



**HAL**  
open science

# Contribution à l'étude de nouveaux agents antimicrobiens dans un modèle expérimental de kératite à *Acanthamoeba* chez le rat

Julie Gueudry

► **To cite this version:**

Julie Gueudry. Contribution à l'étude de nouveaux agents antimicrobiens dans un modèle expérimental de kératite à *Acanthamoeba* chez le rat. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2018. Français. NNT : 2018NORMR057 . tel-02969904

**HAL Id: tel-02969904**

**<https://theses.hal.science/tel-02969904>**

Submitted on 17 Oct 2020

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

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





Normandie Université

## THESE

**Pour obtenir le diplôme de doctorat**

**Spécialité : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

**Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie**

**Contribution à l'étude de nouveaux agents antimicrobiens dans un modèle expérimental de kératite à *Acanthamoeba* chez le rat**

**Présentée et soutenue par  
Julie GUEUDRY MOUILHADE**

Thèse soutenue publiquement le 16 octobre 2018 devant le jury composé de		
M. Loïc Favennec	Professeur des Universités – Praticien Hospitalier Université de Rouen Normandie Hôpital Charles Nicolle, Rouen, France	Directeur de thèse
M. Marc Muraine	Professeur des Universités – Praticien Hospitalier Université de Rouen Normandie Hôpital Charles Nicolle, Rouen, France	Codirecteur de thèse
M. Pierre Labalette	Professeur des Universités – Praticien Hospitalier Université de Lille Hôpital Claude Huriez, Lille, France	Rapporteur
M. Tristan Bourcier	Professeur des Universités – Praticien Hospitalier Université de Strasbourg Nouvel Hôpital Civil, Strasbourg France	Rapporteur
Mme Imbert Christine	Professeur des Universités Université de Poitiers, Poitiers, France	Examineur
Mme Le Goff Laetitia	Maître de conférences Université de Rouen Normandie, Rouen, France	Examineur

**Thèse dirigée par le Pr Loïc FAVENNEC, laboratoire EA 7510 et co-dirigée par Pr Marc MURAINÉ, laboratoire INSERM U1234, Université de ROUEN**

*A Frédéric*

*A Paul et Jean*

*A mes parents*

# **LABORATOIRES DE RATTACHEMENT**

Cette thèse a été réalisée dans le laboratoire :

EA 7510 "Epidémiologie-surveillance et circulation des parasites dans l'environnement"

Université de Rouen Normandie, Rouen, France

# COMMUNICATIONS ORALES ET PRIX DANS LE CADRE DE CETTE THESE

## Distinction

Prix de la meilleure communication orale de la session « Lésions cornéennes et cicatrisation » lors du congrès «European Association for Vision and Eye Research (EVER)», qui s'est tenu à Nice du 27 au 30 septembre 2017.

## Communications orales

Société française d'ophtalmologie – Paris 2018

- Pharmacocinétique du voriconazole et du posaconazole après injections intrastromales cornéennes chez le rat.

European Association for Vision and Eye Research (EVER)- Nice 2017

- *In vivo* evaluation of voriconazole eye drops efficacy in a rat *Acanthamoeba polyphaga* keratitis model

Société française d'ophtalmologie – Paris 2017

- Evaluation *in vivo* de l'efficacité du voriconazole en collyre sur un modèle de kératite à *Acanthamoeba polyphaga* chez le rat.

Société française d'ophtalmologie – Paris 2016

- Evaluation *in vivo* de l'efficacité du voriconazole par voie systémique sur un modèle de kératite à *Acanthamoeba polyphaga* chez le rat.

## **Communications affichées**

ARVO Annual Meeting - 2015

The efficacy of Polihexanide (PHMB) eye drops against *Acanthamoeba polyphaga* investigated by an ATP-bioluminescence assay and a rat model of keratitis. Antonino Asero; Andrea Sudano Roccaro; Loic Favennec; Julie Gueudry ; Laetitia Le Goff; Anna Rita Blanco; The Orphan Drug *Acanthamoeba* Keratitis (ODAK) Group

## RESUME

### **Contribution à l'étude de nouveaux agents anti-amibiens dans un modèle expérimental de kératite à *Acanthamoeba* chez le rat**

La kératite à *Acanthamoeba* (KA) est une kératite infectieuse rare et grave, potentiellement cécitante. L'infection est causée par *Acanthamoeba* spp., un protozoaire ubiquitaire présent dans le sol, l'air et l'eau. Jusqu'à 85% des cas de KA sont associés au port de lentilles cornéennes, et plus rarement suite à un traumatisme.

Actuellement, aucune molécule n'a d'autorisation de mise sur le marché dans cette indication dans l'Union européenne et aux États-Unis. Ces dernières années, des combinaisons d'agents anti-amibiens tels que les biguanides et les diamidines ont été utilisées comme traitement de référence. Cependant, les schémas thérapeutiques et les concentrations d'agents actifs reposent sur des données empiriques. Récemment, le voriconazole, antifongique triazolé, a été utilisé avec succès pour traiter des KA humaines. Malgré cela, la communauté ophtalmologique se heurte le plus souvent dans les formes sévères à de grandes difficultés de prise en charge et se retrouve parfois en situation d'impasse thérapeutique. La perte fonctionnelle et anatomique de l'œil est encore possible.

A partir d'un modèle de KA chez le rat, plusieurs molécules et voies d'administration ont été testées. Dans une première partie, en lien avec projet européen ODAK (Orphan drug for *Acanthamoeba* Keratitis), nos travaux ont suggéré qu'une concentration de collyre PHMB supérieure ou égale à 0,04% devait être



préférée. Dans une deuxième partie, nous avons pu montrer la supériorité du voriconazole en collyre par rapport à la voie orale. Enfin, l'étude de la pharmacocinétique du voriconazole et du posaconazole après injections directes intracornéennes, démontre leur faible utilité en clinique humaine du fait de la fréquence nécessaire de réinjection, bien que des analyses complémentaires concernant le posaconazole en collyre pour confirmer son intérêt soient nécessaires. L'ensemble de ces travaux pourrait permettre d'adapter les protocoles thérapeutiques de la KA.

**Mots clés :** *Acanthamoeba*, kératite, voriconazole ; cornée; posaconazole; kératite fongique; triazolés ; PHMB ; biguanides.

## **ABSTRACT**

### **Contribution to the study of new antiamoebic agents in an experimental model of *Acanthamoeba keratitis* in rats**

*Acanthamoeba keratitis* (AK) is a rare and severe form of infectious keratitis, which is potentially sight-threatening. The infection is caused by *Acanthamoeba* spp. a common protozoan present in soil, air and water. Up to 85% of AK cases are associated with contact lens wearing, more rarely after corneal injury.

Currently, there are no agents approved for the treatment of AK in the European Union or in the United States of America. In recent years, combinations of unlicensed anti-amoebic agents such as biguanides and diamidines have been used as the reference treatment. Treatment regimens and concentrations of active agents are based on empirical data. Recently, voriconazole, a mono-triazole, was successfully used to treat cases of human AK. Despite this, the ophthalmological community is most often faced with severe forms of the disease with severe management difficulties and sometimes with a situation of therapeutic impasse. The functional and anatomical loss of an eye can occur.

Several agents and routes of administration have been tested in a rat model of AK. First, as part of the European ODAK project (Orphan drug for *Acanthamoeba Keratitis*), our work suggested that a concentration of PHMB eye drops greater than or equal to 0.04% should be preferred. Second, we were able to show the superiority of voriconazole in eye drops compared to the oral route. Finally, our study on the pharmacokinetics of voriconazole and posaconazole after intrastromal injections, demonstrates their low utility in human because of the need for frequent reinjection.

Nevertheless, additional analyses are necessary to confirm the interest of posaconazole eye drops. All of this work could make it possible to adapt the therapeutic protocols of AK.

**Key words :** *Acanthamoeba*, keratitis, voriconazole ; cornea; posaconazole; fungal; triazoles ; PHMB ; biguanides

## REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier en premier lieu mon directeur de thèse, M. Loïc Favennec, professeur des universités et praticien hospitalier, directeur du laboratoire Epidémiologie-surveillance et circulation des parasites dans l'environnement à l'université de Rouen Normandie et chef de service du laboratoire de parasitologie/mycologie du centre hospitalier universitaire de Rouen. Je le remercie de m'avoir accueillie dans son laboratoire avec confiance et enthousiasme.

Je souhaite remercier mon co-directeur de thèse, M. Marc Muraine, professeur des universités et praticien hospitalier, chef du service d'ophtalmologie du centre hospitalier universitaire de Rouen. Je le remercie pour son soutien intangible.

Je remercie très sincèrement M. Pierre Labalette, professeur des universités et praticien hospitalier dans le service d'ophtalmologie du centre hospitalier universitaire de Lille, ainsi que M. Tristan Bourcier, professeur des universités et praticien hospitalier dans le service d'ophtalmologie du centre hospitalier universitaire de Strasbourg de l'honneur qu'ils m'ont fait, d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse.

J'exprime ma gratitude à Mme Christine Imbert, professeur des universités, professeur de parasitologie à la faculté de médecine et de pharmacie de Poitiers, qui me fait l'honneur d'avoir accepté de juger ce travail.

J'exprime ma gratitude à Mme Laetitia Le Goff, maître de conférences en parasitologie-immunologie à la faculté de médecine et pharmacie de Rouen, qui me fait l'honneur et l'amitié d'avoir accepté de juger ce travail. Je la remercie pour l'ensemble de son aide sans laquelle ce travail n'aurait pu être mené.

Je tiens à remercier particulièrement M. Gérard Brasseur, professeur des universités et praticien hospitalier, ancien chef du service d'ophtalmologie du centre hospitalier universitaire de Rouen, à l'origine de cette collaboration étroite entre l'ophtalmologie et la parasitologie à l'université de Rouen.

J'exprime ma gratitude à l'équipe du laboratoire Epidémiologie-surveillance et circulation des parasites dans l'environnement de l'université de Rouen Normandie,

qui m'a intégrée naturellement, malgré ma présence fractionnée, tout particulièrement à M. Romy Razakandrainibe, post doctorant, et à M. Jean Jacques Ballet, professeur des universités et praticien hospitalier.

Je remercie M. Arnaud François, praticien hospitalier dans le service d'anatomie et cytologie pathologiques du centre hospitalier universitaire de Rouen pour son expertise irremplaçable dans la mise en œuvre de ce projet.

Je remercie l'équipe du laboratoire de pharmacologie du centre hospitalier universitaire de Rouen pour l'expertise indispensable pour les travaux présentés ici.

Enfin, un grand merci à l'équipe de la banque normande de cornée pour son soutien logistique et tout particulièrement à Mme Sabine Lefèvre, technicienne de laboratoire, qui a participé à l'ensemble de l'expérimentation animale toujours animée d'une curiosité et d'un enthousiasme sans faille.

# TABLE des MATIERES

<b>1</b>	<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE : LA KERATITE A ACANTHAMOEBA ....</b>	<b>20</b>
2.1	HISTORIQUE ET EPIDEMIOLOGIE.....	21
2.2	AGENT PATHOGENE .....	22
2.2.1	<i>Les amibes</i> .....	22
2.2.2	<i>Ecologie des amibes libres</i> .....	25
2.2.3	<i>Acanthamoeba spp.</i> .....	27
2.2.3.1	Description.....	27
2.2.3.2	Position taxonomique.....	30
2.3	PHYSIOPATHOLOGIE DE LA KERATITE A ACANTHAMOEBA .....	34
2.3.1	<i>Anatomie de la cornée</i> .....	34
2.3.2	<i>Exposition à Acanthamoeba</i> .....	38
2.3.3	<i>Cascade physiopathologique de la kératite � Acanthamoeba</i> .....	40
2.3.3.1	Adhérence du trophozoïte à l'épithélium cornéen.....	40
2.3.3.2	Effets cytopathiques induits par les trophozoïtes.....	41
2.3.3.3	La dégradation du stroma cornéen .....	42
2.3.4	<i>Réponse du système immunitaire dans la kératite � Acanthamoeba</i> .....	43
2.4	DIAGNOSTIC CLINIQUE DE LA KERATITE A ACANTHAMOEBA .....	44
2.4.1	<i>Facteurs de risque</i> .....	44
2.4.1.1	Le port de lentille de contact .....	44
2.4.1.2	En l'absence de port de lentille de contact.....	46
2.4.2	<i>Histoire et suspicion clinique</i> .....	46
2.4.3	<i>Présentation clinique</i> .....	47
2.4.4	<i>Complications</i> .....	51
2.4.4.1	Complications cornéennes.....	51
2.4.4.2	Complications extra-cornéennes.....	53
2.4.5	<i>Co-infection</i> .....	54
2.4.6	<i>Diagnostic différentiel</i> .....	57
2.5	DIAGNOSTIC PARACLINIQUE DE LA KERATITE A ACANTHAMOEBA .....	57
2.5.1	<i>La microscopie confocale in vivo</i> .....	57
2.5.2	<i>Diagnostic microbiologique</i> .....	62
2.5.2.1	Examen direct et culture.....	62
2.5.2.2	PCR.....	63
2.5.2.3	Biopsie cornéenne et histologie.....	64
2.6	TRAITEMENT MEDICAL.....	66
2.6.1	<i>Les molécules disponibles</i> .....	66
2.6.2	<i>Les antiseptiques</i> .....	68
2.6.2.1	Les biguanides .....	68
2.6.2.2	Les diamidines .....	70
2.6.2.3	Etudes cliniques.....	70
2.6.3	<i>Les antifongiques</i> .....	71
2.6.3.1	Les antifongiques imidazolés et triazolés.....	71
2.6.3.2	Caspofungine .....	73
2.6.4	<i>Miltefosine</i> .....	73
2.6.5	<i>Néomycine</i> .....	74
2.6.6	<i>Métronidazole</i> .....	74
2.6.7	<i>Autres molécules</i> .....	74

2.6.8	<i>Les protocoles médicaux thérapeutiques</i> .....	75
2.6.9	<i>Corticothérapie et les traitements immunosuppresseurs</i> .....	76
2.6.9.1	Corticothérapie locale .....	76
2.6.9.2	Les anti-inflammatoires et immunosuppresseurs par voie systémique.....	77
2.7	TRAITEMENT CHIRURGICAL .....	78
2.7.1	<i>Débridement épithélial</i> .....	78
2.7.2	<i>Cryothérapie</i> .....	78
2.7.3	<i>Cross-linking du collagène</i> .....	78
2.7.4	<i>Photokératectomie thérapeutique</i> .....	80
2.7.5	<i>Kératoplastie</i> .....	81
2.8	ULCERES CORNEENS PERSISTANTS .....	84
2.9	KERATITE A ACANTHAMOEBA PERSISTANTE .....	86
2.10	PRONOSTIC .....	89
2.11	MODELES EXPERIMENTAUX .....	92
<b>3</b>	<b>PARTIE EXPERIMENTALE</b> .....	<b>94</b>
3.1	PROBLEMATIQUE.....	95
3.2	PUBLICATIONS .....	96
<b>4</b>	<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>156</b>
<b>5</b>	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>162</b>

## TABLE DES ILLUSTRATIONS (hors articles)

Figure 1. L'arbre de vie d'après Khan [10] .....	22
Figure 2. Phylogénie simplifiée des amibes au sein des eucaryotes.....	24
Figure 3. Le cycle biologique d' <i>Acanthamoeba</i> spp .....	28
Figure 4. Trophozoïtes d' <i>A. castellanii</i> (microscopie optique). Université de Rouen	29
Figure 5. Kyste d' <i>A. castellanii</i> . Aspect caractéristique de double paroi (microscopie optique). Université de Rouen .....	30
Figure 6. Coupe anatomique schématisée d'un œil. Optoplus.com (13 août 2018)...	35
Figure 7. Photographie de face au biomicroscope de la surface oculaire. CHU Rouen .....	35
Figure 8. Coupe histologique de la cornée. Coloration HES, X10 .....	37
Figure 9. Cascade physiopathologique de la kératite à <i>Acanthamoeba</i> . D'après Clarke <i>et al.</i> [37].....	40
Figure 10. Stades précoces de la KA (1). CHU Rouen.....	48
Figure 11. Stades précoces de la KA (2). CHU Rouen .....	49
Figure 12. Formes stromales de KA. CHU Rouen.....	50
Figure 13. Réactions inflammatoires associées à la KA. CHU Rouen .....	51
Figure 14. Complications cornéennes associées à la KA. Nécrose stromale à type d'abcès. CHU Rouen.....	52
Figure 15. Complications cornéennes associées à la KA. Ulcère chronique d'origine neurotrophique. CHU Rouen.....	52
Figure 16. Complications cornéennes associées à la KA. CHU Rouen .....	53
Figure 17. Images en microscopie électronique d' <i>Acanthamoeba</i> isolées de KA humaines contenant des endosymbiotes. D'après Iovieno <i>et al.</i> [86].....	56
Figure 18. Aspect en microscopie confocale de la KA (1). CHU Rouen.....	59
Figure 19. Aspect en microscopie confocale de la KA (2). CHU Rouen .....	60
Figure 20. Aspect en microscopie confocale de la KA (3). CHU Rouen.....	61
Figure 21. Kyste d' <i>Acanthamoeba</i> visible à l'examen direct d'un grattage cornéen. Aspect de double paroi après coloration de Giemsa x1000, d'après [24].....	63



Figure 22. Diagnostic histologique de la KA. Kystes amibiens isolés sur biopsie de cornée par coloration HES (haut) et par coloration de Gomori-Grocott (bas). CHU Rouen .....	65
Figure 23. Kératoplastie thérapeutique et KA. Greffe de cornée à visée tectonique pour descémétocèle étendu dans les suites d'une KA. CHU Rouen.....	81
Figure 24. Kératoplastie thérapeutique et KA. (A gauche) Ulcère chronique épithélial sur greffon thérapeutique. (A droite) Récidive infectieuse au niveau du greffon thérapeutique transfixiant pour KA. CHU Rouen .....	82
Figure 25. Kératoplastie à visée optique et KA. Kératoplastie transfixiante à 18 mois du début de la KA. CHU Rouen .....	82
Figure 26. Kératoplastie à visée optique et KA. Kératoplastie transfixiante à 10 mois du début de la KA. CHU Rouen .....	82
Figure 27. Ulcères persistants au cours de la KA. Ulcère trophique post KA (à gauche) ayant bénéficié d'une greffe de membrane amniotique (à droite). CHU Rouen	85
Figure 28. Ulcères persistants au cours de la KA. (A gauche) Ulcère cornéen à 9 mois après le début d'une KA. Les prélèvements microbiologiques répétés sont négatifs. (A droite) Aspect de recouvrement conjonctival partiel. CHU Rouen.	85

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

**A** : *Acanthamoeba*

**ARN** : Acide ribonucléique

**AV** : Acuité Visuelle

**CHU** : Centre hospitalier universitaire

**CLX** : Chlorhexidine

**HES** : Hématoxyline Eosine Safran

**IC** : Concentration Inhibitrice

**ISO** : Organisation internationale pour la normalisation

**IVCM** : *In Vivo* Confocal Microscopy (microscopie confocale)

**KA** : Kératite à *Acanthamoeba*

**LASIK** : Laser-Assisted In-Situ Keratomileusis

**MIC** : Minimum inhibitory concentration

**MIP 133** : Mannose-Induced Protein 133

**PAS** : Acide Périodique Schiff

**PCR** : Réaction en Chaîne par Polymérase

**pH** : Potentiel Hydrogène

**PHMB** : Polyhexaméthylène biguanide

**PKT** : Photokératectomie Thérapeutique

**Spp.** : *Species pluralis*

**UV** : ultra-violet

**VRZ** : Voriconazole

# 1 INTRODUCTION

*Acanthamoeba* est un genre d'amibe libre, protozoaire ubiquitaire, mais très fréquemment retrouvé dans l'eau. Les amibes libres se nourrissent des bactéries de l'environnement, mais certaines sont des parasites opportunistes qui peuvent causer des infections chez l'humain. Les kystes d'*Acanthamoeba* sont extrêmement résistants aux conditions extrêmes ou aux différentes stratégies de désinfection mises en œuvre. Ils sont notamment résistants au chlore. Cette résistance intrinsèque préjuge des difficultés thérapeutiques rencontrées.

La kératite à *Acanthamoeba* (KA) a été décrite pour la première fois en 1974 chez un homme dans un contexte post traumatique avec de la paille suivi d'une exposition à une eau contaminée aux Etats-Unis [1]. Deux autres cas ont été ensuite rapportés rapidement au Royaume-Uni [2, 3]. Considérée initialement comme extrêmement rare, la connaissance et l'amélioration des moyens diagnostiques de la KA ont en réalité démontré son importance en pathologie humaine. Le développement de l'utilisation des lentilles de contact a également fait que le nombre de cas décrits a considérablement augmenté à partir du milieu des années 1980. En effet, les lentilles de contact servent de vecteur à *Acanthamoeba* entre l'environnement et la cornée par le biais de l'eau ou de la solution d'entretien dans lesquelles elles sont stockées. Dans les pays où la prévalence du port de lentilles de contact est élevée, 85% à 88% des cas de KA y sont liées.

Malgré sa relative rareté, la KA reste un défi clinique à la fois par les difficultés diagnostiques notamment dans sa forme précoce qui regroupe des signes très peu spécifiques, mais surtout dans sa prise en charge thérapeutique. En effet, le traitement est très difficile notamment pour les kératites au stade tardif. Ainsi, il

existe encore des formes réfractaires qui peuvent conduire à une énucléation malgré un traitement bien conduit.

Bien que les anti-amibiens actuels montrent de très faibles concentrations kysticides minimales, la corrélation clinico-biologique entre les sensibilités *in vitro* et l'efficacité du traitement est loin d'être satisfaisante. En effet, le début de réponse au traitement est souvent retardé, d'autant plus que le stroma est atteint et des cas de kératites persistantes sous traitement bien conduit et vérification de la sensibilité des souches sont décrits. Il est en effet étonnant que les biguanides, principal agent anti-amibien utilisé, puissent conduire à des échecs thérapeutiques. C'est pour cette raison que l'amélioration des modalités d'utilisation des composés anti-amibiens déjà existants et le développement d'autres molécules sont nécessaires dans cette situation d'impasse thérapeutique que peut constituer la KA.

Notre travail comprend une première partie consacrée à la synthèse des données bibliographiques actuelles de la KA et notamment sur sa prise en charge thérapeutique. Nous exposons dans la seconde partie expérimentale nos travaux chez le rat ayant pour but d'étudier et de rechercher de nouvelles stratégies thérapeutiques pour la KA. Celle-ci est présentée sous la forme de 3 articles scientifiques, avant une discussion générale qui expose les perspectives possibles.

## **2 SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE : la kératite à *Acanthamoeba***

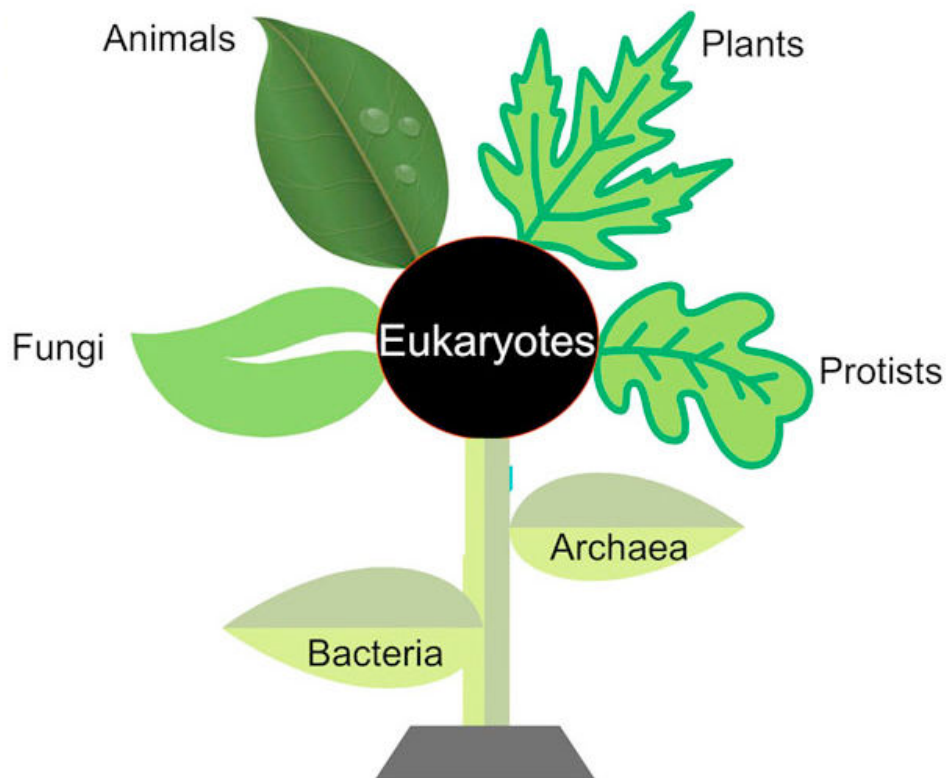
## **2.1 Historique et épidémiologie**

La kératite amibienne a été décrite pour la première fois en 1974 chez un homme dans un contexte post traumatique avec de la paille suivi d'une exposition à une eau contaminée aux Etats-Unis [1]. Deux autres cas ont été ensuite rapportés rapidement au Royaume-Uni [2, 3]. Considérée initialement comme extrêmement rare liée essentiellement aux traumatismes [4], sa connaissance et l'amélioration des moyens diagnostiques ont en réalité démontré son importance en pathologie humaine. Le développement de l'utilisation des lentilles de contact a également fait que le nombre de cas décrits a considérablement augmenté à partir du milieu des années 1980. La kératite amibienne reste cependant considérée comme une pathologie rare avec de larges disparités géographiques. Ainsi en Inde, où l'utilisation des lentilles de contact est moins répandue, la KA représente 1% des cas de kératites microbiennes [5, 6] contre 4 à 8% dans les pays où le port de lentilles de contact est habituel [7, 8]. L'incidence annuelle au Royaume-Uni de la kératite amibienne a été estimée en 1997 et 1999 à 1,26 et à 1,13 cas par million d'habitants et, pour les porteurs de lentilles de contact, à 21,14 et à 17,53 cas par million d'habitants [9]. Entre 2004 et 2007, une épidémie aux Etats-Unis a été attribuée au manque d'efficacité d'un produit reconnu d'entretien de lentilles de contact, conduisant à son retrait du marché [10].

## 2.2 Agent pathogène

### 2.2.1 Les amibes

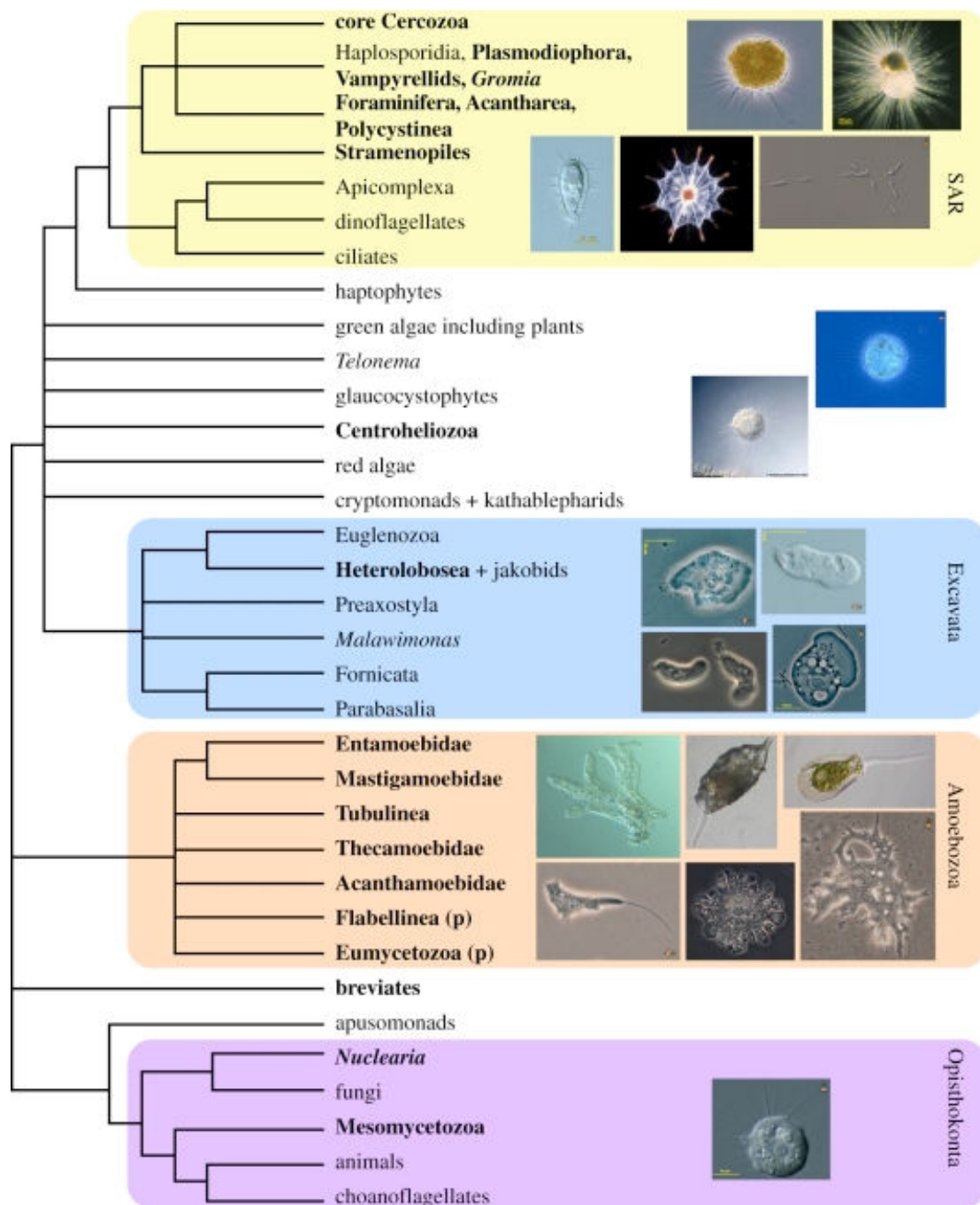
Les amibes sont des protozoaires. Le mot protozoaire vient du grec ancien proto- (*prôtos* « premier ») et *zôon* (« animal »), et désigne les protistes (eucaryotes unicellulaires) qui ingèrent leur nourriture par phagocytose (figure 1) [11].



**Figure 1. L'arbre de vie d'après Khan [10]**

Le terme d'« amoebae » (du grec *amoibē* signifiant « transformation ») regroupe un groupe large de protistes et fait référence au mouvement amiboïde de ces unicellulaires, c'est-à-dire à leur déplacement grâce à des pseudopodes, à type de rampement. Les amibes appartiennent à 4 super-règnes taxonomiques distincts, soulignant l'aspect polyphylétique du groupe (figure 2)[12].





**Figure 2. Phylogénie simplifiée des amibes au sein des eucaryotes.**

Les super-règnes comportant des lignées amibiennes sont surlignés en couleur. Les branches portant des représentants amibiens sont indiquées en gras d'après Lahr *et al*, 2011 [11].

Deux types d'amibes sont distingués en fonction de leur habitat. Les amibes libres, qui n'ont pas besoin d'hôte pour leur cycle biologique et sont capables de vivre de manière autonome et les amibes parasites pour lesquelles la recherche d'un hôte est absolument nécessaire. Les amibes parasites survivent dans l'environnement et prolifèrent essentiellement dans le tube digestif chez l'homme. Leur présence augmente avec les diminutions des conditions d'hygiène et le niveau socio-économique. Parmi eux, certaines sont des pathogènes opportunistes. On décrit par exemple *Entamoeba histolytica*, amibe pathogène, parasite, découverte en 1873 chez un patient souffrant d'une diarrhée sanglante et nommée ainsi en 1903 [11]. A l'inverse, les amibes responsables des kératites humaines sont des amibes libres.

### 2.2.2 Ecologie des amibes libres

Les amibes libres sont des protozoaires saprophytes et ubiquitaires. Elles sont présentes dans l'air, l'eau et le sol. Certaines de ces amibes libres ont la capacité d'amphizoïdie, c'est à dire pouvant vivre soit libres dans la nature, soit chez un hôte (l'homme ou l'animal). Les amibes libres, à l'inverse des parasites, sont capables d'effectuer l'ensemble de leur cycle biologique dans l'environnement, sans avoir besoin d'hôte [11].

Les amibes libres ont été en effet isolées dans divers sources d'eau (comme les lacs, les rivières, les mers,...), le sol, la poussière, les plantes en décomposition ainsi que dans l'air. En plus des environnements naturels, les amibes libres ont été isolées dans l'eau des bouteilles d'eau distillée, dans les piscines, dans les tuyaux d'égouts, dans l'eau du système d'eau potable, dans les unités de climatisation,... De plus, elles sont également isolées dans les conduites d'eau des cabinets dentaires, des hôpitaux

et des unités de dialyse [13, 14]. Cette large distribution fait que la population générale est largement exposée aux amibes libres au cours de sa vie.

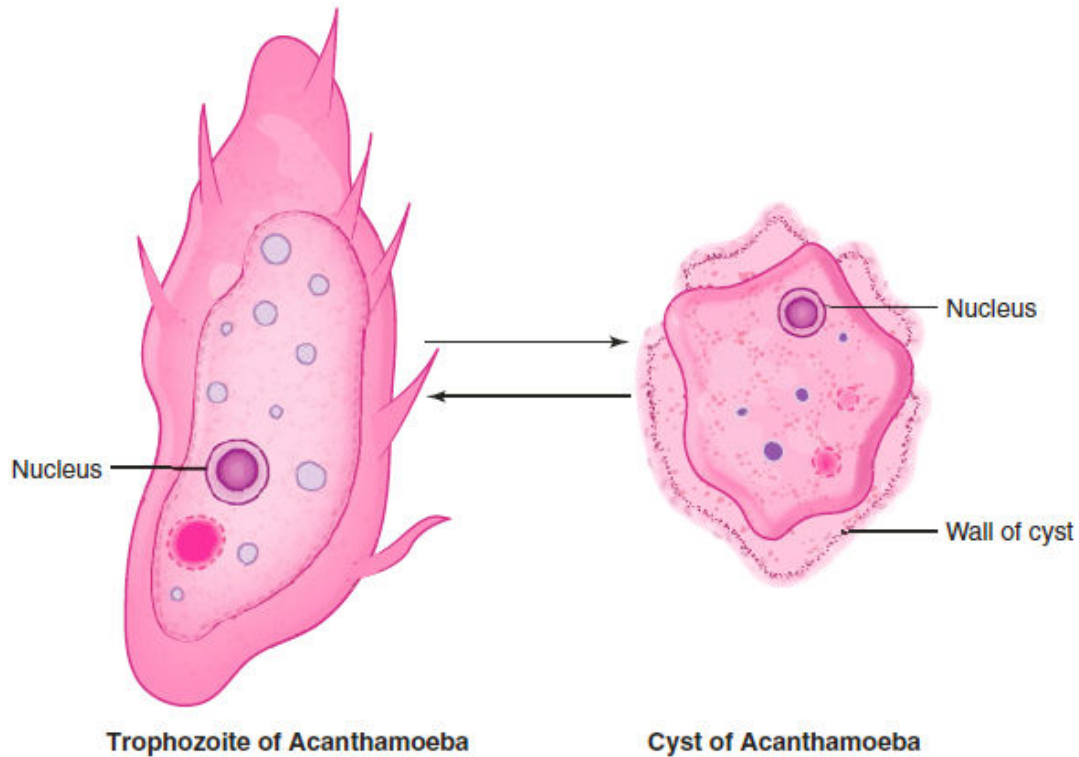
Parmi les nombreuses espèces d'amibes libres, seules quelques unes sont associées à des pathologies humaines : *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* et plusieurs espèces d'*Acanthamoeba*. A noter qu'une autre amibe libre du genre *Sappinia*, *Sappinia pedata*, et une autre du genre *Paravahlkampfia*, *Paravahlkampfia francinar* ont également été identifiées dans des cas de méningo-encéphalites [15]. Certaines infections causées par ces amibes sont de type opportuniste, survenant essentiellement chez les immunodéprimés comme les encéphalites à *Acanthamoeba* alors que d'autres sont non opportunistes comme les kératites à *Acanthamoeba*, les méningoencéphalites à *Naegleria* et certaines encéphalites balamuthiennes.

*Acanthamoeba spp.* est le pathogène le plus souvent responsable de la kératite amibienne. Des cas très rares d'infections cornéennes causées ou suspectées être causées par une amibe non-*Acanthamoeba* comme *Naegleria spp.*, *Hartmannella spp.*, and *Vahlkampfia* sont rapportées dans la littérature [16-23]. Ainsi dans le reste de l'exposé le terme de kératite amibienne sera utilisé de significativité équivalente à celui de kératite à *Acanthamoeba* (KA) qui est le terme le plus fréquemment utilisé dans la littérature anglo-saxonne.

### 2.2.3 Acanthamoeba spp.

#### 2.2.3.1 *Description*

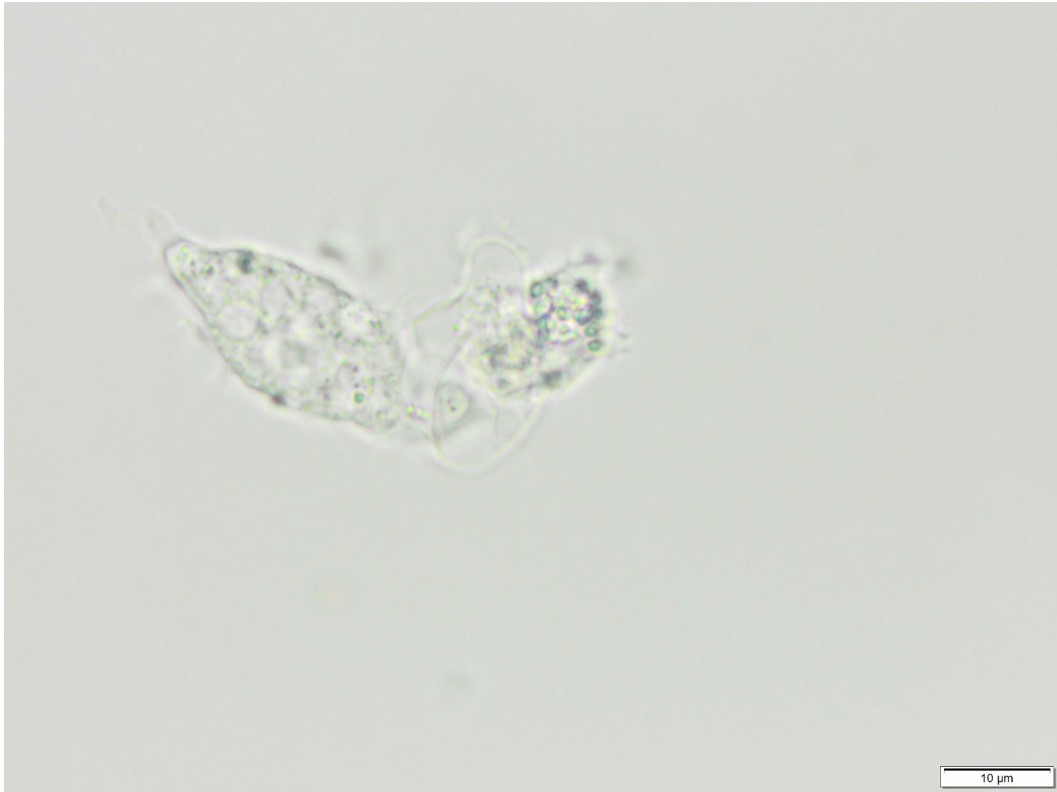
Le genre *Acanthamoeba* spp. est le genre d'amibes libres le plus largement représenté dans notre environnement. Ces amibes sont ubiquitaires mais sont le plus souvent retrouvées en milieux humides tels que l'eau, la boue et le sol. Le cycle biologique d'*Acanthamoeba* spp. comprend un stade actif d'alimentation et de division appelé stade trophozoïte et un stade quiescent appelé kyste. Ce kyste est une forme de protection et de résistance quand l'environnement devient défavorable, en fonction de la disponibilité en nutriment, du pH, de la température et de différents paramètres physico-chimiques. En fonction des conditions de survie, *Acanthamoeba* spp. se transforme d'une forme à l'autre en fonction des conditions locales (figure 3) [24, 25].



**Figure 3. Le cycle biologique d'*Acanthamoeba* spp**

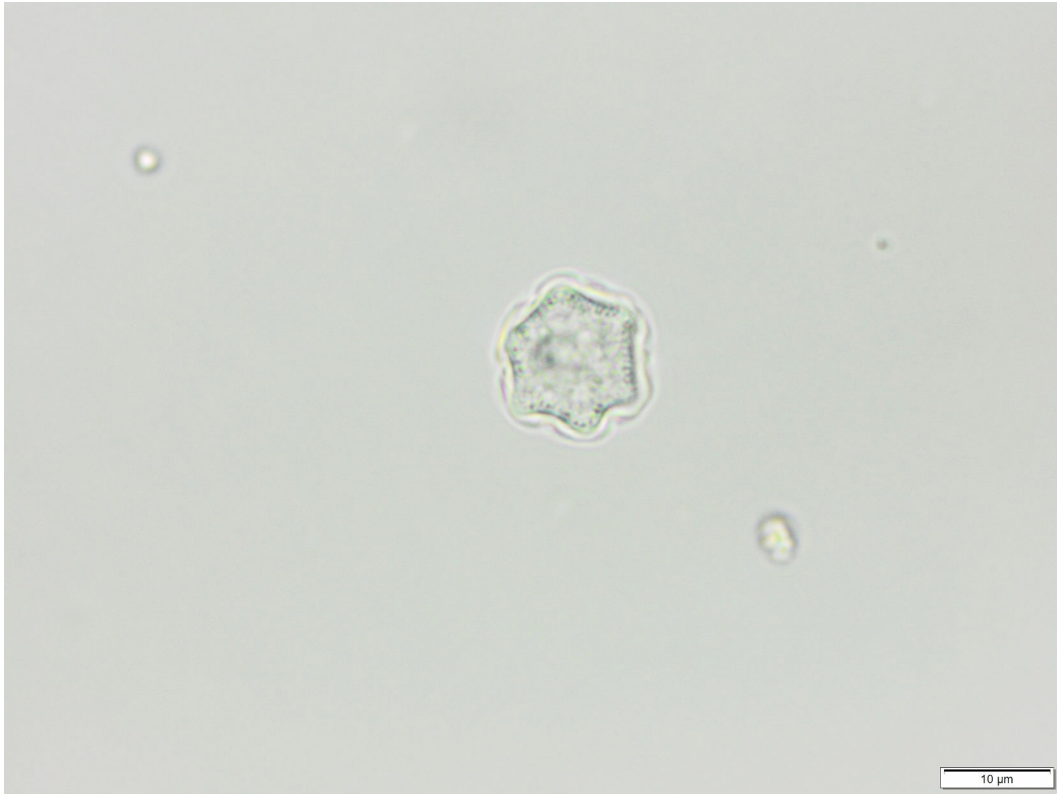
Il comprend 2 formes en fonction des conditions environnementales. Le trophozoïte est la forme active et le kyste est la forme résistante. D'après Sun, 2017 [24].

La taille du trophozoïte varie entre 15 et 50  $\mu\text{m}$ . L'organisation structurale du trophozoïte est celle d'une cellule eucaryote. Le préfixe « *acanth* » signifie « pic » en grec et désigne les acanthopodes, structures en épine situées à la surface des Acanthamibes, permettant leur déplacement, retrouvées à leur surface. Les trophozoïtes aérobies actifs se nourrissent de bactéries, de champignons et d'autres micro-organismes. Ces trophozoïtes se divisent par fission binaire en utilisant un processus mitotique (figure 4).



**Figure 4. Trophozoïtes d'*A. castellanii* (microscopie optique).**  
Université de Rouen

Dans les environnements défavorables, y compris les conditions anaérobies, la forme « trophozoïtes » se transforme en kystes, forme dormante et résistante. Les kystes sont à double paroi et peuvent varier en forme, mesurant de 5-20  $\mu\text{m}$  de diamètre. La paroi comprend un ectocyste externe, qui peut être ondulant plus ou moins polygonal et un endocyste interne, qui est de forme variable stellaire, ovale, polygonale... [15]. De nombreux travaux rapportent la résistance des kystes aux différentes agressions physico-chimiques et conditions extrêmes, comme certains biocides (composés halogénés, biocides cationiques, agents oxydants, aux températures extrêmes, au manque de nourriture ou aux irradiations par UV et rayons X [25]. Ces travaux rendent ainsi compte de la difficulté du traitement des affections humaines liées à *Acanthamoeba* et de l'élimination des kystes responsables de récurrence et de chronicisation (figure 5).



**Figure 5. Kyste d'*A. castellanii*. Aspect caractéristique de double paroi (microscopie optique).** Université de Rouen

#### *2.2.3.2 Position taxonomique*

L'identification des différentes espèces au sein du genre *Acanthamoeba* reste souvent difficile. Le genre *Acanthamoeba* comprend 20 espèces. En 1977, Pussard et Pons [12] proposent une classification de 18 espèces fondée sur des critères morphologiques de taille et de forme des kystes d'*Acanthamoeba*. Elle sera complétée par 2 autres espèces en 1991 (tableau 1) [24]. Cette classification définit ainsi trois groupes :

- *le groupe I* est caractérisé par des Acanthamibes de grande taille dont les kystes ont un diamètre supérieur à 18  $\mu\text{m}$ ; il y a 4 espèces dans ce groupe : *A. astronyxis*, *A. comandoni*, *A. echinulata*, et *A. tubiashi*.

- *le groupe II* regroupe les espèces présentant une surface très irrégulière polygonale, triangulaire ou ovalaire et de diamètre inférieur à 18µm. Ce groupe contient 11 espèces dont *A. polyphaga* et *A. castelanii*.
- *le groupe III* comprend de petites Acanthamibes rondes de diamètre identique au groupe II [8, 13, 14]. Il comprend 5 espèces : *A. palestinensis*, *A. culbertsoni*, *A. lenticulata*, *A. pustulosa*, et *A. royreba*.



**Tableau 1. Classification d'*Acanthamoeba* basée sur la morphologie des kystes [24].**

Groupe morphologique	Nom des espèces
Groupe I	<i>A. astronyxis</i> <i>A. comandoni</i> <i>A. echinulata</i> <i>A. tubiashi</i>
Groupe II	<i>A. castellanii</i> <i>A. mauritaniensis</i> <i>A. polyphaga</i> <i>A. lugdunensis</i> <i>A. quina</i> <i>A. rhysodes</i> <i>A. divionensis</i> <i>A. paradiunionensis</i> <i>A. griffini</i> <i>A. triangularis</i> <i>A. hatchetti</i>
Groupe III	<i>A. palestinensis</i> <i>A. culbertsoni</i> <i>A. lenticulata</i> <i>A. pustulosa</i> <i>A. royreba</i>
<i>A. : Acanthamoeba</i>	

Les espèces les plus souvent impliquées en pathologies humaines, *A. castelani* et *A. polyphaga*, sont situées dans le groupe II. *A. culbertsoni* est cependant classée dans le groupe III. Cette classification présente cependant des limites et l'identification des espèces apparaît souvent problématique. La morphologie des kystes peut en effet changer en fonction des conditions de culture.

Les techniques de biologie moléculaire permettent un diagnostic beaucoup plus sensible et une identification plus spécifique. Ainsi, une nouvelle classification a été établie par Stothard *et al.* en 1999 [26]. Elle se fonde sur l'étude du gène nucléaire de l'ARN ribosomal de la sous-unité 18S. Ces études moléculaires ont permis d'identifier jusqu'à présent 20 génotypes, nommés de T1 à T20 [27]. Gast *et al.* en 1996 et Stothard *et al.* en 1998 identifiaient les 12 premiers génotypes [28, 29]. Certains de ces génotypes sont depuis connus pour être associés à une pathogénicité plus importante comme le génotype T4 en particulier.

Les trois groupes morphologiques établis par Pussard et Pons peuvent être reliés à cette classification de biologie moléculaire mais parfois avec difficultés et une certaine part d'incertitude [30]:

- les génotypes T7, T8, T9, T17 et T18, correspondent aux espèces du groupe I
- les génotypes T3, T4 et T11 correspondent aux espèces du groupe II
- les génotypes T2, T5, T6, T10, T12 et T14 correspondent aux espèces du groupe III

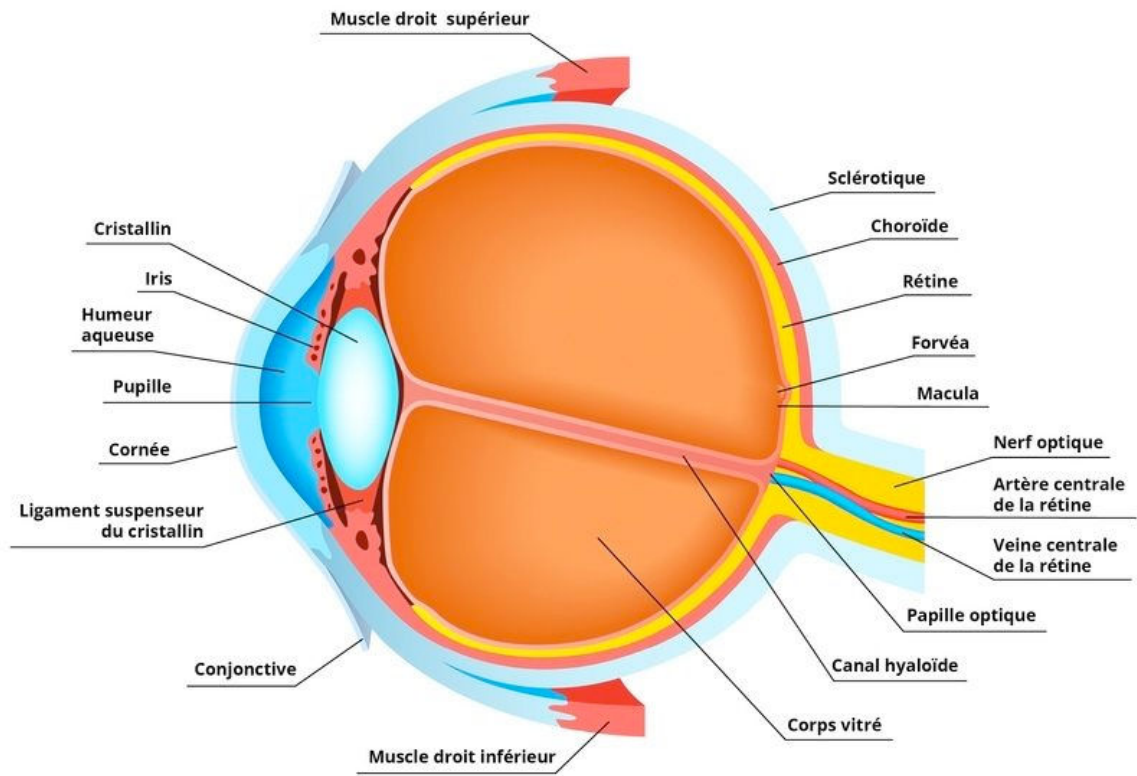
Le génotype T4 est le plus fréquemment retrouvé dans l'environnement [25]. Les kératites à *Acanthamoeba* sont majoritairement dues à des espèces du groupe

T4, incluant *Acanthamoeba castellanii* et *A. polyphaga*. Elles sont en cause dans plus de 90 % des cas de KA. On retrouve plus rarement des espèces du groupe T3 ou T11 [26, 31, 32].

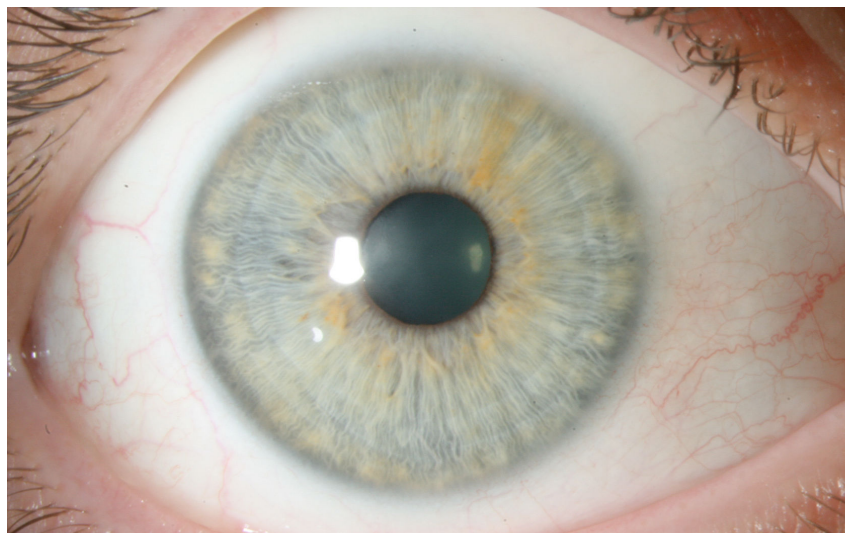
## **2.3 Physiopathologie de la kératite à *Acanthamoeba***

### **2.3.1 Anatomie de la cornée**

La surface oculaire comprend la cornée transparente nécessaire à la vision et la conjonctive qui l'entoure. La cornée est un hublot transparent et convexe constituant une partie de la coque de l'œil prolongée en arrière par la sclère via une zone de jonction appelée le limbe sclérocornéen. Elle est responsable avec le cristallin du pouvoir réfractif l'œil et sa transparence lui permet de transmettre la lumière vers la rétine. Le cristallin et la cornée sont avasculaires et c'est cette particularité qui leur donne une transparence. L'apparition d'une néovascularisation cornéenne est possible au cours de différents phénomènes pathologiques dont les phénomènes infectieux. Son épaisseur est de 530 µm au centre. Les pathologies cornéennes altérant cette transparence vont entraîner obligatoirement une baisse visuelle voire une cécité (figures 6 et 7).



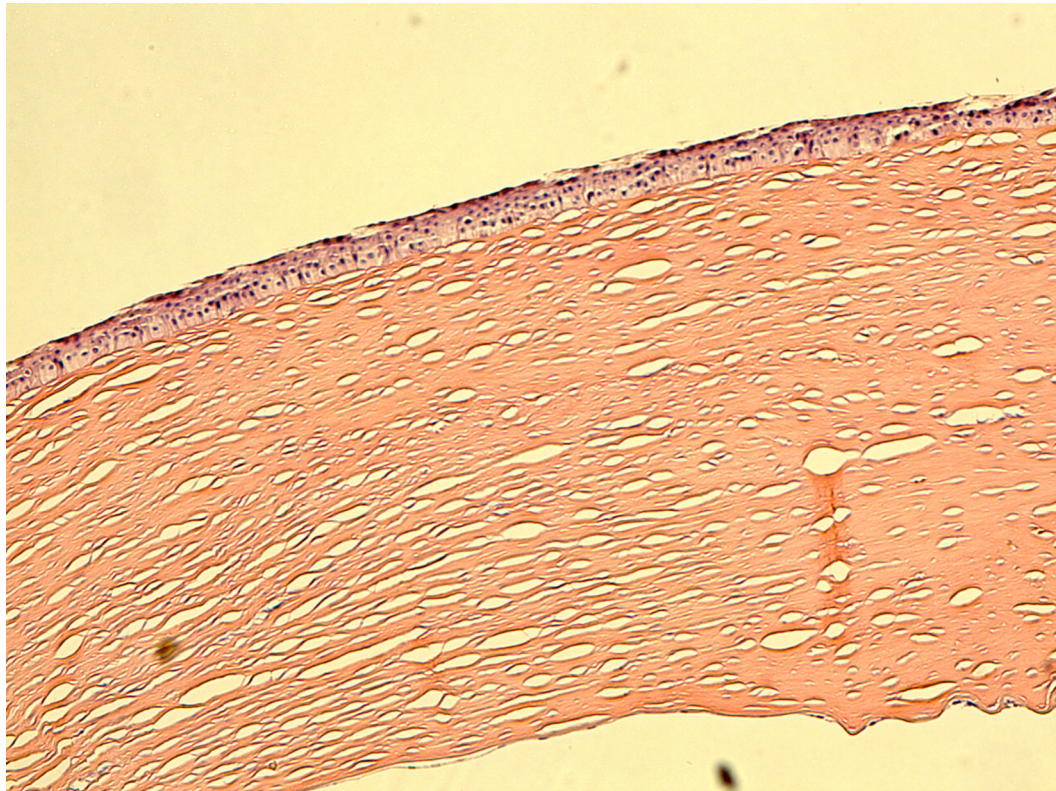
**Figure 6. Coupe anatomique schématisique d'un œil.** Optoplus.com (13 août 2018)



**Figure 7. Photographie de face au biomicroscope de la surface oculaire.** CHU Rouen

Histologiquement, la cornée est constituée (figure 8):

- d'un épithélium squameux non kératinisé de 50 à 60  $\mu\text{m}$  d'épaisseur contenant environ 5 couches cellulaires
- de la membrane de Bowman qui correspond à une fine couche de condensation du stroma antérieur
- d'un stroma riche en collagène représentant 90% de l'épaisseur totale. Les cellules sont appelées kératocytes et le collagène possède une organisation lamellaire
- d'un endothélium monocouche reposant sur une membrane basale appelée membrane de Descemet.



**Epithélium**

**Stroma**

**Endothélium**

**Figure 8. Coupe histologique de la cornée. Coloration HES, X10**

L'innervation sensitive de la cornée se fait par la branche nasociliaire de la branche ophtalmique du nerf trijumeau. Les rameaux nerveux au nombre de 12 à 16 au niveau du limbe pénètrent dans la cornée en périphérie à une profondeur correspondant au tiers antérieur de la cornée, de façon radiaire, puis se dirigent vers l'avant pour former des plexus sous épithéliaux. De là, de nombreuses terminaisons nerveuses émergent et traversent la membrane de Bowman pour gagner l'épithélium cornéen.

La surface oculaire, dont la cornée, est recouverte du film lacrymal qui représente la deuxième ligne de défense de l'œil après les paupières. Il est composé d'une couche muqueuse, d'une couche aqueuse et d'une couche lipidique. En dehors de son action lubrifiante, il permet d'éliminer les déchets et participe au métabolisme de la cornée par apport de l'oxygène dissout dans la composante aqueuse des larmes. Il apporte également des protéines antimicrobiennes (immunoglobuline A et G, lysozyme, lactoferrine, bêta-lysines) pour lutter contre les agressions du monde extérieur.

### 2.3.2 Exposition à *Acanthamoeba*

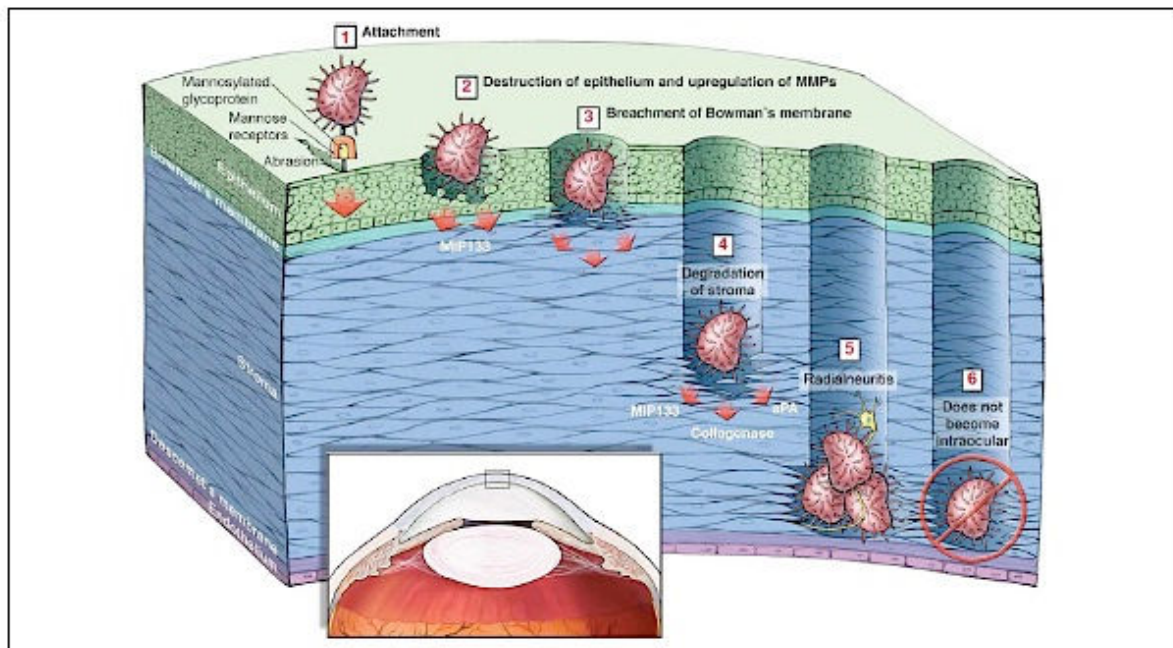
*Acanthamoeba* est un parasite opportuniste de l'homme. Bien qu'*Acanthamoeba* puisse être à l'origine de méningo-encéphalite ou d'atteinte cutanée, la pathologie humaine la plus fréquemment associée à *Acanthamoeba* est la kératite. L'exposition à *Acanthamoeba* spp. est fréquente ; ainsi 50 à 100% de la population générale possède des anticorps circulants spécifiques dirigés contre des antigènes d'*Acanthamoeba* [33, 34]. Par ailleurs *Acanthamoeba* peut être isolée du nez et de la

gorge de personnes asymptomatiques [35]. Par conséquent, la kératite à *Acanthamoeba* résulte habituellement d'un contact accidentel.

Malgré l'exposition forte à *Acanthamoeba* spp., la fréquence des kératites amibiennes reste modeste voire rare. *Acanthamoeba* spp. contamine entre 3,9 et 8,9 % des boîtiers de lentilles de contact d'individus asymptomatiques [36]. Ainsi, en dehors du contact avec *Acanthamoeba*, la perte de l'intégrité de l'épithélium cornéen semble être nécessaire pour la survenue d'une kératite amibienne comme le sous entend un modèle chez le hamster chinois de KA dans lequel l'apparition de la kératite était conditionnée à l'abrasion de l'épithélium cornéen malgré l'application d'une lentille de contact recouverte d'*Acanthamoeba* [37]. L'observation clinique de kératites amibiennes le plus souvent unilatérales soutient cette hypothèse qu'une brèche épithéliale est nécessaire au développement de la kératite.



### 2.3.3 Cascade physiopathologique de la kératite à *Acanthamoeba*



**Figure 9. Cascade physiopathologique de la kératite à *Acanthamoeba*. D'après Clarke et al. [37]**

(1) Les trophozoïtes adhèrent aux glycoprotéines mannosylées, qui sont régulées à la hausse en réponse à abrasion de l'épithélium cornéen. (2) L'exposition au mannose induit la libération de MIP133 par les trophozoïtes possédant une action cytolitique sur les cellules épithéliales *in vitro*. (3) Progression vers le stroma. (4) Libération de protéases par les trophozoïtes. (5) Regroupement possible des trophozoïtes autour des nerfs cornéens. (6) Progression rare des trophozoïtes au delà de la membrane de Descemet pour engendrer une infection intraoculaire.

#### 2.3.3.1 Adhérence du trophozoïte à l'épithélium cornéen

Au début de la cascade physiopathologique, les trophozoïtes se lient aux glycoprotéines mannosylées de l'épithélium cornéen par une protéine de 136-kDa au niveau de sa membrane [38, 39]. L'adhérence des trophozoïtes à l'épithélium cornéen est une condition préalable essentielle à la production d'une kératite (figure 9). Des tests d'adhérence *in vitro* utilisant des boutons cornéens de 11 espèces de mammifères

différentes ont indiqué que la liaison des trophozoïtes à l'épithélium cornéen *in vitro* était corrélée étroitement à la susceptibilité de chaque mammifère à cette infection. La lésion la plus importante se faisait chez l'homme, le hamster chinois et le cochon : en moyenne 100-200 parasites/7,07 mm<sup>2</sup> contre 5-20 parasites/7,07 mm<sup>2</sup> pour les autres espèces [40]. Jaison *et al.* [41] ont montré que l'abrasion cornéenne, facteur de risque nécessaire pour le développement d'une KA entraînait une augmentation de l'expression de glycoprotéines mannosylées au niveau de l'épithélium cornéen. Les lentilles de contact pourraient ne pas servir uniquement de vecteur pour les trophozoïtes vers la cornée, mais pourrait également augmenter la régulation des glycoprotéines mannosylées sur l'épithélium cornéen, pouvant ainsi produire une adhérence accrue des *Acanthamibes* au niveau de l'épithélium cornéen par le production de microtraumatismes [42].

### 2.3.3.2 Effets cytopathiques induits par les trophozoïtes

Après l'adhésion à l'épithélium cornéen, les trophozoïtes dégradent l'épithélium cornéen et la membrane de Bowman sous-jacente pour accéder au stroma cornéen (figure 9). Les trophozoïtes semblent être capables *in vitro* d'induire la mort de plusieurs types de cellules dont les cellules épithéliales, les cellules endothéliales et les fibroblastes de la cornée par différents moyens cytopathiques comme une cytolysse directe, l'apoptose ou la phagocytose [39]. En outre, l'exposition au mannose induit la production d'une protéase de 133 kDa appelée MIP (*mannose-induced protein*) 133 par les trophozoïtes d'*Acanthamoeba*. MIP133 induit une cytolysse « sans contact » des cellules épithéliales de la cornée *in vitro* [43, 44]. Certaines études sur des cornées en organoculture ont montré que la liaison *Acanthamoeba* - glycoprotéines mannosylées

induirait la libération de facteurs cytopathiques (y compris MIP133) facilitant la destruction et l'invasion des trophozoïtes [42, 43]. Ainsi, le mannose semble augmenter la pathogénicité des trophozoïtes. De plus, le mannose libre augmente la pathogénicité des trophozoïtes *in vivo*, comme le suggère le fait que les lentilles de contact recouvertes de mannose et d'*Acanthamoeba* provoquent des kératites plus sévères que celles induites par des lentilles non recouvertes de mannose [42]. De plus les isolats cliniques pathogènes, mais non les isolats non pathogènes du sol d'*Acanthamoeba* spp. produisent du MIP133, indiquant la corrélation probable entre la production de MIP133 et le pouvoir pathogène d'*Acanthamoeba* [45].

Le dépôt de glycoprotéines contenant du mannose sur les lentilles de contact pourrait constituer un facteur de risque supplémentaire de KA. Le mannose exprimé sur les parois cellulaires de la flore bactérienne de la surface oculaire pourrait également contribuer à la physiopathologie des KA.

### 2.3.3.3 La dégradation du stroma cornéen

Les trophozoïtes d'*Acanthamoeba* utilisent plusieurs enzymes protéolytiques non spécifiques pour pénétrer et dégrader le stroma; celles-ci comprennent des protéases à sérine, une protéase à cystéine, une élastase et une métalloprotéinase [13, 46-48]. L'aspect de périnévrite radiaire est pathognomonique des kératites amibiennes. *In vitro*, des études ont montré que les trophozoïtes répondent par chimiotactisme à des extraits de cellules neuronales et de cellules de la crête neurale, mais non à des extraits de cellules épithéliales ou stromales cornéennes [49]. De plus, les trophozoïtes d'*Acanthamoeba* sont capables d'induire la mort de cellules nerveuses à la fois par la cytolysse directe et apoptose [50]. La prédilection des trophozoïtes à

infiltrer les nerfs cornéens et produire une cytolysse des cellules nerveuses *in vitro* pourraient expliquer la douleur intense associée à la KA et la formation de périnévrites.

Enfin, la faible incidence d'endophtalmie à *Acanthamoeba* est surprenante du fait de la capacité du trophozoïte à franchir la membrane de Descemet et l'endothélium cornéen, suggérant que les trophozoïtes peuvent, par conséquent, pénétrer dans la chambre antérieure de l'œil. Cependant, certaines études *in vivo* indiquent que les trophozoïtes qui entrent en chambre antérieure sont éliminés par une activité neutrophilique marquée. L'activité des neutrophiles anti-trophozoïtes a été mise en évidence par l'injection en chambre antérieure de millions de trophozoïtes qui en 15 jours avaient été tous éliminés [51].

#### 2.3.4 Réponse du système immunitaire dans la kératite à *Acanthamoeba*

Les éléments de l'immunité innée et adaptative sont impliqués dans la réponse immunitaire de la KA. Ainsi, les macrophages et les neutrophiles de l'immunité innée sont capables de détruire les trophozoïtes et les kystes *in vitro* [43, 52-55]. De plus, les macrophages et les neutrophiles sont essentiels à la résolution des kératites amibiennes expérimentales [56, 57].

La récurrence d'une KA est possible ce qui suggère une immunisation non protectrice. Par conséquent, le système immunitaire adaptatif n'est pas efficace pour prévenir la réinfection, bien que l'immunisation systémique avec des antigènes d'*Acanthamoeba* spp. entraîne des réponses à type d'hypersensibilité retardée et la production IgG sériques [58]. Néanmoins, les anticorps IgA sécrétoires, peuvent tout

de même protéger contre la maladie en limitant l'adhérence des trophozoïtes sur l'épithélium cornéen [59].

## **2.4 Diagnostic clinique de la kératite à *Acanthamoeba***

### **2.4.1 Facteurs de risque**

#### *2.4.1.1 Le port de lentille de contact*

La KA est habituellement unilatérale, bien qu'une atteinte bilatérale soit survenue chez 8 cas sur 106 (7,5%) dans une étude britannique [9]. Il s'agit le plus souvent de sujets jeunes et immunocompétents sans sex ratio particulier [60]. Le port de lentilles de contact constitue le principal facteur de risque dans les pays industrialisés. En effet, *Acanthamoeba* est capable d'adhérer aux lentilles souples ou rigides, portées ou non portées. Il existe une recrudescence des KA au cours de l'été et au début de l'automne du fait probablement de la présence accrue d'*Acanthamoeba* dans l'environnement par temps plus chaud [7, 61, 62], ainsi que probablement d'une augmentation de la pratique des sports nautiques pendant la période estivale [63].

Il peut donc s'agir d'un port de lentilles souples ou rigides, utilisées à visée optique, thérapeutique ou esthétique. Cependant, les porteurs de lentilles souples ont 9 fois plus de risque de contracter une KA que les porteurs de lentilles rigides [64]. Néanmoins, l'ortho-kératologie, qui constitue un port nocturne de lentilles rigides en vue d'aplatir l'épithélium cornéen temporairement pour limiter une myopie dans la journée, semble être un facteur de risque non négligeable [65]. Les principaux facteurs de risques sont les erreurs au cours de l'entretien des lentilles

notamment l'utilisation de l'eau du robinet ou l'ajout de produit d'entretien sur de l'ancien déjà présent dans les boîtiers [66]. Cependant, même sans erreur dans l'entretien des lentilles de contact, le développement d'une KA est possible. En outre, une étude antérieure a indiqué qu'aucune des solutions de lentilles de contact commercialisées testées dans ce travail n'étaient capables d'éradiquer l'ensemble des kystes de 3 souches d'*Acanthamoeba* [67]. De plus, les conditions d'essais en laboratoire optimisent l'efficacité des solutions de lentilles de contact. Par conséquent, leur efficacité dans les conditions de « vie réelle » est inconnue, d'autant plus que les biofilms et une colonisation microbienne se développent souvent sur les lentilles favorisant l'adhérence d'*Acanthamoeba* [68]. En 1997, des lignes directrices réglementaires de l'organisation internationale pour la normalisation (ISO) ont été publiées concernant les solutions d'entretiens lentilles de contact. La norme 14729 a décrit les exigences microbiologiques mais *Acanthamoeba* n'était pas été incluse en tant qu'organisme d'essai car elle était considérée comme une cause rare de kératite infectieuse et qu'aucun schéma d'essai standard n'était disponible.

De nouvelles normes recommandant que les produits d'entretien des lentilles soient évalués conformément aux conditions réelles de désinfection, connues sous la norme ISO 18259, ont été publiées en 2014. Les normes précédentes pour les solutions de désinfections des lentilles évaluaient l'efficacité antimicrobienne intrinsèque d'une solution mais sans évaluer comment le produit pouvait se comporter en contact avec une lentille de contact. Cette nouvelle norme conseille de tester les solutions d'entretien en présence de souillures organiques mimant la présence de dépôts sur la lentille, qui augmentent les chances de survie des microorganismes à l'effet d'un biocide, et précise de tester les solutions sur des lentilles de contact en condition de stockage dans des étuis [69]. Ces normes sont cependant volontaires sans être obligatoires.

#### *2.4.1.2 En l'absence de port de lentille de contact*

La KA en l'absence de port de lentilles de contact est souvent sous-estimée et diagnostiquée tardivement, même si elle peut représenter en fonction des séries entre 3% et 15% des cas aux Etats-Unis et au Royaume-Uni [9, 70, 71]. La KA est alors fréquemment associée à un traumatisme ou à une exposition à de l'eau ou des sols contaminés, souvent chez les agriculteurs [5, 72]. La KA a également été décrite après un traumatisme chirurgical sans utilisation post-opératoire de lentille thérapeutique, y compris après chirurgie réfractive comme le LASIK [73].

#### 2.4.2 Histoire et suspicion clinique

La rapidité du diagnostic et la mise en route précoce d'un traitement adapté conditionnent le pronostic de la KA, qui se détériore au delà d'un délai de 3 semaines [74-76]. La KA est à évoquer devant toute kératite survenant après un traumatisme tellurique ou suivi d'une exposition avec de l'eau contaminée, et chez tous les porteurs de lentilles de contact, particulièrement en cas d'évolution indolente ou d'atypicités cliniques pour une kératite bactérienne ou fongique. En outre, le retard de réponse thérapeutique à un traitement de première intention anti-bactérien ou antiviral doit faire évoquer le diagnostic. En cas d'évolution défavorable, la KA doit tout de même être évoquée en cas de facteur de risque même si d'autres microorganismes ont été isolés car il peut exister des co-infections bactériennes, fongiques ou même virales [72, 77-79].

### 2.4.3 Présentation clinique

Dans les formes de KA sans co-infection, la présentation clinique évolue initialement d'une forme épithéliale vers une forme stromale. La majorité des patients se plaignent de douleurs intenses, photophobie et de larmoiement. La douleur induite, possiblement insomniente est souvent disproportionnée par rapport à l'atteinte objective cornéenne et cette discordance est évocatrice du diagnostic surtout chez le porteur de lentilles de contact. A l'inverse, l'absence de douleur ne permet pas d'éliminer le diagnostic car certains cas de KA non douloureuses ont été décrits [78].

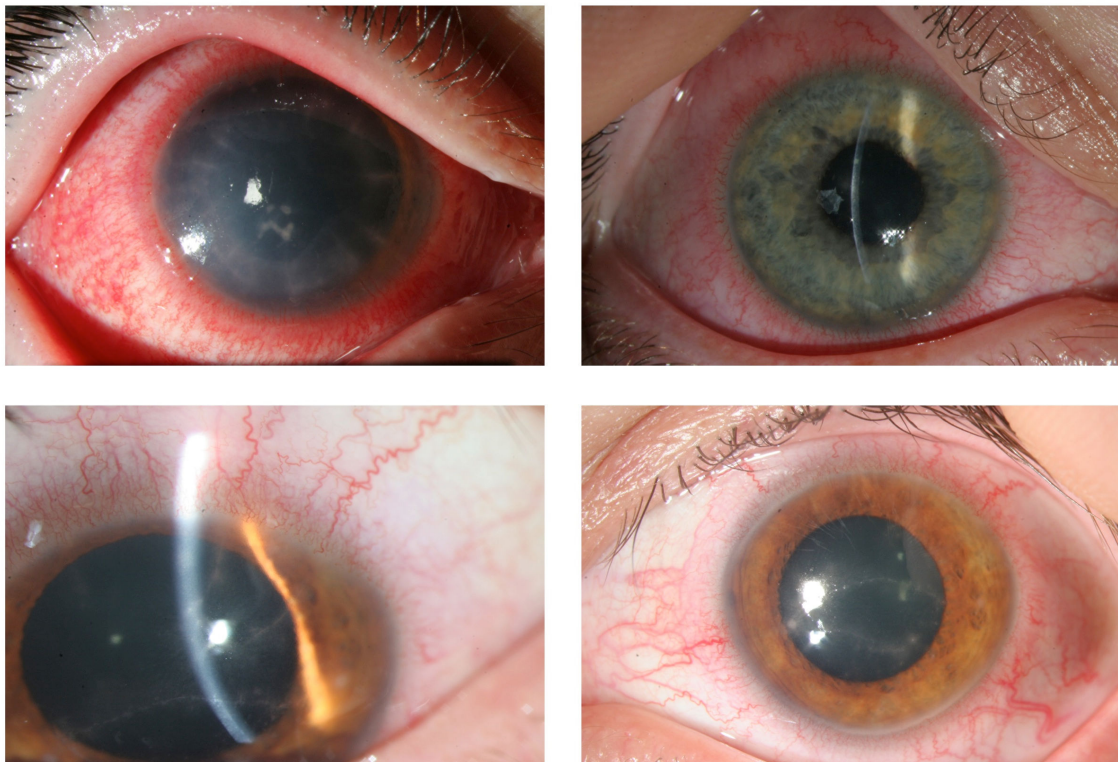
Classiquement, la présentation et les signes cliniques se modifient en fonction de la durée d'évolution de la KA (tableau 2).

**Tableau 2: Présentation initiale de la KA au stade précoce et au stade tardif [63, 77]**

<b>Signes cliniques</b>	<b>Stade précoce * (%)</b>	<b>Stade tardif ** (%)</b>
<b>72 patients</b>		
Kératite ponctuée superficielle	46	21
Pseudodentrite	14	4
Ulcération épithéliale	38	75
Périnévrite	57	29
Infiltrat annulaire	19	83
Réaction de chambre antérieure	5	79
* Symptomatologie évoluant depuis moins d'un mois		
** Symptomatologie évoluant depuis plus de 2 mois		
KA : kératite amibienne		

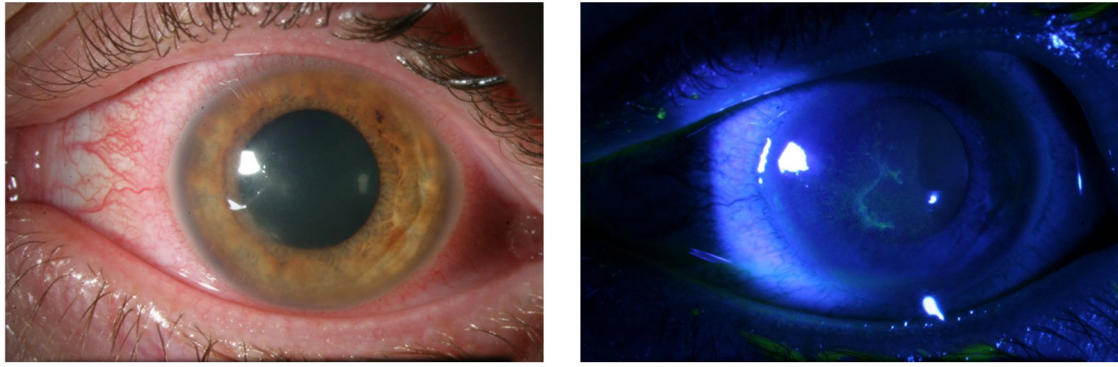


La kératite précoce, avant 3 semaines ou 1 mois d'évolution, est caractérisée par une atteinte épithéliale prédominante pouvant comporter une kératite ponctuée superficielle, des pseudodentrites, des infiltrats épithéliaux ou sous épithéliaux, des ulcérations cornéennes et des périnévrites [77, 80]. Ces périnévrites sont considérées comme pathognomoniques de la KA, mais sont inconstantes, retrouvées jusque dans 63% des cas diagnostiqués à 6 semaines [63]. Leur recherche doit être attentive lors de l'examen clinique car elles peuvent être discrètes et peu nombreuses, ainsi seuls 1 ou 2 nerfs peuvent être atteints (figures 10 et 11).



**Figure 10. Stades précoces de la KA (1).** CHU Rouen

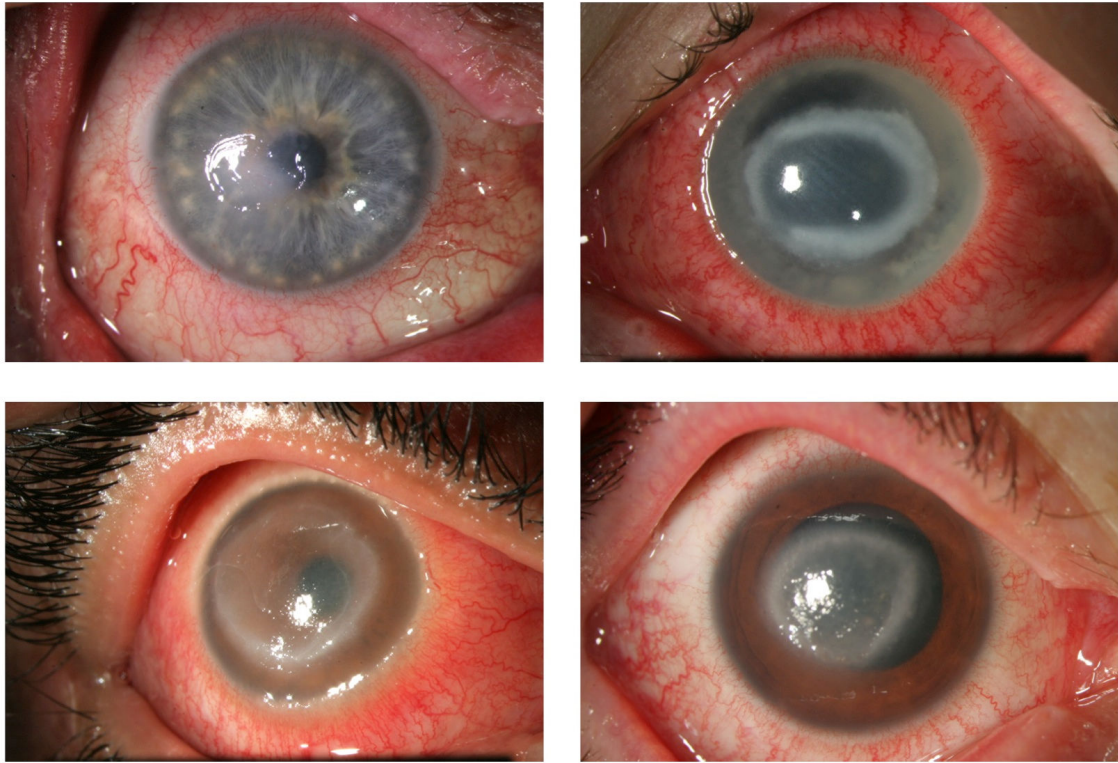
(En haut et à gauche) Ulcère épithélial associé à des périnévrites sur 360°. (En haut et à droite) Epithéliopathie visible à l'anomalie de reflet de la lumière projetée donnant un aspect non physiologique « gaufree ». (En bas et à gauche) Périnévrites localisées en supérieur et pseudodentrites centrales. (En bas et à droite) Pseudodentrites centrales.



**Figure 11. Stades précoces de la KA (2).** CHU Rouen

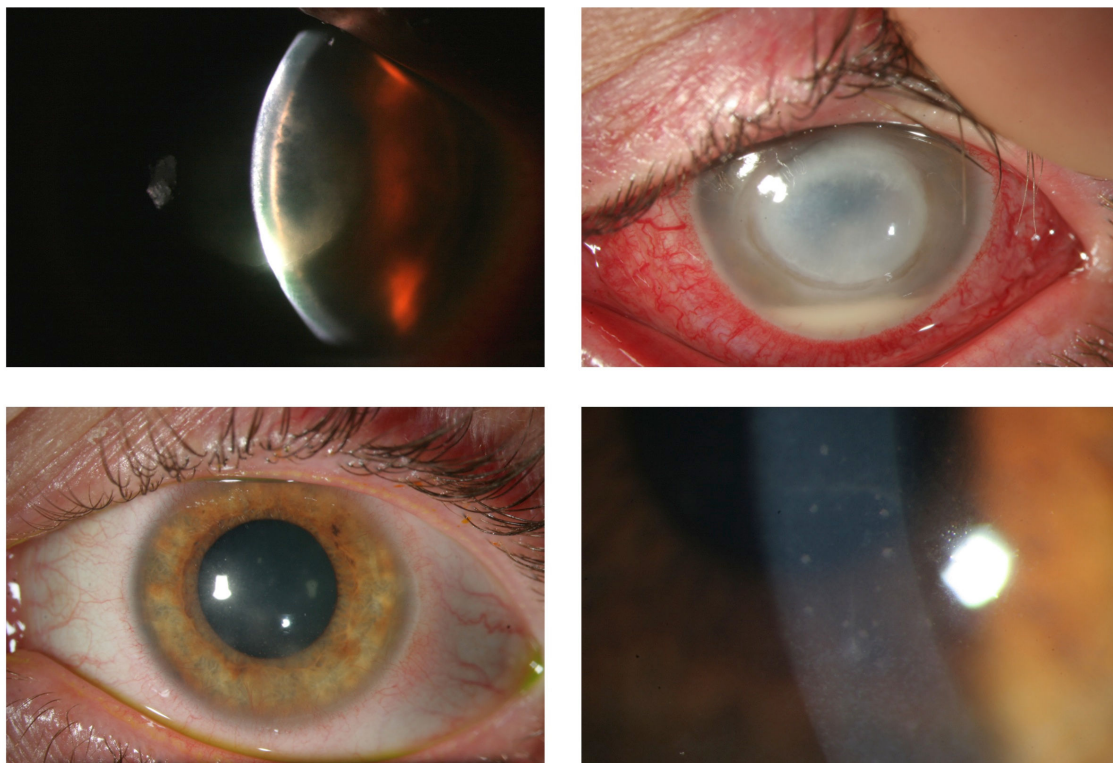
Pseudodentrite centrale en lumière blanche (à gauche) et en lumière bleue cobalt (à droite) après instillation de fluorescéine.

Après 3 semaines à 1 mois d'évolution, la présentation clinique se modifie avec l'apparition possible d'infiltrats annulaires, d'ulcères stromaux puis d'une réaction de chambre antérieure compliquée ou non d'un hypopion. Certains patients présentent des plaques endothéliales et des lésions d'endothélites responsables d'œdème cornéen [77]. A ce stade les périnévrites régressent (figures 12 et 13).



**Figure 12. Formes stromales de KA. CHU Rouen**

(En haut et à gauche) Ulcère épithélial associé à un infiltrat stromal antérieur. (En haut et à droite) Kératite stromale annulaire caractéristique. (En bas et à gauche) Kératite annulaire stromale et réaction inflammatoire du limbe. (En bas et à droite) Kératite annulaire et infiltration stromale antérieure.



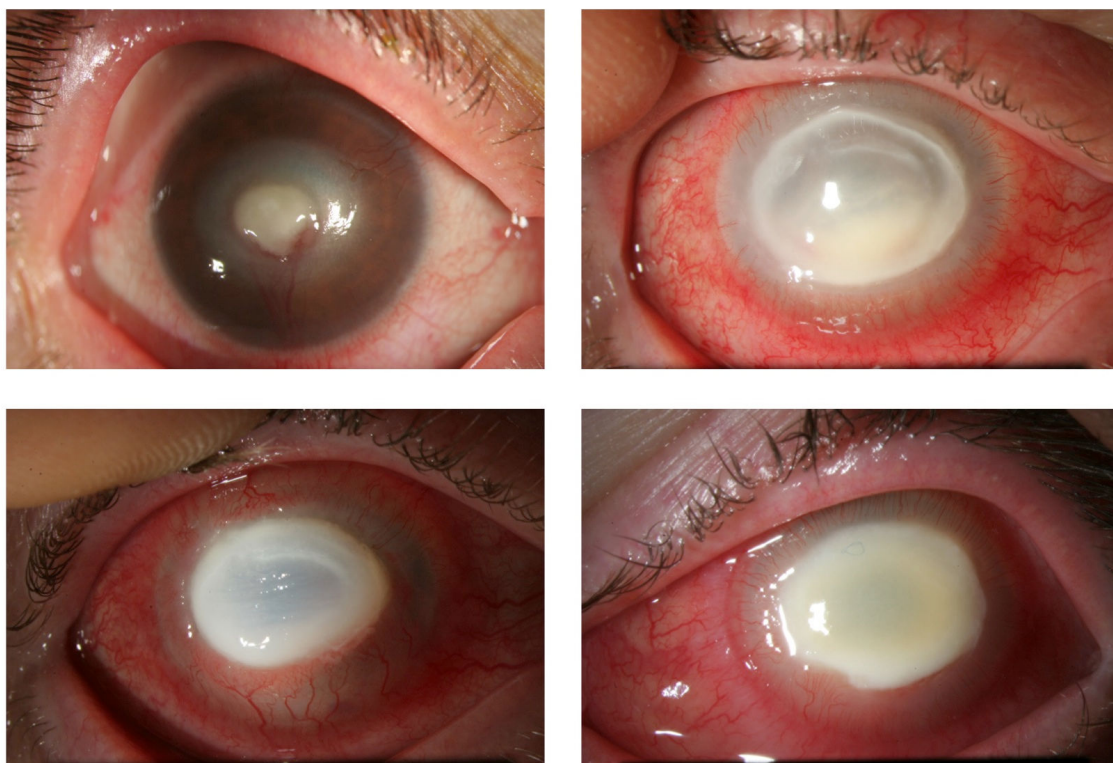
**Figure 13. Réactions inflammatoires associées à la KA. CHU Rouen**

(En haut et à gauche) Réaction endothéliale inflammatoire visible avec la fente lumineuse. (En haut et à droite) Kératite stromale sévère associée à un hypopion. (En bas et à gauche) : Kératite stromale antérieure et réaction inflammatoire à type de précipités rétrocornéens. (En bas et à droite) Même patient à plus fort grossissement.

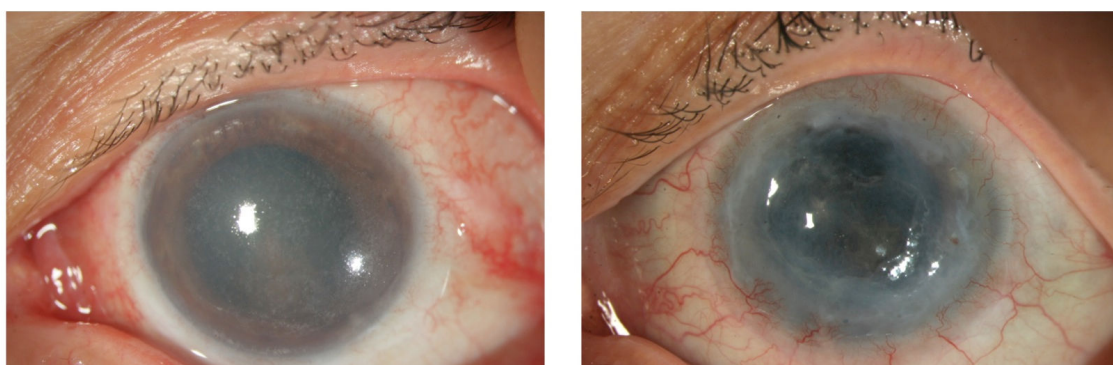
#### 2.4.4 Complications

##### *2.4.4.1 Complications cornéennes*

Au stade tardif, une aggravation locale comme une néovascularisation, une perforation cornéenne, un abcès ou une fonte stromale est possible (figure 14) [77]. Une anesthésie cornéenne est fréquente (figure 15). Les surinfections bactériennes au cours du traitement sont possibles [63].



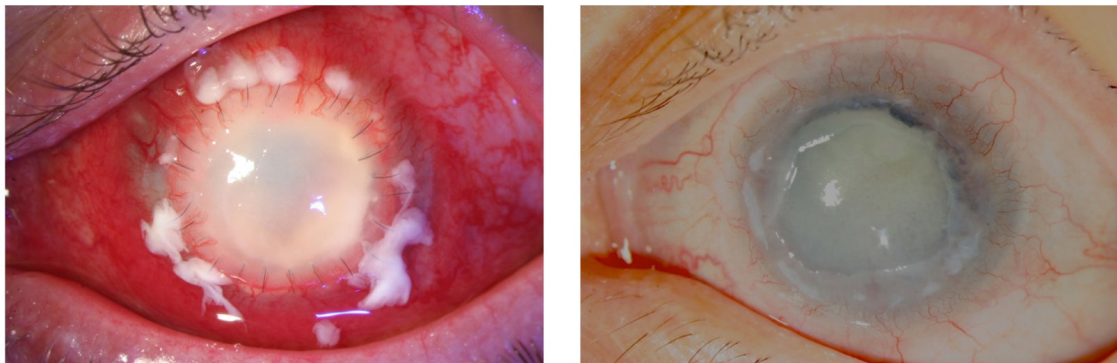
**Figure 14. Complications cornéennes associées à la KA. Nécrose stromale à type d'abcès. CHU Rouen**



**Figure 15. Complications cornéennes associées à la KA. Ulcère chronique d'origine neurotrophique. CHU Rouen**

#### 2.4.4.2 Complications extra-cornéennes

Au cours des stades tardifs, peuvent apparaître des complications extra-cornéennes comme une atrophie irienne, une mydriase aréactive, une sclérite, un glaucome ou une cataracte (figure 16) [81]. La cataracte survient dans environ 20% des cas même en l'absence de corticothérapie [82, 83].



**Figure 16. Complications cornéennes associées à la KA. CHU Rouen**

(A gauche) Sclérite et récurrence sur le greffon cornéen. (A droite) Ulcère cornéen neurotrophique, cataracte blanche et mydriase aréactive

Les manifestations extra-cornéennes de la KA correspondent à l'intrication de plusieurs phénomènes locaux dont principalement de l'inflammation induite par l'infection locale. En effet la dissémination infectieuse d'*Acanthamoeba* au sein de structures oculaires autre que la cornée est très rare et a été peu fréquemment rapportée dans la littérature. Ainsi, l'analyse histologique de 11 pièces d'énucléation réalisées pour kératite amibienne sévère ne retrouvait pas de propagation extra-cornéenne. Cependant, seule une analyse par PCR permettrait d'obtenir une certitude de cette donnée car l'analyse histologique peut être toute de même prise à défaut [84]. D'autres mécanismes ont été incriminés comme l'ischémie induite par des

phénomènes de thrombose intravasculaire et pour certains de la toxicité des collyres anti-*Acanthamoeba* utilisés. Cependant la toxicité des collyres anti-*Acanthamoeba* est très largement remise en cause [63].

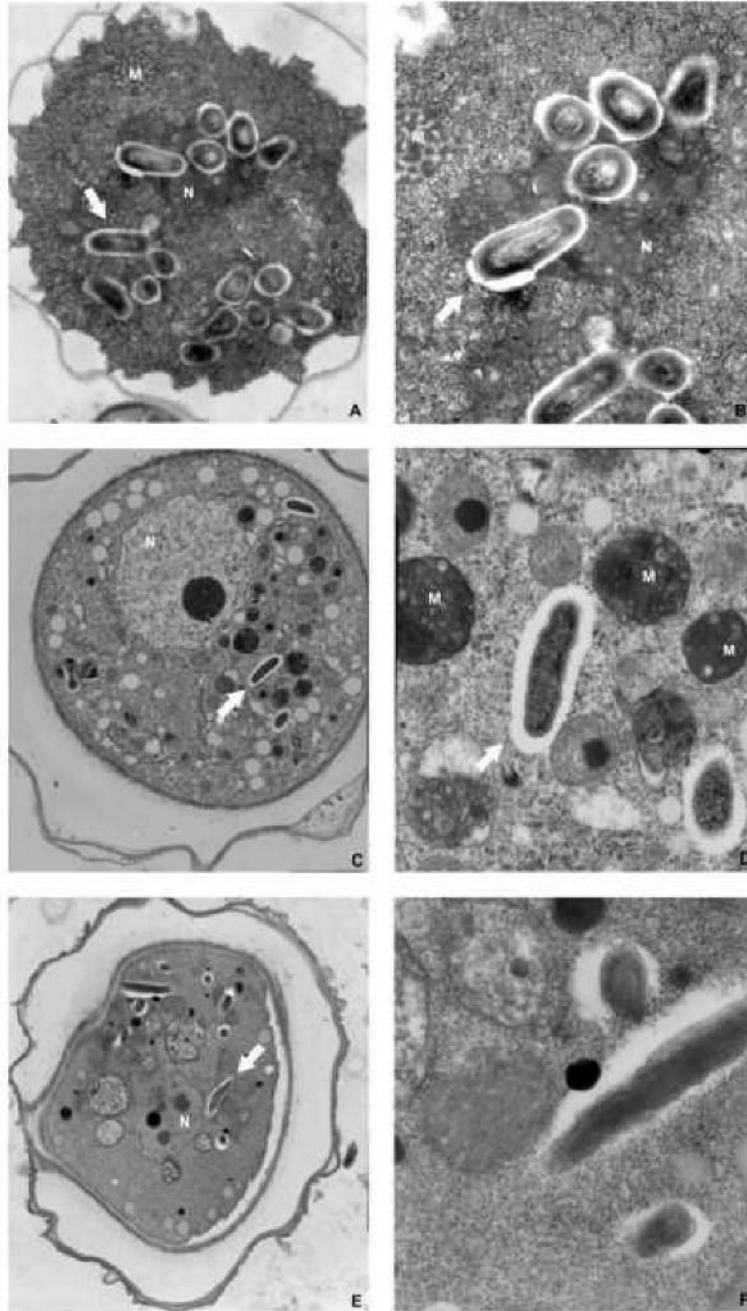
#### 2.4.5 Co-infection

L'existence d'une co-infection bactérienne ou fongique n'est pas un évènement exceptionnel. La survenue de cultures positives en bactériologie ou en mycologie et positives pour *Acanthamoeba* dans 14 cas sur 100 a été décrite en 2018 [85]. La mauvaise réponse au traitement médical d'une kératite infectieuse doit faire rechercher une co-infection à *Acanthamoeba* ou l'inverse notamment en cas de kératites sous lentilles.

Certains éléments pourraient expliquer ce taux de co-infection. *Acanthamoeba* se nourrit d'organismes microbiens mais peut aussi les accueillir. Ainsi, une co-infection peut se trouver du fait de la « co-localisation » des *Acanthamoeba* et de certaines bactéries ou éléments fongiques. En outre, *Acanthamoeba* est fréquemment considérée comme le cheval de Troie du monde microbiologique. Ainsi, elle est en interaction constante avec les biofilms et possèdent la capacité d'héberger, de protéger et de disséminer des micro-organismes potentiellement pathogènes (figure 17). En effet, la majorité des isolats d'*Acanthamoeba* abritent des endosymbiotes qui peuvent contenir des virus, des levures et des bactéries, dont certains sont des pathogènes humains potentiels [86-88]. Un endosymbiote est défini par un organisme qui vit au sein du corps ou des cellules d'un autre organisme. La nature exacte de la symbiose et le bénéfice qu'ils

représentent pour *Acanthamoeba* sont inconnus [89]. Les microorganismes internalisés échappent à la digestion du protozoaire en s'abritant au sein de ses compartiments cellulaires, sont capables de s'y répliquer et profitent de la résistance des kystes amibiens notamment aux biocides pour attendre des conditions favorables à leur dissémination dans l'environnement. Dans le cas des KA, ces endosymbiotes pourraient être responsables d'une co-infection que l'on pourrait considérer « en 2 temps » [90].





**Figure 17. Images en microscopie électronique d'*Acanthamoeba* isolées de KA humaines contenant des endosymbiotes. D'après Iovieno *et al.* [86]**

Kystes d'*Acanthamoeba* contenant *Pseudomonas* (A), *Legionella* (C) et Mycobacteria (E).  
Ultrastructures des *Pseudomonas* (B), *Legionella* (D) et Mycobacteria (F).

#### 2.4.6 Diagnostic différentiel

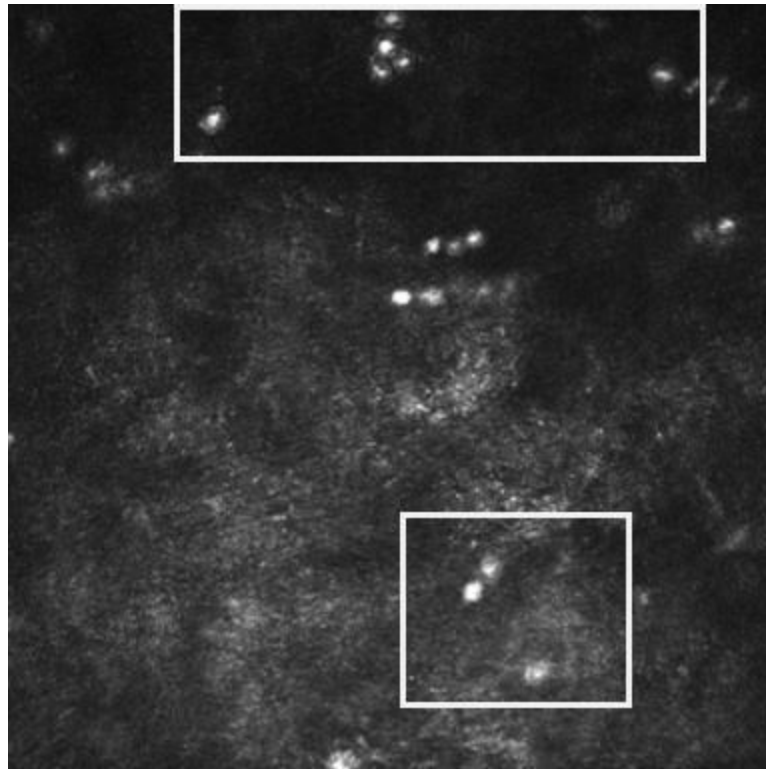
Lors de la présence d'une kératite annulaire et de périnévrites radiaires dans un contexte de port de lentilles de contact, le diagnostic clinique de KA est relativement facile à évoquer. Cependant, lorsque l'infection cornéenne est au stade précoce, en cas de signes atypiques ou de co-infection, le diagnostic est beaucoup plus difficile et un diagnostic de kératite virale ou de kératite fongique peut être posé à tort. En fonction des zones géographiques, la fréquence de l'un ou l'autre diagnostic varie. Sharma *et al* ont décrit en Inde en 2000, un diagnostic erroné clinique de kératites fongiques chez 15 patients sur 33 soit chez 45,4% des patients avec une KA [72]. En Angleterre, sur 185 patients KA analysés pour ce paramètre, 96 patients ont eu un diagnostic de kératite herpétique avant que le diagnostic ne soit redressé c'est à dire dans 52% des cas [91]. Ainsi la présomption clinique de KA doit être forte devant toute kératite sous lentilles de contact.

### **2.5 Diagnostic paraclinique de la kératite à *Acanthamoeba***

#### 2.5.1 La microscopie confocale *in vivo*

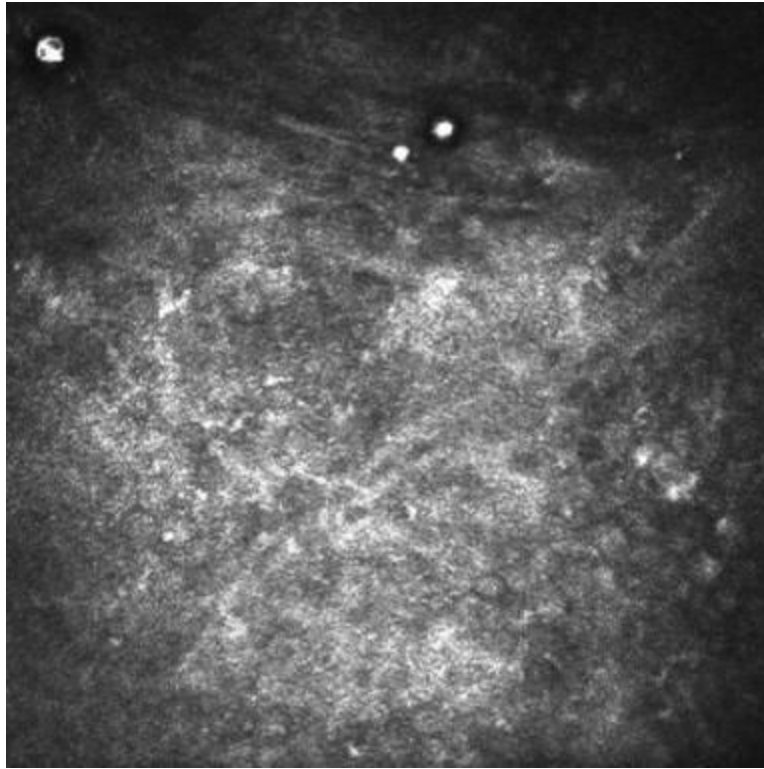
La microscopie confocale *in vivo* constitue une aide au diagnostic. Il s'agit d'un procédé non contact et atraumatique. La microscopie confocale *in vivo* (IVCM) est une technique d'imagerie de haute résolution utilisée depuis deux décennies. Le premier cas de KA diagnostiqué par microscopie confocale a été rapporté en 1992 [92]. L'IVCM permet d'examiner les structures cornéennes au niveau cellulaire de manière non invasive, répétable et en temps réel. Les caractéristiques en microscopie

confocale des KA sont des images rondes ou ovales hyperréfléctives de 15 à 30  $\mu\text{m}$  de diamètre, parfois à double paroi visibles dans l'épithélium ou dans le stroma de la cornée correspondant aux kystes (figures 18, 19 et 20) [93-95]. Cependant, l'aspect en double paroi n'est pas toujours présent en fonction de la réflectivité des tissus avoisinants et du plan de la coupe, ce qui rend l'identification de kystes parmi les résidus cellulaires et les cellules inflammatoires difficile voire impossible [94]. L'IVCM peut également distinguer les trophozoïtes, qui du fait de formes moins caractéristiques sont plus difficiles à discerner des autres éléments cornéens. L'aspect faisant évoquer des pseudopodes constituerait une aide pour les différencier. La microscopie confocale retrouve parfois un aspect de nerfs élargis évocateurs de périnévrites [94, 96].



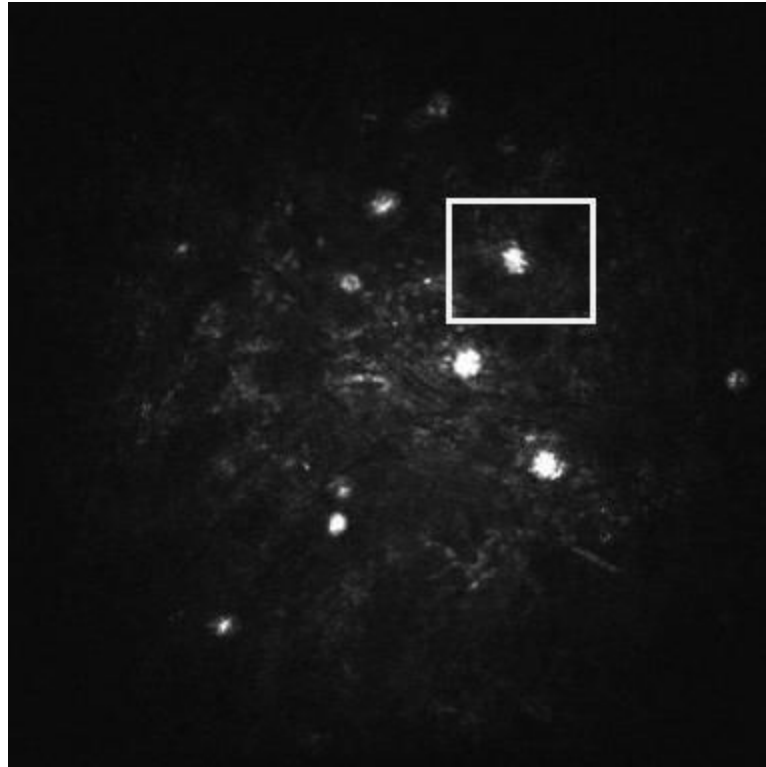
**Figure 18. Aspect en microscopie confocale de la KA (1).** CHU Rouen

Aspect de structures hyperréfléctives à double paroi représentant probablement les kystes d'*Acanthamoeba*. Microscope confocal HRT-2, Heidelberg Engineering, Heidelberg, Allemagne (400  $\mu\text{m}$  x 400  $\mu\text{m}$ ).



**Figure 19. Aspect en microscopie confocale de la KA (2).**  
CHU Rouen

Aspect de structures hyperréfléctives en cible visible dans l'épithélium cornéen. Microscope confocal HRT-2, Heidelberg Engineering, Heidelberg, Allemagne (400  $\mu\text{m}$  x 400  $\mu\text{m}$ ).



**Figure 20. Aspect en microscopie confocale de la KA (3).** CHU Rouen Aspect compatible avec des trophozoïtes. L'aspect évoque des pseudopodes. Microscope confocal HRT-2, Heidelberg Engineering, Heidelberg, Allemagne (400  $\mu\text{m}$  x 400  $\mu\text{m}$ ).

La microscopie confocale, malgré les hautes valeurs de sensibilité (de 55,8% à 100%) et de spécificité (de 77,3% à 100%) rapportées dans la littérature pour le diagnostic KA en prenant pour référence soit l'examen direct ou la culture à partir de prélèvement cornéen [95, 97-100], est largement opérateur dépendante. Ainsi, l'IVCM pour le diagnostic de KA présente des limites. Récemment, la sensibilité et la spécificité de l'IVCM ont été définies en prenant comme référence les KA diagnostiquées par PCR. Plusieurs aspects de microscopie confocale ont été évalués dans un groupe de KA PCR *Acanthamoeba* + et un groupe de kératites infectieuses PCR *Acanthamoeba* -. Les aspects microscopiques les plus spécifiques ont été ceux avec la plus faible sensibilité. Ainsi 2 signes en microscopie confocale apparaissent comme pathognomoniques, il s'agit de « l'image en cible » visible dans l'épithélium

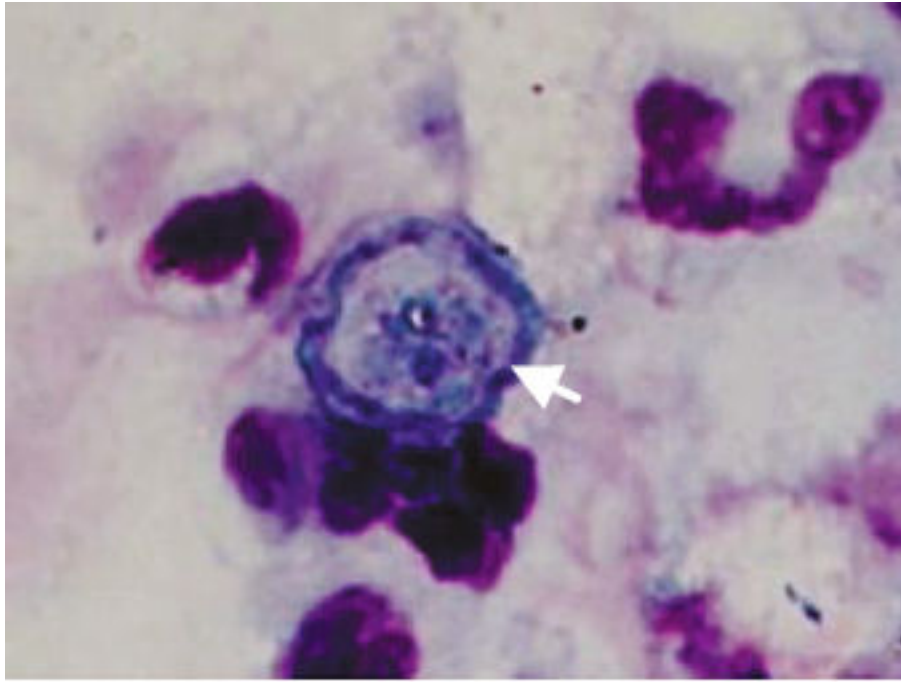
(<30 µm) et l'aspect de pseudo-trophozoïtes spiculés (>30 µm), mais d'une sensibilité de 8,7% et de 10,9% respectivement. De manière plus surprenante, les aspects de kystes à double paroi et de kystes vides ne ressortent pas statistiquement comme évocateurs de KA même si ces aspects sont plus souvent observés en cas de KA [101].

L'IVCM reste cependant une aide au diagnostic, mais ne doit pas conduire à un diagnostic erroné de KA ou à un faux sentiment de sécurité quand il n'y a pas d'éléments caractéristiques de KA. L'IVCM est probablement insuffisante pour établir un diagnostic de certitude de KA en cas de négativité des examens tissulaires (culture, histologie, PCR) [63, 101].

## 2.5.2 Diagnostic microbiologique

### *2.5.2.1 Examen direct et culture*

Le diagnostic de certitude est inestimable du fait de l'agressivité et de la longueur du traitement qui doit être mis en route. Cependant, il est difficile car la preuve parasitologique de l'infection est difficile à apporter. Un diagnostic définitif de KA peut seulement être fait sur la base de la culture ou de l'histologie, ou par l'identification de la présence d'ARN amibien par PCR à partir d'un grattage de la cornée. L'examen direct du produit de grattage de la surface de la cornée peut permettre d'identifier *Acanthamoeba* après coloration May-Grünwald Giemsa après une lecture par microscopie optique à la recherche de kystes ou de trophozoïtes (figure 21). Cette technique nécessite une équipe de biologistes entraînés.



**Figure 21. Kyste d'*Acanthamoeba* visible à l'examen direct d'un grattage cornéen.** Aspect de double paroi après coloration de Giemsa x1000, d'après [24].

La culture des produits de grattage cornéen nécessite des milieux spécifiques, soit gélose non nutritive ou milieux liquides enrichis avec une suspension d'*Escherichia coli*. La lecture se fait au microscope inversé à la recherche de kystes ou de trophozoïtes, mais la culture demande le plus souvent de une à plusieurs semaines. Le taux de rendement de ces cultures est variable entre 30 à 64% [77, 102]. Elles peuvent ainsi revenir faussement négatives.

#### 2.5.2.2 PCR

Les méthodes de culture sont longues et un peu fastidieuses. L'amplification génomique par PCR d'*Acanthamoeba* augmente la sensibilité des prélèvements et la rapidité du diagnostic positif, mais n'est disponible que dans certains centres [103].



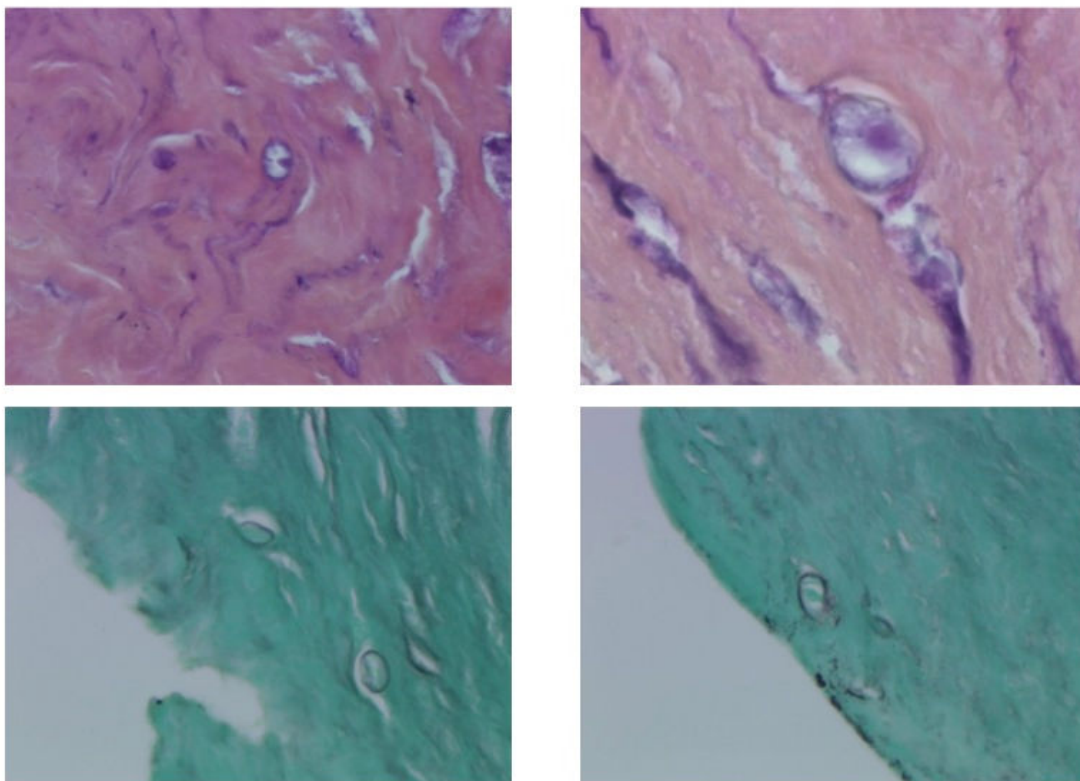
Il n'existe pas de kit commercial disponible. La PCR est réalisée sur le produit de grattage cornéen recueilli sur une lame de bistouri stérile après rinçage pour limiter les inhibiteurs comme la fluorescéine ou les collyres anesthésiants [104]. Elle implique l'amplification d'un fragment du gène de l'ARN ribosomal 18S [32]. Plusieurs études rapportent l'utilisation de la PCR en temps réel pour diagnostiquer la KA ; elle permet une quantification du matériel génétique sur le site de l'infection, pour un diagnostic précis et éventuellement suivre l'évolution sous traitement [105-108]. La spécificité de cette technique est de 100%. Khainar *et al* ont comparé l'analyse par PCR en temps réel ou non à l'examen direct et à la culture. La PCR en temps réel possède la meilleur sensibilité, estimée à 89,3% [109]. La PCR peut produire des résultats « faux-négatifs » dans les cas de grattages cornéens trop superficiels ou en cas de présence d'inhibiteurs comme la fluorescéine ou les anesthésiques locaux.

*Acanthamoeba* doit aussi être recherchée au niveau des lentilles et/ou du boîtier sans être pour autant synonyme d'infection cornéenne puisque les boîtiers des porteurs de lentilles de patients asymptomatiques peuvent être contaminés par des amibes libres [110].

### 2.5.2.3 Biopsie cornéenne et histologie

Le diagnostic microbiologique peut être pris à défaut et la biopsie cornéenne est parfois nécessaire. Il est conseillé d'effectuer une fenêtrage thérapeutique avant d'effectuer le prélèvement [111]. Il s'agit d'une méthode invasive, mais qui peut s'avérer nécessaire dans les cas où l'abcès s'aggrave malgré un traitement probabiliste large et où les cultures sont restées négatives à plusieurs reprises [112].

La profondeur et la taille du prélèvement expliquent probablement le succès de ce type de prélèvement, alors que les autres moyens d'identification ont échoué. De plus, la biopsie cornéenne retire une zone de cornée vouée dans le meilleur des cas à une cicatrisation opaque néovascularisée. L'analyse histologique peut également être réalisée sur le bouton cornéen prélevé lors d'une kératoplastie. Différentes colorations sont utiles dont Hématoxyline Eosine Safran (HES), May-Grünwald Giemsa, Periodic Acid Schiff ou Gomori-Grocott qui révèlent les kystes au sein du stroma (figure 22).



**Figure 22. Diagnostic histologique de la KA.** Kystes amibiens isolés sur biopsie de cornée par coloration HES (haut) et par coloration de Gomori-Grocott (bas). CHU Rouen

## 2.6 Traitement médical

### 2.6.1 Les molécules disponibles

Le traitement est institué après les prélèvements microbiologiques en cas de suspicion clinique, en fonction de l'examen clinique, de l'histoire de la maladie et des données de la microscopie confocale, sans attendre la confirmation microbiologique ou histologique. Le but du traitement médical de la KA est l'éradication des kystes et des trophozoïtes viables et la résolution rapide de la réponse inflammatoire induite. Les kystes d'*Acanthamoeba* spp. responsables de la chronicisation de l'infection cornéenne sont résistants à de nombreux agents disponibles, ce qui explique la difficulté du traitement de cette affection.

Par ailleurs, la prise en charge thérapeutique et le choix des molécules doivent prendre en compte les spécificités de la pénétration des médicaments au sein de la cornée. En effet, elle est modulée par de nombreux paramètres spécifiques, comme la solubilité et la taille de la molécule. Ainsi la cornée est l'une des 2 principales barrières anatomiques qui limitent la diffusion des médicaments dans l'œil. La barrière cornéenne présente 3 composantes successives de polarités différentes. L'épithélium et l'endothélium sont lipophiles accessibles à des formes non-ionisées. A l'inverse le stroma est hydrophile caractérisé par une affinité pour les formes ionisées [113].

Il n'y a actuellement pas d'anti-amibien qui possède une autorisation de mise sur le marché pour la prise en charge des KA en Europe ou aux Etats-Unis et les informations obtenues sur la sécurité et l'efficacité le sont à partir de séries de cas publiées. Le propamide iséthionate (Brolène®), non disponible en France, possède cependant l'autorisation de mise sur le marché dans l'indication « kératite amibienne » en Australie [114].

La sensibilité d'*Acanthamoeba* à différents agents anti-amibiens peut être déterminée *in vitro* à la fois pour les trophozoïtes et pour les kystes, avec cependant une relative variabilité selon les études. Le tableau 3 résume l'efficacité des anti-amibiens classiquement utilisés [115].

**Tableau 3. Efficacité des différents traitements anti-amibiens *in vitro*.** D'après Bourcier *et al* [116].

Agent/activité <i>in vitro</i>	Activité antitrophozoïte	Activité kysticide
<b>Biguanides</b>		
PHMB (polyhexaméthylène biguanide)	+++	+++
Chlorhexidine	+++	+++
Picloxydine (vitabact®)	+++	++
<b>Diamidines aromatiques</b>		
Propamidine (Brolène®)	+++	++
Hexamidine (Désoméline®)	+++	++
<b>Aminoglycosides</b>		
Néomycine	++	-
Paromomycine	+++	-
<b>Antifongiques</b>		
Miconazole	+	+/-
Kétoconazole	+	+/-
Fluconazole	+	-+/-
Clotrimazole	+	+/-
Itraconazole	+	+/-

Les diamidines (Hexamidine di-isétionate et Propamidine iséthionate) et les biguanides (PHMB et Chlorhexidine) sont les molécules qui possèdent la meilleure activité *in vitro* contre les kystes [115, 117-119] et correspondent actuellement au traitement de référence proposé [63]. Le PHMB 0,02% seul ou en association a été testé sur des modèles animaux murins avec une certaine efficacité [120-122].

## 2.6.2 Les antiseptiques

### 2.6.2.1 *Les biguanides*

La chlorhexidine (CLX) et le polyhexaméthylène biguanide (PHMB) sont des biguanides cationiques à large spectre d'activité antimicrobienne, généralement utilisées comme désinfectants, antiseptiques ou conservateurs. Ils sont utilisés à différentes concentrations comme conservateurs pour certains collyres ou dans certaines solutions d'entretien de lentilles de contact [123]. Il n'existe pas de préparation de collyre commercialement disponible pour ces 2 produits, qui doivent être préparés par les pharmacies hospitalières.

Le PHMB est un polymère linéaire constitué de plusieurs groupes de biguanides cationiques reliés par des chaînes hexaméthylène. Ce composé est synthétisé sous la forme d'un mélange de polymères avec des masses molaires très variables allant de 500 à 6000 g/mol [124]. Le PHMB est disponible dans le commerce en solutions aqueuses concentrées (20%) comme désinfectant pour piscines et ou comme conservateurs de produits cosmétiques. La longueur moyenne des chaînes de polymère est considérée comme  $n=12$ , correspondant à une masse molaire moyenne de 2400

g/mol. La différence d'efficacité en fonction de la masse molaire reste discutée [123]. Les concentrations kysticides du PHMB sont très variables et ont été mesurées de < 1 mg/L à 256 mg/L [123]. L'activité kysticide *in vitro* du PHMB est temps et concentration dépendante [125].

La structure chimique de la chlorhexidine consiste en une chaîne hexaméthylène hydrophobe reliant deux groupes cationiques de chlorophénylbiguanide. Sa masse molaire est de 505 g/mol. Les concentrations kysticides très variables de CLX ont été mesurées de < 1 mg/L à 256 mg/L [123]. L'activité kysticide est également temps et concentration dépendante [125].

*In vitro*, les résultats sont discordants pour savoir qui du PHMB ou de la CLX est le plus efficace sur les trophozoïtes et les kystes d'*Acanthamoeba* [126-130]. Ces variations pourraient s'expliquer par la longueur des chaînes de polymères utilisés, le temps d'exposition, les souches utilisées et les méthodes de mesure.

Les biguanides interagissent avec la membrane cytoplasmique, entraînant une perte de composants cellulaires et une inhibition des enzymes de la chaîne respiratoire [131]. Cliniquement, la toxicité épithéliale de la cornée est minime pour la chlorhexidine à 0,02% et le PHMB à 0,02%. Cependant, la chlorhexidine à 0,05% présente une toxicité cornéenne chez le lapin, tandis que le PHMB a été montré être non toxique *in vitro* sur l'épithélium des mammifères à une concentration de 20% [132].

D'autres biguanides tels que l'alexidine et le myristamidopropyl diméthylamine ont également montré avoir une efficacité anti-*Acanthamoeba* utile *in vitro* et pourraient mériter des études plus approfondies ; ils n'ont cependant pas encore été testés cliniquement [64, 133].

### 2.6.2.2 Les diamidines

Les diamidines aromatiques sont constituées de deux cycles benzéniques liés par une chaîne alkyle de longueur variable. La propamidine et l'hexamidine possèdent respectivement une chaîne de 3 et 6 carbones, correspondant à des masses molaires de 312 g/mol et 354 g/mol. Les diamidines sont disponibles sous forme de préparations commerciales c'est à dire la propamidine 0,1% (Brolène®, Patheon, Swindon, Royaume-Uni) ou de l'hexamidine 0,1% (Désomedine®, Laboratoire Chauvin, Bausch and Lomb, Montpellier, France). Les diamidines sont utilisées dans la KA depuis son utilisation avec succès en association avec un collyre à la néomycine en 1985 [134]. Par la suite, Brasseur *et al* ont rapporté que l'hexamidine possédait également une activité anti-*Acanthamoeba* et avait été utile pour la prise en charge de 2 patients infectés en 1994 [135]. Les concentrations kysticides sont également très variables pour les diamidines [123]. Ainsi, Perrine *et al* ont étudié l'effet anti-*Acanthamoeba* de plusieurs diamidines contre *A. polyphaga* mesurant la durée de survie des kystes et des trophozoïtes. Une augmentation de l'effet amoebicide sur les trophozoïtes et les kystes est notée pour l'hexamidine par rapport à la propamidine, et plus encore quand la chaîne alkyl était augmentée en longueur, allant de pair avec l'augmentation du caractère amphiphile de la molécule [136].

### 2.6.2.3 Etudes cliniques

La seule étude contrôlée randomisée s'intéressant à la prise en charge des KA a comparé les monothérapies PHMB 0,02% et CLX 0,02% chez 56 patients. Ce travail a suggéré que les deux biguanides seraient tout aussi efficaces l'un que l'autre en monothérapie [137]. Dans la littérature, au cours des études cliniques, la chlorhexidine

0,02% [138, 139] ou le PHMB 0,02% [131, 140, 141] sont désormais habituellement associés avec la propamidine 0,1% ou également l'hexamidine 0,1%.

Les effets antiseptiques des diamidines résultent de leurs propriétés tensioactives cationiques induisant un changement de structure de la membrane cellulaire affectant sa perméabilité. Des isolats cliniquement résistants ont été rapportés pour la propamidine et l'hexamidine [119, 133], ce qui fait qu'elles sont déconseillées en monothérapie.

Cliniquement, les diamidines sont bien tolérées par les tissus oculaires, bien qu'un traitement prolongé de propamidine puissent entraîner une toxicité épithéliale [77].

### 2.6.3 Les antifongiques

#### *2.6.3.1 Les antifongiques imidazolés et triazolés*

Elder *et al* [115] ont étudié la concentration minimale inhibitrice amoebicide et la concentration inhibitrice kysticide du kétoconazole, du fluconazole, du miconazole et du clotrimazole. Ils ont retrouvé des concentrations minimales inhibitrices amoebicides de 144 et 320 µg/mL pour le kétoconazole et le fluconazole et des concentrations inhibitrices kysticides au delà de 500 µg/mL pour les quatre composés. Ces niveaux sont beaucoup plus élevés que ceux de Ficker *et al*, qui ont enregistré des concentrations minimales inhibitrices amoebicides entre 7 et 19 µg/mL et des concentrations inhibitrices kysticides entre 7,5 et 75 µg/mL pour le clotrimazole [142]. Concernant le kétoconazole par voie orale, une concentration cornéenne de 1,4 µg/g soit µg/mL est obtenue mais cela reste néanmoins insuffisant. L'itraconazole,



antifongique triazolé à large spectre, a été utilisé avec succès chez trois patients avec KA [143].

Le voriconazole (VRZ) est un antifongique triazolé à large spectre de seconde génération (masse molaire, 349 g/mol) efficace contre les levures et les filamenteux. Son activité antifongique repose sur l'inhibition de la synthèse de l'ergostérol, affectant ainsi la membrane cellulaire [144]. L'ergostérol est un constituant important de la membrane cellulaire des kystes et des trophozoïtes d'*Acanthamoeba*. Une étude a montré que le voriconazole induit la mort cellulaire programmée chez *A. castellanii* [145]. De manière empirique, le voriconazole est utilisé chez l'homme. Trois patients ont été traités avec succès après son utilisation en collyre et par voie intrastromale en association avec des biguanides et des diamidines en 2009 [146]. Son utilisation par voie systémique a également été rapportée en 2010 avec succès (3 yeux) [76]. *In vitro*, les résultats sur son potentiel effet kysticide sont contradictoires. L'évaluation de la MIC<sub>90</sub> du voriconazole contre les trophozoïtes d'*Acanthamoeba* est rapportée dans la littérature comprise entre 1 à 52,85 mg/L [147, 148]. Alors que les kystes sont décrits comme résistants au VRZ [149], certaines études discordantes, notent une activité kysticide à des concentrations comprises entre 5 à 15 mg /L ou à des concentrations plus élevées pour les souches de référence et les isolats cliniques [150, 151]. Les différences entre les souches d'*Acanthamoeba* et les méthodologies peuvent expliquer en partie ces variations. En cas d'utilisation par voie systémique, une surveillance des effets secondaires fréquents notamment hépatiques ou neurologiques est nécessaire.

Une activité kysticide a été rapportée pour le posaconazole qui est un autre antifongique triazolé. *In vitro*, sa concentration minimale kysticide a été évaluée à 43,75 µg/mL pour les isolats cliniques et 52,5 µg/mL pour les souches de références [151].

### 2.6.3.2 Caspofungine

La caspofungine est un médicament antifongique de la classe des échinocandines. La caspofungine inhibe les  $\beta$ -1,3-glucan-synthases, constituant essentiel de la paroi cellulaire de nombreux champignons filamenteux et levures, par un mécanisme compétitif et altère la synthèse des polysaccharides, entravant la croissance cellulaire et déclenchant la lyse de la cellule microbienne. L'effet de la caspofungine sur les trophozoïtes d'*Acanthamoeba* est concentration dépendante et a été étudié dans une seule étude. L'inhibition totale de la croissance des trophozoïtes nécessite des concentrations élevées, de 250 et 500 mg /L, testée sur *A. castellanii*, *A. culbertsoni* et *A. polyphaga*. L'éradication complète des kystes a été mesurée pour *A. castellanii* et *A. polyphaga* avec une concentration de 500 mg/L [152]. Ces concentrations cornéennes semblent cependant difficiles à obtenir en pratique clinique.

### 2.6.4 Miltefosine

La miltéfosine est un alkyl-lysophospholipide. Elle était disponible commercialement pour le traitement local des métastases cutanées du sein jusqu'en 2013 en France (Miltex®) et est toujours disponible comme médicament anti-parasitaire pour traiter la leishmaniose (Impavido®) en gélules. Le mode d'action implique l'inhibition de plusieurs enzymes sur la membrane plasmique, l'altération du métabolisme intracellulaire des phospholipides et la limitation du potentiel membranaire mitochondrial [123]. Elle serait efficace *in vitro* sur les trophozoïtes entre 40 et 80  $\mu$ M de souches de référence mais également partiellement sur les kystes de 3 souches cliniques (160  $\mu$ M) [153]. Ces niveaux seraient à comparer aux

concentrations obtenues dans la cornée. Cette sensibilité semble être cependant variable d'une souche à l'autre et devrait être testée avant un éventuel traitement [148, 154]. La miltéfosine a été testée en monothérapie puis en association avec du PHMB sur des kératites expérimentales chez le hamster et le rat avec des résultats encourageants [120, 122, 155]. La miltéfosine n'a pas, toutefois, été testée chez l'homme dans cette indication. Cette molécule est abortive et tératogène par voie systémique.

#### 2.6.5 Néomycine

La néomycine a été largement utilisée en association, soit en trithérapie [156, 157] ou soit en bithérapie [158]. Cependant, les kystes sont de manière systématique résistants *in vitro* [115]. Par ailleurs, la néomycine est responsable d'une toxicité épithéliale responsable d'ulcère chronique [64].

#### 2.6.6 Métronidazole

Le métronidazole en collyre 0,4% a été testé en association dans une étude rétrospective chez l'homme en association [78], mais ne semble pas avoir d'effet *in vitro* [159].

#### 2.6.7 Autres molécules

De plus, d'autres molécules ont été testées *in vitro* pour leur éventuelle action anti-*Acanthamoeba* : notamment, la povidone iodée, le chlorure de benzalkonium et

la natamycine ont démontré une activité anti-trophozoïtes mais aussi kysticide [149, 160-162]. Leur toxicité mais surtout leur biodisponibilité au sein du stroma cornéen sont à prendre en compte et à mettre en balance par rapport aux molécules plus classiquement utilisées.

#### 2.6.8 Les protocoles médicaux thérapeutiques

Les protocoles de traitements utilisés sont empiriques et reposent à la fois sur des données de laboratoire et des données cliniques provenant, le plus souvent, de séries de cas. Le traitement commence habituellement par un biguanide (PHMB 0,02% ou chlorhexidine 0,02%) et une diamidine (propamidine 0,1% ou hexamidine 0,1%), bien qu'il n'y ait pas pour le moment d'élément prouvant la supériorité d'une association par rapport à une monothérapie par biguanides cliniquement.

Le plus souvent le PHMB 0,02% et l'hexamidine 0,1% sont administrés toutes les heures, jour et nuit, pendant 48 heures initialement, puis toutes les heures pendant la journée durant 72 heures supplémentaires. La toxicité épithéliale est habituelle à cette posologie ce qui oblige à réduire le traitement progressivement jusqu'à 4 fois par jour pendant plusieurs semaines ou mois [63]. Il n'existe pas de consensus sur la durée du traitement. Cependant celui-ci est prolongé dans les atteintes stromales. Dans une étude multicentrique au Royaume-Uni regroupant 218 patients, la durée moyenne du traitement médical était de 6 mois (0,5 à 29 mois) [62]. En fonction des centres un antifongique triazolé, le plus souvent par voie générale est ajouté [116].

## 2.6.9 Corticothérapie et les traitements immunosuppresseurs

### 2.6.9.1 *Corticothérapie locale*

Le bénéfice d'une corticothérapie locale est difficile à préciser dans la KA et son utilisation reste controversée. Les données de la littérature à ce sujet sont peu nombreuses et présentent des facteurs confondants car il est vrai que la corticothérapie est plus facilement utilisée dans les formes sévères et ainsi la corticothérapie peut sembler associée à un pronostic plus sombre sans en être réellement la cause, car non retrouvé en analyse multivariée [91]. En effet, les corticoïdes topiques pourraient améliorer la qualité de vie des patients en soulageant la douleur et améliorer la vision à court et à long terme [163]. Cependant, *in vitro* et sur des modèles animaux, des études ont montré que les corticoïdes pouvaient potentialiser la KA. *In vitro*, la dexaméthasone favoriserait le désenkystement et la prolifération des trophozoïtes. De plus, les trophozoïtes ou les kystes traités avec de la dexaméthasone induiraient un effet cytopathogène sur les cellules épithéliales cornéennes plus important par rapport à ceux non traités. Enfin, une injection intramusculaire de dexaméthasone chez un modèle de KA chez le hamster chinois augmenterait l'incidence, la gravité et la chronicité de la kératite [164]. Cliniquement 2 publications en 1991 déconseillent l'utilisation des collyres corticoïdes dans la KA en raison de la proportion d'échec du traitement [165, 166]. Depuis, 2 études ont comparé le devenir des patients ayant reçu une corticothérapie locale après le début du traitement anti amibien [91, 163]. Elles sont toutes les 2 rassurantes en objectivant une non aggravation des patients traités. Cependant, la nécessité et l'innocuité de la corticothérapie locale dans les KA restent débattues. Si elle est utilisée, il est préférable de la commencer après au moins 15 jours de

traitement anti-*Acanthamoeba* et de poursuivre celui-ci pendant au moins 1 mois après son arrêt [63].

#### 2.6.9.2 *Les anti-inflammatoires et immunosuppresseurs par voie systémique*

La présence d'une sclérite, correspondant à une infection ou à une inflammation de la sclère est une complication possible de la KA dans environ 10% des cas, mais dont la fréquence est probablement sous estimée [167, 168]. La physiopathogénie est mal comprise mais chez l'homme, il n'y a pas de preuve dans la plupart des cas, que l'inflammation soit accompagnée d'une invasion de la sclère ou du segment postérieur par *Acanthamoeba*. En effet, peu de cas d'invasion extra-cornéenne d'*Acanthamoeba* ont été décrits à ce jour [81]. L'approche thérapeutique des sclérites ou des douleurs intenses associées n'est pas codifiée mais repose pour certains sur un algorithme thérapeutique. Initialement, les anti-inflammatoires non stéroïdiens sont proposés; puis en cas de formes réfractaires, les corticoïdes par voie systémique et certains immunosuppresseurs pourraient être utilisés (mycophénolate mofetil, azathioprine, ciclosporine). Dans ce type de protocole est associé systématiquement un traitement anti-fongique (itraconazole 100 mg ou voriconazole 200 mg, 2 fois par jour) pour leur action au moins anti-trophozoïtes et dans l'idée de limiter l'éventuelle progression d'*Acanthamoeba* en extra-cornéen possiblement favorisée par l'immunodépression induite [81]. A noter également que la sclérite associée à la KA nécessite parfois une énucléation du fait des douleurs insupportables induites [63].

## **2.7 Traitement chirurgical**

### **2.7.1 Débridement épithélial**

Le débridement épithélial extensif de la zone affectée de l'épithélium cornéen peut être en partie thérapeutique si il est réalisé tôt, lorsque la maladie est encore intra-épithéliale [169]. Il est généralement fait dans le cadre des prélèvements à visée étiologique pour les cultures et PCR. Il est pratiqué par certains pour améliorer la pénétration des collyres anti-amibiens [78].

### **2.7.2 Cryothérapie**

*In vitro*, il a été montré que la cryothérapie tue les trophozoïtes mais pas les kystes, sauf si elle est combinée avec un traitement médical [170]. La cryothérapie a été rarement utilisée comme une mesure d'appoint au traitement médical et chirurgical, en cas de kératite réfractaire sévère [171]. Les risques des effets secondaires sévères de la cryo-application de la cornée doivent être pondérés par rapport à la possibilité de récurrence après kératoplastie et de propagation à la sclère ou de la survenue d'une fonte ou d'une perforation cornéenne.

### **2.7.3 Cross-linking du collagène**

Le cross-linking du collagène a été récemment proposé dans la prise en charge de certaines kératites infectieuses. Cette technique permet de créer des ponts entre les fibrilles de collagène du stroma cornéen, photosensibilisées par la riboflavine pendant 30 minutes, à l'aide d'une irradiation par les UV-A. Son utilisation princeps en

ophtalmologie est le kératocône pour rigidifier la cornée et limiter sa protrusion. Son action dans les kératites infectieuses serait à la fois anti-microbienne, par libération des radicaux libre oxygénés lors de la réaction du cross-linking qui endommagerait les parois des agents pathogènes, à la fois liée au renforcement de la résistance biomécanique du stroma cornéen en augmentant sa résistance aux différentes protéases et limitant la survenue de fonte stromale et à la fois anti-inflammatoire et anti-nociceptive par inhibition de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. Cependant, l'augmentation de la résistance du stroma pourrait limiter la pénétration des agents anti-infectieux, des troubles trophiques secondaires avec retard de cicatrisation pourraient survenir par atteinte des nerfs cornéens et limitation de la production de certaines cytokines, et l'aggravation de l'état inflammatoire local serait possible en libérant en masse des antigènes infectieux [172].

Concernant la KA, les données de la littérature sont discordantes. Les études précliniques ne démontrent pas d'effets anti-infectieux ni sur les kystes ni sur les trophozoïtes [173-175]. *In vitro*, sur des cultures de trophozoïtes, un enkystement a été observé sans diminution du nombre de formes végétatives [176]. Même en augmentant les doses reçues d'irradiation aux UV-A à 10 fois la dose habituelle en association avec la riboflavine, aucune augmentation de l'effet kysticide du PHMB ou de la chlorhexidine n'a été retrouvée [177]. Une étude retrouve une réduction significative de la croissance d'*A. castellani* en cas de traitement UVA/Riboflavine par rapport à la non irradiation avec cependant un protocole classique d'application différent de celui utilisé en clinique humaine [178], ainsi qu'une diminution significative des kystes traités par UVA/Riboflavine par rapport à la chlorhexidine [176]. *In vivo*, sur des modèles animaux de lapins ou de hamster chinois de kératites expérimentales de KA,



le traitement par UVA/Riboflavine ne montrait pas d'efficacité par rapport à une absence de traitement [173, 175].

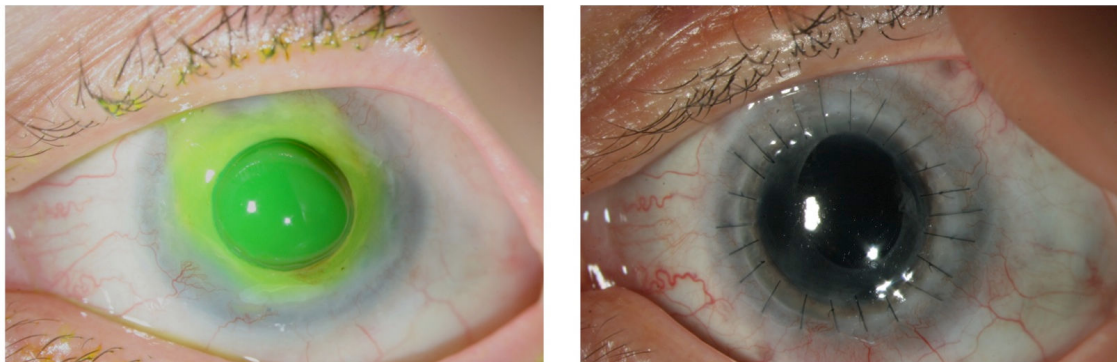
Cliniquement, certaines expériences favorables sont rapportées. Dans une méta-analyse publiée en 2016, 10 patients porteurs d'une KA sur 11 ont cicatrisé avec UVA/riboflavine en traitement adjuvant [179]. Cependant le nombre très faible de patients rapportés dans la littérature, l'absence de groupe contrôle et les résultats pour le moins non concluants des études précliniques *in vitro* ou chez l'animal contrôle doivent inciter à la prudence dans cette indication à l'heure actuelle. Enfin, l'analyse histologique des cornées retirées après kératoplastie thérapeutique pour KA réfractaire ayant bénéficié soit d'une cryothérapie cornéenne associée ou non à un traitement par UVA/ Riboflavine a été effectuée. Parmi les 9 patients étudiés, 4 cornées contenaient encore des kystes amibiens, identifiés en histologie [180].

#### 2.7.4 Photokératectomie thérapeutique

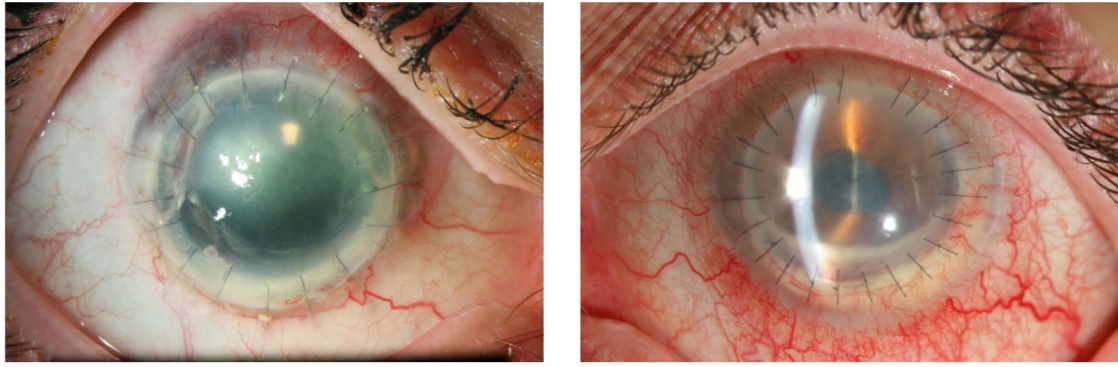
La surface de cornée infectée par *Acanthamoeba* pourrait également être « photoablatée ». La photokératectomie thérapeutique (PKT) au laser Excimer est une technique chirurgicale utilisée pour régulariser la surface cornéenne ou éliminer des opacités. Excimer est un acronyme pour Excited Dimer. Ce laser émet dans l'ultraviolet un rayon dont l'énergie, absorbée par la cornée, va permettre la photoablation, c'est à dire la vaporisation du tissu cornéen, en réalisant une sculpture précise. Il est habituellement utilisé pour la chirurgie réfractive. Quelques cas de KA traitées par PKT ont été décrits [181, 182], même si il existe un risque d'amincissement de la cornée et si il semble utile de s'interroger sur la persistance de kystes dans les zones de stroma non traitées.

### 2.7.5 Kératoplastie

L'utilisation de la greffe de cornée ou kératoplastie peut avoir, en cas de KA, 2 objectifs. La kératoplastie thérapeutique a pour but de maintenir l'intégrité anatomique du globe en cas de perforation ou peut être pratiquée dans le but de réduire la quantité d'*Acanthamoeba* présente au niveau du site infectieux alors que le traitement médical a échoué (figure 23 et 24). La kératoplastie optique a pour but la réhabilitation visuelle pour améliorer la vision chez les patients à distance de l'épisode aigu infectieux en cas de cicatrices stromales ou d'astigmatisme irrégulier (figure 25 et 26).



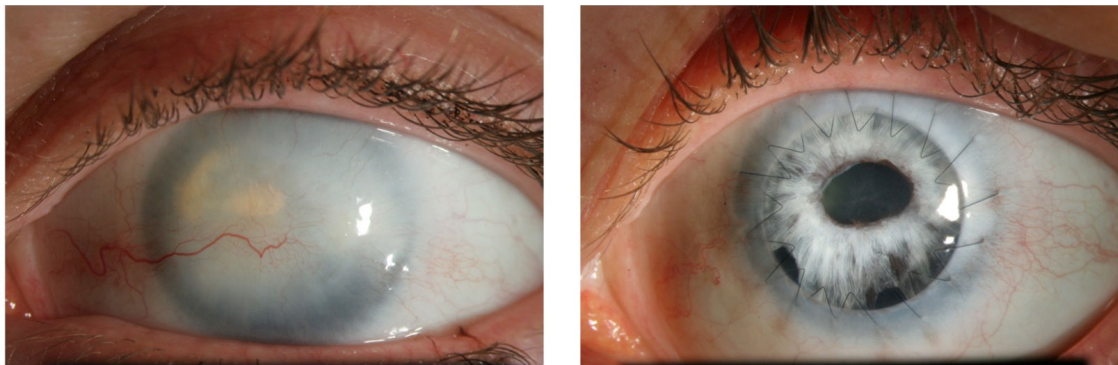
**Figure 23. Kératoplastie thérapeutique et KA. Greffe de cornée à visée tectonique pour descémétocèle étendu dans les suites d'une KA. CHU Rouen**



**Figure 24. Kératoplastie thérapeutique et KA.** (A gauche) Ulcère chronique épithélial sur greffon thérapeutique. (A droite) Récidive infectieuse au niveau du greffon thérapeutique transfixiant pour KA. CHU Rouen



**Figure 25. Kératoplastie à visée optique et KA.** Kératoplastie transfixiante à 18 mois du début de la KA. CHU Rouen



**Figure 26. Kératoplastie à visée optique et KA.** Kératoplastie transfixiante à 10 mois du début de la KA. CHU Rouen

La kératoplastie thérapeutique est largement remise en question et semble devoir être limitée au maximum, en dernier recours. En effet, les complications post-opératoires sont nombreuses à type de récurrence de l'infection sur le greffon, de glaucome, de retard de cicatrisation ou même d'endophtalmie [183]. La nécessité d'une deuxième greffe est fréquente jusqu'à 60% des cas [184]. A l'inverse, la kératoplastie lamellaire ou transfixiante à visée optique est utile dans les stratégies de réhabilitation visuelle. Ainsi, la kératoplastie optique après « guérison » de la KA semble avoir un bon pronostic visuel. En 2005, une étude sur 13 patients ayant bénéficié d'une kératoplastie à visée optique a retrouvé une acuité visuelle finale comprise entre 5/10 et 10/10 pour tous les patients, exceptés ceux présentant un glaucome secondaire agonique. Un seul patient a bénéficié d'une deuxième greffe à cause d'un échec secondaire du greffon suite à une hypertension oculaire [185]. La question qui se pose est quand considérer une KA guérie et ainsi quand pouvoir proposer une kératoplastie optique. Il semble qu'un délai de 3 mois après arrêt de tout traitement sans récurrence soit une bonne limite [185], bien que ce délai puisse être discuté au cas par cas.

Plusieurs études ont comparé le pronostic de la kératoplastie optique et thérapeutique en cas de KA. En raison des différences de pronostic visuel et de survie du greffon, toutes proposent de reculer au maximum le temps de la kératoplastie [75, 183]. La plus large comporte 50 yeux de 50 patients en 2015 [186]. Dans cette étude la kératoplastie optique est pratiquée en moyenne dans un délai de 17 mois après le début de la symptomatologie. Ainsi, 2/24 patients (8%) dans le groupe kératoplastie optique et 23/26 patients (89%) dans le groupe kératoplastie thérapeutique présentaient une acuité visuelle finale  $<1/10$ , soit un risque 13 fois supérieur après ajustement des facteurs confondants. Il est cependant à noter que la plupart des kératoplasties

thérapeutiques avaient été pratiquées en cas de perforation cornéenne et représentaient donc des patients avec une atteinte probablement plus sévère.

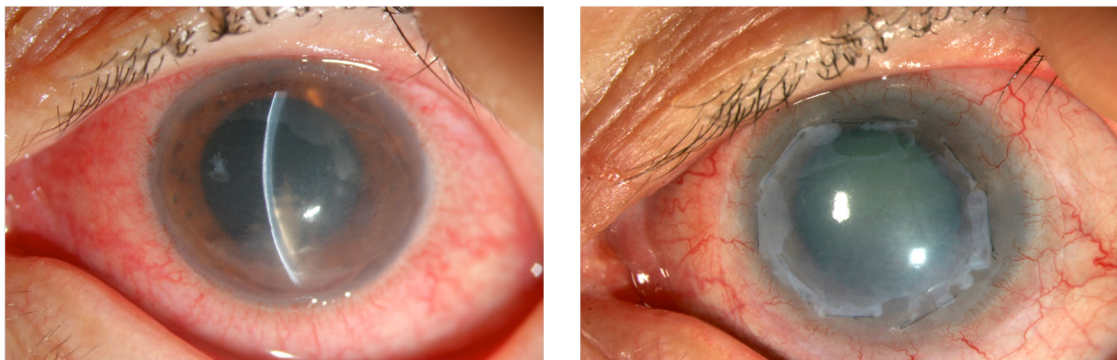
Plus récemment, certaines publications ont proposé une kératoplastie lamellaire profonde ou antérieure en laissant donc la partie plus postérieure de la cornée avec des résultats étonnamment bons sur un nombre restreint de patients [187-190], en comparaison avec la littérature discutée précédemment du pronostic des kératoplasties transfixiantes thérapeutiques. Le délai de greffe est ici très rapide ou non rapporté (10 jours-6,2 mois) et il est ainsi difficile de comparer par rapport à l'évolution de la maladie si le traitement médical seul avait été maintenu seul [191]. Même si il est vrai que la kératoplastie lamellaire limite le risque de rejet, le risque est de laisser des éléments infectieux dans le stroma résiduel avec un risque de récurrence. La kératoplastie lamellaire expose également les patients au risque de rupture de la membrane de Descemet en per-opératoire les exposant ainsi au pronostic de la kératoplastie transfixiante thérapeutique dans ce contexte. Cela semble donc difficile de proposer ce traitement rapidement dans la prise en charge de la KA, comme cela peut être évoqué [187].

## **2.8 Ulcères cornéens persistants**

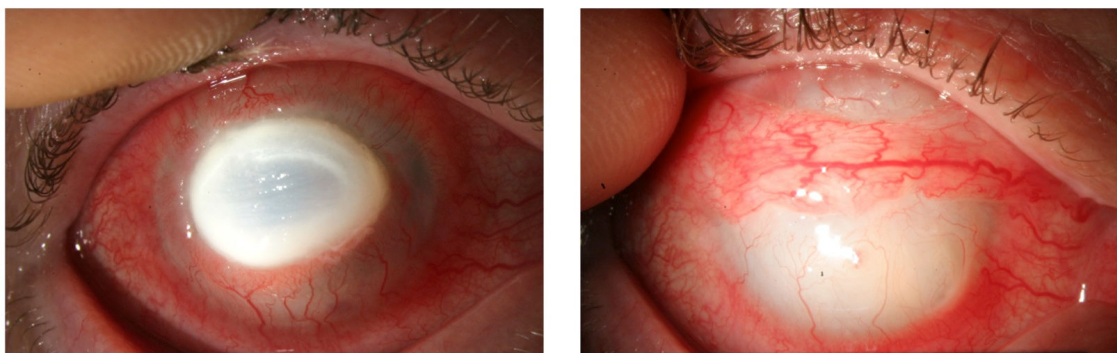
Il s'agit d'une situation fréquente après une KA. Le traitement consiste dans un premier temps, autant que possible, à exclure une surinfection bactérienne, fongique ou herpétique, mais aussi une infection persistante à *Acanthamoeba* avec des cultures répétées. La microscopie confocale et la PCR ne font en effet pas la différence entre les micro-organismes viables ou non. Il faut ensuite essayer de réduire la toxicité du traitement en interrompant tous les traitements locaux potentiellement toxiques en

collyre, pendant plusieurs jours. Le traitement de l'inflammation locale peut contribuer à promouvoir la cicatrisation.

En cas de non cicatrisation, certaines alternatives sont possibles. Les recouvrements conjonctivaux partiels et les greffes de membrane amniotique peuvent restaurer l'intégrité de la surface oculaire et fournir un soutien métabolique et mécanique pour pouvoir obtenir une cicatrisation épithéliale cornéenne chez les patients atteints de KA (figure 26 et 27) [192].



**Figure 27. Ulcères persistants au cours de la KA.** Ulcère trophique post KA (à gauche) ayant bénéficié d'une greffe de membrane amniotique (à droite). CHU Rouen



**Figure 28. Ulcères persistants au cours de la KA.** (A gauche) Ulcère cornéen à 9 mois après le début d'une KA. Les prélèvements microbiologiques répétés sont négatifs. (A droite) Aspect de recouvrement conjonctival partiel. CHU Rouen

La membrane amniotique est la partie la plus interne du placenta, utilisée en ophtalmologie pour ses vertus anti-inflammatoires et pro-cicatrisantes. Le plus souvent, elle est utilisée dans ce cas de figure à la phase post-infectieuse sur les douleurs, l'inflammation de surface oculaire et pour promouvoir la cicatrisation épithéliale [193, 194].

## **2.9 Kératite à *Acanthamoeba* persistante**

Bien que les anti-amibiens actuels montrent de très faibles concentrations kysticides minimales, la corrélation clinico-biologique entre les sensibilités *in vitro* et l'efficacité du traitement est loin d'être satisfaisante. En effet, le début de réponse au traitement est souvent retardé (évalué à 15 jours [191]) et des cas de kératites persistantes sous traitement bien conduit et vérification de la sensibilité des souches sont décrits [115, 119]. Il est en effet étonnant que les biguanides ayant des concentrations minimales kysticides approximatives à 2 µg/mL, c'est à dire 100 fois plus faibles que la concentration des collyres utilisés (PHMB ou chlorhexidine 0,02% soit 200 µg/mL) puissent conduire à des échecs thérapeutiques. Des concentrations inhibitrices kysticides plus élevées comme 3 µg/mL pour le PHMB ou 12,5 µg/mL pour la chlorhexidine ont été néanmoins signalées, même si ces concentrations restent largement sous la concentration des collyres biguanides utilisés [119, 133].

Les raisons de cette dissociation clinico-biologique ne sont pas pour l'instant comprises. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées.

1- Il est possible qu'en réalité les concentrations locales intrastromales des biguanides n'atteignent pas les niveaux thérapeutiques. Ainsi une seule étude a mesuré la pénétration du PHMB et de la chlorhexidine au niveau cornée de manière indirecte. Leur pénétration a été évaluée *ex-vivo* sur des cornées de lapin enserrées dans des chambres de perfusion artificielles. Une solution de PHMB 0,02% ou de chlorhexidine 0,02% a été administrée deux fois par heure pendant 8 heures sur les cornées avec et sans épithélium. La quantité de médicament pénétrant dans la chambre antérieure artificielle a été ensuite mesurée. Ni le PHMB ni la chlorhexidine n'étaient détectables même après 8 heures d'instillation dans la chambre antérieure qu'il s'agisse d'une cornée avec ou sans épithélium. Ceci pourrait expliquer la longueur et certains échecs du traitement de la kératite à *Acanthamoeba*. Il faut tout de même noter que la concentration intrastromale n'a pas été réellement mesurée et que cela peut permettre de penser qu'il existe une pénétration quand même dans la cornée avec par exemple un effet barrière de l'endothélium ou bien qu'il s'agisse d'une accumulation de ces molécules, du fait d'interactions électrostatiques entre la charge cationique des biguanides et les protéoglycanes cornéennes chargées négativement empêchant ou ralentissant la pénétration à travers le stroma cornéen [195].

Cependant une étude va à l'encontre de l'hypothèse de « stockage » des biguanides au sein du stroma cornéen. Ainsi, une publication rapporte la pharmacocinétique dans la cornée de la chlorhexidine en collyre. Cette analyse a été réalisée chez le lapin, après plusieurs temps, après l'instillation de 2 gouttes de collyre à la chlorhexidine à 0,02% (200 µg/mL) à 5 minutes d'intervalle. Le pic de concentration est à 15 minutes et culmine à 1,218 µg/mL avec une décroissance rapide



et une non détection à 2 heures [196]. Elder *et al* ont montré, *in vitro*, que la concentration minimale amoebicide sur les trophozoïtes était de 0,71 µg/mL et que la concentration kysticide minimale était de 2,77 µg /mL [115]. A partir de cette étude unique de pharmacocinétique, il serait donc possible de conclure que la chlorhexidine n'est pas kysticide dans la cornée *in vivo* et qu'elle est active sur les trophozoïtes que sur une très courte période, environ 5 minutes après chaque instillation.

La pharmacocinétique dans la cornée de la propamide et de l'hexamide ne semble pas avoir été étudiée jusqu'à maintenant.

2- Ces molécules pourraient se lier aux composants tissulaires ou être inactivées *in vivo* [63].

3- *Acanthamoeba* pourrait être intrinsèquement plus résistante *in vivo* qu'*in vitro* ou des résistances acquises pourraient survenir suite à une période de traitement prolongé [63].

Par conséquent, un des leviers utilisables pour essayer d'améliorer l'efficacité du traitement serait d'essayer d'augmenter les concentrations intrastromales des biguanides qui sont possiblement infra-thérapeutiques d'après l'étude précédemment décrite. L'augmentation de la concentration des biguanides en collyre a déjà été testée en cas de KA réfractaires. Des concentrations plus élevées de PHMB en collyre (0,04% ou 0,06%) [146, 197, 198] ou de chlorhexidine (0,04%) ont été utilisées [199]. De plus, une activité kysticide plus élevée a été rapportée en utilisant une association de

biguanides. Cette association serait plus efficace que la monothérapie particulièrement en cas d'association PHMB 0,04% et chlorhexidine 0,04% [117].

L'utilisation d'autres voies d'administration pourrait également être utilisée, notamment les injections directement dans le stroma de la cornée ou intrastromales. Cette voie est par exemple utilisée relativement couramment en cas de kératites fongiques [200]. Les biguanides non jamais été injectés dans la cornée et la toxicité éventuelle serait probablement une préoccupation. Le seul cas de KA à l'heure actuelle traitée par injection intrastromale a bénéficié d'injections de voriconazole l [146].

## **2.10 Pronostic**

La KA est une maladie potentiellement cécitante. Le tableau 4 résume les données d'acuités visuelles finales de cohortes de patients de larges effectifs anglais avec une cohorte récente française. Le centre français est un centre de référence ce qui peut expliquer la proportion d'acuités visuelles basses plus importante alors que l'analyse britannique analysait l'ensemble des KA identifiées sur un territoire donné.

**Tableau 4. Pronostic de la KA dans 2 centres ophtalmologiques européens**

	Date étude	Lieu étude	Acuité visuelle finale
Dart <i>et al</i> 2009	1992-1999	Royaume-Uni 229 patients	AV $\geq$ 10/10 : 150 patients (65,5%) 5/10 < AV $\leq$ 6,6/10 : 70 patients (30,5%) 1/10 < AV $\leq$ 3,3/10 : 5 patients (2%) PL: 2 patients (<1%) Enucléation : 2 patients (<1%)
Bouheraoua <i>et al</i> 2013	2004-2008	Paris, France Hôpital des XV-XX 44 patients	5/10 < AV $\leq$ 10/10 : 24 patients (55%) 1,6/10 < AV $\leq$ 4/10 : 10 patients (23%) PL < AV $\leq$ 1/10 : 8 patients (18%) Enucléation : 2 patients (4%)
AV : Acuité visuelle PL : Perception lumineuse			

La gravité de la maladie à la présentation initiale est un facteur pronostic important. Ainsi, La KA a été subdivisée en 5 stades de présentation clinique initiale par Tu *et al* [201] en fonction du pronostic visuel final:

Stade 1 : Epithéliopathie

Stade 2 : Epithéliopathie et périnévrites

Stade 3 : Atteinte stromale antérieure

Stade 4 : Atteinte stromale postérieure

Stade 5 : Kératite annulaire

Les stades 1, 2 et 3 ont un pronostic visuel identique (entre 68,8% et 81,8% des patients ont une acuité visuelle (AV) finale d'au moins 9/10) alors que les stades 4 et 5 présentent un risque de séquelle visuelle plus marqué (AV finale < 9/10 ou nécessité d'une kératoplastie). Cette analyse a été effectuée sur 61 yeux. Thebpatiphat *et al* [157] ont confirmé l'importance de la gravité de l'atteinte initiale sur le pronostic (20 yeux). Robaei *et al* en 2014 ont montré que la présence d'une kératite annulaire multipliait par 5 le risque d'un mauvais résultat visuel [202].

Le délai entre l'apparition des symptômes et le début d'un traitement adapté est considéré également comme un facteur de risque important; au delà de 18 jours - 1 mois, le pronostic visuel se dégrade et la nécessité d'un geste chirurgical « à chaud » augmente [74, 75, 203]. A l'inverse, peu de patients évoluent défavorablement si le diagnostic est établi au cours des 3 premières semaines ce qui correspond à une atteinte épithéliale prédominante.

La PCR en temps réel pourrait également être un facteur pronostic. En effet, Le nombre de copies d'*Acanthamoeba* lors de la première visite semble être corrélé avec le stade clinique initial de KA et être un facteur de risque significatif pour un mauvais pronostic [204].

Ainsi ces 3 principaux facteurs de risque semblent intimement liés à la gravité clinique initiale en corrélation avec le retard diagnostique et le corolaire de la multiplication d'*Acanthamoeba*.

Plus récemment l'instillation de dexaméthasone en collyre pour un diagnostic erroné avant le diagnostic de KA a pu être identifiée comme un facteur de mauvais pronostic indépendant multipliant par 4 le risque d'AV ≤ 2,5/10, de perforation

cornéenne et de recours à une kératoplastie en analyse multivariée sur 174 patients [202]. Cependant, certaines études antérieures n'avaient pas réussi à identifier ce facteur probablement du fait d'effectifs de patients plus restreints [163, 201, 205]. Récemment, la recherche de facteurs de risque plus large a confirmé que la gravité initiale, le délai du diagnostic, la corticothérapie avant le traitement antimicrobien mais aussi l'âge des patients >34 ans étaient des facteurs de mauvais pronostic. Cette analyse met également en évidence le fardeau que constitue la KA pour les patients et le système hospitalier. Ainsi, pour les patients ayant de mauvais résultats fonctionnels (93 patients), 25% ont nécessité plus de 55 visites de consultation et 58 mois de suivi [91].

## **2.11 Modèles expérimentaux**

Le développement d'un modèle animal approprié est essentiel pour l'étude détaillée de la biologie moléculaire, de la pathologie et de l'immunologie de la KA et pouvoir tester *in vivo* de nouveaux agents pharmacologiques [88]. Actuellement, les modèles animaux de KA sont réalisés via des lentilles de contact contaminées ou avec des injections intrastromales d'*Acanthamoeba*. Certains modèles sont réalisés en mimant la physiopathologie de l'infection chez l'homme en abrasant les cornées et en les recouvrant d'une lentille de contact recouverte d'*Acanthamoeba*. Cependant, le taux d'infection n'est pas satisfaisant [206, 207]. Les injections intrastromales d'*Acanthamoeba* sont une méthode directe et rapide pour atteindre un fort taux d'infection, mais ne reflète pas la physiopathologie chez l'homme car la maladie débute au niveau de l'épithélium avant de gagner le stroma [120, 155, 207]. Plusieurs espèces

ont été utilisées pour induire des KA expérimentales comme, le porc, la souris, le rat, la souris, le lapin, le chat et le hamster [120, 206, 208].

### **3 PARTIE EXPERIMENTALE**

### 3.1 PROBLEMATIQUE

La kératite amibienne est associée à un handicap visuel important notamment quand le début de la prise en charge s'effectue lorsque le stroma cornéen est atteint ou kératite stromale. Les traitements disponibles ne permettent pas dans la majorité des cas une régression rapide de la symptomatologie et n'évitent pas la constitution de séquelles. Ainsi, le traitement actuel ne fait pas consensus que cela soit sur les molécules utilisées, la durée, ainsi que le recours ou non plus ou moins précocement à une intervention chirurgicale. De plus, il existe une discordance entre l'efficacité de certaines molécules *in vitro* sur *Acanthamoeba* et leur efficacité en clinique humaine conduisant à évaluer leur pénétration au niveau cornéen. En outre, cette morbidité ophtalmologique persistante incite à rechercher des alternatives thérapeutiques que ce soit en termes de composés utilisés, de concentrations ou de voies d'administrations.

Dans ce contexte, les objectifs des travaux menés au cours de cette thèse ont tenté de :

- Rechercher la concentration optimale du PHMB collyre à tester au cours d'un essai clinique dans le cadre du projet européen ODAK à l'aide d'un modèle expérimental de kératite amibienne *in vivo* chez le rat
- Démontrer l'efficacité du voriconazole sur *Acanthamoeba in vitro* et sur un modèle expérimental de kératite amibienne *in vivo* chez le rat
- Etudier la pharmacocinétique au niveau cornéen des nouveaux antifongiques triazolés, le voriconazole et le posaconazole, chez le rat



## **3.2 PUBLICATIONS**

A) Evaluation *in vivo* de l'efficacité du collyre au polyhexaméthylène biguanide chez un modèle expérimental chez le rat de kératite à *Acanthamoeba*

Article N°1:

*Soumission en cours à Investigative Ophthalmology & Visual Science*

Ce travail a été effectué dans le cadre du programme européen Orphan Drug for *Acanthamoeba* Keratitis (ODAK). Le programme ODAK est un projet européen dont le but est le développement d'un traitement de la kératite amibienne commercialisé afin de le rendre plus facilement accessible. Ce projet, toujours en cours, se concentre sur la recherche préclinique et clinique et le développement du polyhexaméthylène biguanide (PHMB).

En effet, l'efficacité clinique du PHMB 0,02% est rapportée dans la littérature, le plus souvent sur des séries de cas et la littérature est relativement pauvre. En outre, le schéma de traitement avec PHMB 0,02% utilisé jusqu'ici dans la pratique clinique est empirique et il n'existe actuellement aucun schéma thérapeutique validé. Par ailleurs, il n'existe pas de formulation commerciale du PHMB en collyre ce qui rend son accès difficile et retarde fréquemment son utilisation alors que la kératite à *Acanthamoeba* doit être traitée rapidement.

Le projet ODAK se divise en plusieurs programmes, menés à bien par différentes équipes localisées en Europe. Il englobe

- L'évaluation de l'efficacité et de l'innocuité des traitements actuels de la kératite à *Acanthamoeba* dans le cadre d'un essai clinique rétrospectif
- L'estimation du profil d'efficacité et de tolérance chez l'homme d'un collyre contenant une concentration de PHMB déterminée au cours de travaux préliminaires non cliniques (stabilité, profil de sécurité et efficacité chez l'animal)
- L'établissement du régime thérapeutique le plus efficace pour la prise en charge de la kératite à *Acanthamoeba*

Ainsi, au laboratoire de parasitologie de la faculté de Rouen (EA 7510 "Epidémiologie-surveillance et circulation des parasites dans l'environnement"), nous avons été en charge des travaux expérimentaux sur un modèle de kératite amibienne chez le rat pour définir la concentration du collyre PHMB à tester au cours de l'essai clinique prévu chez l'homme.

## Résumé détaillé

La kératite amibienne est une infection cornéenne rare. Le traitement médical est mal codifié et difficile, même si l'association de biguanides et de diamines semble améliorer le pronostic. Le polyhexaméthylène biguanide (PHMB), molécule de première attention, n'est pas actuellement commercialisé, mais disponible en préparation magistrale hospitalière. Il est actuellement utilisé en cas de KA à la concentration habituelle de 0,02%. Le projet ODAK (Orphan Drug for Acanthamoeba Keratitis) a pour objectif d'apporter la preuve de l'efficacité et de la tolérance du PHMB chez l'animal et chez l'homme pour obtenir une autorisation de mise sur le marché. Le but de cette étude intermédiaire pré-clinique est de déterminer la concentration de PHMB la plus efficace chez l'animal afin de pouvoir réduire le nombre de collyres à tester dans de futurs essais cliniques.

Soixante deux rats Sprague-Dawley ont été infectés, au niveau de l'œil gauche par une injection intrastromale de  $10^4$  *Acanthamoeba polyphaga*. Les collyres PHMB à 0,02%, 0,04%, 0,06% et 0,08% ainsi que l'association PHMB 0,02% et iséthionate de propamide 0,1% ont été testés à la posologie d'une goutte 4 fois par jour. Les rats témoins ont reçus l'excipient seul du collyre PHMB. Un examen ophtalmologique hebdomadaire associé à une injection sous conjonctivale de bétaméthasone (0,28 mg) ont été réalisés. L'infection clinique était définie par la présence d'un œdème ou d'un infiltrat stromal associés ou non à des néovaisseaux cornéens. La gravité de l'infection clinique a été classée de 0 (pas de lésion) à 3 (opacité cornéenne masquant les détails iriens). A J28, les rats ont été sacrifiés. Un grattage cornéen pour analyse bactériologique, parasitologique et en PCR en temps

réel a été réalisé pour chaque rat. Après coupe en paraffine, les cornées ont été analysées après coloration Hématoxyline- Eosine-Safran (HES) et acide périodique Schiff (PAS). Un rat avec un abcès de cornée à *Staphylococcus aureus* a été sacrifié 20 jours après l'infection et n'a pas été pris en compte.

L'infection clinique s'est aggravée entre le 14<sup>ème</sup> jour et le 28<sup>ème</sup> jour dans les groupes de rats traités par PHMB 0,02% (3/6 rats), 0,08% (4/11 rats) et l'association PHMB 0,02% et iséthionate de propamide 0,1% (7/11 rats) comme le groupe témoin (7/11 rats), alors que l'infection clinique s'est moins aggravée de manière significative par rapport au groupe témoin dans les groupes de rats traités par PHMB 0,04% (0/11 rats) ( $p < 0,05$ ), avec une tendance similaire pour le groupe de rats traités par PHMB 0,06% (2/11 rats) ( $p = 0,08$ ). Le taux d'infection identifiée en histologie, culture et/ou PCR à J28 n'était pas significativement plus faible dans les groupes PHMB 0,02%, 0,04%, 0,06% et 0,08% et l'association PHMB 0,02% et iséthionate de propamide 0,1% que dans le groupe témoin.

Une monothérapie par PHMB à une concentration égale ou supérieure à 0,04% semble être efficace cliniquement sur un modèle animal de kératite amibienne. Ainsi, le PHMB collyre à une concentration égale ou supérieure à 0,04% devrait être testé dans de futurs essais cliniques en fonction des résultats des études toxicologiques.

**Ces travaux ont permis d'identifier que l'utilisation de concentrations de PHMB collyre supérieures à 0,02% semblait pertinente. L'absence de différence en terme microbiologique peut s'expliquer en partie par l'efficacité retardée *in vivo* du PHMB dans la**

**kératite à *Acanthamoeba*, notamment dans les formes profondes stromales provoquées par le modèle expérimental utilisé par injection directe dans le stroma cornéen comme c'est le cas ici. Les échecs thérapeutiques actuels en clinique humaine pourraient être en partie liés à une concentration trop faible du PHMB. Suite à ses travaux, L'étude clinique de phase 3 du projet ODAK a débuté dans 2 centres européens. Il s'agit d'une étude randomisée, en double aveugle menée chez des sujets atteints de KA comparant l'association du collyre à 0,08% de PHMB + placebo par rapport au traitement conventionnel collyre PHMB à 0,02% de + collyre propamide à 0,1%.**

*In vivo* evaluation of polyhexamethylene biguanide ophthalmic solution efficacy in a rat  
*Acanthamoeba polyphaga* keratitis model

Running title: PHMB eye drops against *Acanthamoeba* rat keratitis

Julie GUEUDRY<sup>1,2\*</sup>, Laetitia LE GOFF<sup>1</sup>, Sabine LEFEVRE<sup>2</sup>, Antonino ASERO<sup>3</sup>, Elodie COLASSE<sup>4</sup>, Arnaud FRANCOIS<sup>1,4</sup>, Romy RAZAKANDRAINIBE<sup>1</sup>, Jean Jacques BALLET<sup>1</sup>, Marc MURAINÉ<sup>2</sup> and Loïc FAVENNEC<sup>1</sup>

<sup>1</sup> EA 7510 ESCAPE, Rouen, France " EPIDEMIOSURVEILLANCE ET CIRCULATION DES PARASITES DANS LES ENVIRONNEMENTS" - University of Rouen Normandie, France

<sup>2</sup> Department of Ophthalmology – Charles Nicolle University Hospital, Rouen, France

<sup>3</sup> SIFI SpA, Aci Sant'Antonio, Catania, Italy

<sup>4</sup> Department of Pathological Anatomy and Cytology - Charles Nicolle University Hospital, Rouen, France

Correspondence and reprint requests to:

Dr Julie Gueudry

Department of Ophthalmology

Charles Nicolle Hospital

22 Boulevard Gambetta

76031 ROUEN - FRANCE

Tel: (33) 2 32 88 80 57      Fax: (33) 2 32 88 80 46

E-mail: [julie.gueudry@chu-rouen.fr](mailto:julie.gueudry@chu-rouen.fr)

## ABSTRACT

The aim of this work was to test preclinically the efficacy of a PHMB ophthalmic solution at different concentration (0.02%, 0.04%; 0.06%, or 0.08%) as well as a combination of PHMB and propamidine isethionate (0.02% and 0.1%, respectively) in a Sprague-Dawley rat model of *Acanthamoeba* keratitis. Rats inoculated with *Acanthamoeba polyphaga* were divided into 6 groups, *i.e.* untreated control rats, rats topically treated 4 times a day from day 7 to day 21 post-infection (p.i.) with PHMB alone or with the combination of PHMB and propamidine isethionate. Keratitis lesions were weekly scored from grade 0 to grade 3. At day 28 p.i., superficial corneal epithelium scrapings from euthanized rats were cultured and PCR analysed, and eye globe histology was performed. Compared with the control group, monotherapy with 0.04% and 0.06% PHMB eye drops prevented corneal lesion worsening between day 14 and 28 p.i. ( $p < 0.05$ ). Monotherapy or combined PHMB- propamidine isethionate with 0.02% did not decrease culture, PCR and histology *Acanthamoeba* positivities compared with the control group ( $p > 0.05$ ). Data suggest that PHMB solutions at concentration over 0.04% should be considered appropriate in undertaking monotherapy clinical trials for the treatment of AK.

Keywords: *Acanthamoeba*, keratitis, PHMB



## **Introduction**

Human *Acanthamoeba* keratitis (AK), is an uncommon but severe, potentially sight-threatening condition<sup>1</sup> associated with contact lens wearing in up to 85% of cases.<sup>2</sup> Thus far, the overall clinical outcome tends to be poor, with an important proportion of patients requiring keratoplasty or enucleation. For instance, in a recent study, 33 of 100 patients developed a best-corrected visual acuity worse than 20/200 in the affected eye.<sup>3</sup> *Acanthamoeba* spp. are ubiquitous free-living protozoans that exist in two forms, *i.e.* vegetative trophozoites and dormant cysts. There is currently no drug approved for the treatment of AK in any country. Biguanides such as polyhexamethylene biguanide (PHMB) and chlorhexidine, which were reported as most efficient cysticidal agents *in vitro*,<sup>4</sup> are currently used as first-line treatment, and a randomized controlled trial comparing PHMB and chlorhexidine monotherapies in 56 eyes with AK suggested that the two agents were equally effective as monotherapies.<sup>5</sup> Most treatment regimens, however, were based only on empirical efficacy and safety data. In addition, biguanide eye drops have presently to be prepared by compounding pharmacies in the absence of ready-made medicinal product. Thus the present study was aimed at providing basis for an approved AK therapy in humans by pre-clinically testing the efficacy of a PHMB ophthalmic solution preparation against the development of AK lesions in a documented rat model.

## **Methods**

### ***Acanthamoeba***

From axenic *A. polyphaga* cultures (isolate ATCC #50495, Rockville, MD, USA) grown at 30°C in 20 cm<sup>2</sup> flasks in PYG medium, 80% trophozoite suspensions were obtained by refrigerating flasks in ice water baths.

### ***PHMB ophthalmic solution formulation***

SIFI SpA has developed stable and sterile PHMB ophthalmic formulations in phosphate buffer (pH 5-6) with sodium chloride as isotonicizing agent. In the formula, monobasic sodium phosphate monohydrate and disodium phosphate dodecahydrate are used to obtain a buffered solution at pH around 5.8; whilst sodium chloride is added in order to regulate the formulation osmolality.

### ***Experimental A. polyphaga rat keratitis and PHMB treatment***

In Sprague-Dawley specific pathogen-free male rats (150 g, Janvier, Le Genest Saint Isle, France) housed 2 per cage, experimental AK was obtained using intra-stromal trophozoite injections as previously described.<sup>6</sup> On the day of infection, 62 infected rats were randomly divided into 6 groups for follow-up, *i.e.* control rats; untreated rats (except one rat with in which *Staphylococcus aureus* keratitis was present in cornea on day 20 p.i., and which was euthanized according to above ethical requirements and not further taken into account); rats topically treated with PHMB (0.02%, 0.04%, 0.06%, or 0.08%); and rats treated with PHMB 0.02% in combination with propamidine isethionate, 0.1% (11, 6, 11, 11, 11 and 11 rats, respectively). Treatment was started on day 7 post-infection and administered 4 times a day for 21 days.

Rats were clinically examined every day, and eyes were observed weekly using a slit lamp by the same experienced investigator. Keratitis lesions were scored according to the following grade scheme: grade 0 - no corneal opacity; grade 1 - corneal opacity visible only using oblique slit beam; grade 2 - corneal opacity visible using retro-illumination but not sufficient to obscure iris details; grade 3 - corneal opacity visible using retro-illumination and obscuring iris details.<sup>7, 8</sup> All procedures involving rats were performed according to regulations of the French Ministry of Research after approval of the *ad hoc* local ethical committee (decision

#00755.02). The procedures also comply with the guidelines of the ARVO statement for the appropriate “Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research”.

### ***Ophthalmic microbiological analyses and histology***

On day 28 post-infection (p.i.), rats were euthanized, and superficial corneal epithelium scrapings were cultured in non-nutrient agar plates with *Escherichia coli* suspension overlays and examined for viable *Acanthamoeba* forms every week for 1 month. *Acanthamoeba* spp. quantitative PCR was performed, in a Light Cycler 2.0 (Roche Diagnostics), using primers and probes described by Qvarnstrom et al.<sup>9</sup> The reaction mix contained 1× FastStart DNA mastermix (Roche Diagnostics, Meylan, France), 0.2 μM of each primer, 0.2 μM probe, 3.5mM MgCl<sub>2</sub> and 10 μl of DNA in 25 μl total reaction volume. Cycling sequence was: 10 min at 95°C followed by 45 cycles of 15s at 95°C and 30s at 63°C. Eye globes of killed animals were punctured, placed in a 10% buffered formaldehyde solution, paraffin-embedded, and 3 mm sections were stained with hematoxylin-eosin. The absence of bacterial and fungal contamination of scrapings and eye globes was checked in blood agar cultures.

### ***Data analysis***

Contingency analysis of differences between groups were analysed using Fisher's exact tests. A p value <0.05 was considered significant.

## Results

### *PHMB efficacy against A. polyphaga rat keratitis*

Although surface contamination by scraping or infected lenses would be closer from human keratitis,<sup>10</sup> intra-stromal injections of parasites which usually results in higher corneal infection rates were performed in the present model and resulted on day 28 p.i. in grade 0, 1, 2 and 3 lesions in 1, 0, 4 and 7 untreated rats, respectively (Table 1).

Compared with the control group, PHMB monotherapy with 0.04% prevented corneal lesion worsening from day 14 to day 28 (Table 1). Although not significant, a similar trend was noted for 0.06% PHMB drops ( $p=0.08$ ), while no difference was observed between the PHMB 0.02%, PHMB 0.08% and PHMB 0.02% plus propamidine isethionate 0.1% groups and the control group ( $p>0.05$ ).

### *Microbial analysis*

Following PHMB monotherapy at all concentrations or PHMB 0.02% associated with propamidine isethionate 0.1%, the ratios of *Acanthamoeba* positive cornea scraping and eye globe samples detected using cultures, PCR and histology did not differ from that of the control group ( $p>0.05$ ).

The lower sensitivity of cultures vs histology for corneal *Acanthamoeba* detection ( $p<0.001$ , Table 2) likely reflected the nature of samplings, *i.e.* superficial corneal scrapings vs corneal stroma analysis. For PCR, sensitivity impairment by PHMB inhibition of amplifications cannot be excluded.<sup>11</sup>

## Discussion

In the present study, anti-AK efficacy of eye drops PHMB monotherapy was dependent on PHMB concentration.

The use of a buffer system at a pH between 5.0 and 6.0 is ideal for the product stability. Purified water is a suitable solvent for all the above mentioned PHMB eye drops formulations. In addition, at this pH the PHMB molecule exhibits a net positive charge able to perform its biocide mechanism of action.<sup>12</sup>

To our knowledge, previous studies in experimental animals did not test PHMB eye drops over the concentration of 0.02% which was found ineffective as we also report<sup>6, 8</sup> or more favourable.<sup>13</sup> Compared to human AK cases management, the present model was similar in the frequency of maintenance treatment (qid)<sup>1</sup> and different however in requiring regular peri-ocular injections of slow-release corticosteroid suspension (not performed and even avoided in humans), and duration regimens. In addition, the direct injection of *Acanthamoeba* into the cornea stroma does not reflect the physiopathology of AK and induces more severe keratitis, and those which make it more difficult to demonstrate efficacy of therapy especially like for PHMB 0.08%. However, present data are consistent with previous reports of treatment failures in humans using a topical 0.02% (200 µg/ml) PHMB solution, *i.e.* well above the minimal *in vitro* cysticidal concentration (MCC) for PHMB.<sup>14</sup> In a few human cases of resistant AK,<sup>1, 15-17</sup> higher concentrations (0.04% or 0.06%), which were found efficient in the present study, were frequently used successfully. Furthermore, higher cysticidal activity was reported by using combined biguanides than individual drug application, especially when a PHMB 0.04% and chlorhexidine 0.04% combination was used.<sup>18</sup>

Dissociations observed between clinical evolution of PHMB treated rats and *in vitro* *Acanthamoeba* sensitivities underline the need for pre-clinical studies of anti-amoebal agents *in vivo* models.<sup>4, 14</sup> The ability of PHMB to cross the epithelium and penetrate into the stroma is only very partially documented. Adequate corneal stromal concentrations may not be achieved using low concentrations of PHMB, which may bind to tissue components or be inactivated *in vivo*. In an *ex vivo* model consisting of rabbit corneas clamped in artificial perfusion chambers, potential accumulation of this amphiphilic substance within the corneal stroma, prevented or slowed its penetration through the corneal stroma and into the perfusion chamber.<sup>19</sup> Thus high PHMB concentration in eye drops would likely facilitate drug penetration into deep corneal stroma, and improve concentration-dependent<sup>20</sup> cysticidal activity of PHMB in prolonged human AK cases due to extended survival of amoebic cysts.<sup>1, 14, 21</sup> Interestingly, PHMB eye drops has been shown to be nontoxic to mammalian corneal epithelia at concentrations up to 20%.<sup>22</sup>

Acquired drug resistance to biguanides after prolonged intensive treatment has been previously excluded as a cause of discrepancy between *in vitro* and *in vivo* activity,<sup>14</sup> however *in vivo* intrinsic resistance of *Acanthamoeba* may be higher than *in vitro*.<sup>4, 23</sup>

Current results suggest that PHMB concentrations of more than 0.04% should be tested in future clinical trials according to other toxicologic and *in vitro* tests. Probably, the use of PHMB over 0.02% as first-line treatment either alone or in combination with diamidines, with which there may be a synergistic or additive effect could be relevant. Whatsoever, present data obtained with one *Acanthamoeba polyphaga* reference strain should be interpreted in the context of the large variations of *Acanthamoeba* spp. clinical isolate minimal cysticidal concentrations.<sup>24</sup>

**Funding:** ODAK (Orphan Drug for Acanthamoeba Keratitis) is a European research project, which received research funding from the European Union (Grant Agreement number 305661). It is a consortium of six European partners implicated in ophthalmic drugs, toxicology and parasitology. The ODAK aims to assess efficacy and safety of PHMB eye drops to provide basis for marketing authorisation.

**Acknowledgement:**

Table 1. Day 28 post-infection evaluation of the clinical efficacy of corneal PHMB treatment against *Acanthamoeba polyphaga* keratitis in rats

Group (number of rats)	D28 keratitis lesions				D <sub>14</sub> -D <sub>28</sub> grade worsening <sup>a</sup>
	Grade 0	Grade 1	Grade 2	Grade 3	
Control infected rats (11 <sup>b</sup> )	1	0	4	6	7
PHMB 0.02% (6)	0	0	4	2	3
PHMB 0.04% (11)	3	1	4	3	0*
PHMB 0.06% (11)	2	2	5	2	2**
PHMB 0.08% (11)	2	1	5	3	4
Propamidine isethionate + PHMB 0.02% (11)	1	1	6	3	7

<sup>a</sup> Ratio of animals with a >1 keratitis lesions grade difference between D28 and D14

<sup>b</sup> One rat with *Staphylococcus aureus* keratitis was euthanized on day 20 p.i. and not further taken into account

\* p=0.0039 compared with the control group

\*\* p=0.08 compared with the control group



Table 2: Day 28 post-infection evaluation of the parasitological efficacy of corneal PHMB treatment of *Acanthamoeba polyphaga* keratitis in rats

<b>Group (number of rats)</b>	<b>Culture</b>	<b>PCR</b>	<b>Histology</b>
Control infected rats (11 <sup>a</sup> )	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>6</b>
PHMB 0.02% (6)	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>6</b>
PHMB 0.04% (11)	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>6</b>
PHMB 0.06% (11)	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>5</b>
PHMB 0.08% (n=11)	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>7</b>
Propamidine isethionate + PHMB 0.02% (n=11)	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>5</b>
<b>Total 61</b>	<b>16/61</b>	<b>33/61</b>	<b>35/61</b>

Results expressed in numbers of rats with *Acanthamoeba* positive samples

<sup>a</sup> One rat with *Staphylococcus aureus* keratitis was euthanized on day 20 p.i. and not further taken into account

1. Dart JK, Saw VP, Kilvington S. Acanthamoeba keratitis: diagnosis and treatment update 2009. *American journal of ophthalmology* 2009;148:487-499 e482.
2. Radford CF, Minassian DC, Dart JK. Acanthamoeba keratitis in England and Wales: incidence, outcome, and risk factors. *The British journal of ophthalmology* 2002;86:536-542.
3. Ross J, Roy SL, Mathers WD, et al. Clinical characteristics of Acanthamoeba keratitis infections in 28 states, 2008 to 2011. *Cornea* 2014;33:161-168.
4. Elder MJ, Kilvington S, Dart JK. A clinicopathologic study of in vitro sensitivity testing and Acanthamoeba keratitis. *Investigative ophthalmology & visual science* 1994;35:1059-1064.
5. Lim N, Goh D, Bunce C, et al. Comparison of polyhexamethylene biguanide and chlorhexidine as monotherapy agents in the treatment of Acanthamoeba keratitis. *American journal of ophthalmology* 2008;145:130-135.
6. Vasseneix C, Gargala G, Francois A, et al. A keratitis rat model for evaluation of anti-Acanthamoeba polyphaga agents. *Cornea* 2006;25:597-602.
7. Polat ZA, Walochnik J, Obwaller A, Vural A, Dursun A, Arici MK. Miltefosine and polyhexamethylene biguanide: a new drug combination for the treatment of Acanthamoeba keratitis. *Clinical & experimental ophthalmology* 2014;42:151-158.
8. Ruddell TJ, Easty DL. Drug therapy in a murine model of Acanthamoeba keratitis. *Eye* 1995;9 ( Pt 1):142-143.
9. Qvarnstrom Y, Visvesvara GS, Sriram R, da Silva AJ. Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of Acanthamoeba spp., Balamuthia mandrillaris, and Naegleria fowleri. *J Clin Microbiol* 2006;44:3589-3595.
10. Ren M, Wu X. Evaluation of three different methods to establish animal models of Acanthamoeba keratitis. *Yonsei medical journal* 2010;51:121-127.
11. Thompson PP, Kowalski RP, Shanks RM, Gordon YJ. Validation of real-time PCR for laboratory diagnosis of Acanthamoeba keratitis. *J Clin Microbiol* 2008;46:3232-3236.
12. Seal D. Treatment of Acanthamoeba keratitis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2003;1:205-208.
13. Panda A, Das GK, Biswas NR, Mittal D, Mohanty S. Therapy of acanthamoeba keratitis--an experimental study. *Indian J Physiol Pharmacol* 2000;44:363-367.
14. Perez-Santonja JJ, Kilvington S, Hughes R, Tufail A, Matheson M, Dart JK. Persistently culture positive acanthamoeba keratitis: in vivo resistance and in vitro sensitivity. *Ophthalmology* 2003;110:1593-1600.
15. Mathers W. Use of higher medication concentrations in the treatment of acanthamoeba keratitis. *Archives of ophthalmology* 2006;124:923.
16. Ku JY, Chan FM, Beckingsale P. Acanthamoeba keratitis cluster: an increase in Acanthamoeba keratitis in Australia. *Clin Exp Ophthalmol* 2009;37:181-190.
17. Bang S, Edell E, Eghrari AO, Gottsch JD. Treatment with voriconazole in 3 eyes with resistant Acanthamoeba keratitis. *American journal of ophthalmology* 2010;149:66-69.

18. Mafra CS, Carrijo-Carvalho LC, Chudzinski-Tavassi AM, et al. Antimicrobial action of biguanides on the viability of Acanthamoeba cysts and assessment of cell toxicity. *Investigative ophthalmology & visual science* 2013;54:6363-6372.
19. Vontobel SF, Abad-Villar EM, Kaufmann C, Zinkernagel AS, Hauser PC, Thiel MA. Corneal Penetration of Polyhexamethylene Biguanide and Chlorhexidine Digluconate. *Clinical & experimental ophthalmology* 2015;6.
20. Sunada A, Kimura K, Nishi I, et al. In vitro evaluations of topical agents to treat Acanthamoeba keratitis. *Ophthalmology* 2014;121:2059-2065.
21. Robaei D, Carnt N, Minassian DC, Dart JK. Therapeutic and optical keratoplasty in the management of Acanthamoeba keratitis: risk factors, outcomes, and summary of the literature. *Ophthalmology* 2015;122:17-24.
22. Larkin DF, Berry M, Easty DL. In vitro corneal pathogenicity of Acanthamoeba. *Eye* 1991;5 ( Pt 5):560-568.
23. Alkharashi M, Lindsley K, Law HA, Sikder S. Medical interventions for acanthamoeba keratitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2015;CD010792.
24. Lim L, Coster DJ, Badenoch PR. Antimicrobial susceptibility of 19 Australian corneal isolates of Acanthamoeba. *Clin Exp Ophthalmol* 2000;28:119-124.

B) Evaluation de l'activité anti-*Acanthamoeba* du voriconazole *in vitro*, de sa pénétration cornéenne et de son efficacité sur un modèle expérimental chez le rat de kératite amibienne

Article N°2:

*Article publié dans la revue Journal of Antimicrobial Chemotherapy en mars 2018.*

***Evaluation of voriconazole anti-Acanthamoeba polyphaga in vitro activity, rat cornea penetration, and efficacy against experimental rat Acanthamoeba keratitis***

Julie GUEUDRY<sup>1,2\*</sup>, Laetitia LE GOFF<sup>1</sup>, Patricia COMPAGNON<sup>3</sup>, Sabine LEFEVRE<sup>2</sup>, Elodie COLASSE<sup>4</sup>, Camille AKNINE<sup>1</sup>, François DUVAL<sup>1</sup>, Arnaud FRANCOIS<sup>1,4</sup>, Romy RAZAKANDRAINIBE<sup>1</sup>, Jean Jacques BALLE<sup>1</sup>, Marc MURAINÉ<sup>2</sup> and Loïc FAVENNEC<sup>1</sup>

<sup>1</sup> EA 3800 "Protozooses Transmises par l'Alimentation" - University of Rouen Normandie, France

<sup>2</sup> Department of Ophthalmology – Charles Nicolle University Hospital, Rouen, France

<sup>3</sup> Department of Clinical Pharmacology – Charles Nicolle University Hospital, Rouen, France

<sup>4</sup> Department of Pathological Anatomy and Cytology - Charles Nicolle University Hospital, Rouen, France

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans la revue *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* en mars 2018 (Gueudry J, Le Goff L, Compagnon P, Lefevre S, Colasse E, Aknine C, Duval F, François A, Razakandrainibe R, Ballet JJ, Muraine M, Favennec L. Evaluation of voriconazole anti-*Acanthamoeba polyphaga* in vitro activity, rat cornea penetration and efficacy against experimental rat *Acanthamoeba keratitis*. *J Antimicrob Chemother*. 2018 Mar 27). Du fait que l'éditeur n'autorise pas la mise en ligne des articles du *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, seule la première page est insérée. L'intégralité de l'article dans sa dernière version est ensuite insérée à la suite sans la mise en forme de l'éditeur.

Nous décrivons ici *in vitro* et *in vivo* l'efficacité du voriconazole sur une souche de référence *A. Polyphaga* et sur une kératite expérimentale de KA.

## Résumé détaillé

La kératite amibienne est une infection cornéenne rare. Le traitement médical est mal codifié et difficile, même si l'association de biguanides, le plus souvent le polyhexaméthylène biguanide (PHMB), et de diamines semble améliorer le pronostic. L'utilisation du voriconazole, antifongique triazolé, a été rapporté dans la prise en charge de la KA à propos de quelques cas cliniques. Les données sur son efficacité *in vitro* sont discordantes. Le but de cette étude a été de tester l'efficacité du voriconazole en collyre à 10 mg/mL *in vivo* sur un modèle de kératite à *A. polyphaga* chez le rat. Les objectifs de cette étude ont été de mesurer l'activité du voriconazole *in vitro* anti- *A. polyphaga*, ainsi que son efficacité sur une KA expérimentale chez le rat ainsi que la pharmacocinétique de voriconazole en collyre et par voie orale dans la cornée du rat.

*In vitro*, les activités amoebicide et kysticide vis-à-vis du voriconazole ont été mesurées à l'aide du test de survie colorimétrique XTT. Pour l'étude *in vivo*, quarante rats Sprague-Dawley ont été infectés, au niveau de l'œil gauche par une injection intrastromale de  $10^4$  *Acanthamoeba polyphaga*. Le voriconazole en collyre à 10 mg/mL a été administré chez 10 rats pendant 72 heures toutes les heures de 8 à 20 heures soit 13 fois par jour, puis pendant 10 jours toutes les 2 heures de 8 à 20 heures soit 7 fois par jour puis 4 fois par jour de 8 à 20 heures pendant 7 jours dans l'œil gauche. De manière concomitante, le voriconazole a été instillé dans l'œil droit pour évaluer la pharmacocinétique selon ce protocole. Le voriconazole par voie systémique *per os* à la posologie de 60 mg/jour en deux prises a été testé chez 10 rats. Les rats témoins n'ont reçu aucun traitement. Un examen ophtalmologique hebdomadaire associé à une injection sous conjonctivale de bétaméthasone (0,28

mg) ont été réalisés. L'infection clinique était définie par la présence d'un œdème ou d'un infiltrat stromal associés ou non à des néovaisseaux cornéens. La gravité de l'infection clinique a été classée de 0 (pas de lésion) à 3 (opacité cornéenne masquant les détails iriens). A J28, les rats ont été sacrifiés. Un grattage cornéen pour analyse bactériologique, parasitologique et en PCR en temps réel a été réalisé pour chaque rat. La concentration plasmatique et cornéenne du voriconazole dans la cornée droite non infectée a été déterminée par chromatographie en phase liquide à haute performance pour chaque rat.

*In vitro*, le voriconazole a inhibé la prolifération des trophozoïtes avec une valeur IC 50 de 0,02 mg/L et une valeur IC 90 de 2,86 mg/L; aucun effet kysticide n'a été trouvé. *In vivo*, l'infection clinique s'est aggravée chez moins de rats de manière significative entre 7 et le 14<sup>ème</sup> jour dans le groupe traité par le voriconazole collyre (1/10 rats) en comparaison avec le groupe témoin (9/10 rats) ( $p=0,001$ ). Cependant, l'infection s'est ensuite aggravée de manière similaire entre le 14<sup>ème</sup> et le 28<sup>ème</sup> jour chez ces deux groupes ( $p >0,05$ ). L'infection clinique s'est aggravée chez autant de rats entre le 7<sup>ème</sup> et le 14<sup>ème</sup> jour, et entre le 14<sup>ème</sup> jour et le 28<sup>ème</sup> jour dans les groupes de rats traités par voriconazole à 60 mg/jour per os et dans le groupe témoin ( $p >0,05$ ). L'analyse bactériologique n'a pas identifié de surinfection bactérienne significative. L'analyse en PCR à la recherche d'*A. polyphaga* et l'analyse histologique n'ont pas montré de différence significative entre les groupes traités et le groupe témoin.

La pénétration intracornéenne du voriconazole a été étudiée après une administration horaire pendant 3 jours chez 5 rats, la concentration moyenne était de 5,6 +/- 4,4 ng/mg; puis après une administration toutes les deux heures pendant 7 jours chez 5 rats, la concentration moyenne était de 2,38 +/-1,6 ng/mg; puis après

une administration 4 fois par jour pendant 14 jours chez 9 rats, la concentration moyenne était de 0,32 +/- 0,15 ng/mg. Après administration par voie générale à 60 mg/kg/jour, la concentration sanguine moyenne du voriconazole était de 1,72 +/- 1,79 µg/mL et dans la cornée de 3,29 +/- 2,27 ng/mg chez 10 rats étudiés.

Les données actuelles soulignent ainsi le besoin de schéma d'instillation de voriconazole en collyre à haute fréquence pour obtenir un effet thérapeutique sur la KA. Ainsi, une monothérapie par voriconazole en collyre à 1% semble être efficace cliniquement sur un modèle animal de kératite amibienne en instillation toutes les heures et ne l'est plus dès que la fréquence d'instillation est diminuée. Une monothérapie de voriconazole par voie orale à une posologie égale à 60 mg/jour administré *per os* ne semble pas être efficace sur un modèle animal de KA. Ainsi, l'efficacité semble corrélée à l'obtention de forte concentration intracornéenne, difficilement accessible après administration par voie générale sans générer des effets secondaire généraux. De plus, le voriconazole est connu pour avoir une forte variabilité inter- et intra-individuelle des concentrations résiduelles et une pharmacocinétique non linéaire.

**Ainsi, les données présentées dans cet article semble souligner la nécessité de concentration intracornéenne haute pour qu'il soit utile dans la prise en charge des KA. Cela incite à étudier d'autres voies d'administrations afin d'essayer d'obtenir des concentrations locales cornéennes encore plus élevées de manière prolongée et d'essayer d'atteindre une efficacité du voriconazole sur les kystes amibiens éventuellement sur d'autres souches d'*Acanthamoeba*, ainsi qu'une synergie potentielle en cas d'association thérapeutique.**



## Evaluation of voriconazole anti-*Acanthamoeba polyphaga* *in vitro* activity, rat cornea penetration and efficacy against experimental rat *Acanthamoeba* keratitis

Julie Gueudry<sup>1,2\*</sup>, Laetitia Le Goff<sup>1</sup>, Patricia Compagnon<sup>3</sup>, Sabine Lefevre<sup>2</sup>, Elodie Colasse<sup>4</sup>, Camille Aknine<sup>1</sup>, François Duval<sup>1</sup>, Arnaud François<sup>1,4</sup>, Romy Razakandrainibe<sup>1</sup>, Jean Jacques Ballet<sup>1</sup>, Marc Muraine<sup>2</sup> and Loïc Favennec<sup>1</sup>

<sup>1</sup>EA3800 'Protozooses Transmises par l'Alimentation' – University of Rouen Normandy, Rouen, France; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology – Charles Nicolle University Hospital, Rouen, France; <sup>3</sup>Department of Clinical Pharmacology – Charles Nicolle University Hospital, Rouen, France; <sup>4</sup>Department of Pathological Anatomy and Cytology – Charles Nicolle University Hospital, Rouen, France

\*Corresponding author. Department of Ophthalmology, Charles Nicolle Hospital, 22 Boulevard Gambetta, 76031 Rouen, France. Tel: (33)-2-32-88-80-57; Fax: (33)-2-32-88-80-46; E-mail: julie.gueudry@chu-rouen.fr [orcid.org/0000-0002-8592-3810](https://orcid.org/0000-0002-8592-3810)

Received 2 November 2017; returned 18 December 2017; revised 30 January 2018; accepted 26 February 2018

**Background:** *Acanthamoeba* keratitis (AK) is a sight-threatening infectious disease. Its effective and safe medical therapy remains highly debated. Recently, voriconazole, a monotriazole with noted *in vitro* activity against a large variety of fungi, has been successfully used both topically and systemically to treat human AK cases.

**Objectives:** To measure anti-*Acanthamoeba polyphaga* *in vitro* activity, anti-rat AK efficiency and rat cornea penetration of eye-drop and oral voriconazole.

**Methods:** *A. polyphaga* was maintained in axenic cultures. *In vitro*, amoebicidal and cysticidal activities of voriconazole were measured using an XTT assay. AK lesions of Sprague Dawley rats were scored from grade 0 to grade 3. For 21 days, from day 7 post-infection, voriconazole (1% solution) eye drops were instilled or voriconazole was administered by gavage (60 mg/kg/day). After killing, superficial corneal epithelium scrapings were cultured and analysed by PCR, and eye-globe histology was performed. Cornea and plasma concentrations were determined using 2D HPLC separation and tandem MS.

**Results:** *In vitro*, voriconazole inhibited trophozoite proliferation with an IC<sub>50</sub> value of 0.02 mg/L and an IC<sub>90</sub> value of 2.86 mg/L; no cysticidal effect was found. In AK rats, eye drops reduced clinical worsening from day 7 to day 14 post-infection and oral voriconazole was not effective. Voriconazole cornea concentrations were directly dependent on the frequency of eye-drop instillations, which resulted in lower plasma concentrations, whilst oral voriconazole resulted in lower cornea concentrations.

**Conclusions:** Present data underline the need for high-frequency eye-drop instillation regimens for efficient AK therapy.

### Introduction

Although its occurrence is low, human *Acanthamoeba* keratitis (AK) is a severe, sight-threatening condition, often associated with contact-lens wearing, with a substantial proportion of patients requiring further optical or therapeutic keratoplasty or enucleation. *Acanthamoeba castellanii* and *Acanthamoeba polyphaga* are the most common species to cause keratitis.<sup>1</sup> The efficacy and safety of currently available medical treatments are highly debated. Biguanides are commonly used as first-line treatment, with polyhexamethylene biguanide (PHMB) and chlorhexidine previously established as the most successful cysticidal agents *in vitro*.<sup>2</sup>

Recently, voriconazole, a monotriazole with noted *in vitro* activity against a large variety of fungi, has been successfully used both topically and systemically in human AK cases.<sup>3–5</sup> The aim of this study was to measure anti-*A. polyphaga* *in vitro* activity, anti-rat AK efficiency and rat cornea penetration of topical and oral voriconazole.

### Materials and methods

#### *Acanthamoeba*

From axenic *A. polyphaga* cultures (isolate ATCC 50495, Rockville, MD, USA) grown at 30°C in 20 cm<sup>2</sup> flasks in Peptone Yeast Extract Glucose Broth (PYG)

© The Author(s) 2018. Published by Oxford University Press on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. All rights reserved. For permissions, please email: [journals.permissions@oup.com](mailto:journals.permissions@oup.com).

1 of 4

Evaluation of voriconazole anti-*Acanthamoeba polyphaga* *in vitro* activity, rat cornea penetration, and efficacy against experimental rat *Acanthamoeba* keratitis

Running title: voriconazole activity against *Acanthamoeba* keratitis

Julie GUEUDRY<sup>1,2\*</sup>, Laetitia LE GOFF<sup>1</sup>, Patricia COMPAGNON<sup>3</sup>, Sabine LEFEVRE<sup>2</sup>,  
Elodie COLASSE<sup>4</sup>, Camille AKNINE<sup>1</sup>, François DUVAL<sup>1</sup>, Arnaud FRANCOIS<sup>1,4</sup>, Romy  
RAZAKANDRAINIBE<sup>1</sup>, Jean Jacques BALLEET<sup>1</sup>, Marc MURAINÉ<sup>2</sup> and Loïc  
FAVENNEC<sup>1</sup>

<sup>1</sup> EA3800 "Protozooses Transmises par l'Alimentation" - University of Rouen Normandy, Rouen, France

<sup>2</sup> Department of Ophthalmology – Charles Nicolle University Hospital, Rouen, France

<sup>3</sup> Department of Clinical Pharmacology – Charles Nicolle University Hospital, Rouen, France

<sup>4</sup> Department of Pathological Anatomy and Cytology - Charles Nicolle University Hospital, Rouen, France

Correspondence and reprint requests to:

Dr Julie Gueudry

Department of Ophthalmology

Charles Nicolle Hospital

22 Boulevard Gambetta

76031 ROUEN - FRANCE

Tel: (33) 2 32 88 80 57      Fax: (33) 2 32 88 80 46

E-mail: [julie.gueudry@chu-rouen.fr](mailto:julie.gueudry@chu-rouen.fr)

## **SYNOPSIS**

### **Background**

*Acanthamoeba* keratitis (AK) is a sight-threatening infectious disease. Its effective and safe medical therapy remains highly debated. Recently, voriconazole, a mono-triazole with noted *in vitro* activity against a large variety of fungi, has been successfully used both topically and systemically to treat human AK cases.

### **Objectives**

To measure anti-*Acanthamoeba polyphaga* *in vitro* activity, anti-rat AK efficiency and rat cornea penetration of eye drop and *per os* voriconazole.

### **Methods**

*Acanthamoeba polyphaga* was maintained in axenic cultures. *In vitro*, amoebicidal and cysticidal activities to voriconazole were measured using XTT assay. Sprague-Dawley rats *Acanthamoeba* keratitis lesions were scored from grade 0 to grade 3. For 21 days from day 7 post infection, voriconazole (1% solution) eye drops were instilled or voriconazole was administered by gavage (60 mg/kg/day). After killing, superficial corneal epithelium scrapings were cultured and PCR analysed, and eye globes histology was performed. Cornea and plasma concentrations were determined using a two-dimensional HPLC separation and tandem mass spectrometry.

### **Results**

*In vitro*, voriconazole inhibited trophozoite proliferation with an IC<sub>50</sub> value of 0.02 mg/L and an IC<sub>90</sub> value of 2.86 mg/L; no cysticidal effect was found. In AK rats, eye drops reduced

clinical worsening from day 7 to day 14 post infection and *oral* voriconazole was not effective. Voriconazole cornea concentrations were directly dependent on the frequency of eye drop instillations, which resulted in lower plasma concentrations, whilst oral voriconazole resulted in lower cornea concentrations.

### **Conclusions**

Present data underline the need for high frequency eye drop instillation regimens for efficient AK therapy.

Keywords: *Acanthamoeba*, keratitis, voriconazole

## Introduction

While its occurrence is low, human *Acanthamoeba* keratitis (AK) is a severe, sight-threatening condition, often associated to contact lens wearing with a substantial proportion of patients requiring further optical or therapeutic keratoplasty or enucleation. *Acanthamoeba* (*A.*) *castellanii* and *A. polyphaga* are the most common to cause keratitis.<sup>1</sup> The efficacy and safe of currently available medical treatments are highly debated. Biguanides are commonly used as first-line treatment, with polyhexamethylene biguanide (PHMB) and chlorhexidine previously established as the most successful cysticidal agents *in vitro*.<sup>2</sup> Recently, voriconazole, a mono-triazole with noted *in vitro* activity against a large variety of fungi, has been successfully used both topically and systemically in human AK cases.<sup>3-5</sup> The aim of this study was to measure anti-*A. polyphaga in vitro* activity, anti-rat AK efficiency and rat cornea penetration of topical and *per os* voriconazole.

## Materials and methods

### *Acanthamoeba*

From axenic *A. polyphaga* cultures (isolate ATCC #50495, Rockville, MD, USA) grown at 30°C in 20 cm<sup>2</sup> flasks in PYG (Peptone-Yeast extract-Glucose) medium, 80% trophozoite suspensions were obtained by refrigerating flasks in ice water baths. To obtain encystment, washed trophozoites were resuspended in high salt encystment medium (250 mM NaCl, 4.6 mM MgSO<sub>4</sub>, and 0.36 mM CaCl) as previously described.<sup>6</sup>

### *Voriconazole preparations*

Voriconazole solutions were prepared with sterile injection water using 10 mg/mL (1% w/v) intravenous voriconazole lyophilisate (Vfend, Pfizer, Paris, France) for *in vitro* studies and

eye drops and 200 mg Vfend tablets for oral treatment.

### ***In vitro evaluation of voriconazole amoebicidal and cysticidal activities***

Trophozoite ( $10^3/100$  microL/well), were allowed to adhere in 96 well flat-bottom microplates (2 h, 37 °C) and voriconazole was added for 72 h (final concentrations of 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 20 and 40 mg/L). Trophozoite viability was measured using XTT assay (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) (final concentration: 0.3 mg/mL, incubation for 6 h-24 h at 37°C). After subtracting 630 nm absorbance value from corresponding 490 nm values for wavelength correction of optical defects, results were expressed as percentage of control (medium alone) culture well values. To evaluate cysticidal activity, voriconazole was added for 24 or 48 h (final concentrations of 5, 10, 50, 100, and 200 mg/L) in microplates containing  $10^3$  cysts/100  $\mu$ L/well, and maintained at 37 °C for 5 days *i.e.* until >80 % trophozoite confluence in control wells. Trophozoite reversion was evaluated by using XTT colorimetry after incubation for 2h, 4h or 6h at 37°C, and absorbance reading and correction as above. In control wells, >90% trophozoites reversion was microscopically verified.

### ***Experimental A. polyphaga rat keratitis and voriconazole treatment***

All procedures were performed according to regulations of the French Ministry of Research after approval of the *ad hoc* ethical committee (n° 00755.02). In Sprague-Dawley male specific pathogen-free rats (150 g, Janvier, Le Genest Saint Isle, France) housed 2 per cage, AK was obtained as described.<sup>7</sup> Eyes were examined weekly using a slit lamp by the same experienced investigator, and keratitis lesions were scored. The following grade scheme was used: grade 0: no corneal opacity; grade 1: corneal opacity visible only using oblique slit beam; grade 2: corneal opacity visible using retro-illumination but not sufficient to obscure iris details; grade 3: corneal opacity visible using retro-illumination and obscuring iris

details.<sup>8,9</sup> Nineteen rats with left eye AK received voriconazole (1% solution) eye drops daily for 21 days in both eyes. Instillation sequences are summarized in table 1. Orally treated AK rats received voriconazole by gavage (60 mg/kg/day, 2 daily doses).

### ***Ophthalmic microbiological analyses and histology***

On day 28 post-infection (p.i.), rats were euthanized, blood samples collected, and superficial corneal epithelium scrapings obtained for cultures (non nutrient agar plates with *Escherichia coli* suspension overlay examined for viable *Acanthamoeba* every week for 1 month). *Acanthamoeba spp.* quantitative PCR was performed, in a Light Cycler 2.0 (Roche Diagnostics), using primers and probe as described by Qvarnstrom *et al.*<sup>10</sup> The reaction mix contained 1× FastStart DNA mastermix (Roche Diagnostics, Meylan, France), 0.2 μM of each primer, 0.2 μM probe, 3.5mM MgCl<sub>2</sub> and 10 μL of DNA in 25 μL total reaction volume. Cycling parameters were: 10 min at 95°C followed by 45 cycles of 15s at 95°C and 30s at 63°C.

Eye globes of killed animals were punctured, placed in a 10% buffered formaldehyde solution, paraffin-embedded, and 3 mm sections were stained with hematoxylin-eosin.

### ***Cornea and plasma voriconazole concentrations during topical and per os treatments in AK rats***

At the end of each instillation regimen as above, right (non infected) cornea samples were thawed, weighed, and 100 microliters of voriconazole-d<sub>5</sub>-surcharged methanol (internal standard) was added to each sample as extraction/precipitation reagent. After vortex mixing, tubes were incubated for 30 min at room temperature and sonicated for 15 minutes before

centrifugation (16,000g for 5 min). For plasma samples, each 50  $\mu$ L aliquot was mixed with 100  $\mu$ L extraction/precipitation reagent, vortex-mixed, and centrifuged in a like manner. Supernatants were transferred in HPLC vials and 1  $\mu$ L was injected for quantification in a two-dimensional HPLC separation and tandem mass spectrometry system consisting of a 3200 Qtrap tandem mass spectrometer equipped with a turbo ion spray source (AB Sciex, Framingham, USA). Sample clean-up was carried out on-line in a perfusion column preceding an analytical octadecyl column connected to the mass spectrometer. Quantitation was performed in multiple reaction monitoring (MRM) in positive ion mode with voriconazole-d5 as internal standard. The assay, conducted in accordance with US FDA bioanalytical guidelines,<sup>11</sup> resulted in lower and upper quantitation thresholds of 0.005 and 0.01  $\mu$ g/mL respectively, for both cornea and plasma samples.

### ***Data analysis***

Statistics were performed using contingency analysis (Fisher's exact tests). A p value <0.05 was considered significant.

## **Results**

### ***In vitro voriconazole amoebicidal activity***

Optimal XTT staining to evaluate trophozoite viability was obtained after 24H incubation (data not shown). In 3 triplicated independent experiments voriconazole inhibited trophozoite proliferation in a concentration-dependent manner: incubation with 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 20 and 40 mg/L voriconazole, resulted in inhibition percentages of  $44.4 \pm 1.3$ ,  $55.3 \pm 3.5$ ,  $67.9 \pm 22.5$ ,  $81.6 \pm 26.0$ ,  $77.5 \pm 10.3$ ,  $93.5 \pm 3.1$ ,  $98.6 \pm 1.4$ ,  $96.6 \pm 4.5$ , and  $100 \pm 0.7$  (mean  $\pm$  SD), respectively, corresponding to an average 0.02 mg/L IC 50 and an average 2.86 mg/L



IC90. After cyst incubation with 5, 10, 50, 100, and 200 mg/L voriconazole for 24 h or 48 h, reversion to trophozoites was similar to untreated controls (>90%,  $p > 0.05$ ).

### ***Voriconazole efficacy against *A. polyphaga* rat keratitis***

As shown in Table 2, worsening of clinical symptoms from day 7 to day 14 p.i. was observed in fewer rats in the eye drops group (topically treated with 1% voriconazole from day 7 to day 28 p.i.) than in the untreated control group ( $p = 0.001$ ), while clinical infection similarly worsened in both groups from day 14 to day 28 p.i. ( $p > 0.05$ ). In orally treated rats, clinical infection worsening was similar to untreated controls from day 7 to day 28 p.i. ( $p > 0.05$ ). Topical or oral voriconazole did not affect day 28 p.i. culture, PCR and histology positivities for *A. polyphaga* (Table S1, available as Supplementary data at JAC Online).

### ***Cornea and plasma voriconazole concentrations in eye drop and oral voriconazole treated AK rats***

As shown in Table 1, voriconazole cornea concentrations were directly dependent on frequency of eye drop instillations. Voriconazole cornea concentrations were higher after hourly and 2- hourly topical administration than after 4-hourly administration ( $p = 0.005$ , respectively). Following oral twice-a-day administrations of 60 mg/kg/day for 21 days, mean cornea and blood voriconazole concentrations averaged  $1.72 \pm 1.79$  ng/mg (as ng/ $\mu$ L, cornea considering that 90 % of cornea tissue is composed of water)<sup>12</sup> and  $3.29 \pm 2.27$  mg/L in 10 rats (mean  $\pm$  SD), respectively.

## Discussion

The present voriconazole *Acanthamoeba* IC<sub>90</sub> evaluation (2.86 mg/L) compares with previously reported values of 1 to 52.85 mg/L, and strong inhibition observed over 40 mg/L.<sup>13,14</sup> No cysticidal activity was detected, consistent with the reported cyst resistance of clinical isolates at 1 and 10 mg/L concentrations.<sup>15</sup> In other discrepant studies, however, cysticidal activity was obtained at 5 to 15 mg/L or at higher concentrations for collection strains and clinical isolates, respectively.<sup>16,17</sup> Differences in *Acanthamoeba* strains and methodologies (such as staining) may account for such variations.

In an AK rat model, topical and oral voriconazole doses were determined according to previous studies in Humans.<sup>18</sup> Eye drop treatment from day 7 p.i. reduced AK lesion worsening from day 7 to day 14 p.i. without later effect while oral voriconazole therapy did not modify clinical lesions until day 28 p.i.. In both untreated and treated infected eyes, *Acanthameoba* persistence was constantly established on day 28 p.i. by cultures, PCR and histology.

For the first time, cornea concentrations were measured in non-infected eyes of voriconazole treated AK rats to suitably document concentrations during infection. At the end of a 3 days hourly topical instillation sequence, cornea concentrations were in the same range as the estimated amoebicidal IC<sub>90</sub> and were markedly reduced after switching to 2-hourly instillations. While using 1000 times more concentrated eye drops, resulting cornea concentrations were not proportionally increased compared with values obtained in normal and *Paecilomyces lilacinus* keratitis rabbits, respectively<sup>19</sup> and appeared to depend more on instillation frequency than on voriconazole dose, consistent with an absence of cornea "reservoir" effect as reported in human aqueous humor, and reminiscent of the need for high instillation frequency to maintain voriconazole cornea concentrations above the MIC<sub>90</sub> for

most fungal species.<sup>20</sup> Accordingly, cornea voriconazole concentrations were found equivalent, after 2-hourly eye drops regimen, to that in aqueous humor in Humans,<sup>20</sup> and elevated aqueous humor concentrations were rapidly obtained after eye instillation in humans.<sup>18</sup> In topically treated rats, plasma concentrations were close from those in healthy horses<sup>21</sup> and presumably lower than those associated with adverse side effects in Humans.<sup>22</sup> Due to ethical constraints, one eye of each rat was infected. Thus, voriconazole was quantified in non-infected cornea since infected corneas were used for microbiological/histological assessments. Since concentrations in infected corneas likely exceed those in non infected ones, this may represent a limitation for extrapolating our results to infected corneas.<sup>12</sup>

Reminiscent of reports in Humans of aqueous humor voriconazole concentration being half of that in plasma 3 hours after oral administration,<sup>23</sup> oral regimen resulted in cornea concentrations lower than IC90. Unwanted side effects may whatever prevent from using high systemic doses of voriconazole, which also exhibits high inter- and intra-individual variabilities in residual concentrations, and non-linear pharmacokinetic characteristics.<sup>22</sup>

Present data seem to underline the need for high voriconazole cornea concentrations for AK therapy. Therefore, further studies are necessary to investigate other routes of administration to achieve higher cornea concentrations, and to study the cysticidal effect of voriconazole on different *Acanthamoeba* strains and its efficacy in association with other drugs.

## **Acknowledgements**

We are grateful to Auda Alsafandi and Sarah Vazirnejad for technical support and for helpful discussion over the course of the *in vitro* study.

## **Funding**

Financial support was obtained from the university of Rouen, France.

R.R is a postdoc fellow supported by the university of Rouen, France and the Normandie region, France.

## **Transparency declarations**

None of us has any financial interests relevant to this study.

## **Author contributions**

J.G., L.L.G. and L.F. designed the study, J.G., L.L.G., P.C., S.L., E.C. C.A., F.D., A.F., R.R. and L.F. performed the experiments, J.G., L.L.G., MM and L.F. analysed and interpreted the results, J.G and L.L.G. wrote the draft manuscript, J.J.B. revised the manuscript and M.M and L.F approved the final version of the manuscript.

## **Supplementary data**

**Table S1** is available as Supplementary data at JAC Online.

## REFERENCES

1. Dart JK, Saw VP, Kilvington S. Acanthamoeba keratitis: diagnosis and treatment update 2009. *American journal of ophthalmology* 2009; **148**: 487-99 e2.
2. Elder MJ, Kilvington S, Dart JK. A clinicopathologic study of in vitro sensitivity testing and Acanthamoeba keratitis. *Investigative ophthalmology & visual science* 1994; **35**: 1059-64.
3. Cabello-Vilchez AM, Martin-Navarro CM, Lopez-Arencibia A et al. Voriconazole as a first-line treatment against potentially pathogenic Acanthamoeba strains from Peru. *Parasitology research* 2014; **113**: 755-9.
4. Bang S, Edell E, Eghrari AO et al. Treatment with voriconazole in 3 eyes with resistant Acanthamoeba keratitis. *American journal of ophthalmology* 2010; **149**: 66-9.
5. Tu EY, Joslin CE, Shoff ME. Successful treatment of chronic stromal acanthamoeba keratitis with oral voriconazole monotherapy. *Cornea* 2010; **29**: 1066-8.
6. Sykes DE, Band RN. Polyphenol oxidase produced during encystation of Acanthamoeba castellanii. *J Protozool* 1985; **32**: 512-7.
7. Vasseneix C, Gargala G, Francois A et al. A keratitis rat model for evaluation of anti-Acanthamoeba polyphaga agents. *Cornea* 2006; **25**: 597-602.
8. Polat ZA, Walochnik J, Obwaller A et al. Miltefosine and polyhexamethylene biguanide: a new drug combination for the treatment of Acanthamoeba keratitis. *Clinical & experimental ophthalmology* 2014; **42**: 151-8.
9. Ruddell TJ, Easty DL. Drug therapy in a murine model of Acanthamoeba keratitis. *Eye* 1995; **9 ( Pt 1)**: 142-3.
10. Qvarnstrom Y, Visvesvara GS, Sriram R et al. Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of Acanthamoeba spp., Balamuthia mandrillaris, and Naegleria fowleri. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 3589-95.
11. Administration USDoHaHSFaD. Guidance for industry, Bioanalytical Method Validation. 2001.
12. Cahane M, Ben Simon GJ, Barequet IS et al. Human corneal stromal tissue concentration after consecutive doses of topically applied 3.3% vancomycin. *The British journal of ophthalmology* 2004; **88**: 22-4.
13. Rocha-Cabrera P, Reyes-Batlle M, Martin-Navarro CM et al. Detection of Acanthamoeba on the ocular surface in a Spanish population using the Schirmer strip test: pathogenic potential, molecular classification and evaluation of the sensitivity to chlorhexidine and voriconazole of the isolated Acanthamoeba strains. *J Med Microbiol* 2015; **64**: 849-53.
14. Schuster FL, Guglielmo BJ, Visvesvara GS. In-vitro activity of miltefosine and voriconazole on clinical isolates of free-living amebas: Balamuthia mandrillaris, Acanthamoeba spp., and Naegleria fowleri. *J Eukaryot Microbiol* 2006; **53**: 121-6.
15. Sunada A, Kimura K, Nishi I et al. In vitro evaluations of topical agents to treat Acanthamoeba keratitis. *Ophthalmology* 2014; **121**: 2059-65.

16. Martin-Navarro CM, Lopez-Arencibia A, Arnalich-Montiel F et al. Evaluation of the in vitro activity of commercially available moxifloxacin and voriconazole eye-drops against clinical strains of *Acanthamoeba*. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 2013; **251**: 2111-7.
17. Iovieno A, Miller D, Ledee DR et al. Cysticidal activity of antifungals against different genotypes of *Acanthamoeba*. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 5626-8.
18. Neoh CF, Leung L, Chan E et al. Open-Label Study of Absorption and Clearance of 1% Voriconazole Eye Drops. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; **60**: 6896-8.
19. Sponsel W, Chen N, Dang D et al. Topical voriconazole as a novel treatment for fungal keratitis. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 262-8.
20. Vemulakonda GA, Hariprasad SM, Mieler WF et al. Aqueous and vitreous concentrations following topical administration of 1% voriconazole in humans. *Archives of ophthalmology* 2008; **126**: 18-22.
21. Clode AB, Davis JL, Salmon J et al. Evaluation of concentration of voriconazole in aqueous humor after topical and oral administration in horses. *Am J Vet Res* 2006; **67**: 296-301.
22. Dolton MJ, Mikus G, Weiss J et al. Understanding variability with voriconazole using a population pharmacokinetic approach: implications for optimal dosing. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 1633-41.
23. Hariprasad SM, Mieler WF, Holz ER et al. Determination of vitreous, aqueous, and plasma concentration of orally administered voriconazole in humans. *Archives of ophthalmology* 2004; **122**: 42-7.

**Table 1.** Rat instillation sequences of 1% voriconazole eye drops and voriconazole cornea concentration measured in the right non-infected cornea

<b>Voriconazole eye drops regimen</b>		<b>Voriconazole cornea concentration (last day of eye drops sequences)  Mean ± SD</b>
<b>First instillation sequence (Frequency/duration)</b>	<b>Subsequent instillation sequence (Frequency/duration)</b>	
<b>Hourly</b> (13 times a day, 8 AM to 8 PM)/ <b>3 days</b>	<b>None</b>	<b>5.6 ± 4.4 ng /mg (5 rats)</b>  (Day 10 post-infection)
<b>Hourly</b> (13 times a day, 8 AM to 8 PM)/ <b>3 days</b>	<b>2-hourly</b> (7 times a day, 8 AM to 8 PM)/ <b>11 days</b>	<b>2.38 ± 1.6 ng /mg (5 rats)</b>  (Day 17 post-infection)
<b>Hourly</b> (13 times a day, 8 AM to 8 PM)/ <b>3 days</b>	<b>2-hourly</b> (7 times a day, 8 AM to 8 PM) / <b>11 days then 4-hourly</b> (4 times a day 8AM to 20PM)/ <b>7 days</b>	<b>0.32 ± 0.15 ng /mg (9 rats)</b>  (Day 28 post-infection)

**Table 2.** Evaluation of the clinical efficacy of eye drop and oral voriconazole treatments against *Acanthamoeba polyphaga* rat keratitis symptoms

<b>Group of rats</b>	<b>Grade 0<sup>a</sup></b>	<b>Grade 1<sup>a</sup></b>	<b>Grade 2<sup>a</sup></b>	<b>Grade 3<sup>a</sup></b>	<b>Grade worsening<sup>b</sup></b>
Untreated (n=10)	<b>1/10</b>	<b>1/10</b>	<b>4/10</b>	<b>4/10</b>	<b>9/10</b>
Voriconazole eye drops (n=10)	<b>0/10</b>	<b>4/10</b>	<b>5/10</b>	<b>1/10</b>	<b>1/10*</b>
Oral voriconazole (n=9)	<b>0/9</b>	<b>1/9</b>	<b>5/9</b>	<b>3/9</b>	<b>4/9</b>

<sup>a</sup> Grades were evaluated at day 14 post-infection

<sup>b</sup> Ratios of animals with grade worsening from day 7 to day 14 post infection

\* p<0.01 compared with the untreated group



**Table S1.** Parasitological efficacy of eye drops and oral voriconazole treatments of *Acanthamoeba polyphaga* rat keratitis. Results given as the ratio of the numbers of rat with positive *Acanthamoeba* detection in the cornea

*Supplementary material is exclusively published online*

<b>Group of rats</b>	<b><i>Acanthamoeba</i> positive agar culture</b> (Day 28 post-infection)	<b><i>Acanthamoeba</i> positive real time PCR</b> (Day 28 post-infection)	<b><i>Acanthamoeba</i> positive histology</b> (Day 28 post-infection)
Untreated (n=10)	<b>2/10</b>	<b>1/10</b>	<b>4/10</b>
Voriconazole eye drops (n=9)	<b>0/9</b>	<b>4/9</b>	<b>1/9</b>
Oral voriconazole (n=9)	<b>1/9</b>	<b>3/9</b>	<b>6/9</b>

C) Pharmacocinétique du voriconazole et du posaconazole après injection intrastromale et du posaconazole collyre chez le rat

Article 3 :

Soumis pour publication, en cours de relecture pour « Diagnostic Microbiology and Infectious Disease »

Julie GUEUDRY<sup>1,2\*</sup>, Laetitia LE GOFF<sup>1</sup>, Fabien LAMOUREUX<sup>3</sup>, Tony PEREIRA<sup>3</sup>, Sabine LEFEVRE<sup>2</sup>, Romy RAZAKANDRAINIBE<sup>1</sup>, Damien COSTA<sup>1</sup>, Jean Jacques BALLET<sup>1</sup>, Marc MURAINÉ<sup>2</sup> and Loïc FAVENNEC<sup>1</sup>

<sup>1</sup> EA7510 "Epidémiologie-surveillance et circulation des parasites dans l'environnement"  
– University of Rouen Normandie, Rouen, France

<sup>2</sup> Department of Ophthalmology – Charles Nicolle University Hospital, Rouen,  
France

<sup>3</sup> Department of Clinical Pharmacology – Charles Nicolle University Hospital, Rouen,  
France

A la suite des résultats des travaux décrits ci-dessus, nous nous sommes intéressés à l'utilisation d'autres voies d'administration des antifongiques dans l'espoir d'obtenir des concentrations dans la cornée supérieures à celles obtenues avec la voie locale par collyre ou par voie générale. Nous avons tout d'abord testé le voriconazole puis devant des concentrations très hautes mais de très courte durée après des injections directes dans la cornée nous avons testé le posaconazole, antifongique triazolé récemment disponible sous une forme injectable, de plus haut poids moléculaire dans le but d'essayer de limiter au maximum la diffusion trans-cornéenne et ainsi de maintenir des concentrations élevées dans la cornée le plus longtemps possible.

## Résumé détaillé

La kératite amibienne est une infection cornéenne rare liée à *Acanthamoeba*. Le traitement médical est mal codifié et difficile notamment du fait de la résistance des kystes. Certaines données *in vitro* évoquent l'action anti-*Acanthamoeba* des nouveaux agents antifongiques triazolés, mais à des concentrations kysticides très élevées difficilement accessibles. Peu de choses sont connues concernant les concentrations obtenues après injections intrastromales, pourtant utilisées dans les cas de kératites réfractaires, notamment fongiques. Le but de cette étude est de tester la concentration obtenue de voriconazole et de posaconazole dans la cornée après injection intrastromale. Les concentrations intracornéennes du posaconazole obtenues après instillation de collyre chez le rat ont été également mesurées.

Vingt neuf et 28 rats Sprague-Dawley ont reçu, au niveau de l'œil gauche, une injection intra-stromale de 1 µL de voriconazole (solution à 10 mg/mL) et de 1 µL de posaconazole (solution à 18 mg/mL), respectivement. Les concentrations de voriconazole et de posaconazole ont été évaluées dans la cornée et dans le plasma, après euthanasie des animaux, à 3 h, 6 h, 1, 2 et 6 jours. Le posaconazole a également été instillé dans l'œil droit sous la forme de collyre (solution à 18 mg/mL) chez les 28 rats ayant reçu une injection intrastromale de posaconazole. La concentration cornéenne du posaconazole a été déterminée par chromatographie en phase liquide à haute performance.

Trente minutes après l'injection intrastromale, la concentration cornéenne de voriconazole atteint 303 +/- 93,22 ng/mg. Cependant une diminution rapide est observée dès la troisième heure, 1,07 +/- 0,37 ng/mg, puis à la sixième heure 0,19 +/-

0,15 ng/mg, puis à J1 0,05+/- 0,06 ng/mg, à J2 0,1+/- 0,09 ng/mg et finalement à J6 0,50+/- 0,55 ng/mg. Les taux plasmatiques de voriconazole sont restés bas, avec une concentration maximale de 0,03 ± 0,02 µg/mL.

Trente minutes après l'injection intrastromale, la concentration cornéenne de posaconazole atteint 264,25 +/- 109,35 ng/mg. Cependant une diminution est observée à la troisième heure 35,34 +/- 14,05 ng/mg, puis à la sixième heure 3,72 +/- 2,02 ng/mg, puis à J1 4,84 +/- 9,79 ng/mg, à J2 0,31 +/- 0,19 ng/mg et finalement à J6 0,60+/- 0,24 ng/mg. Les taux plasmatiques de posaconazole ont été mesurés 0,44 ± 0,18 µg/mL au maximum.

La pénétration intracornéenne du posaconazole en collyre a été étudiée après une administration horaire pendant 24 heures chez 5 rats, la concentration moyenne était de 74,14 +/- 27,80 ng/mg à H3 à 28,8 +/- 17,69 ng/mg; puis après une administration toutes les deux heures pendant une journée, la concentration moyenne était de 23,62 +/- 8,33 ng/mg, puis après 48 heures 6,30 +/- 3,55 ng/mg ; puis après une administration 4 fois par jour pendant 2 jours, la concentration moyenne était de 11,21+/- 2,79 ng/mg.

Les concentrations minimales kysticides connues de la littérature ne sont obtenues que pendant une très courte durée après injection intrastromale de voriconazole et de posaconazole, moins de 3 heures. Probablement que les propriétés de diffusion du voriconazole font qu'il ne se maintient pas dans la cornée ce qui pour une utilisation en clinique humaine nécessiterait une fréquence d'injections impossible à mettre en pratique. Après injection de posaconazole, des concentrations élevées se maintiennent de manière plus prolongée que le voriconazole et sont obtenues après instillation même avec des fréquences d'instillation réduite.

**Ces travaux mettent en avant la limite de l'utilisation des dérivés triazolés en injections intrastromales du fait de leur propriété pharmacocinétique qui font que les concentrations importantes obtenues sont de courte durée nécessitant un nombre d'injections très fréquemment répétées. En revanche, le posaconazole en collyre semble se profiler comme une alternative intéressante. Ces travaux orientés initialement pour préciser la prise en charge des KA, éclairent cependant la prise en charge des kératites infectieuse sévères fongiques.**

Corneal pharmacokinetics of voriconazole and posaconazole following intrastromal injection and posaconazole eye drops instillation in rats

Julie GUEUDRY<sup>1,2\*</sup>, Laetitia LE GOFF<sup>1</sup>, Fabien LAMOUREUX<sup>3</sup>, Tony PEREIRA<sup>3</sup>, Sabine LEFEVRE<sup>2</sup>, Romy RAZAKANDRAINIBE<sup>1</sup>, Damien COSTA<sup>1</sup>, Jean Jacques BALLET<sup>1</sup>, Marc MURAINÉ<sup>2</sup> and Loïc FAVENNEC<sup>1</sup>

<sup>1</sup> EA7510 "Epidémio-surveillance et circulation des parasites dans l'environnement" – University of Rouen Normandie, Rouen, France

<sup>2</sup> Department of Ophthalmology – Charles Nicolle University Hospital, Rouen, France

<sup>3</sup> Department of Clinical Pharmacology – Charles Nicolle University Hospital, Rouen, France

Running title: Intrastromal and eye drops triazoles in rat cornea

Correspondence and reprint requests to:

Dr Julie Gueudry

Department of Ophthalmology

Charles Nicolle Hospital

22 Boulevard Gambetta

76031 ROUEN - FRANCE

Tel: (33) 2 32 88 80 57      Fax: (33) 2 32 88 80 46

E-mail: [julie.gueudry@chu-rouen.fr](mailto:julie.gueudry@chu-rouen.fr)

## ABSTRACT

Infectious keratitis is a major global cause of visual impairment and blindness worldwide. Common difficulties in treating fungal or *Acanthamoeba* keratitis cases prompt new therapeutic possibilities. In this study, intrastromal voriconazole and posaconazole, and topical posaconazole, were tested on obtaining therapeutic cornea concentrations. In anesthetized rats, single intracorneal injection resulted after 30 min in respectively >300 ng/mg and >260 ng/mg cornea concentrations, dropping to low levels within hours, while staying low in plasma. The effect of hourly posaconazole eye drops resulted in >10 ng/mg cornea concentration lasted longer than that of every 2 and every 4 hours further instillations. Data document limitations of intrastromal triazole administration and potential of posaconazole eye drops to maintain therapeutic cornea concentrations and to treat severe infectious keratitis.

Keywords: cornea; keratitis; voriconazole; posaconazole; fungal; triazoles



## ARTICLE

### 1. Introduction

Infectious keratitis is a major global cause of visual impairment and blindness worldwide, prompting new therapeutic possibilities. Appropriate ocular concentrations of anti-infectious agents, which may be extrapolated from *in vitro* studies of microorganism sensitivities, are indicative of clinical efficiency. While eye drops are generally used as first line therapy, some agents were administered intrastromally, i.e. intracorneally, in expecting elevated cornea concentrations which would require toxic systemic doses [1], particularly in difficult to treat severe infectious keratitis cases such as fungal keratitis and less frequently in case of *Acanthamoeba* keratitis [2, 3]. Combined intrastromal and topical or systemic anti-fungal treatments have been frequently used in such situations, yet for both topical and intrastromal agents, limited information is presently available on resulting cornea concentrations [4-6]. Except for amphotericin B, resulting cornea concentrations of antifungal agents, including voriconazole, which was intrastromally administered to treat fungal keratitis cases, are not presently documented [5]. For posaconazole, an alternative broad-spectrum triazole agent which shows promise in treating refractory fungal keratitis cases, ocular pharmacokinetics was studied in one clinical observation in the absence of cornea concentration measurement [7]. Thus the aim of this study was to document for the first time in rats the efficiency of intrastromal voriconazole and posaconazole administrations, and posaconazole eye drop instillations, in maintaining potentially therapeutic cornea concentrations.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Voriconazole and posaconazole preparations

Voriconazole and posaconazole solutions (10 mg/mL and 18 mg/mL, respectively) were prepared by diluting lyophilisates (Vfend, Pfizer, Paris, France, and Noxafil, MSD, Courbevoie, France) in sterile injection water.

### 2.2 Subjects

Five weeks old male SPF Sprague-Dawley, 150 g rats (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) were housed 3 per cage. This study was approved by the *ad hoc* local ethical committee (No. 00755.02) and all experiments were performed in compliance with the European Community regulation for laboratory animal care and use (Directive 2010/63/UE). Rats were anesthetized intraperitoneally by mixed 2/3 ketamine and 1/3 xylazine hydrochlorides. Twenty-nine and 28 rats received intrastromal triazole injections consisting of 1 µL of above solutions, respectively, administered under microscopic examination in the left eye (10 µL Hamilton syringes, 32 gauge needles). At sequential times post-injection (Table 1), 5 or 4 animals were killed, and cornea and blood samples were collected and frozen. Posaconazole (1.8% solution) eye drops were administered for 6 days in right eyes (see regimens and sampling times in Table 2).

### *2.3 Determination of voriconazole and posaconazole concentrations in rat cornea and plasma samples*

Cornea samples were thawed and weighed in microtubes, and 100  $\mu\text{L}$  of an extraction solution containing the internal standards (deuterated VCZ-d5 or PSZ-D5, 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in acetonitrile) was added to each cornea sample (or to 50  $\mu\text{L}$  of plasma). The mixtures were vortexed for 10 sec, sonicated for 15 min (cornea samples), centrifuged, and 1 mL of supernatant was injected into the chromatographic system. The liquid chromatography-tandem mass spectrometry procedure was performed as previously described [6, 8]. For voriconazole and posaconazole, lower limits of detection and quantification were 0.005  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively (*i.e.* rounded 0.005 ng/mg and 0.1 ng/mg of cornea, assuming that >90 % of cornea weight was due to its water content) [9]. The assay was validated according to the FDA and EMA guidelines for bioanalytical methods validation. Within-run and between runs accuracy and precision were <15% of nominal concentrations and <15% CV for the LC-MS/MS assay.

### *2.4 Data analysis*

Concentrations were expressed in means  $\pm$  1 SD. Differences between groups were investigated using Student's *t* test, thus assuming normal like distributions of values (Kolmogorov-Smirnov  $p > 0.01$  in most groups of 5 rats). *p* values lower than 0.05 were considered significant.

### 3. Results

#### *3.1 Cornea and plasma voriconazole and posaconazole concentrations following intrastromal injection*

As shown in Table 1, mean cornea voriconazole concentration exceeded 300 ng/mg at 30 min post-intrastromal injection, a rapid decrease was observed until 6 h ( $p < 0.005$ ), and concentrations were very low from 6 h to day 6. Plasma levels remained very low from 30 min until day 6. Mean posaconazole cornea concentration reached 264.2 ng/mg at 30 min, decreased further from 6 h to 48 h ( $p < 0.05$ ) and remained very low until 144 h. In contrast, corresponding posaconazole plasma concentrations increased until 72 h ( $p = 0.02$ ) and plateaued on day 6 (0.4  $\mu\text{g/mL}$ ).

#### *3.2 Cornea posaconazole during topical treatment*

Using day time, hourly posaconazole eye drops instillations, average cornea concentration reached  $>70$  ng/mg 3 h post-first instillation, and dropped until 24 h ( $p < 0.02$ , Table 2), thus more efficient in maintaining posaconazole cornea levels than further 7 times a day time, every 2 hours instillations ( $p = 0.049$ ), and further 4 times a day time, every 4 hours instillations ( $p = 0.035$ ).

### 4. Discussion

Cornea concentrations of more than 250 ng/mg obtained 30 min post-intrastromal injections of both voriconazole or posaconazole were much higher than previously reported fungicidal concentrations [10-13]. Such levels, however, were short-lived since at 3 h, they were reduced by factors of 280 and 7.5, respectively, and low concentrations were further

observed. For voriconazole, data are consistent with the reported lack of benefits of using intrastromal instead of topical therapy as an adjunct to natamycin in human fungal keratitis cases [14], and for posaconazole, they reveal a similar sharp drop in cornea concentrations within few hours. Plasma concentrations were constantly very low for voriconazole while interestingly increasing until more than 0.40 ng/mL at 72 h for posaconazole, consistent with slow posaconazole absorption and elimination observed in several species including rats [15]. Moreover, repeated eye drops installation resulted in some systemic absorption and progressive diffusion and accumulation of posaconazole in rat plasma.

Cornea posaconazole concentrations assessed for the first time after eye drops instillation alone were found dependent on instillation frequency. They were similar to concentrations of 0.25 µg/mL (vitreous) and 0.9 µg/mL (aqueous humor) obtained using concomitant oral and eye drops administrations in one clinical case with *Fusarium solani* keratitis and endophthalmitis [7]. Data suggest that posaconazole eye drops may offer an alternative with fewer side effects to the systemic route successfully used in the management of some cases of refractory fungal keratitis [16].

Rapid triazole diffusion might be facilitated by low molecular weight for the partially hydrophilic voriconazole, and a solubilizer for the lipophilic, posaconazole [17]. The absence of cornea reservoir effect previously reported for topical voriconazole in rats was confirmed after intrastromal voriconazole and posaconazole injection, and for topical posaconazole by the dependence of cornea concentrations on instillation frequency [6]. Triazole diffusion is a contrast with high molecular amphotericin B which topically does not enter stroma when corneal epithelium is left in place, and of which intrastromal injections resulted in persisting corneal levels well above MICs of most yeast [5]. Present intrastromal triazole data suggest that intrastromal amphotericin B is a preferred option to manage fungal keratitis.

For human *Acanthamoeba* keratitis, a severe sight-threatening infectious disease, effective and safe medical therapy remains highly debated [18]. Recently, using antifungal triazole, in particular voriconazole, resulted in encouraging results experimentally *in vivo* [6], and to treat human *Acanthamoeba* keratitis cases [2], but underlined the need for high voriconazole cornea concentrations. *In vitro* cyst inhibition activity of voriconazole was reported at 4,59 µg/mL or higher concentrations for collection strains and clinical isolates and the minimal cysticidal concentration of posaconazole was previously established at 43.75 and 52.5 µg/mL for clinical isolates and ATCC strains, respectively [19, 20]. Present data suggest that cysticidal concentrations were maintained for only 30 min and 3 hours after voriconazole and posaconazole intrastromal injections, respectively, and that hourly posaconazole eye drops maintained potentially cysticidal cornea concentrations for at least 3 hours prompts to further study of the efficacy of frequent and prolonged topical instillations of posaconazole which was not used so far to treat human *Acanthamoeba* keratitis cases. Anti-trophozoite IC 90 were previously reported for voriconazole from 2.86 to 52.85 µg/mL [6, 21], and not yet determined for posaconazole.

Present data, which document the limitations of triazole intra-stromal administration, and the potential of topical posaconazole administration, prompt to further evaluate topical posaconazole regimens to ensure pertinent clinical applications in severe keratitis cases.

## **Acknowledgments**

We are grateful to Charles Hervouet for his technical assistance.

## **Declarations**

**Funding:** Financial support was obtained from the University of Rouen Normandie, Rouen, France. R.R is a postdoc fellow supported by the university of Rouen Normandie, Rouen, France and the Normandie region, France.

**Competing interests:** None.

**Ethical Approval:** This study was approved by the *ad hoc* local ethical committee (No. 00755.02) and all experiments were performed in compliance with the European Community regulation for laboratory animal care and use (Directive 2010/63/UE).

**Table 1.** Cornea and plasma concentrations after voriconazole and posaconazole intrastromal injections.

Time post-intrastromal injection (h)	Voriconazole concentration		Posaconazole concentration	
	Left cornea (ng/mg)	Plasma (µg/ml)	Left cornea (ng/mg)	Plasma (µg/ml)
<b>0.5</b>	303 ± 93.22	0.026 ± 0.017	264.3 ± 109.4	N.A.
<b>3</b>	1.07 ± 0.37	0.008 ± 0.001	35.3 ± 14.0	0.1 ± 0.1
<b>6</b>	0.19 ± 0.15	0.010 ± 0.005	3.7 ± 2.0	0.2 ± 0.1
<b>24</b>	0.05 ± 0.06	0.001 ± 0.002	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.1
<b>48</b>	0.10 ± 0.09	0	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.2
<b>72</b>	N.A.	N.A.	0.2 ± 0.2	0.4 ± 0.1
<b>144 (6 days)</b>	0.46 ± 0.55	0.001 ± 0.002	0.6 ± 0.2	0.4 ± 0.2

Results expressed in mean concentrations +/- 1 SD in 5 rats for each post-injection time (except for voriconazole at 6 days and for posaconazole at 3 h, 24 h, and 6 h with 4 rats each) N.A.: not available



**Table 2.** Posaconazole cornea concentration in the course of instillation sequences

<b>Posaconazole eye drops regimen</b>		<b>(Time post-first instillation)</b>
		<b>Posaconazole right cornea mean concentration ng/mg ± 1 SD</b>
		<b>(Number of rats)</b>
<b>First instillation sequence</b>	<b>Subsequent instillation sequence</b>	
<b>(Frequency/duration)</b>	<b>(Frequency/duration)</b>	
<b>Hourly (13 times a day, 8 AM to 8 PM)/ 2 days</b>	<b>None</b>	(3 h) 74.1 ± 27.8 (4)
		(6 h) 28.8 ± 17.7 (4)
		(24 h) 14.8 ± 9.3 (5)
<b>Hourly (13 times a day, 8 AM to 8 PM)/ 2 days</b>	<b>Every 2 hours (7 times a day, 8 AM to 8 PM)/ 2 days</b>	(48 h) 23.6 ± 8.3 (5)
		(72 h) 6.3 ± 3.6 (5)
<b>Hourly (13 times a day, 8 AM to 8 PM)/ 2 days</b>	<b>Every 2 hours (7 times a day, 8 AM to 8 PM) /2 days then every 4 hours (4 times a day 8 AM to 20 PM)/ 2 days</b>	(144 h) 11.2 ± 2.8 (5)

**Results expressed in mean concentrations +/- 1 SD in 5 rats for each post-first instillation time (except for posaconazole at 3 h and 6 h with 4 rats each).**

- [1] Girmenia C, Iori AP. An update on the safety and interactions of antifungal drugs in stem cell transplant recipients. *Expert Opin Drug Saf.* 2017;16:329-39.
- [2] Bang S, Edell E, Eghrari AO, Gottsch JD. Treatment with voriconazole in 3 eyes with resistant *Acanthamoeba* keratitis. *American journal of ophthalmology.* 2010;149:66-9.
- [3] Austin A, Lietman T, Rose-Nussbaumer J. Update on the Management of Infectious Keratitis. *Ophthalmology.* 2017;124:1678-89.
- [4] Sponsel W, Chen N, Dang D, Paris G, Graybill J, Najvar LK, et al. Topical voriconazole as a novel treatment for fungal keratitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:262-8.
- [5] Qu L, Li L, Xie H. Corneal and aqueous humor concentrations of amphotericin B using three different routes of administration in a rabbit model. *Ophthalmic Res.* 2010;43:153-8.
- [6] Gueudry J, Le Goff L, Compagnon P, Lefevre S, Colasse E, Aknine C, et al. Evaluation of voriconazole anti-*Acanthamoeba polyphaga* in vitro activity, rat cornea penetration and efficacy against experimental rat *Acanthamoeba* keratitis. *J Antimicrob Chemother.* 2018.
- [7] Sponsel WE, Graybill JR, Nevarez HL, Dang D. Ocular and systemic posaconazole(SCH-56592) treatment of invasive *Fusarium solani* keratitis and endophthalmitis. *The British journal of ophthalmology.* 2002;86:829-30.
- [8] Lamoureux F, Dufлот T, Woillard JB, Metsu D, Pereira T, Compagnon P, et al. Impact of CYP2C19 genetic polymorphisms on voriconazole dosing and exposure in adult patients with invasive fungal infections. *Int J Antimicrob Agents.* 2016;47:124-31.
- [9] Cahane M, Ben Simon GJ, Barequet IS, Grinbaum A, Diamanstein-Weiss L, Goller O, et al. Human corneal stromal tissue concentration after consecutive doses of topically applied 3.3% vancomycin. *The British journal of ophthalmology.* 2004;88:22-4.

- [10] Halliday CL, Chen SC, Kidd SE, van Hal S, Chapman B, Heath CH, et al. Antifungal susceptibilities of non-*Aspergillus* filamentous fungi causing invasive infection in Australia: support for current antifungal guideline recommendations. *Int J Antimicrob Agents*. 2016;48:453-8.
- [11] Uchida K, Yokota N, Yamaguchi H. In vitro antifungal activity of posaconazole against various pathogenic fungi. *Int J Antimicrob Agents*. 2001;18:167-72.
- [12] Morace G, Polonelli L, Group G. Voriconazole activity against clinical yeast isolates: a multicentre Italian study. *Int J Antimicrob Agents*. 2005;26:247-53.
- [13] Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN, Group SP. Antifungal activities of posaconazole, ravuconazole, and voriconazole compared to those of itraconazole and amphotericin B against 239 clinical isolates of *Aspergillus* spp. and other filamentous fungi: report from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2000. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:1032-7.
- [14] Sharma N, Chacko J, Velpandian T, Titiyal JS, Sinha R, Satpathy G, et al. Comparative evaluation of topical versus intrastromal voriconazole as an adjunct to natamycin in recalcitrant fungal keratitis. *Ophthalmology*. 2013;120:677-81.
- [15] Agency EM. Posaconazole, Scientific Discussion. 2005.
- [16] Al-Hatmi AMS, Bonifaz A, Ranque S, Sybren de Hoog G, Verweij PE, Meis JF. Current antifungal treatment of fusariosis. *Int J Antimicrob Agents*. 2018;51:326-32.
- [17] Maertens J, Cornely OA, Ullmann AJ, Heinz WJ, Krishna G, Patino H, et al. Phase 1B study of the pharmacokinetics and safety of posaconazole intravenous solution in patients at risk for invasive fungal disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58:3610-7.

- [18] Dart JK, Saw VP, Kilvington S. Acanthamoeba keratitis: diagnosis and treatment update 2009. *American journal of ophthalmology*. 2009;148:487-99.
- [19] Martin-Navarro CM, Lopez-Arencibia A, Arnalich-Montiel F, Valladares B, Pinero JE, Lorenzo-Morales J. Evaluation of the in vitro activity of commercially available moxifloxacin and voriconazole eye-drops against clinical strains of Acanthamoeba. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology*. 2013;251:2111-7.
- [20] Iovieno A, Miller D, Ledee DR, Alfonso EC. Cysticidal activity of antifungals against different genotypes of Acanthamoeba. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58:5626-8.
- [21] Rocha-Cabrera P, Reyes-Batlle M, Martin-Navarro CM, Dorta-Gorriñ A, Lopez-Arencibia A, Sifaoui I, et al. Detection of Acanthamoeba on the ocular surface in a Spanish population using the Schirmer strip test: pathogenic potential, molecular classification and evaluation of the sensitivity to chlorhexidine and voriconazole of the isolated Acanthamoeba strains. *J Med Microbiol*. 2015;64:849-53.

## 4 Discussion et perspectives

En complément du développement de nouveaux composés ou de nouveaux procédés thérapeutiques, l'étude et la connaissance de la pharmacocinétique des molécules utilisées dans la prise en charge thérapeutique des KA semblent être un élément déterminant pour l'amélioration des chances de réussite de guérison de la maladie. Les difficultés thérapeutiques sont ainsi en partie liées à la résistance intrinsèque des kystes d'*Acantamoeba* nécessitant des concentrations importantes des composés actifs et des propriétés de la cornée qui présente 3 couches successives de polarité différente compliquant la pénétration des molécules.

Nos travaux ont permis de montrer que l'augmentation de la concentration du PHMB en collyre pouvait améliorer le devenir sous traitement en limitant l'évolution des KA expérimentales. Cette efficacité relative de non progression de la KA nous a fait étudier d'autres molécules. Les triazolés sont utilisés de manière empirique en clinique humaine et leur étude sur notre modèle expérimental nous a paru tout à fait pertinente. Ainsi, de manière similaire, l'efficacité du voriconazole a pu être montrée en limitant la progression des formes stromales pendant la période de fréquence d'instillations importante qui permettait d'atteindre des concentrations intrastromales hautes avec une diminution de l'efficacité du voriconazole dès que la fréquence d'instillation était réduite et par voie de conséquence la concentration intrastromale. La faisabilité et l'étude de la pharmacocinétique du voriconazole nous a paru intéressante pour essayer d'obtenir des concentrations encore supérieures qui pour certains auteurs rendent le voriconazole kysticide, ce qui n'a pas été confirmée dans nos travaux. Nous avons pu montrer que cette voie intrastromale permettait

d'obtenir effectivement des concentrations extrêmement hautes mais cependant de très courte durée ce qui limite grandement son bénéfice en clinique. Nous avons donc émis l'hypothèse que le relatif faible poids moléculaire pouvait être en cause dans la diffusion rapide du voriconazole, c'est pour cela que nous avons pratiqué la même expérience avec du posaconazole. Il s'agit d'un antifongique de nouvelle génération triazolé, disponible depuis peu sous forme injectable, de plus haut poids moléculaire que le voriconazole en pensant que cela aiderait à maintenir des concentrations élevées plus longtemps. Les hautes concentrations se maintiennent un peu plus longtemps que le voriconazole mais avec une fréquence de réinjection haute ce qui limite aussi son utilité en clinique. En revanche, les concentrations cornéennes semblent intéressantes en collyre, car elles se maintiennent à des niveaux potentiellement thérapeutiques malgré une fréquence d'instillation réduite.

Alors que le traitement habituel de la KA repose en grande partie sur le PHMB 0,02%, il semblerait utile de pouvoir augmenter sa concentration. L'étude clinique du projet ODAK a débuté depuis un an et a pour but d'obtenir les autorisations de commercialisation d'un collyre au PHMB. Il s'agit d'un essai clinique de phase 3, randomisé, en double aveugle mené chez des sujets atteints de KA. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'efficacité, l'innocuité et la tolérance de l'association du collyre à 0,08% de PHMB + placebo par rapport au traitement conventionnel collyre PHMB à 0,02% de + collyre propamidine à 0,1%.

L'utilisation du voriconazole au cours de la KA semblerait donc utile mais en favorisant la forme en collyre avec une fréquence d'instillation importante plutôt que la voie systémique. En effet le collyre permet l'obtention d'une concentration plus

haute que la voie orale et de plus sans les effets secondaires notamment hépatiques. L'association collyre et voie orale a probablement un intérêt dans le maintien de concentration plus stable à mettre cependant en balance avec les effets secondaires.

Nos travaux initialement axés sur la KA nous apportent des enseignements sur la prise en charge des kératites fongiques. Actuellement, la voie intrastromale est facilement utilisée dans les kératites fongiques réfractaires. On peut se poser la question de choisir entre l'amphotéricine B molécule plus ancienne et le voriconazole, plus récent et largement utilisé en ophtalmologie pour sa bonne diffusion. D'après nos travaux, il semble donc plus pertinent de maintenir l'utilisation des injections intracornéennes d'amphotéricine B plutôt que de changer pour le voriconazole car les niveaux thérapeutiques se maintiennent de manière plus prolongée, ce qui n'est pas le cas du voriconazole.

La principale limite de nos travaux est la difficulté de reproduire les conditions de cliniques humaines. Nous avons utilisé un modèle animal de KA qui ne reflète pas complètement la physiopathologie de la KA humaine. En effet, comme nous l'avons vu *Acanthamoeba* pénètre d'abord dans l'épithélium, moment où la KA semble plus facilement accessible au traitement médical et d'ailleurs avec des succès thérapeutiques fréquents à ce stade puis *Acanthamoeba* pénètre dans le stroma avec à partir de ce moment une plus grande difficulté d'accès aux différents traitements et de moindres succès thérapeutiques. Notre modèle consiste en l'injection dans le stroma d'*Acanthamoeba* et a l'avantage d'induire plus facilement une KA expérimentale également plus sévère. Ceci a pour conséquence de mettre en avant plus difficilement une efficacité des molécules testées du fait de la gravité de la kératite et de la réaction inflammatoire induite et de diminuer la pertinence des tests

microbiologiques effectués à partir de grattages épithéliaux. Par ailleurs, chez l'homme les collyres sont instillés au début de la KA toutes les heures jour et nuit, et le traitement est prolongé sur plusieurs mois, ce qui est difficilement reproductible en laboratoire.

De nombreux travaux restent à réaliser dans le domaine de la KA tant les difficultés thérapeutiques sont grandes et le pronostic mauvais. L'optimisation du traitement de la KA est primordiale. Au delà du développement de nouvelles molécules et de systèmes innovants, tester de manière plus systématique d'abord *in vitro* les associations médicamenteuses pourrait apporter une aide pour optimiser le traitement. Actuellement l'association biguanides, diamidines et voriconazole en collyre semble le traitement à conseiller. La mise à disposition prochaine probablement du PHMB à 0,08% grâce à l'étude ODAK pourra faciliter la prise en charge des patients. Dans le but d'augmenter la concentration intrastromale des biguanides, il faudrait s'interroger sur la faisabilité du PHMB en injection intrastromale. De manière parallèle, la mise au point de la mesure effective des concentrations de biguanides obtenues dans le stroma cornéen serait une grande avancée.

La place de la corticothérapie est à préciser et cela pourrait passer par une étude prospective multicentrique. Par ailleurs, le moment de la kératoplastie n'est pas codifié. Ainsi, existe-t-il une utilité à la kératoplastie dite « à chaud » ou thérapeutique en l'absence de raison tectonique comme une perforation imminente de grande taille ? Cette étude semble plus facilement réalisable en étude rétrospective en étudiant le pronostic à long terme des patients issus de centres avec une prise en charge différente.



Dans l'avenir, La mise au point d'un « *anti-Acanthamoebagramme* » sera éventuellement possible. La mise au point de cette procédure pourrait passer dans un premier temps par une analyse plus rétrospective du pronostic de la KA en fonction de la souche isolée cliniquement.

Ce travail ouvre des perspectives pour des travaux futurs que nous espérons pouvoir mener au sein du laboratoire :

1. Identifier les géotypes d'*Acanthamoeba* spp. isolées au cours de l'essai clinique européen ODAK
2. Etudier, *in vitro*, la sensibilité d'*Acanthamoeba* au posaconazole en analysant des souches de références et des souches cliniques
3. Approfondir l'étude de la pharmacocinétique du posaconazole en collyre dans la cornée en fonction de la présence ou non de l'épithélium cornéen
4. Etudier, *in vivo*, l'intérêt du posaconazole en collyre sur un modèle expérimental de KA si l'étude *in vitro* confirme une sensibilité d'*Acanthamoeba* spp.
5. Mettre au point un modèle de kératite à *Fusarium* chez le rat par injection intrastromale afin de pouvoir tester *in vivo* l'efficacité du posaconazole en collyre dans cette indication.

## **5 Références bibliographiques**

1. Naginton, J., P.G. Watson, T.J. Playfair, et al. Amoebic infection of the eye. *Lancet* 1974, 7896, 2: 1537-40.
2. Jones, D.B., G.S. Visvesvara, and N.M. Robinson. Acanthamoeba polyphaga keratitis and Acanthamoeba uveitis associated with fatal meningoencephalitis. *Trans Ophthalmol Soc U K* 1975, 2, 95: 221-32.
3. Jones, B.R., J.I. McGill, and A.D. Steele. Recurrent suppurative kerato-uveitis with loss of eye due to infection by Acanthamoeba castellani. *Trans Ophthalmol Soc U K* 1975, 2, 95: 210-3.
4. Ma, P., E. Willaert, K.B. Juechter, et al. A case of keratitis due to Acanthamoeba in New York, New York, and features of 10 cases. *J Infect Dis* 1981, 5, 143: 662-7.
5. Srinivasan, M., C.A. Gonzales, C. George, et al. Epidemiology and aetiological diagnosis of corneal ulceration in Madurai, south India. *Br J Ophthalmol* 1997, 11, 81: 965-71.
6. Bharathi, M.J., R. Ramakrishnan, R. Meenakshi, et al. Microbial keratitis in South India: influence of risk factors, climate, and geographical variation. *Ophthalmic Epidemiol* 2007, 2, 14: 61-9.
7. Houang, E., D. Lam, D. Fan, et al. Microbial keratitis in Hong Kong: relationship to climate, environment and contact-lens disinfection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001, 4, 95: 361-7.
8. Butler, T.K., J.J. Males, L.P. Robinson, et al. Six-year review of Acanthamoeba keratitis in New South Wales, Australia: 1997-2002. *Clin Exp Ophthalmol* 2005, 1, 33: 41-6.
9. Radford, C.F., D.C. Minassian, and J.K. Dart. Acanthamoeba keratitis in England and Wales: incidence, outcome, and risk factors. *Br J Ophthalmol* 2002, 5, 86: 536-42.
10. Verani, J.R., S.A. Lorick, J.S. Yoder, et al. National outbreak of Acanthamoeba keratitis associated with use of a contact lens solution, United States. *Emerg Infect Dis* 2009, 8, 15: 1236-42.
11. Khan, N.A., *Section A. Biology and phylogeogeny*, in *Acanthamoeba: biology and pathogenesis*. 2009: Norfolk, UK.
12. Lahr, D.J., L.W. Parfrey, E.A. Mitchell, et al. The chastity of amoebae: re-evaluating evidence for sex in amoeboid organisms. *Proc Biol Sci* 2011, 1715, 278: 2081-90.
13. Marciano-Cabral, F. and G. Cabral. Acanthamoeba spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev* 2003, 2, 16: 273-307.
14. Trabelsi, H., F. Dendana, A. Sellami, et al. Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review. *Pathol Biol (Paris)* 2012, 6, 60: 399-405.
15. Yera, H., P. Goldschmidt, and C. Chaumeil. Amibes libres : Acanthamoeba, Naegleria, Balamuthia *EMC - Biologie médicale* 20127(4):1-8.
16. Aitken, D., J. Hay, F.B. Kinnear, et al. Amebic keratitis in a wearer of disposable contact lenses due to a mixed Vahlkampfia and Hartmannella infection. *Ophthalmology* 1996, 3, 103: 485-94.
17. Inoue, T., S. Asari, K. Tahara, et al. Acanthamoeba keratitis with symbiosis of Hartmannella ameba. *Am J Ophthalmol* 1998, 5, 125: 721-3.
18. Tolba, M.E., E.A. Huseein, H.M. Farrag, et al. Allovahlkampfia spelaea Causing Keratitis in Humans. *PLoS Negl Trop Dis* 2016, 7, 10: e0004841.
19. Lorenzo-Morales, J., E. Martinez-Carretero, N. Batista, et al. Early diagnosis of amoebic keratitis due to a mixed infection with Acanthamoeba and Hartmannella. *Parasitol Res* 2007, 1, 102: 167-9.

20. Pinna, A., T. Porcu, F. Boscia, et al. Free-Living Amoebae Keratitis. *Cornea* 2017, 7, 36: 785-90.
21. Aimard, L., P. Brasseur, L. Favennec, et al. Amebic keratitis due to a mixed infection with *Acanthamoeba* and *Hartmannella* species. *Clin Infect Dis* 1998, 1, 26: 187-8.
22. Dua, H.S., A. Azuara-Blanco, M. Hossain, et al. Non-*Acanthamoeba* amebic keratitis. *Cornea* 1998, 6, 17: 675-7.
23. Kennedy, S.M., P. Devine, C. Hurley, et al. Corneal infection associated with *Hartmannella vermiformis* in contact-lens wearer. *Lancet* 1995, 8975, 346: 637-8.
24. Visvesvara, G.S. Classification of *Acanthamoeba*. *Rev Infect Dis* 1991;13 Suppl 5: S369-72.
25. Sun, X., *Etiology*, in *Acanthamoeba keratitis*, Springer, Editor. 2017.
26. Stothard, D.R., J. Hay, J.M. Schroeder-Diedrich, et al. Fluorescent oligonucleotide probes for clinical and environmental detection of *Acanthamoeba* and the T4 18S rRNA gene sequence type. *J Clin Microbiol* 1999, 8, 37: 2687-93.
27. Corsaro, D., J. Walochnik, M. Kohsler, et al. *Acanthamoeba* misidentification and multiple labels: redefining genotypes T16, T19, and T20 and proposal for *Acanthamoeba micheli* sp. nov. (genotype T19). *Parasitol Res* 2015, 7, 114: 2481-90.
28. Gast, R.J., D.R. Ledee, P.A. Fuerst, et al. Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: four nuclear 18S rDNA sequence types. *J Eukaryot Microbiol* 1996, 6, 43: 498-504.
29. Stothard, D.R., J.M. Schroeder-Diedrich, M.H. Awwad, et al. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *J Eukaryot Microbiol* 1998, 1, 45: 45-54.
30. Fuerst, P.A. Insights from the DNA databases: approaches to the phylogenetic structure of *Acanthamoeba*. *Exp Parasitol* 2014;145 Suppl: S39-45.
31. Zhang, Y., X. Sun, Z. Wang, et al. Identification of 18S ribosomal DNA genotype of *Acanthamoeba* from patients with keratitis in North China. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004, 6, 45: 1904-7.
32. Schroeder, J.M., G.C. Booton, J. Hay, et al. Use of subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoeba* from humans with keratitis and from sewage sludge. *J Clin Microbiol* 2001, 5, 39: 1903-11.
33. Cerva, L. *Acanthamoeba culbertsoni* and *Naegleria fowleri*: occurrence of antibodies in man. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 1989, 1, 33: 99-103.
34. Cursons, R.T., T.J. Brown, E.A. Keys, et al. Immunity to pathogenic free-living amoebae: role of humoral antibody. *Infect Immun* 1980, 2, 29: 401-7.
35. Rivera, F., F. Medina, P. Ramirez, et al. Pathogenic and free-living protozoa cultured from the nasopharyngeal and oral regions of dental patients. *Environ Res* 1984, 2, 33: 428-40.
36. Szczotka-Flynn, L.B., E. Pearlman, and M. Ghannoum. Microbial contamination of contact lenses, lens care solutions, and their accessories: a literature review. *Eye Contact Lens* 2010, 2, 36: 116-29.
37. Badenoch, P.R., A.M. Johnson, P.E. Christy, et al. Pathogenicity of *Acanthamoeba* and a *Corynebacterium* in the rat cornea. *Arch Ophthalmol* 1990, 1, 108: 107-12.

38. Garate, M., Z. Cao, E. Bateman, et al. Cloning and characterization of a novel mannose-binding protein of *Acanthamoeba*. *J Biol Chem* 2004, 28, 279: 29849-56.
39. Clarke, D.W. and J.Y. Niederkorn. The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis. *Trends Parasitol* 2006, 4, 22: 175-80.
40. Niederkorn, J.Y., J.E. Ubelaker, J.P. McCulley, et al. Susceptibility of corneas from various animal species to in vitro binding and invasion by *Acanthamoeba castellanii* [corrected]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992, 1, 33: 104-12.
41. Jaison, P.L., Z. Cao, and N. Panjwani. Binding of *Acanthamoeba* to [corrected] mannose-glycoproteins of corneal epithelium: effect of injury. *Curr Eye Res* 1998, 8, 17: 770-6.
42. Alizadeh, H., S. Neelam, M. Hurt, et al. Role of contact lens wear, bacterial flora, and mannose-induced pathogenic protease in the pathogenesis of amoebic keratitis. *Infect Immun* 2005, 2, 73: 1061-8.
43. Hurt, M., J. Niederkorn, and H. Alizadeh. Effects of mannose on *Acanthamoeba castellanii* proliferation and cytolytic ability to corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003, 8, 44: 3424-31.
44. Leher, H., R. Silvano, H. Alizadeh, et al. Mannose induces the release of cytopathic factors from *Acanthamoeba castellanii*. *Infect Immun* 1998, 1, 66: 5-10.
45. Hurt, M., S. Neelam, J. Niederkorn, et al. Pathogenic *Acanthamoeba* spp secrete a mannose-induced cytolytic protein that correlates with the ability to cause disease. *Infect Immun* 2003, 11, 71: 6243-55.
46. Cao, Z., D.M. Jefferson, and N. Panjwani. Role of carbohydrate-mediated adherence in cytopathogenic mechanisms of *Acanthamoeba*. *J Biol Chem* 1998, 25, 273: 15838-45.
47. Cho, J.H., B.K. Na, T.S. Kim, et al. Purification and characterization of an extracellular serine proteinase from *Acanthamoeba castellanii*. *IUBMB Life* 2000, 3, 50: 209-14.
48. Hadas, E. and T. Mazur. Proteolytic enzymes of pathogenic and non-pathogenic strains of *Acanthamoeba* spp. *Trop Med Parasitol* 1993, 3, 44: 197-200.
49. Pidherney, M.S., H. Alizadeh, G.L. Stewart, et al. In vitro and in vivo tumoricidal properties of a pathogenic/free-living amoeba. *Cancer Lett* 1993, 1-2, 72: 91-8.
50. Pettit, D.A., J. Williamson, G.A. Cabral, et al. In vitro destruction of nerve cell cultures by *Acanthamoeba* spp.: a transmission and scanning electron microscopy study. *J Parasitol* 1996, 5, 82: 769-77.
51. Clarke, D.W., H. Alizadeh, and J.Y. Niederkorn. Failure of *Acanthamoeba castellanii* to produce intraocular infections. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005, 7, 46: 2472-8.
52. Marciano-Cabral, F. and D.M. Toney. The interaction of *Acanthamoeba* spp. with activated macrophages and with macrophage cell lines. *J Eukaryot Microbiol* 1998, 4, 45: 452-8.
53. Stewart, G.L., I. Kim, K. Shupe, et al. Chemotactic response of macrophages to *Acanthamoeba castellanii* antigen and antibody-dependent macrophage-mediated killing of the parasite. *J Parasitol* 1992, 5, 78: 849-55.
54. Ferrante, A. and T.J. Abell. Conditioned medium from stimulated mononuclear leukocytes augments human neutrophil-mediated killing of a virulent *Acanthamoeba* sp. *Infect Immun* 1986, 2, 51: 607-17.

55. Stewart, G.L., K. Shupe, I. Kim, et al. Antibody-dependent neutrophil-mediated killing of *Acanthamoeba castellanii*. *Int J Parasitol* 1994, 5, 24: 739-42.
56. van Klink, F., W.M. Taylor, H. Alizadeh, et al. The role of macrophages in *Acanthamoeba keratitis*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996, 7, 37: 1271-81.
57. Hurt, M., S. Apte, H. Leher, et al. Exacerbation of *Acanthamoeba keratitis* in animals treated with anti-macrophage inflammatory protein 2 or antineutrophil antibodies. *Infect Immun* 2001, 5, 69: 2988-95.
58. Alizadeh, H., Y. He, J.P. McCulley, et al. Successful immunization against *Acanthamoeba keratitis* in a pig model. *Cornea* 1995, 2, 14: 180-6.
59. Clarke, D.W. and J.Y. Niederkorn. The immunobiology of *Acanthamoeba keratitis*. *Microbes Infect* 2006, 5, 8: 1400-5.
60. Chew, H.F., E.H. Yildiz, K.M. Hammersmith, et al. Clinical outcomes and prognostic factors associated with *acanthamoeba keratitis*. *Cornea* 2011, 4, 30: 435-41.
61. Ibrahim, Y.W., D.L. Boase, and I.A. Cree. Factors affecting the epidemiology of *Acanthamoeba keratitis*. *Ophthalmic Epidemiol* 2007, 2, 14: 53-60.
62. Radford, C.F., O.J. Lehmann, and J.K. Dart. *Acanthamoeba keratitis*: multicentre survey in England 1992-6. National *Acanthamoeba Keratitis Study Group*. *Br J Ophthalmol* 1998, 12, 82: 1387-92.
63. Dart, J.K., V.P. Saw, and S. Kilvington. *Acanthamoeba keratitis*: diagnosis and treatment update 2009. *Am J Ophthalmol* 2009, 4, 148: 487-99 e2.
64. Seal, D.V. *Acanthamoeba keratitis* update-incidence, molecular epidemiology and new drugs for treatment. *Eye (Lond)* 2003, 8, 17: 893-905.
65. Watt, K. and H.A. Swarbrick. Microbial keratitis in overnight orthokeratology: review of the first 50 cases. *Eye Contact Lens* 2005, 5, 31: 201-8.
66. Cope, J.R., S.A. Collier, O.D. Schein, et al. *Acanthamoeba Keratitis* among Rigid Gas Permeable Contact Lens Wearers in the United States, 2005 through 2011. *Ophthalmology* 2016, 7, 123: 1435-41.
67. Hiti, K., J. Walochnik, E. Maria Haller-Schober, et al. Efficacy of contact lens storage solutions against different *acanthamoeba* strains. *Cornea* 2006, 4, 25: 423-7.
68. Patel, A. and K. Hammersmith. Contact lens-related microbial keratitis: recent outbreaks. *Curr Opin Ophthalmol* 2008, 4, 19: 302-6.
69. *ISO 18259, Ophthalmic optics – Contact lens care products – Method to assess contact lens care products with contact lenses in a lens case, challenged with bacterial and fungal organisms*. 2014.
70. Acharya, N.R., T.M. Lietman, and T.P. Margolis. Parasites on the rise: a new epidemic of *Acanthamoeba keratitis*. *Am J Ophthalmol* 2007, 2, 144: 292-3.
71. Stehr-Green, J.K., T.M. Bailey, and G.S. Visvesvara. The epidemiology of *Acanthamoeba keratitis* in the United States. *Am J Ophthalmol* 1989, 4, 107: 331-6.
72. Sharma, S., P. Garg, and G.N. Rao. Patient characteristics, diagnosis, and treatment of non-contact lens related *Acanthamoeba keratitis*. *Br J Ophthalmol* 2000, 10, 84: 1103-8.
73. Balasubramanya, R., P. Garg, S. Sharma, et al. *Acanthamoeba keratitis* after LASIK. *J Refract Surg* 2006, 6, 22: 616-7.
74. Claerhout, I., A. Goegebuer, C. Van Den Broecke, et al. Delay in diagnosis and outcome of *Acanthamoeba keratitis*. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2004, 8, 242: 648-53.

75. Bacon, A.S., J.K. Dart, L.A. Ficker, et al. Acanthamoeba keratitis. The value of early diagnosis. *Ophthalmology* 1993, 8, 100: 1238-43.
76. Tu, E.Y., C.E. Joslin, and M.E. Shoff. Successful treatment of chronic stromal acanthamoeba keratitis with oral voriconazole monotherapy. *Cornea* 2010, 9, 29: 1066-8.
77. Bacon, A.S., D.G. Frazer, J.K. Dart, et al. A review of 72 consecutive cases of Acanthamoeba keratitis, 1984-1992. *Eye (Lond)* 19937 ( Pt 6): 719-25.
78. Sun, X., Y. Zhang, R. Li, et al. Acanthamoeba keratitis: clinical characteristics and management. *Ophthalmology* 2006, 3, 113: 412-6.
79. Mathers, W.D., M.A. Goldberg, J.E. Sutphin, et al. Coexistent Acanthamoeba keratitis and herpetic keratitis. *Arch Ophthalmol* 1997, 6, 115: 714-8.
80. Awwad, S.T., W.M. Petroll, J.P. McCulley, et al. Updates in Acanthamoeba keratitis. *Eye Contact Lens* 2007, 1, 33: 1-8.
81. Iovieno, A., D.M. Gore, N. Carnt, et al. Acanthamoeba sclerokeratitis: epidemiology, clinical features, and treatment outcomes. *Ophthalmology* 2014, 12, 121: 2340-7.
82. Illingworth, C.D. and S.D. Cook. Acanthamoeba keratitis. *Surv Ophthalmol* 1998, 6, 42: 493-508.
83. Herz, N.L., A.Y. Matoba, and K.R. Wilhelmus. Rapidly progressive cataract and iris atrophy during treatment of Acanthamoeba keratitis. *Ophthalmology* 2008, 5, 115: 866-9.
84. Awwad, S.T., M. Heilman, R.N. Hogan, et al. Severe reactive ischemic posterior segment inflammation in acanthamoeba keratitis: a new potentially blinding syndrome. *Ophthalmology* 2007, 2, 114: 313-20.
85. Raghavan, A., S. Baidwal, P. Vijayaraghavan, et al. Diagnostic Evaluation of Co-Occurrence of Acanthamoeba and Fungi in Keratitis: A Preliminary Report. *Cornea* 2018, 2, 37: 227-34.
86. Iovieno, A., D.R. Ledee, D. Miller, et al. Detection of bacterial endosymbionts in clinical acanthamoeba isolates. *Ophthalmology* 2010, 3, 117: 445-52, 52 e1-3.
87. Balczun, C. and P.L. Scheid. Free-Living Amoebae as Hosts for and Vectors of Intracellular Microorganisms with Public Health Significance. *Viruses* 2017, 4, 9.
88. Siddiqui, R. and N.A. Khan. Biology and pathogenesis of Acanthamoeba. *Parasit Vectors* 20125: 6.
89. Paterson, G.N., M. Rittig, R. Siddiqui, et al. Is Acanthamoeba pathogenicity associated with intracellular bacteria? *Exp Parasitol* 2011, 2, 129: 207-10.
90. Tu, E.Y., C.E. Joslin, L.M. Nijm, et al. Polymicrobial keratitis: Acanthamoeba and infectious crystalline keratopathy. *Am J Ophthalmol* 2009, 1, 148: 13-9 e2.
91. Carnt, N., D. Robaei, D.C. Minassian, et al. Acanthamoeba keratitis in 194 patients: risk factors for bad outcomes and severe inflammatory complications. *Br J Ophthalmol* 2018.
92. Chew, S.J., R.W. Beuerman, M. Assouline, et al. Early diagnosis of infectious keratitis with in vivo real time confocal microscopy. *CLAO J* 1992, 3, 18: 197-201.
93. Bourcier, T., B. Dupas, V. Borderie, et al. Heidelberg retina tomograph II findings of Acanthamoeba keratitis. *Ocul Immunol Inflamm* 2005, 6, 13: 487-92.



94. Labbe, A., C. Khammari, B. Dupas, et al. Contribution of in vivo confocal microscopy to the diagnosis and management of infectious keratitis. *Ocul Surf* 2009, 1, 7: 41-52.
95. Vaddavalli, P.K., P. Garg, S. Sharma, et al. Role of confocal microscopy in the diagnosis of fungal and acanthamoeba keratitis. *Ophthalmology* 2011, 1, 118: 29-35.
96. Villani, E., C. Baudouin, N. Efron, et al. In vivo confocal microscopy of the ocular surface: from bench to bedside. *Curr Eye Res* 2014, 3, 39: 213-31.
97. Fust, A., J. Toth, G. Simon, et al. Specificity of in vivo confocal cornea microscopy in Acanthamoeba keratitis. *Eur J Ophthalmol* 2017, 1, 27: 10-15.
98. Tu, E.Y., C.E. Joslin, J. Sugar, et al. The relative value of confocal microscopy and superficial corneal scrapings in the diagnosis of Acanthamoeba keratitis. *Cornea* 2008, 7, 27: 764-72.
99. Kanavi, M.R., M. Javadi, S. Yazdani, et al. Sensitivity and specificity of confocal scan in the diagnosis of infectious keratitis. *Cornea* 2007, 7, 26: 782-6.
100. Hau, S.C., J.K. Dart, M. Vesaluoma, et al. Diagnostic accuracy of microbial keratitis with in vivo scanning laser confocal microscopy. *Br J Ophthalmol* 2010, 8, 94: 982-7.
101. De Craene, S., J. Knoeri, C. Georgeon, et al. Assessment of Confocal Microscopy for the Diagnosis of Polymerase Chain Reaction-Positive Acanthamoeba Keratitis: A Case-Control Study. *Ophthalmology* 2018, 2, 125: 161-68.
102. Parmar, D.N., S.T. Awwad, W.M. Petroll, et al. Tandem scanning confocal corneal microscopy in the diagnosis of suspected acanthamoeba keratitis. *Ophthalmology* 2006, 4, 113: 538-47.
103. Zamfir, O., H. Yera, T. Bourcier, et al. Diagnostic par PCR des kératites   Acanthamoeba spp. *J Fr Ophthalmol* 2006, 9, 29: 1034-40.
104. Goldschmidt, P., H. Rostane, C. Saint-Jean, et al. Effects of topical anaesthetics and fluorescein on the real-time PCR used for the diagnosis of Herpesviruses and Acanthamoeba keratitis. *Br J Ophthalmol* 2006, 11, 90: 1354-6.
105. Riviere, D., F.M. Szczebara, J.M. Berjeaud, et al. Development of a real-time PCR assay for quantification of Acanthamoeba trophozoites and cysts. *J Microbiol Methods* 2006, 1, 64: 78-83.
106. Qvarnstrom, Y., G.S. Visvesvara, R. Sriram, et al. Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of Acanthamoeba spp., Balamuthia mandrillaris, and Naegleria fowleri. *J Clin Microbiol* 2006, 10, 44: 3589-95.
107. Thompson, P.P., R.P. Kowalski, R.M. Shanks, et al. Validation of real-time PCR for laboratory diagnosis of Acanthamoeba keratitis. *J Clin Microbiol* 2008, 10, 46: 3232-6.
108. Itahashi, M., S. Higaki, M. Fukuda, et al. Utility of real-time polymerase chain reaction in diagnosing and treating acanthamoeba keratitis. *Cornea* 2011, 11, 30: 1233-7.
109. Khairnar, K., G.S. Tamber, F. Ralevski, et al. Comparison of molecular diagnostic methods for the detection of Acanthamoeba spp. from clinical specimens submitted for keratitis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011, 4, 70: 499-506.
110. Larkin, D.F., S. Kilvington, and D.L. Easty. Contamination of contact lens storage cases by Acanthamoeba and bacteria. *Br J Ophthalmol* 1990, 3, 74: 133-5.

111. Alexandrakis, G., R. Haimovici, D. Miller, et al. Corneal biopsy in the management of progressive microbial keratitis. *Am J Ophthalmol* 2000, 5, 129: 571-6.
112. Allan, B.D. and J.K. Dart. Strategies for the management of microbial keratitis. *Br J Ophthalmol* 1995, 8, 79: 777-86.
113. Dupin, O. and C. Trinquand. [Ocular drug penetration]. *J Fr Ophtalmol* 2000, 5, 23: 501-4; quiz 23.
114. Alkharashi, M., K. Lindsley, H.A. Law, et al. Medical interventions for acanthamoeba keratitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2015, 2: CD010792.
115. Elder, M.J., S. Kilvington, and J.K. Dart. A clinicopathologic study of in vitro sensitivity testing and Acanthamoeba keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994, 3, 35: 1059-64.
116. Bourcier, T., J. Letsch, A. Sauer, et al. Kératites amibiennes. *EMC-Ophthalmologie* 2013, Article 21-200-D-25, 10(3).
117. Mafra, C.S., L.C. Carrijo-Carvalho, A.M. Chudzinski-Tavassi, et al. Antimicrobial action of biguanides on the viability of Acanthamoeba cysts and assessment of cell toxicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013, 9, 54: 6363-72.
118. Lim, L., D.J. Coster, and P.R. Badenoch. Antimicrobial susceptibility of 19 Australian corneal isolates of Acanthamoeba. *Clin Exp Ophthalmol* 2000, 2, 28: 119-24.
119. Perez-Santonja, J.J., S. Kilvington, R. Hughes, et al. Persistently culture positive acanthamoeba keratitis: in vivo resistance and in vitro sensitivity. *Ophthalmology* 2003, 8, 110: 1593-600.
120. Vasseneix, C., G. Gargala, A. Francois, et al. A keratitis rat model for evaluation of anti-Acanthamoeba polyphaga agents. *Cornea* 2006, 5, 25: 597-602.
121. Ruddell, T.J. and D.L. Easty. Drug therapy in a murine model of Acanthamoeba keratitis. *Eye (Lond)* 1995, ( Pt 1): 142-3.
122. Polat, Z.A., J. Walochnik, A. Obwaller, et al. Miltefosine and polyhexamethylene biguanide: a new drug combination for the treatment of Acanthamoeba keratitis. *Clin Experiment Ophthalmol* 2014, 2, 42: 151-8.
123. Carrijo-Carvalho, L.C., V.P. Sant'ana, A.S. Foronda, et al. Therapeutic agents and biocides for ocular infections by free-living amoebae of Acanthamoeba genus. *Surv Ophthalmol* 2017, 2, 62: 203-18.
124. Gilbert, P. and L.E. Moore. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J Appl Microbiol* 2005, 4, 99: 703-15.
125. Lee, J.E., B.S. Oum, H.Y. Choi, et al. Cysticidal effect on acanthamoeba and toxicity on human keratocytes by polyhexamethylene biguanide and chlorhexidine. *Cornea* 2007, 6, 26: 736-41.
126. Khunkitti, W., S.V. Avery, D. Lloyd, et al. Effects of biocides on Acanthamoeba castellanii as measured by flow cytometry and plaque assay. *J Antimicrob Chemother* 1997, 2, 40: 227-33.
127. Khunkitti, W., A.C. Hann, D. Lloyd, et al. Biguanide-induced changes in Acanthamoeba castellanii: an electron microscopic study. *J Appl Microbiol* 1998, 1, 84: 53-62.
128. Kowalski, R.P., S. Abdel Aziz, E.G. Romanowski, et al. Development of a practical complete-kill assay to evaluate anti-Acanthamoeba drugs. *JAMA Ophthalmol* 2013, 11, 131: 1459-62.
129. Narasimhan, S., H.N. Madhavan, and L.T. K. Development and application of an in vitro susceptibility test for Acanthamoeba species isolated from keratitis

- to polyhexamethylene biguanide and chlorhexidine. *Cornea* 2002, 2, 21: 203-5.
130. Turner, N.A., A.D. Russell, J.R. Furr, et al. Emergence of resistance to biocides during differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. *J Antimicrob Chemother* 2000, 1, 46: 27-34.
  131. Larkin, D.F., S. Kilvington, and J.K. Dart. Treatment of *Acanthamoeba* keratitis with polyhexamethylene biguanide. *Ophthalmology* 1992, 2, 99: 185-91.
  132. Larkin, D.F., M. Berry, and D.L. Easty. In vitro corneal pathogenicity of *Acanthamoeba*. *Eye (Lond)* 19915 ( Pt 5): 560-8.
  133. Kilvington, S., R. Hughes, J. Byas, et al. Activities of therapeutic agents and myristamidopropyl dimethylamine against *Acanthamoeba* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2002, 6, 46: 2007-9.
  134. Wright, P., D. Warhurst, and B.R. Jones. *Acanthamoeba* keratitis successfully treated medically. *Br J Ophthalmol* 1985, 10, 69: 778-82.
  135. Brasseur, G., L. Favennec, D. Perrine, et al. Successful treatment of *Acanthamoeba* keratitis by hexamidine. *Cornea* 1994, 5, 13: 459-62.
  136. Perrine, D., J.P. Chenu, P. Georges, et al. Amoebicidal efficiencies of various diamidines against two strains of *Acanthamoeba* polyphaga. *Antimicrob Agents Chemother* 1995, 2, 39: 339-42.
  137. Lim, N., D. Goh, C. Bunce, et al. Comparison of polyhexamethylene biguanide and chlorhexidine as monotherapy agents in the treatment of *Acanthamoeba* keratitis. *Am J Ophthalmol* 2008, 1, 145: 130-5.
  138. Hay, J., C.M. Kirkness, D.V. Seal, et al. Drug resistance and *Acanthamoeba* keratitis: the quest for alternative antiprotozoal chemotherapy. *Eye (Lond)* 19948 ( Pt 5): 555-63.
  139. Seal, D., J. Hay, C. Kirkness, et al. Successful medical therapy of *Acanthamoeba* keratitis with topical chlorhexidine and propamidine. *Eye (Lond)* 199610 ( Pt 4): 413-21.
  140. Duguid, I.G., J.K. Dart, N. Morlet, et al. Outcome of *acanthamoeba* keratitis treated with polyhexamethyl biguanide and propamidine. *Ophthalmology* 1997, 10, 104: 1587-92.
  141. Azuara-Blanco, A., A.S. Sadiq, M. Hussain, et al. Successful medical treatment of *Acanthamoeba* keratitis. *Int Ophthalmol* 1997, 4, 21: 223-7.
  142. Ficker, L., D. Seal, D. Warhurst, et al. *Acanthamoeba* keratitis--resistance to medical therapy. *Eye (Lond)* 1990, 4 ( Pt 6): 835-8.
  143. Ishibashi, Y., Y. Matsumoto, T. Kabata, et al. Oral itraconazole and topical miconazole with debridement for *Acanthamoeba* keratitis. *Am J Ophthalmol* 1990, 2, 109: 121-6.
  144. Lamb, D.C., A.G. Warrilow, N.J. Rolley, et al. Azole Antifungal Agents To Treat the Human Pathogens *Acanthamoeba castellanii* and *Acanthamoeba* polyphaga through Inhibition of Sterol 14alpha-Demethylase (CYP51). *Antimicrob Agents Chemother* 2015, 8, 59: 4707-13.
  145. Martin-Navarro, C.M., A. Lopez-Arencibia, I. Sifaoui, et al. Statins and voriconazole induce programmed cell death in *Acanthamoeba castellanii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2015, 5, 59: 2817-24.
  146. Bang, S., E. Edell, A.O. Eghrari, et al. Treatment with voriconazole in 3 eyes with resistant *Acanthamoeba* keratitis. *Am J Ophthalmol* 2010, 1, 149: 66-9.
  147. Rocha-Cabrera, P., M. Reyes-Batlle, C.M. Martin-Navarro, et al. Detection of *Acanthamoeba* on the ocular surface in a Spanish population using the Schirmer strip test: pathogenic potential, molecular classification and

- evaluation of the sensitivity to chlorhexidine and voriconazole of the isolated Acanthamoeba strains. *J Med Microbiol* 2015, 8, 64: 849-53.
148. Schuster, F.L., B.J. Guglielmo, and G.S. Visvesvara. In-vitro activity of miltefosine and voriconazole on clinical isolates of free-living amebas: *Balamuthia mandrillaris*, *Acanthamoeba* spp., and *Naegleria fowleri*. *J Eukaryot Microbiol* 2006, 2, 53: 121-6.
  149. Sunada, A., K. Kimura, I. Nishi, et al. In vitro evaluations of topical agents to treat *Acanthamoeba* keratitis. *Ophthalmology* 2014, 10, 121: 2059-65.
  150. Martin-Navarro, C.M., A. Lopez-Arencibia, F. Arnalich-Montiel, et al. Evaluation of the in vitro activity of commercially available moxifloxacin and voriconazole eye-drops against clinical strains of *Acanthamoeba*. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2013, 9, 251: 2111-7.
  151. Iovieno, A., D. Miller, D.R. Ledee, et al. Cysticidal activity of antifungals against different genotypes of *Acanthamoeba*. *Antimicrob Agents Chemother* 2014, 9, 58: 5626-8.
  152. Bouyer, S., C. Imbert, G. Daniault, et al. Effect of caspofungin on trophozoites and cysts of three species of *Acanthamoeba*. *J Antimicrob Chemother* 2007, 1, 59: 122-4.
  153. Walochnik, J., M. Duchene, K. Seifert, et al. Cytotoxic activities of alkylphosphocholines against clinical isolates of *Acanthamoeba* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2002, 3, 46: 695-701.
  154. Mrva, M., M. Garajova, M. Lukac, et al. Weak cytotoxic activity of miltefosine against clinical isolates of *Acanthamoeba* spp. *J Parasitol* 2011, 3, 97: 538-40.
  155. Polat, Z.A., A. Obwaller, A. Vural, et al. Efficacy of miltefosine for topical treatment of *Acanthamoeba* keratitis in Syrian hamsters. *Parasitol Res* 2012, 2, 110: 515-20.
  156. Varga, J.H., T.C. Wolf, H.G. Jensen, et al. Combined treatment of *Acanthamoeba* keratitis with propamidine, neomycin, and polyhexamethylene biguanide. *Am J Ophthalmol* 1993, 4, 115: 466-70.
  157. Thebpatiphat, N., K.M. Hammersmith, F.N. Rocha, et al. *Acanthamoeba* keratitis: a parasite on the rise. *Cornea* 2007, 6, 26: 701-6.
  158. Hargrave, S.L., J.P. McCulley, and Z. Husseini. Results of a trial of combined propamidine isethionate and neomycin therapy for *Acanthamoeba* keratitis. Brolene Study Group. *Ophthalmology* 1999, 5, 106: 952-7.
  159. Taravaud, A., P.M. Loiseau, and S. Pomel. In vitro evaluation of antimicrobial agents on *Acanthamoeba* sp. and evidence of a natural resilience to amphotericin B. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 2017, 3, 7: 328-36.
  160. Gatti, S., C. Cevini, A. Bruno, et al. In vitro effectiveness of povidone-iodine on *Acanthamoeba* isolates from human cornea. *Antimicrob Agents Chemother* 1998, 9, 42: 2232-4.
  161. Osato, M.S., N.M. Robinson, K.R. Wilhelmus, et al. In vitro evaluation of antimicrobial compounds for cysticidal activity against *Acanthamoeba*. *Rev Infect Dis* 1991; 13 Suppl 5: S431-5.
  162. Tu, E.Y., M.E. Shoff, W. Gao, et al. Effect of low concentrations of benzalkonium chloride on *Acanthamoeba* survival and its potential impact on empirical therapy of infectious keratitis. *JAMA Ophthalmol* 2013, 5, 131: 595-600.
  163. Park, D.H., D.A. Palay, S.M. Daya, et al. The role of topical corticosteroids in the management of *Acanthamoeba* keratitis. *Cornea* 1997, 3, 16: 277-83.

164. McClellan, K., K. Howard, J.Y. Niederkorn, et al. Effect of steroids on Acanthamoeba cysts and trophozoites. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001, 12, 42: 2885-93.
165. Rabinovitch, T., S.S. Weissman, H.B. Ostler, et al. Acanthamoeba keratitis: clinical signs and analysis of outcome. *Rev Infect Dis* 1991; 13 Suppl 5: S427.
166. Stern, G.A. and M. Buttross. Use of corticosteroids in combination with antimicrobial drugs in the treatment of infectious corneal disease. *Ophthalmology* 1991, 6, 98: 847-53.
167. Mannis, M.J., R. Tamaru, A.M. Roth, et al. Acanthamoeba sclerokeratitis. Determining diagnostic criteria. *Arch Ophthalmol* 1986, 9, 104: 1313-7.
168. Lee, G.A., T.B. Gray, J.K. Dart, et al. Acanthamoeba sclerokeratitis: treatment with systemic immunosuppression. *Ophthalmology* 2002, 6, 109: 1178-82.
169. Brooks, J.G., Jr., D.J. Coster, and P.R. Badenoch. Acanthamoeba keratitis. Resolution after epithelial debridement. *Cornea* 1994, 2, 13: 186-9.
170. Matoba, A.Y., P.D. Pare, T.D. Le, et al. The effects of freezing and antibiotics on the viability of Acanthamoeba cysts. *Arch Ophthalmol* 1989, 3, 107: 439-40.
171. Binder, P.S. Cryotherapy for medically unresponsive acanthamoeba keratitis. *Cornea* 1989, 2, 8: 106-14.
172. Atia, R., L. Jouve, J. Knoeri, et al. [Corneal collagen cross-linking to treat infectious keratitis]. *J Fr Ophthalmol* 2018.
173. Berra, M., G. Galperin, G. Boscaro, et al. Treatment of Acanthamoeba keratitis by corneal cross-linking. *Cornea* 2013, 2, 32: 174-8.
174. del Buey, M.A., J.A. Cristobal, P. Casas, et al. Evaluation of in vitro efficacy of combined riboflavin and ultraviolet a for Acanthamoeba isolates. *Am J Ophthalmol* 2012, 3, 153: 399-404.
175. Kashiwabuchi, R.T., F.R. Carvalho, Y.A. Khan, et al. Assessing efficacy of combined riboflavin and UV-A light (365 nm) treatment of Acanthamoeba trophozoites. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011, 13, 52: 9333-8.
176. Letsch, J., A. Abou-Bacar, E. Candolfi, et al. [Evaluation of in vitro efficacy of combined riboflavin and ultraviolet-A (365 nm) for Acanthamoeba]. *J Fr Ophthalmol* 2015, 3, 38: 213-9.
177. Lamy, R., E. Chan, S.D. Good, et al. Riboflavin and ultraviolet A as adjuvant treatment against Acanthamoeba cysts. *Clin Exp Ophthalmol* 2016, 3, 44: 181-7.
178. Makdoui, K., A. Backman, J. Mortensen, et al. Comparison of UVA- and UVA/riboflavin-induced growth inhibition of Acanthamoeba castellanii. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2013, 2, 251: 509-14.
179. Papaioannou, L., M. Miligkos, and M. Papathanassiou. Corneal Collagen Cross-Linking for Infectious Keratitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cornea* 2016, 1, 35: 62-71.
180. Hager, T., A. Hasenpus, T. Stachon, et al. Crosslinking and corneal cryotherapy in acanthamoeba keratitis -- a histological study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2016, 1, 254: 149-53.
181. Kandori, M., T. Inoue, M. Shimabukuro, et al. Four cases of Acanthamoeba keratitis treated with phototherapeutic keratectomy. *Cornea* 2010, 10, 29: 1199-202.
182. Taenaka, N., M. Fukuda, T. Hibino, et al. Surgical therapies for Acanthamoeba keratitis by phototherapeutic keratectomy and deep lamellar keratoplasty. *Cornea* 2007, 7, 26: 876-9.

183. Kitzmann, A.S., K.M. Goins, J.E. Sutphin, et al. Keratoplasty for treatment of Acanthamoeba keratitis. *Ophthalmology* 2009, 5, 116: 864-9.
184. Kashiwabuchi, R.T., D. de Freitas, L.S. Alvarenga, et al. Corneal graft survival after therapeutic keratoplasty for Acanthamoeba keratitis. *Acta Ophthalmol* 2008, 6, 86: 666-9.
185. Awwad, S.T., D.N. Parmar, M. Heilman, et al. Results of penetrating keratoplasty for visual rehabilitation after Acanthamoeba keratitis. *Am J Ophthalmol* 2005, 6, 140: 1080-84.
186. Robaei, D., N. Carnt, D.C. Minassian, et al. Therapeutic and optical keratoplasty in the management of Acanthamoeba keratitis: risk factors, outcomes, and summary of the literature. *Ophthalmology* 2015, 1, 122: 17-24.
187. Anshu, A., A. Parthasarathy, J.S. Mehta, et al. Outcomes of therapeutic deep lamellar keratoplasty and penetrating keratoplasty for advanced infectious keratitis: a comparative study. *Ophthalmology* 2009, 4, 116: 615-23.
188. Parthasarathy, A. and D.T. Tan. Deep lamellar keratoplasty for acanthamoeba keratitis. *Cornea* 2007, 8, 26: 1021-3.
189. Por, Y.M., J.S. Mehta, J.L. Chua, et al. Acanthamoeba keratitis associated with contact lens wear in Singapore. *Am J Ophthalmol* 2009, 1, 148: 7-12 e2.
190. Sarnicola, E., C. Sarnicola, F. Sabatino, et al. Early Deep Anterior Lamellar Keratoplasty (DALK) for Acanthamoeba Keratitis Poorly Responsive to Medical Treatment. *Cornea* 2016, 1, 35: 1-5.
191. Arora, T., S. Arora, and V. Sharma. Early Deep Anterior Lamellar Keratoplasty (DALK) for Acanthamoeba Keratitis-How to Define Early? *Cornea* 2016, 6, 35: e14.
192. Abdulhalim, B.E., M.M. Wagih, A.A. Gad, et al. Amniotic membrane graft to conjunctival flap in treatment of non-viral resistant infectious keratitis: a randomised clinical study. *Br J Ophthalmol* 2015, 1, 99: 59-63.
193. Bourcier, T., F. Patteau, V. Borderie, et al. Intérêt de la greffe de membrane amniotique dans le traitement des kératites amibiennes sévères. *Can J Ophthalmol* 2004, 6, 39: 621-31.
194. Kim, J.S., J.C. Kim, T.W. Hahn, et al. Amniotic membrane transplantation in infectious corneal ulcer. *Cornea* 2001, 7, 20: 720-6.
195. Vontobel, S.F., E.M. Abad-Villar, C. Kaufmann, et al. Corneal Penetration of Polyhexamethylene Biguanide and Chlorhexidine Digluconate. *Clinical & Experimental Ophthalmology* 2015, 3, 6.
196. Xuguang, S., L. Yanchuang, Z. Feng, et al. Pharmacokinetics of chlorhexidine gluconate 0.02% in the rabbit cornea. *J Ocul Pharmacol Ther* 2006, 4, 22: 227-30.
197. Mathers, W. Use of higher medication concentrations in the treatment of acanthamoeba keratitis. *Arch Ophthalmol* 2006, 6, 124: 923.
198. Ku, J.Y., F.M. Chan, and P. Beckingsale. Acanthamoeba keratitis cluster: an increase in Acanthamoeba keratitis in Australia. *Clin Exp Ophthalmol* 2009, 2, 37: 181-90.
199. Jiang, C., X. Sun, Z. Wang, et al. Acanthamoeba keratitis: clinical characteristics and management. *Ocul Surf* 2015, 2, 13: 164-8.
200. Kalaiselvi, G., S. Narayana, T. Krishnan, et al. Intrastromal voriconazole for deep recalcitrant fungal keratitis: a case series. *Br J Ophthalmol* 2015, 2, 99: 195-8.

201. Tu, E.Y., C.E. Joslin, J. Sugar, et al. Prognostic factors affecting visual outcome in Acanthamoeba keratitis. *Ophthalmology* 2008, 11, 115: 1998-2003.
202. Robaei, D., N. Carnt, D.C. Minassian, et al. The impact of topical corticosteroid use before diagnosis on the outcome of Acanthamoeba keratitis. *Ophthalmology* 2014, 7, 121: 1383-8.
203. Bouheraoua, N., T. Gaujoux, P. Goldschmidt, et al. Prognostic factors associated with the need for surgical treatments in acanthamoeba keratitis. *Cornea* 2013, 2, 32: 130-6.
204. Ikeda, Y., D. Miyazaki, K. Yakura, et al. Assessment of real-time polymerase chain reaction detection of Acanthamoeba and prognosis determinants of Acanthamoeba keratitis. *Ophthalmology* 2012, 6, 119: 1111-9.
205. Yamazoe, K., Y. Yamamoto, S. Shimazaki-Den, et al. Visual outcome in Japanese patients with Acanthamoeba keratitis. *Eye (Lond)* 2012, 4, 26: 517-22.
206. He, Y.G., J.P. McCulley, H. Alizadeh, et al. A pig model of Acanthamoeba keratitis: transmission via contaminated contact lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992, 1, 33: 126-33.
207. Ren, M. and X. Wu. Evaluation of three different methods to establish animal models of Acanthamoeba keratitis. *Yonsei Med J* 2010, 1, 51: 121-7.
208. Ortilles, A., P. Goni, E. Rubio, et al. A Rabbit Model of Acanthamoeba Keratitis: Use of Infected Soft Contact Lenses After Corneal Epithelium Debridement With a Diamond Burr. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017, 2, 58: 1218-27.

## **Contribution à l'étude de nouveaux agents anti-amibiens dans un modèle expérimental de kératite à *Acanthamoeba* chez le rat**

La kératite à *Acanthamoeba* (KA) est une kératite infectieuse rare et grave, potentiellement cécitante. L'infection est causée par *Acanthamoeba* spp., un protozoaire ubiquitaire présent dans le sol, l'air et l'eau. Jusqu'à 85% des cas de KA sont associés au port de lentilles cornéennes, et plus rarement suite à un traumatisme. Actuellement, aucune molécule n'a d'autorisation de mise sur le marché dans cette indication dans l'Union européenne et aux États-Unis. Ces dernières années, des combinaisons d'agents anti-amibiens tels que les biguanides et les diamidines ont été utilisées comme traitement de référence. Cependant, les schémas thérapeutiques et les concentrations d'agents actifs reposent sur des données empiriques. Récemment, le voriconazole, antifongique triazolé, a été utilisé avec succès pour traiter des KA humaines. Malgré cela, la communauté ophtalmologique se heurte le plus souvent dans les formes sévères à de grandes difficultés de prise en charge et se retrouve parfois en situation d'impasse thérapeutique. La perte fonctionnelle et anatomique de l'œil est encore possible. A partir d'un modèle de KA chez le rat, plusieurs molécules et voies d'administration ont été testées. Dans une première partie, en lien avec projet européen ODAK (Orphan drug for *Acanthamoeba* Keratitis), nos travaux ont suggéré qu'une concentration de collyre PHMB supérieure ou égale à 0,04% devait être préférée. Dans une deuxième partie, nous avons pu montrer la supériorité du voriconazole en collyre par rapport à la voie orale. Enfin, l'étude de la pharmacocinétique du voriconazole et du posaconazole après injections directes intracornéennes, démontre leur faible utilité en clinique humaine du fait de la fréquence nécessaire de réinjection, bien que des analyses complémentaires concernant le posaconazole en collyre pour confirmer son intérêt soient nécessaires. L'ensemble de ces travaux pourrait permettre d'adapter les protocoles thérapeutiques de la KA.

## **Contribution to the study of new anti-amoebic agents in an experimental model of *Acanthamoeba* keratitis in rats**

*Acanthamoeba* keratitis (AK) is a rare and severe form of infectious keratitis, which is potentially sight-threatening. The infection is caused by *Acanthamoeba* spp. a common protozoan present in soil, air and water. Up to 85% of AK cases are associated with contact lens wearing, more rarely after corneal injury. Currently, there are no agents approved for the treatment of AK in the European Union or in the United States of America. In recent years, combinations of unlicensed anti-amoebic agents such as biguanides and diamidines have been used as the reference treatment. Treatment regimens and concentrations of active agents are based on empirical data. Recently, voriconazole, a mono-triazole, was successfully used to treat cases of human AK. Despite this, the ophthalmological community is most often faced with severe forms of the disease with severe management difficulties and sometimes with a situation of therapeutic impasse. The functional and anatomical loss of an eye can occur. Several agents and routes of administration have been tested in a rat model of AK. First, as part of the European ODAK project (Orphan drug for *Acanthamoeba* Keratitis), our work suggested that a concentration of PHMB eye drops greater than or equal to 0.04% should be preferred. Second, we were able to show the superiority of voriconazole in eye drops compared to the oral route. Finally, our study on the pharmacokinetics of voriconazole and posaconazole after intrastromal injections, demonstrates their low utility in human because of the need for frequent reinjection. Nevertheless, additional analyses are necessary to confirm the interest of posaconazole eye drops. All of this work could make it possible to adapt the therapeutic protocols of AK.