic bactériologique des abcès de cornée et des endophtalmies.

RESUME :

L'identification des agents pathogènes responsables des abcès de cornée et des endophtalmies pose le problème d'un grand nombre de faux négatifs avec les techniques diagnostiques standards. Cette étude a été menée afin de déterminer si l'amplification de l'ARN 16S et l'identification bactérienne à partir des produits obtenus apportent un bénéfice à la culture pour détecter les bactéries responsables de ces deux pathologies. Cette étude prospective, comparative, regroupe 63 prélèvements réalisés en double exemplaires : un pour la culture, l'autre pour la biologie moléculaire. Un fragment d'ARN 16S a d'abord été amplifié par une première PCR universelle, puis par PCR nichée. Les amplicons de chacune des PCR ont été séquencés afin de permettre les identifications des agents pathogènes. L'amplification d'un fragment de gène de l'ARN 16S par PCR nichée est une méthode rapide, fiable et reproductible de biologie moléculaire. Associée à la culture, elle augmente la sensibilité des résultats pour les prélèvements d'ophtalmologie dont l'inoculum est de faible quantité et fragile. Notre étude suggère que, si l'association de la PCR aux techniques conventionnelles de microbiologie augmente la sensibilité, elle ne peut en aucun cas remplacer la culture.

TITLE – Interest of PCR in bacterial diagnosis of bacterial keratitis and endophthalmitis.

ABSTRACT :

Microbiological investigations often fail to detect the infecting agent in bacterial keratitis and endophthalmitis which are frequent in current practice. Our study was designed to evaluate the contribution of 16S RNA amplification using polymerase chain reaction (PCR) and nested PCR, when compared to culture, in the diagnosis of bacterial keratitis and endophthalmitis. In this prospective comparative study, we included 63 patients. For every patient, two samples were taken: one for bacterial culture, the other for PCR. PCR and nested PCR 16S rRNA were performed using universal primers for eubacterial genome, and the amplicons were thereafter sequenced. 16S rRNA PCR is a rapid alternative to culture, sensitive and repeatable. But it should be considered as a supplement to standard microbiological procedures. PCR associated to culture is more efficient.

MOTS-CLES : kératites bactériennes, endophtalmie, PCR nichée, ADN 16S ribosomal, microbiologie

KEY-WORDS: Bacterial keratitis, endophthalmitis, nested PCR, 16S rRNA, bacterial culture

OPHTALMOLOGIE