

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

FACULTÉ DE PHARMACIE

\*\*\*\*\*

ANNEE 2011

THESE N°

**ÉTUDE OBSERVATIONNELLE DE LA CONTAMINATION  
BACTÉRIENNE DES GREFFONS CORNÉENS PRÉLEVÉS  
AU CHU DE LIMOGES**

**MÉMOIRE DU  
DIPLOME D'ÉTUDES SPECIALISÉES DE BIOLOGIE MÉDICALE**

TENANT LIEU DE

**THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

présentée et soutenue publiquement

le 14 juin 2011

par

**Aurélie DUBOIS**

née le 30 Juin 1984, à Cambrai (59)

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

Madame le Professeur Sylvie ROGEZ ..... Président  
Monsieur le Professeur Gilles DREYFUSS ..... Juge  
Monsieur le Professeur Pierre-Yves ROBERT ..... Juge  
Madame le Docteur Jeanne MOREAU ..... Juge  
Madame le Professeur Marie-Cécile PLOY ..... Membre invité  
Monsieur le Docteur Fabien GARNIER ..... Membre invité

Université de Limoges  
FACULTE DE PHARMACIE

**DOYEN DE LA FACULTE** Monsieur le Professeur Jean-Luc **DUROUX**  
**1<sup>er</sup> VICE-DOYEN** Madame Catherine **FAGNERE**, Maître de Conférences  
**2<sup>ème</sup> VICE-DOYEN** Monsieur Serge **BATTU**, Maître de Conférences

**PROFESSEURS**

<b>BENEYTOUT</b> Jean-Louis	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>BOTINEAU</b> Michel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
<b>BROSSARD</b> Claude	PHARMACOTECHNIE
<b>BUXERAUD</b> Jacques	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
<b>CARDOT</b> Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>CHULIA</b> Albert	PHARMACOGNOSIE
<b>CHULIA</b> Dominique	PHARMACOTECHNIE
<b>DELAGE</b> Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
<b>DESMOULIERE</b> Alexis	PHYSIOLOGIE
<b>DREYFUSS</b> Gilles	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
<b>DUROUX</b> Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
<b>LOUDART</b> Nicole	PHARMACOLOGIE

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES**

<b>LACHATRE</b> Gérard	TOXICOLOGIE
<b>MOESCH</b> Christian	HYGIENE HYDROLOGIE ENVIRONNEMENT
<b>ROGEZ</b> Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE

**MAITRES DE CONFERENCES**

<b>BASLY</b> Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>BATTU</b> Serge	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>BEAUBRUN-GIRY</b> Karine	PHARMACOTECHNIE

<b>BILLET</b> Fabrice	PHYSIOLOGIE
<b>CALLISTE</b> Claude	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
<b>CLEDAT</b> Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>COMBY</b> Francis	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
<b>COURTIOUX</b> Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE
<b>DELEBASSEE</b> Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
<b>DEMIOT</b> Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
<b>FAGNERE</b> Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
<b>FROISSARD</b> Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
<b>JAMBUT</b> Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
<b>LABROUSSE</b> Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
<b>LEGER</b> David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>LIAGRE</b> Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>LOTFI</b> Hayat	TOXICOLOGIE
<b>MARION-THORE</b> Sandrine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
<b>MARRE-FOURNIER</b> Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>MILLOT</b> Marion	PHARMACOGNOSIE
<b>MOREAU</b> Jeanne	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
<b>POUCET</b> Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE BIOPHYSIQUE,
<b>ROUSSEAU</b> Annick	BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
<b>SIMON</b> Alain	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
<b>TROUILLAS</b> Patrick	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
<b>VIANA</b> Marylène	PHARMACOTECHNIE
<b>VIGNOLES</b> Philippe	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE

**MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES**

<b>DREYFUSS</b> Marie-Françoise	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
---------------------------------	-----------------------------------

**PROFESSEUR CERTIFIE**

<b>MARBOUTY</b> Jean-Michel	ANGLAIS
-----------------------------	---------

## Remerciements

---

À **Madame le Professeur Sylvie Rogez**, Professeur des Universités de Bactériologie-Virologie-Hygiène, Biologiste des Hôpitaux, Praticien Hospitalier, de l'honneur que vous me faites de présider ce jury. Vos compétences en Virologie et votre implication pour les internes de Biologie Médicale m'ont beaucoup apporté. Veuillez trouver ici l'expression de tout mon respect.

À **Monsieur le Professeur Gilles Dreyfuss**, Professeur des Universités de Parasitologie-Mycologie, d'avoir accepté de juger ce travail sans hésitation. J'ai assisté avec plaisir durant mon cursus d'interne à certains de vos enseignements en Parasitologie. Veuillez trouver ici toute ma considération.

À **Madame le Docteur Jeanne Moreau**, Maître de conférences des Universités d'Immunologie, d'avoir accepté de juger ce travail sans me connaître. J'ai apprécié votre abord facile et la spontanéité avec laquelle vous m'avez reçue. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de ma sincère reconnaissance.

À **Monsieur le Professeur Pierre-Yves Robert**, Professeur des Universités d'Ophtalmologie, Ophtalmologiste des Hôpitaux, Praticien Hospitalier, de m'avoir fait confiance afin de mener à terme ce projet. Votre disponibilité et votre sympathie m'ont beaucoup touchée. Veuillez recevoir ici l'expression de toute ma gratitude.

À **Madame le Professeur Marie-Cécile Ploy**, Professeur des Universités de Bactériologie-Virologie-Hygiène, Biologiste des Hôpitaux, Chef de service, de l'honneur que vous me faites de siéger à ce jury. Vos compétences, vos conseils et la confiance que vous m'avez accordée ont largement contribué à ma formation. Mes passages dans votre service furent de très bons moments. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de ma sincère admiration.

À **Monsieur le Docteur Fabien Garnier**, Bactériologie-Virologie-Hygiène, Biologiste des Hôpitaux, Praticien Hospitalier, d'avoir accepté de diriger cette thèse. Ta disponibilité et ton soutien m'ont beaucoup apporté. Tu as su m'assister et guider ce travail avec rigueur mais aussi beaucoup de sympathie, ce fût un réel plaisir de travailler avec toi. Trouve en cette thèse l'expression de ma sincère reconnaissance.

## **À l'ensemble des personnes ayant contribué à ce travail,**

À Monsieur le Docteur Nicolas Pichon, médecin réanimateur, responsable de la Coordination Hospitalière des Prélèvements d'Organes et de Tissus (CHPOT), et aux infirmières coordinatrices sans qui ce travail n'aurait pu exister.

Aux internes du service d'Ophtalmologie du CHU de Limoges, préleveurs des greffons cornéens, ainsi qu'au Docteur Salomon de la Clinique Chénieux de Limoges pour leur participation au projet.

Au personnel de la banque de tissus du Limousin, Madame le Docteur Marie-Claire Roussanne ainsi que les techniciennes que je remercie pour leur disponibilité et leur sympathie lors de nos nombreux échanges. Au personnel de la banque de tissus d'Aquitaine, arrivé dans un second temps sur ce projet.

À Delphine Chainier et Julie Vignaud, formidable équipe de la recherche clinique du laboratoire de Bactériologie, pour m'avoir épaulée tout au long de ce projet. Cela n'a pas été facile tous les jours mais je n'ose imaginer ce que ça aurait été sans vous.

Au Docteur Olivier Barraud, pour ta disponibilité en toutes circonstances et tes explications sur les intégrons et la triplex.

À l'équipe de biologie moléculaire du laboratoire de Bactériologie pour m'avoir formée à la biologie moléculaire appliquée à la Bactériologie et pour votre aide lors de mes manipulations.

À toutes les techniciennes (et au technicien) de Bactériologie, qui ont eu à se frotter de près ou de loin au protocole DOCO. Je sais que ce projet vous a effrayé et vous effraye encore mais vous avez toujours fait au mieux afin de m'aider.

Aux membres de l'équipe d'accueil EA 3175 pour leur gentillesse.

À Marie-Claire Baclet pour ses précieux conseils en biologie moléculaire.

Au Docteur Jean-Baptiste Woillard pour m'avoir éclairée sur l'utilisation des statistiques.

## **À l'ensemble des personnes ayant contribué à ma formation,**

### À Amiens

À Gilles Duverlie, Catherine François, Carole Fournier, Sandrine Castelain, et toute l'équipe de recherche du laboratoire de virologie du CHU d'Amiens présente lors de mon passage : Agnès, Catherine, Noémie, Véronique et Virginie, pour mon année d'initiation à la recherche et à la microbiologie, ma dernière à Amiens, qui n'aurait pas pu mieux se dérouler.

### À Cahors

À l'ensemble des biologistes et du personnel du laboratoire de Biologie Médicale du CH de Cahors, pour votre accueil très chaleureux pour ce stage qui représente la dernière ligne droite de ma formation. Un merci particulier à Nathalie pour la relecture de ce travail.

### À Limoges

Aux biologistes du laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène du CHU de Limoges non cités précédemment : Monsieur Denis, pour vos enseignements passionnés et passionnants, Nadia Hidri, Christian Martin, Sophie Alain, Sébastien Hantz, Valérie Marczuk et Marcelle Mounier, pour votre sympathie, votre formation et la confiance que vous m'avez accordée.

Aux biologistes des autres laboratoires du CHU de Limoges notamment Marie-Laure Dardé et Bernard Bouteille au laboratoire de Parasitologie-Mycologie ; Franck Trimoreau, Elise Frébet, Magali Donnard et Jean Feuillard au laboratoire d'Hématologie ; Corinne Magdelaine au laboratoire de Biochimie.

À tous les techniciens de ces différents laboratoires, notamment ceux de Bactériologie-Virologie-Hygiène et de Parasitologie-Mycologie, pour tous les bons moments passés avec vous au cours de mes multiples passages, mais aussi les techniciens d'Hématologie et de Biochimie. Vous avez tous contribué à ma formation et je vous en remercie. Une petite pensée également pour les secrétaires.

À tous mes co-internes, en particulier ceux qui me feront revenir dans le Limousin : Axel, Elodie, Hélène et Nathalie mais aussi Pamela, Stéphanie, Clothilde, Jean-Philippe, Vincent, Albertine, François, Chloé, Laura, Laurie, Pauline, Marc, Dominique, Ana, Céline, Fanny, Jasmine, Jennifer et Laure. Si j'ai tant apprécié mon internat à Limoges c'est en en grosse partie grâce à vous et je voulais vous remercier pour tous les bons moments passés ensemble.

**Aux personnes qui me sont chères,**

À ma famille, grands-parents, oncles et tantes, cousins qui vont arrêter de me demander quand est-ce que je finis mes études.

À mes beaux-parents et ma belle-sœur, la meilleure belle-famille qu'on puisse avoir.

À mes amis, d'hier et d'aujourd'hui, ceux qui me donnent tant envie de me rapprocher de la Picardie et qui ont suivi mon aventure limougeaude.

---

À mes parents, que je ne pourrai jamais assez remercier. Vous avez tout fait pour que je sois la plus heureuse et la plus épanouie possible. Je vous dédie cette thèse qui clôture mes longues années d'étude et signe mon futur rapprochement. Je voulais que vous sachiez à quel point vous comptez pour moi. Maman, merci beaucoup pour ton travail de relecture.

---

À Benoit, ma moitié. Pour ta tendresse, ta patience et tous les sacrifices que je t'ai fait faire au cours des ces années d'études, et surtout pour ton attitude attentionnée au cours de ces derniers mois où je n'ai pas dû être facile à vivre tous les jours. A notre futur, qu'il soit aussi heureux que tous nos moments passés ensemble. Avec tout mon amour.

# Sommaire

---

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>10</b>
<b>I. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>11</b>
A. GREFFE DE CORNÉE .....	11
B. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION DU GREFFON .....	18
C. CONTAMINATION BACTÉRIOLOGIQUE DES GREFFONS .....	23
D. DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE EN OPHTALMOLOGIE.....	32
E. RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES.....	41
<b>II. INTRODUCTION À L'ÉTUDE EXPÉRIMENTALE.....</b>	<b>51</b>
<b>III. MATÉRIELS ET MÉTHODES .....</b>	<b>53</b>
<b>IV. RÉSULTATS.....</b>	<b>63</b>
<b>V. DISCUSSION.....</b>	<b>85</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>93</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>94</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>103</b>
<b>TABLES.....</b>	<b>118</b>
<b>SERMENT DE GALIEN.....</b>	<b>125</b>



## Glossaire

---

### A. Anglicismes

*quencher* fluorophore extincteur

### B. Abréviations

A	adénine
ADN	acide désoxyribonucléique
AFSSAPS	Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
ATP	adénosine tri phosphate
BET	bromure d'éthidium
BHI	<i>brain heart infusion</i>
BLSE	$\beta$ -lactamase à spectre étendu
BMR	bactérie multirésistante
C	cytosine
CHU	Centre hospitalo-universitaire
CMI	concentration minimale inhibitrice
ddNTP	didéoxyribonucléotide
dNTP	désoxyribonucléotide
ERG	entérocoque résistant aux glycopeptides
G	guanine
HTLV	virus T-lymphotropique humain
mL	millilitre
mM	millimolaire
NAD	nicotinamide adénine dinucléotide
OR	odd ratio
pb	paires de bases
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PLP	protéine liant les pénicillines
QSP	quantité suffisante pour
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
SCN	staphylocoque à coagulase négative
T	tyrosine
UV	ultra-violet
VHB	virus de l'hépatite B
VIH	virus de l'immunodéficience humaine

## Introduction

---

La greffe de cornée ou kératoplastie est la plus fréquente et la plus ancienne des greffes de tissu réalisée chez l'homme (1887 – Von Hippel) (20). En 2009 en France, sur 4416 nouveaux inscrits en attente d'une greffe de cornée, 66% de ces patients ont pu bénéficier d'une greffe dans l'année. Le nombre total de patients en attente de greffe diminue d'année en année traduisant une relative autosuffisance des greffons à l'échelon national (4).

Le nombre de cornées reçues en 2009 par les banques de tissus, en charge de la conservation des greffons, se chiffre à 8880. En revanche, le taux d'élimination a très légèrement augmenté par rapport à l'année 2008, atteignant 51,5% (+ 0,5% en 2009 soit 90 cornées rejetées de plus). Un certain nombre de ces cornées est rejeté pour raison bactériologique malgré les antibiotiques présents dans les milieux de conservation (4) .

La greffe de cornée, comme toute greffe, expose à un risque de contamination bactérienne du donneur vers le receveur susceptible d'entraîner une endophtalmie, infection rare mais grave. Des études ont montré que la colonisation des cornées, bien que n'ayant que très peu d'incidence sur la survenue d'endophtalmies post-kératoplastie, augmente le risque de contamination du greffon pendant sa conservation et donc son élimination des banques de tissus (93, 114).

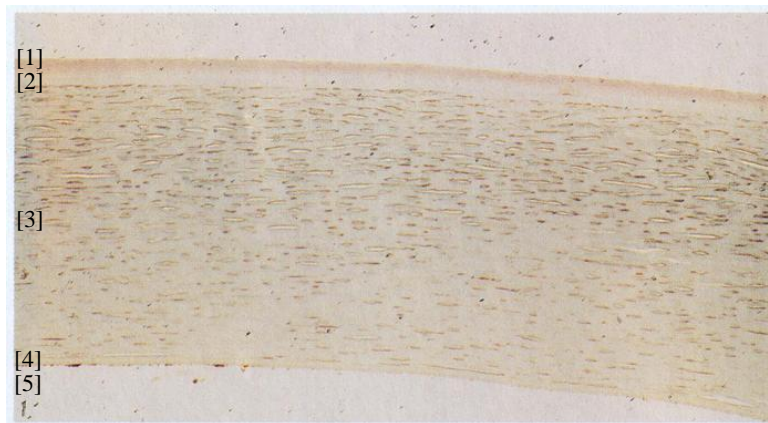
Nous présentons ici une étude observationnelle qui a permis d'étudier et de suivre la population bactérienne présente au niveau de la cornée, du prélèvement jusqu'à la greffe, et de mettre en évidence les résistances aux antibiotiques des bactéries présentes au contact du greffon. Ce suivi a été envisagé par une double approche, la première par bactériologie conventionnelle (culture, identification, antibiogramme) ; la seconde par analyse en biologie moléculaire, ayant consisté en la détection de la présence de bactéries par amplification d'un fragment du gène de l'ARN 16S ribosomal et la recherche de la présence d'intégrons, éléments impliqués dans la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques. La relation potentielle entre différents paramètres (causes du décès, pathologies infectieuses lors du décès, durée entre décès et prélèvement des cornées, durée d'hospitalisation...) et la contamination du greffon a également pu être étudiée. Le but initial de l'étude était de rassembler des éléments permettant de sécuriser la greffe de cornée, par la mise en évidence de donneurs susceptibles d'être évincés du don ou par la meilleure conservation des greffons (notamment par les antibiotiques présents dans les milieux de conservation).

## I. Rappels bibliographiques

---

### A. Greffe de cornée

La greffe de cornée consiste à remplacer un fragment de cornée opaque par une cornée saine, transparente, venant d'un donneur. La cornée est un tissu transparent qui constitue la lentille principale du système optique oculaire. Elle est avasculaire ce qui en fait un site privilégié pour la greffe. Elle est composée de cinq couches [figure 1] : l'épithélium en relation étroite avec le film lacrymal, la membrane de Bowman, le stroma, la membrane de Descemet et l'endothélium. Elle est délimitée par le limbe scléro-cornéen, richement vascularisé (89).



**Figure 1 : Cornée normale vue en coupe**

D'après (89). Coloration par le trichrome de Masson. Grossissement  $\times 63$ . [1] Epithélium. [2] Membrane de Bowman. [3] Stroma. [4] Membrane de Descemet. [5] Endothélium.

### 1. Principales indications de la greffe de cornée

Les indications comprennent toutes les affections avec opacification cornéenne accompagnée d'une baisse d'acuité visuelle dont les principales sont (19, 22, 31) :

- les kératopathies bulleuses, volontiers douloureuses, regroupant les œdèmes cornéens secondaires à une défaillance endothéliale. Celles-ci peuvent être primitives (altération constitutionnelle des cellules endothéliales avec l'âge) ou secondaires notamment en cas de chirurgie intra-oculaire, la plus fréquemment impliquée étant la chirurgie de la cataracte. La kératoplastie est proposée pour la restauration de l'acuité visuelle et pour son effet antalgique.

- les dégénérescences cornéennes, regroupant essentiellement le kératocône, affection cornéenne débutant chez l'enfant ou l'adulte jeune entraînant un amincissement progressif de la cornée, responsable d'un astigmatisme irrégulier puis d'opacités cornéennes, qui est devenu ces dernières années la première indication de greffe de cornée en France ; et les dystrophies

cornéennes endothéliales notamment la dystrophie de Fuchs, pathologie endothélio-descémétique pouvant être héréditaire ou sporadique.

- les kératites infectieuses, en particulier la kératite herpétique entraînant une opacification du stroma cornéen et donc une baisse importante de l'acuité visuelle. La kératoplastie ne peut s'envisager que si le virus est quiescent depuis au moins 6 à 12 mois. Cette infection est toujours grave car le risque de récurrence de l'infection herpétique sur le greffon est important et impose un traitement antiherpétique oral au long cours. On trouve également les abcès bactériens ou fongiques, secondaires au port de lentilles de contact ou d'autres étiologies, ainsi que les kératites amibiennes du porteur de lentille. Si la kératoplastie est indiquée, celle-ci doit être effectuée à distance de l'épisode infectieux (environ 1 an).

- d'autres indications comme l'échec d'une précédente kératoplastie, représentant actuellement une indication non négligeable de kératoplasties transfixiantes lorsque la cause de l'échec de la première greffe est connue et peut être corrigée.

Les indications de greffe restent constantes dans le temps, les principales indications étant les pathologies endothéliales et les kératocônes suivis par les séquelles de kératite et les échecs de greffe. Le tableau 1 montre l'évolution de ces indications depuis 2005.

**Tableau 1 : Évolution des indications de greffe de cornées de 2005 à 2009.**

Indication	2005	2006	2007	2008	2009
<b>Kératocône</b>	21,8 %	20,5 %	21,2 %	19,8 %	18,9 %
<b>Décompensation endothéliale primitive</b>					
Dystrophie de Fuchs	8,8 %	9,8 %	10,5 %	12,0 %	11,9 %
Autres dystrophies	1,6 %	1,4 %	1,4 %	1,2 %	1,6 %
<b>Décompensation endothéliale secondaire</b>					
Pseudophaque (chirurgie de la cataracte)	22,5 %	21,5 %	20,8 %	21,7 %	20,0 %
Autres chirurgies	4,8 %	5,1 %	5,7 %	5,3 %	5,6 %
<b>Séquelle de kératite</b>					
Infections virales	4,3 %	5,1 %	4,3 %	3,9 %	4,1 %
Infections bactériennes	2,1 %	3,0 %	2,6 %	2,7 %	2,7 %
Autres infections	0,7 %	1,1 %	0,8 %	0,9 %	0,8 %
Inflammatoire	0,8 %	0,9 %	0,6 %	0,5 %	0,5 %
Autres étiologies	3,0 %	2,9 %	3,0 %	2,8 %	2,5 %
Dystrophie stromale	4,1 %	3,2 %	3,0 %	3,1 %	3,3 %
<b>Séquelle de traumatisme</b>					
Chimique	0,8 %	0,9 %	0,6 %	0,7 %	0,5 %
Autres origines	4,1 %	3,2 %	3,4 %	3,0 %	3,4 %
<b>Autres</b>					
Échec de greffe	10,0 %	10,1 %	12,1 %	12,0 %	13,2 %
Autres (dont non classifiées)	11 %	11,3 %	9,8 %	10,3 %	10,8 %
<b>Total des greffes</b>	4 604	4 427	4 150	4 324	4 416

Source : GLAC (logiciel de gestion de liste d'attente de greffe de cornées) D'après (4)

## 2. Réalisation et pronostic

Il existe plusieurs techniques opératoires. La technique la plus fréquente à l'heure actuelle est la kératoplastie transfixiante. Elle consiste à prélever par trépanation circulaire une partie de la cornée pathologique du receveur, d'un diamètre variable, que l'on remplace par un greffon sain de diamètre identique provenant d'un donneur. Le greffon est suturé à la cornée du receveur par un surjet ou par des points de suture, laissés en place pendant un an. Cette technique nécessite des greffons cornéens de densité cellulaire endothéliale supérieure à 2000 cellules/mm<sup>2</sup>. La deuxième technique est la kératoplastie lamellaire antérieure profonde consistant à pratiquer d'abord un plan de clivage dans la cornée, pour laisser en place chez le receveur la membrane de Descemet et l'endothélium et ne greffer que la partie antérieure (épithélium, membrane de Bowman et stroma). C'est une technique ancienne dont les résultats visuels étaient inférieurs à ceux de la kératoplastie transfixiante. Les progrès dans les techniques chirurgicales l'ont remise au premier plan et elle tend à devenir la technique de greffe de référence dans les situations cliniques où l'endothélium du receveur est normal, en particulier dans le kératocône (19). Le greffon utilisé est prélevé et conservé dans les mêmes conditions que pour une kératoplastie transfixiante et doit répondre aux mêmes exigences sauf pour les critères de qualité endothéliale. Il est possible au cours de la greffe, par l'une ou l'autre des techniques, de combiner d'autres gestes chirurgicaux si nécessaire, tels que l'extraction du cristallin avec mise en place d'un implant intraoculaire ou le traitement chirurgical d'un glaucome. Le traitement post-opératoire comporte une corticothérapie locale pendant une année et l'adjonction de ciclosporine en collyre à 2% chez les receveurs à haut risque de rejet (20).

Le taux de succès en termes de survie du greffon lors de kératoplasties transfixiantes varie en fonction de l'indication opératoire, de la vascularisation de la cornée du receveur et de ses antécédents (20, 22) :

- pronostic excellent, environ 90% de succès dans les kératocônes.
- pronostic bon, 80% à 90% de succès notamment dans les kératites herpétiques inactives.
- pronostic moyen, 50% à 80% de succès, dans les kératites infectieuses actives ou les brûlures modérées.
- pronostic réservé, moins de 50% de succès, dans le cas de brûlures sévères, d'échecs multiples de greffes ou de cornées avec une néovascularisation importante.

Les greffes de cornée sur cornée avasculaire chez des receveurs n'ayant jamais été greffés ont un taux de survie de plus de 90% à deux ans. Les résultats de la kératoplastie lamellaire ne sont connus qu'à court terme et semblent proches de ceux de la greffe transfixiante (19).

### 3. Complications post-kératoplastie

#### a. Complications infectieuses

##### (1) Endophtalmies

Les endophtalmies peuvent être définies comme une réponse inflammatoire à une invasion de l'œil par un microorganisme. Ce sont des infections intraoculaires rares mais dévastatrices, à haut potentiel de morbidité incluant la perte totale de la vision (71). Les signes cliniques des endophtalmies post-kératoplastie associent différents symptômes tels vision floue, œil rouge, douleur, œdème palpébral, pouvant être accompagnés d'un hypopion ou d'une déhiscence de la cicatrice. L'issue va en partie dépendre de l'agent infectieux en cause.

L'incidence des endophtalmies post-kératoplastie n'est pas facile à évaluer à cause des faibles effectifs des populations concernées, en comparaison à celle des endophtalmies consécutives à la chirurgie de la cataracte. Récemment, une équipe indienne ayant mené une étude prospective sur une période de huit ans rapporte une incidence de 0,5% dans leur population (64). Plusieurs revues de la littérature font quant à elles état d'une incidence plus faible, estimée à 0,2% (102, 114). L'une d'entre elle mentionne notamment une baisse notable depuis le début des années 2000 expliquée par le renforcement des mesures de prévention utilisées (décontamination du globe du donneur, conservation par organoculture) (102).

Les anomalies de la surface oculaire sont des facteurs favorisants, de même que les sutures et leur ablation (23). Le germe responsable peut provenir de la flore conjonctivale et palpébrale du patient ou être transmis par le greffon (3, 26, 70). Une éventuelle contamination lors de l'intervention chirurgicale n'aboutit pas systématiquement à une infection clinique et dépend notamment de l'inoculum, qui doit être suffisant, de la nature du germe, qui doit être capable de résister aux défenses de l'hôte, ainsi qu'à l'intégrité de ces défenses (29). Néanmoins, les greffons sont souvent à l'origine de la contamination dans les endophtalmies post-kératoplastie. Des études ont montré une augmentation du risque de 12 à 22 fois lorsque le greffon utilisé n'est pas stérile (7, 74, 114).

En considérant l'ensemble des endophtalmies post-opératoires, les germes les plus isolés sont les staphylocoques à coagulase négative (SCN), dans 47% à 100% des cas, notamment *S. epidermidis* (14, 24). Plusieurs publications, se basant sur des rapports de cas ou sur des études de plus grande ampleur, font état des microorganismes impliqués spécifiquement dans les endophtalmies post-kératoplastie. Les microorganismes isolés sont majoritairement des bactéries, évaluées entre 66% et 100% des germes. Parmi les bactéries, ce sont surtout les bactéries à Gram positif qui sont mises en causes, en particulier les streptocoques, les entérocoques et les

staphylocoques. La nature de différentes études menées sur ce sujet ainsi que leurs résultats sont consignés dans le tableau 2.

**Tableau 2 : Différentes études publiées sur les endophtalmies post-kératoplastie.**

Auteur	Étude / Population	Endophtalmies post-kératoplastie	Germes impliqués
Antonios et al. 1991 (7)	Rétrospective 2210 greffes	9	<b>Bactéries</b> (66,4%) <u>Gram (+)</u> → 100% - 2 <i>S. aureus</i> - 3 <i>S. epidermidis</i> - 1 <i>S. pneumoniae</i> <b>Champignons</b> (33,3%) - 1 <i>C. albicans</i> - 2 <i>C. glabrata</i>
Kloess et al. 1993 (70)	Prospective 1010 greffes	4	<b>Bactéries</b> (75%) <u>Gram (+)</u> → 100% - 2 <i>Streptococcus</i> groupe B - 1 <i>S. pneumoniae</i> <b>Champignons</b> (25%) - 1 <i>C. albicans</i>
Kunimoto et al. 2004 (72)	Prospective 1074 endophtalmies	14 (13 documentées)	<b>Bactéries</b> (100%) <u>Gram (+)</u> → 76,9% - 6 <i>Streptococcus</i> spp - 3 <i>Staphylococcus</i> spp <u>Gram (-)</u> → 23,1% - 1 <i>P. mirabilis</i> - 1 <i>S. marcescens</i>
Hassan et al. 2008 (60)	Rétrospective 340174 greffes	162 (121 documentées)	<b>Bactéries</b> (66,9%) <u>Gram (+)</u> → 62% - 19 <i>Enterococcus</i> spp - 6 <i>S. aureus</i> - 7 <i>S. epidermidis</i> - 15 <i>S. pneumoniae</i> - 24 <i>Streptococcus</i> spp - 3 <i>Clostridium perfringens</i> <u>Gram (-)</u> → 4,9% - 3 <i>P. aeruginosa</i> - 2 Entérobactéries - 1 <i>Achromobacter xylosoxidans</i> <b>Champignons</b> (33,1%) - 39 <i>Candida</i> spp - 1 <i>Cladosporium</i> spp
Jambulingam et al. 2010 (64)	Prospective 231259 endophtalmies	10 (9 documentées)	<b>Bactéries</b> (90%) <u>Gram (+)</u> → 44,4% - 1 <i>S. aureus</i> - 3 <i>E. faecalis</i> <u>Gram (-)</u> → 55,6% - 1 <i>A. faecalis</i> - 2 <i>P. aeruginosa</i> - 1 <i>P. stutzeri</i> <b>Champignons</b> (10%) - 1 <i>A. flavus</i>

D'autres espèces rapportées à partir de cas isolés ont également été mises en cause dans des endophtalmies post-kératoplastie telles *Clostridium* spp (3), *Pseudomonas aeruginosa* (26, 41), *Shewanella putrefaciens* (63) ou *Stenotrophomonas maltophilia* (27).

Deux études multicentriques se sont attachées à établir une relation entre le tableau clinique de l'endophtalmie, le germe impliqué et le pronostic de la greffe. Elles ont toutes deux montré des différences de virulence entre les germes isolés : les SCN hormis *S. lugdunensis* apparaissent peu virulents alors que tous les autres germes, *S. aureus*, streptocoques, entérocoques et bactéries à Gram négatif sont responsables d'endophtalmies sévères d'apparition rapide (< 1 semaine), compromettant la réussite de la greffe (29).

## (2) *Kératites*

La kératite infectieuse est une complication post-opératoire majeure de la kératoplastie transfixiante pouvant entraîner des dommages oculaires graves, tels cicatrice cornéenne, rejet de greffe, perte fonctionnelle et/ou anatomique de l'œil. On distingue principalement les kératites virales, herpétiques, correspondant le plus souvent à une récurrence de la pathologie initiale, et les kératites bactériennes ou fongiques. Ces dernières ont une incidence variable en fonction des zones géographiques, allant de 1,8% à 7,4% dans les pays développés et pouvant atteindre jusqu'à 25% dans les pays en voie de développement (109). Ces différences peuvent être expliquées par des populations d'étude variables mais aussi dans la différence de prise en charge en post-greffe. La majorité des kératites bactériennes ou fongiques survient la première année après la kératoplastie transfixiante particulièrement chez les patients greffés pour séquelles de kératite microbienne (107, 116). Elles se présentent sous forme d'ulcération épithéliale, d'infiltrat ou d'abcès stromal associés à une rougeur, des douleurs, une photophobie, un larmolement et une baisse de la vision (20). Les facteurs de risque infectieux comprennent la présence de fils de suture, le défaut épithélial et le traitement par corticoïdes locaux. Les germes retrouvés sont majoritairement des bactéries, dans 67,8% à 100% des cas, notamment des cocci à Gram positif dans 38,6% à 82,8 % des cas (109, 111). Les plus fréquemment retrouvés sont les SCN, notamment *S. epidermidis* incriminé dans 55,8% des cas lors d'une étude prospective indienne englobant 50 kératites post-greffe (108). Des cas de kératites post-kératoplastie à *C. macginleyi*, germe commensal des flores oculaires ont également été décrites (99). Les germes à Gram négatif isolés incluent *P. aeruginosa* qui, contrairement aux kératites des porteurs de lentilles de contact, n'apparaît pas prédominant dans l'étiologie bactérienne des kératites post-kératoplastie notamment grâce à l'utilisation d'une prophylaxie antibiotique locale (107). Les kératites infectieuses peuvent être consécutives à la transplantation d'un greffon contaminé et être à l'origine d'endophtalmies dans 4 à 13% des cas (109).



## *b. Autres complications (20)*

### *(1) Échec primaire*

L'échec primaire de la kératoplastie, dont la fréquence est évaluée à 1-2%, se définit comme une absence d'éclaircissement du greffon dans la période post-opératoire avec persistance définitive d'un œdème de la cornée greffée. Il nécessite un changement de greffon dans les 3 à 4 semaines suivant la greffe. La principale cause invoquée à l'heure actuelle serait l'infection herpétique du greffon.

### *(2) Rejet d'allogreffe de cornée*

Le rejet d'allogreffe de cornée est la première cause d'échec des kératoplasties transfixiantes, survenant au minimum dix jours après une première greffe. Un processus immunologique peut toucher les différentes couches de la cornée mais seule l'atteinte endothéliale aboutit à l'échec définitif de la greffe. La fréquence du rejet varie selon la forme clinique et la vascularisation de la cornée du receveur. Elle est estimée entre 10% et 15% chez les receveurs standards. Les facteurs de risque de rejet comprennent la néovascularisation de la cornée du receveur et les antécédents de rejet, permettant la définition des receveurs à haut risque. D'autres facteurs tels une greffe pour kératite herpétique, une inflammation oculaire ou l'âge du receveur (receveurs jeunes) semblent influencer la réussite de la greffe. Le mécanisme du rejet débute par une étape d'allorecognition des antigènes du donneur par présentation aux lymphocytes T du receveur, par l'intermédiaire de cellules présentatrices d'antigènes, induisant leur allo-activation. Les cellules effectrices migrent alors vers le greffon où les cellules sont détruites par apoptose, cytotoxicité ou par les macrophages activés. La greffe de cornée jouit cependant d'un privilège immunologique expliqué par l'absence de vaisseaux sanguins et lymphatiques, phénomène induisant un état de tolérance active aux antigènes présents dans la chambre antérieure de l'œil. De plus, l'expression constitutionnelle de la molécule Fas ligand par les cellules épithéliales et endothéliales cornéennes induit une apoptose des lymphocytes à leur contact.

### *(3) Autres*

Les autres complications comprennent l'hypertonie oculaire, deuxième cause d'échec des kératoplasties transfixiantes, les défauts épithéliaux persistants, la décompensation endothéliale non immunologique du greffon pouvant être due à une perte cellulaire endothéliale progressive, et l'astigmatisme, principale source de limitation de l'acuité visuelle après kératoplastie transfixiante.

## **B. Prélèvement et conservation du greffon**

### **1. Prélèvement du greffon (21, 30)**

#### *a. Sélection des donneurs*

Le prélèvement de cornée est effectué sur une personne décédée, en état de mort encéphalique ou en arrêt cardiaque et respiratoire persistant, sélectionnée sous la responsabilité du médecin préleveur. Cette sélection se fait par l'analyse de données pouvant préjuger de la qualité du greffon notamment les antécédents médicaux et chirurgicaux, les habitudes de vie, les traitements suivis par le donneur, un examen clinique approfondi ainsi que des données relatives à la cause du décès, à la durée d'hospitalisation et au délai post mortem. Des critères de sélection ont été proposés par des associations européenne et américaine de banques d'yeux (EEBA : *European Eye Bank association* et EBAA ; *Eye Bank Association of America*). Les contre-indications au prélèvement à but thérapeutique comportent toute affection neurologique potentiellement transmissible, l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou les donneurs à haut risque de contamination par le VIH, les hépatites virales et ictères d'origine inconnue, les septicémies fongiques, la syphilis, la tuberculose active, la lèpre, certaines maladies parasitaires (paludisme, leishmaniose, trypanosomiase et échinococcose), les hémopathies, les tumeurs malignes oculaires, les inflammations oculaires aiguës et les pathologies cornéennes.

Afin de respecter ces contre-indications, des prélèvements sanguins sont effectués pour déterminer le statut sérologique des donneurs vis à vis de certains pathogènes au moment du prélèvement des cornées selon le décret n° 97-928 du 9 octobre 1997 (2). Une sérologie positive ou douteuse pour les virus VIH 1 ou 2, HTLV 1 ou 2, les virus des hépatites B ou C ou pour la syphilis entraîne le rejet systématique des greffons cornéens.

L'âge n'apparaît pas comme un facteur limitant pour être donneur. En effet, plusieurs études ont montré que la survie du greffon ne diminue pas avec l'âge, et même que les greffons cornéens issus de donneurs âgés présenteraient une meilleure survie en organoculture (18, 50).

#### *b. Technique de prélèvement*

Le prélèvement peut être effectué par deux techniques différentes : l'excision in situ ou l'énucléation. Le prélèvement est systématiquement suivi d'une restauration tégumentaire à l'aide d'une prothèse oculaire. La technique quasi exclusivement réalisée à ce jour est l'excision in situ, le plus souvent sur cadavre, dans une salle dédiée du service mortuaire. Le prélèvement se déroule dans des conditions d'asepsie stricte, après désinfection à la povidone iodée (Bétadine® 5%), par un médecin qui porte des gants stériles. La cornée est prélevée en même temps que son anneau

scléral, sur un diamètre de 16 mm, par trépanation ou dissection puis elle est immédiatement plongée dans un milieu de transport. Le prélèvement doit être réalisé dans les meilleurs délais, de façon optimale avant la 6<sup>ème</sup> heure suivant le décès du donneur. Le délai moyen de prélèvement post-mortem se situe entre la 11<sup>ème</sup> et la 12<sup>ème</sup> heure, cependant, un prélèvement peut être réalisé jusqu'à la 20<sup>ème</sup> heure si le corps a été placé rapidement après le décès en chambre froide à +4°C (dans les 4 heures suivant le décès). Les avantages de cette technique de prélèvement, par rapport à l'énucléation, sont la fiabilité, la rapidité, la simplicité d'exécution ainsi que la meilleure acceptation du don par les familles des donneurs. Elle demande cependant de la minutie pour éviter tout contact au niveau de l'endothélium cornéen dont la vitalité est essentielle pour la réussite de la greffe. Elle supprime le délai entre l'énucléation et la mise en conservation, diminuant les risques de contamination.

Le prélèvement par énucléation, actuellement interdit en France, se fait au bloc opératoire sur un donneur en état de mort encéphalique. Le globe est rincé par du sérum physiologique stérile puis placé en chambre humide stérile. Le principal avantage de cette technique reste la décontamination, en bain de povidone iodée, qui ne peut être assurée en cas d'excision in situ. Le choix de l'une ou l'autre technique de prélèvement ne semble pas influencer directement la contamination du greffon (66), bien qu'une étude ait montré une plus faible incidence de contamination pour les prélèvements par excision in situ (53).

La ponction sanguine pour les sérologies est faite soit par voie intracardiaque, soit préférentiellement par voie sous-clavière chez les donneurs en arrêt cardiaque et respiratoire persistant (1).

## **2. Conservation du greffon (20, 21)**

La conservation des greffons cornéens est réservée aux banques de cornées autorisées par l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé. En 2009, cette conservation était réalisée par 20 banques de tissus (4). Ces dernières prennent en charge la conservation, le contrôle de qualité, le contrôle de stérilité du greffon et la réalisation des contrôles sérologiques du donneur selon les règles de bonnes pratiques relatives à la conservation, à la transformation et au transport des tissus d'origine humaine utilisés à des fins thérapeutiques. La conservation peut se faire par deux approches différentes : la conservation à court terme en milieu liquide à +4°C et la conservation à moyen terme en organoculture à +31°C.

## a. Méthodes de conservation

### (1) Conservation en milieu liquide à +4°C (21)

La conservation de la cornée à +4°C ou hypothermique est une conservation à court terme. Après prélèvement de la cornée, le greffon est transporté à la banque de tissu dans un milieu de conservation en milieu réfrigéré. Les milieux utilisés maintiennent une activité métabolique minimale permettant la survie des cellules. Ils sont issus de modifications du milieu décrit par McCarey et Kaufman et sont composés d'un milieu nutritif, d'une substance colloïdo-osmotique (chondroïtine sulfate) permettant de réduire l'œdème cornéen, un tampon (Hepes, Bicarbonate), des antioxydants, des antibiotiques et du rouge phénol, indicateur coloré de virage de pH. Les antibiotiques n'ayant pas d'activité à +4°C, un réchauffement avant utilisation est nécessaire pour qu'ils puissent exercer leur action. La durée maximale de conservation est d'une semaine. Les lésions de conservation sont modérées et les résultats cliniques des kératoplasties sont bons. Aucun contrôle de stérilité n'est effectué pour cette méthode de conservation.

### (2) Conservation par organoculture à +31°C

Cette méthode proposée dès les années 1970 a été introduite en France par l'équipe de Delbosc à la fin des années 1980 (37). Après prélèvement des cornées par excision in situ, le greffon, placé dans un milieu de transport (CorneaPrep II®, Eurobio, Courtaboeuf, France), est acheminé à la banque de tissus à température ambiante le plus rapidement possible. Ce milieu de transport permet également d'éliminer les greffons fortement contaminés qui ne doivent pas être transférés en organoculture. La deuxième étape consiste en le transfert du greffon dans un milieu de conservation (CorneaMax®, Eurobio, Courtaboeuf, France) après un délai de 3 à 5 jours. Ces milieux sont composés de milieu nutritif Dulbecco modifié selon Iscove, de sérum de veau fœtal à 2%, de mercaptoéthanol, de thioglycérol, d'antibiotiques (Pénicilline et Streptomycine) et de rouge phénol, permettant d'observer une modification du pH. Dans le milieu de conservation, le greffon est conservé à +31°C ± 1°C pendant la période de quarantaine. Cette dernière dure un minimum de deux semaines, afin de permettre aux éventuels germes ayant résisté à la décontamination de croître suffisamment pour faire virer l'indicateur de pH contenu dans le milieu. Durant cette période, toutes les analyses réglementaires sont effectuées. La troisième étape se déroule après qualification du greffon et sélection du receveur. La cornée est transférée dans un milieu conservé à température ambiante (CorneaJet®, Eurobio, Courtaboeuf, France) permettant le transport du greffon tout en assurant sa déturgescence. En effet, l'organoculture entraîne un œdème cornéen conséquent qu'il est nécessaire de réduire avant la greffe. La durée de conservation autorisée est de 4 à 5 semaines mais il est préférable d'utiliser le greffon le plus rapidement possible après la fin de

la période de quarantaine microbiologique. De meilleurs résultats post-greffe sont observés en termes de densité endothéliale et de réversibilité de l'œdème cornéen pour les durées de conservation plus courtes.

### *b. Tests bactériologiques pendant la conservation*

Les critères d'acceptation d'une cornée en vue d'une greffe sont multiples. Ils comprennent des critères de qualité endothéliale décrits par Pels et Schuchard (86) : densité cellulaire, viabilité et morphologie cellulaire, l'absence de contre-indication générale chez le donneur, des résultats sérologiques négatifs pour l'ensemble des pathogènes testés et des contrôles de stérilité du greffon. Ces derniers ne peuvent être envisagés que pour les greffons cornéens conservés par organoculture, la durée de conservation par hypothermie étant trop brève pour qu'un contrôle de stérilité pré-greffe du milieu soit réalisé dans des conditions satisfaisantes. Il existe plusieurs méthodes de contrôle de stérilité pouvant être associées : l'écouvillonnage du limbe après décontamination et avant dissection de la cornée, la culture des milieux d'organoculture, leur observation quotidienne ou la culture d'un fragment d'anneau scléral. Actuellement en France, la stérilité est vérifiée par observation quotidienne des milieux et mise en culture de chaque milieu de conservation du greffon à l'issue de son utilisation. Des tests de stérilité des milieux sont donc effectués sur le milieu de transport (CorneaPrep II®), entre le troisième et le cinquième jour après prélèvement de la cornée lors du transfert du greffon vers le milieu de conservation (CorneaMax®), et sur le milieu de conservation, 48 heures avant la greffe lors du passage du greffon en milieu de déturgescence (CorneaJet®). Une contamination bactérienne n'étant pas toujours visible par un contrôle externe des milieux, l'efficacité des mesures mises en œuvre pour détecter cette éventuelle contamination est très importante. De ce point, l'organoculture paraît une méthode plus adaptée que le stockage à +4°C, des tests de stérilité pouvant être effectués à plusieurs reprises. Une étude portant sur 762 cornées prélevées par excision in situ a permis de mieux appréhender le moment optimal du premier contrôle de stérilité. La contamination des milieux a été évaluée du 3<sup>ème</sup> au 8<sup>ème</sup> jour de conservation et les résultats n'ont pas montré d'intérêt à repousser le premier test de stérilité. En effet, la probabilité de ne pas mettre en évidence une cornée contaminée était de 1,42% et le retard du premier test de stérilité ne permettait pas un rattrapage suffisant alors qu'il entraînait un retard à la libération des cornées (62). Néanmoins, cette étude et d'autres insistent sur l'utilité de la répétition d'un test de stérilité de façon ultérieure, au moment de la mise en déturgescence du greffon, le premier test échouant dans la détection des contaminations dans 31% à 66% des cas (51, 57, 62, 118). L'automatisation de la culture par mise à profit des systèmes utilisés pour les hémocultures a permis une sensibilisation de la détection des contaminations, bactériennes ou fongiques, mais également de réduire le temps de réponse d'une

éventuelle contamination, notamment au moment de la déturgence où le délai jusqu'à la greffe est court (105, 106, 118). Actuellement, 80% des banques de cornées françaises utilisent des techniques d'hémoculture aérobie et anaérobie, manuelles ou automatisées, avec un inoculum variant de 1 à 10 ml et une durée d'incubation de 10 à 15 jours (39).

Une deuxième approche consiste en la culture de l'anneau scléral jouxtant la cornée pour évaluer sa contamination. L'intérêt d'une culture de tissu cornéen en pré-greffe a été avancé pour la mise en évidence de germes inhabituels tels des bactéries du genre *Clostridium* dans le cas d'une conservation de cornées à court-terme (3). Cependant, la culture de l'anneau scléral en pré-opératoire ne préjuge pas des complications infectieuses post-kératoplastie (43). Il apparaît également peu intéressant de cultiver des anneaux scléraux résiduels au moment de la greffe car cela n'a également qu'un faible impact en ce qui concerne la détection d'endophtalmies bactériennes. Cette approche a été avancée par plusieurs auteurs dans les conservations des greffons à +4°C, qui la recommandaient afin d'avoir des informations sur un éventuel germe impliqué dans une endophtalmie post-kératoplastie (7, 70). Or, une méta-analyse visant à évaluer le rôle pronostic de la culture des anneaux scléraux dans la transplantation cornéenne a conclu que l'augmentation de la probabilité de détecter une endophtalmie n'est que de 0,2% à 1% si la culture est positive et entraîne des coûts importants. Un intérêt pourrait éventuellement être avancé pour les endophtalmies fongiques car les levures sont susceptibles d'entraîner de façon plus systématique des endophtalmies post-kératoplastie (114). En outre, une étude anglaise a montré que la présence et la nature de microorganismes étaient différentes entre l'anneau scléral et le bouton cornéen, renforçant le fait que la culture en routine des anneaux scléraux n'apporte pas de réels bénéfices (5)

Bien que des auteurs aient émis des doutes quant à l'utilité des tests de stérilité au vu des faibles taux de contamination et des coûts engendrés (34), la mise en culture des milieux d'organoculture dans des flacons à hémoculture semble actuellement la méthode de détection des contaminations la plus reconnue.

## **C. Contamination bactériologique des greffons**

### **1. Colonisation bactérienne du donneur au moment du prélèvement**

#### *a. Germes mis en évidence au niveau de la cornée*

La flore commensale des paupières et de la conjonctive est constituée de nombreuses bactéries et autres micro-organismes. Chez les patients sains, les culs-de sac conjonctivaux sont colonisés dans environ 80% des cas. *Staphylococcus epidermidis* est la bactérie la plus fréquemment retrouvée sur le revêtement cutané périoculaire et au niveau des conjonctives (55). Les micro-organismes présents de façon habituelle chez les patients sains sont des corynébactéries, d'autres SCN, des streptocoques, des bactéries des genres *Neisseria* et *Moraxella*. *S. aureus* ainsi que les bactéries à Gram négatif peuvent être retrouvés mais de façon beaucoup moins fréquente (13, 55, 80). La cornée n'est que peu colonisée par des bactéries opportunistes grâce au film lacrymal qui permet le lavage de la surface cornéenne et dont certaines protéines et enzymes possèdent une activité antibactérienne (55).

Les taux de colonisation des cornées des donneurs varient de 24,7% à 88,8% avant désinfection de la surface oculaire selon les publications (9, 93, 96, 103). Les microorganismes peuvent croître aisément, le film lacrymal étant absent chez les personnes décédées. Ces germes, consignés dans le tableau 3, sont majoritairement des bactéries à Gram positif comparables à ceux de la flore conjonctivale normale décrite (45, 87, 93). Les autres germes retrouvés font partie des flores du tractus respiratoire ou du tube digestif, ou sont des germes environnementaux.

Polack et collaborateurs ont comparé les flores oculaires issues de la cornée et des conjonctives et ont trouvé moins de bactéries dans les cultures cornéennes (87). L'hypothèse émise pour répondre à ce phénomène est que les microorganismes pourraient être piégés dans l'épithélium conjonctival. Les différentes études abordant la colonisation des donneurs se sont focalisées sur la cornée et ont recherché les microorganismes se trouvant à son bord par écouvillonnage du limbe scléro-cornéen ou par grattage cornéen. Les taux de colonisation, consignés dans le tableau 3, varient de 24,7% à 88,8% avant toute décontamination avec une prédominance très marquée des bactéries quelque soit l'étude. La distribution des germes semble modifiée par rapport à celle des personnes en vie, avec la présence des germes normalement retrouvés dans la flore cornéenne, mais également d'une part importante de bactéries à Gram négatif. Badenoch et collaborateurs ont étudié de façon rétrospective les germes isolés de 434 limbes, montrant une colonisation dans 73% des cas. Pour les patients ayant eu les deux yeux prélevés, 19% ont une seule cornée positive, 63% ont les deux. Les cultures positives sont

polybactériennes dans 35% des cas et une proportion plus importante des bacilles à Gram négatif est retrouvée par rapport à la flore des personnes vivantes (9). Ceci apparaît également dans les travaux de Pardos et Gallagher et ceux de l'équipe de Tandon (85, 103).

D'autres travaux montrent une flore proche de celle de patients vivants. L'équipe de Robert retrouve une flore superficielle comparable à la flore normale à la suite de grattages cornéens de 93 cornées sur le point d'être prélevées. Lindquist et collaborateurs, dans une étude récente, ont montré une colonisation au niveau du limbe chez 78,5% des donneurs et la présence de SCN chez 62%, de bactéries du genre *Corynebacterium* chez 27%, de streptocoques chez 9,5% et de germes anaérobies du genre *Propionibacterium* chez 10% des donneurs. Bien que des bacilles à Gram négatif aient été retrouvés dans 14,5% des cas, la flore cornéenne normale était prédominante (77).

**Tableau 3 : Taux de colonisation cornéenne des donneurs avant prélèvement et distribution des germes.**

	<i>Satpathy et al. 1993</i> (96)	<i>Robert et al. 2002</i> (93)	<i>Tandon et al. 2007</i> (103)	<i>Pardos et Gallagher. 1982</i> (85)	<i>Robert et al. 2002</i> (93)	
Nature du prélèvement	Limbe <u>avant désinfection</u>	Grattage cornéen <u>avant désinfection</u>	Limbe <u>avant désinfection</u>	Limbe <u>après irrigation</u>	Grattage cornéen <u>après désinfection</u>	Humeur aqueuse <u>après désinfection</u>
Taille de l'échantillon	1557	93	334	4167	93	93
<b>Culture positive</b>	<b>42,8%</b>	<b>24,7%</b>	<b>88,8%</b>	<b>12,4%</b>	<b>4,3%</b>	<b>8,6%</b>
<b>Bactéries</b>	<b>91,5%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>99,6%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>
<u>Gram positif</u>	<u>32,7%</u>	<u>79,1%</u>	<u>55%</u>	<u>77,7%</u>	<u>100%</u>	<u>75%</u>
SCN	25,7%	37,5%	43,8%	66,4%	50%	-
- <i>S. epidermidis</i>	25,7%	37,5%	43,8%	66,4%	50%	-
- Autres SCN	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	3,5%	33,3%	5,6%	8,2%	50%	37,5%
<i>Streptococcus</i> spp	-	8,3%	0,7%	2,3%	-	-
<i>Corynebacterium</i> spp	2,4%	-	4,9%	-	-	-
<i>Propionibacterium</i> spp	-	-	-	-	-	-
Autres Gram positif	1,1%	-	-	0,8%	-	37,5% 25% Entérocoques 12,5% Anaérobies
<u>Gram négatif</u>	<u>58,9%</u>	<u>20,9%</u>	<u>45%</u>	<u>21,9%</u>	=	<u>25%</u>
<i>Pseudomonas</i> spp	16%	4,2%	22,9%	5,8%	-	-
Entérobactéries	12,2%	16,7%	7,6%	15,9	-	25%
Autres Gram négatif	30,7%	-	14,5%	0,2%	-	-
<b>Champignons</b>	<b>8,5%</b>	-	-	<b>0,4%</b>	-	-



Cette colonisation, très fréquente, implique donc des processus de décontamination rigoureux afin d'éviter les éliminations de greffons pour cause microbiologique. Robert et collaborateurs avancent que 50% des contaminations de greffons peuvent être imputables à une contamination initiale du donneur. De plus, des travaux récents ont montré que cette contamination, en plus d'entraîner des rejets de greffons par les banques de tissu, étaient à l'origine d'endophtalmies. En effet, 162 endophtalmies post-kératoplastie ont été observées sur une période de 10 ans après distribution d'environ 34000 greffons. Les germes isolés chez le receveur concordaient dans un tiers des cas avec un germe isolé de la cornée du donneur lors des endophtalmies bactériennes et dans 75% des cas quand l'endophtalmie était d'étiologie fongique (60).

Dès 1982, Pardos et Gallagher ont montré que l'irrigation massive par une solution de sérum physiologique permettait de diminuer la contamination des greffons à 12,4% (85). Actuellement l'agent décontaminant utilisé en complément est la polyvidone iodée (Bétadine®) dont le spectre est celui de l'iode libéré lentement et progressivement. C'est une substance bactéricide en moins de 5 minutes in vitro sur l'ensemble des bactéries, fongicide sur les levures et champignons filamenteux et active sur la plupart des virus et protozoaires. Son utilisation dans la décontamination oculaire est basée sur une supériorité décrite par plusieurs auteurs en comparaison avec les agents antibiotiques testés (54, 79, 83, 103). Gopinathan et collaborateurs ont testé son efficacité par rapport à la gentamicine et à la ciprofloxacine, elle s'est avérée être un meilleur agent décontaminant (54). L'équipe de Robert a également observé cette propriété puisqu'une décontamination par cette substance a permis de passer de 23 cornées contaminées à seulement 4 (93). Une décontamination durant 3 minutes semble satisfaisante car active sur les SCN mais pas sur les corynébactéries, néanmoins une prolongation de la décontamination ne permet pas l'élimination des corynébactéries (54). Il a donc été admis que les différentes procédures prophylactiques permettaient de diminuer considérablement la contamination du greffon mais que le pouvoir décontaminant n'étant pas de 100%, un échec dans la stérilisation complète de la cornée pouvait occasionnellement laisser un nombre de bactéries entraînant une contamination du milieu de culture (9, 17, 93). Après désinfection, il a été noté par Tandon et collaborateurs une décroissance des bactéries à Gram positif mais une augmentation relative des bactéries à Gram négatif de 21% à 64,7%. Robert et collaborateurs font ce même constat, notamment dans les milieux intraoculaires, avançant comme hypothèse la translocation dans l'humeur aqueuse de germes issus de la flore digestive (bacilles à Gram négatif, anaérobies), provenant d'une décharge bactériémique péri-mortem (93).

## 2. Contamination bactérienne du greffon à l'issue de la conservation

La contamination des cornées à l'issue de leur conservation en hypothermie a été largement étudiée car plus ancienne que la conservation par organoculture. Cette méthode ne permettant qu'une conservation de courte durée, ce sont les anneaux scléraux qui ont été cultivés en post-greffe. Différentes études publiées à ce sujet, consignées dans le tableau 4, font état de taux de contamination variant de 4,2% à 29% (7, 43, 45, 47, 53, 59, 70, 90, 113). Une conservation du greffon plus de 5 jours serait liée à des contaminations bactériennes mises en évidence à l'issue du stockage et le risque d'endophtalmie serait 12 à 22 fois plus important lorsque le greffon utilisé n'est pas stérile en culture post-greffe (7, 74, 114). Les milieux utilisés n'avaient à l'origine qu'une fonction de maintien de la viabilité cellulaire, notamment endothéliale. Ils ont progressivement été améliorés par ajout d'antibiotiques qui leur permet également de contribuer à la stérilité du greffon (92), expliquant le passage de taux évalués entre 15% et 30% dans le début des années 1990, à des taux inférieurs avoisinant 15% à la fin des années 2000. Cette baisse semble toute relative et la résistance de plus en plus importante des bactéries aux antibiotiques peut l'expliquer en partie.

La conservation par organoculture, d'utilisation plus récente, permet quant à elle de pouvoir contrôler la stérilité des greffons avant leur distribution. Les taux de rejet pour cause microbiologique sont évalués entre 5% et 11,4% selon les équipes (8, 17, 47, 93, 105, 118). L'Agence française pour la sécurité sanitaire des produits de santé enregistre depuis 2005 tous les agents contaminants des milieux d'organoculture, bactériologiques ou fongiques, isolés dans les banques de cornées françaises. Le dernier recensement datant de 2008 fait état d'un taux d'élimination des cornées pour cause microbiologique de 8,3% (38). Les divers résultats sont rapportés dans le tableau 5 ainsi que la distribution des différents germes impliqués dans cette contamination. Les principales autres causes d'élimination des greffons sont une mauvaise qualité endothéliale ou une sérologie positive contre un pathogène induisant l'exclusion des dons. Seule une contamination du milieu de culture après une quarantaine adéquate est une raison valable d'exclusion du greffon car la greffe de cornées colonisées avant désinfection ne semble pas être liée à un sur-risque d'endophtalmie post-kératoplastie (93). Selon Borderie et Laroche, les contaminations bactériennes durant l'organoculture se déclarent en moyenne vers 5,2 jours contre 7,6 jours pour les infections fongiques. Elles sont généralement détectées après la mise en évidence d'un trouble du milieu de culture dont la valeur prédictive positive avoisine les 100%. La valeur prédictive négative d'un milieu clair est quant à elle évaluée à 99%. Aucun des antibiotiques mis en place dans les milieux n'est efficace contre toutes les bactéries isolées (17). Les contaminations sont le plus souvent mises en évidence durant la conservation *sensus stricto* mais des germes peuvent également être retrouvés durant la déturgescence. Zanetti et collaborateurs rapportent une majorité de contamination par des bactéries à Gram positif

**Tableau 4 : Taux de contamination et distribution des germes après conservation de greffons cornéens en hypothermie.**

	<i>Antonios et al. 1991</i> (7)	<i>Farell et al. 1991</i> (45)	<i>Kloess et al. 1993</i> (70)	<i>Gomes et al. 1995</i> (53)	<i>Wiffen et al 1997</i> (113)	<i>Everts et al.2001</i> (43)	<i>Rehany et al. 2004</i> (90)	<i>Ritterband et al.2006</i> (92)	<i>Fontana et al 2007</i> (47)	<i>Hassan et al. 2007</i> (59)
Nature du prélèvement	Anneaux scléreaux	Anneaux scléreaux	Anneaux scléreaux	Anneaux scléreaux	Anneaux scléreaux	Anneaux scléreaux	Anneaux scléreaux	Anneaux scléreaux	Anneaux scléreaux	Anneaux scléreaux
Taille de l'échantillon	1399	446	932	1097	1078	774	469	509	185	263
<b>Culture positive</b>	<b>29%</b>	<b>15,4%</b>	<b>14%</b>	<b>4,2%</b>	<b>19,4%</b>	<b>5,3%</b>	<b>16,8%</b>	<b>11,9%</b>	<b>9,8%</b>	<b>8,9%</b>
<b>Bactéries</b>	<b>91%</b>	<b>97,1%</b>	<b>87,5%</b>	<b>100%</b>	<b>93,5%</b>	<b>88%</b>	<b>100%</b>	<b>87%</b>	<b>88,5%</b>	<b>95,6%</b>
<u>Gram positif</u>	-	<u>94,2%</u>	<u>83,5%</u>	-	<u>88,3%</u>	<u>83%</u>	<u>77,3%</u>	<u>77%</u>	<u>83%</u>	<u>91,3%</u>
SCN	22%	18,8%	39%	39,2%	56,5%	51%	63,6%	18%	44%	8,7%
- <i>S. epidermidis</i>	22%	11,6%	39%	-	-	-	63,6%	18%	39%	-
- Autres SCN	-	7,2%	-	-	-	-	-	-	5,5%	-
<i>S. aureus</i>	3%	1,5%	3%	5,9%	2,6%	2,5%	-	7%	22%	8,7%
<i>Streptococcus</i> spp	8%	37,6%	26%	27,5%	15,5%	12%	11,2%	1,5%	5,5%	39,1%
<i>Corynebacterium</i> spp	24%	11,6%	8%	3,9%	4,3%	10%	-	-	-	-
<i>Propionibacterium</i> spp	26%	21,8%	1,5%	-	1,3%	-	-	49%	-	-
Autres Gram positif	-	2,9%	6%	-	8,1%	7,5%	2,5%	1,5%	11%	34,8%
					4,3% Entérocoques					26,1% Anaérobies 8,7% Entérocoques
<u>Gram négatif</u>	-	<u>2,9%</u>	<u>4%</u>	-	<u>5,2%</u>	<u>5%</u>	<u>22,7%</u>	<u>10%</u>	<u>5,5%</u>	<u>4,3%</u>
<i>Pseudomonas</i> spp	1%	-	1,5%	-	0,9%	-	3,8%	-	5,5%	
Entérobactéries	-	-	0,5%	-	2,6%	5%	13,9%	3%	-	4,3%
Autres Gram négatif	-	2,9%	2%	-	1,7%	-	5%	7%	-	
<b>Champignons</b>	<b>9%</b>	<b>2,9%</b>	<b>12,5%</b>	-	<b>6,5%</b>	<b>12%</b>	-	<b>13%</b>	<b>11,5%</b>	<b>4,4%</b>

**Tableau 5 : Taux de contamination et distribution des germes après conservation de greffons cornéens par organoculture.**

	<i>Hagenah et al.</i> 1995 (57)	<i>Borderie et al.</i> 1998 (17)		<i>Albon et al.</i> 2001 (5)		<i>Robert et al.</i> 2002 (93)	<i>Zanetti et al.</i> 2005 (118)	<i>Fontana et al.</i> 2007 (47)		<i>Hermel et al.</i> 2009 (62)	<i>Delesalle et al.</i> 2010 (38)
Nature du prélèvement	Milieux de culture	Milieux de culture	Anneaux scléreaux	Anneaux scléreaux	Bouton Cornéen	Milieux de culture	Milieux de culture	Milieux de culture	Anneaux scléreaux	Milieux de culture	Milieux de culture
Taille de l'échantillon	1134	603	409	117	72	93	3100	604	443	762	7493
<b>Culture positive</b>	<b>0,53%</b>	<b>11,4%</b>	<b>0,7%</b>	<b>29%</b>	<b>15,3%</b>	<b>5,4%</b>	<b>7,2%</b>	<b>6,4%</b>	<b>1,3%</b>	<b>2,4%</b>	<b>8,3%</b>
<b>Bactéries</b>	<b>50%</b>	<b>65%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>87,3%</b>	<b>88%</b>	<b>33,3%</b>	<b>69,6%</b>	<b>78%</b>
<u>Gram positif</u>	<u>100%</u>	<u>29%</u>	<u>100%</u>	<u>94,9%</u>	<u>100%</u>	<u>100%</u>	<u>36,4%</u>	<u>60%</u>	-	<u>43,6%</u>	-
SCN		16%	66,7%	59%	54,5%	60%	12,7%	23%	-	34,6%	13,8%
- <i>S. epidermidis</i>		-	-	-	-	60%	3,9%	23%	-	4,3%	-
- Autres SCN		-	-	-	-	-	8,8%	-	-	30,4%	-
<i>S. aureus</i>		13%	33,3%	-	9,1%	30%	15,4%	27%	-	8,6%	2,7%
<i>Streptococcus</i> spp		-	-	17,9%	-	-	-	-	-	-	2,9%
<i>Corynebacterium</i> spp		-	-	-	-	-	-	-	-	-	<1%
<i>Propionibacterium</i> spp		-	-	-	-	-	-	-	-	-	<1%
Autres Gram positif	100% <i>Micrococcus</i> spp	-	-	18% 15,4%	36,4% 27,3%	-	-	10%	-	-	<1%
				<i>Bacillus</i> spp	<i>Bacillus</i> spp						
<u>Gram négatif</u>		<u>36%</u>	-	<u>5,1%</u>	-	-	<u>50,1%</u>	<u>28%</u>	<u>33,3%</u>	<u>26%</u>	-
<i>Pseudomonas</i> spp		13%	-	5,1%	-	-	2,8%	18%	33,3%	-	11,5%
Entérobactéries		12%	-	-	-	-	-	5%	-	13%	7,6-10%
Autres Gram négatif		11%	-	-	-	-	48% 21,5% <i>A. xylooxidans</i> 12,7% <i>S. maltophilia</i>	5%	-	13%	40% *
<b>Champignons</b>	<b>50%</b>	<b>35%</b>	-	-	-	-	<b>12,7%</b>	<b>12%</b>	<b>66,6%</b>	<b>30,4%</b>	<b>17%</b>

\* : 10,5% *S. paucimobilis* ; 6,6% *Brevundimonas* spp ; 4,3% *S. maltophilia* ; 2,7% *A. baumannii* ; 4,7% *B. cepacia* ; 11% Autres bactéries à Gram négatif

au début de la conservation, ce qui concorde avec les données des autres études, mais une proportion plus importante de bactéries à Gram négatif pendant la phase de déturgescence par rapport à la phase de conservation, notamment *A. xylosoxidans* et *S. maltophilia*, germes environnementaux pouvant être impliqués dans des infections humaines. L'hypothèse avancée est que les bactéries pénètrent le tissu cornéen pendant la conservation par culture, n'étant pas éliminés grâce à leurs résistances aux antibiotiques, puis sont « expulsées » lors de la déturgescence (118). La contamination du bouton cornéen apparaît moins importante que celle de l'anneau scléral et les bactéries isolées ne sont pas toujours similaires. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'anneau scléral, adjacent à la cornée, se trouve aussi aux abords des conjonctives (5).

Les deux techniques de conservation ont été comparées sur le plan microbiologique. Deux études semblent montrer un avantage pour l'organoculture sur ce point. Borderie et Laroche ont observé une diminution de 19 à 53 fois de la contamination des anneaux scléraux conservés par organoculture par rapport à la conservation à +4°C employée par certaines équipes (7, 17, 113). La comparaison avec les données d'autres équipes ne mettait pas en évidence de différence significative (17, 70, 74). L'équipe de Fontana a évalué les deux modes de conservation dans une même étude et avance des taux de contamination de 1,3% et 1,4% pendant l'organoculture (énucléation et excision in situ) contre des contaminations de 8% et 12% en conservation hypothermique. Ceci est expliqué par la possibilité de rejeter les cornées contaminées pendant le stockage ce qui entraîne une proportion beaucoup moins élevée d'anneaux scléraux positifs à l'issue de la conservation. Cette capacité reste le principal avantage de l'organoculture qui permet une distribution de greffons stériles.

### **3. Influence de différents facteurs sur la contamination du greffon**

#### *a. Facteurs propres au donneur*

L'étude d'un lien entre différents paramètres propres au donneur et la contamination des cornées a donné lieu à de nombreux résultats discordants. L'âge du donneur a été montré par certains comme n'entraînant pas de différences significatives sur la contamination du greffon (17) quand d'autres ont fait état d'un effet de l'âge sur la contamination interne de l'œil, expliqué par une plus grande perméabilité des tissus de façon spontanée ou à cause de conditions pathologiques, mais une absence d'effet sur la contamination externe (93).

Une étude de Borderie et collaborateurs portant sur 603 cornées n'a pas montré d'influence notable de la cause de la mort du donneur sur la colonisation cornéenne (18). Néanmoins, le décès par cancer peut représenter un facteur de risque notamment par l'hospitalisation prolongée consécutive à cette pathologie ou l'utilisation de cytotoxiques qui sont à l'origine de risques

majorés de colonisation de la cornée (90). Une augmentation du risque d'endophtalmies post-kératoplastie a d'ailleurs été notée en cas de donneur cancéreux ou mort à l'hôpital, probablement due à la transmission d'un germe du donneur à l'hôte. Ceci pourrait être dû à la contamination des donneurs par des germes nosocomiaux tels des entérocoques ou des levures, dans le sang et les tissus, microorganismes se trouvant être à l'origine d'endophtalmies. L'auteur ne préconise pas d'éviction systématique des dons de ces populations (60). Un rapport de cas faisant état d'un patient ayant eu une endophtalmie grave causée par une bactérie du genre *Clostridium*, dont le greffon avait été prélevé sur un patient décédé des suites d'un cancer du colon métastasé, pose néanmoins le problème de l'éligibilité de donneurs atteints de cancers gastro-intestinaux chez qui la translocation bactérienne à partir du tractus gastro-intestinal est augmentée (3).

Les études possédant des donneurs décédés par pathologies cardio-vasculaires sont à l'origine de résultats controversés. Hagenah et collaborateurs décrivent une très faible incidence de contamination de cornées (0,53%) à l'issue d'une conservation par organoculture et attribuent ce taux à la sélection des donneurs, en bon état général et non hospitalisés, décédés brutalement des suites de maladies cardio-vasculaires ou d'accidents. L'équipe de Rehany rapporte au contraire une augmentation de la contamination avec un décès par maladies cardiaques mais est dans l'incapacité d'avancer une explication à cette observation (90). Il semblerait donc que les pathologies cardio-vasculaires n'entrent pas réellement dans les pathologies accroissant le risque de contamination des cornées.

La présence d'un sepsis au moment du décès est un paramètre à l'origine de nombreux débats quant à l'éviction ou non du don. Des travaux n'ont pas établi de lien significatif entre sepsis et contamination du greffon, notamment quand le prélèvement est effectué par excision in situ avec toutes les précautions et s'il est conservé par organoculture (90, 93). La nature avasculaire de la cornée a notamment été avancée pour expliquer l'absence de lien (90). D'autres études ont au contraire montré une influence du sepsis sur la contamination des greffons. Armitage et Easty, dans une étude incluant 9250 cornées, ont trouvé un risque de contamination augmenté 1,9 fois quand le décès était dû à une infection, notamment une septicémie (8). Une revue indienne fait état d'une contamination non augmentée de l'humeur aqueuse chez les patients avec un sepsis documenté ou suspecté mais mentionne une étude ayant retrouvé le portage de germes au niveau oculaires lors de sepsis (95). Il n'y a donc pas de lien clair entre les microorganismes isolés du sang et de l'humeur aqueuse, cependant de nombreux centres continuent d'exclure les donneurs septicémiques au moment de leur décès du don de tissu cornéen (60).

### *b. Facteurs liés au prélèvement et à la conservation*

Le facteur le plus communément étudié est le délai entre le décès du donneur et le prélèvement de la cornée. Les résultats avancés apparaissent une fois de plus non concordants. Certaines études ne retrouvent pas de lien significatif entre ce délai et la contamination du greffon (90, 113) quand d'autres avancent un risque de contamination augmenté avec le délai décès-prélèvement : Armitage et Easty avancent un risque faiblement augmenté (1,03 fois) de contamination avec l'augmentation du délai décès-prélèvement (8), Borderie et Laroche font d'un délai décès-prélèvement compris entre 13 et 24 heures un facteur prédictif de contamination (17). Hassan et Wilhelmus, en analyse univariée, ont montré qu'au-delà d'un délai décès-prélèvement supérieur à 15 heures, chaque intervalle de 6 heures supplémentaires augmente de 91% les risques d'avoir une cornée contaminée (59). L'allongement du délai décès-prélèvement pourrait entraîner un risque de multiplication des bactéries intraoculaires, parallèlement à l'augmentation de la charge bactérienne liée à la bactériémie post-mortem, mais n'aurait aucun effet sur la contamination externe (93).

Une culture positive serait également associée à une mauvaise qualité tissulaire plutôt qu'à une bonne qualité endothéliale. Ceci pourrait être expliqué par la présence d'un œdème stromal, en partie induit par la conservation, facilitant la pénétration de bactéries dans les cornées du donneur (59).

### *c. Facteurs environnementaux*

Hassan et Wilhelmus se sont penchés sur les conditions environnementales au moment du prélèvement du donneur. Ils ont d'abord observés que les températures extérieures hautes peuvent augmenter le risque relatif de transmission de *Candida* par kératoplastie (58). Une deuxième étude leur a permis de montrer que les cultures d'anneaux scléraux positives après conservation à +4°C, notamment à levures, étaient associées à des températures extérieures au moment du décès supérieures à 24°C, étayant leur première observation (59). Ce phénomène n'a pas été montré pour les agents bactériens et n'a pas été relayé par d'autres équipes.

## **D. Diagnostic bactériologique en ophtalmologie**

### **1. Diagnostic bactériologique usuel**

Le diagnostic bactériologique est une étape très importante dans la détermination étiologique des infections oculaires bactériennes, kératites ou endophtalmies. Les prélèvements réalisés en pratique courante sont soit des grattages cornéens dans le cas de kératites, soit des prélèvements d'humeur aqueuse ou de vitré dans le cas d'endophtalmies. Les prélèvements conjonctivaux ont peu de valeur dans le cas d'infections car ils reflètent la flore conjonctivale au moment de leur réalisation et non celle au moment de l'infection endoculaire. L'utilisation de milieux de transport type Eswab® (Copan, Brescia, Italie) permet d'assurer la viabilité d'un grand nombre de germes et la stabilisation des acides nucléiques au cours du transfert vers le laboratoire et préserve donc la sensibilité du diagnostic (33, 84).

L'analyse microbiologique conventionnelle comprend un examen direct et une mise en culture du prélèvement qui est actuellement la méthode de référence pour déterminer l'étiologie infectieuse. L'examen direct présente une faible sensibilité, notamment à cause des volumes réduits de prélèvement et du faible inoculum. La mise en culture doit se faire sur plusieurs types de milieux de culture, incubés en conditions adaptées, afin d'isoler les bactéries de culture facile mais aussi des germes plus exigeants. Une identification d'espèce, classiquement à l'aide de tests phénotypiques (morphologie, coloration de Gram, tests biochimiques) ainsi qu'un antibiogramme sont réalisés. La négativité des cultures peut être associée à plusieurs facteurs : le faible volume du prélèvement et donc de l'inoculum bactérien, l'utilisation d'antibiotiques avant le prélèvement, le caractère non homogène des liquides intraoculaires ou la difficulté de croissance en culture de certains germes (28).

Les milieux de culture utilisés dans différentes études de la littérature permettent la croissance de nombreux germes. En effet, les équipes ayant étudié la colonisation des cornées de patients vivants ou de donneurs décédés ont très souvent associé des milieux de culture liquides tels le *Brain Heart Infusion* ou BHI (9, 55, 81) à des milieux de culture solides, géloses au sang et/ou géloses chocolat, incubés à 37°C dans diverses conditions atmosphériques incluant l'aérobiose, l'aérobiose enrichie en CO<sub>2</sub> et l'anaérobiose (54, 76, 81). Le BHI est un milieu de culture liquide, contenant des infusions de tissus de cœur et de cerveau, permettant la croissance de nombreux micro-organismes. Les géloses au sang sont des milieux d'isolement facilitant la croissance de micro-organismes exigeants car permettant un apport nutritif adapté à la majorité des espèces bactériennes quel que soit leur métabolisme. Les géloses Chocolat contiennent en plus les facteurs X (hémine) et V (NAD) permettant la croissance de germes exigeants des genres



*Neisseria* et *Haemophilus* (15). Pour la culture d'anneaux scléaux à l'issue d'une conservation hypothermique, certains auteurs ont utilisé un bouillon BHI (59, 90, 113) mais dans d'autres études ce dernier était volontiers remplacé par un bouillon thioglycolate, dans lequel était immergé le résidu opératoire après ensemencement de milieux solides ou non (7, 43, 45, 47, 53, 70, 92). Les bouillons thioglycolate et Schaedler sont plus spécifiquement destinés à la recherche des bactéries anaérobies mais permettent également la croissance des bactéries aérobies. Ils contiennent un mélange de peptones permettant la croissance de la plupart des micro-organismes ainsi que de l'extrait de levure et des agents réducteurs (cystéine et thioglycolate de sodium pour le bouillon thioglycolate ; cystéine et glucose pour le bouillon de Schadler) favorisant la croissance des germes anaérobies.

Les durées d'incubation des différents milieux variaient de 48 heures à 14 jours en fonction des études, la plupart ayant une durée d'incubation de 7 jours. Pour la culture de milieux d'organoculture, les études les plus anciennes utilisaient des milieux de culture liquide type BHI ou thioglycolate incubés de 5 à 7 jours puis repiqués sur des milieux solides en cas de positivité (5, 18). Puis, des études plus récentes ont comparé ces techniques de culture manuelles à une culture automatisée par mise à profit des systèmes utilisés pour les hémocultures et ont conclu à une plus grande sensibilité de ces dispositifs (105, 118). La dernière étude évaluant la contamination des milieux d'organoculture n'utilisait quant à elle que des flacons de système automatisé (62).

## **2. Biologie moléculaire**

### *a. Techniques de biologie moléculaire (6)*

Le diagnostic microbiologique direct s'est enrichi ces dernières années grâce à la démocratisation des techniques de biologie moléculaire, notamment celles basées sur la PCR (*Polymerase chain reaction*). La biologie moléculaire représente un ensemble d'outils permettant la mise en évidence des acides nucléiques, ADN ou ARN, et permettant l'identification de microorganismes ou la présence de gènes d'intérêt. Le déroulement classique d'une démarche de biologie moléculaire à visée diagnostique en microbiologie comporte, après une étape d'extraction des acides nucléiques, une réaction de PCR la plupart du temps suivie d'une réaction de séquençage. Le principe des ces techniques est rappelé brièvement ci-dessous :

## **(I) PCR ou « Polymerase chain reaction »**

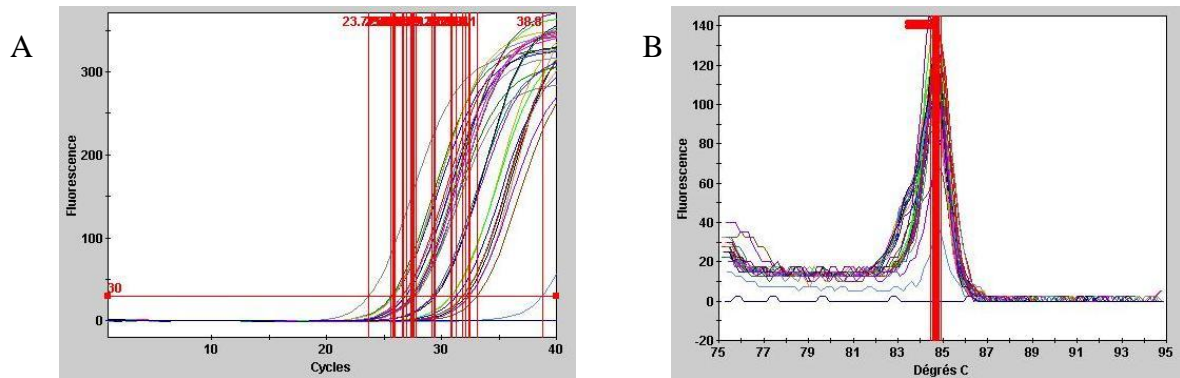
### **(a) Principe**

Cette technique, inventée dans les années 1980, permet l'amplification d'un fragment d'ADN compris entre deux séquences connues de manière exponentielle. Elle est basée sur l'utilisation d'une enzyme thermorésistante, l'ADN polymérase (la plus connue étant la *Taq* ADN polymérase) capable de synthétiser un brin complémentaire d'une séquence d'ADN à partir d'une amorce qui, une fois fixée sur sa séquence complémentaire, va initier le processus. La réaction de PCR est une succession de trois étapes répétées de manière cyclique, classiquement 25 à 40 fois. La première étape consiste en une dénaturation thermique permettant la séparation des deux brins d'ADN par rupture des liaisons hydrogène. La deuxième étape correspond à l'hybridation des amorces sur les séquences connues encadrant le fragment d'intérêt, à une température spécifique de celles-ci. La troisième étape est l'élongation consistant en l'incorporation, dans le sens 5'-3' à partir des amorces, de désoxyribonucléotides complémentaires au brin matrice par l'ADN polymérase. Le facteur théorique d'amplification est  $2^n$ , n étant le nombre de cycles mais le rendement d'une réaction n'est jamais de 100%. La linéarité ne dure que pendant la phase exponentielle puis une phase de plateau survient liée à la dégradation de la polymérase, l'épuisement des réactifs et l'accumulation d'ADN. La PCR dite classique implique une détection du fragment cible sur un gel d'agarose après addition d'un agent intercalant tel le bromure d'éthidium (BET) et exposition aux UV.

### **(b) PCR en temps réel**

La PCR en temps réel est fondée sur la détection directe du produit amplifié par un marqueur fluorescent dont l'intensité émise est proportionnelle à la quantité de produits amplifiés. Plusieurs chimies ont été développées dont le SYBR® Green, agent intercalant fluorescent et la détection basée sur des sondes marquées, dont les plus couramment utilisées sont les sondes TaqMan®.

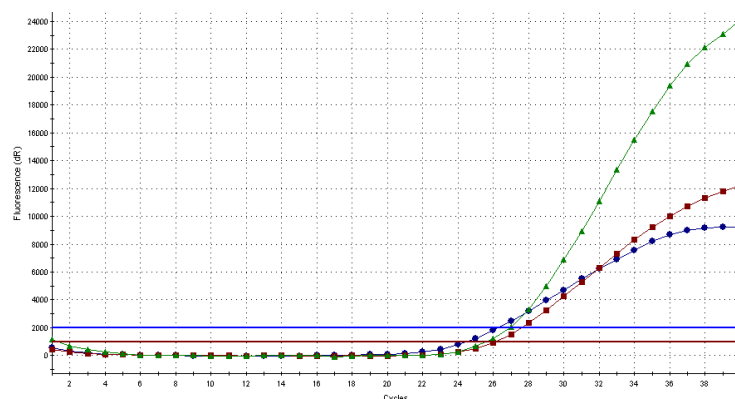
Le SYBR® Green est un agent intercalant se liant à l'ADN double brin. Au cours de l'hybridation des amorces puis de l'élongation du brin d'ADN, il s'intercale entre les deux brins nouvellement synthétisés et émet une fluorescence. Cette dernière, acquise à la fin de l'élongation, est proportionnelle au nombre de produits amplifiés formés. Les inconvénients de cette technologie comprennent une toxicité intrinsèque, bien que moindre par rapport au BET, et surtout un manque total de spécificité, ce produit s'intercalant dans toute molécule d'ADN double brin pouvant entraîner un bruit de fond important. Néanmoins ce manque de spécificité peut être pallié par l'analyse concomitante de la courbe de fusion de l'amplicon, spécifique de sa composition en GC.



**Figure 2 : PCR en temps réel avec SYBR® Green**

**A.** Aspect en sigmoïde de la courbe d’amplification. L’axe des abscisses correspond aux cycles de la PCR, l’axe des ordonnées à l’intensité de fluorescence proportionnelle à la quantité de produit amplifié. Le cycle seuil ou Ct correspond au nombre de cycles nécessaires pour atteindre une valeur de fluorescence seuil supérieure à la fluorescence du bruit de fond. **B.** Aspect de la dérivée primaire de la courbe de fusion. Le pic correspond à la température de fusion du produit amplifié.

La technologie TaqMan® utilise des sondes de 15 à 30 bases, simple brin, linéaires marquées par deux fluorophores : un fluorophore émetteur en 5’ et un fluorophore extincteur ou *quencher* en 3’. Elle s’hybride spécifiquement à sa séquence cible et la proximité des deux fluorophores inhibe l’émission de fluorescence. L’activité exonucléase de l’ARN polymérase permet l’hydrolyse de la sonde hybridée sur sa cible pendant la phase d’élongation entraînant un éloignement des deux fluorophores, permettant une émission de fluorescence par le fluorophore émetteur. Cette technologie présente une sensibilité plus élevée que la PCR temps réel en SYBR® Green et une spécificité élevée grâce à la sonde spécifique de la séquence cible. Ces dernières possèdent également une capacité de multiplexage intéressante par l’emploi de sondes marquées par deux fluorophores émetteurs différents, dont les spectres de détection sont éloignés l’un de l’autre. Par contre, les sondes étant hydrolysées, une courbe de fusion ne peut être effectuée en post-PCR.



**Figure 3 : PCR en temps réel avec sondes TaqMan®**

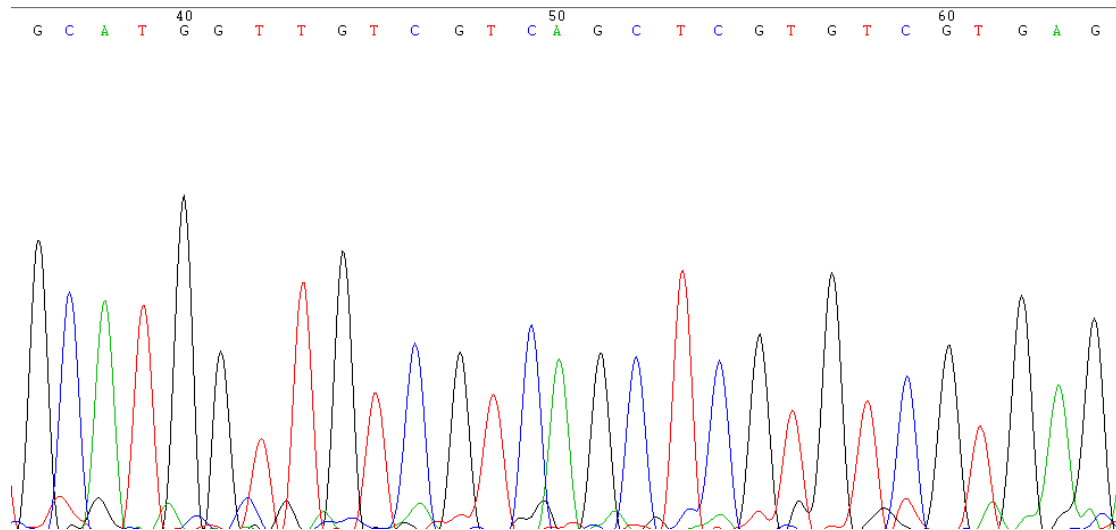
Aspect d’une PCR multiplex en technologie TaqMan®. Amplification d’un échantillon, chaque couleur représente des séquences cibles différentes, mises en évidence à l’aide de sondes marquées par des fluorochromes différents. L’axe des abscisses correspond aux cycles de la PCR, l’axe des ordonnées à l’intensité de fluorescence proportionnelle à la quantité de produit amplifié.

Au final, la PCR en temps réel présente de nombreux avantages par rapport à la PCR classique, dont l'augmentation notable de la sensibilité. De plus, la détection est réalisée en même temps que l'amplification réduisant notablement le temps nécessaire à la détection des produits (environ 1 heure) ; après addition de l'acide nucléique au milieu réactionnel, la réaction s'effectue en milieu fermé diminuant les risques de contamination ; enfin la PCR en temps réel possède une grande capacité de multiplexage permettant l'amplification et la détection simultanées de plusieurs produits en une seule réaction. Cependant un inconvénient réside dans la taille des fragments amplifiés, limités à quelques centaines de paire de bases.

## *(2) Séquençage*

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides d'un fragment d'ADN donné. Il s'effectue principalement d'après la technique de Sanger, technique utilisant la réaction de polymérisation de l'ADN à l'aide d'une ADN polymérase et de didéoxyribonucléotides (ddNTP).

Le principe consiste en une réaction d'amplification où un seul brin de la molécule d'ADN, en pratique un amplicon issu d'une réaction de PCR, sert de matrice. L'élongation de l'amorce est réalisée par l'ADN polymérase thermostable en présence des quatre désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) et des quatre didéoxyribonucléotides (ddATP, ddCTP, ddGTP ou ddTTP). Quand un ddNTP est incorporé, l'élongation s'arrête car la modification de structure empêche la poursuite de la synthèse. La terminaison se fait de manière statistique suivant que l'ADN polymérase utilise l'un ou l'autre de ces nucléotides. Il en résulte un mélange de fragments d'ADN de tailles croissantes, qui se terminent par les différents ddNTP. Ces fragments sont ensuite soumis à une électrophorèse sur séquenceur capillaire : les molécules d'ADN chargées négativement migrent vers l'anode, leur temps de migration variant en fonction de leur taille. A la sortie, la détection des fragments se fait grâce à l'émission de fluorescence des fluorophores excités présents sur les ddNTP, de couleurs différentes en fonction de la base, permettant l'élaboration d'électrophorégrammes [figure 4]. C'est une technique très robuste mais fastidieuse et coûteuse. Actuellement les séquenceurs automatiques permettent de séquencer des fragments d'ADN d'une longueur maximale inférieure à 1000pb.



**Figure 4 : Exemple d'électrophorogramme obtenu par séquençage.**

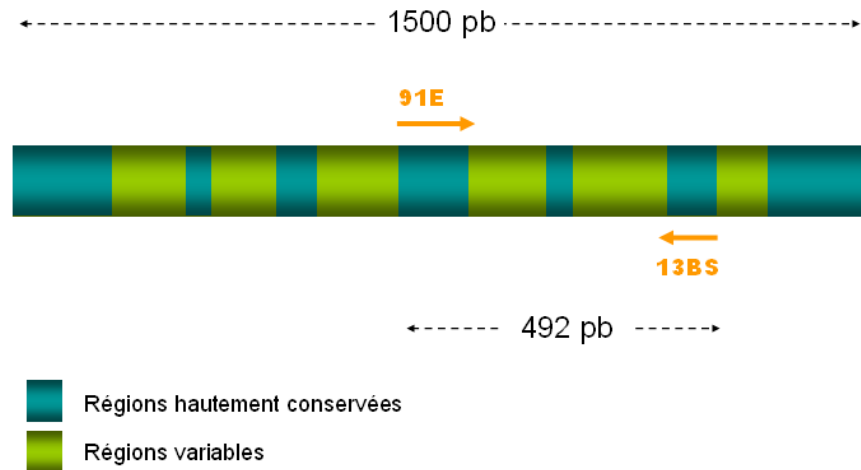
Extrait d'un électrophorogramme : chaque couleur correspond à une base nucléotidique différente, rouge = thymidine, bleu = cytosine, noir = guanine ; vert = adénosine. La hauteur du pic est proportionnelle à la quantité d'un fragment d'une taille donnée.

#### *b. Utilisation de la biologie moléculaire en diagnostic bactériologique*

La biologie moléculaire présente quatre grandes applications en bactériologie clinique. La première est l'identification bactérienne par amplification d'ADN des microorganismes, notamment directement à partir des prélèvements cliniques sans culture préalable. Les autres applications comprennent la recherche de facteurs de virulence, l'étude de la résistance aux antibiotiques ou encore l'étude épidémiologique de souches grâce au typage moléculaire.

L'identification en bactériologie est utilisée lorsque la culture est difficile ou l'identification problématique et envisage deux approches différentes : la PCR universelle ou panbactérienne, associant l'amplification d'une cible commune à toute les bactéries suivie d'un séquençage de cette cible pour l'identification et la PCR spécifique, ciblant un gène spécifique de l'espèce que l'on recherche. Il existe plusieurs PCR universelles ciblant différents gènes tels les gènes *rpoB*, codant pour la sous-unité  $\beta$  de l'ARN polymérase ; *sodA*, codant pour la superoxyde dismutase ; *gyrB* codant pour la sous-unité B de l'ADN gyrase et le gène de l'ARN 16S ribosomal. Chacun de ces gènes est retrouvé chez toutes les bactéries mais certains sont plus discriminants pour certaines espèces comme *rpoB* pour les corynébactéries (69) ou *sodA* pour les streptocoques (88). La cible la plus utilisée reste le gène de l'ARN 16S ribosomal, mesurant 1500 paires de bases et codant un constituant de la petite sous-unité 16S du ribosome bactérien. Il est composé de régions hautement conservées, communes à toutes les bactéries et de régions variables interposées permettant la différenciation inter-espèce (91). Plusieurs techniques ciblant différents fragments de ce gène ont été développées. Leur point commun réside dans le domaine de fixation des amorces, qui se trouve dans des régions hautement conservées du gène. Les régions encadrées par ces

amorces sont quant à elles des régions variables, permettant une discrimination entre espèces. Par exemple, une de ces techniques cible un fragment mesurant 492 paires de bases encadré par les amorces 91E et 13BS (52). [figure 5]



**Figure 5 : Schéma du gène de l'ARN 16S ribosomal**

Gène de 1500pb entrecoupé de régions variables et conservées. Les amorces 91E et 13BS permettent d'amplifier un petit fragment de 492pb permettant l'identification de toute bactérie hors anaérobie.

Après amplification de ce fragment du gène cible, une identification d'espèce peut être réalisée par séquençage de l'ADN amplifié. La séquence obtenue est alors comparée avec les séquences contenues dans les banques de données publiées. Une identification implique un pourcentage d'homologie entre les séquences de 97% au niveau du genre et de 99% au niveau de l'espèce. La seconde approche utilise des PCR spécifiques de pathogènes particuliers. En effet, pour certaines bactéries telles *S. aureus* ou *S. pneumoniae*, des gènes spécifiques d'espèce ont été décrits et leur détection par amplification suffit donc à poser un diagnostic d'espèce. Ces techniques peuvent être mises en œuvre directement sur toutes sortes de prélèvements et sont réalisables en quelques heures, permettant de renseigner la présence ou l'absence d'une espèce bactérienne dans un prélèvement dans des délais très courts. Un résultat doit toujours être analysé en regard du contexte clinico-biologique. Un résultat négatif doit être interprété avec prudence et doit toujours prendre en compte la sensibilité des différentes techniques, étroitement liée avec l'inoculum bactérien supposé dans les prélèvements. Les PCR spécifiques présentent l'avantage d'être plus sensibles que la PCR universelle, plus rapides et plus spécifiques que les cultures pour les germes à croissance lente. Il n'existe pas d'interférence avec des bactéries contaminantes mais un des ses inconvénients est la nécessité d'un diagnostic orienté. L'approche universelle présente l'avantage de ne pas préjuger l'éventuel germe impliqué et de rechercher l'ensemble des bactéries mais a comme inconvénients une moins bonne sensibilité, de pouvoir être à l'origine de difficultés d'identification entre espèces proches, d'avoir un délai de réponse plus long (3 jours environ) et

d'être plus sujette aux contaminations et donc aux faux-positifs. Elle ne peut être effectuée que sur des prélèvements normalement stériles car la présence de plusieurs germes dans un prélèvement peut être à l'origine de séquences nucléotidiques ininterprétables (28).

L'étude de la résistance aux antibiotiques d'un point de vue génique s'avère très intéressante, notamment pour diminuer le temps de réponse au clinicien à propos de la sensibilité d'une souche vis-à-vis de certains antibiotiques. Par exemple, la méticillinorésistance de *S. aureus* est conférée par une PLP additionnelle, la PLP2a codée par le gène *mecA*. Des techniques de PCR spécifique en temps réel ont donc été développées afin de pouvoir renseigner de façon très rapide la présence ou non de ce gène dans une souche de staphylocoque (44). Cette approche moléculaire trouve également son utilité dans l'explication de phénotypes de résistance observés sur antibiogrammes, notamment par la recherche d'intégrons, éléments génétiques bactériens mobiles pouvant contenir plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques.

### *c. Diagnostic des infections oculaires bactériennes par biologie moléculaire*

Le diagnostic par PCR semble une technique particulièrement adaptée aux prélèvements oculaires puisque ce sont des prélèvements de volume limité, à inoculum bactérien faible, mal adaptés au diagnostic conventionnel par culture. Les techniques de biologie moléculaire sont couramment utilisées en pathologie oculaire à la recherche d'étiologies virales car un nombre limité de virus, principalement des Herpesviridae (HSV1, HSV2, VZV, CMV), peut être mis en cause. Pour les infections bactériennes, kératites et endophtalmies, de nombreux microorganismes peuvent être responsables impliquant l'utilisation d'une PCR panbactérienne. Globalement, peu de travaux ont été publiés à ce sujet. Les principales études concernant les endophtalmies aiguës et/ou chroniques, résumées par Chiquet et collaborateurs (28), utilisaient des PCR universelles classiques. Une étude récente effectuée sur des prélèvements d'humeur aqueuse ou de vitré associait une PCR universelle ciblant un fragment de 192pb de l'ARN 16S ribosomal en technologie SYBR® Green, suivie d'un séquençage en cas de positivité de l'amplification, à une PCR multiplex en chimie TaqMan® à partir des mêmes amorces mais avec des sondes s'hybridant au niveau de régions conservées, spécifiques du caractère Gram positif ou négatif permettant d'obtenir une orientation sur l'agent bactérien impliqué. Malgré un faible nombre de prélèvements, cette étude a montré un passage de 47,6% à 95,3% dans la détection et/ou orientation étiologique par rapport à la culture (16), traduisant une sensibilité accrue des techniques de biologie moléculaire sur les prélèvements oculaires (16, 97). Ce versant universel a également été envisagé pour la recherche d'agents fongiques pour lesquels la culture reste à l'heure actuelle fréquemment

difficile. Le gène majoritairement ciblé est celui de l'ARN 18S ribosomal, équivalent de l'ARN 16S ribosomal chez les eucaryotes (104, 110).

En résumé, les principaux avantages du diagnostic bactériologique moléculaire en ophtalmologie sont l'augmentation de la sensibilité de détection, notamment en cas d'antibiothérapie préalable ou de bactéries exigeantes ou non cultivables, et l'identification de bactéries non reconnues jusqu'alors pour être pathogènes. La principale limite réside dans les faibles inocula contenus dans les prélèvements induisant des résultats négatifs malgré une étiologie bactérienne. En ophtalmologie, un résultat négatif n'exclut généralement pas une étiologie infectieuse quand le contexte est favorable (28).



## ***E. Résistance aux antibiotiques***

### **1. Notions de résistance aux antibiotiques (35, 65)**

#### *a. Généralités*

Les antibiotiques agissent sur les bactéries en inhibant des fonctions physiologiques indispensables telles la synthèse de la paroi, la réplication/transcription de l'ADN, la synthèse protéique ou la respiration cellulaire. Pour cela, ils doivent pénétrer dans la bactérie et se fixer sur des cibles moléculaires spécifiques sans être détruits. De nombreux facteurs conditionnent l'activité d'un antibiotique et les bactéries possèdent une multitude de mécanismes entraînant une résistance, variant en fonction des espèces bactériennes et des antibiotiques considérés.

On différencie les résistances naturelles intrinsèques à la bactérie, portées par le chromosome bactérien et pouvant constituer des critères d'identification, et les résistances acquises. Ces dernières concernent une proportion de souches au sein d'une espèce, sont variables dans le temps et l'espace. Une souche bactérienne est résistante à un antibiotique lorsque sa concentration minimale inhibitrice ou CMI est significativement supérieure à celle des souches sensibles, dites sauvages. Les résistances acquises constituent un marqueur épidémiologique.

Les résistances sont dues à des modifications génétiques et leur support est soit chromosomique par mutation, soit extra-chromosomique par acquisition de matériel génétique étranger. Les mutations au niveau d'une région chromosomique préexistante (gène, promoteur...) sont rares et stables, de transmission verticale. Elles touchent en général un seul antibiotique, ou une seule famille sauf si le mécanisme engendré est un mécanisme d'efflux. L'acquisition de matériel génétique extra chromosomique est également de transmission verticale mais surtout de transmission horizontale au sein d'une même espèce et parfois entre espèces différentes. Le transfert de gènes se fait par l'intermédiaire d'éléments mobiles, plasmides et transposons, grâce à différents processus. Les plasmides sont des molécules d'ADN double brin, circulaires et de taille variable capables de réplication autonome, situés dans le cytoplasme et dont le transfert horizontal est surtout conjugatif (transfert génétique unidirectionnel s'effectuant entre des bactéries de « sexes » différents, par formation d'un pont cytoplasmique entre une bactérie donatrice et une bactérie réceptrice). Les transposons sont des séquences d'ADN capables de changer de localisation dans le génome, ne se trouvant jamais à l'état libre, non capables de réplication autonome mais codant pour des déterminants de transposition, mécanisme par lequel ils sont transférés. Celui-ci consiste en l'addition d'un segment d'ADN de taille définie au sein d'un génome (chromosome bactérien ou plasmide) en l'absence d'homologie de séquence nucléotidique.

Les plasmides et transposons sont souvent porteurs de plusieurs gènes de résistance aux et confèrent aux souches qui les hébergent un risque de multirésistance.

### *b. Principaux mécanismes de résistance*

Il existe quatre principaux mécanismes de résistance acquise aux antibiotiques : l'inactivation de l'antibiotique, la modification de la cible de l'antibiotique, la baisse de la perméabilité membranaire et l'efflux actif. Les principaux mécanismes et exemples de cette résistance acquise sont consignés dans le tableau 6.

L'inactivation des antibiotiques est le mécanisme le plus fréquent. Celui-ci consiste en une modification de structure de l'antibiotique lui faisant perdre sa capacité de liaison à la cible. La production de ces enzymes peut être d'origine intrinsèque, codée par un gène porté par le chromosome bactérien, ou extrinsèque, codée par des gènes transmis par des plasmides ou des transposons. Les principales familles d'antibiotiques touchées par ces enzymes sont les  $\beta$ -lactamines et les aminosides. Les  $\beta$ -lactamases inhibent la fixation des  $\beta$ -lactamines sur les protéines liant les pénicillines (PLP) par hydrolyse du cycle  $\beta$ -lactame. Ce mécanisme reste prépondérant, notamment chez les bactéries à Gram négatif. Il existe différents types de  $\beta$ -lactamases tels les pénicillinases, pouvant avoir un spectre restreint mais aussi un spectre plus étendu comme les BLSE ( $\beta$ -lactamases à spectre étendu) capables d'inhiber les céphalosporines de 3ème génération ; les céphalosporinases, portées par le chromosome bactérien ou des plasmides, ou encore des carbapénémases. Pour les aminosides, l'inactivation enzymatique consiste en la modification de résidus hydroxyle (phospho-transférases APH, nucléotidyl-transférases ANT) ou amines (acétyl-transférases AAC). L'inactivation enzymatique est aussi retrouvée pour d'autres familles mais de façon moins fréquente [tableau 6].

La modification de la cible a pour conséquence une diminution de l'affinité des antibiotiques envers leurs cibles cellulaires, soit par production d'une enzyme modifiant ces cibles, soit par substitution ou transformation. La modification enzymatique est le principal mécanisme visant les macrolides, lincosamides et streptogramines B : la méthylation de résidus adénine de l'ARN 23S, par l'intermédiaire d'une méthylase codée par le gène *erm*, stoppe la synthèse peptidique (phénotypes MLSb inductible ou constitutif). Les modifications par mutations sont le résultat de mutations spontanées, diminuant l'affinité des cibles moléculaires pour les antibiotiques. Ce mécanisme a largement été décrit, notamment chez les fluoroquinolones où le principal mécanisme de résistance implique des modifications des cibles que sont l'ADN gyrase (*gyrA*, *gyrB*) et la topo-isomérase IV (*parC*, *parE*). Chez *S. pneumoniae*, une diminution d'affinité des PLP essentielles, induisant une perte de sensibilité pour la pénicilline G, est due à une recombinaison de segments géniques de PLP provenant de streptocoques commensaux avec ceux

de souches de *S. pneumoniae* aboutissant à des PLP mosaïques. La production d'une PLP supplémentaire de faible affinité pour les  $\beta$ -lactamines nommée PLP2a chez les staphylocoques résistants à la méticilline constitue leur mécanisme majeur de résistance aux  $\beta$ -lactamines. Cette protéine est codée par le gène *mecA* localisé dans un élément génétique mobile, la cassette *SCCmec*.

La baisse de la perméabilité concerne surtout les bactéries à Gram négatif car les antibiotiques actifs sur ces bactéries, à l'exception des polymyxines et des aminosides, doivent traverser la membrane externe par diffusion passive à travers les porines. Cette baisse est consécutive à l'obstruction partielle ou totale des porines ou à leur disparition. Le passage peut également être ralenti à cause de mutations touchant le lipopolysaccharide, diminuant l'accessibilité des antibiotiques aux porines. L'exemple le plus fréquent d'imperméabilité concerne la résistance aux carbapénèmes de *P. aeruginosa* par altération, sous-expression ou absence d'une porine spécifique, OprD.

Les systèmes d'efflux sont constitués de protéines jouant le rôle de pompe grâce à l'énergie, produite par hydrolyse de l'ATP ou générée par le gradient électrochimique de la membrane cytoplasmique, aboutissant à l'expulsion de l'antibiotique dès qu'il apparaît dans la cellule bactérienne lui empêchant d'atteindre sa cible. Ils ont été décrits chez plusieurs espèces dont *E. coli* et *P. aeruginosa* et concernent plusieurs familles d'antibiotiques dont les fluoroquinolones, les  $\beta$ -lactamines, les tétracyclines. En fonction des molécules touchées, ils peuvent constituer des systèmes de résistance multiples.

### c. *Notion de bactérie multirésistante*

Les bactéries multirésistantes ou BMR sont définies comme des bactéries résistantes à plusieurs familles d'antibiotiques. Leur apparition et leur diffusion dans les populations humaines constituent l'un des phénomènes émergents majeurs de ces trente dernières années, pouvant aboutir à des situations d'impasse thérapeutique. La multirésistance concerne les bactéries responsables d'infections communautaires et les bactéries responsables d'infections nosocomiales ou associées aux soins. La diffusion des BMR est à l'heure actuelle problématique d'autant plus que les perspectives d'apparition de nouvelles classes d'antibiotiques sont faibles.

Les principales espèces bactériennes concernées par cette multirésistance sont citées ci-dessous (61) :

- Les entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE), pour lesquelles des résistances à d'autres familles d'antibiotiques de nature plasmidique sont souvent associées (fluoroquinolones, aminosides). Ces résistances peuvent conduire à des souches contre lesquelles

**Tableau 6 : Principaux mécanismes de résistance des principales familles d'antibiotiques ciblant les germes courants**

Famille d'antibiotique	Mécanisme de résistance	Principaux exemples <sup>b</sup>	Fréquence <sup>a</sup>
β-lactamines	Inactivation enzymatique	Production de β-lactamase par de nombreux Gram + et -, à l'exception des streptocoques et rare chez les entérocoques	+++
	Altération de cible	Mutations ou recombinaison de gène des PLP chez <i>S. pneumoniae</i> et <i>H. influenzae</i>	+++
	Cible supplémentaire	Acquisition de la PLP2a par les staphylocoques	+++
	Efflux actif	Surproduction du système MexAB-OprM chez <i>P. aeruginosa</i>	++
	Imperméabilité membranaire	Déficit en porine OprD chez <i>P. aeruginosa</i> (carbapénèmes)	++
Aminosides	Inactivation enzymatique	Acquisition d'enzymes ANT, APH ou AAC par de nombreux Gram + et -	+++
	Modification de la cible	Acquisition de méthylases de l'ARN 16S	+/-
	Imperméabilité membranaire	Défaut de transport actif à travers la membrane cytoplasmique	+/-
Macrolides et apparentés	Modification de cible	Acquisition de méthylases de l'ARN 23S	+++
	Efflux actif	Acquisition de systèmes extrinsèques (Gram + surtout) ou surproduction de systèmes intrinsèques (Gram - surtout)	++
Glycopeptides	Modification de cible	Acquisition de déterminants <i>van</i> par les entérocoques et les staphylocoques	+/-
	Séquestration antibiotique	Surproduction d'un peptidoglycane remanié chez <i>S. aureus</i>	+/-
Oxazolidinones	Altération de cible	Mutations dans l'ARN 23S chez entérocoques et staphylocoques	+/-
Quinolones	Altération de cible	Mutations dans les topoisomérases de type II chez les Gram + et -	+++
	Efflux actif	Surproduction de systèmes intrinsèques chez les Gram + et -	++
	Protection de la cible	Acquisition de déterminants <i>qnr</i> par les Gram -	+
	Inactivation enzymatique	Acquisition d'acétylase	+/-
Tétracyclines	Efflux actif	Acquisition de systèmes extrinsèques (protéines Tet) ou surproduction de systèmes intrinsèques	+++
	Protection de cible	Acquisition de déterminants <i>tet(M)</i> , <i>tet(O)</i> , <i>tet(S)</i> par les Gram +	+++
	Inactivation enzymatique	Acquisition de déterminant <i>tet(X)</i> (anaérobies)	+/-
Rifampicine	Altération de cible	Mutations dans l'ARN polymérase	++
	Inactivation enzymatique	Acquisition de l'ADP-ribosyl-transférase Arr-2 par les Gram -	+/-
Fosfomycine	Imperméabilité membranaire	Déficit dans le système de transport du glycérol-3-phosphate	++
	Inactivation enzymatique	Acquisition de déterminants <i>fos</i>	+/-
Metronidazole	Inactivation enzymatique	Acquisition des déterminants Nim chez <i>Bacteroides</i> spp.	+/-
Triméthoprime	Altération de cible	Mutation dans la DHFR	++
	Cible supplémentaire	Acquisition de DHFR de faible affinité	++
	Amplification de cible	Surproduction de la DHFR	+
Sulfamides	Altération de cible	Mutation dans la DHPS	++
	Cible supplémentaire	Acquisition de DHFR de faible affinité	++
Polymyxines	Imperméabilité membranaire	Neutralisation de groupements PO <sub>4</sub> du LPS chez divers Gram -	+/-

D'après (35). a. La fréquence des mécanismes de résistance en France à titre indicatif : rare (+/-), peu fréquent (+), fréquent (++) , très fréquent (+++). b. AAC : aminoside acétyltransférase ; APH : aminoside phosphotransférase ; ANT : aminoside nucléotidyltransférase ; DHFR : dihydrofolate réductase ; DHPS : dihydropteroate synthétase ; LPS : Lipopolysaccharide ; PLP : protéine liant la pénicilline ; - : négatif ; + : positif

aucun antibiotique disponible n'est actif. Les céphalosporinases peuvent également être à l'origine de bactéries multirésistantes lorsqu'elles sont hyperproduites ou dérégulées. En effet, certaines céphalosporinases sont régulées par un répresseur dont une mutation peut entraîner une expression dérégulée de l'enzyme qui est alors capable d'inhiber l'ensemble des pénicillines et les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération.

- Les autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa* producteur de céphalosporinase dérégulée, et *Acinetobacter baumannii*. La multirésistance chez *P. aeruginosa* est définie par l'association de la résistance aux fluoroquinolones, aux carbapénèmes, aux céphalosporines à large spectre et aux aminosides résultant de plusieurs mécanismes de résistance, de nature chromosomiques ou plasmidique. Les infections à *Acinetobacter baumannii* multirésistantes aux antibiotiques et notamment à l'imipénème ont émergé depuis une dizaine d'années, conduisant à des situations d'impasses thérapeutiques.

- Les entérocoques, par résistance aux glycopeptides. Ce sont des bactéries commensales du tube digestif de l'homme naturellement peu sensibles à la pénicilline, résistantes aux céphalosporines et aux faibles concentrations de clindamycine et d'aminosides. L'utilisation massive de glycopeptides a exercé une pression de sélection sur les entérocoques et a induit l'émergence de souches résistantes dès la fin des années 1980 (73). En France, la prévalence de la résistance des entérocoques aux glycopeptides reste faible à l'heure actuelle (< 2 %).

- *Staphylococcus aureus* par résistance à la méticilline (SARM). Plus de 90 % des souches produisent une pénicillinase mais les pénicillines à activité anti-staphylococcique telles l'oxacilline restent actives. Cependant des souches hospitalières, et plus récemment communautaires ont développé un mécanisme de résistance par production de PLP2a codée par le gène *mecA*. Ce dernier peut être accompagné de gènes de résistance à d'autres familles d'antibiotiques, expliquant le profil de multirésistance que l'on observe chez les SARM hospitaliers. Les glycopeptides représentent l'alternative thérapeutique de choix malgré la description de souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides. Cette diminution de sensibilité est le plus souvent hétérogène et de détection difficile mais indispensable car ces souches sont responsables d'échecs thérapeutiques.

Dans la plupart des cas, la résistance aux antibiotiques n'émerge pas directement chez les bactéries pathogènes mais d'abord chez des bactéries non pathogènes, commensales ou environnementales, sous la pression des antibiotiques massivement utilisés (médecine humaine et vétérinaire, élevage et agriculture). Les bactéries sont ensuite capables de transférer horizontalement des gènes de résistance acquis, notamment par l'intermédiaire d'intégrons (78).

Plusieurs communiqués ont été publiés afin d'alerter sur la situation actuelle et des mesures visant à réduire la consommation d'antibiotiques et à dépister les patients porteurs asymptomatiques de ces BMR ont été prises (56, 61).

## 2. Intégrons, support de résistance aux antibiotiques (12, 25)

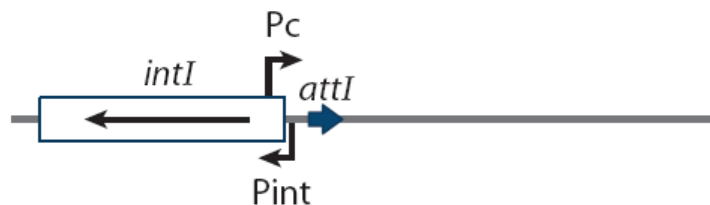
### a. Généralités sur les intégrons

Les intégrons sont des éléments génétiques bactériens constituant un vecteur majeur de résistance aux antibiotiques. Ils ont été décrits en 1989 par une équipe australienne (98) et sont définis comme un système de capture et d'expression de gènes sous forme de cassettes, éléments génétiques mobiles capables d'être intégrés ou excisés par un mécanisme spécifique de site catalysé par une intégrase. Ce sont des éléments non capables d'autoréplication qui se situent soit sur des éléments mobiles tels les transposons ou les plasmides ou plus rarement dans le chromosome bactérien. A ce jour, 130 cassettes différentes portant divers gènes de résistance aux antibiotiques ont été identifiées dans les intégrons portés par des éléments mobiles, rendant majeure leur implication dans la dissémination de la résistance.

### b. Structure et fonctionnement

Tous les intégrons sont constitués d'une plateforme fonctionnelle stable, immobile, la région 5' *conserved segment* ou 5'CS, associée à une région variable composée des cassettes. Les principaux composants de la région 5' CS sont : [figure 6]

- un gène *intI*, codant pour une recombinase à tyrosine spécifique de site ou intégrase, enzyme catalysant les processus d'intégration ou d'excision spécifiques des cassettes. L'expression de ce gène est assurée par un promoteur nommé *Pint*.
- un site spécifique de recombinaison *attI*, immédiatement adjacent au gène *intI*, comportant des sites d'attachement de l'intégrase *intI*.
- un promoteur *Pc*, assurant l'expression des cassettes situées en aval. Ce promoteur joue un rôle très important pour le fonctionnement de l'intégron car la majorité des cassettes ne possède pas de promoteur propre.



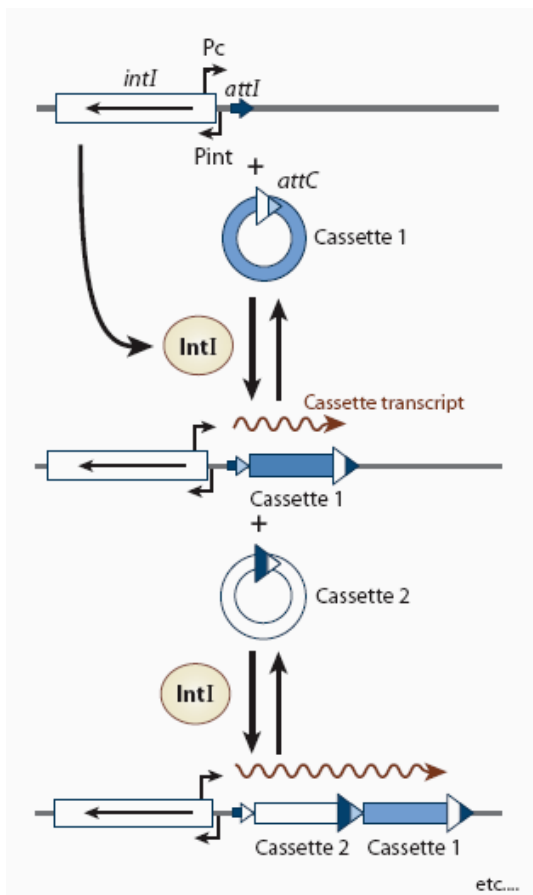
**Figure 6 : Schéma général de la plateforme fonctionnelle des intégrons**

La partie stable des intégrons est composée d'un gène *intI* codant pour une intégrase, d'un site de recombinaison spécifique *attI* et du promoteur des cassettes *Pc*.

Cinq classes d'intégrons ont été décrites à partir de la séquence des gènes des intégrases. Les principales classes impliquées dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques sont les trois premières bien que les cinq aient été associées à l'antibiorésistance. Les intégrons de classe 1 et 2 possèdent une seconde région conservée en 3', la région 3' *conserved segment* ou 3'CS.

La région variable, se situant en aval du site *attI*, est composée de cassettes de taille et de fonction variables mobilisables par les intégrases. Une cassette est définie par un gène, pouvant coder pour une résistance, immédiatement suivi par un site de recombinaison *attC* spécifiquement reconnu par l'intégrase. Les cassettes se trouvent à l'état linéaire au sein de l'intégron mais leur excision en fait des entités circulaires, non répliquatives.

Le mouvement des cassettes a principalement été étudié pour les intégrons de classe 1. L'intégrase codée par le gène *intI* catalyse préférentiellement la réaction de recombinaison entre le site *attI* de la plateforme et le site *attC* de la cassette, qui aboutit à l'intégration de la cassette sous forme linéaire au sein de l'intégron au niveau du site *attI*. Elle est également capable de catalyser une réaction entre les régions *attC* de deux cassettes, ce qui aboutit à l'excision d'une cassette. Le mouvement des cassettes se fait donc par insertion-excision par un mécanisme de recombinaison entre deux sites spécifiques catalysé par l'intégrase [figure 7]. Plusieurs cassettes peuvent exister sur un même intégron, ce qui peut conférer une résistance en bloc à plusieurs familles d'antibiotiques pour la bactérie qui l'héberge.



**Figure 7 : Modèle de capture de gènes médiée par les intégrons et d'échange de cassettes.**

Les cassettes circulaires sont insérées de façon répétée au site spécifique de recombinaison *attI* adjacent au promoteur Pc. Elles sont excisées au niveau de sites *attC*. *intI* : gène codant pour une intégrase ; IntI : intégrase. D'après (25).

### c. *Epidémiologie des intégrons*

Les 3 principales classes d'intégrons de résistance ont une prévalence importante aussi bien en microbiologie clinique que dans l'environnement ou chez l'animal. Les intégrons de classe 1 sont les plus prévalents et les plus étudiés. Cet intérêt réside dans leur très grande variabilité en cassettes aboutissant à des résistances plus diverses que les autres classes d'intégrons où les cassettes sont plus stables. Par exemple, les intégrons de classe 2 possèdent une intégrase IntI 2 non fonctionnelle limitant les phénomènes de réarrangement des cassettes. Néanmoins leur association systématique aux gènes de transposition *tns* leur confère une mobilité importante et une mutation dans le codon stop peut rendre l'intégrase opérationnelle. Les intégrons de classe 3 sont beaucoup moins décrits en microbiologie clinique mais présentent une intégrase fonctionnelle capable de recombinaison telle IntI 1.

Les bactéries hôtes sont principalement des bactéries à Gram négatif, notamment les entérobactéries où quasiment toutes les espèces ont été décrites comme pouvant héberger des intégrons. Les autres bactéries à Gram négatif hébergeant fréquemment des intégrons incluent *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* et d'autres espèces ayant été décrites mais de façon beaucoup plus rare. Du côté des bactéries à Gram positif, les genres décrits comme abritant potentiellement des intégrons sont *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* et *Streptococcus*.

Les intégrons de résistance ont été largement décrits dans des prélèvements cliniques de tout type et chez tout patient. Leur prévalence est difficile à évaluer, notamment par absence de recherche dans certains prélèvements. Les données les plus abondantes concernent les bactéries isolées du tractus urinaire, où des études évoquent une prévalence des intégrons de classe 1 aux alentours de 50% (112, 117) et des bactéries isolées d'hémocultures où la prévalence apparaît plus faible. La présence d'un intégron dans une souche bactérienne et la résistance aux antibiotiques paraissent significativement associées. Les cassettes prédominantes sont *dfr* et *aad* conférant respectivement une résistance au triméthoprimé et aux aminosides.

### **3. Prévalence des germes résistants au niveau des cornées**

Plusieurs études ont été menées afin de mettre en évidence les résistances aux antibiotiques des germes présents au niveau de la cornée, notamment dans le but de prévenir par une prophylaxie antibiotique adaptée les endophtalmies causées par la flore du receveur. Conformément à la composition de la flore cornéenne, ce sont les SCN, notamment *S. epidermidis* et *S. haemolyticus*, qui ont été les plus étudiés car majoritaires. Une équipe a montré dans différentes études que ces SCN, représentant environ 80% des souches isolées, étaient résistants à la pénicilline G dans 82% à 90% des cas, à la méticilline dans environ 35% à 47% des cas et se



révélaient multirésistants dans 28% à 35% des cas (81, 82, 100, 101). Ces germes multirésistants étaient observés chez 33% des patients dont la cornée était colonisée (81). La méticillinorésistance suivait l'évolution décrite par Davis et collaborateurs, avec une tendance à l'augmentation (36), et elle était considérablement plus élevée que dans une étude japonaise qui relatait seulement 1,6% de SCN méti-R (68). Ces différences entre études peuvent être expliquées par les différences de distribution des souches en fonction des zones géographiques et l'augmentation globale de la résistance aux antibiotiques. Ces SCN étaient résistants à l'érythromycine dans près de la moitié des cas, restaient sensibles à la vancomycine de façon constante et présentaient une sensibilité aux fluoroquinolones et aux aminosides dans une très grande majorité des cas. Les autres germes mis en évidence dans ces études, notamment *S. aureus*, les streptocoques et les bacilles à Gram négatif isolés étaient beaucoup moins sujets à l'antibiorésistance que les SCN.

Ces résultats concernent la flore de patients et non de donneurs bien que ces flores soient comparables (45). Une étude ancienne se focalisant sur la flore cornéenne des donneurs, décrivait également une présence prépondérante de SCN, notamment *S. epidermidis*. Elle faisait état d'une résistance à la méticilline pour 30% des *S. epidermidis* et à la gentamicine pour 82%. Près de 50% des germes isolés de façon globale étaient résistants à la gentamicine, soulevant le problème de l'adéquation des antibiotiques utilisés dans les milieux de conservation des greffons (96). Une augmentation de la résistance à la vancomycine des germes à Gram positif a en outre été rapportée par plusieurs équipes au cours des dernières années (90, 103). Une autre étude où *P. aeruginosa* apparaissait prépondérant après désinfection des cornées montrait une tendance des souches isolées à résister à la majorité des antibiotiques testés, notamment les aminosides (103). Plus récemment, une étude portant sur la flore cornéenne de donneurs et de receveurs et se focalisant sur les SCN et leurs résistances a montré que les germes isolés de cornées de donneurs avaient plus tendance à acquérir des résistances après une courte exposition aux antibiotiques que ceux des receveurs. Ceci était notamment expliqué par la mise en place des cornées des donneurs dans un environnement clos dans lequel les transferts de résistance sont favorisés (115). Ces différents travaux montrent surtout que les antibiotiques présents dans les milieux de conservation n'avaient pas forcément une activité optimale contre les germes colonisant la cornée des donneurs, notamment à cause de la résistance à la gentamicine (45, 103, 115) ou à la ciprofloxacine (115). Ritterband et collaborateurs font état d'un taux de contamination de 11,9% avec les milieux classiques et une diminution de ce taux à 2,5% par ajout de moxifloxacine dans les milieux de conservation. Ceci est expliqué par la forte prévalence de germes résistants à la gentamicine mais restant sensibles à la moxifloxacine au niveau des cornées. Les équipes ayant ciblé la contamination dans les milieux d'organoculture font état de niveaux de résistance élevés chez les germes isolés (17, 62, 118), qui sont fréquemment des

SCN, et que les antibiotiques présents dans les milieux ne permettent pas de s'affranchir de ces contaminants (17).

De façon plus anecdotique, des cas d'endophtalmies post-kératoplastie ont été décrits avec comme étiologie bactérienne des germes hautement résistants aux antibiotiques, tels *E. faecium* résistant à la vancomycine ou *S. maltophilia* dont l'origine la plus probable a été établie comme une contamination de la cornée du donneur (10, 27).

A ce jour, aucune étude n'a étudié le versant génétique de la résistance aux antibiotiques dans les prélèvements cornéens, notamment la présence d'éléments mobiles comme les intégrons.

## II. Introduction à l'étude expérimentale

---

Toute chirurgie de greffe expose à un risque de contamination bactérienne du donneur vers le receveur. Cette transmission de bactéries est susceptible d'entraîner une endophtalmie ou une kératite post-opératoire lors d'une greffe de cornée.

En France, la cornée est prélevée en même temps que son anneau scléral dans des conditions d'asepsie stricte, après désinfection à la povidone iodée (Bétadine®). Le greffon est immédiatement plongé dans un milieu d'organoculture contenant des antibiotiques (pénicilline G et streptomycine), il est acheminé à la banque de tissus puis il est conservé à 31°C pendant 2 à 4 semaines. Les critères de validation du greffon pour être délivré à un chirurgien en vue d'une greffe sont multiples, l'absence de contamination bactérienne sur les milieux d'organoculture étant primordiale. C'est pourquoi des prélèvements bactériologiques sont effectués de façon systématique sur les différents milieux utilisés.

Les études d'épidémiologie bactérienne portant sur la colonisation des donneurs ont montré des taux de culture positive variant de 24,7% à 88,8% avant désinfection de la surface oculaire. Les germes sont majoritairement des bactéries à Gram positif, proches de la flore conjonctivale. Les procédures prophylactiques (désinfection de surface du donneur et conservation dans un milieu enrichi en antibiotiques) permettent de diminuer notablement la contamination du greffon. Ceci a été vérifié systématiquement, en revanche, il semblerait qu'après désinfection, les bactéries à Gram négatif soient retrouvées en plus grande proportion et que les bactéries présentes dans les milieux intraoculaires soient préférentiellement des germes de la flore digestive provenant d'une décharge bactériémique péri-mortem. Les études de contamination réalisées durant l'organoculture font état d'une majorité de bactéries à Gram positif lors des contaminations détectées pendant la phase de conservation et d'une augmentation relative des germes à Gram négatif pendant la phase de déturgence.

Le problème de la résistance aux antibiotiques des bactéries retrouvées au niveau de la flore bactérienne cornéenne ou acquises durant la conservation cornéenne peut devenir problématique, les germes isolés étant potentiellement nosocomiaux ou connus pour être multirésistants. Ces différents éléments soulèvent la question de l'adéquation des antibiotiques contenus dans les milieux de culture.

Les différentes études sur la contamination du donneur ont permis de prendre en compte des facteurs de risque bactériens liés au donneur. Un décès par cancer ou dans un établissement hospitalier pourrait augmenter les risques de transmission microbiologique du donneur vers le receveur et les données concernant les donneurs septicémiques au moment de leur mort sont

contradictoires. Aucune étude à ce jour ne s'est intéressée à l'influence des conditions de conservation du corps du donneur de l'heure du décès jusqu'à l'heure du prélèvement des greffons cornéens.

Le diagnostic microbiologique des infections oculaires se fait classiquement par culture conventionnelle. Néanmoins, afin d'optimiser la détection de micro-organismes responsables d'infections telles les endophtalmies, des techniques de biologie moléculaire comme la PCR panbactérienne visant l'ARNS 16S ribosomal peuvent être utilisées de façon complémentaire à la culture conventionnelle, permettant notamment de rattraper le diagnostic dans certains cas où la croissance des agents pathogènes s'avère difficile.

Une première étude réalisée dans notre centre avait permis d'apporter des éléments utiles sur la contamination bactérienne des donneurs de cornée (93). Dans le but de limiter les risques de perte de greffon pour raison bactériologique, une nouvelle étude observationnelle de la population bactérienne présente autour de la cornée du donneur a été mise en place. Cette étude prospective présente l'avantage de suivre le greffon dès le prélèvement du donneur jusqu'à la greffe. L'objectif principal a été d'évaluer la contamination bactérienne tout au long du cheminement du prélèvement, en débutant par un état des lieux des flores cornéennes et conjonctivales puis en estimant la contamination de tous les milieux d'organoculture et en recherchant la présence de germes dans les anneaux scléraux, résidus opératoires récupérés au moment de la greffe. Les objectifs secondaires ont été multiples : évaluer la prévalence de la résistance bactérienne et celle de bactéries multirésistantes au niveau de chaque type de prélèvement réalisé ; identifier les facteurs relatifs au donneur ou à la conservation du corps associés avec la présence d'un germe bactérien sur les prélèvements réalisés ; identifier la présence de bactéries dans les prélèvements sanguins post mortem afin de mettre en évidence une éventuelle relation entre les germes sanguins et oculaires. Le recueil d'informations sur le donneur a eu pour but d'étudier les liens donneur/contamination du greffon déjà mis en évidence par certains auteurs mais également ceux non envisagés jusqu'à maintenant comme les conditions de conservation du corps. Le troisième aspect de cette étude a été d'introduire de façon systématique l'utilisation de la biologie moléculaire pour la recherche des germes colonisant la cornée par l'intermédiaire d'une PCR panbactérienne. D'autre part, la recherche d'intégrons s'est montrée intéressante à explorer afin d'apprécier la prévalence de ces supports de résistance aux antibiotiques au niveau des greffons cornéens.

### **III. Matériels et méthodes**

---

#### ***A. Inclusions***

Toute personne décédée entre le 15 mars 2010 et le 22 février 2011 pour laquelle des prélèvements de cornées ont pu être effectués au CHU de Limoges était susceptible d'être incluse dans la population d'étude. Durant cette période, 78 donneurs ont été prélevés parmi lesquels 64 ont été inclus dans l'étude.

#### ***B. Prélèvements biologiques***

Pour chaque inclusion, les deux cornées ont été prélevées. L'étude peut être séparée en trois phases distinctes pour lesquelles des prélèvements biologiques ont été réalisés [Annexe 1] :

1. au moment du prélèvement des cornées
2. pendant la conservation du greffon à la banque de tissu (entre le prélèvement et la greffe)
3. au moment de la greffe ou du rejet du greffon

##### **1. Prélèvements effectués chez le donneur**

L'ophtalmologiste effectuait en collaboration avec l'infirmière coordinatrice le prélèvement des deux cornées ainsi que différents prélèvements spécifiques au protocole [Annexe 1]. Ces derniers étaient de deux types, oculaires et sanguins, et accompagnés d'une fiche de saisie « donneur » anonymisée comportant plusieurs renseignements sur le donneur : jour et heure de décès ; délai décès-prélèvement ; durée de réfrigération du corps ; cause du décès ; pathologies associées au moment du décès ; sepsis ou immunodépression au moment du décès. La durée cumulée d'hospitalisation pendant les 6 mois précédant le décès du donneur était également relevée. L'ensemble des prélèvements et la fiche étaient acheminés rapidement au laboratoire de Bactériologie pour traitement.

##### ***a. Prélèvements oculaires***

Les prélèvements oculaires ont été au nombre de trois pour une cornée. Les deux premiers consistaient en deux écouvillonnages, l'un au niveau du cul de sac conjonctival, l'autre au niveau du limbe scléro-cornéen avant désinfection et prélèvement de la cornée. Ceux-ci ont été effectués avec le dispositif ESwab® (Copan, Brescia, Italie), composé d'un écouvillon floqué de fibres de nylon et d'un milieu de transport, le liquide d'Amies (tampon phosphate inorganique, sels de calcium et de magnésium, chlorure de sodium en présence d'un milieu réducteur à base de thioglycolate de sodium), permettant la mise en culture et l'isolement de bactéries ainsi que la

réalisation de tests moléculaires (33). Le troisième prélèvement consistait en une ponction de chambre antérieure après désinfection à la povidone iodée (Bétadine®). L'humeur aqueuse prélevée était également transférée dans un milieu de transport ESwab®.

### *b. Prélèvements sanguins*

Au niveau du même point de ponction, après désinfection à la povidone iodée (Bétadine®) étaient prélevés une série d'hémocultures (flacon aérobie et flacon anaérobie, BacT/Alert®, bioMérieux) et un tube EDTA (Vacutainer®, Becton-Dickinson) afin de rechercher la présence de germes dans le sang par biologie moléculaire.

## **2. Prélèvements provenant de la Banque de tissus**

Les cornées incluses dans le protocole ont été prises en charge par la banque de tissus du Limousin du 15 mars 2010 au 31 décembre 2010 puis par la banque de tissus d'Aquitaine du 1<sup>er</sup> janvier 2011 au 25 mars 2011.

De manière générale, des prélèvements pour recherche bactériologique ont été effectués à chacune des différentes étapes de la conservation du greffon. Les premiers prélèvements étaient obtenus au moment du transfert du greffon du milieu de transport CorneaPrep II® vers le milieu de conservation CorneaMax®, effectué dans un délai de 3 à 5 jours après prélèvement de la cornée. Les seconds prélèvements étaient effectués au moment du transfert du milieu CorneaMax®, à l'issue de la conservation du greffon, vers le milieu de déturgescence CorneaJet® (environ 48 heures avant la greffe). Si les milieux (CorneaPrep II® et CorneaMax®) étaient limpides, les techniciennes de la banque de tissus ensemençaient, après transfert du greffon, 2 flacons d'hémocultures (aérobie et anaérobie), selon une procédure habituelle de contrôle microbiologique, et prélevaient un aliquote de 1mL de milieu en tube de cryoconservation pour recherche de génome bactérien par biologie moléculaire. Si les milieux présentaient des signes de contamination (milieux troubles), la cornée était rejetée et acheminée au laboratoire dans le milieu contaminé.

Une fiche de saisie « banque » comportant plusieurs renseignements sur le greffon (qualité du greffon, comptage endothélial, résultat des sérologies virales, validation de la cornée pour la greffe) était transmise au laboratoire par la banque de tissus pour toute cornée, rejetée ou greffée.

## **3. Prélèvements reçus du bloc opératoire d'ophtalmologie**

En cas de validation pour greffe, le greffon cornéen était acheminé au bloc opératoire dans son milieu de déturgescence CorneaJet®. Le chirurgien ophtalmologiste, après la kératoplastie faisait parvenir les résidus opératoires (anneau scléral) au laboratoire dans le milieu CorneaJet® pour traitement bactériologique.

## C. Diagnostic bactériologique usuel

### 1. Mise en culture des prélèvements

Les prélèvements oculaires se trouvant dans les milieux de transport ESwab® ont été traités de la même façon quelle que soit la localisation du prélèvement (écouvillonnage cul de sac conjonctival ; écouvillonnage limbe scléro-cornéen ; ponction humeur aqueuse) : 200 µL de milieu de transport où le prélèvement a été déchargé étaient prélevés stérilement sous hotte à flux laminaire avec des gants puis répartis sur 2 géloses solides (Columbia au sang ; Chocolat Polyvitex), sur lesquels l'ensemencement s'effectuait en quadrants, et dans un bouillon de Schaedler. Les incubations et lecture des milieux de culture ayant été utilisés sont consignées dans le tableau 7. Le volume restant des ESwab® était congelé à -80°C pour la biologie moléculaire.

**Tableau 7 : Incubation et lecture des différents milieux de culture.**

Type de gélose	Fournisseur	Incubation	Lecture
Gélose Columbia + sang de mouton	Oxoid	anaérobiose, 37°C	48h, 5j
Chocolat Polyvitex	bioMérieux	atmosphère + 5% CO <sub>2</sub> , 37°C	48h
Bouillon de Schaedler	bioMérieux	atmosphère, 37°C	48h, 5j

Le bouillon de Schaedler était repiqué de façon systématique au bout de 48h d'incubation sur deux géloses Columbia au sang, l'une placée en atmosphère additionnée de 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C, l'autre placée en anaérobiose à 37°C. La lecture de ces repiquages se faisait à 48 heures. Toute culture positive était traitée selon les techniques habituelles du laboratoire avec identification et antibiogramme des germes isolés, détaillées ci-dessous [tableaux 8 et 9].

Les milieux d'organoculture arrivant dans leur récipient d'origine, milieu de déturgescence après greffe (CorneaJet®) ou milieu contenant une cornée rejetée (CorneaMax® ou CorneaPrepII®) étaient ensemencés en flacons d'hémocultures et en tube de cryoconservation au laboratoire sous hotte à flux laminaire avec des gants.

Les flacons d'hémocultures ensemencés avec des prélèvements sanguins ou les milieux d'organoculture étaient incubés dans l'automate BacT/ALERT® pour une durée de 10 jours. Si les flacons étaient détectés comme positifs, un examen direct, une subculture, une identification et un antibiogramme étaient réalisés. Le tube EDTA et les aliquotes de 1 mL de milieu étaient congelés à -80°C pour la biologie moléculaire.

L'anneau scléral ou la cornée était séparé en 2 : une moitié pour la culture, une moitié congelée à -80°C pour la biologie moléculaire. La moitié de l'anneau scléral (ou de la cornée) destinée à la culture était prédécoupée en plusieurs morceaux de façon stérile, sous hotte, puis

broyée manuellement dans 200µL d'eau stérile. Le broyat était ensemencé de la même façon que les ESwab®, comme expliqué ci-dessus.

## 2. Isolement et identification de bactéries

Toutes les colonies de morphologie différente retrouvées sur les milieux gélosés étaient isolées selon les techniques habituelles du laboratoire. Un état frais et/ou une coloration de Gram ont été réalisés sur chacune des colonies. Lorsque cela était nécessaire pour l'orientation diagnostique, des tests rapides tels la recherche d'une catalase ou d'une oxydase étaient effectués.

L'identification des différentes bactéries était effectuée à l'aide de galeries d'identification biochimique manuelles interprétées à l'aide du système miniAPI® (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) ou lues par l'automate Vitek® 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Les différentes galeries utilisées en fonction des souches bactériennes isolées sont consignées dans le tableau 8.

**Tableau 8 : Galeries d'identification utilisées en fonction de la bactérie isolée.**

Type de bactérie				Galerie d'identification	
				Nom	Fournisseur
Aérobie ou aéro- anaérobie facultatif	Bacille	Gram négatif	Type entérobactérie	Vitek® 2 GN	bioMérieux
			Non fermentaire		
	Coccobacille	Gram négatif	-	API® NH	bioMérieux
			-	API® coryné	bioMérieux
	Bacille	Gram positif	Type corynébactérie	RapID™ CB Plus	Remel
			Autres	-	-
	Cocci	Gram positif	Type staphylocoque	Vitek® 2 GP	bioMérieux
			Type streptocoque	Rapid ID 32 Strep	bioMérieux
			Type entérocoque	Vitek® 2 GP	bioMérieux
			-	API® NH	bioMérieux
Anaérobie	Bacille/Cocci	Gram positif/négatif	-	Rapid ID 32 A	bioMérieux

## 3. Antibiogramme

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques des souches isolées a été réalisée à l'aide de l'automate Vitek® 2 grâce aux cartes consignées dans le tableau 9 ou par la technique de diffusion en milieu gélosé selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) (32). La lecture des milieux gélosés s'effectuait à l'aide du système SirScan® micro+ (I2A, Pérols, France).



**Tableau 9 : Techniques d'antibiogramme en fonction de la bactérie isolée.**

Type de bactérie			Antibiogramme				
			Méthode	Matériel	Fournisseur		
Aérobie ou aéro- anaérobie facultatif	Bacille	Type entérobactérie	automatisé Vitek® 2	AST-N103	bioMérieux		
		Gram négatif	Non fermentaire	automatisé Vitek® 2	AST-N093	bioMérieux	
				diffusion en milieu gélosé	Mueller Hinton 2	bioMérieux	
		Coccobacille	Gram négatif	-	diffusion en milieu gélosé	Chocolat Polyvitex®	bioMérieux
	Bacille	Gram positif	Type corynébactérie	diffusion en milieu gélosé	Mueller Hinton 2 + 5% sang mouton	bioMérieux	
			Autres	diffusion en milieu gélosé	Mueller Hinton 2 + 5% sang mouton	bioMérieux	
		Cocci	Gram positif	Type staphylocoque	automatisé Vitek® 2	AST-P581	bioMérieux
				Streptocoque	diffusion en milieu gélosé	Mueller Hinton 2 + 5% sang mouton	bioMérieux
	Cocci	Gram positif	Type Streptocoque	semi-automatisée	ATB™ Strep	bioMérieux	
				diffusion en milieu gélosé	Mueller Hinton 2 + 5% sang mouton	bioMérieux	
		Gram négatif	Type Entérocoque	automatisé Vitek® 2	AST-P606	bioMérieux	
			-	diffusion en milieu gélosé	Chocolat Polyvitex®	bioMérieux	
Anaérobie	Bacille	Gram positif	-	diffusion en milieu gélosé	Mueller Hinton 2 + 5% sang mouton	bioMérieux	
			Gram négatif	-	semi-automatisée	ATB™ Ana	bioMérieux
	Cocci	Gram positif/négatif	-	diffusion en milieu gélosé	Mueller Hinton 2 + 5% sang mouton	bioMérieux	
				diffusion en milieu gélosé	Mueller Hinton 2 + 5% sang mouton	bioMérieux	

## D. Biologie moléculaire

### 1. Extraction de l'ADN

L'ADN de l'ensemble des prélèvements était extrait à l'aide de l'automate NucliSens® easyMag (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) selon les recommandations du fabricant. La lyse des échantillons pouvait se faire directement dans l'automate (« lyse embarquée », durée 10 minutes) ou avant de mettre en place l'échantillon dans l'automate (« tube lysé »). Les paramètres de prétraitement ou d'extraction différaient en fonction des prélèvements, ils sont consignés dans le tableau 10.

**Tableau 10 : Prises d'essai, prétraitements et paramètres d'extraction des prélèvements.**

Type de prélèvement	Prise d'essai	Prétraitement	Lyse	Volume de silice	Volume d'élution
Cul-de-sac conjonctival Limbe scléro-cornéen	500 µL	30 µL de protéinase K, incubation 30 min à 56°C	embarquée	50 µL	50 µL
Humeur aqueuse	800 µL	40 µL de protéinase K, incubation 30 min à 56°C	embarquée	50 µL	50 µL
Sang	200 µL	-	tube lysé extemporanée	140 µL	110 µL
Milieux d'organoculture					
CorneaPrepII® CorneaMax® CorneaJet®	500 µL	30 µL de protéinase K, incubation 30 min à 56°C	embarquée	50 µL	50 µL
Anneau-scléral (AS) Cornée (C)	400 µL après prétraitement	- Mise en place d' ½ AS ou C + 600 µL PBS en tube Lysing Matrix A/D (MP Biomedicals)  - 2 cycles de broyage mécanique en FastPrep™ (MP Biomedicals) [Speed 6.0, Time 40s] séparés par une incubation de 5 minutes dans la glace et un pulse  - 30 µL de protéinase K, incubation 30 min à 56°C  - Centrifugation : 15 min 13000 tours/min à 4°C	tube lysé 1 heure	50 µL	50 µL

L'ADN extrait était ensuite conservé à -80°C jusqu'à utilisation.

## 2. Amplification génique

L'amplification génique a été utilisée à deux fins :

- La détection d'ADN bactérien par PCR en temps réel, en technologie SYBRGreen®. Le gène cible était celui de l'ARN 16S ribosomal et la recherche était effectuée sur tous les extraits d'ADN dont la mise en culture du prélèvement s'était révélée négative ou monobactérienne.
- La détection des trois classes d'intégrons de résistance aux antibiotiques, par PCR triplex en temps réel, à l'aide de sondes TaqMan® marquées par trois fluorophores différents (11). Elle était réalisée de façon systématique sur les prélèvements oculaires effectués à J1, chez toute souche de bactérie à Gram négatif isolée d'un prélèvement oculaire ainsi que chez toute souche isolée d'un prélèvement dont la recherche d'intégrons s'était avérée positive.

En parallèle de ces deux amplifications était effectuée une PCR ciblant la  $\beta 2$  microglobuline, gène de ménage présent dans toute cellule humaine. Cette troisième réaction était quant à elle précédée sur l'ensemble des ADN extraits des prélèvements oculaires effectués à J1 et sur tout ADN issu d'autres prélèvements mais sélectionné pour la recherche d'ARN 16S ribosomal, comme témoin d'extraction et d'absence d'inhibiteurs dans les prélèvements. Elle a été réalisée grâce à la chimie SYBRGreen®.

Les amorces et sondes utilisées sont relatées dans le tableau 11.

**Tableau 11** : Séquences et caractéristiques des amorces et sondes utilisées

Gène cible	Amorces et sondes	[C] ( $\mu$ M)	Séquence (5'-3')	Amplicon		Réf
				Taille	Température de fusion	
ARN 16S petit fragment	91E	20	TCA AAK GAA TTG ACG GGG GC	492 pb	87°C	(52)
	13BS		CAA GGC CCG GGA ACG TAT A			
$\beta 2$ micro globuline	$\beta$ GLO1	20	ACA CAA CTG TGT GTT CAC TAG C	110 pb	84°C	-
	$\beta$ GLO2		CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC			
<i>int11</i>	<i>int11-LC1</i>	10	GCC TTG ATG TTA CCC GAG AG	196 pb	-	(11, 12)
	<i>int11-LC5</i>		GAT CGG TCG AAT GCG TGT			
	<i>int11-probe</i>		(6-FAM) ATT CCT GGC CGT GGT TCT GGG TTT T (BHQ1)			
<i>int12</i>	<i>int12-LC2</i>	10	TGC TTT TCC CAC CCT TAC C	195 pb	-	(11, 12)
	<i>int12-LC3</i>		GAC GGC TAC CCT CTG TTA TCT C			
	<i>int12-probe</i>		(Texas Red) TGG ATA CTC GCA ACC AAG TTA TTT TTA CGC TG (BHQ2)			
<i>int13</i>	<i>int13-LC1</i>	10	GCC ACC ACT TGT TTG AGG A	138 pb	-	(11, 12)
	<i>int13-LC2</i>		GGA TGT CTG TGC CTG CTT G			
	<i>int13-probe</i>		(Cy3) CGC CAC TCA TTC GCC ACC CA (BHQ3)			

Les conditions de réalisation des différentes PCR sont consignées dans le tableau 12. Chaque série comportait un témoin négatif pour s'exempter du risque de contamination et un témoin positif (2 ou 5 µL) pour s'assurer de l'intégrité du mélange réactionnel.

**Tableau 12 : Conditions des différentes réactions de PCR**

Gène cible	Appareil de PCR temps réel	Kit	Mix réactionnel (pour 1 réaction)			Programme d'amplification	
<i>ARN 16S</i> petit fragment	Smart Cycler® II Orgentec SAS, Trappes, France	SYBR® Premix Ex Taq™ Takara Bio Inc, Shiga, Japon	SYBR® Mix	12,5 µL	} X 3	Étape initiale 10s 95°C	40 cycles : (3 étapes) 10s 95°C 15s 55°C 20s 72°C.
			Amorce 1	0,5 µL			
<i>β2 microglobuline</i>			Amorce 2	0,5 µL	}	Étape initiale 10s 95°C	40 cycles : (3 étapes) 10s 95°C 20s 54°C 30s 72°C.
			ADN	5 µL			
			Eau	QSP 25 µL			
<i>Int11 + Int12 + Int13</i> prélèvements	MX3005P™ Stratagene	LightCycler® FastStart DNA Master Hybridization Probes Mix Roche, Meylan, France	LightCycler® Mix	2 µL	} X 3	Étape initiale 10s 95°C	45 cycles : (2 étapes) 30s 95°C 1 min 60°C
			MgCl <sub>2</sub>	4 µL			
<i>Int11 + Int12 + Int13</i> souches		QIAGEN® Multiplex PCR Master Mix Quiagen, Courtaboeuf, France	Amorce 1	0,8 µL	} X 3		
			Amorce 2	0,8 µL			
			Sonde	0,4 µL			
			ADN	5 µL			
			Eau	QSP 20µL			

Une amplification était considérée positive pour les réactions ciblant les gènes de l'ARN 16S ribosomal et de la β2 microglobuline en présence d'un cycle seuil (Ct) inférieur ou égal à 40 cycles et d'un pic unique au niveau de la dérivée primaire de la courbe de fusion, caractérisant la température de fusion de l'amplicon recherché.

Pour la recherche d'intégrons, les seuils de fluorescence étaient fixés à 2000 pour le fluorophore FAM, 1000 pour Texas Red et 100 pour Cy3. Une amplification était considérée positive en présence d'un cycle seuil (Ct) inférieur ou égal à 34 cycles.

### 3. Séquençage

Toute amplification positive en ARN 16S a fait l'objet d'un séquençage de l'amplicon, d'après la technique de Sanger, afin d'identifier l'espèce bactérienne.

Les amplicons obtenus suite à l'amplification génique du gène de l'ARN 16S ribosomal étaient purifiés grâce au kit MSB® Spin PCRapace (Eurobio, Courtaboeuf, France) selon les recommandations du fabricant. Les produits purifiés étaient ensuite analysés par électrophorèse en champ constant sur gel d'agarose à 0,8% en présence d'un agent intercalant (bromure d'éthidium (BET) 0,5mg/L) afin de vérifier le bon déroulement de la purification (absence de dégradation d'ADN, présence d'un seul amplicon de taille attendue) et d'évaluer la quantité d'amplicons obtenue. Un volume de 3 µL d'ADN purifié était soumis à un courant de 50V pendant 40 minutes puis le gel comprenant le BET était révélé à l'aide d'UV courts (environ 300 nm) permettant la visualisation de bandes spécifiques des amplicons. La taille, en paire de bases, des produits d'amplification était appréciée par comparaison à un marqueur de poids moléculaire de taille connue (123pb DNA ladder, Invitrogen Ltd, Paisley, UK) également déposé sur le gel. Le produit de PCR purifié (25 µL) était conservé à -20°C jusqu'à son utilisation pour le séquençage.

Le produit de PCR purifié subissait alors deux PCR de séquence, l'une grâce à l'amorce 91E (sens), l'autre grâce à l'amorce 13BS (anti-sens) [tableau 11] avec le kit Big Dye® Terminator v1.1 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Le mélange réactionnel d'un volume final de 20 µL comprenait:

Big Dye® Terminator	4 µL
Tampon (5x)	2 µL
Amorce 91E OU amorce 13BS	4µL
ADN purifié	10 µL

Le programme de la PCR de séquence consistait en 25 cycles de 3 étapes, une étape de dénaturation à 96°C de 10s, une étape d'hybridation à 50°C de 5s et une étape de polymérisation à 60°C de 4min. Les produits de la PCR de séquence obtenus étaient purifiés sur colonne (NucleoSEQ®, Macherey-Nagel Germany) et analysés à l'aide du séquenceur capillaire ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Les données des électrophorégrammes obtenus étaient analysées et corrigées grâce au logiciel Chromas Lite ([http://www.technelysium.com.au/chromas\\_lite.html](http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html)). Les séquences sens et antisens étaient ensuite comparées grâce au logiciel d'alignement en ligne ClustalW disponible sur le site EMBL EBI (<http://www.ebi.ac.uk>). Les séquences alignées étaient alors comparées avec les séquences présentes dans la base de données GenBank grâce au logiciel en ligne BLAST disponible sur le site NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Une identification de genre était valable lorsque le pourcentage d'homologie entre les séquences était supérieur ou égal à 97%, une identification d'espèce lorsque le pourcentage d'homologie était supérieur ou égal à 99%.

## ***E. Analyse statistique***

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel MedCalc® Version 11.1.1.0 (MedCalc Software bvba). Les cornées droite et gauche ont été considérées comme indépendantes.

Les variables qualitatives ont été décrites par les effectifs en nombre absolu et pourcentages et les variables quantitatives, n'étant pas distribuées normalement, ont été décrites par les médianes et les percentiles 2,5-97,5. Des tests non paramétriques ont été utilisés : le test exact de Fischer pour les variables qualitatives, le test de Mann-Whitney pour les variables quantitatives indépendantes et le test de Wilcoxon pour les variables quantitatives appariées.

Dans un deuxième temps, la recherche de facteurs de risques a été réalisée par régression logistique. Une analyse univariée a été réalisée avec la sélection des variables présentant un  $p < 0,2$ . Ces variables ont ensuite été incluses dans un modèle intermédiaire. Le modèle final a été sélectionné par procédure pas-à-pas basé sur la vraisemblance des modèles.

Le degré de signification statistique retenu pour l'ensemble des analyses a été fixé à 0,05.

## IV. Résultats

### A. Population

Notre population d'étude était composée de 64 donneurs de cornées dont les données sont récapitulées dans le tableau 13. Tous les donneurs étaient hospitalisés au moment de leur décès.

**Tableau 13 : Données descriptives de la population d'étude (n=64).**

<i>Variables</i>	<i>Valeurs médianes et Effectifs *</i>
<b>Âge</b> (années)	<u>75 (50,4-92,8)</u>
<b>Sexe</b>	
- Hommes	37 (57,8%)
- Femmes	27 (42,2%)
<b>Durée d'hospitalisation cumulée les 6 mois avant le décès</b> (jours)	<u>17 (2-175)</u>
<b>Cause du décès</b>	
- Choc septique	4 (6,2%)
- Cancer	25 (39,1%)
- Maladie cardio-vasculaire	18 (28,1%)
- Autres causes	17 (26,6%)
<b>Sepsis au moment du décès</b>	
- OUI	16 (25%)
- NON	48 (75%)
<b>Immunodépression au moment du décès</b>	
- OUI	5 (7,8%)
- NON	59 (92,2%)
<b>Délai décès-prélèvement</b> (heures)	<u>10,8 (3,3-21,7)</u>
- < 6 heures	12 (26,6%)
- 6-12 heures	24 (37,5%)
- 12-18 heures	17 (26,6%)
- 18-24 heures	11 (17,2%)
<b>Durée de réfrigération du corps avant prélèvement</b> (heures)	<u>4,5 (0-20,3)</u>
- < 2 heures	21 (32,8%)
- 2-5 heures	14 (21,9%)
- 5-10 heures	10 (15,6%)
- > 10 heures	19 (29,7%)

\* Les valeurs soulignées représentent des valeurs médianes (2,5<sup>ème</sup> percentile – 97,5<sup>ème</sup> percentile).  
Les valeurs non soulignées représentent des effectifs.

## B. Devenir des cornées

La quasi-totalité des donneurs ont eu les deux cornées prélevées. Pour un des donneurs, une seule cornée a été prélevée, la deuxième présentant un ulcère. Le nombre de cornées considérées pour notre étude s'élève donc à 127. Le devenir de ces cornées est décrit dans la figure 8.

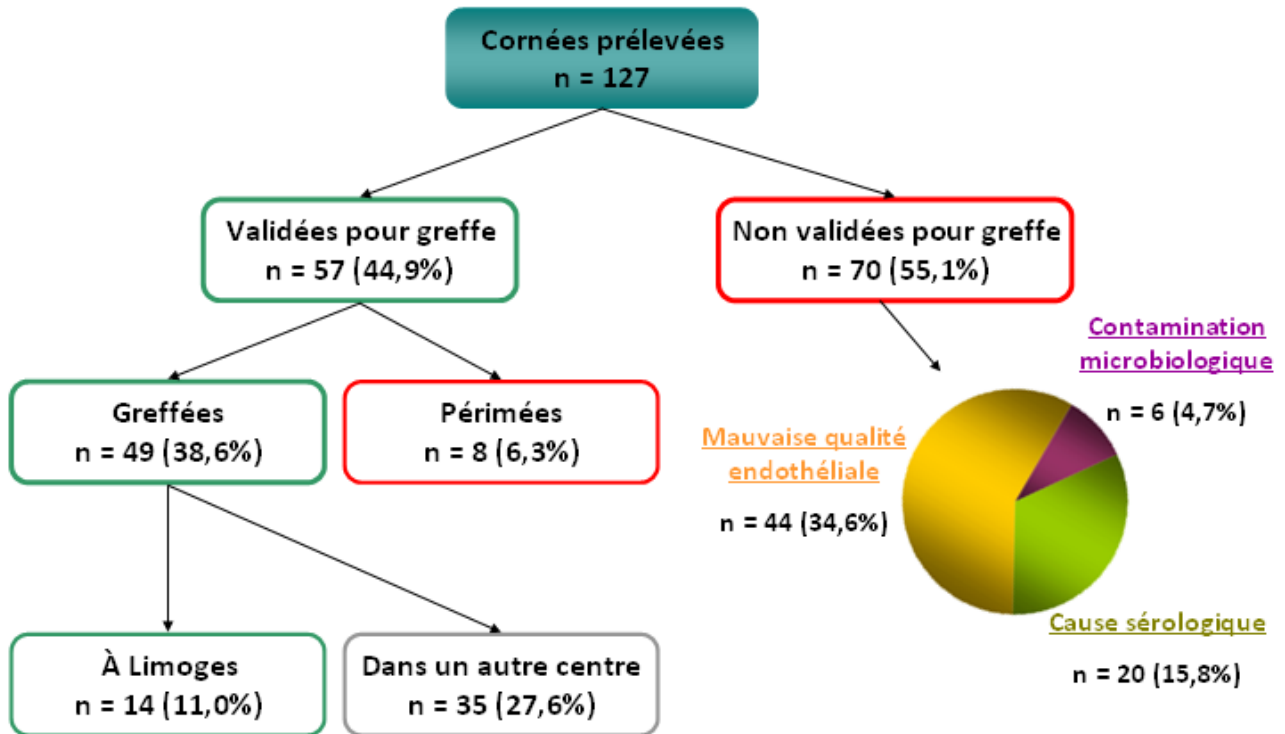


Figure 8 : Devenir des cornées incluses dans l'étude.

Les cornées non validées pour greffe l'ont été pour trois raisons [figure 8].

- La mauvaise qualité endothéliale, raison principale. Parmi ces cornées, on distingue les cornées rejetées d'emblée (n=20, 15,7%), quand le nombre de cellules endothéliales était inférieur à 1500 cellules/mm<sup>2</sup>, des bouchons cornéens (n=24, 18,9%) dont la densité endothéliale est comprise entre 1500 et 2000 cellules/mm<sup>2</sup> mais conservés jusqu'à péremption en cas de besoin urgent de greffon.
- La présence d'une sérologie ininterprétable, douteuse ou positive vis-à-vis des pathogènes recherchés de façon systématique. Les sérologies positives ou douteuses concernaient le virus de l'hépatite B (n=10, 7,9%), le VIH (n=4, 3,1%), *Treponema pallidum*, agent de la syphilis (n=2, 1,6%). Deux cornées ont été rejetées à cause d'un sérum hémolysé rendant les sérologies ininterprétables.
- Une cause microbiologique, beaucoup moins fréquente. Trois cornées ont été éliminées à cause d'une contamination par un agent bactérien (n=3, 2,4% : *K. pneumoniae* ; *S. haemolyticus* ; *S. maltophilia*), trois autres à cause d'un agent fongique (n=3, 2,4% : *C. albicans* ; *C. albicans* ; *Rhodotorula mucilaginosa*).



Chaque cornée a pu bénéficier, avant prélèvement, des deux écouvillonnages superficiels et du prélèvement intraoculaire. L'obtention d'un prélèvement à l'issue de la conservation, cornée ou anneau scléral, n'a pu être possible qu'en cas d'élimination de la cornée par la banque de tissus ou lorsqu'une greffe était réalisée à Limoges. Au cours de notre période d'étude, 78 cornées ont été éliminées, seulement 67 ont été reçues au laboratoire. Sur l'ensemble des cornées greffées à Limoges, onze ont été greffées dans le service d'ophtalmologie du CHU de Limoges, trois l'ont été à la clinique Chénieux de Limoges. Dix anneaux scléraux ont effectivement été acheminés au laboratoire après chirurgie par l'un ou l'autre centre.

En résumé, en considérant les greffons éliminés et ceux greffés à Limoges, nous avons obtenu l'ensemble des prélèvements attendus pour 77 des 127 cornées prélevées, soit 60,6% de l'ensemble des cornées.

### C. Colonisation des cornées au moment du prélèvement

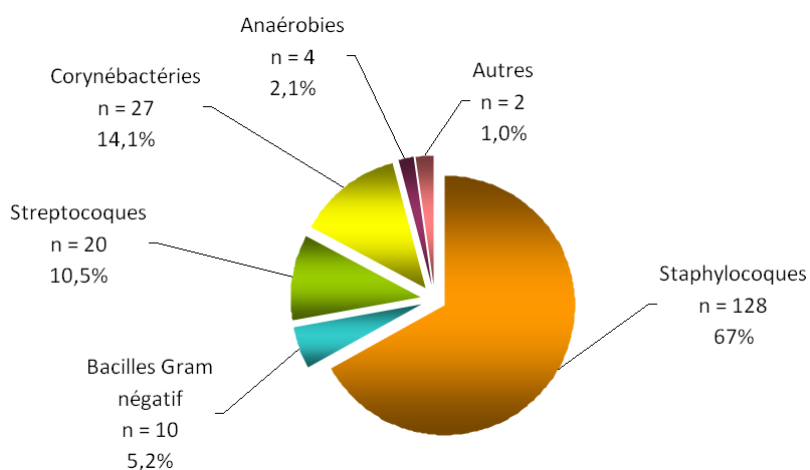
La colonisation bactérienne a été évaluée au niveau de deux sites, le cul-de-sac conjonctival et le limbe scléro-cornéen, pour toute cornée incluse dans l'étude. Les différents résultats obtenus sont relatés de façon précise dans l'Annexe 2.

#### 1. Culs-de-sac conjonctivaux

##### a. Culture conventionnelle

La proportion de culs-de-sac conjonctivaux colonisés sur l'ensemble des culs-de-sac prélevés s'élève à 77,2% (n=98). Le nombre total de germes isolés à partir des culs-de-sac s'élève à 191. En considérant les cornées colonisées, le nombre médian de germes isolés est égal à 2 ; 95% de notre population ayant entre 1 et 4 germes isolés.

La distribution par famille bactérienne est schématisée sur la figure 9. Les différentes espèces retrouvées sont consignées dans le tableau 14.



**Figure 9 : Distribution des germes isolés des culs-de-sac conjonctivaux par famille bactérienne.**

**Tableau 14 : Récapitulatif des espèces isolées au niveau des culs-de-sac conjonctivaux.**

<i>Famille bactérienne</i>		<i>Espèce</i>	<i>Total</i>
Staphylocoques	Staphylocoques à coagulase négative	<i>S. aureus</i>	10 (5,2%)
		<i>S. capitis</i>	3 (1,6%)
		<i>S. epidermidis</i>	96 (50,3%)
		<i>S. hominis</i>	12 (6,3%)
		<i>S. lugdunensis</i>	1 (0,5%)
		<i>S. schleiferi</i>	1 (0,5%)
		<i>S. warneri</i>	5 (28,6%)
<b>Total Staphylocoques</b>			<b>128 (67%)</b>
Corynébactéries	Corynébactéries	<i>C. accolens</i>	6 (3,1%)
		<i>C. amycolatum</i>	1 (0,5%)
		<i>C. colyleae</i>	1 (0,5%)
		<i>C. macginleyi</i>	8 (4,2%)
		<i>C. propinquum</i>	3 (1,6%)
		<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	6 (3,1%)
		<i>Dermabacter hominis</i>	2 (1,0%)
<b>Total Corynébactéries</b>			<b>27 (14,1%)</b>
Streptocoques	Streptocoques	<i>S. pneumoniae</i>	1 (0,5%)
		<i>S. anginosus</i>	1 (0,5%)
		<i>S. equinus</i>	1 (0,5%)
		<i>S. mitis</i>	3 (1,6%)
		<i>S. oralis</i>	2 (1,0%)
		<i>S. salivarius</i>	1 (0,5%)
		<i>S. thermophilus</i>	1 (0,5%)
	Apparentés	<i>Streptococcus</i> spp	1 (0,5%)
		<i>G. haemolysans</i>	4 (2,1%)
		<i>G. morbillorum</i>	1 (0,5%)
	Entérocoques	<i>Gemella</i> spp	2 (1,0%)
		<i>E. faecalis</i>	2 (1,0%)
		<b>Total Streptocoques</b>	
Bacilles à Gram négatif	Bacilles à Gram négatif non fermentaires	<i>P. aeruginosa</i>	2 (1,0%)
		<i>S. maltophilia</i>	2 (1,0%)
	Entérobactéries	<i>C. koseri</i>	1 (0,5%)
		<i>E. coli</i>	3 (1,6%)
		<i>K. pneumoniae</i>	2 (1,0%)
<b>Total Bacilles à Gram négatif</b>			<b>10 (5,2%)</b>
Anaérobies		<i>P. avidum</i>	1 (0,5%)
		<i>P. acnes</i>	3 (1,6%)
<b>Total Anaérobies</b>			<b>4 (2,1%)</b>
Autres	Autres bactéries à Gram négatif	<i>H. influenzae</i>	1 (0,5%)
		<i>N. cinerea</i>	1 (0,5%)
<b>Total Autres</b>			<b>2 (1,0%)</b>
<b>TOTAL</b>			<b>191 (100%)</b>

La famille bactérienne majoritaire est celle des staphylocoques, 67% des germes isolés, *S. epidermidis* en représentant à lui seul 50%. On retrouve au moins un *S. epidermidis* sur 75 culs-de-sac conjonctivaux (59,1%), ce qui en fait aussi le germe colonisant le plus fréquemment les culs-de-sac conjonctivaux.

Les familles suivantes sont les corynébactéries et les streptocoques.

### b. Biologie moléculaire

La biologie moléculaire n'a été effectuée qu'en cas de culture négative ou monobactérienne. Les résultats obtenus en fonction de la culture sont relatés dans le tableau 15. Deux échantillons n'ont pu être testés à cause d'une quantité insuffisante de prélèvement à l'issue de la mise en culture [Annexe 2, donneur 037].

**Tableau 15 : Résultats des amplifications du fragment du gène de l'ARN 16S ribosomal dans les culs-de-sac conjonctivaux en fonction de la culture.**

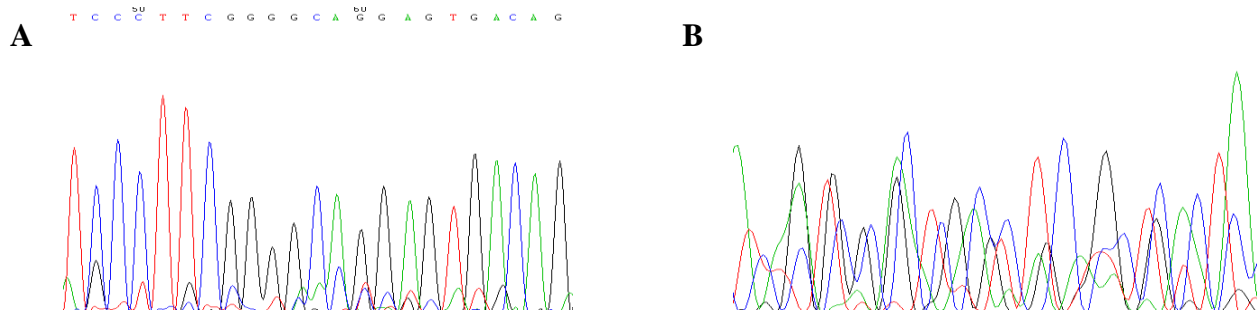
Culture \ PCR ARN 16S					Total
	Négative	Positive	Non applicable	Non effectuée	
Négative	26	2	1	-	29 (22,8%)
Monobactérienne	36	4	1	-	41 (32,3%)
Polybactérienne	-	1	-	56	57 (44,9%)
<b>Total</b>	<b>62 (48,8%)</b>	<b>7 (5,5%)</b>	<b>2 (1,6%)</b>	<b>56 (44,1%)</b>	<b>127 (100%)</b>

En cas de culture monobactérienne, 36 amplifications sont apparues négatives, 4 positives. Deux amplifications ont été retrouvées positives quand la culture conventionnelle était négative [Annexe 2].

Les produits d'amplification ont été purifiés et séquencés. Les résultats du séquençage pour les échantillons monobactériens en culture sont décrits ci-dessous:

- pour l'œil droit du donneur 010, « Uncultured *Sphingomonas* » (pourcentage d'homologie avec les séquences des bases de données = 97%) avec un isolement de *S. warneri* en culture.
- pour l'œil droit du donneur 041, *C. macginleyi* (pourcentage d'homologie avec les séquences des bases de données = 99%) avec un isolement de *C. macginleyi* en culture.
- pour l'œil droit du donneur 060, *S. dysgalactiae* (pourcentage d'homologie avec les séquences des bases de données = 99%) [Figure 10 A.] avec un isolement de *S. epidermidis* en culture.
- pour l'œil droit du donneur 006, la séquence s'est avérée ininterprétable après séquençage, dû à la présence de multiples pics [Figure 10 B.]

Un de ces échantillons apparaît concordant vis-à-vis des résultats obtenus en culture. Pour les deux autres échantillons identifiés, la biologie moléculaire a permis de mettre en évidence la présence de germes dans l'échantillon que la culture n'avait pas permis d'identifier, un au niveau de l'espèce et l'autre au niveau du genre. Les deux amplifications obtenues pour les échantillons négatifs en culture ont été à l'origine de séquences ininterprétables.



**Figure 10 : Électrophorégrammes.**

Fragments du gène de l'ARN 16S ribosomal, séquences sens (91E). **A.** Extrait de l'électrophorégramme obtenu pour le prélèvement de cul-de-sac conjonctival de l'œil droit du donneur 060. **B.** Extrait d'un électrophorégramme ininterprétable par présence de multiples populations aboutissant à une superposition de pics (donneur 006, œil droit, cul-de-sac conjonctival).

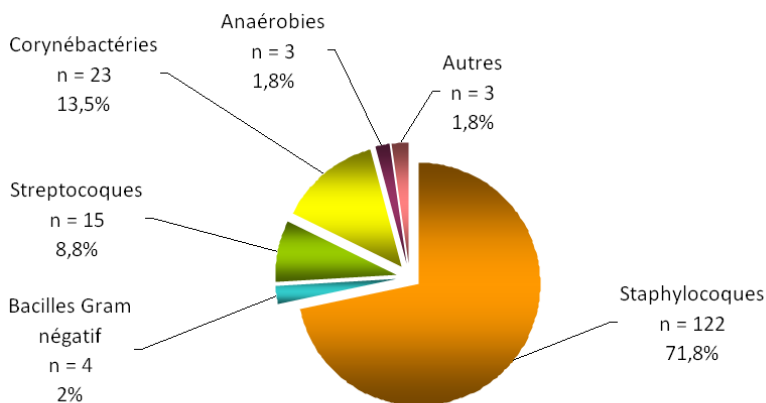
En considérant la culture comme technique de référence, la recherche de l'ARN 16S présente une très mauvaise sensibilité, égale à 10,0% (2,8%-23,6%). Au vu de cette faible sensibilité, un échantillon polybactérien a été amplifié et séquencé pour évaluer notre PCR universelle. Quatre germes différents avaient été isolés de cet échantillon en culture [Annexe 2, donneur 005, œil gauche, cul-de-sac conjonctival] et paradoxalement, la séquence est apparue interprétable, donnant pour identification le germe prépondérant en culture.

## 2. Limbes scléro-cornéens

### a. Culture conventionnelle

La proportion de limbes scléro-cornéens colonisés sur l'ensemble des limbes prélevés s'élève à 71,7% (n=91). En considérant les cornées colonisées, le nombre médian de germes isolés est égal à 2 ; 95% de notre population ayant entre 1 et 4 germes isolés.

La distribution par famille bactérienne est schématisée sur la figure 11. Les différentes espèces retrouvées sont consignées dans le tableau 15.



**Figure 11 : Distribution des germes isolés des limbes scléro-cornéens par famille bactérienne**

**Tableau 16 : Récapitulatif des espèces isolées au niveau des limbes scléro-cornéens.**

<i>Type bactérien</i>		<i>Espèce</i>	<i>Total</i>
Staphylocoques	Staphylocoques à coagulase négative	<i>S. aureus</i>	8 (4,6%)
		<i>S. auricularis</i>	1 (0,6%)
		<i>S. cohnii</i>	1 (0,6%)
		<i>S. epidermidis</i>	86 (50,6%)
		<i>S. haemolyticus</i>	2 (1,2%)
		<i>S. hominis</i>	17 (10,0%)
		<i>S. schleiferi</i>	1 (0,6%)
		<i>S. warneri</i>	4 (2,4%)
	Apparentés	<i>Micrococcus luteus</i>	2 (1,2%)
<b>Total Staphylocoques</b>			<b>122 (71,8%)</b>
Corynébactéries		<i>C. accolens</i>	7 (4,1%)
		<i>C. amycolatum</i>	1 (0,6%)
		<i>C. macginleyi</i>	7 (4,1%)
		<i>C. propinquum</i>	4 (2,4%)
		<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	4 (2,4%)
<b>Total Corynébactéries</b>			<b>23 (13,5%)</b>
Streptocoques	Streptocoques	<i>S. pneumoniae</i>	1 (0,6%)
		<i>S. mitis</i>	1 (0,6%)
		<i>S. oralis</i>	3 (1,8%)
		<i>S. anginosus</i>	1 (0,6%)
		<i>S. salivarius</i>	1 (0,6%)
	Apparentés	<i>Gemella spp</i>	3 (1,8%)
		<i>Granulicatella adiacens</i>	1 (0,6%)
		<i>Leuconostoc cremoris</i>	1 (0,6%)
	Entérocoques	<i>E. faecalis</i>	3 (1,8%)
		<b>Total Streptocoques</b>	
Bacilles à Gram négatif	Bacilles à Gram négatif non fermentaires Entérobactéries	<i>P. aeruginosa</i>	1 (0,6%)
		<i>C. koseri</i>	1 (0,6%)
		<i>E. coli</i>	2 (1,2%)
<b>Total Bacilles à Gram négatif</b>			<b>4 (2,4%)</b>
Anaérobies	Anaérobies	<i>P. avidum</i>	1 (0,6%)
		<i>P. acnes</i>	2 (1,2%)
<b>Total Anaérobies</b>			<b>3 (1,8%)</b>
Autres	Autres bactéries à Gram négatif	<i>H. influenzae</i>	1 (0,6%)
		<i>N. cinerea</i>	1 (0,6%)
	Bacilles à Gram positif	<i>Lactobacillus spp.</i>	1 (0,6%)
<b>Total Autres</b>			<b>3 (1,8%)</b>
<b>TOTAL</b>			<b>170 (100%)</b>

De la même façon que pour les culs-de-sac conjonctivaux, les germes les plus isolés au niveau des limbes scléro-cornéens sont les staphylocoques, notamment les SCN et plus particulièrement *S. epidermidis* (50,6%). L'ordre de grandeur des isollements pour chaque famille bactérienne est sensiblement le même que pour les culs-de-sac conjonctivaux.

Les deux germes ayant colonisé le plus de limbes sont : *S. epidermidis*, isolé de 69 limbes sur les 127 prélevés (54,3%) et *S. hominis*, isolé de 12 limbes (9,4%). Les autres germes fréquemment retrouvés, mais à moindre échelle, sont des corynébactéries : *C. macginleyi* (sur 8 cornées, 6,3%), *C. accolens* (sur 6 cornées, 4,7%) et *C. pseudodiphtheriticum* (sur 6 cornées, 4,7%).

### b. Biologie moléculaire

De la même façon que pour les culs-de-sac conjonctivaux, la biologie moléculaire n'a été effectuée qu'en cas de culture négative ou monobactérienne. Les résultats sont résumés dans le tableau 17. Un échantillon n'a pu être testé à cause d'une quantité insuffisante de prélèvement à l'issue de la mise en culture [Annexe 2, donneur 037].

**Tableau 17 : Résultats des amplifications du fragment du gène de l'ARN 16S ribosomal dans les limbes scléro-cornéens en fonction de la culture.**

PCR ARN 16S Culture	Négative	Positive	Non applicable	Non effectuée	Total
Négative	33	3	-	-	35 (27,6%)
Monobactérienne	38	2	1	-	42 (33,1%)
Polybactérienne	-	-	-	50	50 (39,4%)
<b>Total</b>	<b>71 (55,9%)</b>	<b>5 (3,9%)</b>	<b>1 (0,8%)</b>	<b>50 (39,4%)</b>	<b>127 (100%)</b>

Pour les prélèvements dont la culture était négative, 33 amplifications se sont avérées négatives, 3 positives. Deux d'entre elles ont donné une amplification ininterprétable et la troisième a permis de mettre en évidence un germe non isolé en culture. En effet, le séquençage a identifié la présence d'une bactérie du genre *Escherichia* (pourcentage d'homologie avec les séquences des bases de données = 98% vis-à-vis d'*E. vulneris*, *E. fergusonii* et d'*E. coli*) dans le limbe de l'œil gauche du donneur 048 [Annexe 2].

En cas de culture monobactérienne, 38 amplifications sont apparues négatives, deux positives. Le séquençage des deux échantillons positifs n'ont pas permis d'identifier de germe, l'une étant ininterprétable, l'autre ayant donné comme résultat de séquençage : « Uncultured bacterium clone ».

De la même façon que pour les culs-de-sac, en considérant la culture comme technique de référence, la biologie moléculaire s'est avérée présenter une sensibilité médiocre, égale à 5,0% (0,6%-16,9%).

### 3. Comparaison de la colonisation des différentes localisations

La colonisation ayant été évaluée au niveau de deux sites, cul-de-sac conjonctival et limbe scléro-cornéen, nous avons comparé ces deux localisations en terme de fréquence de colonisation et de nombre de germes impliqués dans cette colonisation [Tableau 18].

**Tableau 18 : Colonisation des culs-de-sac conjonctivaux et des limbes scléro-cornéens.**

<b>A. Colonisation</b>	<b>Culs-de-sac conjonctivaux (n=127)</b>	<b>Limbes scléro-cornéens (n=127)</b>	<b>p</b>
- OUI	98 (77,2%)	92 (72,4 %)	0,47
- NON	29 (22,8%)	35 (27,6%)	
<b>B. Nombre de germes isolés</b>	<b>Culs-de-sac conjonctivaux (n=98)</b>	<b>Limbes scléro-cornéens (n=92)</b>	<b>p</b>
	2 (1 ; 4)	2 (1 ; 4)	0,55

**A.** Comparaison de la fréquence de colonisation sur l'ensemble des prélèvements effectués. **B.** Comparaison du nombre de germes isolés sur les prélèvements dont la culture et/ou la biologie moléculaire étai(en)t positive(s).

Les culs-de sac conjonctivaux et les limbes scléro-cornéens n'apparaissent pas significativement différents que ce soit en terme de fréquence de colonisation ou de nombre de germes isolés par site. De plus la distribution des germes par famille bactérienne au niveau des culs-de-sac conjonctivaux et des limbes scléro-cornéens n'est pas statistiquement différente ( $p=0,73$ ), on peut donc en conclure que la flore conjonctivale et la flore à la surface de l'œil sont très proches.

## **D. Contamination intraoculaire et sanguine**

### **1. Contamination intraoculaire**

#### *a. Culture conventionnelle*

Sur les 127 humeurs aqueuses prélevées, cinq étaient contaminées (3,9%). Pour quatre d'entre elles la culture était monobactérienne, la cinquième était polybactérienne [Annexe 2]. Les germes isolés sont les suivants :

- Quatre SCN : *S. warneri* et *S. xylosus* (donneur 003, œil gauche) *S. epidermidis* (donneur 011, œil gauche) et *S. hominis* (donneur 034, œil droit) ;
- *Bacillus* spp à deux reprises (donneur 001, œil gauche ; donneur 052, œil droit).

#### *b. Biologie moléculaire*

La biologie moléculaire a été exécutée pour les prélèvements d'humeurs aqueuses dont la culture était négative ou monobactérienne. Les résultats des amplifications en fonction de la culture sont relatés dans le tableau 19. Un échantillon n'a pu être testé à cause d'une quantité insuffisante de prélèvement à l'issue de la mise en culture [Annexe 2, donneur 037].

**Tableau 19 : Résultats des amplifications du fragment du gène de l'ARN 16S ribosomal dans les humeurs aqueuses en fonction de la culture.**

Culture \ PCR ARN 16S	Négative	Positive	Non applicable	Non effectuée	Total
	Négative	120	1	1	-
Monobactérienne	4	-	-	-	4 (3,1%)
Polybactérienne	-	-	-	1	1 (0,8%)
<b>Total</b>	124 (97,6%)	1 (0,8%)	1 (0,8%)	50 (39,4%)	127 (100%)

Pour les prélèvements dont la culture était négative, 120 amplifications se sont avérées négatives, une seule positive. Le séquençage de l'échantillon positif (donneur 060, œil droit) n'a pas permis d'identifier le germe présent (« Uncultured bacterium clone »).

Aucun fragment n'a été obtenu à partir des extraits provenant de l'échantillon dont la culture était positive.

La sensibilité n'a pu être calculée car aucun des quatre échantillons positifs en culture ne s'est avéré positif en biologie moléculaire.

### c. Comparaison de la colonisation cornéenne et de la contamination intraoculaire

On peut considérer que la cornée est colonisée quand le limbe scléro-cornéen, adjacent à la cornée, est colonisé. La contamination intraoculaire, évaluée à partir de l'humeur aqueuse a été comparée à la colonisation du limbe scléro-cornéen [Tableau 20].

**Tableau 20 : Comparaison de la colonisation de la cornée et de la contamination de l'humeur aqueuse.**

Isolement de germes <sup>a</sup>	Limbes scléro-cornéens (n=127)	Humeur aqueuse (n=127)	P
- OUI	92 (72,4 %)	5 (3,9%)	<0,001
- NON	35 (27,6%)	122 (96,1 %)	

a. L'isolement de germes implique une colonisation pour le prélèvement superficiel et une contamination pour le milieu intraoculaire. Les nombres absolus et proportions rapportés consistent en l'effectif de prélèvements où au moins un germe a été isolé.

La colonisation de la cornée est significativement plus fréquente que la contamination intraoculaire.

## 2. Contamination sanguine

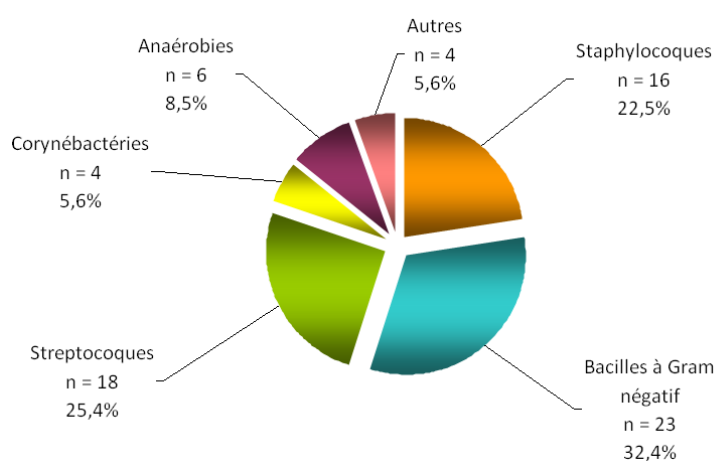
Pour chaque donneur, un prélèvement sanguin a été réalisé en parallèle des prélèvements oculaires. Ce prélèvement sanguin a été mis en flacons d'hémoculture et analysé directement par biologie moléculaire.



### a. Culture conventionnelle

Soixante-quatre donneurs ont été inclus dans l'étude donc 64 prélèvements sanguins ont été effectués. Sur l'ensemble de ces prélèvements, 28 (43,8%) se sont avérés positifs en culture. Le nombre total de germes isolés à partir du sang s'élève à 71. En considérant les prélèvements positifs, le nombre médian de germes isolés est de 2, six étant le nombre maximum de germes isolés à partir d'un prélèvement sanguin. Dix-neuf hémocultures sont polybactériennes et 9 sont monobactériennes.

Les résultats sont consignés dans l'Annexe 3. La distribution par famille bactérienne est schématisée sur la figure 12. Les différentes espèces retrouvées sont consignées dans le tableau 21.



**Figure 12 : Distribution des germes isolés des prélèvements sanguins par famille bactérienne.**

Les germes les plus isolés sont des bacilles à Gram négatif, notamment les entérobactéries qui représentent 31% (n=22) des germes totaux. L'espèce la plus fréquente est *E. coli* (n=9, 12,7%). La deuxième famille la plus représentée est celle des streptocoques (25,4%) suivie de près par les staphylocoques (22,5%).

Pour les hémocultures positives, on peut considérer que 67,9% d'entre elles contenaient des germes pouvant appartenir à la flore digestive (dont 50% d'hémocultures polybactériennes) et que les autres, soit 32,1%, étaient positives avec des germes pouvant être retrouvés dans la flore cutanée (dont 17,8% d'hémocultures polybactériennes).

**Tableau 21 : Récapitulatif des espèces isolées dans le sang.**

<i>Type bactérien</i>		<i>Espèce</i>	<i>Total</i>	
Bacilles à Gram négatif	Bacilles à Gram négatif non fermentants Entérobactéries	<i>S. maltophilia</i>	1 (1,4%)	
		<i>C. freundii</i>	1 (1,4%)	
		<i>E. cloacae</i>	1 (1,4%)	
		<i>E. coli</i>	9 (12,7%)	
		<i>E. gergoviae</i>	1 (1,4%)	
		<i>H. alvei</i>	3 (4,2%)	
		<i>K. oxytoca</i>	2 (2,8%)	
		<i>K. pneumoniae</i>	3 (4,2%)	
		<i>P. penneri</i>	1 (1,4%)	
		<i>P. vulgaris</i>	1 (1,4%)	
<b>Total Bacilles à Gram négatif</b>			<b>23 (32,4%)</b>	
Streptocoques	Entérocoques	<i>E. faecalis</i>	3 (4,2%)	
		<i>E. faecium</i>	2 (2,8%)	
		Streptocoques	<i>S. agalactiae</i>	1 (1,4%)
			<i>S. anginosus</i>	1 (1,4%)
			<i>S. lentus</i>	1 (1,4%)
			<i>S. mitis</i>	3 (4,2%)
	<i>S. oralis</i>		2 (2,8%)	
	<i>S. parasanguinis</i>		1 (1,4%) <sup>1</sup>	
	<i>S. vestibularis</i>		1 (1,4%)	
	Apparentés	<i>S. salivarius</i>	1 (1,4%)	
		<i>Leuconostoc cremoris</i>	1 (1,4%)	
	<i>Leuconostoc spp</i>	1 (1,4%)		
	<b>Total Streptocoques</b>			<b>18 (25,4%)</b>
Staphylocoques	Staphylocoques à coagulase négative	<i>S. aureus</i>	3 (4,2%)	
		<i>S. capitis</i>	2 (2,8%)	
		<i>S. epidermidis</i>	7 (9,9%)	
		<i>S. haemolyticus</i>	4 (5,6%)	
<b>Total Staphylocoques</b>			<b>16 (22,5%)</b>	
Anaérobies		<i>B. fragilis</i>	1 (1,4%) <sup>1</sup>	
		<i>B. vulgatus</i>	1 (1,4%)	
		<i>Bacteroides spp.</i>	1 (1,4%)	
		<i>C. difficile</i>	1 (1,4%)	
		<i>C. perfringens</i>	1 (1,4%)	
		<i>Mogibacterium diversum</i>	1 (1,4%)	
<b>Total Anaérobies</b>			<b>6 (8,5%)</b>	
Corynébactéries		<i>C. urealyticum</i>	1 (1,4%)	
		<i>Corynebacterium</i> Groupe G	1 (1,4%)	
		<i>Corynebacterium spp</i>	2 (2,8%)	
<b>Total Corynébactéries</b>			<b>4 (5,6%)</b>	
Autres	Autres bactéries à Gram négatif	<i>H. parainfluenzae</i>	1 (1,4%)	
	Bacilles à Gram positif	<i>Lactobacillus spp.</i>	2 (2,8%)	
	Levures		1 (1,4%)	
<b>Total Autres</b>			<b>4 (5,6%)</b>	
<b>TOTAL</b>			<b>71 (100%)</b>	

### b. Biologie moléculaire

La biologie moléculaire a été effectuée dans les prélèvements sanguins sous les mêmes conditions que pour les prélèvements oculaires. Pour un échantillon, l'amplification du gène de la  $\beta 2$  microglobuline est apparue négative (donneur 019), ceci étant dû soit à un échec dans l'extraction des acides nucléiques, soit à la présence d'inhibiteurs dans le prélèvement. Celui-ci n'a donc pas pu être utilisé pour la PCR ciblant l'ARN 16S. Les résultats obtenus comparés à ceux de la culture sont rassemblés dans le tableau 22.

**Tableau 22 : Résultats des amplifications du fragment du gène de l'ARN 16S ribosomal dans le sang en fonction de la culture.**

Culture \ PCR ARN 16S	PCR				Total
	Négative	Positive	Non applicable	Non effectuée	
Négative	35	-	1	-	36 (56,2%)
Monobactérienne	7	2	-	-	9 (14,1%)
Polybactérienne	-	-	-	19	19 (29,7%)
<b>Total</b>	<b>42 (65,6%)</b>	<b>2 (3,2%)</b>	<b>1 (1,6%)</b>	<b>19 (29,7%)</b>	<b>64 (100%)</b>

Pour les prélèvements dont la culture était négative, aucune amplification ne s'est avérée positive. Pour les cultures monobactériennes, sept amplifications se sont montrées négatives, deux positives. Les deux produits d'amplification ont été séquencés : pour l'un, les séquences étaient ininterprétables (donneur 063) ; pour l'autre le séquençage a fourni la même identification que la culture (*E. coli*, donneur 010). La sensibilité de la biologie moléculaire dans le sang est évaluée à 22,2% (2,8%-60,1%).

### c. Corrélation entre notion de sepsis et hémocultures positives

La coordination des prélèvements d'organes a fourni pour chaque donneur des renseignements sur la présence d'un sepsis ou non au moment du décès. Ces données ont été comparées aux résultats des hémocultures et de la biologie moléculaire sur le sang. Le calcul du coefficient kappa permet d'évaluer la concordance entre deux jugements sur la présence d'un même phénomène, en tenant compte de la part de concordance due au hasard. Plus le coefficient est proche de 1, plus la concordance est bonne. Au contraire un coefficient kappa proche de zéro signifie qu'il y a indépendance entre les jugements (15).

**Tableau 23. : Evaluation de la concordance entre sepsis au moment du décès et mise en évidence de germes dans le sang.**

		Sepsis		Total	kappa
		OUI	NON		
Isolement d'un/ plusieurs germes du sang	OUI	7	21	28	0,00
	NON	9	27	36	
Total		16	48	64	

Dans notre cas, le calcul du coefficient kappa, dont la valeur est égale à zéro ne montre pas de concordance entre la présence d'un sepsis au moment du décès et l'isolement de germe dans le sang obtenu au moment du prélèvement de la cornée [Tableau 23].

## ***E. Contamination pendant l'organoculture***

La contamination a été évaluée en cours et à l'issue de l'organoculture, par culture et biologie moléculaire, pour les cornées qui ont effectivement été greffées mais aussi pour les greffons éliminés de la banque de tissus. L'ensemble des résultats est rapporté dans l'Annexe 4.

### **1. Milieux d'organoculture**

#### *a. Culture conventionnelle*

##### **(1) CorneaPrep®**

Les milieux de transport de toutes les cornées ont été reçus soit 127. Sur l'ensemble de ces milieux, six ont été rejetés pour contamination microbiologique (4,7%). Cinq contaminations ont été détectées grâce à la culture systématique en flacons d'hémocultures (donneur 003, œil droit et œil gauche ; donneur 011, œil gauche ; donneur 021, œil gauche ; donneur 033, œil droit) alors que le dernier milieu a été décelé positif grâce au trouble engendré par la contamination (donneur 017, œil droit). Toutes les cultures positives étaient monobactériennes.

Les germes isolés sont d'origine bactérienne dans la moitié des cas, majoritairement des bacilles à Gram négatif (*K. pneumoniae* ; *S. haemolyticus* ; *S. maltophilia*), et d'origine fongique dans l'autre moitié des cas (*C. albicans* ; *C. albicans* ; *R. mucilaginosa*).

##### **(2) CorneaMax®**

Les milieux de conservation ont été reçus soit dans un but systématique de contrôle, quand la cornée était validée pour greffe, soit avec le greffon éliminé. Au total, 101 milieux de conservation ont pu être étudiés. Aucune contamination supplémentaire n'a été détectée sur ces milieux de conservation, que la cornée soit greffée ou non.

##### **(3) CorneaJet®**

Quatorze milieux de déturgescence ont été reçus, correspondant aux quatorze cornées greffées dans un des 2 centres de Limoges. Aucune contamination n'a été mise en évidence.

## b. Biologie moléculaire

La biologie moléculaire a été effectuée sur tous les milieux d'organoculture, les cultures bactériennes étant soit négatives, soit monobactériennes pour six milieux. Les résultats des amplifications sont consignés dans le tableau 24.

**Tableau 24 : Résultats des amplifications du fragment du gène de l'ARN 16S ribosomal dans les milieux d'organoculture en fonction de la culture.**

Culture		PCR ARN 16S	<i>Négative</i>	<i>Positive</i>	<i>Non applicable</i>	<i>Total</i>
Cornea Prep®	<i>Négative</i>		117	-	4	121 (95,3%)
	<i>Monobactérienne</i>		4	2	-	6 (4,7%)
	<i>Total</i>		121 (95,3%)	2 (1,6%)	4 (3,1%)	<b>127 (100%)</b>
Cornea Max®	<i>Négative</i>		96	-	-	96 (95,1%)
	<i>Monobactérienne</i>		3	2	-	5 (4,9%)
	<i>Total</i>		99 (98,0%)	2 (2,0%)	-	<b>101 (100%)</b>
Cornea Jet®	<i>Négative</i>		14	-	-	14 (100%)
	<i>Monobactérienne</i>		-	-	-	-
	<i>Total</i>		14 (100%)	-	-	<b>14 (100%)</b>

Sur les 242 milieux collectés, l'amplification a pu être effectuée sur 238 milieux car quatre échantillons n'ont pas été réservés pour la biologie moléculaire par mégarde. Quatre amplifications se sont révélées positives, respectivement deux pour les milieux CorneaPrep II®, deux pour les milieux CorneaMax®. Pour les CorneaPrep II®, le séquençage d'un des 2 amplicons a donné la même identification que le germe isolé en culture (donneur 033, œil droit, *S. maltophilia*, pourcentage d'homologie avec les séquences des bases de données = 99%) ; le séquençage du deuxième échantillon positif, dont la culture était positive à *K. pneumoniae* (donneur 011, œil gauche), n'a pas permis d'identifier de germe (« Uncultured bacterium clone »). Les amplifications positives pour les CorneaMax® concernaient les mêmes cornées et le séquençage a quant à lui confirmé les résultats de la culture (donneur 011, œil gauche, *K. pneumoniae*, pourcentage d'homologie avec les séquences des bases de données = 99% ; donneur 033, œil droit, *S. maltophilia*, pourcentage d'homologie avec les séquences des bases de données = 99%). En conséquence, les germes mis en évidence dans les CorneaMax® étaient concordants avec ceux isolés des CorneaPrep®.

Finalement, sur ces 238 milieux, on obtient une sensibilité de cette technique de 33,3% (9,9%-65,1%).

## 2. Anneaux scléaux et cornées

Les cornées pour lesquelles l'élimination de la banque de tissu était due à une contamination n'ont pas été mises en culture. En effet, celles-ci étant immergées dans les milieux

de culture, le même germe que celui isolé dans le milieu contaminé aurait systématiquement été retrouvé. Parmi les cornées éliminées pour cause microbiologique, n'ont été considérées pour la recherche du gène de l'ARN 16S que les cornées dont la contamination était fongique.

#### *a. Culture conventionnelle*

Soixante-douze cornées ou anneaux scléaux ont été mis en culture (10 anneaux scléaux et 62 cornées), aucun n'a été à l'origine d'une culture positive.

#### *b. Biologie moléculaire*

La biologie moléculaire a été effectuée sur ces 72 cornées ou anneaux scléaux négatifs en culture et sur les 3 cornées rejetées pour contamination fongique. Soixante-quatorze amplifications se sont avérées négatives et le séquençage du seul produit d'amplification obtenu était ininterprétable alors que la culture était négative (donneur 053, œil droit).

### **F. Résistance aux antibiotiques**

Un antibiogramme a été effectué pour chaque germe isolé, quelque soit la localisation. Les phénotypes de résistance acquise des germes vis-à-vis des cinq principales familles d'antibiotiques ( $\beta$ -lactamines, aminosides, macrolides, fluoroquinolones et glycopeptides) ont été étudiés.

#### **1. Staphylocoques**

##### *a. SCN*

En considérant toutes les localisations, 248 SCN ont été isolés dont 190 *S. epidermidis* (76,6%). Sur ces 248 SCN, 5 n'ont pu être analysés par perte des données, 15 étaient sauvages (6,0%). Les germes présentant un ou plusieurs phénotypes de résistances étaient au nombre de 228 (91,9%) Les phénotypes de résistance observés ainsi que leurs fréquences sont consignés dans le tableau 25 A.

Près de 2/3 des SCN isolés étaient résistants à la méticilline, 38,6% résistants à tous les aminosides, près de la moitié étaient résistants aux fluoroquinolones et 20% de sensibilité diminuée aux glycopeptides. Plus de la moitié présentait une résistance acquise pour au moins 3 des cinq familles principales d'antibiotiques (n=124, 54,4%).

##### *b. S. aureus*

*S. aureus* a été isolé vingt-et-une fois toutes localisations confondues. Sur ces 21 germes, un seul était sensible vis-à-vis de tous les antibiotiques (4,8%). Les différents phénotypes de résistance rencontrés sont dans le tableau 25 A.

Sur l'ensemble de ces *S. aureus*, 28,3% (n=5) étaient résistants à la méticilline et donc catégorisés BMR. Parmi les cinq souches méti-R, 3 souches étaient résistantes aux fluoroquinolones et 2 autres souches présentaient un phénotype de résistance vis-à-vis des aminosides (résistantes à la kanamycine et tobramycine) et des macrolides. Les souches possédant une pénicillinase ne présentaient pas d'autres phénotypes de résistance alors que les souches méti-R présentaient au moins un deuxième phénotype de résistance associé.

## 2. Bacilles à Gram négatif

Toutes localisations considérées, 41 bacilles à Gram négatifs ont été isolés dont plus de la moitié dans le sang (n=23, 56,1%). Sur ces 41 bacilles, on dénombre 33 entérobactéries et 8 bacilles à Gram négatif non fermentants. Parmi ces derniers seulement deux espèces ont été retrouvées, *P. aeruginosa* (n=3) et *S. maltophilia* (n=5), dont aucune souche ne présentait de phénotype de résistance acquise. Par contre, les entérobactéries présentaient des phénotypes de résistance acquise dans 39,4% des cas (n=13), phénotypes explicités dans le tableau 25 B. Sur ces 13 germes, cinq ont été isolés de prélèvements oculaires, quatre de culs-de-sac conjonctivaux, un d'un limbe scléro-cornéen. Les phénotypes retrouvés ont été : la présence de BLSE (n=6, 14,6%), notamment pour *K. pneumoniae* pour lesquelles des résistances aux aminosides et aux fluoroquinolones étaient systématiquement associées, des pénicillinases plus ou moins résistantes aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases ou des céphalosporinases hyperproduites pour *E. coli*. Quasiment toutes les entérobactéries présentant un phénotype de résistance pour une des 3 grandes familles d'antibiotiques étaient résistantes au cotrimoxazole (n=12, 36,3%).

## 3. Corynébactéries

Sur les 54 corynébactéries et apparentées isolées de l'ensemble des prélèvements, 31 (57,4%) présentaient un phénotype de résistance acquise aux antibiotiques. Aucune n'apparaissait résistante aux  $\beta$ -lactamines. La famille la plus touchée a été celle des macrolides pour laquelle 23 souches (42,6%) présentaient un phénotype MLSb inductible et 2 souches étaient résistantes isolément à la lincomycine. Les deux autres familles touchées de façon plus ponctuelle étaient les aminosides (résistance à la kanamycine) pour 7 souches (13,0%) et les fluoroquinolones pour 9 souches (16,7%). Deux souches (3,7%) présentaient des résistances pour les 3 familles d'antibiotiques

**Tableau 25 : Principaux phénotypes de résistance acquise aux antibiotiques des staphylocoques et des Bacilles à Gram négatif, fréquence des ces phénotypes .**

**A. Staphylocoques**

Identification	Effectif	β-lactamines		Aminosides			Macrolides				Fluoroquinolones	Glycopeptides (intermédiaire ou résistant)
		Pénicillinase	Méti-R	K	KT	KTG	MLSb inducible	MLSb constitutif	MSb	Autres phénotypes <sup>a</sup>		
<b>SCN</b>												
<i>S. epidermidis</i>	177	67 (37,9%)	108 (61,1%)	1 (<1%)	9 (5,1%)	68 (38,4%)	38 (21,5%)	5 (2,8%)	18 (10,2%)	16 (9,0%)	85 (48,0%)	46 (26,0%)
<i>S. hominis</i>	28	2 (7,1%)	24 (85,7%)	-	3 (10,7%)	13 (46,4%)	5 (17,9%)	1 (3,6%)	8 (28,6%)	7 (28,0%)	16 (57,1%)	1 (3,6%)
<i>S. warneri</i>	8	7 (87,5%)	1 (12,5%)	-	3 (37,5%)	1 (12,5%)	1 (12,5%)	2 (25,0%)	1 (12,5%)	-	3 (37,5%)	-
Autres SCN	15	7 (46,7%)	7 (46,7%)	1 (6,7%)	-	6 (40%)	1 (6,7%)	1 (6,7%)	3 (20,0%)	5 (33,3%)	5 (33,3%)	1 (6,7%)
<b>TOTAL</b>	<b>228</b>	<b>83 (36,4%)</b>	<b>140 (61,4%)</b>	<b>2 (&lt;1%)</b>	<b>15 (6,6%)</b>	<b>88 (38,6%)</b>	<b>45 (19,7%)</b>	<b>9 (3,9%)</b>	<b>30 (13,2%)</b>	<b>28 (12,3%<sup>o</sup>)</b>	<b>109 (47,8%)</b>	<b>48 (21,0%)</b>
<i>S. aureus</i>		15 (71,4%)	5 (23,8%)	-	2 (9,1%)	-	2 (9,1%)	-	-	-	3 (14,3%)	-

**Meti-R** : résistance à l'ensemble des β-lactamines par production d'une PLP2a additionnelle ; **K** : résistance à la kanamycine et à l'amikacine ; **KT** : phénotype K + résistance à la tobramycine et netilmicine ; **KTG** : résistance à tous les aminosides sauf la streptomycine ; **MLSb** : résistance par acquisition d'une méthylase de l'ARN 23S , **MSb** : résistance par efflux ; <sup>a</sup>. Les autres phénotypes retrouvés sont des phénotypes LSa, touchant les lincosamides et la streptogramine A ou l'association de plusieurs phénotypes de résistance.

**B. Bacilles à Gram négatif**

Identification	Effectif	β-lactamines				Aminosides	Fluoroquinolones		Cotrimoxazole
		Pénicillinase	TRI	BLSE	Céphalosporinase hyperproduite	GmTmNt	Niveau 2 de résistance	Niveau 3 de résistance	
<b>Entérobactéries</b>									
<i>C. freundii</i>	1	-	-	1 (100%)	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	6	2 (33,3%)	1 (16,7%)	-	3 (50%)	-	1 (16,7%)	-	6 (100%)
<i>K. pneumoniae</i>	5	-	-	5 (100%)	-	5 (100%)	1 (20%)	4 (80%)	5 (100%)
<i>P. vulgaris</i>	1	1 (100%)	-	-	-	-	-	-	1 (100%)
<b>TOTAL</b>	<b>13</b>	<b>3 (23,1%)</b>	<b>1 (7,7%)</b>	<b>6 (46,2%)</b>	<b>3 (23,1%)</b>	<b>5 (38,5%)</b>	<b>2 (15,4%)</b>	<b>4 (30,8%)</b>	<b>12 (92,3%)</b>

**TRI** : Pénicillinase résistante aux inhibiteurs de β-lactamase ; **BLSE** : β-lactamase à spectre étendu ; **GmTmNt** : résistance à la gentamicine, la tobramycine et la netilmicine par production d'enzymes inactivatrices des aminosides ; **Niveaux de résistance aux fluoroquinolones** : niveau 2 : 1 mutation *gyrA* + 1 mutation *par* → résistance à toutes les fluoroquinolones sauf la ciprofloxacine, niveau 3 : 2 mutations *gyrA* + 1 mutation *par* → résistance à toutes les fluoroquinolones..



## 4. Streptocoques et apparentés

### a. Streptocoques

Quarante-deux streptocoques et apparentés ont été isolés durant l'étude, dont 16 présentaient un phénotype de résistance acquise aux antibiotiques (38,1%). Aucun des deux pneumocoques isolés ne présentait de résistance acquise. Les résistances observées concernaient principalement les macrolides (phénotype MLSb constitutif n=4, 9,5% ; phénotype MSb dû à un efflux n=7, 16,7%) et les fluoroquinolones (n=12, 28,6%). Uniquement deux souches étaient résistantes aux  $\beta$ -lactamines (4,8%). Parmi les souches résistantes, les streptocoques les plus représentés appartenaient au groupe viridans : *S. mitis*, *S. oralis*, *S. anginosus* et *S. salivarius* (n=13, 81,3%).

### b. Entérocoques

Sur les 11 entérocoques isolés, 8 présentaient un ou plusieurs phénotype(s) de résistance acquise (72,7%). Ceux-ci touchaient les aminosides, les macrolides et les fluoroquinolones, résistances souvent associés (n=3, 27,3%). Un des deux *E. faecium* isolés était également résistant aux  $\beta$ -lactamines. Aucun entérocoque résistant aux glycopeptides (ERG) n'a été mis en évidence.

## 5. Anaérobies

Treize germes anaérobies ont été isolés, trois seulement présentant des phénotypes de résistances (23,1%) : trois bactéries du genre *Bacteroides* possédaient une  $\beta$ -lactamase hyperexprimée. Aucun des sept *Propionibacterium* isolés de prélèvements oculaires ne présentait de résistance aux antibiotiques.

## **G. Recherche d'intégrons dans les prélèvements oculaires**

La recherche d'intégrons a été effectuée de façon systématique sur les prélèvements oculaires effectués à J1 pour évaluer la prévalence de ces supports de résistance aux antibiotiques dans les flores cornéenne ou conjonctivale mais également dans l'humeur aqueuse. Au total, 125 culs-de-sac conjonctivaux, 125 limbes scléro-cornéens et 126 humeurs aqueuses ont été testés pour la présence d'intégrons de classe 1, 2 ou 3. Onze intégrons de classe 1 ont été détectés, un intégron de classe 2 a été décelé. Pour chaque prélèvement positif en triplex intégrons, les différentes classes ont été recherchées sur les souches isolées de chaque prélèvement afin d'identifier le germe porteur de ce support. Les résultats sont consignés dans le tableau 26.

**Tableau 26 : Récapitulatif des prélèvements contenant des intégrons.**

Type de prélèvement	Donneur	Prélèvement		Souches bactériennes		
			Intégrons détectés	Isolées du prélèvement	Intégrons détectés	
Cul-de-sac conjonctival	005	Œil droit	<i>intI 1</i>	<i>C. pseudodiphtheriticum</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. aureus</i>	<i>intI 1</i> - -	
		Œil gauche	<i>intI 1</i>	<i>C. pseudodiphtheriticum</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. aureus</i> <i>S. pneumoniae</i>	<i>intI 1</i> - - -	
	011	Œil gauche	<i>intI 1</i>	<i>S. epidermidis</i> <i>K. pneumoniae</i>	- <i>intI 1</i>	
	052	Œil gauche	<i>intI 1</i>	<i>S. epidermidis</i> <i>C. propinquum</i> <i>P. aeruginosa</i>	- <i>intI 1</i> -	
	053	Œil gauche	<i>intI 1 + intI 2</i>	<i>S. epidermidis</i> <i>S. aureus</i> <i>S. capitis</i> <i>C. macginleyi</i>	- - - -	
	054	Œil droit	<i>intI 1</i>	<i>S. epidermidis</i>	-	
	055	Œil gauche	<i>intI 1</i>	<i>S. epidermidis</i>	-	
Limbe scléro-cornéen	005	Œil droit	<i>intI 1</i>	<i>C. pseudodiphtheriticum</i> <i>S. epidermidis</i> <i>G. adiacens</i>	<i>intI 1</i> - -	
	011	Œil gauche	<i>intI 1</i>	<i>S. epidermidis</i>	-	
	048	Œil gauche	<i>intI 1</i>	-	-	
052	Œil gauche	<i>intI 1</i>	<i>S. epidermidis</i> <i>C. propinquum</i>	- <i>intI 1</i>		

*intI 1* : Intégrons de classe 1 ; *intI 2* : Intégrons de classe 2

Pour trois des sept donneurs, l'intégron de classe 1 détecté l'a été au niveau de différents sites (donneurs 005, 011 et 052) et les bactéries l'hébergeant ont pu être identifiées :

- *K. pneumoniae* (donneur 011) possédant une BLSE et des mécanismes de résistance associés,
- Deux corynébactéries, *C. pseudodiphtheriticum* (donneur 005) et *C. propinquum* (donneur 052) présentant toutes deux une résistance au sulfaméthoxazole et une résistances aux macrolides pour la première, aux macrolides et aux fluoroquinolones pour la seconde.

Les germes hébergeant les intégrons retrouvés chez les autres donneurs n'ont pu être mis en évidence.

## **H. Mise en évidence de facteurs de risque**

### **1. Facteurs de risque de colonisation de la cornée**

La colonisation des culs-de-sac conjonctivaux et des limbes scléro-cornéens a été étudiée en fonction des différents paramètres relevés pour chaque donneur. Les résultats des analyses univariées pour chaque variable ainsi que ceux des analyses multivariées sont consignés dans le tableau 27. Un seul facteur de risque a été mis en évidence : un décès par maladie cardiovasculaire favoriserait la colonisation du limbe scléro-cornéen. D'autres tendances ressortent :

- pour la colonisation des culs-de-sac conjonctivaux un délai entre le décès et le prélèvement inférieur à 6 heures aurait tendance à avoir un effet protecteur.
- pour la colonisation des limbes scléro-cornéens, des délais de prélèvements longs, supérieurs à 12 heures, auraient tendance à être protecteurs.

La colonisation du cul-de-sac conjonctival est un facteur de risque de colonisation du limbe scléro-cornéen. En effet, un limbe adjacent à des culs-de-sac conjonctivaux non colonisés a 5,89 plus de chance de ne pas être colonisé ([2,41-14,39]  $p < 0,0001$ ).

La contamination sanguine ne semble pas avoir de lien significatif ni avec la colonisation des culs-de-sac conjonctivaux (OR=0,49 [0,21-1,13]  $p=0,09$ ), ni avec la colonisation des limbes scléro-cornéens (OR=0,64 [0,30-1,39]  $p=0,26$ ).

### **2. Facteurs de risque de contamination pendant organoculture**

Le rejet d'un greffon pour cause microbiologique a été évalué en fonction de la colonisation du limbe scléro-cornéen. Cette dernière ne semble pas influencer une contamination du milieu d'organoculture (OR=0,5 [0,06-4,44]  $p=0,53$ ). En ce qui concerne la qualité endothéliale, nous avons voulu savoir si une cornée de mauvaise qualité était plus susceptible d'être contaminée qu'une cornée transfixiante. Ceci n'a pu être évalué car aucune des 6 cornées rejetées n'a été catégorisée en mauvaise qualité endothéliale [Annexe 4].

**Tableau 27 : Influence de différents facteurs relatifs au donneur et au prélèvement de la cornée sur la colonisation des culs-de-sac conjonctivaux et des limbes scléro-cornéens.**

Variables	Données (par cornée)	Cul-de-sac conjonctival				Limbe scléro-cornéen			
		Odd ratio bruts		Odd ratio ajustés		Odd ratio bruts		Odd ratio ajustés	
		OR (95%IC)	p	OR (95%IC)	p	OR (95%IC)	p	OR (95%IC)	p
Âge (années)	75 (50,4-92,8)	-	0,44			-	0,62		
<b>Sexe</b>									
- Hommes	73 (57,5%)	1	[ref]			1	[ref]		
- Femmes	54 (42,5%)	0,88 (0,38-2,04)	0,77			1,15 (0,52-2,55)	0,72		
<b>Durée d'hospitalisation *</b> (jours)	17 (2-175)	-	0,50			-	0,08	-	-
<b>Cause du décès</b>									
- Choc septique	8 (6,2%)	INI	0,99			INI	0,99	-	-
- Cancer	50 (39,1%)	1	[ref]			1	[ref]	-	-
- Maladie cardio-vasculaire	36 (28,1%)	1,26 (0,46-3,47)	0,65			3,60 (1,19-10,91)	0,02	<b>3,20</b> <b>(1,13-9,06)</b>	<b>0,03</b>
- Autres causes	34 (26,6%)	1,17 (0,43-3,24)	0,76			0,94 (0,38-2,31)	0,89	-	-
<b>Sepsis au moment du décès</b>									
- OUI	32 (25,2%)	0,45 (0,18-1,09)	0,08	-	-	0,79 (0,33-1,89)	0,59		
- NON	95 (74,8%)	1	[ref]	-	-	1	[ref]		
<b>Immunodépression au moment du décès</b>									
- OUI	10 (7,9%)	2,83 (0,34-23,34)	0,33			1,57 (0,32-7,80)	0,58		
- NON	117 (92,1%)	1	[ref]			1	[ref]		
<b>Délai décès-prélèvement (heures)</b>									
- < 6 heures	24 (18,9%)	0,28 (0,09-0,90)	0,03	-	-	0,49 (0,15-1,55)	0,22	-	-
- 6-12 heures	48 (37,8%)	1	[ref]	-	-	1	[ref]	-	-
- 12-18 heures	33 (26,0%)	0,63 (0,20-2,02)	0,44	-	-	0,35 (0,12-0,99)	0,05	-	-
- 18-24 heures	22 (17,3%)	0,46 (0,13-1,56)	0,21	-	-	0,29 (0,09-0,90)	0,03	-	-
<b>Durée de réfrigération du corps avant prélèvement (heures)</b>									
...- < 2 heures	41 (32,3%)	1	[ref]	-	-	1	[ref]		
...- 2-5 heures	30 (23,6%)	0,67 (0,21-2,19)	0,52	-	-	1,29 (0,41-4,05)	0,66		
...- 5-10 heures	18 (14,2%)	0,17 (0,16-1,47)	0,17	-	-	0,51 (0,15-1,66)	0,26		
...- > 10 heures	38 (29,9%)	0,66 (0,22-2,00)	0,47	-	-	0,62 (0,23-1,65)	0,34		
<b>Qualité endothéliale</b>									
- < 1500 / mm <sup>2</sup>	22 (17,3%)	1,71 (0,51-5,71)	0,38			1,25 (0,43-3,63)	0,68		
- 1500-2000 / mm <sup>2</sup>	30 (23,6%)	1,90 (0,64-5,68)	0,25			1,87 (0,67-5,24)	0,23		
- > 2000 / mm <sup>2</sup>	69 (54,3%)	1	[ref]			1	[ref]		

\* Durée d'hospitalisation cumulée pendant les 6 mois précédant le décès.

## V. Discussion

---

L'objectif principal de notre travail était dans un premier temps de faire un état des lieux de la flore cornéenne des donneurs de cornée par l'étude des germes isolés au moment du prélèvement du greffon. Dans un deuxième temps, la contamination bactérienne de ces greffons pendant et à l'issue de leur conservation par organoculture a été évaluée. Les objectifs secondaires étaient de déterminer la proportion de germes multirésistants au contact des cornées, de mesurer l'influence de différents paramètres relatifs au donneur, au prélèvement du greffon ou à sa conservation pouvant préjuger de la sécurité microbiologique des greffons délivrés et enfin, de déterminer la prévalence des intégrons dans la flore cornéenne. Pour ces différents objectifs, deux approches ont été utilisées, la culture conventionnelle et la biologie moléculaire.

### ***A. Population et devenir des cornées prélevées***

#### **1. Population**

Notre population de donneurs avait un sexe ratio équilibré et s'est avérée être une population âgée. En effet, l'âge médian était de 75 ans (50,4-92,8), le donneur le plus âgé ayant 97 ans. Ceci peut avoir une incidence sur la densité cellulaire endothéliale au moment du prélèvement mais n'affecte ni la qualité endothéliale au moment de la délivrance du greffon ni la sécurité microbiologique du greffon (50). Dans notre étude, les cornées auraient tendance à être moins rejetées plus l'âge du donneur augmente (OR=0,97 [0,94-0,99] p=0,05), résultats en accord avec ceux de Gain et collaborateurs qui ont montré une meilleure survie en organoculture des greffons provenant de donneurs très âgés (50). Certains auteurs décrivent l'âge comme facteur favorisant de contamination interne de l'œil (93) mais très peu de contaminations internes ont été mises en évidence dans notre étude. Peu de nos patients étaient immunodéprimés au moment de leur décès et ceci n'est pas apparu être en faveur d'une colonisation cornéenne ou d'une contamination du greffon plus importante.

La cause du décès en tant que facteur favorisant de la contamination des greffons a été largement étudiée. Le cancer a été majoritairement décrit comme pouvant représenter un facteur de risque de contamination microbiologique des greffons (3, 60) notamment par la présence dans la flore de ces donneurs de germes éventuellement nosocomiaux et potentiellement plus résistants liés à une hospitalisation prolongée. Or, notre travail n'a pas montré de lien entre les colonisations des culs-de-sac conjonctivaux et des limbes scléro-cornéens et le décès par cancer. De façon plus générale, aucun lien n'a été mis en évidence avec une hospitalisation prolongée dans les 6 mois précédant le décès. Dans notre étude, un décès par maladie cardio-vasculaire s'est avéré être le seul

facteur de risque de colonisation du limbe scléro-cornéen, ce qui est en accord avec les travaux de Rehany et collaborateurs qui décrivent également une augmentation de la contamination des greffons en cas de décès par maladie cardio-vasculaire, sans trouver d'explication raisonnable à cette observation (90). Comme d'autres études l'ont montré, cette donnée semble néanmoins paradoxale, un décès par maladie cardio-vasculaire arrivant le plus souvent subitement et chez des personnes non hospitalisées (18, 57). Un quart de notre population était connue pour être en sepsis au moment du décès, mais peu de nos donneurs sont décédés suite à un choc septique. Nous n'avons pas retrouvé de corrélation entre cette notion de sepsis et l'isolement de germes dans le sang. En effet, certains donneurs étiquetés septiques avaient des hémocultures négatives (9 donneurs sur 16) et certains donneurs pour lesquels aucune bactériémie n'était renseignée se sont avérés avoir des hémocultures positives (21 donneurs sur 28). Le premier phénomène peut être expliqué par l'administration d'antibiotiques chez les patients septiques avant leur décès, ayant pu inhiber la croissance bactérienne au moment de la mise en culture du sang. Le second trouve son explication soit dans l'existence d'une décharge bactériémique post-mortem par translocation des germes de la flore digestive dans le sang, soit dans une contamination sanguine à partir de la flore cutanée. Cette notion de sepsis ou la présence de germes dans le sang ne semble pas augmenter le risque de colonisation des greffons.

Les délais entre le décès du donneur et le prélèvement de la cornée dans notre étude semblent conformes à ce qui a été décrit dans la littérature. Bien que le prélèvement devrait être réalisé de façon optimale avant la 6<sup>ème</sup> heure suivant le décès du donneur, le délai moyen de prélèvement post-mortem se situe entre la 11<sup>ème</sup> et la 12<sup>ème</sup> heure (20). Notre délai médian était de 10,8 heures (3,3-21,7) et 21,9% des prélèvements ont été réalisés dans les 6 premières heures. Le prélèvement peut être réalisé jusqu'à la 20<sup>ème</sup> heure si le corps a été placé dans les 4 heures suivant le décès en chambre froide à +4°C. Ceci a été respecté sauf pour 5 donneurs pour lesquels le prélèvement a été effectué au-delà de 20 heures. L'augmentation du délai dans notre étude n'est pas apparue comme un facteur de risque de colonisation cornéenne. La durée de réfrigération majoritairement proportionnelle au délai décès-prélèvement ne semble pas non plus influencer le risque de colonisation. Il faut considérer l'ensemble de ces résultats avec prudence car notre effectif de donneurs reste limité pour tirer des conclusions sur l'absence de facteurs de risque éventuels.

## **2. Devenir des cornées**

Les greffons ont été validés par les banques de tissus uniquement dans 44,9% des cas. Cette proportion n'est pas statistiquement différente des données nationales qui font état d'un taux de validation des tissus dans 48,5% des cas ( $p=0,42$ ). Le pourcentage de cornées effectivement

délivrées est encore moins important, avoisinant les 39% mais il est cohérent avec les chiffres nationaux annoncés en 2009 (40%). Ce taux, passé de 52,7% en 2005 à 40% en 2009, peut être expliqué par une restriction de plus en plus prononcée des critères de validation des tissus (sélection clinique, qualification biologique des tissus) depuis 2005 (4).

Dans la littérature, la principale cause d'élimination des cornées est soit une sérologie réglementaire positive ou douteuse (17), soit une mauvaise qualité endothéliale (8). Notre travail a rapporté la mauvaise qualité endothéliale comme principale cause de non validation d'une cornée pour greffe (62,8%), suivie par les causes sérologiques (28,6%) et les rejets pour cause microbiologique (8,6%). On peut noter que 6,3% des cornées, soit 8, ont tout d'abord été validées mais qu'elles n'ont finalement pas été greffées malgré une bonne qualité endothéliale, faute de receveur dans les délais de validité d'utilisation des greffons.

## ***B. Colonisation des cornées et contamination intraoculaire***

### **1. Colonisation conjonctivale et cornéenne**

Notre étude n'a pas montré de différence entre la colonisation conjonctivale et la colonisation du limbe scléro-cornéen, que ce soit en terme de fréquence ou de composition des flores. Chez les patients sains, les conjonctives sont fréquemment colonisées alors que la cornée l'est peu grâce à l'action antibactérienne mécanique et enzymatique du film lacrymal. Dans notre population de donneurs décédés, la disparition du film lacrymal et la contiguïté des conjonctives et du limbe peuvent expliquer ce phénomène, qui semble être une contamination de la cornée par la flore conjonctivale. Le taux de colonisation cornéenne retrouvé dans notre étude a été évalué à 71,7%, taux intermédiaire par rapport à ceux décrits dans la littérature au niveau du limbe scléro-cornéen, allant de 42,8% à 88,8% (96, 103). Il apparaît beaucoup plus important que le taux retrouvé dans la première étude effectuée dans notre centre (71,7% versus 24,7%) (93). Néanmoins, cette différence de résultats est à prendre avec précautions puisque le mode de prélèvement n'était pas le même : écouvillonnages du limbe scléro-cornéen versus grattages cornéens. Une autre équipe ayant étudié l'anneau scléral et le bouton cornéen après conservation par hypothermie a montré une différence dans l'importance de la contamination ainsi que dans les germes contaminants entre ces deux localisations, notamment à cause d'une plus grande proximité des conjonctives de l'anneau scléral par rapport au bouton cornéen (5).

Les germes ayant été isolés sont majoritairement des bactéries à Gram positif, notamment des SCN et des corynébactéries. La flore mise en évidence est proche des flores cornéennes de donneurs précédemment décrites, elles-mêmes ressemblant à la flore conjonctivale des patients sains. Certains auteurs rapportent une plus grande fréquence de bactéries à Gram négatif dans la

flore de donneurs décédés, ce qui n'a pas été le cas dans notre étude. Les premiers travaux effectués dans notre centre avaient cependant déjà montré la prépondérance de bactéries à Gram positif dans les prélèvements superficiels (93). Le germe majoritairement retrouvé dans notre étude a été *S. epidermidis*, représentant à lui seul la moitié des germes isolés des culs-de-sac conjonctivaux et des limbes scléro-cornéens, et s'avérant être retrouvé, sur 59,1% des culs-de-sac conjonctivaux et sur 54,3% des limbes scléro-cornéens. Ce germe appartient à la flore commensale de la peau et ne possède pas de facteurs de virulence. Cependant, il peut se comporter comme un germe opportuniste, responsable d'infections nosocomiales telles que des endophtalmies post-opératoires aiguës ou chroniques (14, 24, 29) et des kératites post-greffe, particulièrement dans les pays en voie de développement (109). Un des problèmes majeurs liés à ce germe n'est pas la sévérité des infections qu'il entraîne mais sa multirésistance aux antibiotiques. Dans notre étude, plus de la moitié des souches étaient résistantes à au moins trois des cinq principales familles d'antibiotiques avec 61,4% de résistance à la méticilline et 38,6% à l'ensemble des aminosides. Or, les antibiotiques contenus dans les milieux d'organoculture sont la pénicilline G et la streptomycine ce qui pose un problème d'adéquation des antibiotiques décontaminants. *S. aureus* a été peu retrouvé sur nos prélèvements (6,2% de l'ensemble des germes isolés des culs-de-sac conjonctivaux et des limbes scléro-cornéens), 23,8% des souches étaient résistantes à la méticilline et donc catégorisées BMR, correspondant au taux actuel de SARM hospitaliers. Aucun des *S. aureus* n'était résistant à la gentamicine. La deuxième famille, en terme de fréquence d'isolement, est celle des corynébactéries, *C. macginleyi* étant l'espèce majoritairement isolée que ce soit des culs-de-sac conjonctivaux ou des limbes. Néanmoins nous pouvons faire l'hypothèse d'une plus grande fréquence de cette bactérie dans la flore de donneurs décédés car les milieux de culture et les incubations utilisés dans notre protocole n'étaient pas optimaux pour sa croissance. En effet, *C. macginleyi*, quasi exclusivement isolée de prélèvements oculaires (48, 49), est une corynébactérie lipophile de croissance lente, favorisée par une atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> mais poussant très peu sur les géloses chocolat. Cette espèce est considérée comme bactérie commensale dominante au niveau de la surface oculaire mais elle peut s'avérer être un pathogène opportuniste dans le cas de conjonctivites (40, 67). Deux cas de kératites post-kératoplastie ont été imputés à ce germe (99) ainsi qu'un cas d'endophtalmie post-opératoire suite à une chirurgie de cataracte (46). Sur l'ensemble des *C. macginleyi* isolées, près d'un quart présentait un phénotype de résistance aux fluoroquinolones mais aucune n'était résistante ni aux  $\beta$ -lactamines, ni aux aminosides. La deuxième corynébactérie que nous avons isolée en terme de fréquence est *C. accolens*, également lipophile et sensible aux antibiotiques testés. Les autres bactéries isolées, streptocoques et entérocoques, peuvent également être à l'origine d'endophtalmies postopératoires. Les streptocoques étaient sensibles aux  $\beta$ -lactamines et aux aminosides pour la quasi-totalité des



souches isolées ; près de la moitié des entérocoques étaient résistants aux aminosides, uniquement une souche d'*E. faecium* était résistante aux pénicillines et aucun VRE n'a été isolé. Nous pouvons également citer la présence de bactéries anaérobies du genre *Propionibacterium*, germes commensaux de la peau pouvant entraîner des endophtalmies chroniques (surtout après chirurgie de la cataracte) (28) mais globalement ces germes ont été peu isolés de nos prélèvements (environ 4% des souches). Les bactéries à Gram négatif, plus fréquemment isolées des culs-de-sac conjonctivaux (5,2%) que des limbes scléro-cornéens (2,4%), ont été de façon plus systématique à l'origine de rejet de cornées pour cause de contamination microbiologique (cf infra, paragraphe C. Organoculture).

La prévalence des intégrons de classe 1, 2 et 3 chez les donneurs, définie par la présence d'un intégron dans au moins un des quatre prélèvements superficiels (œil droit et œil gauche) effectués pour un donneur, a été évaluée à 10,9%. Ces intégrons sont quasi exclusivement des intégrons de classe 1, classe la plus fréquemment décrite et étudiée. Les bactéries connues pour héberger des intégrons sont principalement des bactéries à Gram négatif notamment les entérobactéries mais il est à noter que des intégrons ont également été retrouvés chez des corynébactéries (12). La prévalence dans les prélèvements oculaires superficiels apparaît moins importante que dans le tractus urinaire où des études évoquent une prévalence d'intégrons de classe 1 de 50% (112, 117). Dans notre étude, les intégrons ont été retrouvés chez *K. pneumoniae*, *C. pseudodiphtheriticum* et *C. propinquum*. Nos données peuvent être expliquées par le fait que la flore des donneurs est majoritairement composée de bactéries à Gram positif chez lesquelles les intégrons sont moins décrits. La souche de *K. pneumoniae* hébergeant un intégron de classe 1 présentait de nombreux phénotypes de résistances (BLSE, résistance aux aminosides et aux fluoroquinolones). Les deux corynébactéries étaient relativement sensibles, ne présentant qu'un phénotype de résistance aux macrolides de type MLSb et une résistance aux sulfamides, cette dernière s'avérant être un caractère prédictif de la présence d'un intégron (75).

## **2. Contamination intraoculaire**

Dans la première étude effectuée dans notre centre, les bactéries majoritairement isolées des prélèvements d'humeur aqueuse étaient des bacilles à Gram négatif et des bactéries anaérobies strictes. Ce phénomène avait été relié à la présence d'une bactériémie post-mortem consécutive à la translocation des germes de la flore digestive dans le sang, qui avait pu atteindre et contaminer les milieux intraoculaires (93). C'est pourquoi dans notre protocole nous avons veillé à effectuer un prélèvement sanguin en parallèle des prélèvements oculaires afin de comparer les germes isolés du sang aux germes isolés de l'humeur aqueuse pour tester cette hypothèse. Contrairement aux données de la première étude, nous avons peu isolé de germes de l'humeur aqueuse, notre taux de

contamination étant évalué à 3,9% contre 8,6% dans les travaux de Robert et collaborateurs (93). De plus, aucun bacille à gram négatif et aucun germe anaérobie n'a été retrouvé dans les milieux intraoculaires et pour les quatre donneurs ayant eu de façon concomitante des germes dans l'humeur aqueuse et dans le sang, aucun des germes n'était corrélé. Nous n'avons donc pas pu étayer cette hypothèse. Ce que nous avons pu conclure est que la contamination intraoculaire est beaucoup plus rare que la contamination sanguine et que la colonisation superficielle. Les germes isolés n'étaient pas spécialement résistants et aucun intégron n'a été mis en évidence dans les humeurs aqueuses prélevées.

### **C. Organoculture**

Afin d'évaluer la sécurité microbiologique de la conservation par organoculture des cornées prélevées dans notre centre, notre étude a envisagé l'étude bactériologique de tous les milieux d'organoculture utilisés dans la conservation du greffon. Parallèlement, une évaluation microbiologique, soit des résidus opératoires en cas de greffe, soit des cornées pour les greffons rejetés pour une cause autre que microbiologique a été effectuée. Depuis 2005, on observe une diminution du nombre de cornées déclarées contaminées annuellement par les banques françaises, 10,4 % en 2005-2006 et 8,6 % en 2007-2008 (38). Notre taux de rejet pour cause microbiologique, d'une valeur de 4,7%, était encore moins important que ces chiffres nationaux ou que les chiffres rapportés dans la littérature où le taux de rejet pour contamination varie entre 5% et 11,4% (8, 17, 47, 93, 105, 118). Les contaminations ont principalement été détectées après la mise en culture du milieu de transport (CorneaPrep II®) ayant écourté la conservation de ces cornées contaminées. Ceci semble cohérent puisqu'en plus de maintenir la viabilité cellulaire, ce milieu de transport a pour but d'éliminer les cornées massivement contaminées avant leur mise en conservation. Aucune contamination supplémentaire n'a été mise en évidence ni sur les milieux de conservation (CorneaMax®), ni sur les milieux de déturgescence (CorneaJet®) étudiés. Ceci montre l'utilité des contrôles de stérilité systématique, qui ont permis l'élimination rapide de cornées contaminées inaptées à la greffe. Le taux de contamination retrouvé peut sembler paradoxal par rapport à la majorité de *S. epidermidis* multirésistants retrouvés au niveau des cornées, notamment aux antibiotiques présents dans les milieux de conservation. Mais ces données semblent confirmer qu'une désinfection correcte à la Bétadine® 5%, permettant l'élimination de la majorité des germes présents en surface oculaire, associée à la conservation en milieu d'organoculture supplémenté en pénicilline G et streptomycine est suffisamment efficace pour éradiquer la majorité des flores cornéennes. Ce sont finalement les bacilles à Gram négatif, bien que moins représentés dans la flore des donneurs puisque représentant seulement 1,8% des germes isolés des limbes scléro-cornéens et 5,2% des germes isolés de culs-de-sac conjonctivaux, qui semblaient plus

responsables de contamination du greffon pendant l'organoculture. En effet, deux des trois contaminations bactériennes ont été imputées à *K. pneumoniae* et *S. maltophilia*. Ces deux contaminants avaient été retrouvés au niveau d'un cul-de-sac conjonctival de chacun des donneurs concernés, la souche de *K. pneumoniae* avait même été initialement retrouvée dans le sang, seule corrélation mise en évidence entre un germe oculaire et sanguin. Ces deux germes étaient hautement résistants aux antibiotiques, *S. maltophilia* étant naturellement résistant à la pénicilline G et à tous les aminosides et la souche de *K. pneumoniae* isolée présentant un phénotype de BLSE et des résistances associées aux aminosides et aux fluoroquinolones. Ceci semble cohérent avec les résultats des déclarations 2007-2008 des banques relatives aux cornées éliminées pour cause microbiologique pour lesquelles de nombreuses contaminations à bacilles à Gram négatifs, notamment environnementaux, ont été rapportées (11,5% *P. aeruginosa* ; 10,5% *S. paucimobilis* ; 6,6% *Brevundimonas* spp ; 4,3% *S. maltophilia* ; 2,7% *A. baumannii* ; 4,7% *B. cepacia*), germes pouvant être très résistants aux antibiotiques (38).

#### **D. Apport de la biologie moléculaire**

La biologie moléculaire, dans le but d'une détection bactérienne, a été utilisée sur l'ensemble des prélèvements oculaires, sanguins et milieux d'organoculture pour lesquels la culture conventionnelle était négative ou monobactérienne. Le but était d'évaluer si cette technique pouvait apporter des informations supplémentaires quant à la présence de germes non isolés en culture. Les résultats se sont avérés très décevants. En effet, en prenant la culture conventionnelle comme technique de référence, la sensibilité de la PCR en temps réel ciblant un fragment du gène de l'ARN 16S ribosomal n'excède pas 10% pour les prélèvements oculaires superficiels, 22,2% pour les prélèvements sanguins et 33,3% pour les milieux d'organoculture. Cette dernière valeur plus élevée que les deux premières, a peut-être été augmentée artificiellement par la plus grande proportion de prélèvements négatifs dans les milieux d'organoculture. Le gain diagnostique a été estimé à moins de 1% pour les prélèvements oculaires et s'avère être nul pour les prélèvements sanguins et les milieux d'organoculture.

Ces résultats peuvent être expliqués par deux phénomènes. Le premier est que la PCR ciblant le gène de l'ARN 16S, du fait de son caractère universel, a pour avantage d'amplifier tout type de bactérie mais a pour inconvénient une perte de sensibilité importante en comparaison aux PCR spécifiques. La deuxième explication réside dans l'importance de l'inoculum de départ. Les prélèvements oculaires superficiels consistaient en des écouvillonnages déchargés dans 1 mL de milieu de transport. Nous évaluons une flore, donc un portage pour lequel l'inoculum bactérien est beaucoup moins élevé que dans le cadre d'une infection. Une technique développée en PCR conventionnelle, associant une PCR ciblant l'intégralité du gène de l'ARN 16S et une PCR nichée

ciblant un fragment de ce gène, avait été appliquée dans le cas d'abcès cornéens et d'endophtalmies dans notre centre et avait montré une sensibilité évaluée à 50,0% (24,7%-75,4%) par comparaison à la culture (94). Dans cette étude, la sensibilité relativement faible a été en partie expliquée par les faibles volumes de prélèvements étudiés. Sachant que la biologie moléculaire était utilisée dans le cadre d'infections oculaires documentées cliniquement, et donc à inocula plus importants que dans le cadre d'une colonisation, nos résultats ne semblent pas surprenants, d'autant plus que les quantités prélevées étaient similaires. Ceci montre la difficulté d'application des techniques de PCR universelle aux prélèvements oculaires, notamment hors contexte infectieux. Les discordances de résultats dans le sang s'expliquent également par un inoculum trop faible avant mise en culture pour pouvoir être détectable par biologie moléculaire. Un point de notre protocole concernant la biologie moléculaire appliquée au sang peut cependant être critiqué. Nous avons choisi une prise d'essai de 200 µL afin de limiter la présence d'inhibiteurs de PCR mais cette stratégie a pu s'accompagner d'une baisse de sensibilité de détection liée à un inoculum trop faible. En effet, des protocoles spécifiques de recherche de germes bactériens ou fongiques directement à partir de sang total préconisent des prises d'essai bien plus importantes, de l'ordre de 3mL, et utilisent des procédés d'extraction beaucoup plus complexes (42). Nous n'avions pas choisi cette technique par commodité mais ceci a pu biaisé nos résultats.

## Conclusion

---

Notre étude avait pour but de faire un état des lieux de différents paramètres pouvant conditionner la contamination du greffon cornéen tels la colonisation cornéenne, la contamination des milieux intraoculaires ainsi que différents facteurs de risque liés au donneur ou aux conditions de prélèvement.

Nos résultats ont montré une colonisation cornéenne des donneurs composée majoritairement de bactéries à Gram positif, notamment du genre staphylocoque, relativement résistantes aux antibiotiques utilisés dans les milieux d'organoculture mais induisant finalement peu de rejets des greffons pour cause microbiologique. Le seul facteur de risque de colonisation des cornées mis en évidence apparaît être un décès pour cause cardio-vasculaire, donnée assez surprenante au vu des conditions de décès souvent brutales ne favorisant pas spécialement une colonisation par des germes nosocomiaux plus volontiers résistants. Le sepsis n'apparaît pas comme un facteur de risque de contamination, ce qui confirme les données de la première étude effectuée dans notre centre. La durée entre le décès et le prélèvement ou la durée de réfrigération, paramètre non étudié jusqu'à maintenant, ne semblent pas influencer la contamination du greffon. Nous n'avons retrouvé dans l'humeur aqueuse ni bactéries à Gram négatif, ni germes anaérobies et n'avons donc pas pu confirmer les conclusions de la précédente étude qui émettait l'hypothèse d'une contamination des milieux internes à partir d'une décharge bactériémique post-mortem provenant de la flore digestive. La biologie moléculaire comme outil de détection bactérienne n'a pas montré d'intérêt dans notre étude sur des prélèvements effectués sans contexte d'infection mais a permis de mettre en évidence une prévalence d'intégrons d'environ 11% chez nos donneurs. Au vu de ces résultats, nous n'avons pas pu identifier de facteurs forts, susceptibles d'évincer certaines personnes décédées du don, et la greffe de cornée semble être suffisamment sécurisée microbiologiquement par les mesures de désinfections des cornées et la conservation par organoculture, notre taux de rejet étant plus faible que précédemment décrit et le nombre de cornées actuellement prélevées suffisant à combler les demandes.

Cette étude a donc permis de consolider nos connaissances sur la sécurité microbiologique des greffes de cornée et a montré que la biologie moléculaire n'avait pas d'intérêt hors infection. Des techniques de PCR nichées pourraient néanmoins être envisagées afin de sensibiliser les techniques de détection des germes par PCR universelle. De plus, notre faible effectif aurait besoin d'être augmenté afin de pouvoir conclure de façon certaine sur les éventuels facteurs de risque de contamination permettant la sélection des donneurs. Il reste également à caractériser les intégrons détectés dans les prélèvements oculaires.

## Bibliographie

---

1. Arrêté du 1er avril 1997 portant homologation des règles de bonnes pratiques relatives au prélèvement des tissus et au recueil des résidus opératoires issus du corps humain utilisés à des fins thérapeutiques. *JORF n°81* 6 avril 1997: page 5275, 1997.
2. Décret n°97-928 du 9 octobre 1997 relatif aux règles de sécurité sanitaire applicables à tout prélèvement d'éléments ou toute collecte de produits du corps humain et à leur utilisation à des fins thérapeutiques, à l'exception des gamètes, du sang et de ses composants et de leurs dérivés, ainsi que des réactifs, pris en application des articles L. 665-10 et L. 665-15 du code de la santé publique et modifiant ce code. *JORF n°238* 12 octobre 1997: page 14865, 1997.
3. Clostridial endophthalmitis after cornea transplantation--Florida, 2003. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep* 52: 1176-1179, 2003.
4. **Agence de la Biomédecine**. Rapport médical et scientifique du prélèvement et de la greffe en France pour l'année 2009 [En ligne]. 2010. <http://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2009/accueil.php> [20 Fév. 2011].
5. **Albon J, Armstrong M, Tullo AB**. Bacterial contamination of human organ-cultured corneas. *Cornea* 20: 260-263, 2001.
6. **Ameziane N, Bogard M, Lamoril J**. *Principes de biologie moléculaire en biologie clinique*. Elsevier, 2005.
7. **Antonios SR, Cameron JA, Badr IA, Habash NR, Cotter JB**. Contamination of donor cornea: postpenetrating keratoplasty endophthalmitis. *Cornea* 10: 217-220, 1991.
8. **Armitage WJ, Easty DL**. Factors influencing the suitability of organ-cultured corneas for transplantation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 38: 16-24, 1997.
9. **Badenoch PR, Alfrich SJ, Wedding TR, Coster DJ**. Effectiveness of a decontamination method for donor corneas. *Br J Ophthalmol* 72: 225-227, 1988.
10. **Bains HS, Weinberg DV, Feder RS, Noskin GA**. Postoperative Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Endophthalmitis. *Arch Ophthalmol* 125: 1292-1293, 2007.
11. **Barraud O, Baclet MC, Denis F, Ploy MC**. Quantitative multiplex real-time PCR for detecting class 1, 2 and 3 integrons. *J. Antimicrob. Chemother* 65: 1642-1645, 2010.
12. **Barraud O**. Mise au point d'une PCR en temps réel multiplex pour la détection des 3 classes d'intégrons de résistance aux antibiotiques. Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en Pharmacie. Université de Limoges. 2007.
13. **Batterbury M, Bowling B, Catier A**. *Ophthalmologie*. Elsevier Masson, 2005.
14. **Benz MS, Scott IU, Flynn HW, Unonius N, Miller D**. Endophthalmitis isolates and antibiotic sensitivities: a 6-year review of culture-proven cases. *Am. J. Ophthalmol* 137: 38-42, 2004.

15. **bioMérieux France**. Les milieux de culture [En ligne]. [http://www.biomerieux.fr/upload/PPM\\_FR1.pdf](http://www.biomerieux.fr/upload/PPM_FR1.pdf) [28 Avr. 2011].
16. **Bispo PJM, de Melo GB, Hofling-Lima AL, Pignatari ACC**. Detection and gram discrimination of bacterial pathogens from aqueous and vitreous humor using real-time PCR assays. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 52: 873-881, 2011.
17. **Borderie VM, Laroche L**. Microbiologic study of organ-cultured donor corneas. *Transplantation* 66: 120-123, 1998.
18. **Borderie VM, Scheer S, Touzeau O, Védie F, Carvajal-Gonzalez S, Laroche L**. Donor organ cultured corneal tissue selection before penetrating keratoplasty. *Br J Ophthalmol* 82: 382-388, 1998.
19. **Borderie VM, Bourcier T, Laroche L**. Kératoplasties lamellaires à but optique. *EMC (Elsevier Masson SAS, Paris) Ophtalmologie* 21-206-A-23, 2007.
20. **Borderie VM, Collectif**. *Les greffes en ophtalmologie*. Elsevier, 2004.
21. **Borderie VM, Delbosc B, Fialaire-Legendre A, Laroche L**. Prélèvement et conservation des greffons cornéens. *EMC (Elsevier Masson SAS, Paris) Ophtalmologie* 21-205-A-20, 2007.
22. **Borderie VM, Laroche L, Delbosc B**. Kératoplastie transfixiante. *EMC (Elsevier Masson SAS, Paris) Ophtalmologie* 21-206-A-10, 1999.
23. **Bron A, Cochereau I, Chiquet C, Bourcier T**. Endophtalmies. *EMC (Elsevier Masson SAS, Paris) Ophtalmologie* 21-250-D-40, 2008.
24. **Callegan MC, Gilmore MS, Gregory M, Ramadan RT, Wiskur BJ, Moyer AL, Hunt JJ, Novosad BD**. Bacterial endophthalmitis: therapeutic challenges and host-pathogen interactions. *Prog Retin Eye Res* 26: 189-203, 2007.
25. **Cambray, G, Guerout, A, Mazel D**. Integrons. *Annu. Rev. Genet.* 44: 141-166, 2010.
26. **Chaurasia S, Muralidhar R, Garg P, Gopinathan U**. Donor corneal button-related endophthalmitis after penetrating keratoplasty. *Clin. Experiment. Ophthalmol* 38: 75-76, 2010.
27. **Chen K, Wang N, Sun M, Chen T, Lai C, Wu W, Tan H**. Endophthalmitis caused by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 41: e555-561, 2010.
28. **Chiquet C, Benito Y, Croize J, Romanet J, Vandenesch F, Maurin M**. Diagnostic microbiologique des endophtalmies aiguës. *J Fr Ophtalmol* 30: 1049-1059, 2007.
29. **Chiquet C, Cornut P, Vinh V, Maurin M, Romanet J**. Endophtalmies aiguës : du germe à la clinique. *J Fr Ophtalmol* 30: 1060-1066, 2007.
30. **Collège des Ophtalmologistes Universitaires de France**. Enseignement de 2ème cycle. Item 8 : Prélèvement de cornée à but thérapeutique [En ligne]. *Université Médicale Virtuelle Francophone* 2008. <http://umvf.univ-nantes.fr/ophtalmologie/enseignement/ophtalmo2/site/html/cours.pdf> [27 Fév. 2011].

31. **Collège des Ophtalmologistes Universitaires de France.** Enseignement de 2ème cycle. Item 127 : Greffe de cornée [En ligne]. *Université Médicale Virtuelle Francophone* 2010. <http://umvf.univ-nantes.fr/ophtalmologie/enseignement/ophtalmo7/site/html/1.html> [20 Fév. 2011].
32. **Comité de l'Antibiogramme de la société française de Microbiologie.** Communiqué 2010 [En ligne]. 2010. [http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/file/casfm\\_2010.pdf](http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/file/casfm_2010.pdf) [6 Fév. 2011].
33. **Copan Diagnostics, Inc.** Copan Liquid Amies Elution Swab (ESwab) Collection and Transport System. Product Insert & How to Use Guide [En ligne]. 2010. [http://www.copanusa.com/media/packinserts/49D-REV04\\_2010.10.pdf](http://www.copanusa.com/media/packinserts/49D-REV04_2010.10.pdf) [6 Fév. 2011].
34. **Cornish KS, Ramamurthi S, Butcher I, Ramaesh K.** Is microbiological analysis of donor cornea transport culture media necessary? *Eur J Ophthalmol* 19: 137-138, 2009.
35. **Courvalin P, Leclercq R, Bingen E.** *Antibiogramme*. Editions Eska, 2006.
36. **Davis JL, Koidou-Tsiligianni A, Pflugfelder SC, Miller D, Flynn HW, Forster RK.** Coagulase-negative staphylococcal endophthalmitis. Increase in antimicrobial resistance. *Ophthalmology* 95: 1404-1410, 1988.
37. **Delbosc B, Naegelen J, Herve P, Carbillet JP, Montard M.** Conservation des cornées humaines en milieu de culture enrichi à +37°C : analyses histologiques et biochimiques. *J Fr Ophthalmol* 10: 547-549, 551-555, 1987.
38. **Delesalle N, Dubus J, Fleury L, Mouillot L.** Recueil des contaminations bactériologiques et fongiques observées dans les milieux de conservation cornéens - Bilan 2008 - SFBCT 2009 [En ligne]. 2010. <http://www.afssaps.fr/Activites/Controle-en-laboratoire/La-surveillance-du-marche/La-surveillance-du-marche/Surveillance-du-marche-Controle-des-tissus-et-de-leur-milieu-de-conservation> [3 Mai. 2011].
39. **Delesalle N, Huygue G, Dubus J, Droulin J, Rapon F, Fleury L, Mouillot L.** Contrôle de qualité externe des milieux utilisés dans la greffe de cornée - Résultats des tours de contrôle de 2007 à 2008 - SFBCT 2009 [En ligne]. 2010. <http://www.afssaps.fr/Activites/Controle-en-laboratoire/La-surveillance-du-marche/La-surveillance-du-marche/Surveillance-du-marche-Controle-des-tissus-et-de-leur-milieu-de-conservation> [3 Mai. 2011].
40. **Eguchi H, Kuwahara T, Miyamoto T, Nakayama-Imaohji H, Ichimura M, Hayashi T, Shiota H.** High-Level Fluoroquinolone Resistance in Ophthalmic Clinical Isolates Belonging to the Species *Corynebacterium macginleyi*. *J Clin Microbiol* 46: 527-532, 2008.
41. **Eifrig CWG, Scott IU, Flynn HW, Miller D.** Endophthalmitis caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Ophthalmology* 110: 1714-1717, 2003.
42. **Emrich T, Moczko M, Lohmann S, Mayr J, Stockinger H, Haberhausen G.** LightCycler® SeptiFast Test: rapid detection of nosocomial pathogens by real-time PCR [En ligne]. 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, p. 962 Abstract. 2006. <http://www.aspergillus.org.uk/secure/conferences/confabstracts/posters/ECCMID%2016th%20poster/P962.pdf> [15 Mai. 2011].



43. **Everts RJ, Fowler WC, Chang DH, Reller LB.** Corneoscleral rim cultures: lack of utility and implications for clinical decision-making and infection prevention in the care of patients undergoing corneal transplantation. *Cornea* 20: 586-589, 2001.
44. **Fang H, Hedin G.** Rapid screening and identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from clinical samples by selective-broth and real-time PCR assay. *J. Clin. Microbiol* 41: 2894-2899, 2003.
45. **Farrell PL, Fan JT, Smith RE, Trousdale MD.** Donor cornea bacterial contamination. *Cornea* 10: 381-386, 1991.
46. **Ferrer C, Ruiz-Moreno J, Rodríguez A, Montero J, Alió J.** Postoperative *Corynebacterium macginleyi* endophthalmitis. *J Cataract Refract Surg* 30: 2441-4, 2004.
47. **Fontana L, Errani PG, Zerbinati A, Musacchi Y, Di Pede B, Tassinari G.** Frequency of positive donor rim cultures after penetrating keratoplasty using hypothermic and organ-cultured donor corneas. *Cornea* 26: 552-556, 2007.
48. **Funke G, von Graevenitz A, Clarridge JE, Bernard KA.** Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clin. Microbiol. Rev* 10: 125-159, 1997.
49. **Funke G, Pagano-Niederer M, Bernauer W.** *Corynebacterium macginleyi* has to date been isolated exclusively from conjunctival swabs. *J. Clin. Microbiol* 36: 3670-3673, 1998.
50. **Gain P, Thuret G, Chiquet C, Rizzi P, Pugniet JL, Acquart S, Colpart JJ, Le Petit JC, Maugery J.** Cornea procurement from very old donors: post organ culture cornea outcome and recipient graft outcome. *Br J Ophthalmol* 86: 404-411, 2002.
51. **Gain P, Thuret G, Chiquet C, Vautrin AC, Carricajo A, Acquart S, Maugery J, Aubert G.** Use of a pair of blood culture bottles for sterility testing of corneal organ culture media. *Br J Ophthalmol* 85: 1158-1162, 2001.
52. **Gauduchon V, Chalabreysse L, Etienne J, Célard M, Benito Y, Lepidi H, Thivolet-Béjui F, Vandenesch F.** Molecular diagnosis of infective endocarditis by PCR amplification and direct sequencing of DNA from valve tissue. *J. Clin. Microbiol* 41: 763-766, 2003.
53. **Gomes JA, Dana MR, Dua HS, Goren MB, Laibson PR, Cohen EJ.** Positive donor rim culture in penetrating keratoplasty. *Cornea* 14: 457-462, 1995.
54. **Gopinathan U, Reddy MK, Nadkarni MS, Dasari S, Rao GN.** Antimicrobial effect of ciprofloxacin, povidone-iodine, and gentamicin in the decontamination of human donor globes. *Cornea* 17: 57-61, 1998.
55. **Graham JE, Moore JE, Jiru X, Moore JE, Goodall EA, Dooley JSG, Hayes VEA, Dartt DA, Downes CS, Moore TCB.** Ocular pathogen or commensal: a PCR-based study of surface bacterial flora in normal and dry eyes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 48: 5616-5623, 2007.
56. **Gutmann L, Lortholary O.** Coexister avec la résistance aux antibiotiques : une réalité internationale en 2010. *Médecine/sciences* 26: 2, 2010.
57. **Hagenah M, Böhnke M, Engelmann K, Winter R.** Incidence of bacterial and fungal contamination of donor corneas preserved by organ culture. *Cornea* 14: 423-426, 1995.

58. **Hassan SS, Wilhelmus KR.** Ecologic effects on eye banking. *Am. J. Ophthalmol* 142: 1062-1064, 2006.
59. **Hassan SS, Wilhelmus KR.** Quality assessment and microbiologic screening of donor corneas. *Cornea* 26: 953-955, 2007.
60. **Hassan SS, Wilhelmus KR, Dahl P, Davis GC, Roberts RT, Ross KW, Varnum BH.** Infectious disease risk factors of corneal graft donors. *Arch. Ophthalmol* 126: 235-239, 2008.
61. **Haut Conseil de la santé publique.** Maîtrise de la diffusion des bactéries multirésistantes aux antibiotiques importées en France par des patients rapatriés ou ayant des antécédents d'hospitalisation à l'étranger [En ligne]. 2010. [http://www.hcsp.fr/docspdf/avisrapports/hcspr20101116\\_bmrimport.pdf](http://www.hcsp.fr/docspdf/avisrapports/hcspr20101116_bmrimport.pdf) [5 Mar. 2011].
62. **Hermel M, Salla S, Hamsley N, Steinfeld A, Walter P.** Detection of contamination during organ culture of the human cornea. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol* 248: 117-126, 2010.
63. **Hou YC, Hu FR.** *Shewanella putrefaciens* endophthalmitis after penetrating keratoplasty. *Am. J. Ophthalmol* 124: 114-115, 1997.
64. **Jambulingam M, Parameswaran SK, Lysa S, Selvaraj M, Madhavan HN.** A study on the incidence, microbiological analysis and investigations on the source of infection of postoperative infectious endophthalmitis in a tertiary care ophthalmic hospital: an 8-year study. *Indian J Ophthalmol* 58: 297-302, 2010.
65. **Jehl F, Chomarat M, Weber M, Gérard A.** *De l'antibiogramme à la prescription.* 2 éd. Editions BioMérieux, 2004.
66. **Jhanji V, Tandon R, Sharma N, Titiyal JS, Satpathy G, Vajpayee RB.** Whole globe enucleation versus in situ excision for donor corneal retrieval - a prospective comparative study. *Cornea* 27: 1103-1108, 2008.
67. **Joussen A, Funke G, Joussen F, Herberitz G.** *Corynebacterium macginleyi*: a conjunctiva specific pathogen. *Br J Ophthalmol* 84: 1420-1422, 2000.
68. **Kato T, Hayasaka S.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from conjunctivas of preoperative patients. *Jpn. J. Ophthalmol* 42: 461-465, 1998.
69. **Khamis A, Raoult D, La Scola B.** *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *J. Clin. Microbiol* 42: 3925-3931, 2004.
70. **Kloess PM, Stulting RD, Waring GO, Wilson LA.** Bacterial and fungal endophthalmitis after penetrating keratoplasty. *Am. J. Ophthalmol* 115: 309-316, 1993.
71. **Kresloff MS, Castellarin AA, Zarbin MA.** Endophthalmitis. *Surv Ophthalmol* 43: 193-224, 1998.
72. **Kunimoto DY, Tasman W, Rapuano C, Recchia F, Busbee B, Pearlman R, Belmont J, Cohen E, Vander J, Laibson P, Raber I.** Endophthalmitis after penetrating keratoplasty: microbiologic spectrum and susceptibility of isolates. *Am. J. Ophthalmol* 137: 343-345, 2004.

73. **Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P.** Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N. Engl. J. Med* 319: 157-161, 1988.
74. **Leveille AS, McMullan FD, Cavanagh HD.** Endophthalmitis following penetrating keratoplasty. *Ophthalmology* 90: 38-39, 1983.
75. **Leverstein-van Hall MA, M Blok HE, T Donders AR, Paauw A, Fluit AC, Verhoef J.** Multidrug resistance among Enterobacteriaceae is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin. *J. Infect. Dis* 187: 251-259, 2003.
76. **Lindquist TD, Allen KA, Weber KR, Oiland DM.** Ocular surface flora in drowning victims. *Cornea* 14: 418-422, 1995.
77. **Lindquist TD, Maxwell AJ, Miller TD, Win'E TL, Novicki T, Fritsche TR, Iliakis B, Montoya M.** Preparation of corneal donor eyes comparing 1% versus 5% povidone-iodine. *Cornea* 30: 333-337, 2011.
78. **Marshall BM, Ochieng DJ, Levy SB.** Commensals: Underappreciated Reservoir of Antibiotic Resistance. *Microbe* 4: 231-238, 2009.
79. **Mindrup EA, Dubbel PA, Doughman DJ.** Betadine decontamination of donor globes. *Cornea* 12: 324-329, 1993.
80. **Miño De Kaspar H, Ta CN, Froehlich SJ, Schaller UC, Engelbert M, Klauss V, Kampik A.** Prospective study of risk factors for conjunctival bacterial contamination in patients undergoing intraocular surgery. *Eur J Ophthalmol* 19: 717-722, 2009.
81. **Miño de Kaspar H, Koss MJ, He L, Blumenkranz MS, Ta CN.** Antibiotic susceptibility of preoperative normal conjunctival bacteria. *Am. J. Ophthalmol* 139: 730-733, 2005.
82. **Moss JM, Sanislo SR, Ta CN.** Antibiotic susceptibility patterns of ocular bacterial flora in patients undergoing intravitreal injections. *Ophthalmology* 117: 2141-2145, 2010.
83. **Nash RW, Lindquist TD, Kalina RE.** An evaluation of saline irrigation and comparison of povidone-iodine and antibiotic in the surface decontamination of donor eyes. *Arch. Ophthalmol* 109: 869-872, 1991.
84. **Nys S, Vijgen S, Magerman K, Cartuyvels R.** Comparison of Copan eSwab with the Copan Venturi Transystem for the quantitative survival of *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae* and *Candida albicans*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis* 29: 453-456, 2010.
85. **Pardos GJ, Gallagher MA.** Microbial contamination of donor eyes. A retrospective study. *Arch. Ophthalmol* 100: 1611-1613, 1982.
86. **Pels E, Schuchard Y.** Organ culture in the Netherlands. Dans: *Corneal Surgery: Theory Technique and Tissue*. Mosby, 1993, p. 622-32.
87. **Polack FM, Locatcher-Khorazo D, Gutierrez E.** Bacteriologic study of "donor" eyes. Evaluation of antibacterial treatments prior to corneal grafting. *Arch. Ophthalmol* 78: 219-225, 1967.

88. **Poyart C, Quesne G, Coulon S, Berche P, Trieu-Cuot P.** Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase. *J. Clin. Microbiol* 36: 41-47, 1998.
89. **Raynaud C, Bonicel P, Rigal D, Kantelip B.** Anatomie de la cornée. *EMC (Elsevier Masson SAS, Paris) Ophtalmologie* 21-003-A-10, 1996.
90. **Rehany U, Balut G, Lefler E, Rumelt S.** The prevalence and risk factors for donor corneal button contamination and its association with ocular infection after transplantation. *Cornea* 23: 649-654, 2004.
91. **Relman DA.** The identification of uncultured microbial pathogens. *J. Infect. Dis* 168: 1-8, 1993.
92. **Ritterband DC, Shah MK, Meskin SW, Shapiro DE, Seedor JA, Koplin RS, Hu DN, Shao S, Dahl P, McCormick S.** Efficacy and safety of moxifloxacin as an additive in Optisol-GS a preservation medium for corneal donor tissue. *Cornea* 25: 1084-1089, 2006.
93. **Robert P, Camezind P, Drouet M, Ploy MC, Adenis J.** Internal and external contamination of donor corneas before in situ excision: bacterial risk factors in 93 donors. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol* 240: 265-270, 2002.
94. **Sabatier A.** Etude de l'apport de la PCR dans le diagnostic des abcès de cornées et des endophthalmies. Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en Médecine. Université de Limoges. 2008.
95. **Saini JS, Reddy MK, Sharma S, Wagh S.** Donor corneal tissue evaluation. *Indian J Ophthalmol* 44: 3-13, 1996.
96. **Satpathy G, Angra SK.** Changing patterns of microbial contamination and antimicrobial sensitivity in donor eyes. *Ann Ophthalmol* 25: 442-446, 1993.
97. **Sowmya P, Madhavan HN.** Diagnostic utility of polymerase chain reaction on intraocular specimens to establish the etiology of infectious endophthalmitis. *Eur J Ophthalmol* 19: 812-817, 2009.
98. **Stokes HW, Hall RM.** A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol. Microbiol* 3: 1669-1683, 1989.
99. **Suzuki T, Iihara H, Uno T, Hara Y, Ohkusu K, Hata H, Shudo M, Ohashi Y.** Suture-Related Keratitis Caused by *Corynebacterium macginleyi*. *J Clin Microbiol* 45: 3833-3836, 2007.
100. **Ta CN, He L, Mino de Kaspar H.** In vitro antibiotic susceptibility of preoperative normal conjunctival bacteria. *Eye (Lond)* 23: 559-560, 2009.
101. **Ta CN, Chang RT, Singh K, Egbert PR, Shriver EM, Blumenkranz MS, Miño de Kaspar H.** Antibiotic resistance patterns of ocular bacterial flora: a prospective study of patients undergoing anterior segment surgery. *Ophthalmology* 110: 1946-1951, 2003.

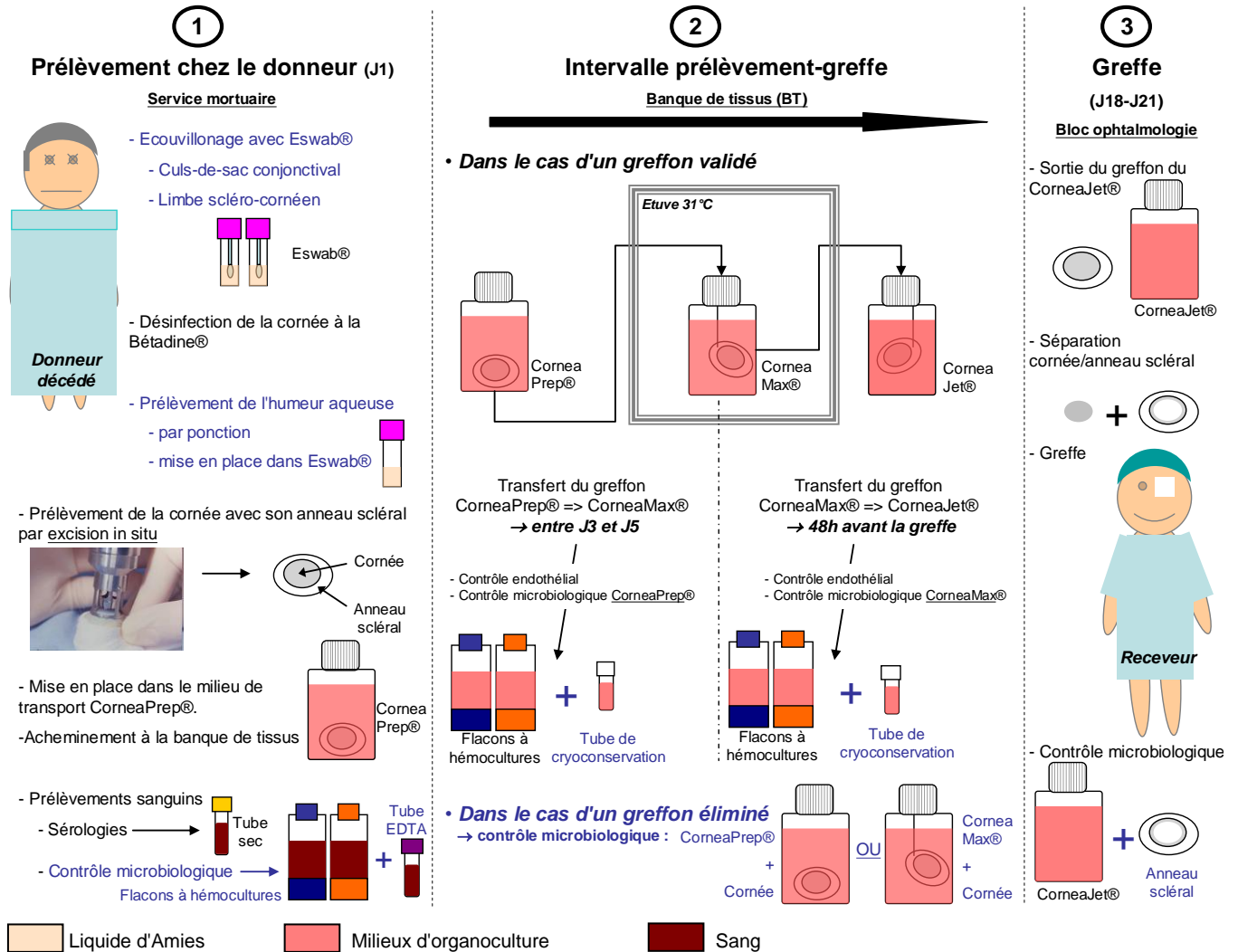
102. **Taban M, Behrens A, Newcomb RL, Nobe MY, McDonnell PJ.** Incidence of acute endophthalmitis following penetrating keratoplasty: a systematic review. *Arch. Ophthalmol* 123: 605-609, 2005.
103. **Tandon R, Mehta M, Satpathy G, Titiyal JS, Sharma N, Vajpayee RB.** Microbiological profile of donor corneas: a retrospective study from an eye bank in north India. *Cornea* 27: 80-87, 2008.
104. **Tarai B, Gupta A, Ray P, Shivaprakash MR, Chakrabarti A.** Polymerase chain reaction for early diagnosis of post-operative fungal endophthalmitis. *Indian J. Med. Res* 123: 671-678, 2006.
105. **Thuret G, Carricajo A, Chiquet C, Vautrin AC, Boureille M, Acquart S, Aubert G, Maugery J, Gain P.** Optimisation du contrôle microbiologique des milieux d'organoculture des greffons cornéens. *J Fr Ophtalmol* 26: 792-800, 2003.
106. **Thuret G, Carricajo A, Chiquet C, Vautrin AC, Celle N, Boureille M, Acquart S, Aubert G, Maugery J, Gain P.** Sensitivity and rapidity of blood culture bottles in the detection of cornea organ culture media contamination by bacteria and fungi. *Br J Ophthalmol* 86: 1422-1427, 2002.
107. **Tixier J, Bourcier T, Borderie V, Laroche L.** Kératites infectieuses après kératoplastie transfixiante. *J Fr Ophtalmol* 24: 597-602, 2001.
108. **Vajpayee RB, Boral SK, Dada T, Murthy GVS, Pandey RM, Satpathy G.** Risk factors for graft infection in India: a case-control study. *Br J Ophthalmol* 86: 261-265, 2002.
109. **Vajpayee RB, Sharma N, Sinha R, Agarwal T, Singhvi A.** Infectious keratitis following keratoplasty. *Surv Ophthalmol* 52: 1-12, 2007.
110. **Varghese B, Rodrigues C, Deshmukh M, Natarajan S, Kamdar P, Mehta A.** Broad-range bacterial and fungal DNA amplification on vitreous humor from suspected endophthalmitis patients. *Mol Diagn Ther* 10: 319-326, 2006.
111. **Wagoner MD, Al-Swailem SA, Sutphin JE, Zimmerman MB.** Bacterial keratitis after penetrating keratoplasty: incidence, microbiological profile, graft survival, and visual outcome. *Ophthalmology* 114: 1073-1079, 2007.
112. **White PA, McIver CJ, Rawlinson WD.** Integrins and gene cassettes in the enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother* 45: 2658-2661, 2001.
113. **Wiffen SJ, Weston BC, Maguire LJ, Bourne WM.** The value of routine donor corneal rim cultures in penetrating keratoplasty. *Arch. Ophthalmol* 115: 719-724, 1997.
114. **Wilhelmus KR, Hassan SS.** The prognostic role of donor corneoscleral rim cultures in corneal transplantation. *Ophthalmology* 114: 440-445, 2007.
115. **Wood TO, Dickson H, Nix VA, Hamilton D.** Bacterial resistance after short-term exposure to antibiotics. *Trans Am Ophthalmol Soc* 100: 137-141, 2002.
116. **Wright TM, Afshari NA.** Microbial keratitis following corneal transplantation. *Am. J. Ophthalmol* 142: 1061-1062, 2006.

117. **Yu HS, Lee JC, Kang HY, Ro DW, Chung JY, Jeong YS, Tae SH, Choi CH, Lee EY, Seol SY, Lee YC, Cho DT.** Changes in gene cassettes of class 1 integrons among *Escherichia coli* isolates from urine specimens collected in Korea during the last two decades. *J. Clin. Microbiol* 41: 5429-5433, 2003.
118. **Zanetti E, Bruni A, Mucignat G, Camposampiero D, Frigo AC, Ponzin D.** Bacterial contamination of human organ-cultured corneas. *Cornea* 24: 603-607, 2005.

# Annexes

## Annexe 1 : Schéma récapitulatif du déroulement d'une greffe et des différents prélèvements de l'étude.

Chronologie et nature des prélèvements reçus au laboratoire en fonction du devenir du greffon. Les étapes écrites en noir sont les étapes classiques du prélèvement et de la conservation du greffon, les étapes de couleur bleue sont celles spécifiquement effectuées dans le cadre du protocole.



**Annexe 2 : Résultats de culture et de biologie moléculaire (PCR ARN 16S et triplex intégrons) pour les prélèvements oculaires effectués le jour du prélèvement de la cornée (cul-de-sac conjonctival, limbe scléro-cornéen, humeur aqueuse).**

Donneur	Cul-de sac conjonctival			Limbe scléro-cornéen			Humeur aqueuse			
		<i>Culture</i>	<i>PCR ARN 16S</i>	<i>Triplex Intégrons</i>	<i>Culture</i>	<i>PCR ARN 16S</i>	<i>Triplex Intégrons</i>	<i>Culture</i>	<i>PCR ARN 16S</i>	<i>Triplex Intégrons</i>
001	Œil droit	<i>S. epidermidis</i> (X 2) <i>S. maltophilia</i>	NE	-	<i>S. epidermidis</i> <i>E. faecalis</i>	NE	-	-	-	-
	Œil gauche	<i>S. epidermidis</i> <i>E. faecalis</i>	NE	-	<i>S. epidermidis</i>	-	-	<i>Bacillus</i> spp	-	-
002	Œil droit	-	INI	-	<i>S. haemolyticus</i> <i>S. hominis</i>	NE	-	-	-	-
	Œil gauche	-	-	-	<i>S. hominis</i>	INI	-	-	-	-
003	Œil droit	<i>S. thermophilus</i> <i>E. faecalis</i>	NE	-	-	-	-	-	-	-
	Œil gauche	<i>S. epidermidis</i> <i>E. faecalis</i>	NE	-	<i>S. epidermidis</i>	-	-	<i>S. warneri</i> <i>S. xylosus</i>	NE	-
004	Œil droit	-	INI	-	-	INI	-	-	-	-
	Œil gauche	<i>S. epidermidis</i> <i>P. acnes</i>	NE	-	-	NE	-	-	-	-
005	Œil droit	<i>C. pseudodiphtheriticum</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. aureus</i>	NE	<i>IntI 1</i>	<i>C. pseudodiphtheriticum</i> <i>S. epidermidis</i> <i>G. adiacens</i>	NE	<i>IntI 1</i>	-	-	-
	Œil gauche	<i>C. pseudodiphtheriticum</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. aureus</i> <i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>IntI 1</i>	<i>C. pseudodiphtheriticum</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. pneumoniae</i>	NE	-	-	-	-
006	Œil droit	<i>S. epidermidis</i> (X 2)	INI	-	-	INI	-	-	-	-
	Œil gauche	<i>S. epidermidis</i>	-	-	<i>S. warneri</i> <i>S. epidermidis</i> (X 2)	NE	-	-	-	-
007	Œil droit	<i>S. epidermidis</i> (X 2) <i>C. macginleyi</i> <i>P. acnes</i>	NE	-	<i>S. epidermidis</i> <i>C. macginleyi</i> <i>P. acnes</i>	NE	-	-	-	-
	Œil gauche	<i>S. lugdunensis</i> <i>S. epidermidis</i> <i>C. macginleyi</i> <i>P. acnes</i>	NE	-	<i>S. epidermidis</i> <i>C. macginleyi</i> <i>P. acnes</i>	NE	-	-	-	-



Donneur	Cul-de sac conjonctival			Limbe scléro-cornéen			Humeur aqueuse		
	Culture	PCR ARN 16S	Triplex Intégrons	Culture	PCR ARN 16S	Triplex Intégrons	Culture	PCR ARN 16S	Triplex Intégrons
008	Œil droit	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-	-
	Œil gauche	<i>S. epidermidis</i>	-	-	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-
009	Œil droit	-	-	-	-	-	-	-	-
	Œil gauche	-	-	<i>M. luteus</i>	-	-	-	-	-
010	Œil droit	<i>S. warneri</i>	« Uncultured <i>Sphingomonas</i> »	-	<i>S. epidermidis</i> (X 2) <i>C. pseudodiphtheriticum</i> <i>Gemella</i> spp	NE	-	-	-
	Œil gauche	<i>Gemella</i> spp	-	-	<i>M. luteus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>Gemella</i> spp	NE	-	-	-
011	Œil droit	<i>S. epidermidis</i>	-	-	<i>S. warneri</i> <i>S. epidermidis</i>	NE	-	-	-
	Œil gauche	<i>S. epidermidis</i> <i>K. pneumoniae</i>	NE	<i>IntI 1</i>	<i>S. epidermidis</i>	-	<i>IntI 1</i>	<i>S. epidermidis</i>	-
012	Œil droit	-	-	-	-	-	-	-	-
013	Œil droit	<i>S. epidermidis</i> (X 2) <i>S. mitis</i>	-	-	<i>S. epidermidis</i> (X 2)	NE	-	-	-
	Œil gauche	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-	-
014	Œil droit	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-	-
	Œil gauche	-	-	-	-	-	-	-	-
015	Œil droit	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-	-
	Œil gauche	<i>S. epidermidis</i> (X 2)	NE	-	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-
016	Œil droit	<i>S. epidermidis</i> (X 2)	NE	-	<i>S. epidermidis</i> (X 2)	NE	-	-	-
	Œil gauche	<i>S. epidermidis</i> (X 2)	NE	-	<i>S. epidermidis</i> <i>C. accolens</i>	NE	-	-	-
017	Œil droit	<i>S. hominis</i>	-	-	<i>S. epidermidis</i> (X 2)	NE	-	-	-
	Œil gauche	<i>S. epidermidis</i>	-	-	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-
018	Œil droit	<i>C. accolens</i> <i>S. epidermidis</i> <i>P. avidum</i>	NE	-	<i>C. accolens</i> <i>S. epidermidis</i> <i>P. avidum</i>	NE	-	-	-
	Œil gauche	<i>S. warneri</i> <i>C. propinquum</i>	NE	-	<i>C. propinquum</i>	-	-	-	-

Donneur	Cul-de sac conjonctival			Limbe scléro-cornéen			Humeur aqueuse		
	Culture	PCR ARN 16S	Triplex Intégrons	Culture	PCR ARN 16S	Triplex Intégrons	Culture	PCR ARN 16S	Triplex Intégrons
019	Œil droit	-	-	<i>S. epidermidis</i> <i>S. auricularis</i> <i>S. hominis</i>	NE	-	-	-	-
	Œil gauche	<i>S. hominis</i>	-	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-
020	Œil droit	<i>S. epidermidis</i> (X 2)	NE	<i>S. epidermidis</i> (X 3)	NE	-	-	-	-
	Œil gauche	<i>S. epidermidis</i>	-	<i>S. epidermidis</i> <i>C. propinquum</i>	NE	-	-	-	-
021	Œil droit	<i>S. aureus</i>	-	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-
	Œil gauche	<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i>	NE	<i>S. haemolyticus</i> <i>S. epidermidis</i>	NE	-	-	-	-
022	Œil droit	<i>S. epidermidis</i>	-	<i>S. epidermidis</i> (X 2)	-	-	-	-	-
	Œil gauche	<i>S. epidermidis</i> (X 2)	NE	<i>S. epidermidis</i> (X 2)	NE	-	-	-	-
023	Œil droit	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-	-
	Œil gauche	<i>S. epidermidis</i> (X 2)	NE	<i>S. epidermidis</i> <i>S. hominis</i> (X 2)	NE	-	-	-	-
024	Œil droit	-	-	<i>S. hominis</i>	-	-	-	-	-
	Œil gauche	<i>S. hominis</i> <i>Gemella</i> spp <i>S. epidermidis</i>	NE	<i>S. hominis</i> <i>Gemella</i> spp <i>S. epidermidis</i>	NE	-	-	-	-
025	Œil droit	-	-	<i>S. epidermidis</i> <i>S. hominis</i>	NE	-	-	-	-
	Œil gauche	<i>S. aureus</i>	-	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-
026	Œil droit	<i>S. epidermidis</i> (X 2)	NE	<i>S. epidermidis</i> <i>S. hominis</i>	NE	-	-	-	-
	Œil gauche	<i>S. epidermidis</i>	-	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-
027	Œil droit	<i>S. epidermidis</i> <i>Streptococcus</i> spp	NE	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-
	Œil gauche	<i>S. epidermidis</i>	-	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-
028	Œil droit	<i>S. capitis</i> <i>C. accolens</i>	NE	<i>S. epidermidis</i> (X 2) <i>S. hominis</i> <i>C. accolens</i>	NE	-	-	-	-

Donneur	Cul-de sac conjonctival			Limbe scléro-cornéen			Humeur aqueuse			
	Culture	PCR ARN 16S	Triplex Intégrons	Culture	PCR ARN 16S	Triplex Intégrons	Culture	PCR ARN 16S	Triplex Intégrons	
028	Œil gauche	<i>S. epidermidis</i> <i>C. accolens</i> <i>S. hominis</i>	NE	-	<i>S. hominis</i> <i>C. accolens</i> <i>C. amycolatum</i> <i>Leuconostoc cremoris</i>	NE	-	-	-	-
029	Œil droit	<i>S. epidermidis</i> (X 2) <i>C. accolens</i>	NE	-	<i>S. epidermidis</i> (X 2) <i>C. accolens</i>	NE	-	-	-	-
	Œil gauche	<i>C. accolens</i>	-	-	<i>S. epidermidis</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>C. accolens</i>	NE	-	-	-	-
030	Œil droit	<i>S. epidermidis</i> <i>S. aureus</i> <i>S. equinus</i>	NE	-	<i>S. epidermidis</i> <i>S. aureus</i>	NE	-	-	-	-
	Œil gauche	<i>S. epidermidis</i> (X 2) <i>S. aureus</i>	NE	-	<i>S. epidermidis</i> <i>E. faecalis</i> <i>S. aureus</i>	NE	-	-	-	-
031	Œil droit	<i>S. epidermidis</i> <i>G. haemolysans</i> <i>D. hominis</i>	NE	-	-	-	-	-	-	-
	Œil gauche	<i>S. epidermidis</i> <i>G. haemolysans</i> <i>D. hominis</i>	NE	-	<i>S. epidermidis</i> <i>S. hominis</i> <i>S. cohnii</i>	NE	-	-	-	-
032	Œil droit	-	-	-	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-
	Œil gauche	<i>S. epidermidis</i>	-	-	<i>E. faecalis</i> <i>S. epidermidis</i>	NE	-	-	-	-
033	Œil droit	<i>S. epidermidis</i> <i>S. maltophilia</i>	NE	-	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-
	Œil gauche	<i>S. epidermidis</i>	-	-	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-
034	Œil droit	-	-	-	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	<i>S. hominis</i>	-
	Œil gauche	<i>S. epidermidis</i> (X 2)	NE	-	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-
035	Œil droit	<i>S. epidermidis</i>	-	-	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-
	Œil gauche	-	-	-	-	-	-	-	-	-
036	Œil droit	<i>S. capitis</i> <i>S. epidermidis</i> (X 2)	NE	-	<i>S. epidermidis</i> (X 2)	NE	-	-	-	-

Donneur	Cul-de sac conjonctival			Limbe scléro-cornéen			Humeur aqueuse		
	Culture	PCR ARN 16S	Triplex Intégrons	Culture	PCR ARN 16S	Triplex Intégrons	Culture	PCR ARN 16S	Triplex Intégrons
036	Œil gauche	<i>K. pneumoniae</i> <i>C. pseudodiphtheriticum</i>	NE	-	-	-	-	-	-
037	Œil droit	-	NA	-	<i>S. hominis</i>	NA	-	-	-
	Œil gauche	<i>S. epidermidis</i>	NA	-	<i>S. epidermidis</i> (X 2)	NE	-	NA	-
038	Œil droit	<i>C. coyleae</i>	-	-	-	-	-	-	-
	Œil gauche	<i>S. aureus</i> <i>S. hominis</i>	NE	-	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-
039	Œil droit	-	-	-	-	-	-	-	-
	Œil gauche	-	-	-	-	-	-	-	-
040	Œil droit	<i>S. epidermidis</i> (X 2)	NE	-	<i>S. epidermidis</i> (X 2)	NE	-	-	-
	Œil gauche	<i>S. epidermidis</i> <i>S. aureus</i>	NE	-	-	-	-	-	-
041	Œil droit	<i>C. macginleyi</i>	<i>C. macginleyi</i>	-	<i>C. macginleyi</i>	-	-	-	-
	Œil gauche	<i>C. macginleyi</i> <i>C. propinquum</i>	NE	-	<i>C. propinquum</i> <i>S. epidermidis</i>	NE	-	-	-
042	Œil droit	<i>E. coli</i> <i>S. epidermidis</i>	NE	-	<i>E. coli</i> <i>S. epidermidis</i>	NE	-	-	-
	Œil gauche	<i>C. pseudodiphtheriticum</i> <i>S. epidermidis</i> (X 2) <i>S. hominis</i>	NE	-	<i>C. pseudodiphtheriticum</i> <i>S. epidermidis</i> (X 2)	NE	-	-	-
043	Œil droit	-	-	-	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-
	Œil gauche	<i>C. koseri</i> <i>H. influenzae</i> <i>N. cinerea</i>	NE	-	<i>C. koseri</i> <i>H. influenzae</i> <i>N. cinerea</i> <i>S. anginosus</i>	NE	-	-	-
044	Œil droit	-	-	-	-	-	-	-	-
	Œil gauche	-	-	-	-	-	-	-	-
045	Œil droit	<i>S. epidermidis</i> (X 2) <i>S. mitis</i>	NE	-	<i>S. schleiferi</i>	-	-	-	-
	Œil gauche	<i>S. schleiferi</i> <i>S. epidermidis</i>	NE	-	-	-	-	-	-

Donneur	Cul-de sac conjonctival			Limbe scléro-cornéen			Humeur aqueuse		
	Culture	PCR ARN 16S	Triplex Intégrons	Culture	PCR ARN 16S	Triplex Intégrons	Culture	PCR ARN 16S	Triplex Intégrons
046	Œil droit	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-	-
	Œil gauche	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-	-
047	Œil droit	-	-	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-
	Œil gauche	-	-	-	-	-	-	-	-
048	Œil droit	-	-	-	-	-	-	-	-
	Œil gauche	-	-	-	<i>Escherichia</i> spp	<i>IntI 1</i>	-	<i>E. coli</i>	-
049	Œil droit	-	-	-	-	-	-	-	-
	Œil gauche	-	-	-	-	-	-	-	-
050	Œil droit	<i>S. epidermidis</i>	-	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-
	Œil gauche	<i>S. epidermidis</i>	-	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-
051	Œil droit	-	-	<i>S. epidermidis</i> (X 2)	NE	-	-	-	-
	Œil gauche	<i>S. mitis</i> <i>S. warneri</i>	NE	<i>S. mitis</i> <i>S. warneri</i> <i>S. epidermidis</i>	NE	-	-	-	-
052	Œil droit	<i>P. aeruginosa</i> <i>S. epidermidis</i>	NE	-	-	-	<i>Bacillus</i> spp	-	-
	Œil gauche	<i>S. epidermidis</i> <i>C. propinquum</i> <i>P. aeruginosa</i>	NE	<i>IntI 1</i>	<i>S. epidermidis</i> <i>C. propinquum</i>	NE	<i>IntI 1</i>	-	-
053	Œil droit	<i>S. epidermidis</i> <i>S. oralis</i> <i>S. salivarius</i> <i>S. aureus</i> <i>C. macginleyi</i>	NE	-	<i>S. epidermidis</i> <i>S. oralis</i> <i>S. salivarius</i> <i>S. aureus</i>	NE	-	-	-
	Œil gauche	<i>S. epidermidis</i> <i>S. aureus</i> <i>S. capitis</i> <i>C. macginleyi</i>	NE	<i>IntI 1</i> <i>IntI 2</i>	<i>C. macginleyi</i> <i>S. hominis</i> <i>C. macginleyi</i>	NE	-	-	-
054	Œil droit	<i>S. epidermidis</i>	-	<i>IntI 1</i>	<i>S. epidermidis</i> (X 2)	NE	-	-	-
	Œil gauche	-	-	-	-	-	-	-	-

Donneur	Cul-de sac conjonctival			Limbe scléro-cornéen			Humeur aqueuse			
	Culture	PCR ARN 16S	Triplex Intégrons	Culture	PCR ARN 16S	Triplex Intégrons	Culture	PCR ARN 16S	Triplex Intégrons	
055	Œil droit	<i>S. epidermidis</i> <i>S. oralis</i> <i>G. haemolysans</i> <i>S. warneri</i>	NE	-	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-
	Œil gauche	<i>S. epidermidis</i>	-	<i>IntI 1</i>	<i>S. warneri</i> <i>S. oralis</i>	NE	-	-	-	-
056	Œil droit	<i>S. hominis</i> <i>C. pseudodiphtheriticum</i> <i>S. epidermidis</i> <i>G. morbillorum</i>	NE	-	<i>Lactobacillus</i> spp	-	-	-	-	-
	Œil gauche	<i>C. pseudodiphtheriticum</i> <i>S. hominis</i>	NE	-	<i>S. hominis</i>	-	-	-	-	-
057	Œil droit	<i>S. epidermidis</i> (X 2) <i>C. accolens</i>	NE	-	<i>C. accolens</i>	-	-	-	-	-
	Œil gauche	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
058	Œil droit	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
	Œil gauche	<i>E. coli</i>	-	-	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-
059	Œil droit	<i>S. epidermidis</i> <i>S. hominis</i>	NE	-	<i>S. epidermidis</i>	NE	-	-	-	-
	Œil gauche	<i>S. hominis</i> <i>S. warneri</i>	-	-	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-
060	Œil droit	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. dysgalactiae</i>	-	-	-	-	-	« Uncultured bacterium clone »	-
	Œil gauche	<i>S. hominis</i>	-	-	<i>S. epidermidis</i>	« Uncultured bacterium clone »	-	-	-	-
061	Œil droit	<i>S. epidermidis</i> <i>C. macginleyi</i>	NE	-	<i>S. epidermidis</i> <i>C. macginleyi</i>	NE	-	-	-	-
061	Œil gauche	<i>S. epidermidis</i> <i>S. hominis</i> <i>C. macginleyi</i>	NE	-	<i>S. epidermidis</i> <i>S. hominis</i> <i>C. macginleyi</i>	NE	-	-	-	-
062	Œil droit	<i>S. epidermidis</i>	-	-	<i>S. epidermidis</i> <i>S. oralis</i>	NE	-	-	-	-
	Œil gauche	<i>S. epidermidis</i>	-	-	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-
063	Œil droit	<i>S. epidermidis</i> (X 2)	-	-	-	-	-	-	-	-
	Œil gauche	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Donneur	Cul-de sac conjonctival			Limbe scléro-cornéen			Humeur aqueuse		
	<i>Culture</i>	<i>PCR ARN 16S</i>	<i>Triplex Intégrons</i>	<i>Culture</i>	<i>PCR ARN 16S</i>	<i>Triplex Intégrons</i>	<i>Culture</i>	<i>PCR ARN 16S</i>	<i>Triplex Intégrons</i>
064	Œil droit	-	-	-	-	-	-	-	-
	Œil gauche	<i>S. epidermidis</i>	-	<i>S. hominis</i>	-	-	-	-	-

NE : non effectué ; - : négatif ; INI : ininterprétable ; ; NA : non applicable ; (X 2) : 2 germes de la même espèce avec antibiogrammes différents.

### Annexe 3 : Résultats des culture et de la biologie moléculaire pour les prélèvements sanguins.

<i>Donneur</i>	<i>Culture</i>	<i>PCR ARN 16S</i>	<i>Donneur</i>	<i>Culture</i>	<i>PCR ARN 16S</i>
001	<i>Corynebacterium</i> Groupe G	-	033	-	-
002	-	-	034	<i>Leuconostoc</i> spp	NE
003	-	-		<i>E. gergoviae</i>	
004	-	-		<i>S. mitis</i>	
005	<i>E. coli</i>	-		<i>S. epidermidis</i>	
006	<i>E. coli</i>	NE		<i>H. parainfluenzae</i>	
	<i>C. freundii</i>		035	<i>H. alvei</i>	
	<i>C. difficile</i>			<i>E. cloacae</i>	NE
	<i>B. vulgatus</i>			<i>E. faecium</i>	
	<i>B. fragilis</i>		036	-	-
	<i>Bacteroides</i> spp.		037	-	-
007	-	-	038	-	-
008	-	-	039	-	-
009	<i>E. coli</i>	-	040	-	-
010	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	041	<i>Lactobacillus</i> spp.	-
011	<i>K. pneumoniae</i>	NE		Levures	
	<i>Lactobacillus</i> spp.		042	<i>E. faecalis</i>	NE
	<i>S. haemolyticus</i>			<i>S. haemolyticus</i>	
012	-	-	043	-	-
013	-	-	044	-	-
014	<i>S. epidermidis</i>	-	045	<i>E. coli</i>	-
015	<i>S. aureus</i>	NE	046	<i>H. alvei</i>	NE
	<i>S. agalactiae</i>			<i>S. mitis</i>	
	<i>S. epidermidis</i>		047	-	-
016	-	-	048	<i>S. maltophilia</i>	NE
017	-	-		<i>E. faecalis</i>	
018	<i>C. urealyticum</i>	-		<i>S. haemolyticus</i>	
019	-	NA		<i>S. epidermidis</i>	
020	-	-	049	-	-
021	-	-	050	-	-
022	-	-	051	<i>S. mitis</i>	NE
023	-	-		<i>S. epidermidis</i>	
024	-	-	052	-	-
025	<i>S. aureus</i>	NE	053	-	-
	<i>S. parasanguinis</i>		054	-	-
026	-	-	055	-	-
027	<i>K. oxytoca</i>	NE	056	-	-
	<i>E. coli</i>		057	<i>K. pneumoniae</i>	NE
	<i>Streptococcus salivarius</i>			<i>E. coli</i>	
	<i>C. perfringens</i>			<i>E. faecium</i>	
	<i>Mogibacterium duveisum</i>			<i>P. vulgaris</i>	
028	<i>P. penneri</i>	NE	058	-	-
	<i>K. pneumoniae</i>		059	<i>S. epidermidis</i>	NE
	<i>E. coli</i>			<i>Corynebacterium</i> spp	
	<i>S. lentus</i>		060	<i>Corynebacterium</i> spp	NE
029	<i>S. capitis</i>	NE		<i>S. haemolyticus</i>	
	<i>S. capitis</i>		061	-	-
030	<i>K. oxytoca</i>	NE	062	-	-
	<i>H. alvei</i>		063	<i>S. epidermidis</i>	INI
	<i>S. aureus</i>		064	<i>E. faecalis</i>	-
	<i>S. anginosus</i>				
	<i>S. oralis</i>				
031	<i>S. oralis</i>	NE			
	<i>S. vestibularis</i>				
	<i>Leuconostoc cremoris</i>				
	<i>E. coli</i>				
032	-	-			

NE : non effectué ; - : négatif ; INI : ininterprétable ;  
NA : non applicable



**Annexe 4 : Résultats de culture et de biologie moléculaire pour les prélèvements issus de l'organoculture.**

Donneur	CorneaPrep®		CorneaMax®		CorneaJet®		Anneaux scléreaux / Cornées			
	Culture	PCR ARN 16S	Culture	PCR ARN 16S	Culture	PCR ARN 16S	Qualité endothéliale	Nature du prélèvement	Culture	PCR ARN 16S
001	Œil droit	-	-	-	NA	NA	<1500/mm <sup>2</sup>	C	-	-
	Œil gauche	-	-	-	NA	NA	<1500/mm <sup>2</sup>	C	-	-
002	Œil droit	-	-	-	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	NA	NA
	Œil gauche	-	-	-	NA	NA	<1500/mm <sup>2</sup>	C	-	-
003	Œil droit	<i>C. albicans</i>	-	<i>C. albicans</i>	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	C	NE	-
	Œil gauche	<i>C. albicans</i>	-	<i>C. albicans</i>	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	C	NE	-
004	Œil droit	-	-	-	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	C	-	-
	Œil gauche	-	-	-	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	C	-	-
005	Œil droit	-	-	-	NA	NA	<1500/mm <sup>2</sup>	C	-	-
	Œil gauche	-	-	-	NA	NA	<1500/mm <sup>2</sup>	C	-	-
006	Œil droit	-	-	-	NA	NA	1500-2000 /mm <sup>2</sup>	C	-	-
	Œil gauche	-	-	-	NA	NA	1500-2000 /mm <sup>2</sup>	C	-	-
007	Œil droit	-	-	-	NA	NA	<1500/mm <sup>2</sup>	C	-	-
	Œil gauche	-	-	-	NA	NA	<1500/mm <sup>2</sup>	C	-	-
008	Œil droit	-	-	-	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	NA	NA
	Œil gauche	-	-	-	NA	NA	1500-2000 /mm <sup>2</sup>	C	NA	NA
009	Œil droit	-	-	-	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	NA	NA
	Œil gauche	-	-	-	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	NA	NA
010	Œil droit	-	-	-	NA	NA	1500-2000 /mm <sup>2</sup>	C	-	-
	Œil gauche	-	-	-	NA	NA	1500-2000 /mm <sup>2</sup>	C	-	-
011	Œil droit	-	-	-	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	C	-	-
	Œil gauche	<i>K. pneumoniae</i>	« Uncultured bacterium clone »	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	C	NE
012	Œil droit	-	-	-	NA	NA	1500-2000 /mm <sup>2</sup>	C	-	-
013	Œil droit	-	-	-	NA	NA	<1500/mm <sup>2</sup>	C	-	-
	Œil gauche	-	-	-	NA	NA	1500-2000 /mm <sup>2</sup>	C	-	-
014	Œil droit	-	-	-	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	C	-	-

Donneur	CorneaPrep®		CorneaMax®		CorneaJet®		Anneaux scléreaux / Cornées			
	Culture	PCR ARN 16S	Culture	PCR ARN 16S	Culture	PCR ARN 16S	Qualité endothéliale	Nature du prélèvement	Culture	PCR ARN 16S
014	Œil gauche	-	-	-	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	C	-	-
015	Œil droit	-	-	NA	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	NA	NA
	Œil gauche	-	-	NA	NA	NA	1500-2000 /mm <sup>2</sup>	C	NA	NA
016	Œil droit	-	-	-	NA	NA	<1500/mm <sup>2</sup>	C	-	-
	Œil gauche	-	-	-	NA	NA	<1500/mm <sup>2</sup>	C	-	-
017	Œil droit	<i>S. haemolyticus</i>	-	NA	NA	NA	NA	C	NA	NE
	Œil gauche	-	-	-	-	-	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	-	-
018	Œil droit	-	-	-	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	NA	NA
	Œil gauche	-	-	-	-	-	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	NA	NA
019	Œil droit	-	-	-	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	NA	NA
	Œil gauche	-	-	-	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	NA	NA
020	Œil droit	-	-	-	-	-	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	-	-
	Œil gauche	-	-	-	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	C	-	-
021	Œil droit	-	-	-	-	-	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	NA	NA
	Œil gauche	<i>R. mucilaginosa</i>	-	<i>R. mucilaginosa</i>	-	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	C	NE	-
022	Œil droit	-	-	-	NA	NA	1500-2000 /mm <sup>2</sup>	C	-	-
	Œil gauche	-	-	-	NA	NA	1500-2000 /mm <sup>2</sup>	C	-	-
023	Œil droit	-	-	-	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	C	-	-
	Œil gauche	-	-	-	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	C	-	-
024	Œil droit	-	-	-	NA	NA	1500-2000 /mm <sup>2</sup>	C	-	-
	Œil gauche	-	-	-	NA	NA	1500-2000 /mm <sup>2</sup>	C	-	-
025	Œil droit	-	-	-	-	-	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	-	-
	Œil gauche	-	-	-	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	C	-	-
026	Œil droit	-	-	-	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	C	-	-
	Œil gauche	-	-	-	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	C	-	-
027	Œil droit	-	-	-	NA	NA	1500-2000 /mm <sup>2</sup>	C	-	-
	Œil gauche	-	-	-	-	-	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	-	-
028	Œil droit	-	-	-	NA	NA	1500-2000 /mm <sup>2</sup>	C	-	-

Donneur	CorneaPrep®		CorneaMax®		CorneaJet®		Anneaux scléreaux / Cornées			
	Culture	PCR ARN 16S	Culture	PCR ARN 16S	Culture	PCR ARN 16S	Qualité endothéliale	Nature du prélèvement	Culture	PCR ARN 16S
028	Œil gauche	-	-	-	NA	NA	1500-2000 /mm <sup>2</sup>	C	-	-
029	Œil droit	-	-	-	-	-	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	NA	NA
	Œil gauche	-	-	-	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	NA	NA
030	Œil droit	-	-	NA	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	NA	NA
	Œil gauche	-	-	NA	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	NA	NA
031	Œil droit	-	-	-	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	NA	NA
	Œil gauche	-	-	-	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	NA	NA
032	Œil droit	-	-	-	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	NA	NA
	Œil gauche	-	-	NA	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	NA	NA
033	Œil droit	<i>S. maltophilia</i>	<i>S. maltophilia</i>	<i>S. maltophilia</i>	<i>S. maltophilia</i>	NA	NA	NA	C	NE
	Œil gauche	-	-	NA	NA	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	NA
034	Œil droit	-	-	-	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	NA	NA
	Œil gauche	-	-	-	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	NA	NA
035	Œil droit	-	-	NA	NA	NA	1500-2000 /mm <sup>2</sup>	C	NA	NA
	Œil gauche	-	-	NA	NA	NA	1500-2000 /mm <sup>2</sup>	C	NA	NA
036	Œil droit	-	-	-	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	NA	NA
	Œil gauche	-	-	-	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	NA	NA
037	Œil droit	-	-	NA	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	C	NA	NA
	Œil gauche	-	-	NA	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	C	NA	NA
038	Œil droit	-	-	-	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	NA	NA
	Œil gauche	-	-	-	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	NA	NA
039	Œil droit	-	-	-	-	-	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	-	-
	Œil gauche	-	-	-	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	NA	NA
040	Œil droit	-	-	-	NA	NA	<1500/mm <sup>2</sup>	C	-	-
	Œil gauche	-	-	-	NA	NA	<1500/mm <sup>2</sup>	C	-	-
041	Œil droit	-	-	NA	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	NA	NA
	Œil gauche	-	-	NA	NA	NA	<1500/mm <sup>2</sup>	C	NA	NA
042	Œil droit	-	-	NA	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	NA	NA

Donneur	CorneaPrep®		CorneaMax®		CorneaJet®		Anneaux scléreaux / Cornées				
	Culture	PCR ARN 16S	Culture	PCR ARN 16S	Culture	PCR ARN 16S	Qualité endothéliale	Nature du prélèvement	Culture	PCR ARN 16S	
042	Œil gauche	-	-	NA	NA	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	NA	NA
043	Œil droit	-	-	-	-	-	-	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	-	-
	Œil gauche	-	-	-	-	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	C	-	-
044	Œil droit	-	-	-	-	-	-	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	-	-
	Œil gauche	-	-	-	-	-	-	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	-	-
045	Œil droit	-	-	-	-	NA	NA	1500-2000 /mm <sup>2</sup>	C	-	-
	Œil gauche	-	-	-	-	NA	NA	<1500/mm <sup>2</sup>	C	-	-
046	Œil droit	-	-	NA	NA	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	NA	NA
	Œil gauche	-	-	NA	NA	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	NA	NA
047	Œil droit	-	-	-	-	NA	NA	<1500/mm <sup>2</sup>	C	-	-
	Œil gauche	-	-	-	-	NA	NA	<1500/mm <sup>2</sup>	C	-	-
048	Œil droit	-	-	NA	NA	NA	NA	<1500/mm <sup>2</sup>	C	NA	NA
	Œil gauche	-	-	NA	NA	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	NA	NA
049	Œil droit	-	-	-	-	-	-	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	-	-
	Œil gauche	-	-	-	-	-	-	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	NA	NA
050	Œil droit	-	-	-	-	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	C	-	-
	Œil gauche	-	-	-	-	-	-	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	-	-
051	Œil droit	-	-	-	-	NA	NA	1500-2000 /mm <sup>2</sup>	C	-	-
	Œil gauche	-	-	-	-	NA	NA	<1500/mm <sup>2</sup>	C	-	-
052	Œil droit	-	-	NA	NA	NA	NA	<1500/mm <sup>2</sup>	C	NA	NA
	Œil gauche	-	-	NA	NA	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	NA	NA
053	Œil droit	-	-	-	-	NA	NA	1500-2000 /mm <sup>2</sup>	C	-	INI
	Œil gauche	-	-	-	-	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	NA	NA
054	Œil droit	-	-	NA	NA	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	C	NA	NA
	Œil gauche	-	-	NA	NA	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	C	NA	NA
055	Œil droit	-	-	-	-	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	C	-	-
	Œil gauche	-	-	-	-	NA	NA	1500-2000 /mm <sup>2</sup>	C	-	-
056	Œil droit	-	-	-	-	NA	NA	1500-2000 /mm <sup>2</sup>	C	-	-

Donneur	CorneaPrep®		CorneaMax®		CorneaJet®		Anneaux scléaux / Cornées			
	Culture	PCR ARN 16S	Culture	PCR ARN 16S	Culture	PCR ARN 16S	Qualité endothéliale	Nature du prélèvement	Culture	PCR ARN 16S
056	Œil gauche	-	-	-	NA	NA	<1500/mm <sup>2</sup>	C	-	-
057	Œil droit	-	-	-	NA	NA	<1500/mm <sup>2</sup>	C	-	-
	Œil gauche	-	-	-	NA	NA	<1500/mm <sup>2</sup>	C	-	-
058	Œil droit	-	NA	-	NA	NA	1500-2000 /mm <sup>2</sup>	C	-	-
	Œil gauche	-	NA	-	NA	NA	1500-2000 /mm <sup>2</sup>	C	-	-
059	Œil droit	-	NA	NA	NA	NA	NA	C	-	-
	Œil gauche	-	NA	NA	NA	NA	NA	C	-	-
060	Œil droit	-	-	-	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	NA	NA
	Œil gauche	-	-	-	NA	NA	>2000/ mm <sup>2</sup>	AS	NA	NA
061	Œil droit	-	-	-	NA	NA	1500-2000 /mm <sup>2</sup>	AS	NA	NA
	Œil gauche	-	-	-	NA	NA	1500-2000 /mm <sup>2</sup>	C	-	-
062	Œil droit	-	-	-	NA	NA	1500-2000 /mm <sup>2</sup>	C	-	-
	Œil gauche	-	-	-	NA	NA	1500-2000 /mm <sup>2</sup>	C	-	-
063	Œil droit	-	-	-	NA	NA	1500-2000 /mm <sup>2</sup>	C	-	-
	Œil gauche	-	-	-	NA	NA	1500-2000 /mm <sup>2</sup>	C	-	-
064	Œil droit	-	-	NA	NA	NA	NA	C	-	-
	Œil gauche	-	-	NA	NA	NA	NA	C	-	-

NE : non effectué ; - : négatif ; NA : non applicable ; INI : ininterprétable ; C : cornée ; AS : Anneau scléral

# Tables

---

## Table des matières

REMERCIEMENTS.....	4
SOMMAIRE.....	8
GLOSSAIRE .....	9
A. ANGLICISMES .....	9
B. ABRÉVIATIONS .....	9
INTRODUCTION.....	10
<b>I. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>11</b>
A. GREFFE DE CORNÉE .....	11
1. Principales indications de la greffe de cornée .....	11
2. Réalisation et pronostic.....	13
3. Complications post-kératoplastie.....	14
a. Complications infectieuses .....	14
(1) Endophtalmies.....	14
(2) Kératites .....	16
b. Autres complications.....	17
(1) Échec primaire .....	17
(2) Rejet d'allogreffe de cornée .....	17
(3) Autres.....	17
B. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION DU GREFFON .....	18
1. Prélèvement du greffon .....	18
a. Sélection des donneurs .....	18
b. Technique de prélèvement.....	18
2. Conservation du greffon.....	19
a. Méthodes de conservation .....	20
(1) Conservation en milieu liquide à +4°C .....	20
(2) Conservation par organoculture à +31°C .....	20
b. Tests bactériologiques pendant la conservation.....	21
C. CONTAMINATION BACTÉRIOLOGIQUE DES GREFFONS .....	23
1. Colonisation bactérienne du donneur au moment du prélèvement .....	23
a. Germes mis en évidence au niveau de la cornée.....	23
2. Contamination bactérienne du greffon à l'issue de la conservation .....	26
3. Influence de différents facteurs sur la contamination du greffon.....	29
a. Facteurs propres au donneur.....	29
b. Facteurs liés au prélèvement et à la conservation .....	31
c. Facteurs environnementaux .....	31
D. DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE EN OPHTALMOLOGIE.....	32
1. Diagnostic bactériologique usuel.....	32

2.	<i>Biologie moléculaire</i> .....	33
a.	Techniques de biologie moléculaire .....	33
(1)	PCR ou « Polymerase chain reaction » .....	34
(a)	Principe.....	34
(b)	PCR en temps réel.....	34
(2)	Séquençage .....	36
b.	Utilisation de la biologie moléculaire en diagnostic bactériologique .....	37
c.	Diagnostic des infections oculaires bactériennes par biologie moléculaire .....	39
E.	RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES.....	41
1.	<i>Notions de résistance aux antibiotiques</i> .....	41
a.	Généralités.....	41
b.	Principaux mécanismes de résistance .....	42
c.	Notion de bactérie multirésistante .....	43
2.	<i>Intégrons, support de résistance aux antibiotiques</i> .....	46
a.	Généralités sur les intégrons.....	46
b.	Structure et fonctionnement.....	46
c.	Epidémiologie des intégrons .....	48
3.	<i>Prévalence des germes résistants au niveau des cornées</i> .....	48
<b>II.</b>	<b>INTRODUCTION À L'ÉTUDE EXPÉRIMENTALE.....</b>	<b>51</b>
<b>III.</b>	<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES .....</b>	<b>53</b>
A.	INCLUSIONS .....	53
B.	PRÉLÈVEMENTS BIOLOGIQUES .....	53
1.	<i>Prélèvements effectués chez le donneur</i> .....	53
a.	Prélèvements oculaires .....	53
b.	Prélèvements sanguins.....	54
2.	<i>Prélèvements provenant de la Banque de tissus</i> .....	54
3.	<i>Prélèvements reçus du bloc opératoire d'ophtalmologie</i> .....	54
C.	DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE USUEL .....	55
1.	<i>Mise en culture des prélèvements</i> .....	55
2.	<i>Isolement et identification de bactéries</i> .....	56
3.	<i>Antibiogramme</i> .....	56
D.	BIOLOGIE MOLÉCULAIRE .....	58
1.	<i>Extraction de l'ADN</i> .....	58
2.	<i>Amplification génique</i> .....	59
3.	<i>Séquençage</i> .....	60
E.	ANALYSE STATISTIQUE.....	62
<b>IV.</b>	<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>63</b>
A.	POPULATION .....	63
B.	DEVENIR DES CORNÉES.....	64
C.	COLONISATION DES CORNÉES AU MOMENT DU PRÉLÈVEMENT.....	65
1.	<i>Culs-de-sac conjonctivaux</i> .....	65
a.	Culture conventionnelle.....	65

b.	Biologie moléculaire .....	67
2.	<i>Limbes scléro-cornéens</i> .....	68
a.	Culture conventionnelle.....	68
b.	Biologie moléculaire .....	70
3.	<i>Comparaison de la colonisation des différentes localisations</i> .....	70
D.	CONTAMINATION INTRAOCULAIRE ET SANGUINE .....	71
1.	<i>Contamination intraoculaire</i> .....	71
a.	Culture conventionnelle.....	71
b.	Biologie moléculaire .....	71
c.	Comparaison de la colonisation cornéenne et de la contamination intraoculaire.....	72
2.	<i>Contamination sanguine</i> .....	72
a.	Culture conventionnelle.....	73
b.	Biologie moléculaire .....	75
c.	Corrélation entre notion de sepsis et hémocultures positives .....	75
E.	CONTAMINATION PENDANT L'ORGANOCULTURE.....	76
1.	<i>Milieus d'organoculture</i> .....	76
a.	Culture conventionnelle.....	76
b.	Biologie moléculaire .....	77
2.	<i>Anneaux scléraux et cornées</i> .....	77
a.	Culture conventionnelle.....	78
b.	Biologie moléculaire .....	78
F.	RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES.....	78
1.	<i>Staphylocoques</i> .....	78
a.	SCN.....	78
b.	<i>S. aureus</i> .....	78
2.	<i>Bacilles à Gram négatif</i> .....	79
3.	<i>Corynébactéries</i> .....	79
4.	<i>Streptocoques et apparentés</i> .....	81
a.	Streptocoques .....	81
b.	Entérocoques .....	81
5.	<i>Anaérobies</i> .....	81
G.	RECHERCHE D'INTÉGRONS DANS LES PRÉLÈVEMENTS OCULAIRES .....	81
H.	MISE EN ÉVIDENCE DE FACTEURS DE RISQUE .....	83
1.	<i>Facteurs de risque de colonisation de la cornée</i> .....	83
2.	<i>Facteurs de risque de contamination pendant organoculture</i> .....	83
<b>V.</b>	<b>DISCUSSION</b> .....	<b>85</b>
A.	POPULATION ET DEVENIR DES CORNÉES PRÉLEVÉES .....	85
1.	<i>Population</i> .....	85
2.	<i>Devenir des cornées</i> .....	86
B.	COLONISATION DES CORNÉES ET CONTAMINATION INTRAOCULAIRE .....	87
1.	<i>Colonisation conjonctivale et cornéenne</i> .....	87
2.	<i>Contamination intraoculaire</i> .....	89
C.	ORGANOCULTURE .....	90



D. APPORT DE LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE .....	91
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>93</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>94</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>103</b>
<b>TABLES.....</b>	<b>118</b>
TABLE DES MATIÈRES.....	118
TABLE DES FIGURES .....	122
TABLE DES TABLEAUX.....	123
TABLE DES ANNEXES .....	124
<b>SERMENT DE GALIEN.....</b>	<b>125</b>

## **Table des figures**

Figure 1 : Cornée normale vue en coupe.....	11
Figure 2 : PCR en temps réel avec SYBR® Green .....	35
Figure 3 : PCR en temps réel avec sondes TaqMan® .....	35
Figure 4 : Exemple d'électrophorégramme obtenu par séquençage.....	37
Figure 5 : Schéma du gène de l'ARN 16S ribosomal.....	38
Figure 6 : Schéma général de la plateforme fonctionnelle des intégrons .....	46
Figure 7 : Modèle de capture de gènes médiée par les intégrons et d'échange de cassettes. ....	47
Figure 8 : Devenir des cornées incluses dans l'étude. ....	64
Figure 9 : Distribution des germes isolés des culs-de-sac conjonctivaux par famille bactérienne. ....	65
Figure 10 : Électrophorégrammes. ....	68
Figure 11 : Distribution des germes isolés des limbes scléro-cornéens par famille bactérienne.....	68
Figure 12 : Distribution des germes isolés des prélèvements sanguins par famille bactérienne. ....	73

## **Table des tableaux**

Tableau 1 : Évolution des indications de greffe de cornées de 2005 à 2009. ....	12
Tableau 2 : Différentes études publiées sur les endophtalmies post-kératoplastie. ....	15
Tableau 3 : Taux de colonisation cornéenne des donneurs avant prélèvement et distribution des germes. ....	24
Tableau 4 : Taux de contamination et distribution des germes après conservation de greffons cornéens en hypothermie. ....	27
Tableau 5 : Taux de contamination et distribution des germes après conservation de greffons cornéens par organoculture. ....	28
Tableau 6 : Principaux mécanismes de résistance des principales familles d'antibiotiques ciblant les germes courants	44
Tableau 7 : Incubation et lecture des différents milieux de culture. ....	55
Tableau 8 : Galeries d'identification utilisées en fonction de la bactérie isolée. ....	56
Tableau 9 : Techniques d'antibiogramme en fonction de la bactérie isolée. ....	57
Tableau 10 : Prises d'essai, prétraitements et paramètres d'extraction des prélèvements. ....	58
Tableau 11 : Séquences et caractéristiques des amorces et sondes utilisées. ....	59
Tableau 12 : Conditions des différentes réactions de PCR. ....	60
Tableau 13 : Données descriptives de la population d'étude (n=64). ....	63
Tableau 14 : Récapitulatif des espèces isolées au niveau des culs-de-sac conjonctivaux. ....	66
Tableau 15 : Résultats des amplifications du fragment du gène de l'ARN 16S ribosomal dans les culs-de-sac conjonctivaux en fonction de la culture. ....	67
Tableau 16 : Récapitulatif des espèces isolées au niveau des limbes scléro-cornéens. ....	69
Tableau 17 : Résultats des amplifications du fragment du gène de l'ARN 16S ribosomal dans les limbes scléro-cornéens en fonction de la culture. ....	70
Tableau 18 : Colonisation des culs-de-sac conjonctivaux et des limbes scléro-cornéens. ....	71
Tableau 19 : Résultats des amplifications du fragment du gène de l'ARN 16S ribosomal dans les humeurs aqueuses en fonction de la culture. ....	72
Tableau 20 : Comparaison de la colonisation de la cornée et de la contamination de l'humeur aqueuse. ....	72
Tableau 21 : Récapitulatif des espèces isolées dans le sang. ....	74
Tableau 22 : Résultats des amplifications du fragment du gène de l'ARN 16S ribosomal dans le sang en fonction de la culture. ....	75
Tableau 23. : Evaluation de la concordance entre sepsis au moment du décès et mise en évidence de germes dans le sang. ....	75
Tableau 24 : Résultats des amplifications du fragment du gène de l'ARN 16S ribosomal dans les milieux d'organoculture en fonction de la culture. ....	77
Tableau 25 : Principaux phénotypes de résistance acquise aux antibiotiques des staphylocoques et des Bacilles à Gram négatif, fréquence de ces phénotypes. ....	80
Tableau 26 : Récapitulatif des prélèvements contenant des intégrons. ....	82
Tableau 27 : Influence de différents facteurs relatifs au donneur et au prélèvement de la cornée sur la colonisation des culs-de-sac conjonctivaux et des limbes scléro-cornéens. ....	84

## ***Table des annexes***

Annexe 1 : Schéma récapitulatif du déroulement d'une greffe et des différents prélèvements de l'étude. ....	103
Annexe 2 : Résultats de culture et de biologie moléculaire (PCR ARN 16S et triplex intégrons) pour les prélèvements oculaires effectués le jour du prélèvement de la cornée (cul-de-sac conjonctival, limbe scléro-cornéen, humeur aqueuse). ....	104
Annexe 3 : Résultats des culture et de la biologie moléculaire pour les prélèvements sanguins. ....	112
Annexe 4 : Résultats de culture et de biologie moléculaire pour les prélèvements issus de l'organoculture. ....	113

## SERMENT DE GALIEN

---

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

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

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

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.