

Évaluation d'une technique de rep-PCR semi-automatisée pour le génotypage de souches du complexe Pseudallescheria boydii / Scedosporium apiospermum au cours de la mucoviscidose

Julien Matray

▶ **To cite this version:**

Julien Matray. Évaluation d'une technique de rep-PCR semi-automatisée pour le génotypage de souches du complexe Pseudallescheria boydii / Scedosporium apiospermum au cours de la mucoviscidose. Sciences pharmaceutiques. 2013. dumas-00916347

HAL Id: dumas-00916347

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00916347

Submitted on 10 Dec 2013

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.

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE ROUEN

ANNÉE : **2012 / 2013** N° :

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

Diplôme d'Études Spécialisées de Biologie Médicale

PAR

Olivier MATRAY

NÉ LE **3 décembre 1985** À **Bois-Guillaume**

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE : **15 octobre 2013**

Évaluation d'une technique de rep-PCR semi-automatisée pour le génotypage de souches du complexe *Pseudallescheria boydii* / *Scedosporium apiospermum* au cours de la mucoviscidose.

PRÉSIDENT DU JURY : **Pr. Christophe MARGUET**
DIRECTEUR DE THÈSE : **Pr. Loïc FAVENNEC**
MEMBRES DU JURY : **Pr Jean-Philippe BOUCHARA**
Dr. Stéphane DOMINIQUE
Dr. Gilles GARGALA
Pr. Luc THIBERVILLE

LISTE DES PROFESSEURS DE LA FACULTÉ

ANNÉE UNIVERSITAIRE 2012 – 2013 U.F.R. DE MÉDECINE - PHARMACIE DE ROUEN

DOYEN : **Professeur Pierre FREGER**

ASSESSEURS : **Professeur Michel GUERBET**
Professeur Benoit VEBER
Professeur Pascal JOLY
Professeur Bernard PROUST

DOYENS HONORAIRES **:** **Professeurs J. BORDE - Ph. LAURET - H. PIGUET - C. THUILLEZ**

PROFESSEURS HONORAIRES : **MM. M.P. AUGUSTIN - J. ANDRIEU-GUITRANCOURT – M. BENOZIO - J. BORDE - Ph. BRASSEUR - R. COLIN - E. COMOY - J. DALION - DESHAYES - C. FESSARD - J.P. FILLASTRE - P. FRIGOT - J.GARNIER - J. HEMET- B. HILLEMAND – G. HUMBERT – J.M.JOUANY – R. LAUMONIER – Ph. LAURET – M. LE FUR – J.P.LEMERCIER – J.P. LEMOINE – Mlle. MAGARD – MM. B.MAITROT – M. MAISONNET – F. MATRAY – P. MITROFANOFF – Mme. A.M. ORECCHIONI – MM P. PASQUIS – H. PIGUET – M.SAMSON – Mme. SAMSON-DOLLFUS – MM. J.C. SCHRUB – R.SOYER – B. TARDIF – TESTART – J.M. THOMINE – C. THUILLEZ – P. TRON – C. WINCKLER – L.M. WOLF**

I - MÉDECINE

PROFESSEURS

M. Frédéric **ANSELME**	HCN	Cardiologie
Mme Isabelle **AUQUIT AUCKBUR**	HCN	Chirurgie plastique
M. Bruno **BACHY**	HCN	Chirurgie pédiatrique
M. Fabrice **BAUER**	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya **BEKRI**	HCN	Biochimie / Biologie moléculaire
M. Jacques **BENICHOU**	HCN	Biostatistiques / Informatique médicale
M. Jean-Paul **BESSOU**	HCN	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
Mme Françoise **BEURET-BLANQUART**	CRMPR	Médecine physique et de réadaptation
M. Guy **BONMARCHAND**	HCN	Réanimation médicale
M. Olivier **BOYER**	UFR	Immunologie
M. Jean-François **CAILLARD** *(Surnombre)*	HCN	Médecine et santé au travail
M. François **CARON**	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
M. Philippe **CHASSAGNE**	HB	Médecine interne / Gériatrie
M. Vincent **COMPERE**	HCN	Anesthésiologie / Réanimation chirurgicale
M. Alain **CRIBIER** *(Surnombre)*	HCN	Cardiologie
M. Antoine **CUVELIER**	HB	Pneumologie
M. Pierre **CZERNICHOW**	HCH	Épidémiologie / Économie de la santé
M. Jean-Nicolas **DACHER**	HCN	Radiologie / Imagerie médicale

M. Stéfan **DARMONI**	HCN	Informatique méd. /Techniques de communication
M. Pierre **DECHELOTTE**	HCN	Nutrition
Mme Danièle **DEHESDIN**	HCN	Oto-rhino-laryngologie
M. Jean **DOUCET**	HB	Thérapeutique / Médecine interne / Gériatrie
M. Bernard **DUBRAY**	CB	Radiothérapie
M. Philippe **DUCROTTE**	HCN	Hépato-gastro-entérologie
M. Frank **DUJARDIN**	HCN	Chirurgie orthopédique / Traumatologie
M. Fabrice **DUPARC**	HCN	Anatomie / Chir. orthopédique / Traumatologie
M. Bertrand **DUREUIL**	HCN	Anesthésiologie / Réanimation chirurgicale
Mle Hélène **ELTCHANINOFF**	HCN	Cardiologie
M. Thierry **FREBOURG**	UFR	Génétique
M. Pierre **FREGER**	HCN	Anatomie / Neurochirurgie
M. Jean François **GEHANNO**	HCN	Médecine et santé au travail
M. Emmanuel **GERARDIN**	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille **GERARDIN**	HCN	Pédopsychiatrie
M. Michel **GODIN**	HB	Néphrologie
M. Philippe **GRISE**	HCN	Urologie
M. Didier **HANNEQUIN**	HCN	Neurologie
M. Fabrice **JARDIN**	CB	Hématologie
M. Luc-Marie **JOLY**	HCN	Médecine d'urgence
M. Pascal **JOLY**	HCN	Dermato - vénéréologie
M. Jean-Marc **KUHN**	HB	Endocrinologie / Maladies métaboliques
Mme Annie **LAQUERRIERE**	HCN	Anatomie-cytologie pathologiques
M. Vincent **LAUDENBACH**	HCN	Anesthésie / Réanimation chirurgicale
M. Joël **LECHEVALLIER**	HCN	Chirurgie infantile
M. Hervé **LEFEBVRE**	HB	Endocrinologie / Maladies métaboliques
M. Thierry **LEQUERRE**	HB	Rhumatologie
M. Eric **LEREBOURS**	HCN	Nutrition
Mlle Anne-Marie **LEROI**	HCN	Physiologie
M. Hervé **LEVESQUE**	HB	Médecine interne
Mme Agnès **LIARD-ZMUDA**	HCN	Chirurgie infantile
M. Pierre-Yves **LITZLER**	HCN	Chirurgie cardiaque
M. Bertrand **MACE**	HCN	Histologie / Embryologie / Cytogénétique
M. Eric **MALLET** *(Surnombre)*	HCN	Pédiatrie
M. Christophe **MARGUET**	HCN	Pédiatrie
Mlle Isabelle **MARIE**	HB	Médecine interne
M. Jean-Paul **MARIE**	HCN	Oto-rhino-laryngologie
M. Loïc **MARPEAU**	HCN	Gynécologie / Obstétrique
M. Stéphane **MARRET**	HCN	Pédiatrie
Mme Véronique **MERLE**	HCN	Épidémiologie
M. Pierre **MICHEL**	HCN	Hépato-gastro-entérologie
M. Francis **MICHOT**	HCN	Chirurgie digestive

M. Bruno **MIHOUT** *(Surnombre)*	HCN	Neurologie
M. Pierre-Yves **MILLIEZ**	HCN	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique
M. Jean-François **MUIR**	HB	Pneumologie
M. Marc **MURAINE**	HCN	Ophtalmologie
M. Philippe **MUSETTE**	HCN	Dermatologie - vénéréologie
M. Christophe **PEILLON**	HCN	Chirurgie générale
M. Jean-Marc **PERON**	HCN	Stomatologie et chirurgie maxillo-faciale
M. Christian **PFISTER**	HCN	Urologie
M. Jean-Christophe **PLANTIER**	HCN	Bactériologie / Virologie
M. Didier **PLISSONNIER**	HCN	Chirurgie vasculaire
M. Bernard **PROUST**	HCN	Médecine légale
M. François **PROUST**	HCN	Neurochirurgie
Mme Nathalie **RIVES**	HCN	Biologie / Méd. du dévelop. et de la reprod.
M. Jean-Christophe **RICHARD** *(Mise en dispo)*	HCN	Réanimation médicale / Médecine d'urgence
M. Horace **ROMAN**	HCN	Gynécologie / Obstétrique
M. Jean-Christophe **SABOURIN**	HCN	Anatomie / Pathologie
M. Guillaume **SAVOYE**	HCN	Hépato-gastro-entérologie
Mme Céline **SAVOYE-COLLET**	HCN	Imagerie médicale
M. Michel **SCOTTE**	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne **TAMION**	HCN	Thérapeutique
Mlle Florence **THIBAUT**	HCN	Psychiatrie d'adultes
M. Luc **THIBERVILLE**	HCN	Pneumologie
M. Christian **THUILLEZ**	HB	Pharmacologie
M. Hervé **TILLY**	CB	Hématologie et transfusion
M. François **TRON** *(Surnombre)*	UFR	Immunologie
M. Jean-Jacques **TUECH**	HCN	Chirurgie digestive
M. Jean-Pierre **VANNIER**	HCN	Pédiatrie génétique
M. Benoît **VEBER**	HCN	Anesthésiologie / Réanimation chirurgicale
M. Pierre **VERA**	CB	Biophysique et traitement de l'image
M. Eric **VERIN**	CRMPR	Médecine physique et de réadaptation
M. Eric **VERSPYCK**	HCN	Gynécologie - obstétrique
M. Olivier **VITTECOQ**	HB	Rhumatologie
M. Jacques **WEBER**	HCN	Physiologie

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

Mme Noëlle **BARBIER-FREBOURG**	HCN	Bactériologie / Virologie
M. Jeremy **BELLIEN**	HCN	Pharmacologie
Mme Carole **BRASSE LAGNEL**	HCN	Biochimie
Mme Mireille **CASTANET**	HCN	Pédiatrie
M. Gérard **BUCHONNET**	HCN	Hématologie
Mme Nathalie **CHASTAN**	HCN	Physiologie

Mme Sophie **CLAEYSSENS**	HCN	Biochimie / Biologie moléculaire
M. Moïse **COEFFIER**	HCN	Nutrition
M. Manuel **ETIENNE**	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
M. Guillaume **GOURCEROL**	HCN	Physiologie
Mme Catherine **HAAS-HUBSCHER**	HCN	Anesthésie / Réanimation chirurgicale
M. Serge **JACQUOT**	UFR	Immunologie
M. Joël **LADNER**	HCN	Épidémiologie / Économie de la santé
M. Jean-Baptiste **LATOUCHE**	UFR	Biologie cellulaire
Mme Lucie **MARECHAL-GUYANT**	HCN	Neurologie
M. Thomas **MOUREZ**	HCN	Bactériologie
M. Jean-François **MENARD**	HCN	Biophysique
Mme Muriel **QUILLARD**	HCN	Biochimie / Biologie moléculaire
M. Vincent **RICHARD**	UFR	Pharmacologie
M. Francis **ROUSSEL**	HCN	Histologie / Embryologie / Cytogénétique
Mme Pascale **SAUGIER-VEBER**	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire **TOBENAS-DUJARDIN**	HCN	Anatomie

PROFESSEURS AGRÉGÉS OU CERTIFIÉS

Mme Dominique **LANIEZ**	UFR	Anglais
Mme Cristina **BADULESCU**	UFR	Communication

II – PHARMACIE

PROFESSEURS

M. Thierry **BESSON**	Chimie thérapeutique
M. Jean-Jacques **BONNET**	Pharmacologie
M. Roland **CAPRON** (PU-PH)	Biophysique
M. Jean **COSTENTIN** (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle **DUBUS**	Biochimie
M. Loïc **FAVENNEC** (PU-PH)	Parasitologie
M. Jean-Pierre **GOULLE**	Toxicologie
M. Michel **GUERBET**	Toxicologie
M. Olivier **LAFONT**	Chimie organique
Mme Isabelle **LEROUX**	Physiologie
Mme Martine **PESTEL-CARON** (PU-PH)	Microbiologie
Mme Elisabeth **SEGUIN**	Pharmacognosie
M. Jean-Marie **VAUGEOIS**	Pharmacologie
M. Philippe **VERITE**	Chimie analytique

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

Mlle Cécile **BARBOT**	Chimie générale et minérale
Mme Dominique **BOUCHER**	Pharmacologie
M. Frédéric **BOUNOURE**	Pharmacie galénique
M. Abdeslam **CHAGRAOUI**	Physiologie
M. Jean **CHASTANG**	Biomathématiques
Mme Marie-Catherine **CONCE-CHEMTOB**	Législation pharmaceutique / Économie de la santé
Mme Elizabeth **CHOSSON**	Botanique
Mlle Cécile **CORBIERE**	Biochimie
M. Eric **DITTMAR**	Biophysique
Mme Nathalie **DOURMAP**	Pharmacologie
Mlle Isabelle **DUBUC**	Pharmacologie
Mme Roseline **DUCLOS**	Pharmacie galénique
M. Abdelhakim **ELOMRI**	Pharmacognosie
M. François **ESTOUR**	Chimie organique
M. Gilles **GARGALA** (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Najla **GHARBI**	Chimie analytique
Mlle Marie-Laure **GROULT**	Botanique
M. Hervé **HUE**	Biophysique / Mathématiques
Mme Laëtitia **LE GOFF**	Parasitologie / Immunologie
Mme Hong **LU**	Biologie

Mme Sabine **MENAGER**	Chimie organique
Mme Christelle **MONTEIL**	Toxicologie
M. Paul **MULDER**	Sciences du médicament
M. Mohamed **SKIBA**	Pharmacie galénique
Mme Malika **SKIBA**	Pharmacie galénique
Mme Christine **THARASSE**	Chimie thérapeutique
M. Rémi **VARIN** (MCU-PH)	Pharmacie hospitalière
M. Frédéric **ZIEGLER**	Biochimie

PROFESSEUR ASSOCIÉ

Mme Sandrine **PANCHOU**	Pharmacie officinale

PROFESSEUR CONTRACTUEL

Mme Elizabeth **DE PAOLIS**	Anglais

ATTACHÉS TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

M. Mazim **MEKAOUI**	Chimie analytique
Mlle Virginie **OXARAN**	Microbiologie

III – MÉDECINE GÉNÉRALE

PROFESSEUR

M. Jean-Loup **HERMIL**	UFR	Médecine générale

PROFESSEURS ASSOCIÉS A MI-TEMPS

M. Pierre **FAINSILBER**	UFR	Médecine générale
M. Alain **MERCIER**	UFR	Médecine générale
M. Philippe **NGUYEN THANH**	UFR	Médecine générale

MAÎTRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS A MI-TEMPS

M. Emmanuel **LEFEBVRE**	UFR	Médecine générale
Mme Elisabeth **MAUVIARD**	UFR	Médecine générale
Mme Marie-Thérèse **THUEUX**	UFR	Médecine générale

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique DELAFONTAINE

HCN -Hôpital Charles Nicolle **HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME**

CB - Centre HENRI BECQUEREL **CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray**

CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation

LISTE DES RESPONSABLES DE DISCIPLINE

Melle Cécile **BARBOT**	Chimie générale et minérale
M. Thierry **BESSON**	Chimie thérapeutique
M. Roland **CAPRON**	Biophysique
M Jean **CHASTANG**	Mathématiques
Mme Marie-Catherine **CONCE-CHEMTOB**	Législation / Économie de la santé
Mlle Elisabeth **CHOSSON**	Botanique
M. Jean-Jacques **BONNET**	Pharmacodynamie
Mme Isabelle **DUBUS**	Biochimie
M. Loïc **FAVENNEC**	Parasitologie
M. Michel **GUERBET**	Toxicologie
M. Olivier **LAFONT**	Chimie organique
Mme Isabelle **LEROUX-NICOLLET**	Physiologie
Mme Martine **PESTEL-CARON**	Microbiologie
Mme Elisabeth **SEGUIN**	Pharmacognosie
M. Mohamed **SKIBA**	Pharmacie galénique
M. Philippe **VÉRITÉ**	Chimie analytique

ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

M. Sahil **ADRIOUCH**	Biochimie / Biologie moléculaire (Unité Inserm 905)
Mme Gaëlle **BOUGEARD-DENOYELLE**	Biochimie / Biologie moléculaire (UMR 1079)
Mme Carine **CLEREN**	Neurosciences (néovasc.)
Mme Pascaline **GAILDRAT**	Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)
M. Antoine **OUVRARD-PASCAUD**	Physiologie (Unité Inserm 1076)
Mme Isabelle **TOURNIER**	Biochimie (UMR 1079)

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

M. Serguei **FETISSOV**	Physiologie (Groupe ADEN)
Mme Su **RUAN**	Génie informatique

AVERTISSEMENT

Par délibération en date du 3 mars 1967, la faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend pas leur donner aucune approbation ni improbation.

REMERCIEMENTS

À monsieur le Professeur Christophe Marguet pour avoir accepté de présider mon jury de thèse.

À monsieur le Professeur Loïc Favennec pour m'avoir dirigé dans ce travail et pour m'avoir permis d'approfondir et d'étudier le fabuleux monde des champignons.

À monsieur le Professeur Luc Thiberville pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

À monsieur le Professeur Jean-Philippe Bouchara pour nous avoir fourni les souches utilisées pour ce travail et pour avoir accepté de quitter sa douceur angevine pour le crachin normand afin de faire partie de mon jury de thèse.

À monsieur le Docteur Stéphane Dominique pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

À monsieur le Docteur Gilles Gargala, pour ses conseils précieux et pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

À Annabel, mon épouse,
compagne formidable, toujours prête à me soutenir.
Ma vie est fantastique depuis que je la partage avec toi !
Tu es une mère exceptionnelle !
Oui maintenant et toujours !

À mon fils, Célestin,
tu me fais rire et tu éclaires mes journées !
Tendrement,
Ton papa.

À mon deuxième enfant,
vivement janvier, que j'apprenne à te connaître encore mieux.

À mes parents,
je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous m'avez donné.

À mes frères et sœur,
Vous avez toujours été là pour moi,
j'ai pu grandir parmi vous en petit dernier heureux !

À Pierre, mon ami,
il aurait été si triste de ne pas figurer dans ces pages.
;-)

Merci à l'ensemble du laboratoire de Parasitologie / Mycologie du CHU de Rouen,
pour leur gentillesse et plus particulièrement à Eléonore et Isabelle
pour les PCR réalisées

Merci aux membres du laboratoire de Parasitologie / Mycologie du CHU d'Angers,
pour avoir nous avoir prêté les isolats et en avoir réalisé le séquençage

Merci à l'association "Vaincre La Mucoviscidose", pour avoir financé ce travail

SOMMAIRE

LISTE DES PROFESSEURS DE LA FACULTÉ i
LISTE DES RESPONSABLES DE DISCIPLINE viii
AVERTISSEMENT x
REMERCIEMENTS xi
SOMMAIRE 1
TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX 3
Introduction 4
PREMIÈRE PARTIE 5
1 Rappels de mycologie 6
1.1 Bases fondamentales 6
1.2 Développements « récents » 7
2 Le complexe d'espèce *Pseudallescheria boydii* / *Scedosporium apiospermum* 9
2.1 Taxonomie et nomenclature 9
2.2 Identification du complexe 9
2.3 Épidémiologie 12
2.4 Virulence 15
2.5 Sensibilité aux antifungiques 15
2.6 Typage 17
3 La mucoviscidose 17
3.1 Généralités 17
3.2 Infection / Colonisation 19
3.3 Pathologie fungique au cours de la mucoviscidose 20
4 Les espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* au cours de la mucoviscidose 21
5 But de l'étude 22
SECONDE PARTIE 23
6 Matériel et Méthodes 24
6.1 Patients et isolats 24
6.2 Culture et extraction 25

6.3 La rep-PCR 25
6.3.1 La technologie DiversiLab® 26
6.3.2 Règles d'interprétation 27
6.4 Séquençage et identification 28
7 Résultats 28
7.1 Séquençage 28
7.2 DiversiLab® *Fungal* kit 29
7.3 DiversiLab® *Aspergillus* kit 30
8 Discussion 33
8.1 Règles d'interprétation des profils 33
8.2 Comparaison des kits de rep-PCR 34
8.3 Comparaison avec la RAPD 34
8.3.1 DiversiLab® *Fungal* kit 35
8.3.2 DiversiLab® *Aspergillus* kit 35
8.4 Comparaison avec les données de la littérature 36
8.4.1 Génotypage 36
8.4.2 Physiopathologie 38
8.5 Considérations technico-économiques 40
Conclusion 41
Bibliographie 42
Annexe 1 : Tracés électrophorétiques obtenus avec le *Fungal* kit 47
Annexe 2 : Tracés électrophorétiques obtenus avec l'*Aspergillus* kit 58
Annexe 3 : Dendrogramme obtenu à partir du *Fungal* kit 69
Annexe 4 : Dendrogramme obtenu à partir de l'*Aspergillus* kit 71
Annexe 5 : Similarité entre les isolats à partir du *Fungal* kit 73
Annexe 6 : Similarité entre les isolats à partir de l'*Aspergillus* kit 74
Annexe 7 : Scatterplot obtenu à partir du *Fungal* kit 75
Annexe 8 : Scatterplot obtenu à partir de l'*Aspergillus* kit 76

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Principaux phyla fungiques et leurs caractéristiques morphologiques 7
Figure 2 : Classification phylogénique des champignons.....8
Figure 3 : Colonie de *Pseudallescheria boydi* 9
Figure 4 : Aspect des anamorphes de *Pseudallescheria apiosperma.*.....10
Figure 5 : *Scedosporium apiospermum*.....11
Figure 6 : Anamorphe *Graphium*.....11
Figure 7 : Pathologies provoquées par les espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum*.....14
Tableau 1 : Synthèse de la sensibilité des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum*. 16
Tableau 2 : Principales manifestations cliniques de la mucoviscidose.....18
Tableau 3 : Nouveaux critères diagnostics proposés pour l'ABPA.....20
Tableau 4 : Données cliniques à propos des patients.....24
Figure 8 : Principe de fonctionnement de la rep-PCR.....26
Figure 9 : Exemple de profil brut et standardisé. 27
Figure 10 : Superposition des profils électrophorétiques des isolats 14758, 14457 et 14638.....29
Tableau 5 : Génotype et identification des isolats.....31
Figure 11 : Profils électrophorétiques des génotypes identifiés parmi les isolats de *S. apiospermum* de patients atteints de la mucoviscidose.....35
Figure 12 : Comparaison entre les différents arbres phylogénétiques.....37
Tableau 6 : Variabilité génotypique selon l'espèce 38
Tableau 7 : Colonisation des voies aériennes supérieures de P8.....39

Introduction

La mycologie médicale est une discipline en plein essor, révolutionnée par de nombreuses avancées dans le domaine de la biologie moléculaire.

La technique de rep-PCR semi-automatisée DiversiLab® a permis un gain de temps et de reproductibilité considérable pour le génotypage de souches bactériennes. Nous nous proposons d'évaluer son intérêt pour étudier des isolats d'espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum*, retrouvés dans les voies respiratoires de patients atteints de mucoviscidose.

En effet, ces espèces sont au deuxième rang des champignons filamenteux associés à la mucoviscidose et il est nécessaire d'étudier leur épidémiologie afin de mieux comprendre leur mode de colonisation et leur pathogénicité.

PREMIÈRE PARTIE :

Champignons filamenteux et mucoviscidose : Rappels bibliographiques

1 Rappels de mycologie

1.1 Bases fondamentales

Pour comprendre la taxonomie et la nomenclature des espèces fongiques, il est important de savoir que la majorité des champignons sont capables de se reproduire de façon sexuée ou asexuée. Il en découle qu'une seule et même espèce peut présenter plusieurs aspects morphologiques différents (macro ou microscopiques) : le téléomorphe correspond à la forme sexuée et l'anamorphe correspond à la forme asexuée (il existe parfois plusieurs anamorphes différents pour un même téléomorphe).

Pour un grand nombre d'espèces, les formes sexuées sont très rarement retrouvées dans la nature ou en culture. De plus, il est difficile de relier les deux formes l'une à l'autre par la simple observation morphologique, à moins de les observer simultanément sur une culture pure.

Historiquement, les formes d'une même espèce ont donc souvent reçu des noms différents. Par exemple, à l'anamorphe *Aspergillus fumigatus*, correspond le téléomorphe *Neosartorya fumigati*.

Il en découlait donc une double classification taxonomique des champignons : d'un côté les champignons dits « parfaits », dont seul le téléomorphe était connu ou relié à l'anamorphe (*Zygomycetes*, *Ascomycetes* et *Basidiomycetes*), d'un autre côté les champignons dits « imparfaits », dont seul l'anamorphe était connu ou non relié au téléomorphe (*Deuteromycetes*).

Une majorité des espèces d'intérêt médical faisait partie des *Deuteromycetes* (cf. fig. 1 issue de Guarro et *al.*, 1999 [1]).

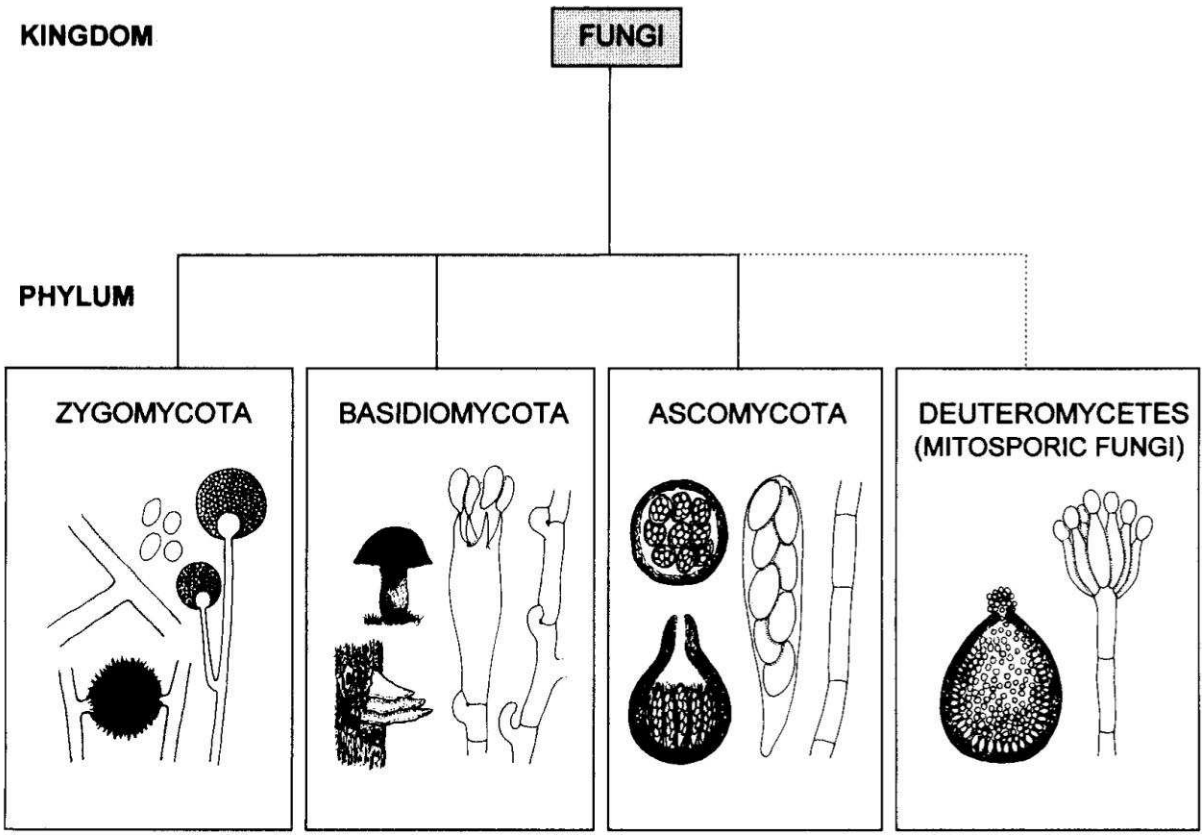


Figure 1 : Principaux phyla fungiques et leurs caractéristiques morphologiques
(extrait de Guarro et *al.*, 1999 [1])

1.2 Développements « récents »

Ces dernières années, de nombreuses études utilisant des techniques de biologie moléculaire ont permis de grandes avancées, par le séquençage du génome de très nombreux champignons.

La comparaison de séquences a permis de rapprocher de nombreux anamorphes et téléomorphes entre eux pour n'en plus faire qu'une même entité bouleversant de ce fait la classification [2].

L'étude des espèces à une échelle moléculaire a favorisé une approche phylogénétique de la taxonomie fungique permettant de développer une classification plus juste. (cf. fig. 2 issue de Blackwell et *al.* 2006 [3])

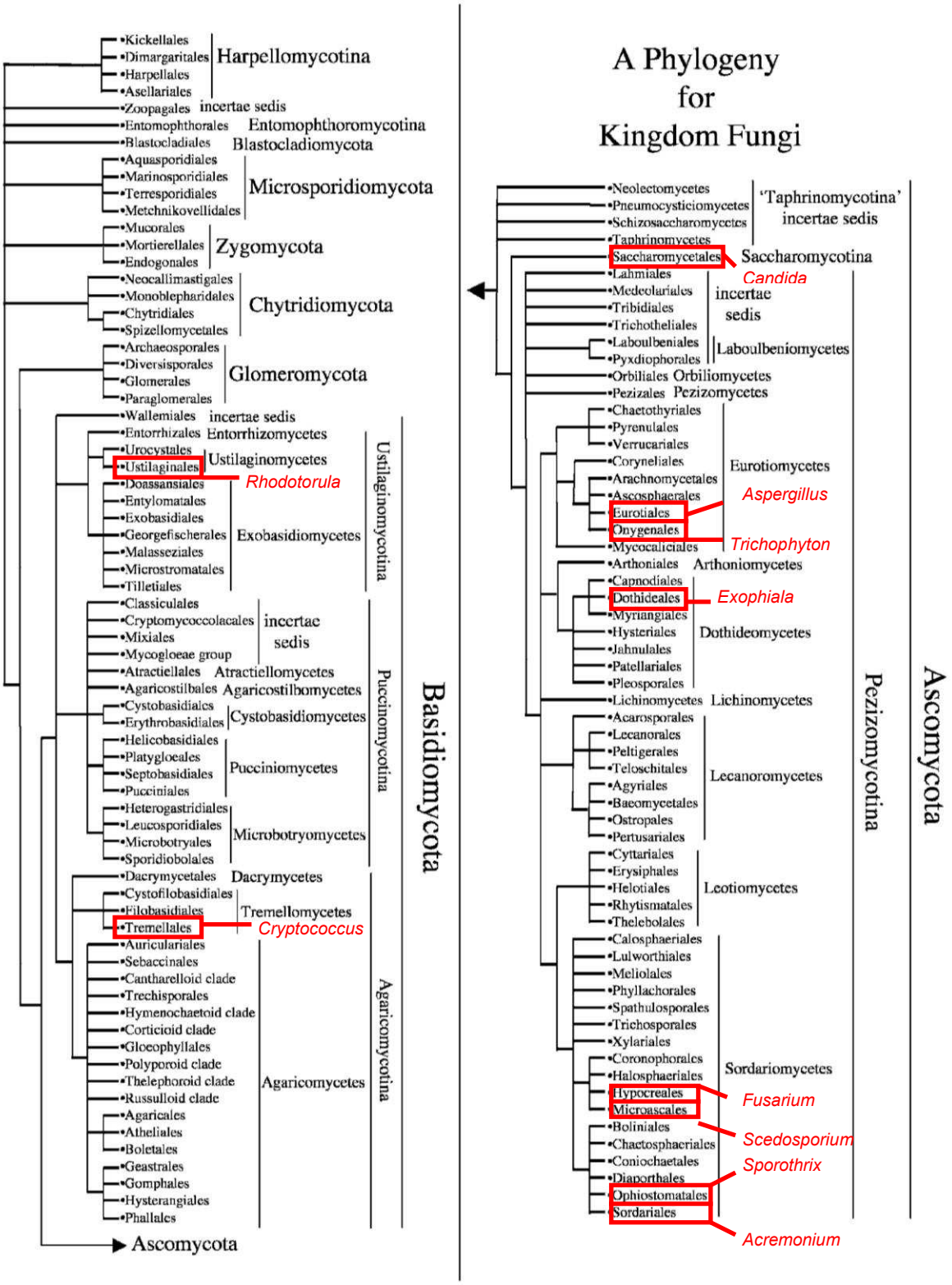


Figure 2 : Classification phylogénique des champignons (selon Blackwell et *al.*, 2006. [3])
Encadrés en rouge, ordres d'intérêt clinique, associés à des genres en faisant partie.

De plus, il a aussi été démontré que de nombreuses « espèces morphologiques » étaient en réalité composées de plusieurs « espèces

phylogénétiques » [1]. Cette différence morphologie / phylogénie a donc donné naissance à la notion de « complexe d'espèce » comportant différentes espèces avec une morphologie et des caractères phénotypiques identiques ou extrêmement proches.

Par exemple le complexe d'espèce *Aspergillus fumigatus* comprend au moins 35 espèces dont : *A. fumigatus sensu stricto*, *A. lentulus*, *A. fumigatiaffinis*, *A. viridinutans*, *Neosartorya pseudofischeri*, *N. udagawae*...

2 Le complexe d'espèce *Pseudallescheria boydii* / *Scedosporium apiospermum*

2.1 Taxonomie et nomenclature

Pseudallescheria est un genre faisant partie des *Ascomycetes*, de l'ordre des *Microascales* et de la famille des *Microascaceae* [1].

Jusqu'à récemment, *S. apiospermum* était considéré comme l'anamorphe de *P. boydii*. Les travaux de Gilgado et *al.* [4-6] ont permis de mettre en évidence plusieurs espèces au sein de ce complexe et de différencier *S. apiospermum* de *P. boydii*. Il est maintenant admis que ce complexe d'espèce comprend : *P. apiosperma*, *P. boydii*, *S. aurantiacum*, *P. minutispora* et *S. dehoogii*. La distinction des sous-groupes *P. ellipsoidea*, *P. fusoidea* et *P. angusta* au sein de l'espèce *P. boydii* fait toujours l'objet de débat [7,8].

2.2 Identification du complexe

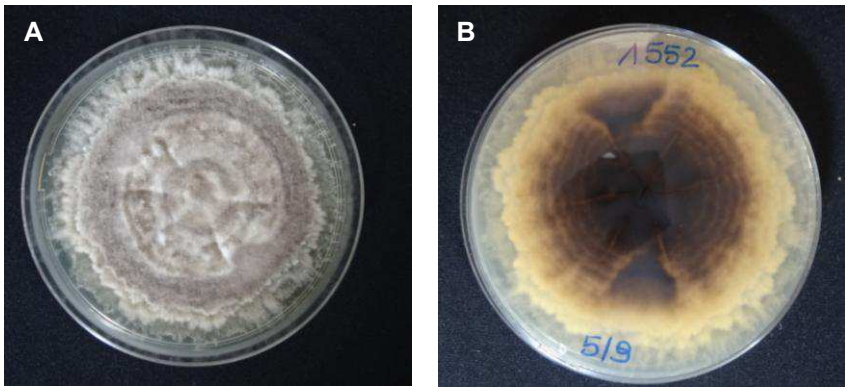


Figure 3 : Colonie de *Pseudallescheria boydi*
Milieu Sabouraud, après 10 j de pousse ; **A** : *recto* ; **B** : *verso*

Sur milieu de Sabouraud, les espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* donnent des colonies cotonneuses / laineuses de couleur blanchâtre à grise allant parfois jusqu'au noir en vieillissant, le verso est brunâtre (cf. fig. 3).

Pour permettre un isolement plus facile de ces espèces dans des isolats cliniques, notamment respiratoires, il est préférable d'utiliser des milieux sélectifs de *Scedosporium* spp, comme le milieu SceSel+ contenant du benomyl qui inhibe le développement des champignons filamenteux à pousse plus rapide [9-11] (ex. : *Aspergillus* spp).

La forme sexuée ne se voit que très rarement en laboratoire clinique et seulement sur milieu pauvre après incubation prolongée.

Il existe 2 formes asexuées (cf. fig. 4)

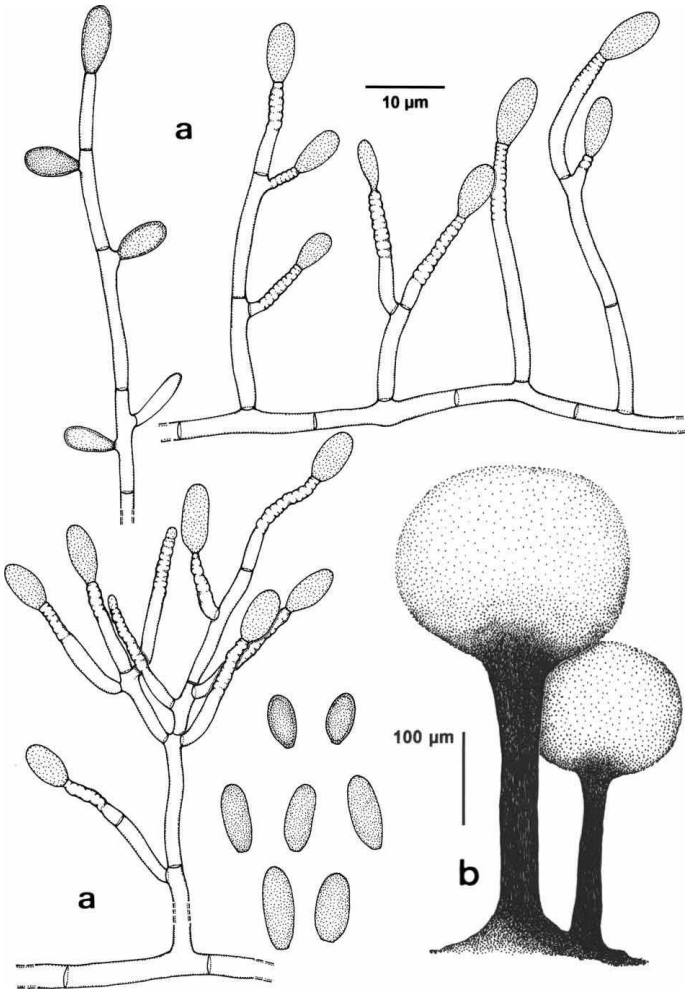


Figure 4 : Aspect des anamorphes de *Pseudallescheria apiosperma.*
a : Scedosporium apiospermum ; **b** : Graphium

La forme *Scedosporium* présente des conidies ovoïdes ou claviformes naissant directement sur le côté des filaments végétatifs (alleuroconidies) ou à l'extrémité de conidiophores fins dressés à angle droit sur le filament ou branchés entre eux. (cf. fig. 5).

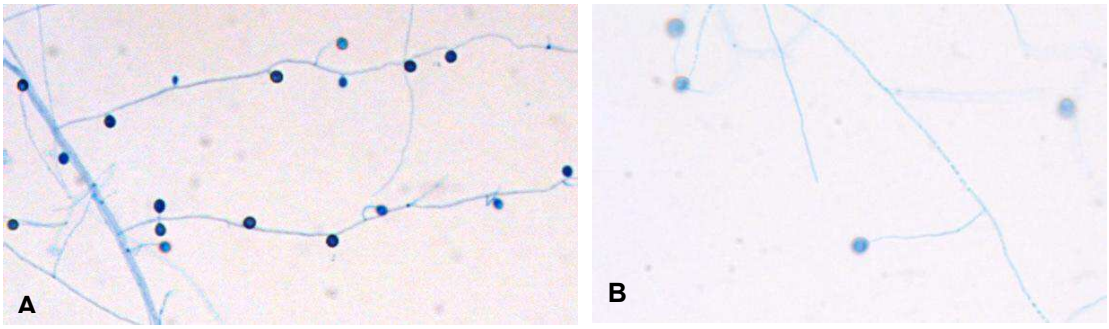


Figure 5 : *Scedosporium apiospermum*.
culture sur lame, coloration au bleu de lactophénol ; **A** : alleuroconidies (grossi. x 400) ; **B** : conidiophore solitaire (grossi. x 1000)

La forme *Graphium* est caractérisée par des annellides regroupées donnant naissance à des conidies hyalines légèrement plus fines (cf. fig. 6).

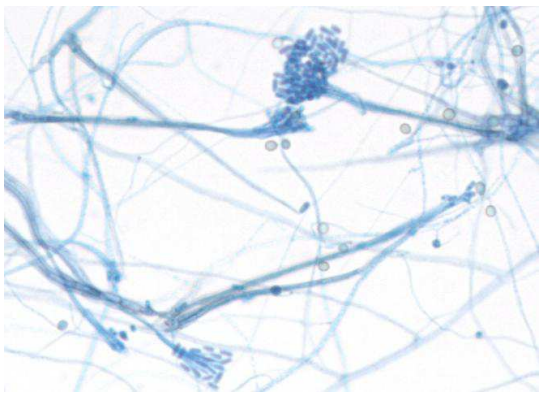


Figure 6 : anamorphe *Graphium*
culture sur lame, coloration au bleu de lactophénol (grossi. x400)

Dans un laboratoire de microbiologie non spécialisé, l'identification au rang d'espèce de ces champignons est excessivement difficile sur des critères uniquement morphologiques, c'est pourquoi il a été mis au point de nombreuses techniques pour la faciliter.

Initialement, la différenciation des espèces de ce complexe a été faite par Gilgado et *al.* (2005) [4] par séquençage partiel de plusieurs loci : 2 régions du gène de la β-tubuline, une région du gène de la calmoduline et la région ITS de l'ARN ribosomal (BT2, TUB, CAL et ITS respectivement). Cette technique étant longue et fastidieuse d'autres méthodes de biologie moléculaire ont été mises au point, pour la plupart basées sur l'étude du gène de la β-tubuline ou de la région ITS. Certaines se font à partir des champignons en culture : PCR temps réel (qPCR), loop mediated isothermal amplification (LAMP), PCR based reverse line blot hybridisation [12] (PCR-RLB), restriction fragment lenght polymorphism [8] (RFLP) ou rolling circle amplification [13] (RCA). D'autres ont pour but de détecter et d'identifier ces pathogènes directement depuis le prélèvement clinique par PCR Multiplex [14] ou PCR-RLB [15] par exemple.

D'autres techniques ne faisant pas appel à la biologie moléculaire sont à l'étude, comme l'utilisation de la spectrophotométrie de masse [16].

2.3 Épidémiologie

Les espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* sont le plus souvent retrouvées en milieux tempérés. Il est maintenant établi qu'il existe une corrélation étroite entre l'activité humaine et la fréquence à laquelle sont retrouvées les espèces du complexe dans l'environnement [11]. Kaltseis et *al.* (2009) [17], dans une étude réalisé en Autriche et aux Pays-Bas, ont estimé que *S. apiospermum* était l'espèce la plus présente suivi de *S. dehoogii* et *S. aurantiacum*. Les résultats de Harun et *al.* (2010) [11], dans une étude réalisée en Australie, place *S. aurantiacum*, comme l'espèce la plus représentée. Ces résultats laissent penser que la répartition environnementale des espèces du complexe est très dépendante de la géographie. Cette hypothèse semble confirmée par des études à propos de la colonisation bronchique de patients atteints de mucoviscidose [18, 19].

Jusqu'à récemment, l'ensemble des manifestations cliniques provoquées par les espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* étaient attribuées à *Scedosporium apiospermum* qui était sensé être l'anamorphe de *Pseudallescheria boydii*. C'est pourquoi il n'est possible de parler de l'épidémiologie clinique que du complexe dans son ensemble et non de chaque espèce prise à part. Pour plus de facilité,

dans les paragraphes qui suivent, nous désignerons l'ensemble du complexe d'espèce par la seule espèce *S. apiospermum*.

Les pathologies provoquées par les champignons de ce complexe sont très variées, on peut les séparer en 3 groupes : les infections localisées faisant suite à un traumatisme, les colonisations de cavités, symptomatiques ou asymptomatiques, et les infections systémiques [20] (cf. fig. 7).

Scedosporium apiospermum est un agent classique responsable de mycétomes à grains blancs, l'inoculation faisant suite à des plaies superficielles [21]. Le même mode d'inoculation peut-être responsable d'arthrites, d'ostéomyélites ou d'endophtalmies chez des sujets immunocompétents [21], dans ces cas l'infection peut rester asymptomatique ou paucisymptomatique pendant plusieurs années. De la même façon, il a été observé des infections cutanées avec lymphadénites sans mycétome chez des sujets immunodéprimés [21].

La propension de *Scedosporium apiospermum* à coloniser des cavités peut être responsable de sinusites mais aussi d'otites externes plus ou moins invasives selon le statut immunologique des patients [22]. *S. apiospermum* est aussi à l'origine de balles fungiques sinusales mais le plus souvent pulmonaires chez des patients ayant une pathologie sous-jacente [23] (sarcoïdose, tuberculose…). Il a été décrit de véritables bronchopneumopathies allergiques à *S. apiospermum* [24]. Nous aborderons plus tard la place des espèces du complexe dans la mucoviscidose.

Chez des patients le plus souvent fragilisés par une pathologie sous-jacente, on peut constater un passage systémique de *S. apiospermum* menant à des infections invasives. Il a été observé de véritables pneumonies invasives à *S. apiospermum* [23] ou « mycétomes pulmonaires », favorisées par une corticothérapie et sur des terrains généralement débilités [20]. Des endocardites à *S. apiospermum* peuvent parfois se déclarer à distance de chirurgies cardiaques. Les infections invasives profondes et touchant plusieurs organes ne s'observent quasiment exclusivement que chez des patients immunodéprimés (transplantation d'organe solide ou de cellules souches hématopoïetiques, leucémie aigüe, cancer solide…) [25]. *S. apiospermum* possède un tropisme vasculaire important [26], il engendre donc régulièrement des complications au niveau du système nerveux central à type de méningites ou d'abcès cérébraux, aussi bien chez l'immunocompétent que l'immunodéprimé [27]. Un mode de contamination particulier à *S. apiospermum*, suivi d'infection disséminée et de complication neurologique se voit chez des patients

rescapés de noyade et ayant inhalé de grande quantité d'eau polluée, appelé en anglais le « *near-drowning syndrome* » [28].

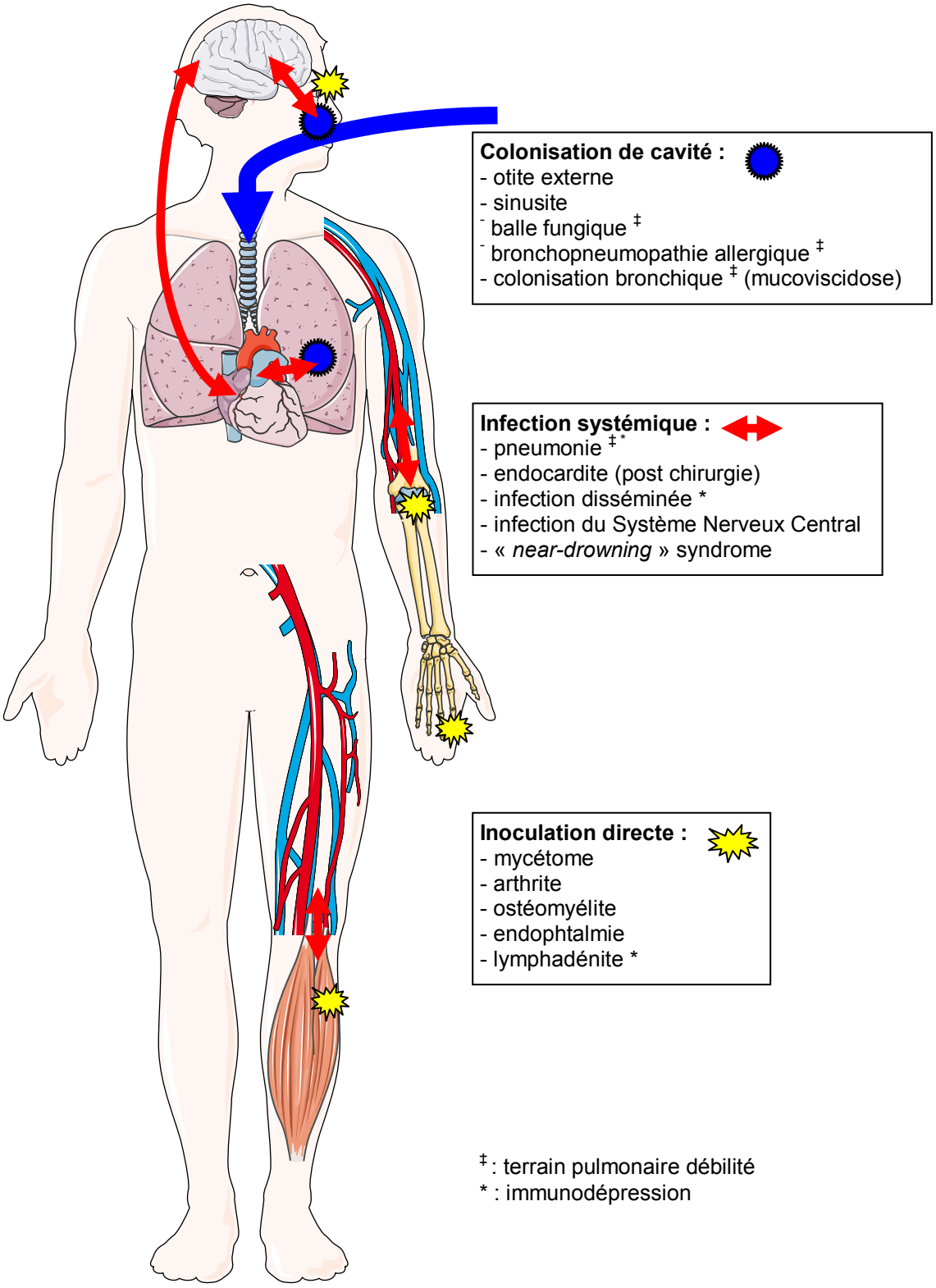


Figure 7 : Pathologies provoquées par les espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum*

2.4 Virulence

Les espèces du complexe sont de virulences différentes ; il a été prouvé sur des modèles murins que *S. aurantiacum* était l'espèce la plus virulente suivie de *S. dehoogii* [29, 30].

Les taux de mortalité observés lors d'infections par des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* sont la preuve de la virulence de ces champignons et / ou de la fragilité des patients atteints. Les taux de mortalité constatés sont de 26,8% et 57,2% en cas d'atteinte pulmonaire invasive ou non respectivement [23], 74% lors d'atteintes du système nerveux central que ce soit chez des patients immunodéprimés ou non [27], 70% lors du « *near-drowing* » syndrome [28] et 58% chez des patients transplantés [31].

2.5 Sensibilité aux antifungiques

L'ensemble des sensibilités *in vitro* aux antifungiques des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* est résumé dans le tableau 1, basé sur les études de Gilgado et *al.*, 2006 [32] et de Lackner et *al.*, 2012 [33].

Les différences de résultats observées vis-à-vis de la micafungine, seule echinocandine testée dans l'étude de Gilgado et *al.*, sont dues au fait que ces derniers utilisent la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) au lieu de la Concentration Minimale Efficace (CME) pour juger de l'efficacité de cette molécule, contrairement à Lackner et *al.*. C'est bien la CME qui doit être utilisée pour définir la sensibilité d'un isolat aux echinocandines comme conseillé dans les dernières recommandations de l'EUCAST [34] (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) et du CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute).

S. aurantiacum est l'espèce du complexe la plus résistante aux antifungiques avec une sensibilité la plus basse pour le voriconazole.

Tableau 1 : Synthèse de la sensibilité *in vitro* aux antifungiques des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum*.

espèce n =	AMB	CAS*	MICA	ANI*	VRZ	PSZ	ITZ	ISZ*	RVZ‡	FLZ‡
S. apio. 154* / 26‡	**R**	I*	S* R‡ bimod*	S*	**S**	I* S‡ bimod*	R* I‡ bimod*	R*	I‡	R‡
P. boy. 60* / 30‡	**R**	I*	S* R‡ bimod*	I*	**S**	I* S‡ bimod*	R* I‡ bimod*	R*	R‡	R‡
S. aur. 22* / 7‡	**R**	R*	**R**	R*	S* I‡	I* R‡	**R**	R*	R‡	R‡
S. deho. 22* / 5‡	**R**	R*	I* R‡	R*	I* S‡	R* S‡	**R**	R*	R‡	R‡
P. minu. 6* / 4‡	**R**	R*	S* R‡	I*	**S**	I* S‡	R* I‡	R*	I‡	R‡
P. elli. 16* / 6‡	**R**	I*	S* R‡	S*	**S**	R* S‡	R* I‡	R*	I‡	R‡
P. fus.‡ 2‡	R‡		R‡		S‡	I‡	R‡		R‡	R‡
P. ang. 15* / 4‡	**R**	R*	S* R‡	I*	**S**	**I**	**R**	R*	R‡	R‡

AMB : amphotericine B, **CAS** : caspofungine, **MICA** : micafungine, **ANI** : anidulafungine, **VRZ** : voriconazole, **PSZ** : posaconazole, **ITZ** : itraconazole, **ISZ** : isavuconazole, **RVZ** : ravuconazole, **FLZ** : fluconazole.
S : CMI/CME_{moy} ≤ 1 µg/ml, **I** : 1 µg/ml < CMI/CME_{moy} < 3 µg/ml, **R** : CMI/CME_{moy} ≥ 3 µg/ml

bimod : répartition bimodale des sensibilités, ↔ : résistances croisées.
***** : selon Lackner et *al.*, 2012 [33], **‡** selon Gilgado et *al.*, 2006 [32], **pas de marque** : commun aux 2 études.

Aux vues de ces données, le voriconazole semble être le traitement probabiliste de choix devant toute infection par une espèce du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum*, suivi de la micafungine et du posaconazole. Cependant, l'existence de souches résistantes et la répartition bimodale de certaines espèces vis-à-vis de ces molécules doit entraîner l'identification précise et la réalisation d'un antifungigramme pour toute souche isolée.

L'association d'un azolé avec une echinocandine semblerait être synergique [35], et serait donc une autre piste à évaluer.

2.6 Typage

Le typage des isolats du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* est d'une importance cruciale pour en comprendre l'épidémiologie, étudier les liens entre souches environnementales et cliniques, ou savoir si certaines souches sont plus pathogènes que d'autres ou spécifiques d'un organe, c'est pour cela qu'il a été développé de nombreuses techniques [36].

Dans certaines méthodes, la différenciation de chaque type est définie sur des bases moléculaires, ce sont des techniques dites de génotypage comme la random amplification of polymorphic DNA [37, 38] (RAPD), les techniques de restriction fragment length polymorphism (RFLP) des gènes ITS [39] ou IGS [40], le séquençage : multi loci [41] (MLST) ou du gène ITS [39, 42]. D'autres études utilisent des techniques basées sur des caractères physiologiques pour réaliser leur typage comme la multi locus enzyme electrophoresis [37] (MLEE) ou le système *Taxa Profile* [43].

La majorité de ces études, bien que réalisées sur un nombre d'isolats restreints, s'accordent à dire qu'il existe une extrême variabilité génétique au sein des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* [7] et qu'il n'y a pas de lien entre le type de chaque isolat et son origine géographique, l'organe qu'il atteint, ou la sévérité de la maladie qu'il provoque [37, 39, 40], bien que certains types auraient été responsables d'épidémies intrahospitalières de faible ampleur [42].

3 La mucoviscidose

3.1 Généralités

Avec une incidence de 1/4600 naissance, la mucoviscidose est la maladie génétique autosomique récessive la plus fréquente en France [44]. Elle résulte d'une mutation du gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) sur le chromosome 7 codant un canal chlore, entraînant un dysfonctionnement des glandes exocrines.

La mutation la plus fréquemment en cause est la mutation ΔF508 qui correspond à une délétion de 3 nucléotides au niveau du 508ème codon et à la délétion d'une phénylalanine à l'origine du dysfonctionnement du canal chlore. Cette mutation est responsable d'environ deux tiers des mucoviscidoses de par le monde et en France

(66% et 66,7% respectivement) [45]. Cependant, il existe de très nombreuses autres mutations au niveau du gène CFTR, à l'heure actuelle presque 1000 allèles différents auraient été identifiés. Les taux de chaque mutation varient grandement selon l'origine ethnique de la population étudiée et bien que ΔF508 reste prépondérante dans les populations européennes caucasiennes (1/2000 à 1/3000 naissances) on observe un gradient Nord-Ouest / Sud –Est de son taux en Europe. Il a été prouvé que d'autres mutations étaient liées à des origines ethniques très spécifiques : G542X serait liée aux anciens phéniciens, N1303K est associé aux populations méditerranéennes et G551D aux anciennes tribus celtiques [45].

Le défaut du canal chlore codé par CFTR entraîne un dysfonctionnement de l'ensemble des glandes exocrines, à l'origine de manifestations cliniques diverses [46] (cf. tab. 2).

Tableau 2 : Principales manifestations cliniques de la mucoviscidose

***Pathologie sinusales et pulmonaires chroniques** :*
Colonisation / infections chroniques (*Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Aspergillus fumigatus…)*
Toux chronique
Anomalies de la radio pulmonaire (bronchiectasies, atélectasies, fibrose, infiltrat…)
Obstruction des voies aériennes distales
Polypes nasaux, anomalies des sinus
Anomalies gastro-intestinales et nutritionnelles
Ileus méconial, obstruction intestinale distale
Insuffisance pancréatique exocrine
Insuffisance pancréatique endocrine menant au diabète
Cirrhose biliaire focale ou multilobaire
Retard staturo-pondéral
Perte excessive de sel
Infertilité masculine et fertilité féminine diminuée

L'ensemble de ces pathologies est à l'origine d'une importante surmortalité chez les patients atteints de mucoviscidose. En France, l'espérance de vie d'un enfant atteint de mucoviscidose, né entre 2001 et 2003, est d'un peu moins de 39 ans [44] (38,7 ans).

3.2 Infection / Colonisation

Au cours de la mucoviscidose, l'importante surmorbidité et surmortalité observée est en grande partie attribuée aux infections chroniques et récurrentes de l'arbre pulmonaire [46].

L'épaississement des sécrétions muqueuses bronchiques et leur production en moins grande quantité entraînerait un défaut de la clairance mucociliaire et donc faciliterait l'adhésion des bactéries aéroportées et des spores fungiques, ainsi que leur prolifération sous forme de biofilm. Ces colonisations chroniques sont à l'origine de réactions immunitaires locales et humorales et cette inflammation est un facteur aggravant à part entière des symptômes respiratoires des patients.

L'écologie microbienne des voies respiratoires et son évolution en fonction de l'âge des patients suivent un schéma relativement similaire chez tous les malades.

Durant l'enfance, ce sont les infections à *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* et *Streptococcus pneumoniae* qui sont les plus fréquentes avec un taux de colonisation à *S. aureus* avoisinant les 70% [46]. Les souches de *S.aureus* résistantes à la meticilline (SARM) sont souvent transmissibles d'un patient à un autre et ces souches épidémiques sont généralement les plus virulentes [47], d'où l'importance des mesures d'hygiène intra et extra hospitalières.

La colonisation puis l'infection chronique par *Pseudomonas aeruginosa* marque un tournant de la maladie pulmonaire. Le passage de la colonisation à l'infection correspond au changement de phénotype des souches de *P. aeruginosa* de l'état non-mucoïde à l'état mucoïde [46]. Sous cette dernière forme, le germe s'organise en biofilm et devient ainsi très résistant aux antibiotiques. Les traitements actuels n'arrivent pas à éliminer le pathogène une fois la colonisation confirmée. Comme pour *S. aureus*, il existe des souches épidémiques de *P. aeruginosa* et certaines sont responsables d'une majoration des signes cliniques comparé aux souches non-épidémiques [47].

Avec l'amélioration du contrôle des espèces citées ci-dessus, l'incidence d'autres bactéries ne cesse d'augmenter, tel *Burkholderia cepacia*,

Stenotrophomonas maltophilia, *Achromobacter xylosoxidans* et certaines mycobactéries atypiques [48].

3.3 Pathologie fungique au cours de la mucoviscidose

La colonisation fungique des voies aériennes des patients atteints de mucoviscidose survient plus tardivement dans l'histoire de la maladie, en général vers l'adolescence. Il est supposé que les dommages infligés à l'épithélium bronchopulmonaire par les colonisations / infections bactériennes sont nécessaires à la bonne adhésion des spores fungiques [49].

L'espèce la plus retrouvée est *A. fumigatus* ; sa prévalence dans les sécrétions bronchiques de patients atteints de mucoviscidose varie selon les études de 16 à 56,7 % [49]. Initialement la colonisation s'effectue par de nombreux génotypes différents et ensuite seulement, un génotype unique prédomine et perdure [49]. L'aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA) est la manifestation clinique la plus fréquente de la colonisation à *A. fumigatus*. Les critères diagnostics proposés par le groupe de travail de l'ISHAM (International Society of Human and Animal Mycology) sur l'ABPA compliquant l'asthme [50] sont exposés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Nouveaux critères diagnostics proposés pour l'ABPA

Pathologies prédisposantes
Asthme, mucoviscidose
Critères obligatoires (les 2 doivent être présents)
- Réponse positive à un test cutané par *Aspergillus* ou taux élevé d'IgE anti *Aspergillus fumigatus*
- Taux élevé d'IgE totales (>1000 UI/mL) *
Autres critères (au moins deux sur trois)
- Présence de précipitine ou d'IgG anti *A. fumigatus* dans le sérum
- Opacités pulmonaires radiologique concordantes avec une ABPA
- Taux de polynucléaires éosinophiles > $0{,}5.10^9$/L chez des patients sans corticoïdes

* Si le patient réunit tous les autres critères, un taux d'IgE < 1000 UI/mL peut être acceptable

A. fumigatus peut être responsable d'autres complications au cours de la mucoviscidose : asthme, bronchites, aspergillomes et infections pulmonaires invasives post-transplantation.

Parmi les autres espèces d'*Aspergillus* retrouvées au cours de la mucoviscidose, la plupart ne sont pas responsables de colonisation au long cours, seul *A. terreus* semble pouvoir provoquer des symptômes et pathologies similaires à *A. fumigatus* [49].

D'autres champignons filamenteux sont retrouvés dans les sécrétions bronchiques de patients atteints de mucoviscidose : *Scedosporium prolificans*, *Exophiala dermatitidis*, *Acrophialophora fusispora* et les espèces du complexe *Rasamsonia argillacea* par exemple. Leurs répartitions varient grandement selon les études, cela peut-être dû à de grandes diversités géographiques mais aussi au manque de standardisation des techniques utilisées pour les rechercher (milieux de culture, temps d'incubation, température d'incubation…) [49].

4 Les espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* au cours de la mucoviscidose

Les espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* sont au deuxième rang des champignons filamenteux colonisant les voies aériennes supérieures des patients atteints de mucoviscidose, après *Aspergillus fumigatus*. L'incidence chez ces patients varie d'environ 8% [15, 19, 24] jusqu'à 15 à 17% avec l'utilisation de milieux sélectifs [19] ; ceci démontre l'importance de leur utilisation pour inhiber la pousse plus rapide de champignons filamenteux tel *A. fumigatus*.

Cimon et *al.* [24] ont montré que la première colonisation par les espèces de ce complexe avait souvent lieu à l'adolescence (14,5 ans), en général après la première colonisation par *A. fumigatus* (12,9 ans).

L'ensemble des espèces du complexe (sauf *S. dehoogii* qui est très peu isolé en clinique) sont capables de coloniser les voies aériennes supérieures des patients atteints de mucoviscidose [19, 41] et la colonisation se fait le plus souvent par une souche majoritaire et persistante [38].

Selon les études, la fréquence de chaque espèce n'est pas la même. En Europe (France, Allemagne), les deux espèces colonisatrices prépondérantes semblent être *S. apiospermum* et *P. boydii* respectivement (41) suivies de *S. aurantiacum* et *P. minutispora* [18], mais dans d'autres études c'est *P. boydii* qui est retrouvé en

premier [15]. En Australie, cependant, c'est *S. aurantiacum* qui est l'espèce la plus fréquemment responsable de colonisations bronchiques [19], ceci semblant correspondre à la répartition environnementale des espèces [11].

Ces épidémiologies différentes sont en faveur d'importantes variabilités géographiques dans la répartition des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* ceci ayant potentiellement de forte conséquences sur l'écologie clinique de ces champignons.

Le rôle pathogène de ces champignons dans la mucoviscidose reste toujours imprécis, cependant, il est avéré qu'ils peuvent provoquer une réponse immune de l'hôte et être à l'origine de véritables pathologies bronchopulmonaires allergiques [20, 24].

De plus, à cause de leur haute résistance aux antifungiques, ils peuvent être à l'origine d'infections invasives chez des patients bénéficiant de greffes pulmonaires [25, 51], amenant certains auteurs à contre-indiquer la greffe en cas de présence de champignons de ce complexe [20]. Cependant certaines de ces infections post-greffe ont pu être traitées par voriconazole nécessitant parfois un traitement à vie [52].

5 But de l'étude

Notre étude a pour but d'évaluer la technique de PCR de séquences répétées de l'ADN (rep-PCR) semi-automatisée DiversiLab®, appliquée au génotypage d'isolats du complexe *P. boydii / S. apiospermum* en comparant 2 kits d'amorces différents, afin de déterminer lequel est le plus approprié.

Nous allons comparer nos résultats avec ceux obtenus par Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) pour les mêmes isolats lors d'une précédente étude [38] (Defontaine et *al.* 2002). La RAPD étant une technique de génotypage assez peu reproductible d'un laboratoire à un autre [1, 36, 53], nous évaluerons si la rep-PCR DiversiLab® est une alternative potentielle à cette technique.

Les résultats obtenus nous permettront d'étudier la physiopathologie de la colonisation des voies aériennes supérieures de patients atteints de mucoviscidose par des souches du complexe d'espèce *P. boydii* / *S. apiospermum.*

SECONDE PARTIE :

Évaluation de la rep-PCR semi-automatisée DiversiLab®

6 Matériel et Méthodes

6.1 Patients et isolats

Nous avons étudié 63 isolats, retrouvés à partir des crachats de 9 patients atteints de mucoviscidose, suivis dans trois centres différents (Angers, Giens et Tours), sur une période d'un an (janvier 1998 à février 1999), qui avaient initialement été identifiés morphologiquement comme étant des souches de *S. apiospermum* (Defontaine et *al.*, 2002) [38]. Il s'agit d'isolats multiples (provenant d'un seul échantillon clinique) pour 4 des 9 patients et multiples et séquentiels (provenant d'échantillons successifs d'un même patient) pour les 5 autres patients.

Deux isolats extérieurs, référencés comme *P. minutispora* ont été inclus dans l'étude (dont la souche de référence IHEM 21148).

L'ensemble des isolats, sauf 2, sont déposés et référencés auprès de la collection internationale de cultures IHEM (Institut d'Hygiène et d'Epidémiologie – section Mycologie; Bruxelles, Belgique).

Tableau 4 : Données cliniques à propos des patients

Patient (hôpital)	Date de naissance	Genre	Année de diagnostic (mutation)	Date de 1ère colonisation	Statut vis à vis du pathogène	Traitement antifungique durant la période d'étude
P1 (Angers)	20/12/79	M	1984 (ΔF508/ΔF508)	Décembre 1991	Colonisation bronchique	Itraconazole à partir de juin 98
P2 (Angers)	06/04/78	M	1984 (ΔF508/ΔF508)	Novembre 1993	Portage transitoire	/
P3 (Giens)	15/03/72	F	1973 (ΔF508/ΔF508)	Mars 1989	Colonisation bronchique	Itraconazole durant toute la période
P4 (Giens)	15/12/50	M	1996 (ΔF508/2789 + 5G → A)	Janvier 1997	Colonisation bronchique	Itraconazole durant toute la période
P5 (Giens)	12/04/87	M	1994 (inconnu)	Septembre 1998	Portage transitoire	Itraconazole de sept. à nov. 98
P6 (Giens)	17/12/84	F	1985 (G542X/inconnu)	Janvier 1992	Colonisation bronchique	Itraconazole d'oct. à dec. 98
P7 (Giens)	21/05/77	F	1990 (ΔF508/S1251N)	Février 1994	Colonisation bronchique	Itraconazole de jan. à mars 98 et de juil. à sept. 98
P8 (Tours)	14/03/78	F	1988 (ΔF508/ΔF508)	Décembre 1993	Infection bronchopulmonaire	Fluconazole jusqu'à avr. 98, itraconazole à partir de mars 98
P9 (Tours)	25/10/84	F	1988 (ΔF508/ΔF508)	Août 1995	Colonisation bronchique	/

Les données cliniques concernant les 9 patients sont disponibles dans le tableau 4.

6.2 Culture et extraction

Chaque isolat a été cultivé de manière standardisée, d'abord durant 7 jours sur gélose Sabouraud à 37°C (BioRad, Marnes-la-Coquette, France) puis, après raclage de la surface gélosée, réensemencé en milieu de Sabouraud liquide (milieu « maison » : peptone, glucose). Après incubation à 37°C pendant 10 à 15 jours sans agitation, le mycélium a été récupéré en surface du bouillon de culture, broyé dans de l'azote liquide, le broyat a été récupéré avec de l'eau sans acide nucléique puis a subi un cycle de congélation / décongélation.

A partir du broyat ainsi obtenu, l'ADN a ensuite été extrait avec le kit Ultraclean Microbial DNA kit (Mo-Bio, Carlsbad, Californie), selon le protocole recommandé par le fabriquant, à l'exception d'une augmentation de la durée d'incubation pendant la phase de lyse cellulaire (une nuit à 4°C au lieu de 15 min). En effet, cette modification que nous proposons permet une amélioration significative du rendement de l'extraction (travaux du laboratoire de Parasitologie / Mycologie du CHU de Rouen antérieurs à cette étude).

L'ADN a ensuite été quantifié sur un NanoVue (GE Healthcare, Vélizy-Villacoublay, France) puis dilué pour obtenir une concentration comprise entre 25 et 50 ng/µL comme recommandé par le fabriquant pour la rep-PCR DiversiLab®.

6.3 La rep-PCR

C'est une technique de biologie moléculaire permettant le génotypage d'isolats microbiens. Elle est basée sur l'amplification par PCR de plusieurs séquences répétitives et non codantes du génome. Les produits d'amplifications sont ensuite séparés par électrophorèse (cf. fig. 8) et leurs profils électrophorétiques sont comparés entre eux afin d'établir la similarité ou non des isolats.

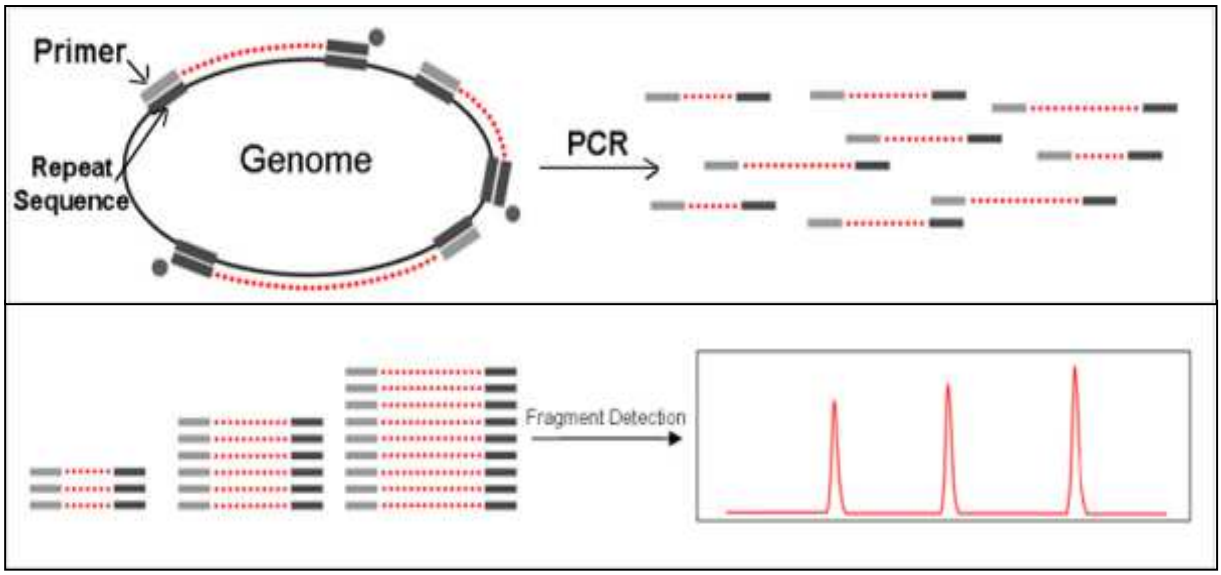


Figure 8 : Principe de fonctionnement de la rep-PCR

6.3.1 La technologie DiversiLab®

La technologie DiversiLab® (bioMérieux SA, Marcy l'Etoile, France) permet de réaliser des rep-PCR de façon semi-automatique, elle associe :

- des réactifs permettant la rep-PCR à proprement parler : amorces spécifiques à chaque kit, acides nucléiques en excès, contrôles positifs et négatifs.
- un système de puces dans les puits desquelles chaque produit d'amplification est marqué par fluorescence.
- un appareil, l'Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Les Ulis, France), qui réalise une microélectrophorèse à partir des produits amplifiés déposés sur les puces. Il fournit un profil électrophorétique "brut" qui est ensuite standardisé grâce à des marqueurs internes de poids moléculaire connus à 150 et 700 paires de bases (pb).(cf. fig. 9)
- le logiciel DiversiLab®, hébergé sur internet, qui permet la gestion des données et le suivi du processus (extraction, PCR, électrophorèse…) pour chaque échantillon ainsi que l'élaboration de rapports où sont comparés les profils électrophorétiques entre eux ou par rapport à une bibliothèque de profils connus.

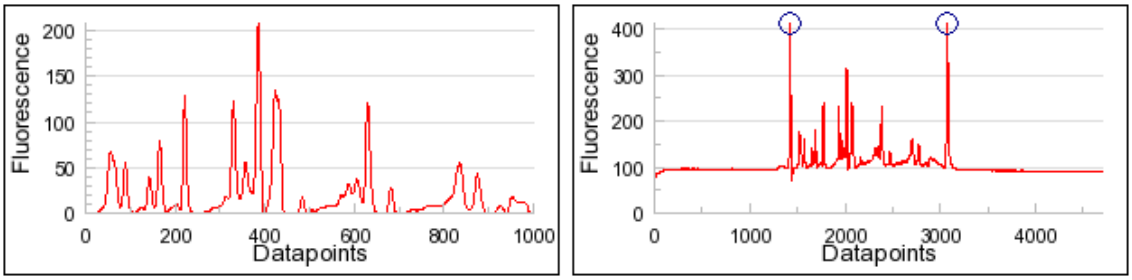


Figure 9 : Exemple de profil brut et standardisé.
Profil électrophorétique brut où l'on voit les marqueurs de poids moléculaire (à droite). Profil standardisé en fonction de l'intensité des marqueurs (à gauche).

Dans notre étude, nous avons réalisé les rep-PCR sur les isolats avec le DiversiLab® *Fungal* kit dont les amorces ont été initialement conçues pour l'étude de l'ensemble des champignons filamenteux, et le DiversiLab® *Aspergillus* kit dont les amorces ont été conçues pour l'étude du genre *Aspergillus*.

Les paramètres du thermocycleur Veriti (Life Technologies, Saint-Aubin, France) ont été les suivants pour le DiversiLab® *Fungal* kit : dénaturation initiale à 94°C pendant 2 min, 35 cycles de dénaturation à 92°C pendant 30 sec, hybridation à 50°C pendant 30 sec, extension à 70°C pendant 90 sec et une extension finale à 70°C pendant 3min.

Pour le DiversiLab® *Aspergillus* kit : dénaturation initiale à 94°C pendant 2 min, 35 cycles de dénaturation à 94°C pendant 30 sec, hybridation à 50°C pendant 30 sec, extension à 70°C pendant 90 sec et une extension finale à 70°C pendant 3 min.

La microélectrophorèse a été réalisée sur l'Agilent 2100 selon les recommandations du constructeur.

Les profils ont été traités à l'aide du logiciel DiversiLab® 3.4 qui calcule un indice de similarité entre chaque profil par la corrélation de Pearson pour ensuite créer un dendrogramme par la méthode UPGMA (Unweigthed Pair Group Method with Arithmetic mean).

6.3.2 Règles d'interprétation

Les outils de traitement des données fournis par le logiciel ont permis de comparer les profils électrophorétiques entre eux selon les règles conseillées par le fournisseur.

- les profils standardisés qui présentent moins de 2 pics dont la fluorescence atteint 100 sont *a priori* ininterprétable.
- les pics situés après 700 pb n'ont pas été pris en compte car les fragments de haut poids moléculaire sont amplifiés de façon moins reproductibles, ils ont donc été considérés comme non spécifiques.
- deux pics de profils différents et de même poids moléculaire ont été considérés différents si l'un était d'une intensité au moins double de l'autre et que le reste des profils étaient d'intensité comparable.
- deux profils ont été considérés :
    - identiques si aucun pic ne différait
    - proches s'il y avait 1 à 2 pics d'écart
    - différents à partir de 3 pics d'écart

6.4 Séquençage et identification

Afin de permettre une identification au rang d'espèce des isolats, des extraits d'ADN ont été préparés pour chacun d'eux à l'aide du DNA Plant mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Une PCR du locus TUB du gène de la β-tubuline a été réalisée, puis les amplicons ont été séquencés et les séquences obtenues ont été comparées à celles déposées dans Genbank pour chacune des espèces du complexe *P. boydii / S. apiospermum*.

Le séquençage a été réalisé par l'équipe du laboratoire de Parasitologie / Mycologie du CHU d'Angers.

7 Résultats

L'ensemble des résultats est visible dans le tableau 5 (p 31)

7.1 Séquençage

Le séquençage a permis l'identification au rang d'espèce de tous les isolats sauf un (14361).

Il a été trouvé : 35 *P. boydii*, 2 *P. ellipsoidea*, 21 *S. apiospermum* et 4 *S. aurantiacum*.

7.2 DiversiLab® *Fungal* kit

La rep-PCR a permis de fournir des profils électrophorétiques exploitables pour l'ensemble des 65 isolats (cf. annexe 1).

Onze génotypes différents ont été mis en évidence.

Les isolats d'un même génotype appartiennent à une seule et même espèce.

La classification génotypique obtenue est identique à celle obtenue par RAPD, excepté pour 2 isolats d'un même patient qui étaient de génotypes différents des autres en RAPD mais qui sont similaires entre eux et aux autres par rep-PCR (P1). (cf. fig. 10)

Parmi les 5 patients pour lesquels des isolats multiples et séquentiels ont été recueillis, 4 d'entre eux sont colonisés par un génotype unique différent d'un patient à l'autre (P1, P3, P4, P7).

Le cinquième est colonisé par 2 génotypes différents de *S. apiospermum* rencontrés une fois simultanément (P8).

Pour les 4 patients avec un seul prélèvement réalisé, il n'a été retrouvé qu'un génotype unique par patient, propre à chaque patient (P2, P5, P6, P9).

Les deux isolats de *P. minutispora* présentent un seul et même génotype.

Nous n'avons pas trouvé de profils « proches »

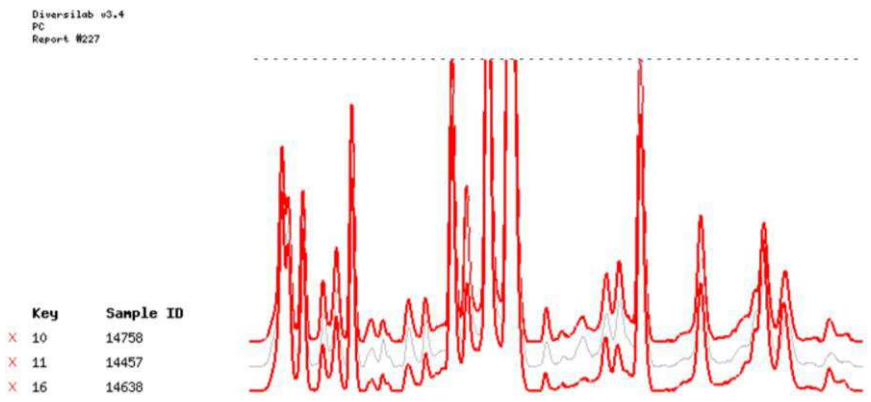


Figure 10 : Superposition des profils électrophorétiques des isolats 14758, 14457 et 14638

7.3 DiversiLab® *Aspergillus* kit

La rep-PCR a permis de fournir des profils électrophorétiques exploitables pour l'ensemble des 65 isolats (cf. annexe 2).

Les profils électrophorétiques comportaient peu de fragments amplifiés supérieurs à 400 pb.

Neuf génotypes différents ont été mis en évidence.

Les isolats d'un même génotype appartiennent à une seule et même espèce.

La classification génotypique obtenue diffère de celle obtenue en RAPD dans plusieurs cas.

On retrouve le même phénomène que celui observé avec le *Fungal* kit pour le patient P1.

Tous les isolats de *P. boydii* font partie d'un unique génotype.

Les patients P5 et P8 présentent un même génotype de *S. apiospermum* sauf pour 3 isolats du patient P8 qui se révèlent être de 2 génotypes différents (14462 et 14465 : génotype 1 ; 14463 : génotype 2).

Parmi les 5 patients pour lesquels des isolats multiples et séquentiels ont été recueillis, 3 d'entre eux sont colonisés par un génotype unique et identique entre les patients (P1, P3, P7).

Le patient P4 est colonisé par un seul génotype différent de celui des autres.

Pour les 4 patients avec un seul prélèvement réalisé, il n'a été retrouvé qu'un génotype unique par patient (P2, P5, P6, P9).

Les deux isolats de *P. minutispora* présentent deux génotypes différents.

Nous n’avons pas trouvé de profils « proches »

Tableau 5 : Génotype et identification des isolats

Patient	Centre Hospitalier	Date d'isolement	Isolat	Identification au rang d'espèce	Génotype		
					RAPD	*Fungal* kit	*Aspergillus* kit
P1	Angers	9-janv-98	14263	*P. boydii*	1	3	5
			14264	*P. boydii*	1	3	5
			14266	*P. boydii*	1	3	5
			14267	*P. boydii*	1	3	5
		10-mars-98	14457	*P. boydii*	1	3	5
		9-avr-98	15142	*P. boydii*	1	3	5
		10-juin-98	14638	*P. boydii*	2	3	5
		31-juil-98	14756	*P. boydii*	1	3	5
			14758	*P. boydii*	3	3	5
			14759	*P. boydii*	1	3	5
		4-sept-98	14369	*P. boydii*	1	3	5
		13-janv-99	15582	*P. boydii*	1	3	5
			15583	*P. boydii*	1	3	5
P2	Angers	13-janv-99	49900353 col. 1	*P. ellipsoidea*	4	7	8
			49900353 col. 2	*P. ellipsoidea*	4	7	8
P3	Giens	24-févr-98	14452	*P. boydii*	5	4	5
			14453	*P. boydii*	5	4	5
			14455	*P. boydii*	5	4	5
		26-mai-98	14624	*P. boydii*	5	4	5
			14626	*P. boydii*	5	4	5
			14627	*P. boydii*	5	4	5
		6-juin-98	14628	*P. boydii*	5	4	5
			14629	*P. boydii*	5	4	5
			14631	*P. boydii*	5	4	5
			14632	*P. boydii*	5	4	5
		15-juin-98	14633	*P. boydii*	5	4	5
			14634	*P. boydii*	5	4	5
			14635	*P. boydii*	5	4	5
			14636	*P. boydii*	5	4	5
			14637	*P. boydii*	5	4	5
		9-nov-98	15464	*P. boydii*	5	4	5
P4	Giens	8-janv-98	14268	*S. apiospermum*	6	8	3
		21-janv-98	14269	*S. apiospermum*	6	8	3
			14270	*S. apiospermum*	6	8	3
			14273	*S. apiospermum*	6	8	3
			14275	*S. apiospermum*	6	8	3
			14276	*S. apiospermum*	6	8	3
		15-févr-99	15643	*S. apiospermum*	6	8	3

Patient	Centre Hospitalier	Date d'isolement	Isolat	Identification au rang d'espèce	Génotype		
					RAPD	*Fungal* kit	*Aspergillus* kit
P5	Giens	22-sept-98	15149	*S. apiospermum*	8	9	4
			15151	*S. apiospermum*	8	9	4
P6	Giens	26-oct-98	15458	*S. aurantiacum*	9	2	6
			15459	*S. aurantiacum*	9	2	6
			15460	*S. aurantiacum*	9	2	6
			15461	*S. aurantiacum*	9	2	6
P7	Giens	19-janv-98	14357	*P. boydii*	10	6	5
		22-sept-98	15545	*P. boydii*	10	6	5
P8	Tours	4-mars-98	14462	*S. apiospermum*	11	10	1
			14463	*S. apiospermum*	11	10	2
			14465	*S. apiospermum*	11	10	1
		12-mars-98	15555	*S. apiospermum*	12	11	4
		11-août-98	14762	*S. apiospermum*	12	11	4
			14763	*S. apiospermum*	12	11	4
			14764	*S. apiospermum*	12	11	4
		22-sept-98	15146	*S. apiospermum*	12	11	4
			15148	*S. apiospermum*	12	11	4
		10-nov-98	15551	*S. apiospermum*	12	11	4
			15552	*S. apiospermum*	12	11	4
			15553	*S. apiospermum*	11	10	4
P9	Tours	16-févr-98	14358	*P. boydii*	15	5	5
			14359	*P. boydii*	15	5	5
			14360	*P. boydii*	15	5	5
			14361	/	15	5	5
			14362	*P. boydii*	15	5	5
/	/	/	13946	*P. minutispora*	/	1	9
/	/	/	21148	*P. minutispora*	/	1	7

8 Discussion

8.1 Règles d'interprétation des profils

La majorité des études utilisant la technologie DiversiLab® sur des isolats fungiques ont pour but l'identification au rang d'espèce. Pour ce faire, les profils sont comparés à des bibliothèques de profils de souches connues, on considère que l'isolat est de la même espèce qu'un isolat de la bibliothèque si la similarité dépasse un certain pourcentage (80 % à 90 % selon les études) [54-58]. Ces règles strictes d'interprétation rendent parfois difficile l'identification d'espèces très variables notamment si la bibliothèque de profils de référence n'est pas assez fournie [59] et il est reconnu que les espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* sont d'une grande variabilité génétique [12, 39, 43].

Notre étude a pour but principal la comparaison du génotype des isolats les uns par rapport aux autres. Dans des études similaires réalisées sur des bactéries, les règles d'interprétation varient en fonction des kits et des espèces [60, 61]. Comme il n'y a aucun consensus sur le génotypage du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* par la technologie DiversiLab®, que ce soit avec le *Fungal* kit ou l'*Aspergillus* kit, nous n'avons pas basé notre interprétation des profils sur le taux de similarité, mais sur leur comparaison visuelle avec l'outil de superposition du logiciel. L'interprétation visuelle des profils, bien que plus fastidieuse permet un fort pouvoir discriminant [60].

A posteriori, il nous est possible d'établir des seuils de similarité en dessous desquels 2 isolats sont considérés de génotypes toujours différents et au dessus desquels ils sont toujours considérés de même génotype, entre ces deux seuils, c'est la comparaison visuelle avec l'outil de superposition des profils du logiciel qui permet de définir si deux isolats sont de même génotype ou non.

Voici les seuils proposés dans notre étude :

- pour le *Fungal* kit : génotypes identiques si similarité ≥ 97 %, différents si ≤ 87 % (cf. annexe5).
- Pour l'*Aspergillus* kit : génotypes identiques si similarité ≥ 90 %, différents si ≤ 75 % (cf. annexe 6).

Lors d'une réaction de PCR, la taq-polymérase commet d'autant plus d'erreur que le fragment amplifié est long et donc de haut poids moléculaire, ces erreurs sont

aléatoires et donc non reproductibles. Pour prendre cela en compte, la corrélation de Pearson calculée par le logiciel DiversiLab®, bien que considérant l'ensemble des pics d'un profil, attribue une valeur moindre aux pics de haut poids moléculaire [59]. C'est pourquoi nous avons pris le parti de ne pas tenir compte de ces pics lors de notre interprétation visuelle.

8.2 Comparaison des kits de rep-PCR

Les deux kits ont permis l'obtention de profils exploitables pour l'ensemble des isolats. Cependant, les profils obtenus avec l'*Aspergillus* kit présentent moins de pics et sont donc plus difficilement interprétables (annexes 1 et 2).

Nous avons obtenu un plus grand nombre de génotypes différents avec le *Fungal* kit qu'avec l'*Aspergillus* kit (11 et 9 respectivement).

Les bornes d'interprétation selon l'index de similarité, établies ci-dessus, sont plus larges avec l'*Aspergillus* kit qu'avec le *Fungal* kit.

Grâce à l'ensemble de ces observations, nous pouvons affirmer que le pouvoir discriminant du *Fungal* kit est plus important que celui de l'*Aspergillus* kit pour l'étude d'isolats du complexe *P. boydii*./ *S. apiospermum*. Ceci est en accord avec l'étude de Fluit et *al.* [60] qui constataient aussi que le pouvoir discriminant de la rep-PCR est moins important quand on observe moins de pics sur le tracé électrophorétique.

8.3 Comparaison avec la RAPD

La RAPD est une technique où des régions polymorphes de l'ADN sont amplifiées de façon aléatoire. Pour typer des isolats, il faut comparer entre eux des gels d'électrophorèse obtenus avec plusieurs amorces. Dans l'étude de Defontaine et *al.*, 3 amorces différentes ont été utilisé (cf. fig. 11).

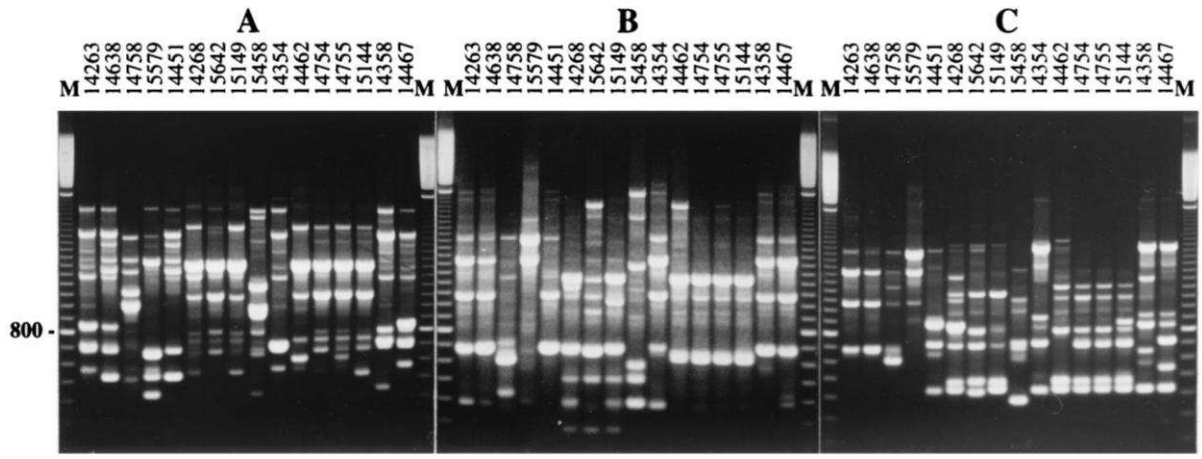


Figure 11 : Profils électrophorétiques des génotypes identifiés parmi les isolats de *S. apiospermum* de patients atteints de la mucoviscidose (extrait de Defontaine et *al.*, 2002).
Les amplicons générés par les amorces GC70 (5'-CGGCCACTGT-3') (**A**), UBC-701 (5'-CCCAACAACCC-3') (**B**) et UBC-703 (5'-CCAACCACCC-3') (**C**) ont été séparés sur gel d'agarose à 1,5%. **Colonne M**, marqueur de poids moléculaire.

8.3.1 DiversiLab® *Fungal* kit

Les résultats obtenus avec le *Fungal* kit sont similaires à ceux obtenus par RAPD, à l'exception des isolats 14638 et 14758 (génotype 2 et 3 respectivement) qui ne sont pas du même génotype entre eux et avec le reste des isolats du patient P1 (génotype 1) en RAPD.

Les génotypes 1 et 2 (isolat 14638) en RAPD ne diffèrent que par le profil obtenu avec l'amorce UBC-701, ce qui signifie que ces deux isolats sont extrêmement proches, cela pourrait expliquer le fait qu'ils ont un génotype identique par rep-PCR.

Quant au génotype 3 (isolat 14758), il diffère du génotype principal du patient sur les 3 profils RAPD. Nous n'avons pas d'explication au fait qu'il soit identique aux autres isolats du patient en rep-PCR.

8.3.2 DiversiLab® *Aspergillus* kit

Il existe plus de différences entre le typage effectué en RAPD et celui effectué par rep-PCR avec l'*Aspergillus* kit.

On retrouve le même phénomène que celui observé avec le *Fungal* kit pour le patient P1

L'*Aspergillus* kit est moins discriminant que la RAPD puisque tous les isolats de *P. boydii* font partie du même génotype (n°5) et que les isolats majoritaires de *S. apiospermum* des patients P5 et P8 font eux aussi partie d'un même génotype (n°4).

Pour les 3 isolats 14462, 14465 (génotype 1) et 14463 (génotype 2), il est probable que la rep-PCR *Aspergillus* n'ait pas fonctionné avec un rendement optimal puisque sur leurs profils électrophorétiques nous n'observons que 2 pics dépassant de peu les 150 unités de fluorescence. Ceci peut expliquer les différences observées avec les résultats obtenus en RAPD et avec le *Fungal* kit.

8.4 Comparaison avec les données de la littérature

8.4.1 Génotypage

Dans leur étude, Steinmann et *al.* [62] utilisent le même kit de rep-PCR que dans la présente étude (DiversiLab® *Mold* kit est l'ancien nom du *Fungal* kit) pour faire du typage d'isolat de *P. boydii* et *S. apiospermum* (n = 19 et n = 16 respectivement), ces isolats comportent des souches de référence et des souches cliniques. Ils utilisent le seuil des 85 % de similarité afin de considérer 2 isolats comme appartenant à la même espèce. Les résultats obtenus montrent qu'au sein de chaque espèce, les isolats ne se trouvent pas tous dans la limite des 85% de similarité. De plus certains isolats appartenant à une espèce ont plus de 85 % de similarité avec des isolats de l'autre espèce. Ils en concluent que la technologie DiversiLab® utilisées avec le *Mold* kit ne permet pas de faire la distinction entre *P. boydii* et *S. apiospermum*.

Dans notre étude, les isolats d'une seule et même espèce ne se trouvent pas toujours dans la limite des 85% quel que soit le kit utilisé (annexes 5 et 6). Cependant, aucun isolat d'une des espèces n'a plus de 85 % de similarité avec un isolat d'une autre espèce, peut-être est-ce parce que nous n'avons qu'un nombre restreint de génotypes pour chaque espèce : 4 génotypes de *P. boydii* et 4 génotypes de *S. apiospermum* avec le *Fungal* kit, le plus discriminant, contre 14 génotypes de *P. boydii* et 7 génotypes de *S. apiospermum* dans l'étude de Steinmann et *al.* .

Par ailleurs, le fait que les isolats d'une même espèce n'aient pas toujours plus de 85 % de similarité confirme la grande variabilité génétique de *P. boydii* et *S.*

apiospermum, ceci est un handicap pour l'identification de ces espèces par rep-PCR mais n'empêche pas son utilisation pour des études de comparaison de génotypes.

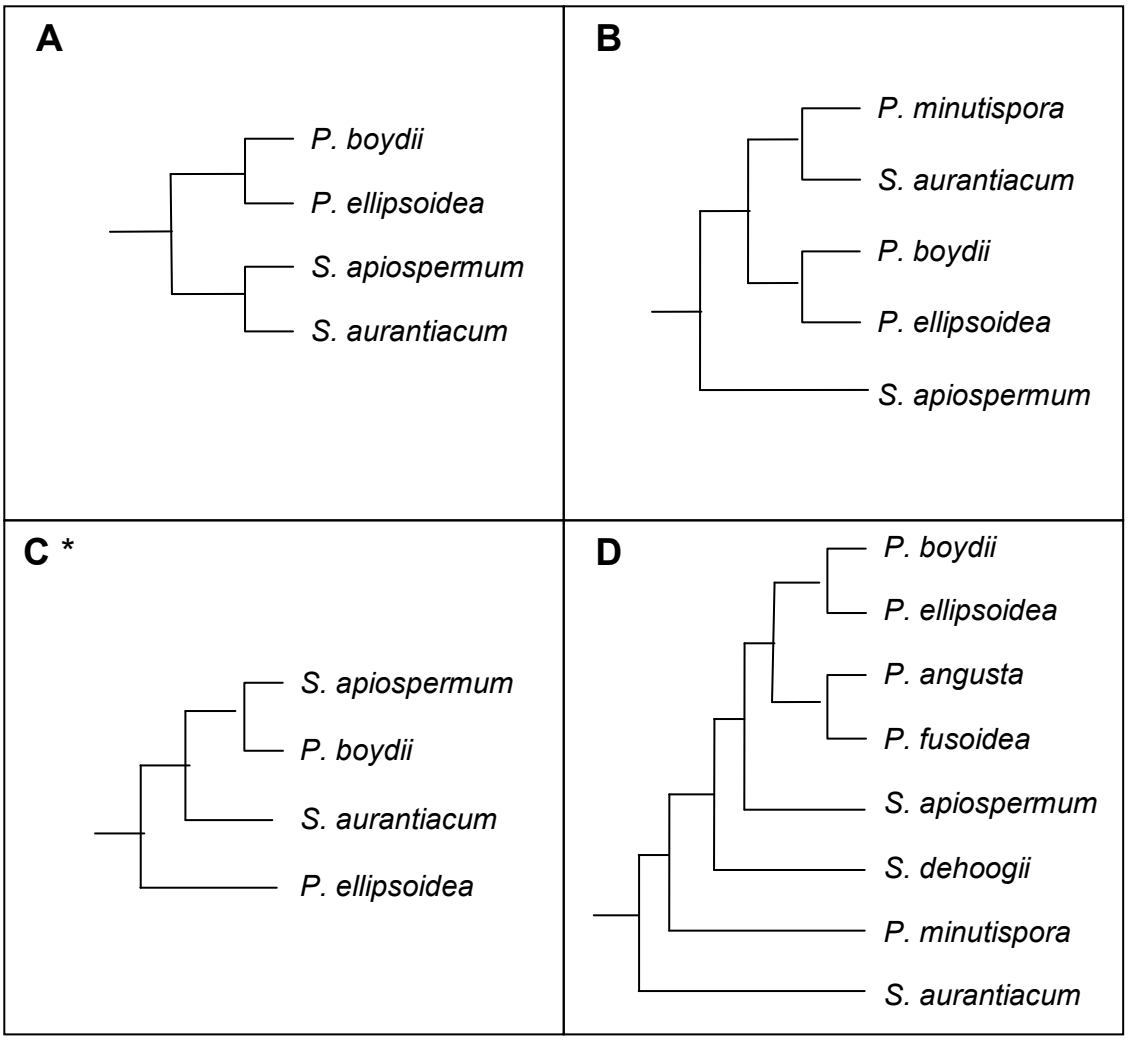


Figure 12 : Comparaison entre les différents arbres phylogénétiques obtenus selon les études, les techniques et les méthodes de construction du dendrogramme, respectivement.

A, Defontaine et *al.*, RAPD, UGPMA. **B**, présente étude, rep-PCR DiversiLab® *Fungal* kit, UGPMA. **C**, présente étude, rep-PCR DiversiLab® *Aspergillus* kit, UGPMA, **P. minutispora* n'est pas pris en compte car les deux isolats se placent différemment dans le dendrogramme. **D** Gilgado et *al.*, séquençage du locus TUB du gène de la β-tubuline, Most-parcimonious tree.

Les dendrogrammes obtenus par rep-PCR, ne relient pas les différentes espèces du complexe de façon identique, ils sont aussi différents de ceux obtenus par Defontaine et *al* [38] (2002) et Gilgado et *al.* [5] (2008) (cf. fig.12). Cela est dû au fait que la méthode UPGMA de construction des dendrogrammes est un algorithme qui a pour but principal de rapprocher les isolats les plus similaires [63], comme il est basé

sur une matrice de distance entre les isolats et non sur des séquences d'ADN, le dendrogramme obtenu ne reflète pas l'histoire phylogénétique des espèces [57] comme le font de plus récentes méthodes.

Dans notre étude, il y a par patient plus de génotypes différents de *S. apiospermum* que de *P. boydii* et cette différence est plus marquée avec l'*Aspergillus* kit. De plus, l'index de similarité le plus faible au sein d'une des deux espèces se voit avec *S. apiospermum* quel que soit le kit utilisé (cf. tab. 6). Bien que nous ayons peu de génotypes différents et peu d'isolats pour l'affirmer, ces résultats témoignent d'une plus grande variabilité génétique de *S. apiospermum* par rapport à *P. boydii* comme cela a déjà été décrit par d'autres [41].

Tableau 6 : Variabilité génotypique selon l'espèce

	P. boydii	*S. apiospermum*
Nombre de patients porteurs	4	3
Nombre de génotypes		
- *Fungal* kit	4	4
- *Aspergillus* kit	1	4
Index de similarité le plus faible		
- *Fungal* kit	78,6 %	66,2 %
- *Aspergillus* kit	77,6 %	69,1 %

8.4.2 Physiopathologie

Dans notre étude, la majorité des patients ne sont colonisés que par des isolats d'un seul et même génotype. Ceci est en accord avec le résultat d'autres études [18, 38, 41] montrant la capacité des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* à coloniser les voies aériennes supérieures des patients atteints de mucoviscidose de façon durable malgré des thérapies antifungiques répétées, et ce, probablement dû à la sensibilité diminuée de ces champignons aux antifungiques couramment utilisés.

Comme dans l'étude de Bernhardt et *al.* [41], nous avons mis en évidence des colonisations chroniques à *P. boydii* et *S. apiospermum*. Le faible nombre de patients

et la quantité restreinte d'isolats ne nous ont pas permis de mettre en évidence de colonisation durable par d'autres espèces du complexe mais dans leur étude, Zouhair et *al.* [18] ont démontré la même capacité de colonisation de la part de *S. aurantiacum* et *P. minutispora*.

Chez un seul patient (P8), nous avons trouvé des isolats de 2 génotypes différents. L'un était majoritaire et retrouvé 8 fois à 4 dates différentes, le second était retrouvé 4 fois à 2 dates différentes, ces deux génotypes ont été retrouvés une fois de façon concomitante (cf. tab. 7). Il s'agit probablement d'une colonisation concomitante par deux souches de génotypes distincts. Cependant nous ne pouvons exclure, aux vues du faible nombre d'isolats, une colonisation par une souche prédominante associée de façon intermittente à une seconde souche minoritaire. Ces deux modes de colonisation par des souches du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* ont déjà été décrits [18, 38, 41].

Tableau 7 : Colonisation des voies aériennes supérieures de P8

Date	12 mar. 98	03 avr. 98	22 sep. 98	11 oct. 98	08 nov. 98
S. apiospermum **génotype 11**		X		X	
S. apiospermum **génotype 12**	X		X	X	X

Dans notre étude, aucun patient n'est colonisé par deux espèces différentes du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum*, ces résultats sont similaires à ceux de Blyth et *al.* [10] mais le nombre d'isolats dans les deux études n'est certainement pas représentatif, n = 32 et n = 63 pour l'étude de Blyth et *al.* et la notre, respectivement. D'autres études, portant sur un plus grand nombre de patients et d'isolats, ont montré que des espèces différentes du complexe pouvaient se retrouver de façon successive ou concomitante dans les voies aériennes de patients atteints de mucoviscidose [15, 18, 38, 41], bien qu'une souche « colonisatrice » persiste.

Les génotypes des isolats retrouvés pour chaque patient que se soit avant ou après administration d'antifungique sont identiques pour les patients P1, P3, P4, P5, P6 et P7, les patients P2 et P9 n'ont pas reçu de traitement. Pour le patient P8 qui

est le seul chez qui l'on retrouve des génotypes différents, il n'y a aucun lien entre les dates d'isolement de chaque génotype et les périodes de traitement antifungique. Cependant, il n'a été administré que du fluconazole ou de l'itraconazole qui sont des molécules peu actives sur les espèces du complexe *P. boydii / S. apiospermum*. De ce fait, nous ne pouvons pas conclure quant à l'influence d'un traitement antifungique efficace sur la colonisation des voies aériennes supérieures des patients.

Il n'existe pas, à l'heure actuelle, dans la littérature, d'étude longitudinale où seraient corrélées les données cliniques des patients, les génotypes des isolats ainsi que leur profil de résistance aux antifungiques. Seul un tel travail permettrait d'évaluer pleinement l'influence des traitements antifungiques.

8.5 Considérations technico-économiques

La rep-PCR DiversiLab® est une technique très standardisée, l'ensemble des réactifs utilisés fait partie de kits commerciaux, il existe des contrôles de qualité permettant de vérifier la qualification de l'opérateur, ainsi que la qualification du thermocycleur avec lequel sont réalisées les PCR. De plus, la microélectrophorèse est automatisée et l'interprétation des profils est assistée par un logiciel. De ce fait, c'est une technique très reproductible, quelles que soient les conditions : inter ou intra-laboratoire, niveau de sous culture, prélèvement à partir des hyphes ou des spores [54, 62]. Cette standardisation et cette reproductibilité permettent de réaliser des bibliothèques de profils réutilisables dans le temps.

De plus, grâce au logiciel DiversiLab® les données sont accessibles et utilisables par l'opérateur depuis n'importe quel ordinateur relié à internet.

Un autre avantage de la rep-PCR semi-automatisée est sa faible durée de réalisation [55, 56] par rapport à d'autres techniques de génotypage [36]. Dans notre étude, nous avons obtenu des résultats exploitables en 24 à 36 heures à partir de la culture en milieu liquide.

Parmi les limitations de la rep-PCR DiversiLab®, nous nous devons de souligner que c'est une technique qui s'avère coûteuse et qui doit être réalisée sur plusieurs échantillons à la fois pour diminuer le prix de revient par isolat puisque les puces de microélectrophorèse comportent 12 puits et ne peuvent pas être réutilisées. À titre indicatif, le prix de revient par échantillon dans notre étude a été d'environ 49 €.

Conclusion

La mucoviscidose est la pathologie génétique la plus fréquente en France. Les espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* sont au deuxième rang des champignons filamenteux retrouvés dans les sécrétions bronchiques des patients atteints et ont montré une pathogénicité vraie notamment en post-greffe pulmonaire.

Comme ces espèces ont des virulences et des résistances aux antifungiques différentes, et pour mieux comprendre leur épidémiologie, il est important de développer des techniques permettant leur identification et leur typage rapide.

Dans notre étude, la technologie de rep-PCR semi-automatisée DiversiLab® a prouvé tout son intérêt pour le génotypage d'isolats de ce complexe, nous avons établi des règles d'interprétation qui pourront être utilisées dans d'autres études. Cette technique confirme les données obtenues en RAPD sur les mêmes isolats, à savoir que les patients atteints de mucoviscidose sont colonisés par une seule et même souche d'espèce du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* au cours de leur histoire.

Les avantages de cette technique sont sa standardisation permettant une très bonne reproductibilité intra et inter laboratoires, une vitesse d'exécution compatible avec un rendu de résultat rapide. Cependant l'utilisation de cette technique semble difficile dans un laboratoire de routine étant donné son coût important et la nécessité de passer un grand nombre d'échantillons à la fois.

Dans notre laboratoire, il peut être envisagé de créer une banque de profils électrophorétiques d'espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* afin d'évaluer cette technique pour l'identification et la différenciation des espèces de ce complexe.

Bibliographie

1. Guarro J, GenéJ, Stchigel AM. Developments in fungal taxonomy. Clin Microbiol Rev. juill 1999;12(3):454‑500.

2. Taylor JW. One Fungus = One Name: DNA and fungal nomenclature twenty years after PCR. IMA Fungus. 1 déc 2011;2(2):113‑120.

3. Blackwell M, Hibbett DS, Taylor JW, Spatafora JW. Research Coordination Networks: a phylogeny for kingdom Fungi (Deep Hypha). Mycologia. déc 2006;98(6):829‑837.

4. Gilgado F, Cano J, Gené J, Guarro J. Molecular Phylogeny of the Pseudallescheria boydii Species Complex: Proposal of Two New Species. J Clin Microbiol. oct 2005;43(10):4930‑4942.

5. Gilgado F, Cano J, Gené J, Sutton DA, Guarro J. Molecular and phenotypic data supporting distinct species statuses for Scedosporium apiospermum and Pseudallescheria boydii and the proposed new species Scedosporium dehoogii. J Clin Microbiol. févr 2008;46(2):766‑771.

6. Gilgado F, Gené J, Cano J, Guarro J. Heterothallism in Scedosporium apiospermum and description of its teleomorph Pseudallescheria apiosperma sp. nov. Med Mycol Off Publ Int Soc Hum Anim Mycol. févr 2010;48(1):122‑128.

7. Rainer J, de Hoog GS, Wedde M, Gräser Y, Gilges S. Molecular variability of Pseudallescheria boydii, a neurotropic opportunist. J Clin Microbiol. sept 2000;38(9):3267‑3273.

8. Lackner M, Klaassen CH, Meis JF, van den Ende AHGG, de Hoog GS. Molecular identification tools for sibling species of Scedosporium and Pseudallescheria. Med Mycol Off Publ Int Soc Hum Anim Mycol. juill 2012;50(5):497‑508.

9. Horré R, Marklein G. Isolation and clinical significance of Pseudallescheria and Scedosporium species. Med Mycol Off Publ Int Soc Hum Anim Mycol. juin 2009;47(4):415‑421.

10. Blyth CC, Harun A, Middleton PG, Sleiman S, Lee O, Sorrell TC, et al. Detection of occult Scedosporium species in respiratory tract specimens from patients with cystic fibrosis by use of selective media. J Clin Microbiol. janv 2010;48(1):314‑316.

11. Harun A, Gilgado F, Chen SC-A, Meyer W. Abundance of Pseudallescheria/Scedosporium species in the Australian urban environment suggests a possible source for scedosporiosis including the colonization of airways in cystic fibrosis. Med Mycol Off Publ Int Soc Hum Anim Mycol. nov 2010;48 Suppl 1:S70‑76.

12. Lu Q, Gerrits van den Ende AHG, Bakkers JMJE, Sun J, Lackner M, Najafzadeh MJ, et al. Identification of Pseudallescheria and Scedosporium Species by Three Molecular Methods▿. J Clin Microbiol. mars 2011;49(3):960‑967.

13. Lackner M, Najafzadeh MJ, Sun J, Lu Q, de Hoog GS. Rapid Identification of Pseudallescheria and Scedosporium Strains by Using Rolling Circle Amplification. Appl Environ Microbiol. janv 2012;78(1):126‑133.

14. Harun A, Blyth CC, Gilgado F, Middleton P, Chen SC-A, Meyer W. Development and Validation of a Multiplex PCR for Detection of Scedosporium spp. in Respiratory Tract Specimens from Patients with Cystic Fibrosis▿. J Clin Microbiol. avr 2011;49(4):1508‑1512.

15. Lu Q, van den Ende AHGG, de Hoog GS, Li R, Accoceberry I, Durand-Joly I, et al. Reverse line blot hybridisation screening of Pseudallescheria/Scedosporium species in patients with cystic fibrosis. Mycoses. oct 2011;54 Suppl 3:5‑11.

16. Coulibaly O, Marinach-Patrice C, Cassagne C, Piarroux R, Mazier D, Ranque S. Pseudallescheria/Scedosporium complex species identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry. Med Mycol Off Publ Int Soc Hum Anim Mycol. août 2011;49(6):621‑ 626.

17. Kaltseis J, Rainer J, De Hoog GS. Ecology of Pseudallescheria and Scedosporium species in human-dominated and natural environments and their distribution in clinical samples. Med Mycol Off Publ Int Soc Hum Anim Mycol. juin 2009;47(4):398‑ 405.

18. Zouhair R, Rougeron A, Razafimandimby B, Kobi A, Bouchara J-P, Giraud S. Distribution of the different species of the Pseudallescheria boydii/Scedosporium apiospermum complex in French patients with cystic fibrosis. Med Mycol Off Publ Int Soc Hum Anim Mycol. 5 mars 2013;

19. Blyth CC, Middleton PG, Harun A, Sorrell TC, Meyer W, Chen SC-A. Clinical associations and prevalence of Scedosporium spp. in Australian cystic fibrosis patients: identification of novel risk factors? Med Mycol Off Publ Int Soc Hum Anim Mycol. nov 2010;48 Suppl 1:S37‑ 44.

20. Guarro J, Kantarcioglu AS, Horré R, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca Estrella M, Berenguer J, et al. Scedosporium apiospermum: changing clinical spectrum of a therapy-refractory opportunist. Med Mycol Off Publ Int Soc Hum Anim Mycol. juin 2006;44(4):295‑ 327.

21. Cortez KJ, Roilides E, Quiroz-Telles F, Meletiadis J, Antachopoulos C, Knudsen T, et al. Infections Caused by Scedosporium spp. Clin Microbiol Rev. janv 2008;21(1):157‑ 197.

22. Bhally HS, Shields C, Lin SY, Merz WG. Otitis caused by Scedosporium apiospermum in an immunocompetent child. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. juill 2004;68(7):975‑ 978.

23. Kantarcioglu AS, de Hoog GS, Guarro J. Clinical characteristics and epidemiology of pulmonary pseudallescheriasis. Rev Iberoam Micol. mars 2012;29(1):1‑ 13.

24. Cimon B, Carrère J, Vinatier JF, Chazalette JP, Chabasse D, Bouchara JP. Clinical significance of Scedosporium apiospermum in patients with cystic fibrosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol. janv 2000;19(1):53‑ 56.

25. Castiglioni B, Sutton DA, Rinaldi MG, Fung J, Kusne S. Pseudallescheria boydii (Anamorph Scedosporium apiospermum). Infection in solid organ transplant recipients in a tertiary medical center and review of the literature. Medicine (Baltimore). sept 2002;81(5):333‑ 348.

26. Albernaz V, Huston B, Castillo M, Mukherji S, Bouldin TW. Pseudallescheria boydii infection of the brain: imaging with pathologic confirmation. AJNR Am J Neuroradiol. mars 1996;17(3):589‑ 592.

27. Kantarcioglu AS, Guarro J, de Hoog GS. Central nervous system infections by members of the Pseudallescheria boydii species complex in healthy and immunocompromised hosts: epidemiology, clinical characteristics and outcome. Mycoses. juill 2008;51(4):275‑ 290.

28. Katragkou A, Dotis J, Kotsiou M, Tamiolaki M, Roilides E. Scedosporium apiospermum infection after near-drowning. Mycoses. 2007;50(5):412‑ 21.

29. Gilgado F, Cano J, Gené J, Serena C, Guarro J. Different virulence of the species of the Pseudallescheria boydii complex. Med Mycol Off Publ Int Soc Hum Anim Mycol. juin 2009;47(4):371‑ 374.

30. Rodríguez MM, Pastor FJ, Salas V, Calvo E, Mayayo E, Guarro J. Experimental murine scedosporiosis: histopathology and azole treatment. Antimicrob Agents Chemother. sept 2010;54(9):3980‑ 3984.

31. Husain S, Muñoz P, Forrest G, Alexander BD, Somani J, Brennan K, et al. Infections due to Scedosporium apiospermum and Scedosporium prolificans in transplant recipients: clinical characteristics and impact of antifungal agent therapy on outcome. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 1 janv 2005;40(1):89‑99.

32. Gilgado F, Serena C, Cano J, Gené J, Guarro J. Antifungal Susceptibilities of the Species of the Pseudallescheria boydii Complex. Antimicrob Agents Chemother. déc 2006;50(12):4211‑4213.

33. Lackner M, de Hoog GS, Verweij PE, Najafzadeh MJ, Curfs-Breuker I, Klaassen CH, et al. Species-specific antifungal susceptibility patterns of Scedosporium and Pseudallescheria species. Antimicrob Agents Chemother. mai 2012;56(5):2635‑2642.

34. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST Technical Note on the method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia-forming moulds. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. oct 2008;14(10):982‑984.

35. Cuenca-Estrella M, Alastruey-Izquierdo A, Alcazar-Fuoli L, Bernal-Martinez L, Gomez-Lopez A, Buitrago MJ, et al. In vitro activities of 35 double combinations of antifungal agents against Scedosporium apiospermum and Scedosporium prolificans. Antimicrob Agents Chemother. mars 2008;52(3):1136‑1139.

36. Harun A, Perdomo H, Gilgado F, Chen SCA, Cano J, Guarro J, et al. Genotyping of Scedosporium species: a review of molecular approaches. Med Mycol Off Publ Int Soc Hum Anim Mycol. juin 2009;47(4):406‑414.

37. Zouhair R, Defontaine A, Ollivier C, Cimon B, Symoens F, Halle JN, et al. Typing of Scedosporium apiospermum by multilocus enzyme electrophoresis and random amplification of polymorphic DNA. J Med Microbiol. oct 2001;50(10):925‑932.

38. Defontaine A, Zouhair R, Cimon B, Carrère J, Bailly E, Symoens F, et al. Genotyping study of Scedosporium apiospermum isolates from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. juin 2002;40(6):2108‑2114.

39. Delhaes L, Harun A, Chen SCA, Nguyen Q, Slavin M, Heath CH, et al. Molecular typing of Australian Scedosporium isolates showing genetic variability and numerous S. aurantiacum. Emerg Infect Dis. févr 2008;14(2):282‑290.

40. Zeng JS, Fukushima K, Takizawa K, Zheng YC, Nishimura K, Gräser Y, et al. Intraspecific diversity of species of the Pseudallescheria boydii complex. Med Mycol Off Publ Int Soc Hum Anim Mycol. sept 2007;45(6):547‑558.

41. Bernhardt A, Sedlacek L, Wagner S, Schwarz C, Würstl B, Tintelnot K. Multilocus sequence typing of Scedosporium apiospermum and Pseudallescheria boydii isolates from cystic fibrosis patients. J Cyst Fibros Off J Eur Cyst Fibros Soc. 10 juin 2013;

42. Williamson EC, Speers D, Arthur IH, Harnett G, Ryan G, Inglis TJ. Molecular epidemiology of Scedosporium apiospermum infection determined by PCR amplification of ribosomal intergenic spacer sequences in patients with chronic lung disease. J Clin Microbiol. janv 2001;39(1):47‑50.

43. Horré R, Schaal KP, Marklein G, de Hoog GS, Reiffert S-M. Physiological typing of Pseudallescheria and Scedosporium strains using Taxa Profile, a semi-automated, 384-well microtitre system. Mycoses. oct 2011;54 Suppl 3:56‑65.

44. Bellis G, Cazes M-H, Parant A, Gaimard M, Travers C, Le Roux E, et al. Cystic fibrosis mortality trends in France. J Cyst Fibros Off J Eur Cyst Fibros Soc. mai 2007;6(3):179‑186.

45. Bobadilla JL, Macek M Jr, Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. Hum Mutat. juin 2002;19(6):575‑ 606.

46. Koch C, Høiby N. Diagnosis and treatment of cystic fibrosis. Respir Int Rev Thorac Dis. 2000;67(3):239‑ 247.

47. Saiman L. Infection prevention and control in cystic fibrosis. Curr Opin Infect Dis. août 2011;24(4):390‑ 395.

48. Huang YJ, Lynch SV. The emerging relationship between the airway microbiota and chronic respiratory disease: clinical implications. Expert Rev Respir Med. déc 2011;5(6):809‑ 821.

49. Pihet M, Carrere J, Cimon B, Chabasse D, Delhaes L, Symoens F, et al. Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis--a review. Med Mycol Off Publ Int Soc Hum Anim Mycol. juin 2009;47(4):387‑ 397.

50. Agarwal R, Chakrabarti A, Shah A, Gupta D, Meis JF, Guleria R, et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol. août 2013;43(8):850‑ 873.

51. Symoens F, Knoop C, Schrooyen M, Denis O, Estenne M, Nolard N, et al. Disseminated Scedosporium apiospermum infection in a cystic fibrosis patient after double-lung transplantation. J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant. mai 2006;25(5):603‑ 607.

52. Musk M, Chambers D, Chin W, Murray R, Gabbay E. Successful treatment of disseminated scedosporium infection in 2 lung transplant recipients: review of the literature and recommendations for management. J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant. oct 2006;25(10):1268‑ 1272.

53. Soll DR. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. Clin Microbiol Rev. avr 2000;13(2):332‑ 370.

54. Healy M, Reece K, Walton D, Huong J, Shah K, Kontoyiannis DP. Identification to the species level and differentiation between strains of Aspergillus clinical isolates by automated repetitive-sequence-based PCR. J Clin Microbiol. sept 2004;42(9):4016‑ 4024.

55. Pounder JI, Williams S, Hansen D, Healy M, Reece K, Woods GL. Repetitive-sequence-PCR-based DNA fingerprinting using the Diversilab system for identification of commonly encountered dermatophytes. J Clin Microbiol. mai 2005;43(5):2141‑ 2147.

56. Healy M, Reece K, Walton D, Huong J, Frye S, Raad II, et al. Use of the Diversi Lab System for species and strain differentiation of Fusarium species isolates. J Clin Microbiol. oct 2005;43(10):5278‑ 5280.

57. Wise MG, Healy M, Reece K, Smith R, Walton D, Dutch W, et al. Species identification and strain differentiation of clinical Candida isolates using the DiversiLab system of automated repetitive sequence-based PCR. J Med Microbiol. juin 2007;56(Pt 6):778‑ 787.

58. Hansen D, Healy M, Reece K, Smith C, Woods GL. Repetitive-sequence-based PCR using the DiversiLab system for identification of Aspergillus species. J Clin Microbiol. mai 2008;46(5):1835‑ 1839.

59. Pounder JI, Hansen D, Woods GL. Identification of Histoplasma capsulatum, Blastomyces dermatitidis, and Coccidioides species by repetitive-sequence-based PCR. J Clin Microbiol. août 2006;44(8):2977‑ 2982.

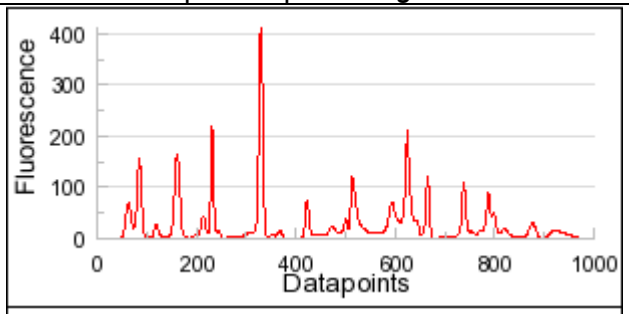
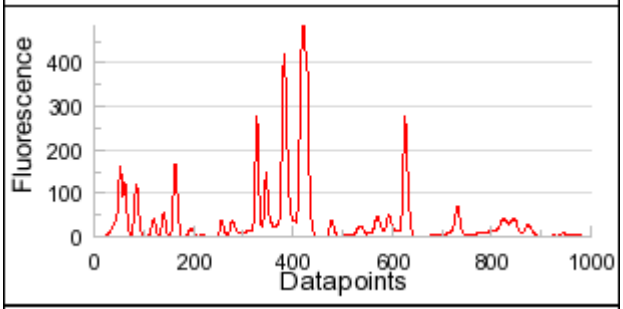
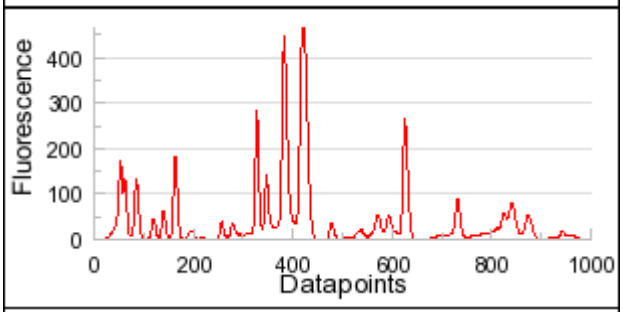
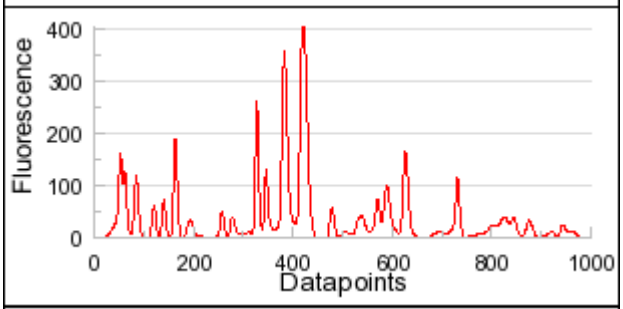
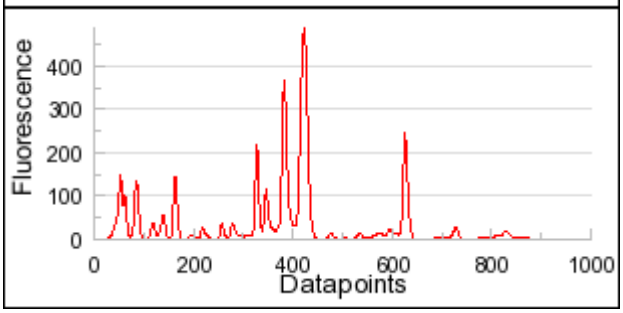
60. Fluit AC, Terlingen AM, Andriessen L, Ikawaty R, van Mansfeld R, Top J, et al. Evaluation of the DiversiLab system for detection of hospital outbreaks of infections by different bacterial species. J Clin Microbiol. nov 2010;48(11):3979‑ 3989.

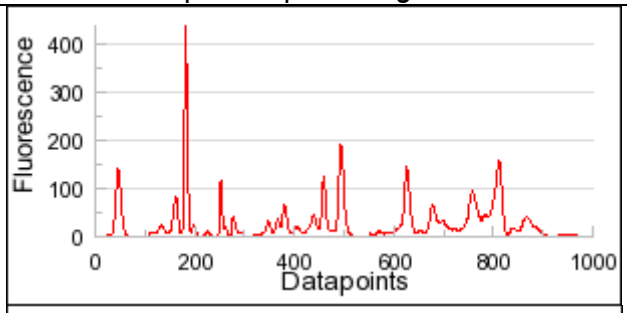
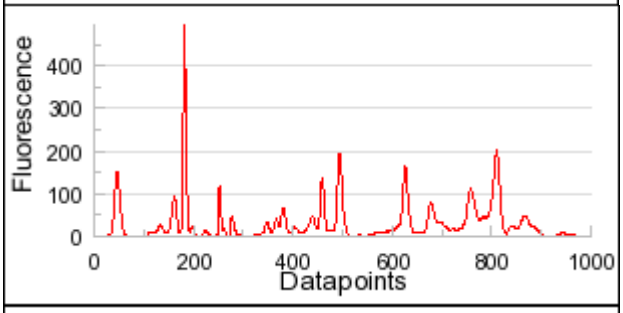
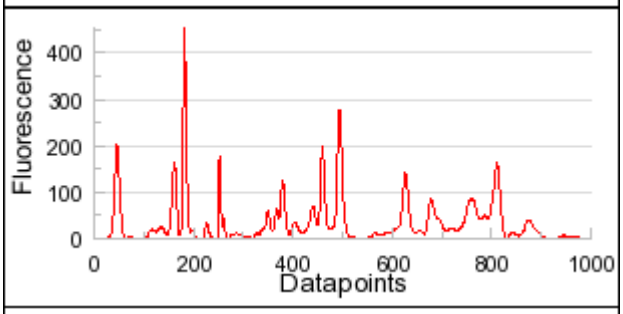
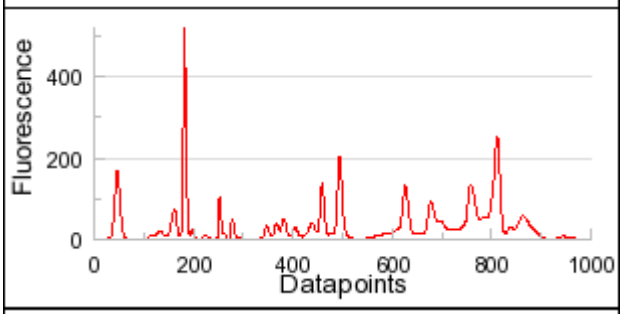
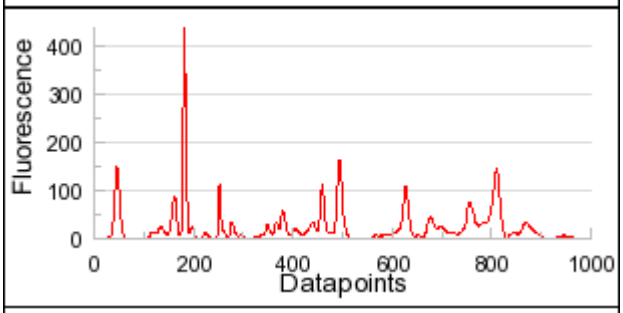
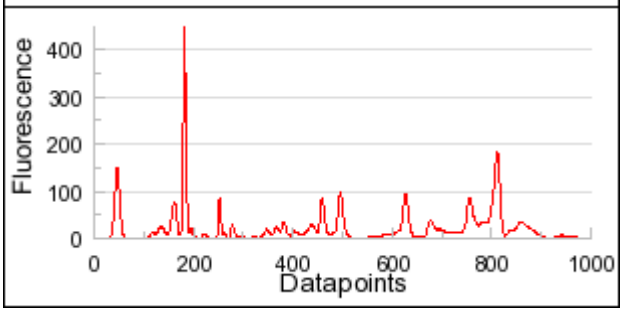
61. Grisold AJ, Zarfel G, Strenger V, Feierl G, Leitner E, Masoud L, et al. Use of automated repetitive-sequence-based PCR for rapid laboratory confirmation of nosocomial outbreaks. J Infect. janv 2010;60(1):44‑51.

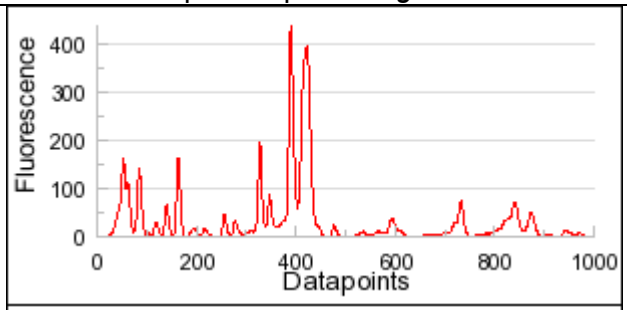
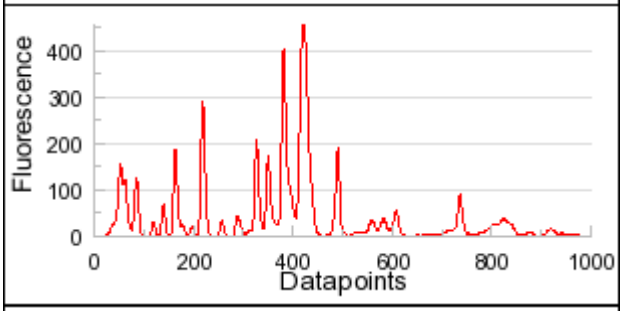
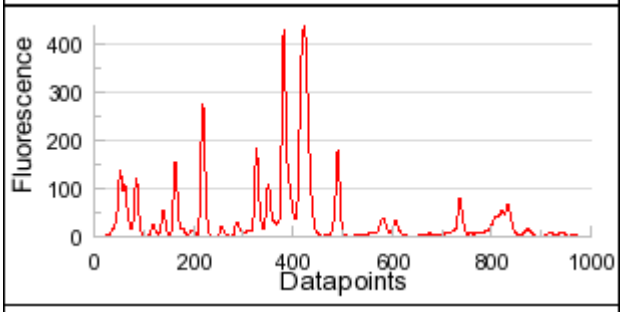
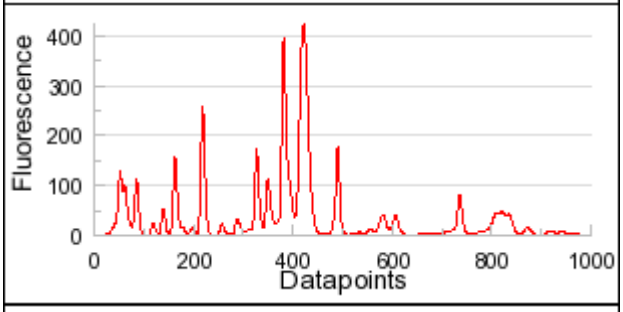
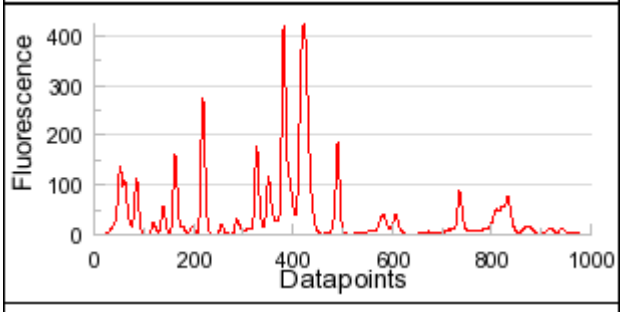
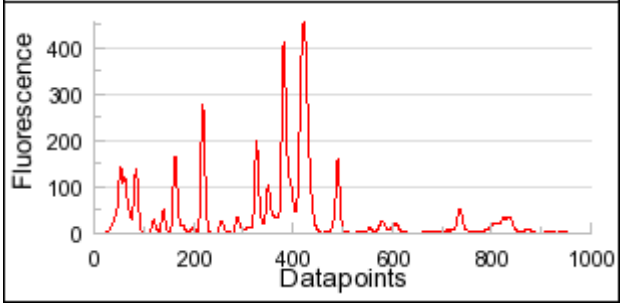
62. Steinmann J, Schmidt D, Buer J, Rath P-M. Discrimination of Scedosporium prolificans against Pseudallescheria boydii and Scedosporium apiospermum by semiautomated repetitive sequence-based PCR. Med Mycol Off Publ Int Soc Hum Anim Mycol. juill 2011;49(5):475‑483.

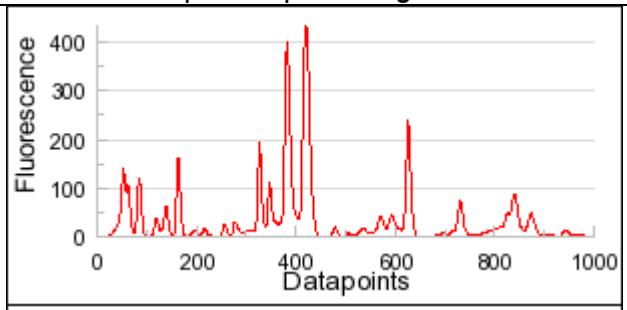
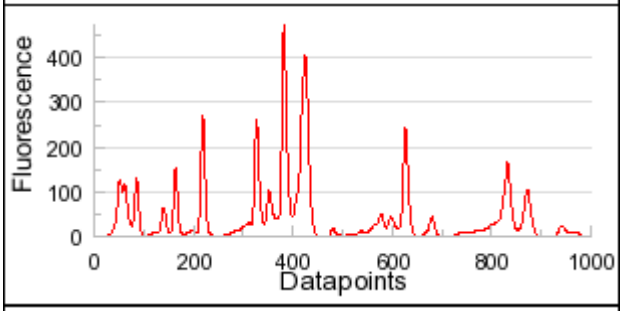
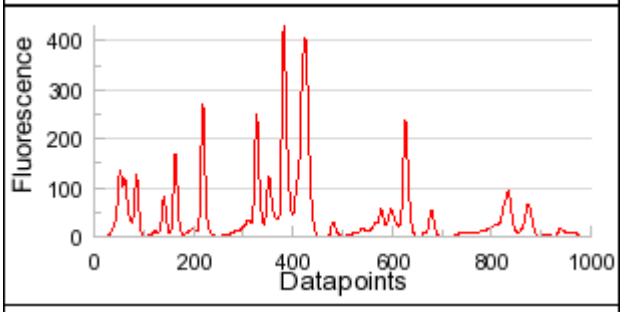
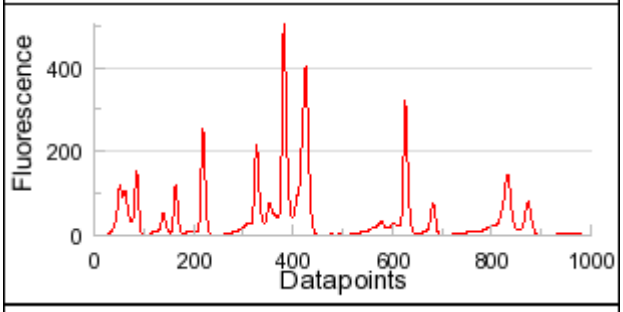
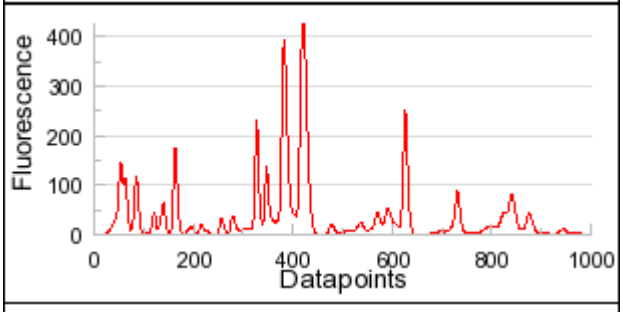
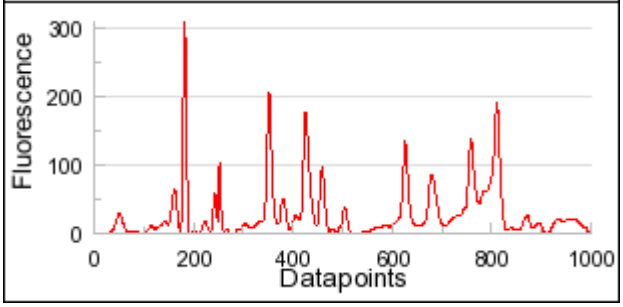
63. Wheeler TJ, Kececioglu JD. Multiple alignment by aligning alignments. Bioinforma Oxf Engl. 1 juill 2007;23(13):i559‑568.

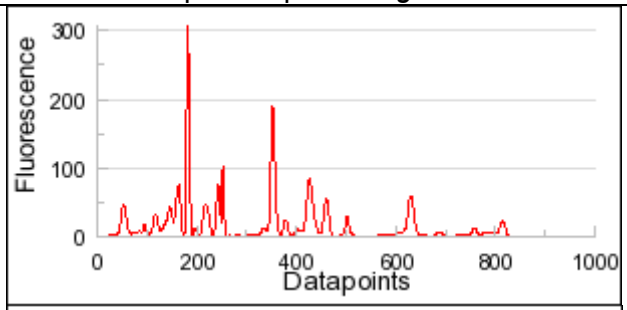
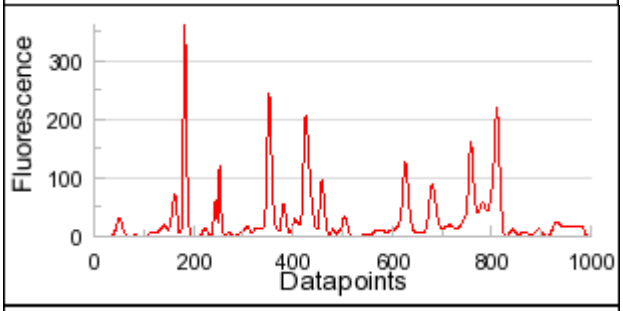
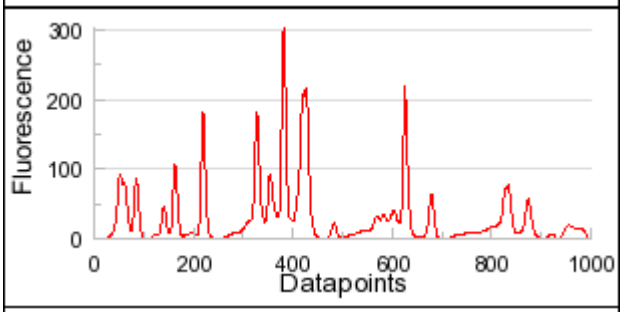
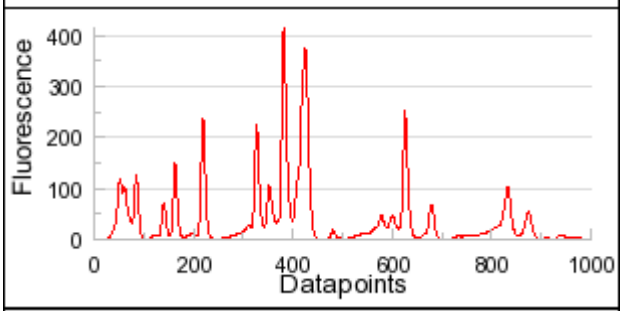
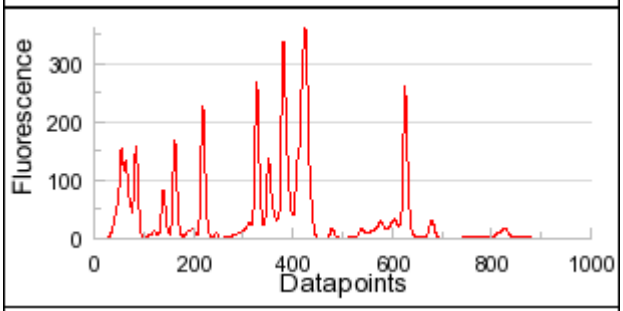
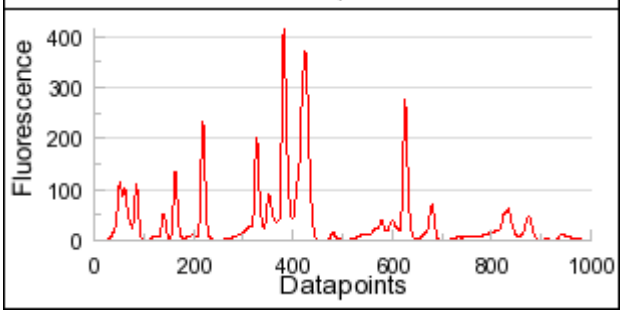
Annexe 1 : Tracés électrophorétiques obtenus avec le *Fungal* kit

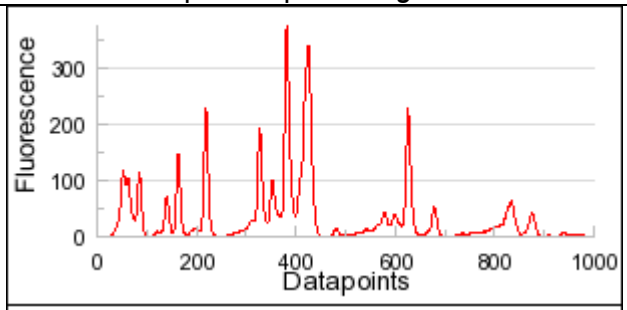
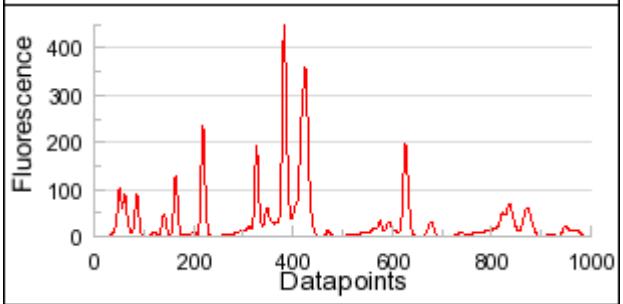
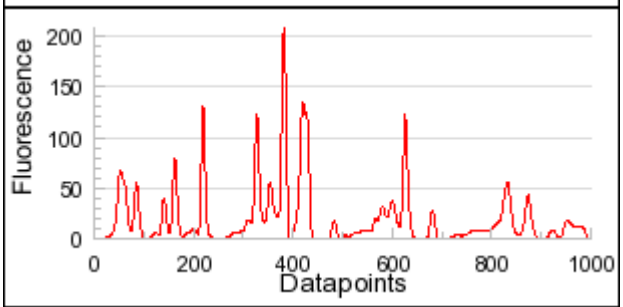
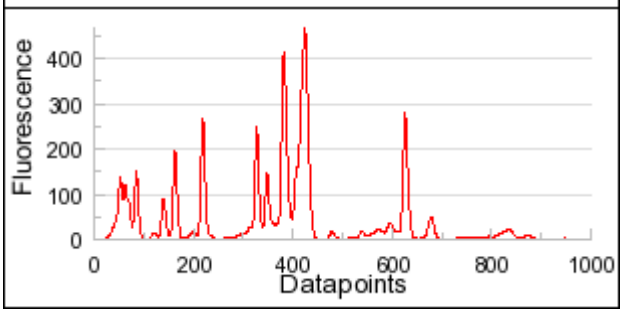
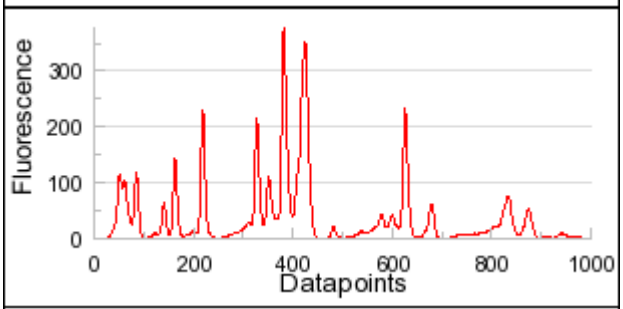
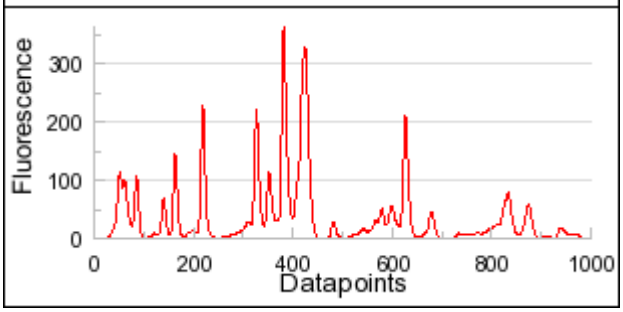
Isolat	Profils électrophorétiques *Fungal* kit	Identification	Génotype
13946		*P. minutispora*	1
14263		*P. boydii*	3
14264		*P. boydii*	3
14266		*P. boydii*	3
14267		*P. boydii*	3

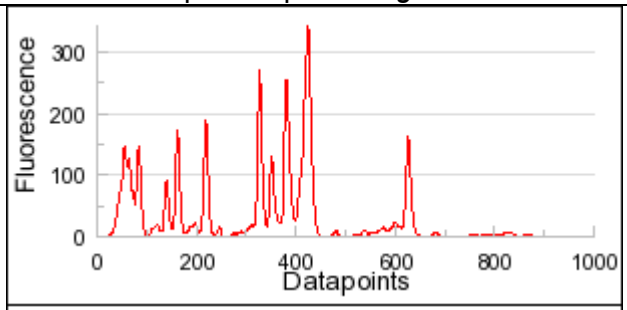
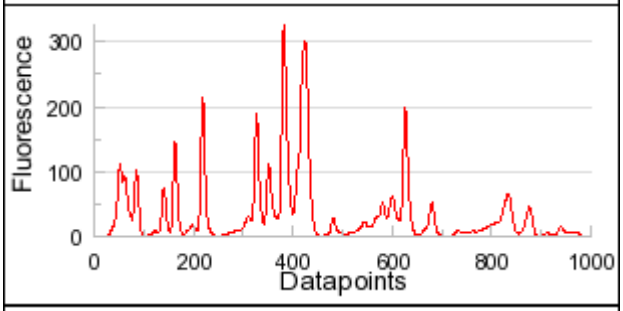
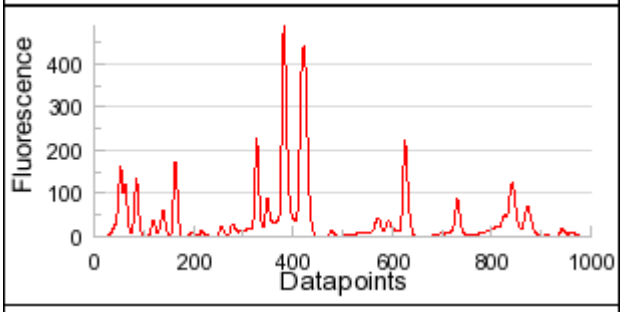
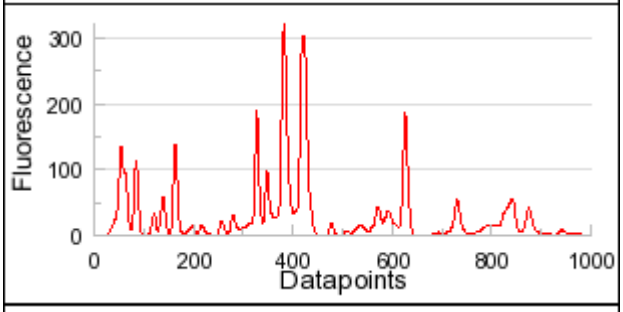
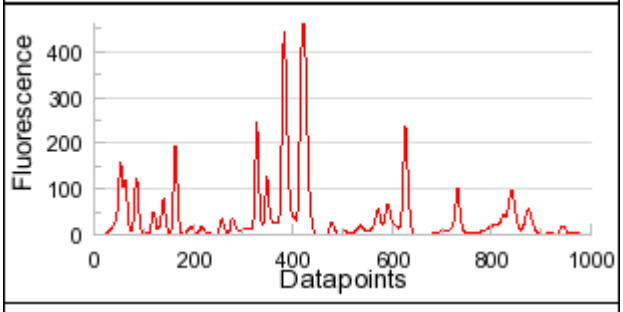
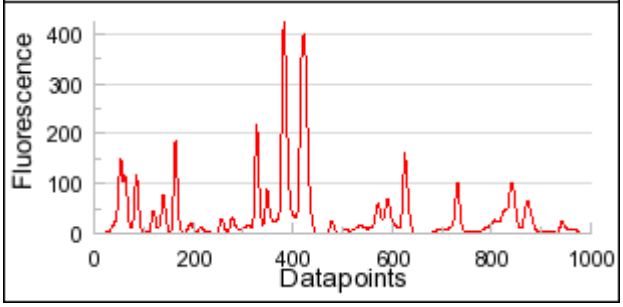
Isolat	Profils électrophorétiques *Fungal* kit	Identification	Génotype
14268		*S. apiospermum*	8
14269		*S. apiospermum*	8
14270		*S. apiospermum*	8
14273		*S. apiospermum*	8
14275		*S. apiospermum*	8
14276		*S. apiospermum*	8

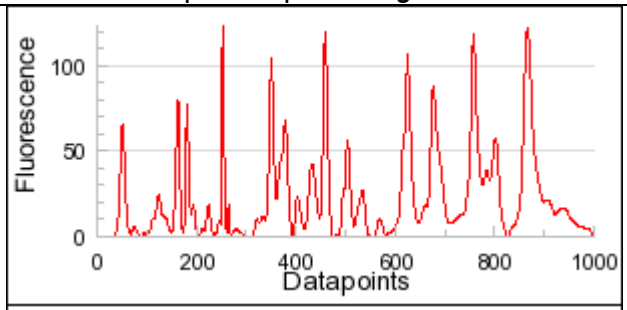
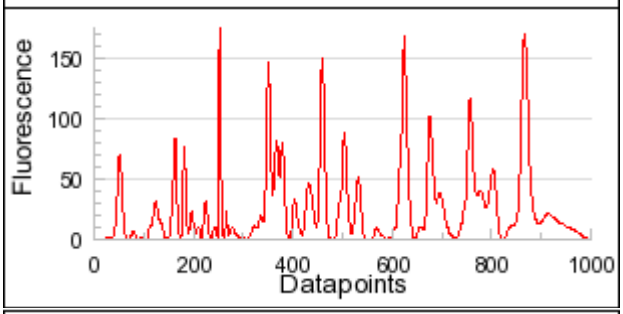
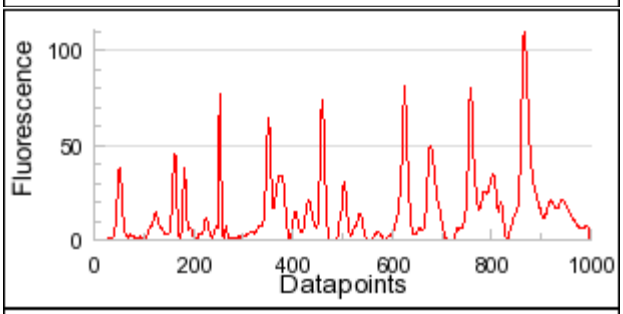
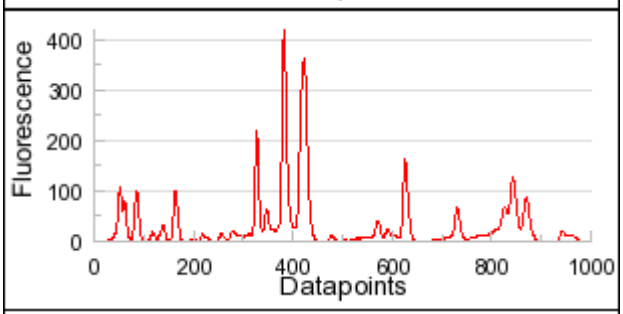
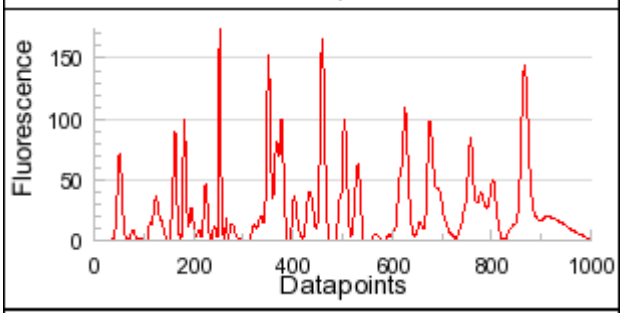
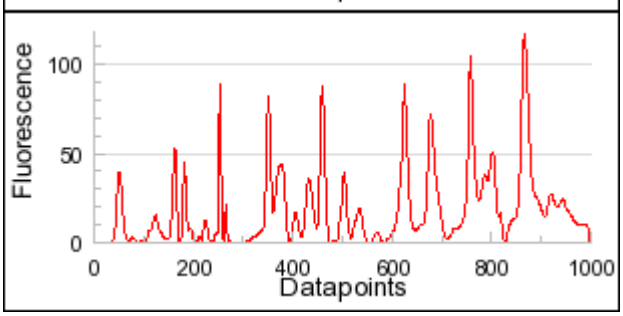
Isolat	Profils électrophorétiques *Fungal* kit	Identification	Génotype
14357		*P. boydii*	6
14358		*P. boydii*	5
14359		*P. boydii*	5
14360		*P. boydii*	5
14361			5
14362		*P. boydii*	5

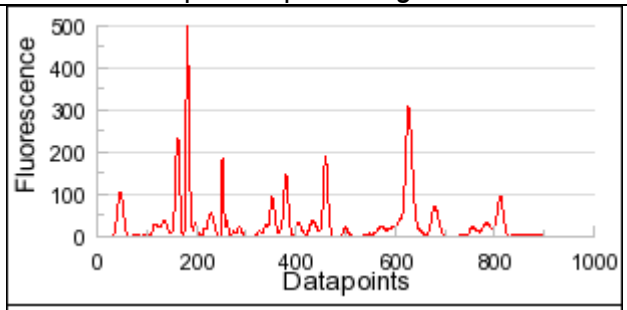
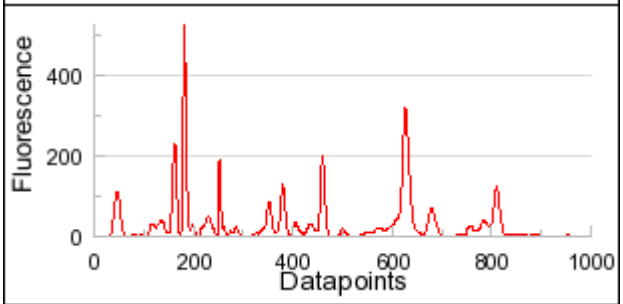
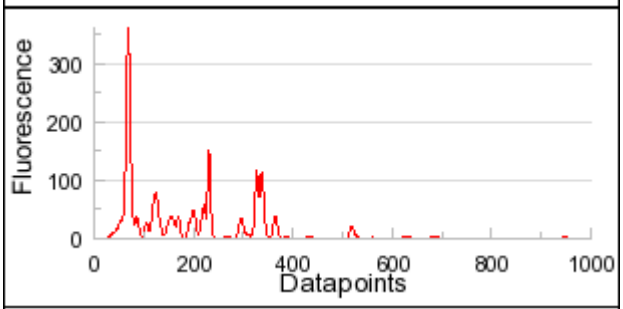
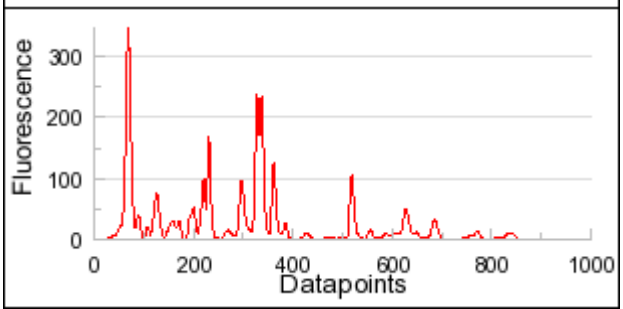
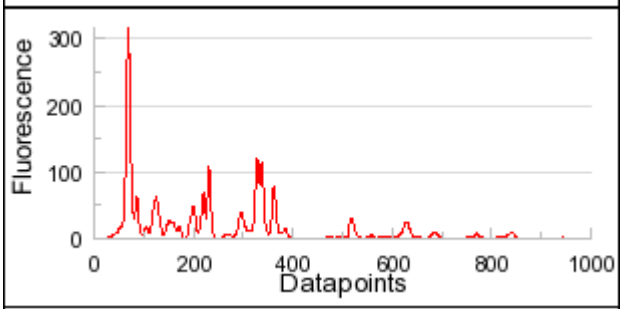
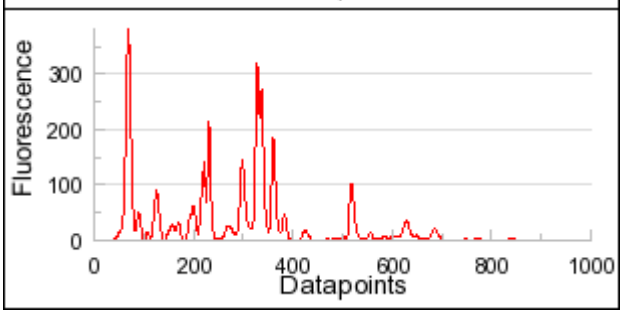
Isolat	Profils électrophorétiques *Fungal* kit	Identification	Génotype
14369		*P. boydii*	3
14452		*P. boydii*	4
14453		*P. boydii*	4
14455		*P. boydii*	4
14457		*P. boydii*	3
14462		*S. apiospermum*	10

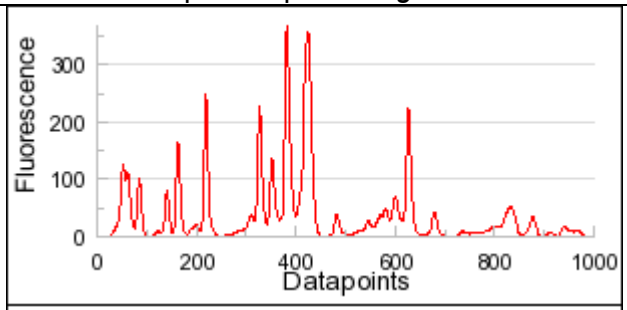
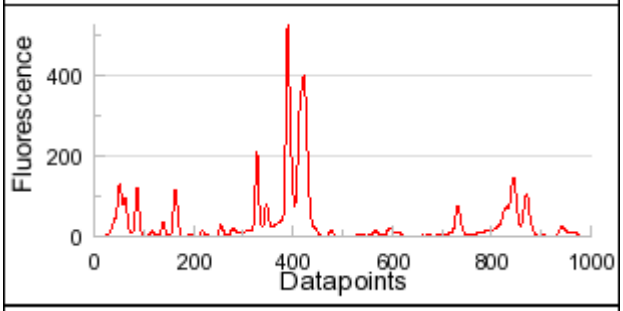
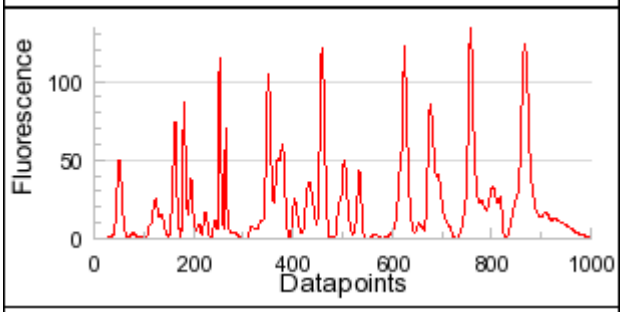
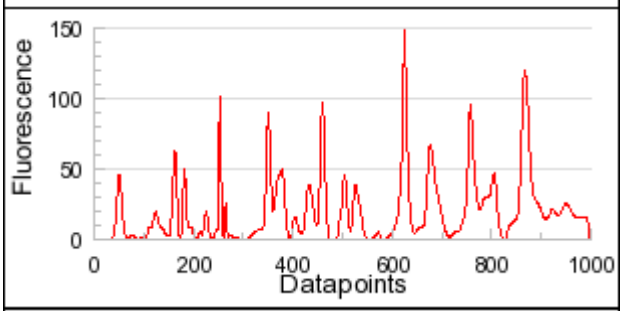
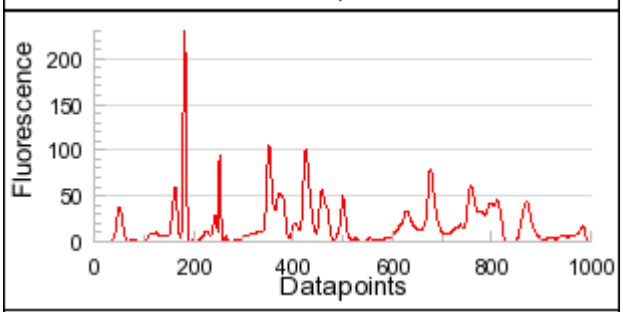
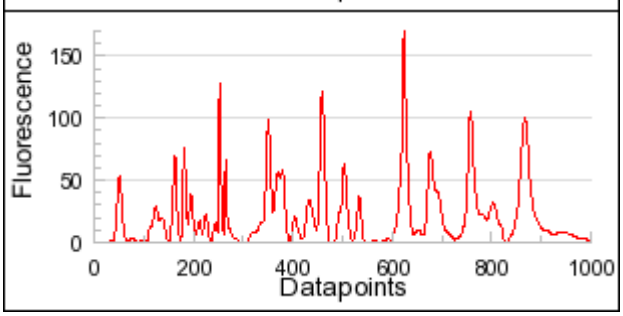
Isolat	Profils électrophorétiques *Fungal* kit	Identification	Génotype
14463		*S. apiospermum*	10
14465		*S. apiospermum*	10
14624		*P. boydii*	4
14626		*P. boydii*	4
14627		*P. boydii*	4
14628		*P. boydii*	4

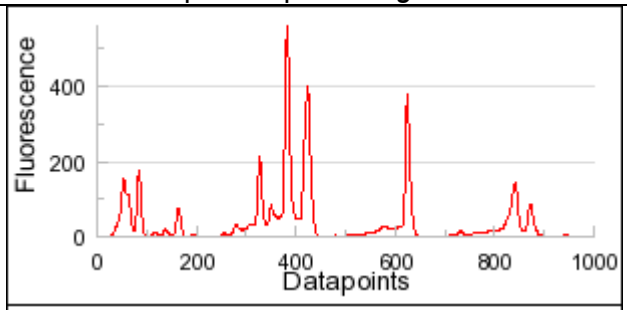
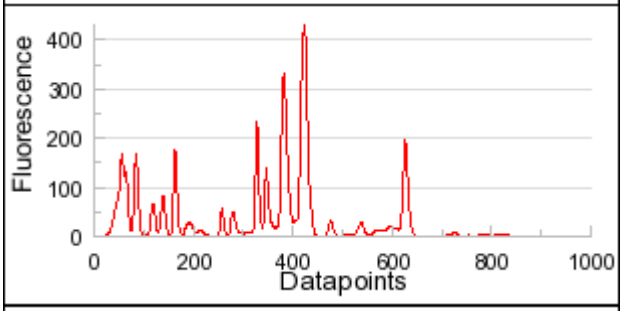
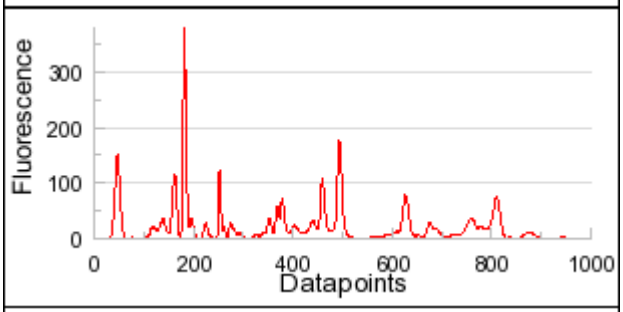
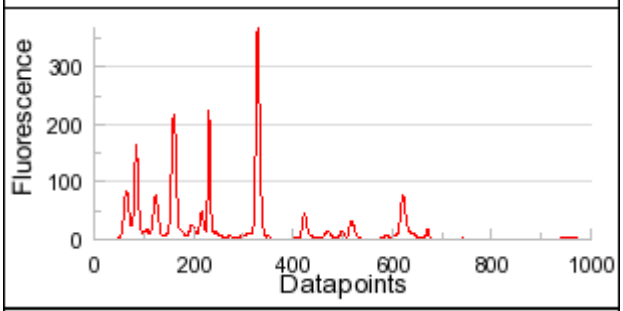
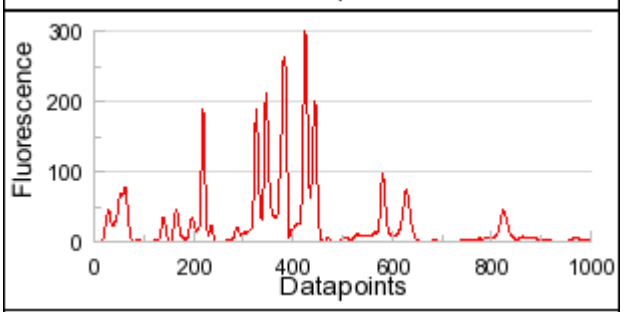
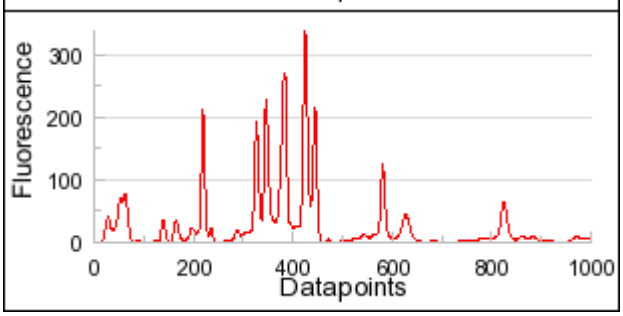
Isolat	Profils électrophorétiques *Fungal* kit	Identification	Génotype
14629		*P. boydii*	4
14631		*P. boydii*	4
14632		*P. boydii*	4
14633		*P. boydii*	4
14634		*P. boydii*	4
14635		*P. boydii*	4

Isolat	Profils électrophorétiques *Fungal* kit	Identification	Génotype
14636		*P. boydii*	4
14637		*P. boydii*	4
14638		*P. boydii*	3
14756		*P. boydii*	3
14758		*P. boydii*	3
14759		*P. boydii*	3

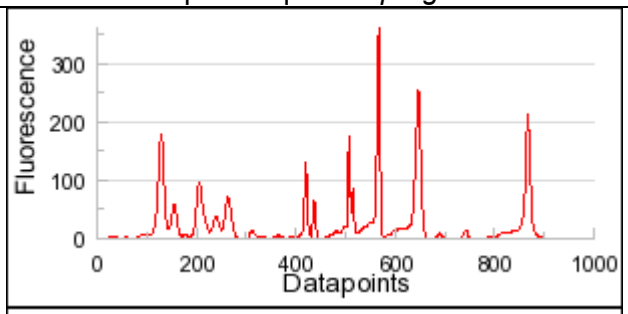
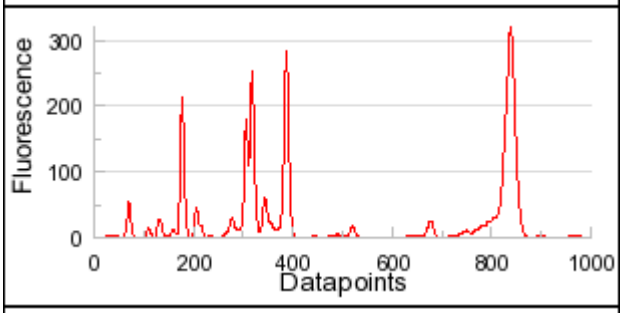
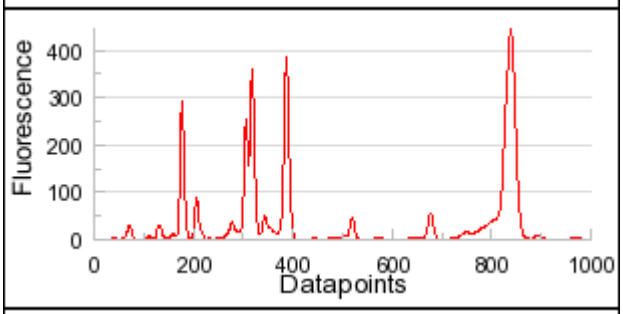
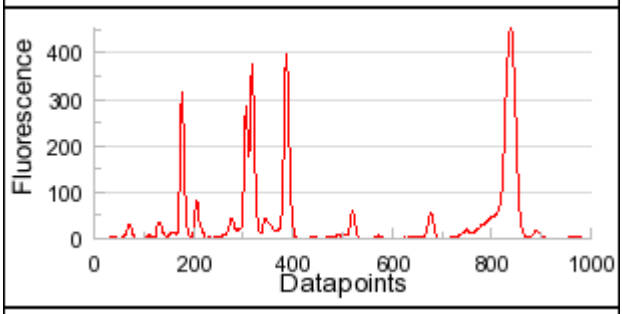
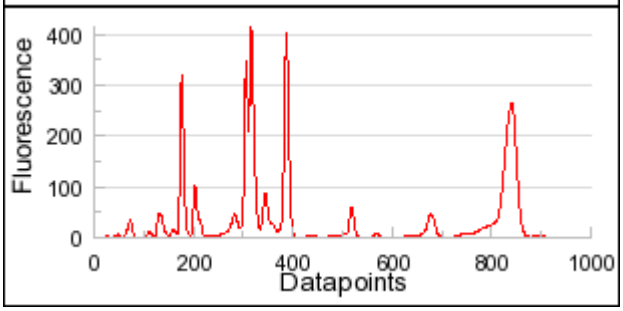
Isolat	Profils électrophorétiques *Fungal* kit	Identification	Génotype
14762		*S. apiospermum*	11
14763		*S. apiospermum*	11
14764		*S. apiospermum*	11
15142		*P. boydii*	3
15146		*S. apiospermum*	11
15148		*S. apiospermum*	11

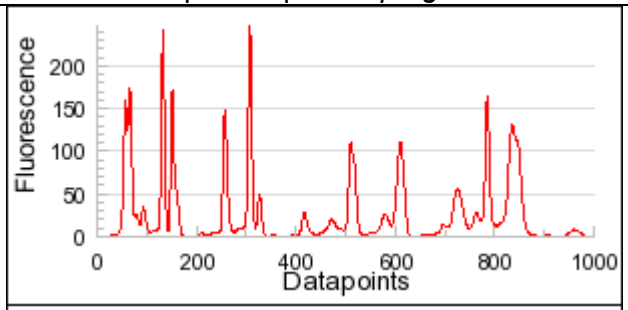
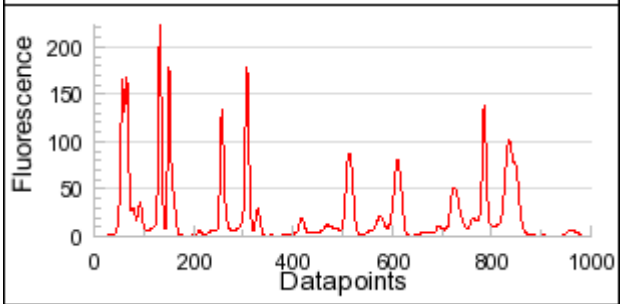
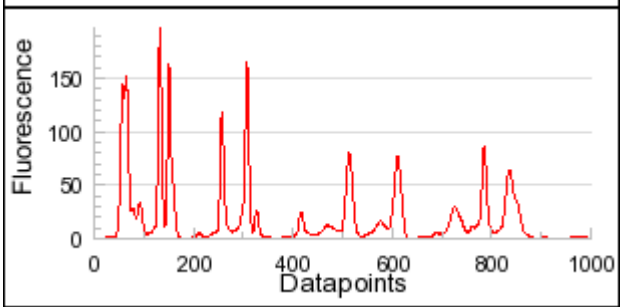
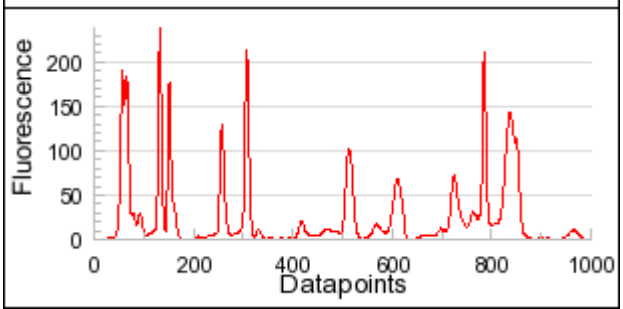
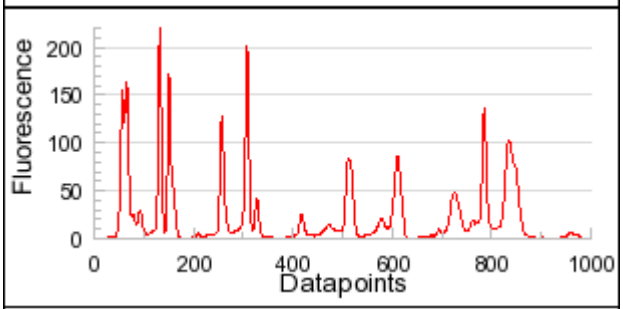
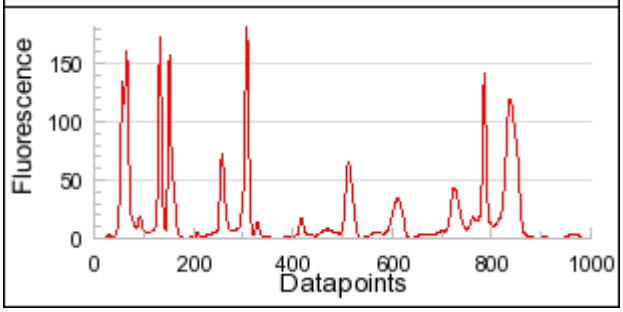
Isolat	Profils électrophorétiques *Fungal* kit	Identification	Génotype
15149		*S. apiospermum*	9
15151		*S. apiospermum*	9
15458		*S. aurantiacum*	2
15459		*S. aurantiacum*	2
15460		*S. aurantiacum*	2
15461		*S. aurantiacum*	2

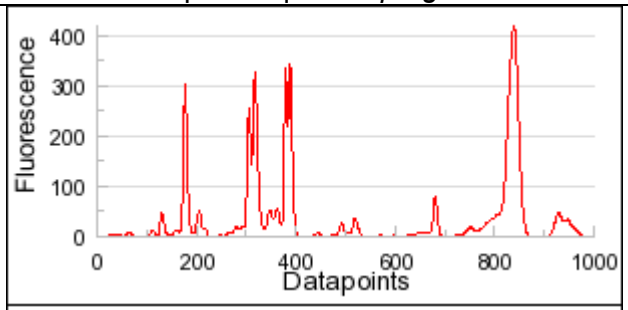
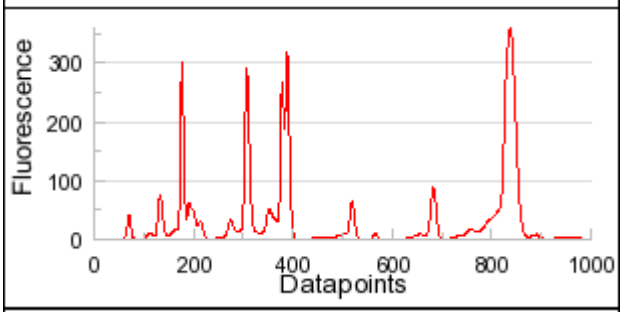
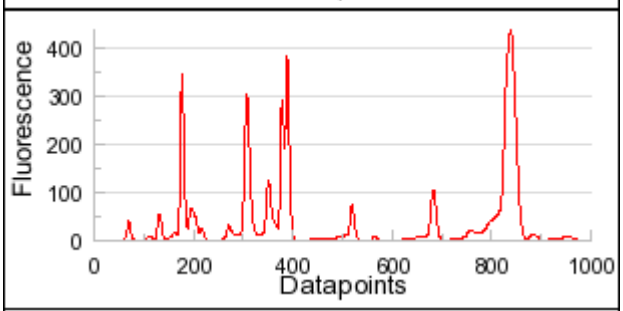
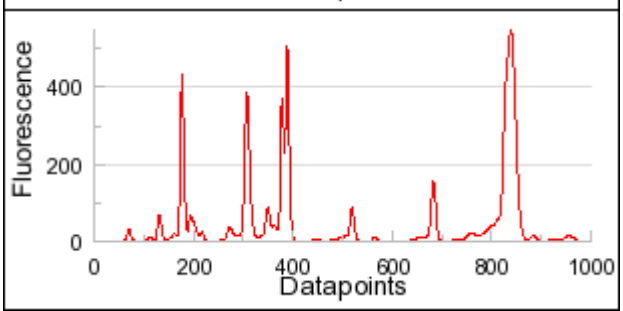
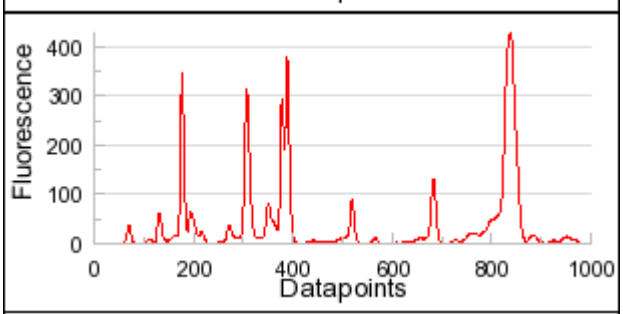
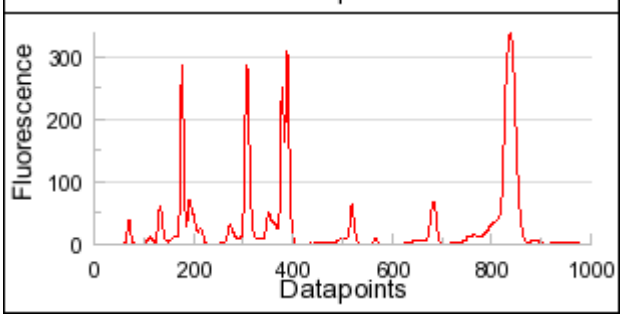
Isolat	Profils électrophorétiques *Fungal* kit	Identification	Génotype
15464		*P. boydii*	4
15545		*P. boydii*	6
15551		*S. apiospermum*	11
15552		*S. apiospermum*	11
15553		*S. apiospermum*	10
15555		*S. apiospermum*	11

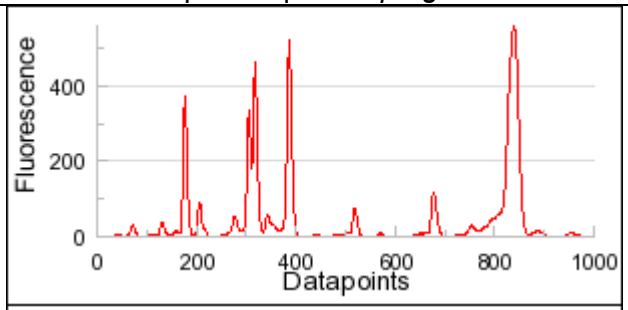
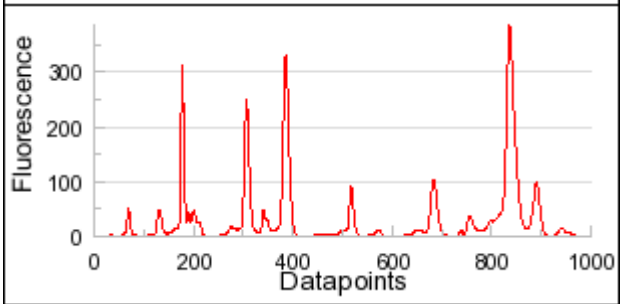
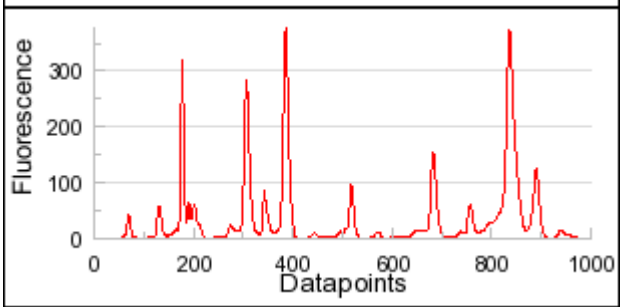
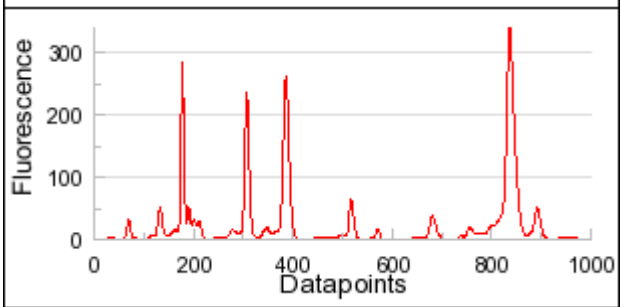
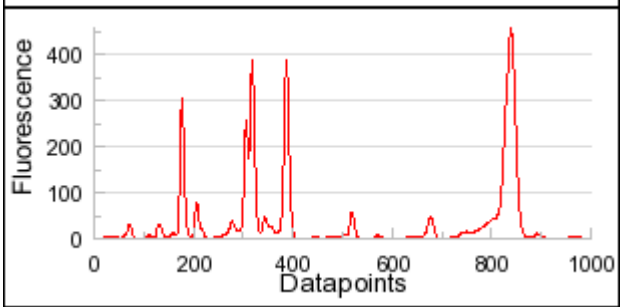
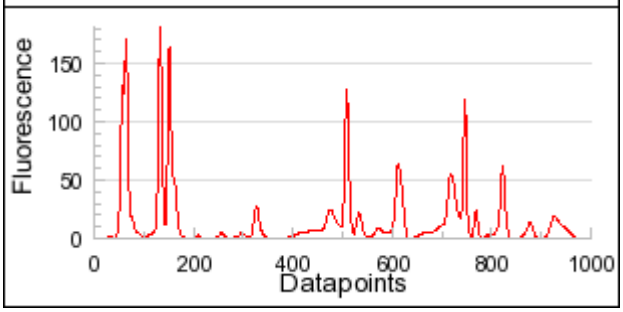
Isolat	Profils électrophorétiques *Fungal* kit	Identification	Génotype
15582		*P. boydii*	3
15583		*P. boydii*	3
15643		*S. apiospermum*	8
21148		*P. minutispora*	1
49900353 col. 1		*P. ellipsoidea*	7
49900353 col. 2		*P. ellipsoidea*	7

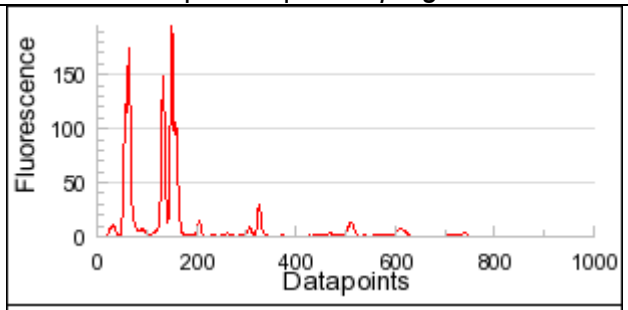
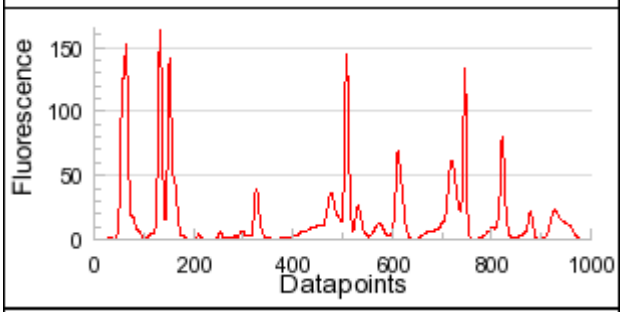
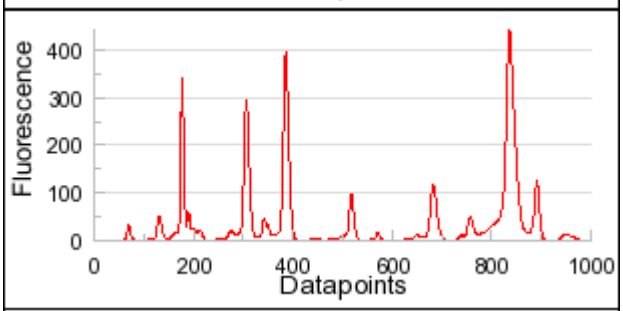
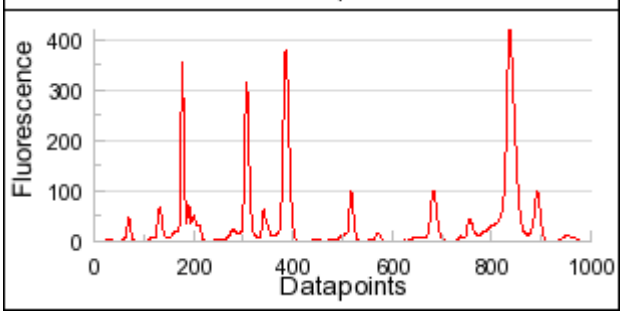
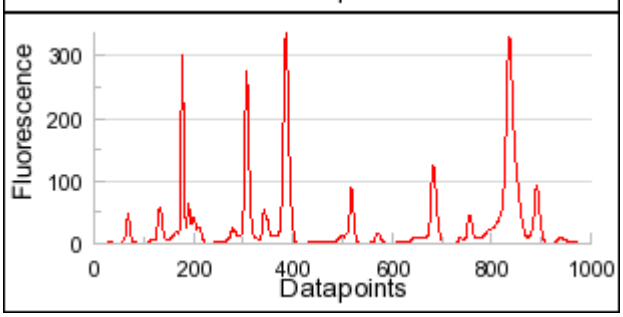
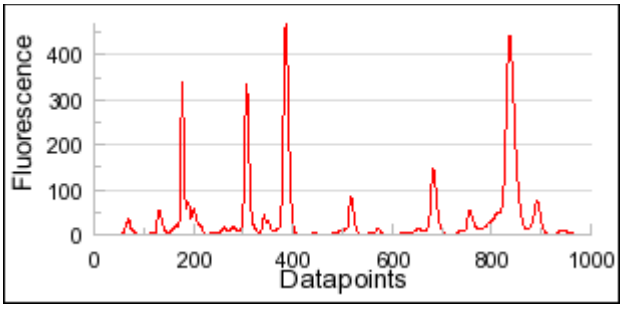
Annexe 2 : Tracés électrophorétiques obtenus avec l'*Aspergillus* kit

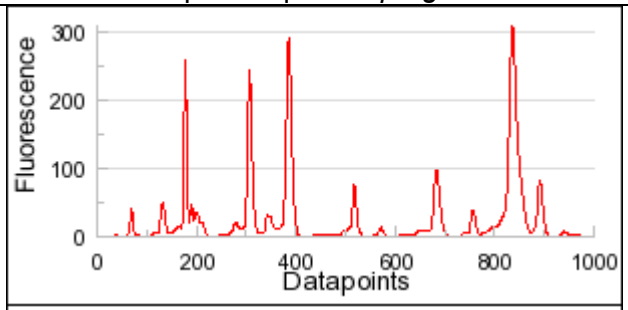
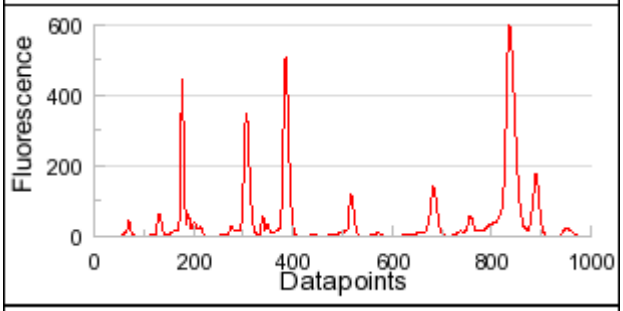
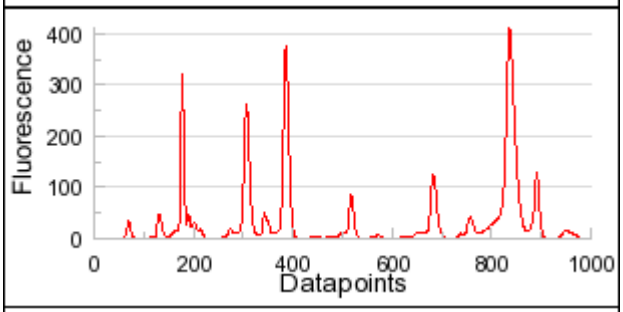
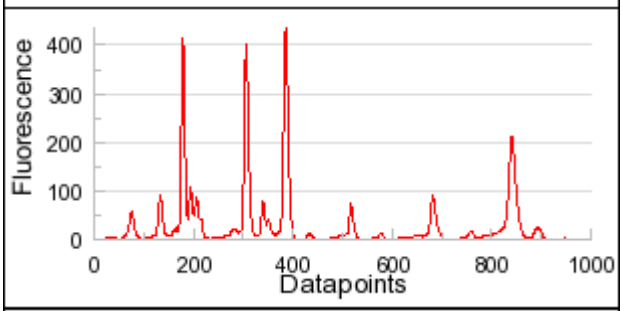
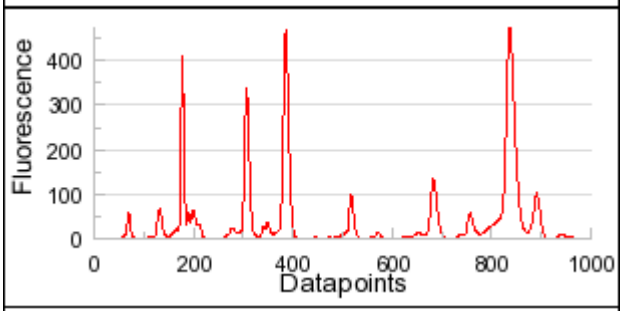
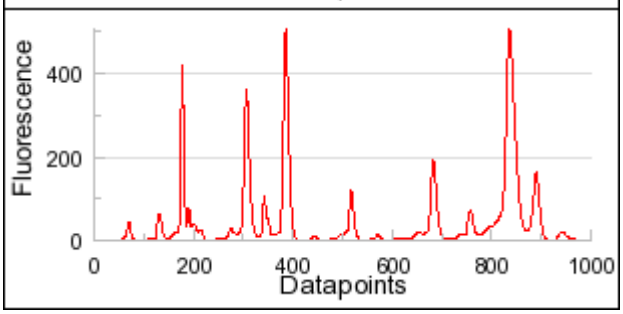
Isolat	Profils électrophorétiques *Aspergillus* kit	Identification	Génotype
13946		*P. minutispora*	7
14263		*P. boydii*	5
14264		*P. boydii*	5
14266		*P. boydii*	5
14267		*P. boydii*	5

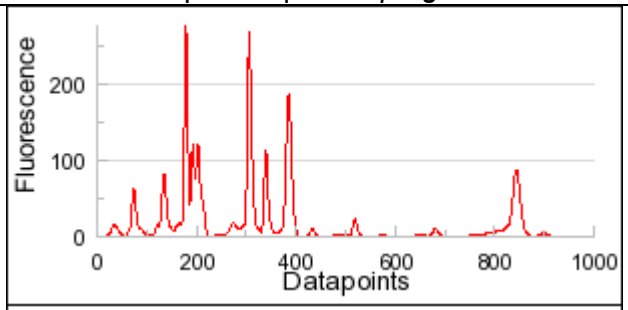
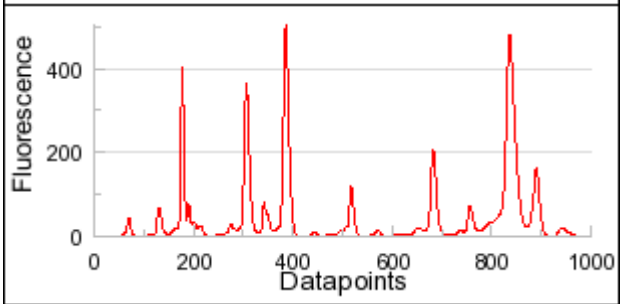
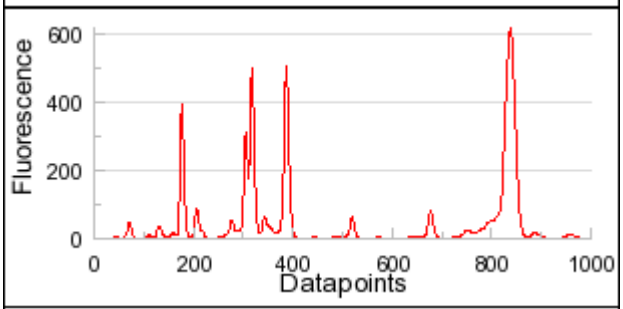
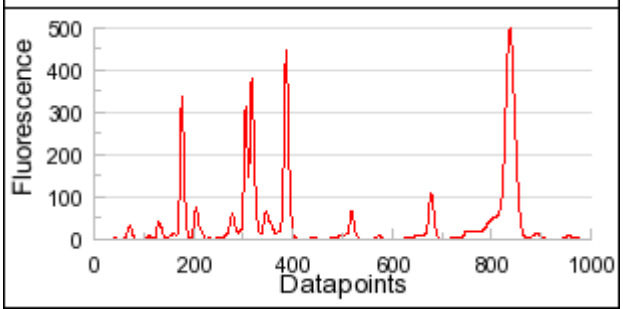
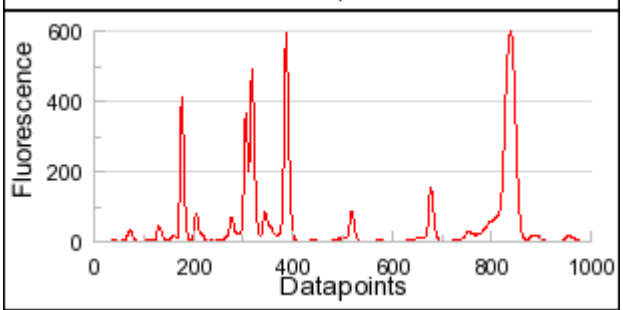
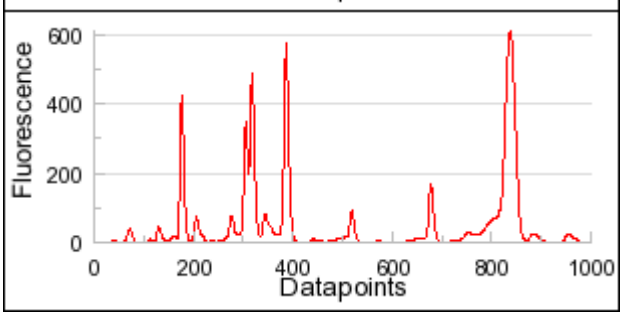
Isolat	Profils électrophorétiques *Aspergillus* kit	Identification	Génotype
14268		*S. apiospermum*	3
14269		*S. apiospermum*	3
14270		*S. apiospermum*	3
14273		*S. apiospermum*	3
14275		*S. apiospermum*	3
14276		*S. apiospermum*	3

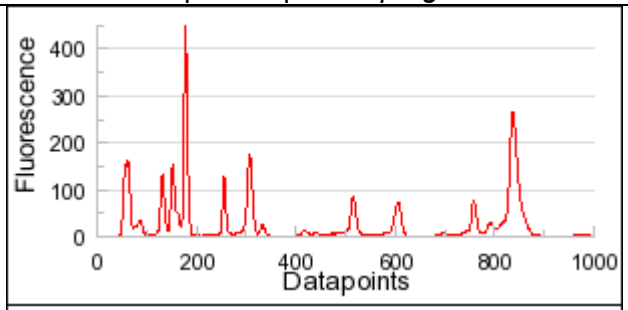
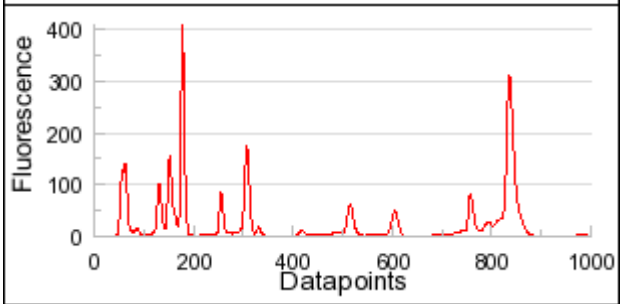
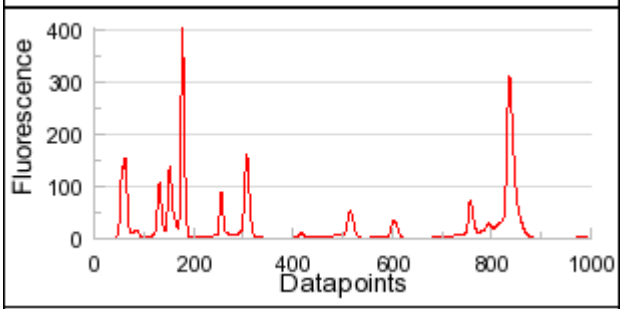
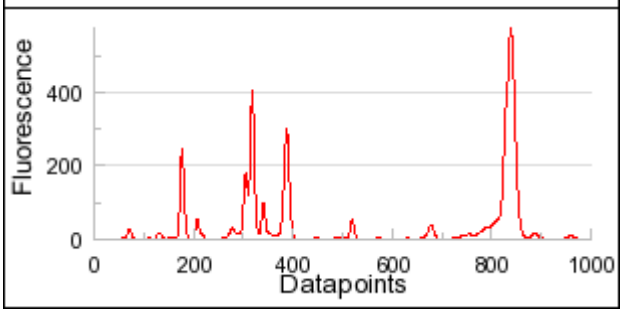
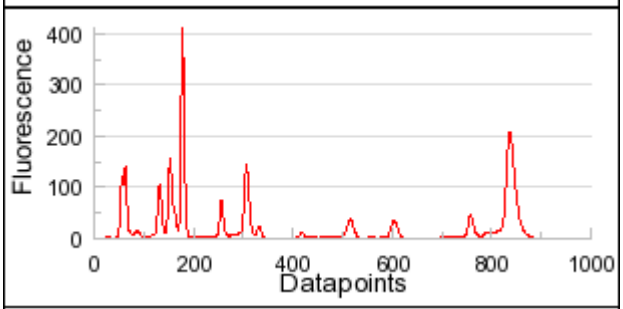
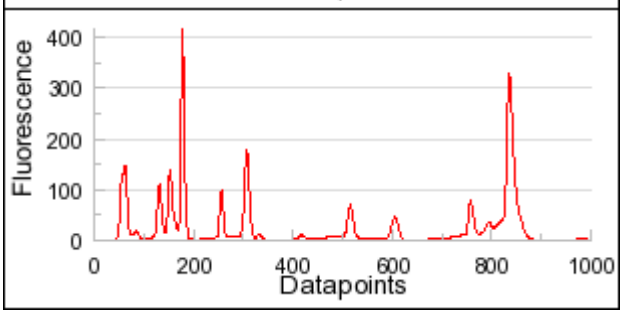
Isolat	Profils électrophorétiques *Aspergillus* kit	Identification	Génotype
14357		*P. boydii*	5
14358		*P. boydii*	5
14359		*P. boydii*	5
14360		*P. boydii*	5
14361			5
14362		*P. boydii*	5

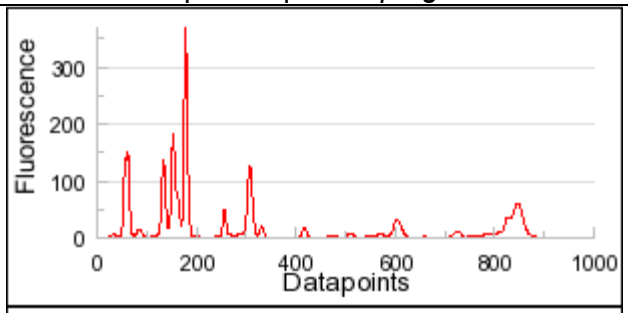
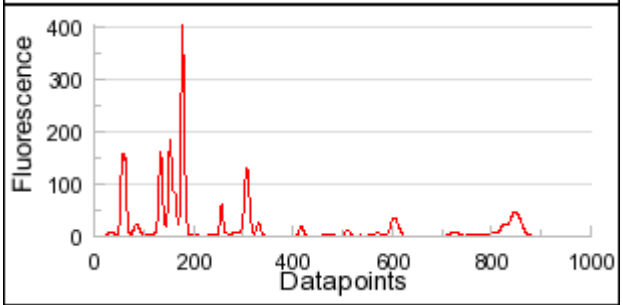
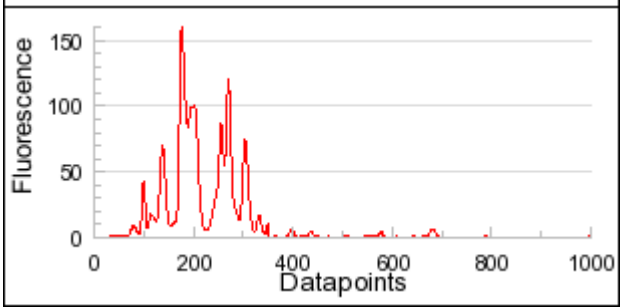
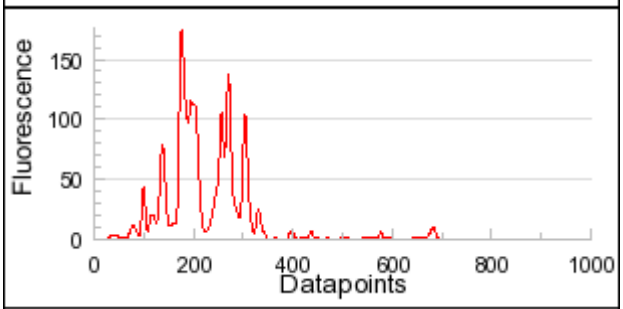
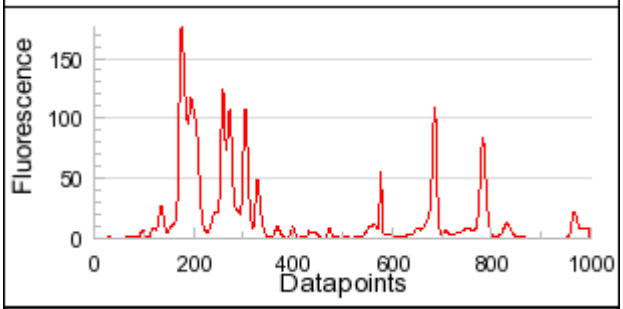
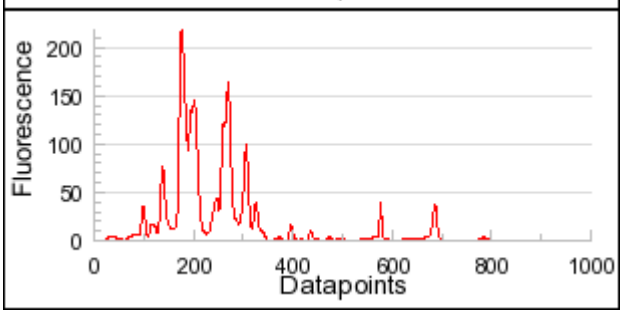
Isolat	Profils électrophorétiques *Aspergillus* kit	Identification	Génotype
14369		*P. boydii*	5
14452		*P. boydii*	5
14453		*P. boydii*	5
14455		*P. boydii*	5
14457		*P. boydii*	5
14462		*S. apiospermum*	1

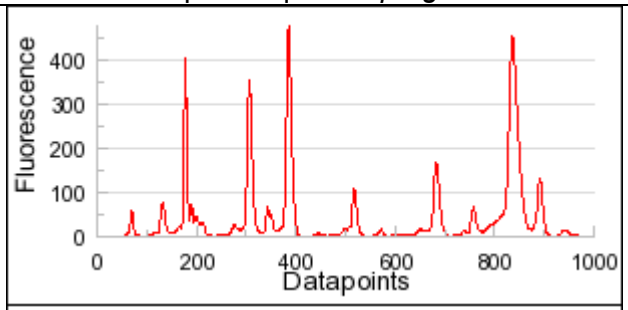
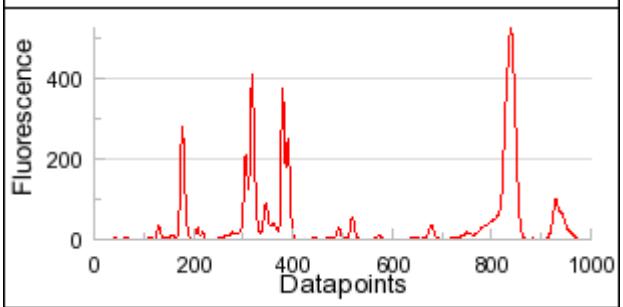
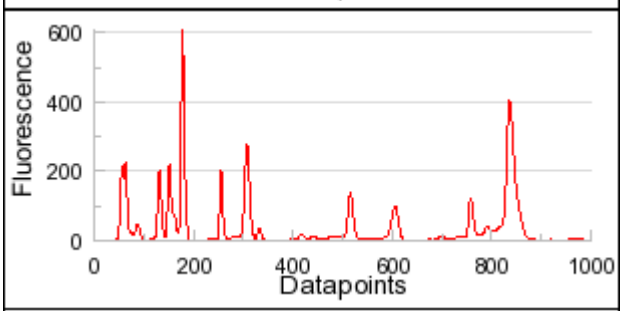
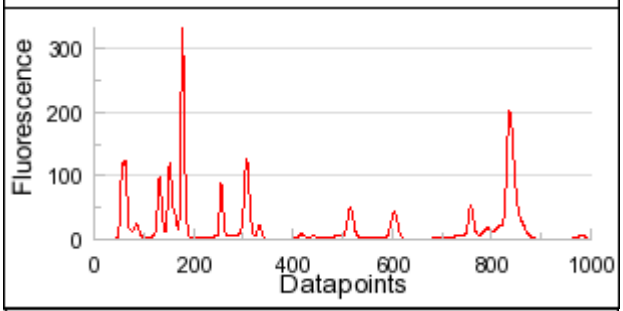
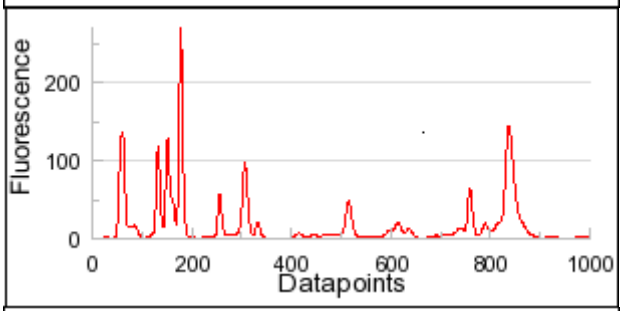
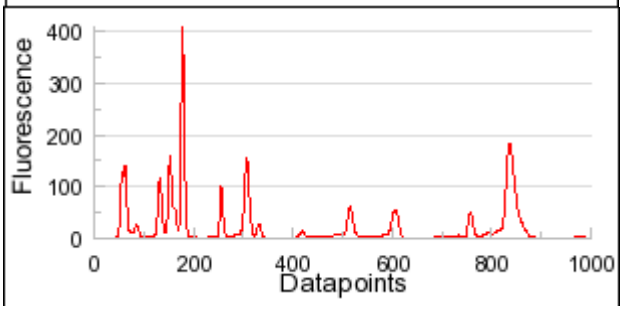
Isolat	Profils électrophorétiques *Aspergillus* kit	Identification	Génotype
14463		*S. apiospermum*	2
14465		*S. apiospermum*	1
14624		*P. boydii*	5
14626		*P. boydii*	5
14627		*P. boydii*	5
14628		*P. boydii*	5

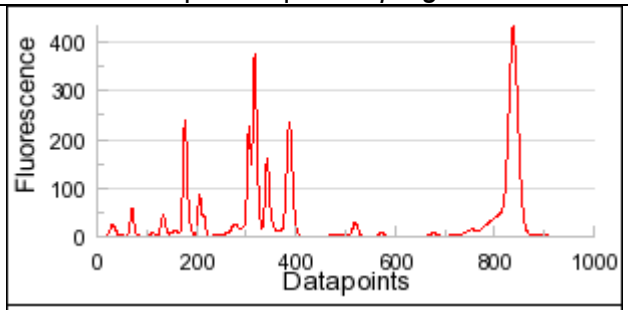
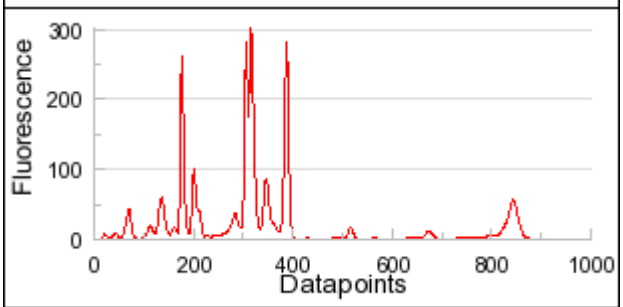
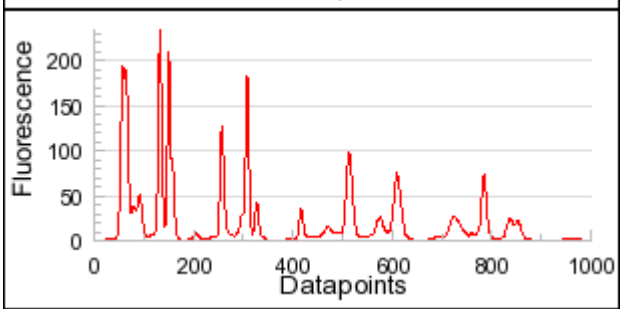
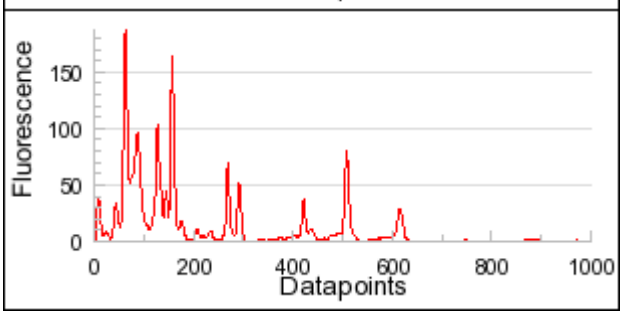
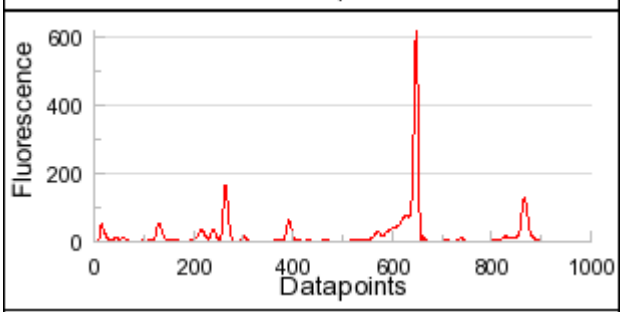
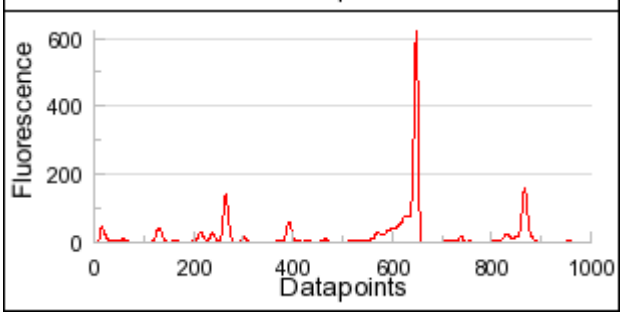
Isolat	Profils électrophorétiques *Aspergillus* kit	Identification	Génotype
14629		*P. boydii*	5
14631		*P. boydii*	5
14632		*P. boydii*	5
14633		*P. boydii*	5
14634		*P. boydii*	5
14635		*P. boydii*	5

Isolat	Profils électrophorétiques *Aspergillus* kit	Identification	Génotype
14636		*P. boydii*	5
14637		*P. boydii*	5
14638		*P. boydii*	5
14756		*P. boydii*	5
14758		*P. boydii*	5
14759		*P. boydii*	5

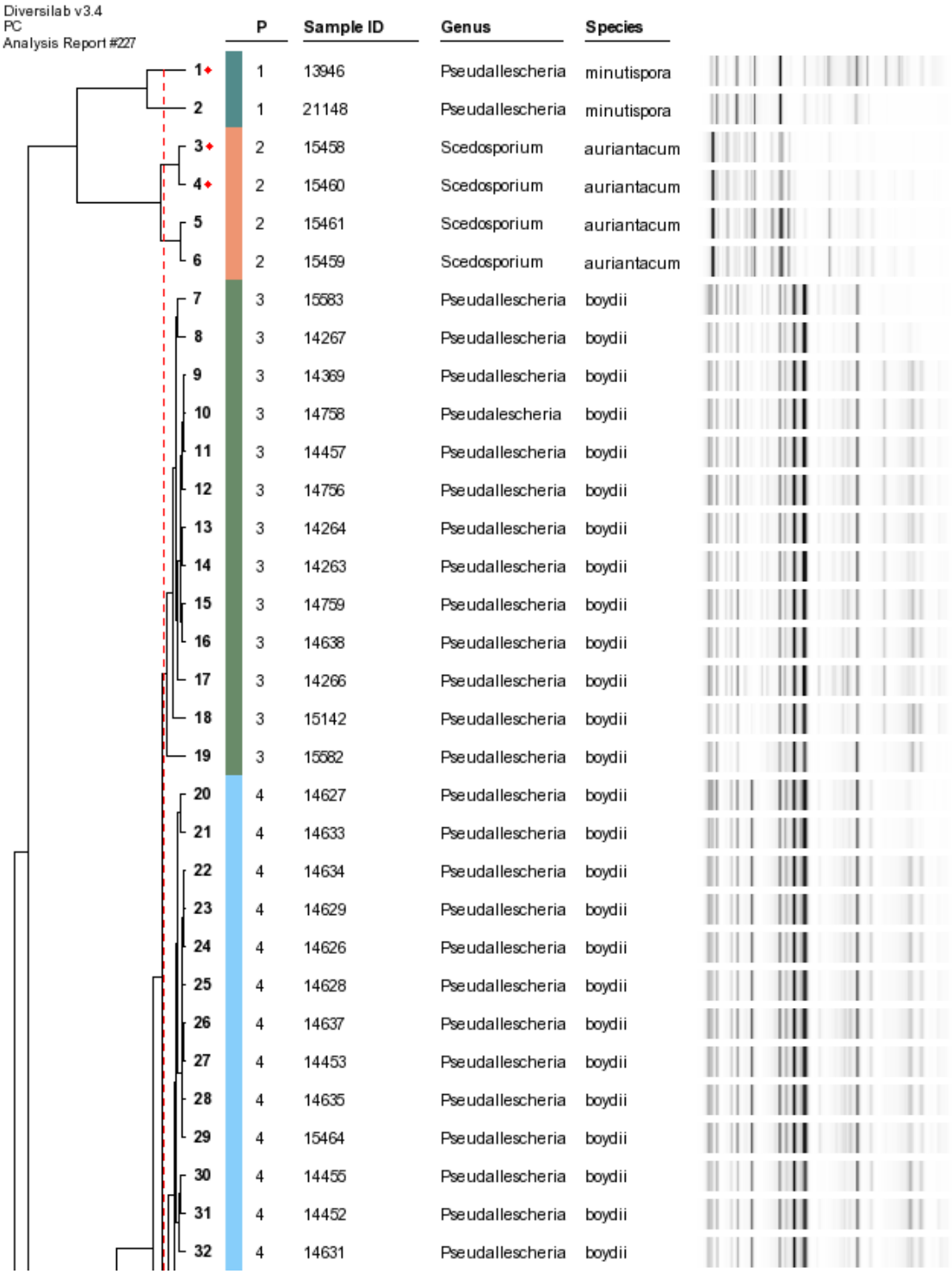
Isolat	Profils électrophorétiques *Aspergillus* kit	Identification	Génotype
14762		*S. apiospermum*	4
14763		*S. apiospermum*	4
14764		*S. apiospermum*	4
15142		*P. boydii*	5
15146		*S. apiospermum*	4
15148		*S. apiospermum*	4

Isolat	Profils électrophorétiques *Aspergillus* kit	Identification	Génotype
15149		*S. apiospermum*	4
15151		*S. apiospermum*	4
15458		*S. aurantiacum*	6
15459		*S. aurantiacum*	6
15460		*S. aurantiacum*	6
15461		*S. aurantiacum*	6

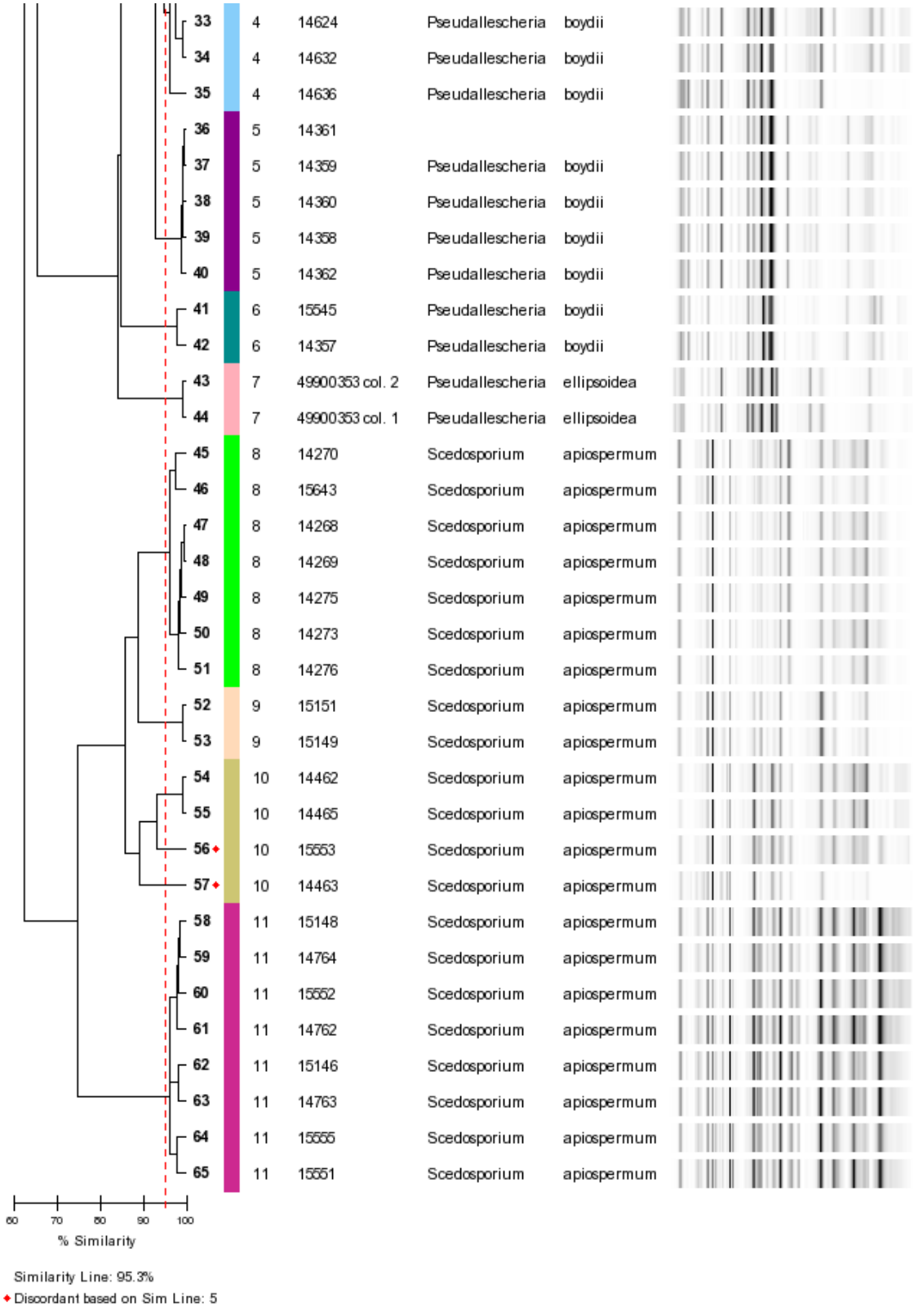
Isolat	Profils électrophorétiques *Aspergillus* kit	Identification	Génotype
15464		*P. boydii*	5
15545		*P. boydii*	5
15551		*S. apiospermum*	4
15552		*S. apiospermum*	4
15553		*S. apiospermum*	4
15555		*S. apiospermum*	4

Isolat	Profils électrophorétiques *Aspergillus* kit	Identification	Génotype
15582		*P. boydii*	5
15583		*P. boydii*	5
15643		*S. apiospermum*	3
21148		*P. minutispora*	7
4990035 3 col. 1		*P. ellipsoidea*	8
4990035 3 col. 2		*P. ellipsoidea*	8

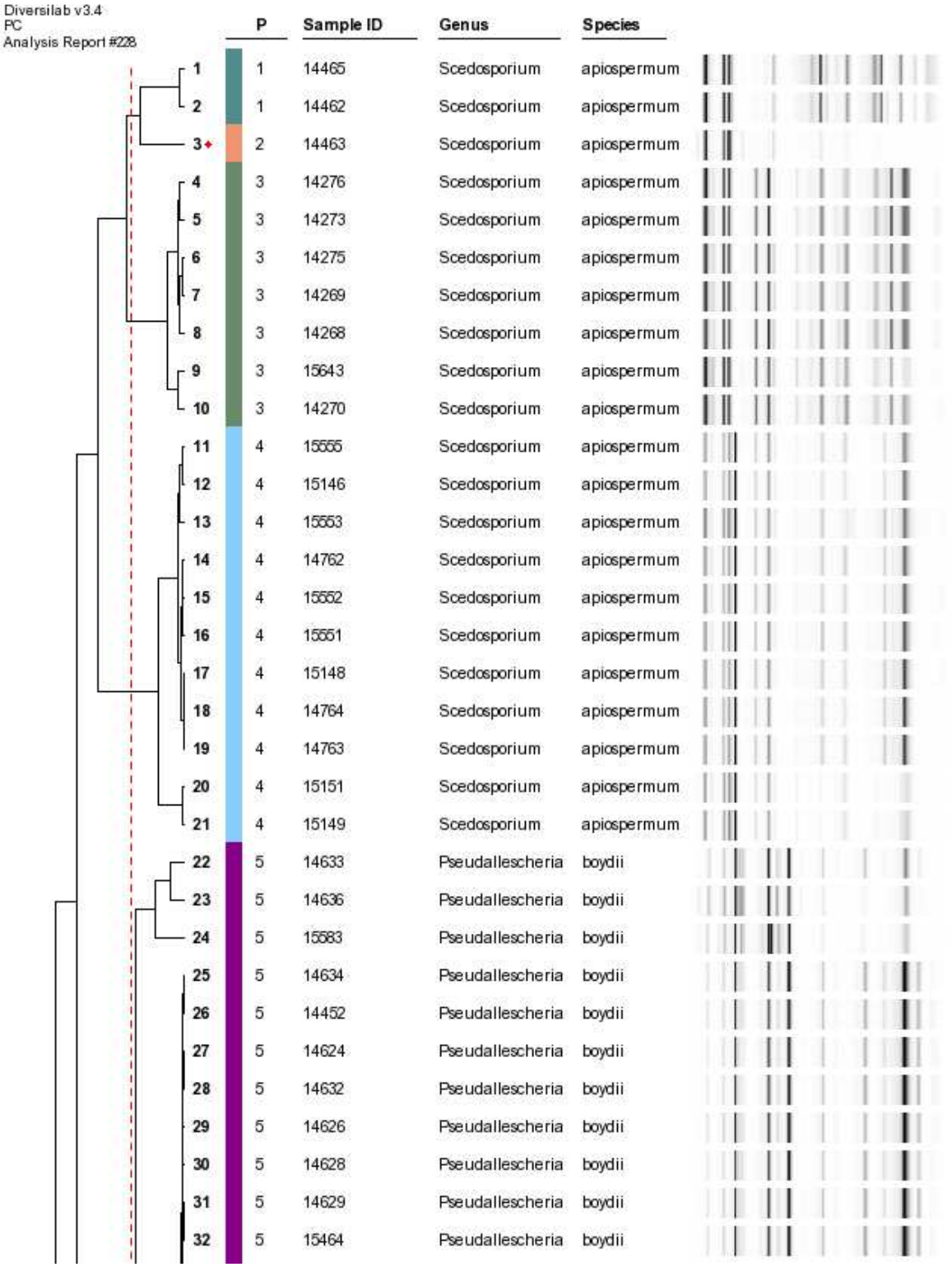
Annexe 3 : Dendrogramme obtenu à partir du *Fungal* kit



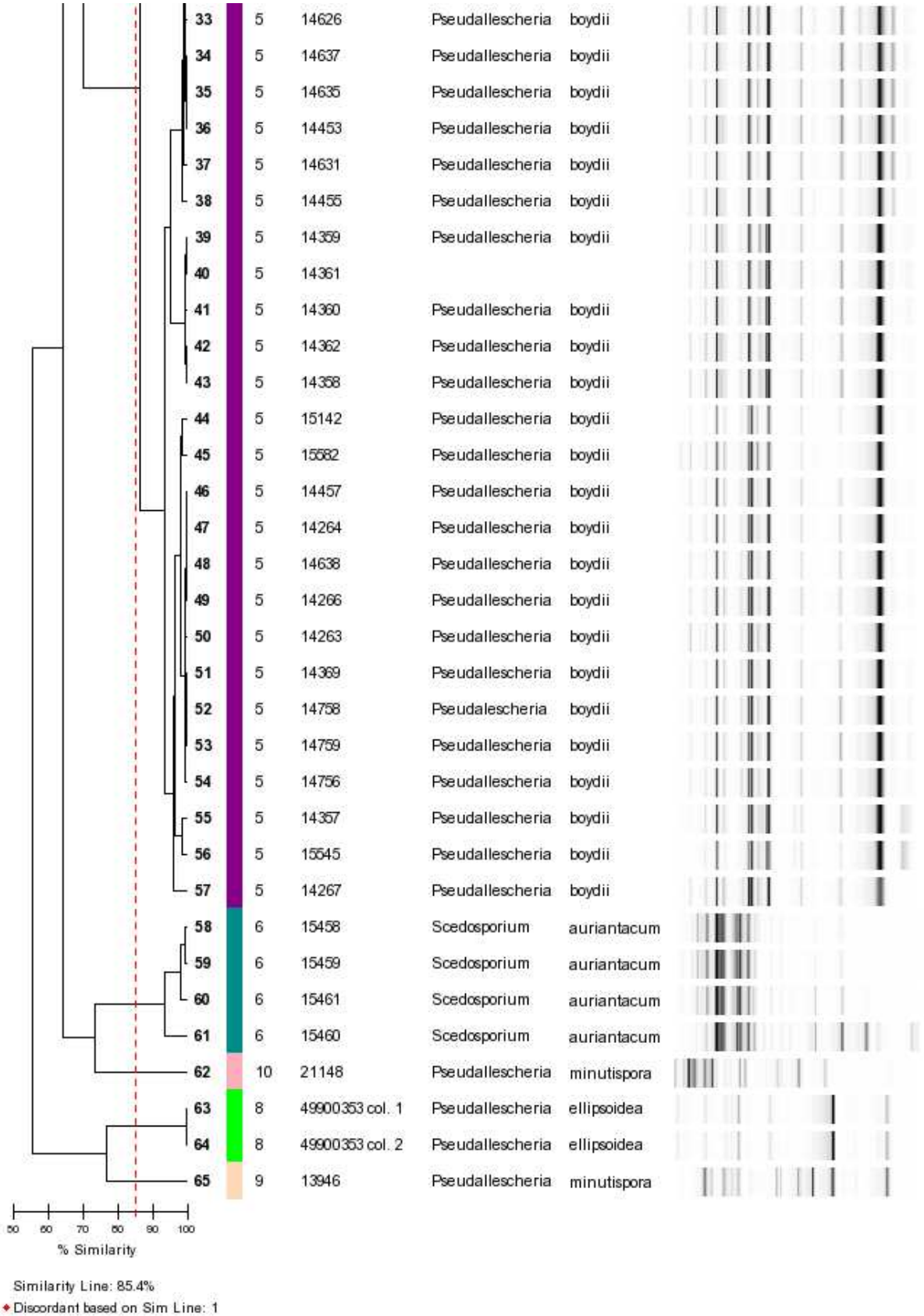
	P	Sample ID	Genus	Species
1	1	13946	Pseudallescheria	minutispora
2	1	21148	Pseudallescheria	minutispora
3	2	15458	Scedosporium	auriantacum
4	2	15460	Scedosporium	auriantacum
5	2	15461	Scedosporium	auriantacum
6	2	15459	Scedosporium	auriantacum
7	3	15683	Pseudallescheria	boydii
8	3	14267	Pseudallescheria	boydii
9	3	14369	Pseudallescheria	boydii
10	3	14758	Pseudalescheria	boydii
11	3	14457	Pseudallescheria	boydii
12	3	14756	Pseudallescheria	boydii
13	3	14264	Pseudallescheria	boydii
14	3	14263	Pseudallescheria	boydii
15	3	14759	Pseudallescheria	boydii
16	3	14638	Pseudallescheria	boydii
17	3	14266	Pseudallescheria	boydii
18	3	15142	Pseudallescheria	boydii
19	3	15682	Pseudallescheria	boydii
20	4	14627	Pseudallescheria	boydii
21	4	14633	Pseudallescheria	boydii
22	4	14634	Pseudallescheria	boydii
23	4	14629	Pseudallescheria	boydii
24	4	14626	Pseudallescheria	boydii
25	4	14628	Pseudallescheria	boydii
26	4	14637	Pseudallescheria	boydii
27	4	14453	Pseudallescheria	boydii
28	4	14635	Pseudallescheria	boydii
29	4	15464	Pseudallescheria	boydii
30	4	14455	Pseudallescheria	boydii
31	4	14452	Pseudallescheria	boydii
32	4	14631	Pseudallescheria	boydii


33 4 14624 Pseudallescheria boydii
34 4 14632 Pseudallescheria boydii
35 4 14636 Pseudallescheria boydii
36 5 14361
37 5 14359 Pseudallescheria boydii
38 5 14360 Pseudallescheria boydii
39 5 14358 Pseudallescheria boydii
40 5 14362 Pseudallescheria boydii
41 6 15545 Pseudallescheria boydii
42 6 14357 Pseudallescheria boydii
43 7 49900353 col. 2 Pseudallescheria ellipsoidea
44 7 49900353 col. 1 Pseudallescheria ellipsoidea
45 8 14270 Scedosporium apiospermum
46 8 15643 Scedosporium apiospermum
47 8 14268 Scedosporium apiospermum
48 8 14269 Scedosporium apiospermum
49 8 14275 Scedosporium apiospermum
50 8 14273 Scedosporium apiospermum
51 8 14276 Scedosporium apiospermum
52 9 15151 Scedosporium apiospermum
53 9 15149 Scedosporium apiospermum
54 10 14462 Scedosporium apiospermum
55 10 14465 Scedosporium apiospermum
56 10 15553 Scedosporium apiospermum
57 10 14463 Scedosporium apiospermum
58 11 15148 Scedosporium apiospermum
59 11 14764 Scedosporium apiospermum
60 11 15552 Scedosporium apiospermum
61 11 14762 Scedosporium apiospermum
62 11 15146 Scedosporium apiospermum
63 11 14763 Scedosporium apiospermum
64 11 15555 Scedosporium apiospermum
65 11 15551 Scedosporium apiospermum
60 70 80 90 100
% Similarity
Similarity Line: 95.3%
Discordant based on Sim Line: 5

Annexe 4 : Dendrogramme obtenu à partir de l'*Aspergillus* kit



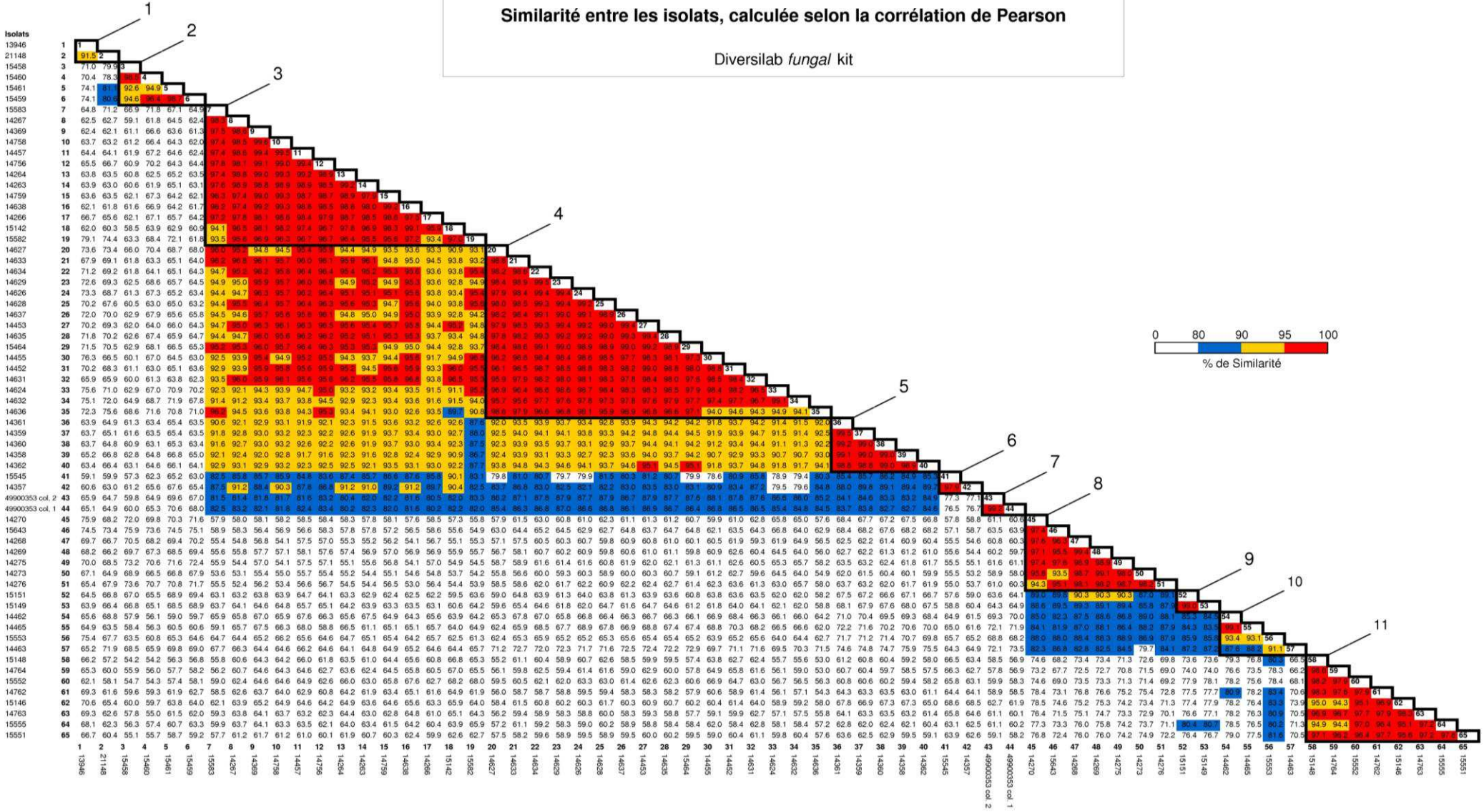
	P	Sample ID	Genus	Species
1	1	14465	Scedosporium	apiospermum
2	1	14462	Scedosporium	apiospermum
3	2	14463	Scedosporium	apiospermum
4	3	14276	Scedosporium	apiospermum
5	3	14273	Scedosporium	apiospermum
6	3	14275	Scedosporium	apiospermum
7	3	14269	Scedosporium	apiospermum
8	3	14268	Scedosporium	apiospermum
9	3	15643	Scedosporium	apiospermum
10	3	14270	Scedosporium	apiospermum
11	4	15555	Scedosporium	apiospermum
12	4	15146	Scedosporium	apiospermum
13	4	15553	Scedosporium	apiospermum
14	4	14762	Scedosporium	apiospermum
15	4	15552	Scedosporium	apiospermum
16	4	15551	Scedosporium	apiospermum
17	4	15148	Scedosporium	apiospermum
18	4	14764	Scedosporium	apiospermum
19	4	14763	Scedosporium	apiospermum
20	4	15151	Scedosporium	apiospermum
21	4	15149	Scedosporium	apiospermum
22	5	14633	Pseudallescheria	boydii
23	5	14636	Pseudallescheria	boydii
24	5	15683	Pseudallescheria	boydii
25	5	14634	Pseudallescheria	boydii
26	5	14452	Pseudallescheria	boydii
27	5	14624	Pseudallescheria	boydii
28	5	14632	Pseudallescheria	boydii
29	5	14626	Pseudallescheria	boydii
30	5	14628	Pseudallescheria	boydii
31	5	14629	Pseudallescheria	boydii
32	5	15464	Pseudallescheria	boydii


33 5 14626 Pseudallescheria boydii
34 5 14637 Pseudallescheria boydii
35 5 14635 Pseudallescheria boydii
36 5 14453 Pseudallescheria boydii
37 5 14631 Pseudallescheria boydii
38 5 14455 Pseudallescheria boydii
39 5 14359 Pseudallescheria boydii
40 5 14361
41 5 14360 Pseudallescheria boydii
42 5 14362 Pseudallescheria boydii
43 5 14358 Pseudallescheria boydii
44 5 15142 Pseudallescheria boydii
45 5 15582 Pseudallescheria boydii
46 5 14457 Pseudallescheria boydii
47 5 14264 Pseudallescheria boydii
48 5 14638 Pseudallescheria boydii
49 5 14266 Pseudallescheria boydii
50 5 14263 Pseudallescheria boydii
51 5 14369 Pseudallescheria boydii
52 5 14758 Pseudalescheria boydii
53 5 14759 Pseudallescheria boydii
54 5 14756 Pseudallescheria boydii
55 5 14357 Pseudallescheria boydii
56 5 15545 Pseudallescheria boydii
57 5 14267 Pseudallescheria boydii
58 6 15458 Scedosporium auriantacum
59 6 15459 Scedosporium auriantacum
60 6 15461 Scedosporium auriantacum
61 6 15460 Scedosporium auriantacum
62 10 21148 Pseudallescheria minutispora
63 8 49900353 col. 1 Pseudallescheria ellipsoidea
64 8 49900353 col. 2 Pseudallescheria ellipsoidea
65 9 13946 Pseudallescheria minutispora
50 60 70 80 90 100
% Similarity
Similarity Line: 85.4%
Discordant based on Sim Line: 1

Annexe 5

Similarité entre les isolats, calculée selon la corrélation de Pearson

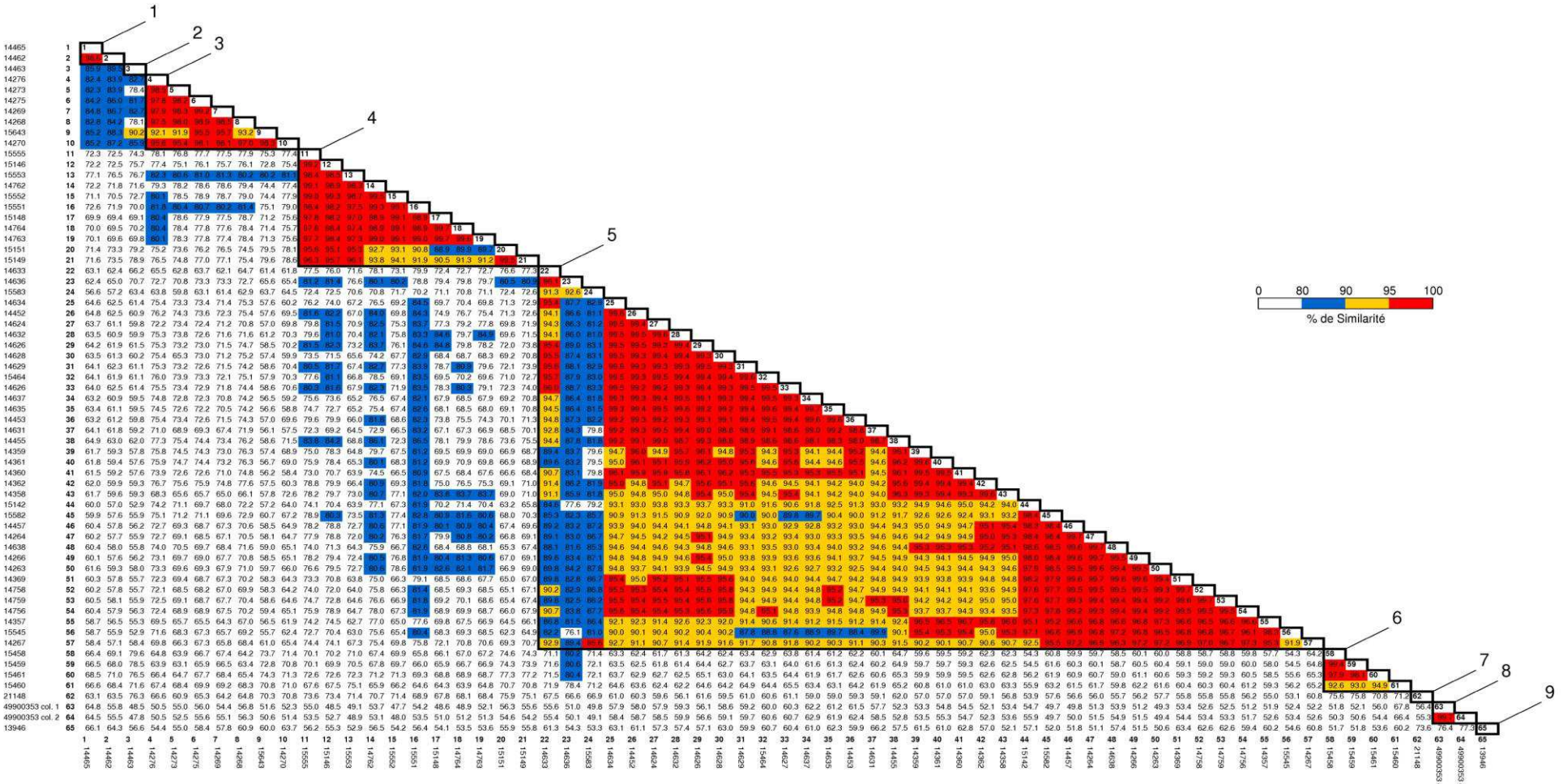
Diversilab *fungal* kit



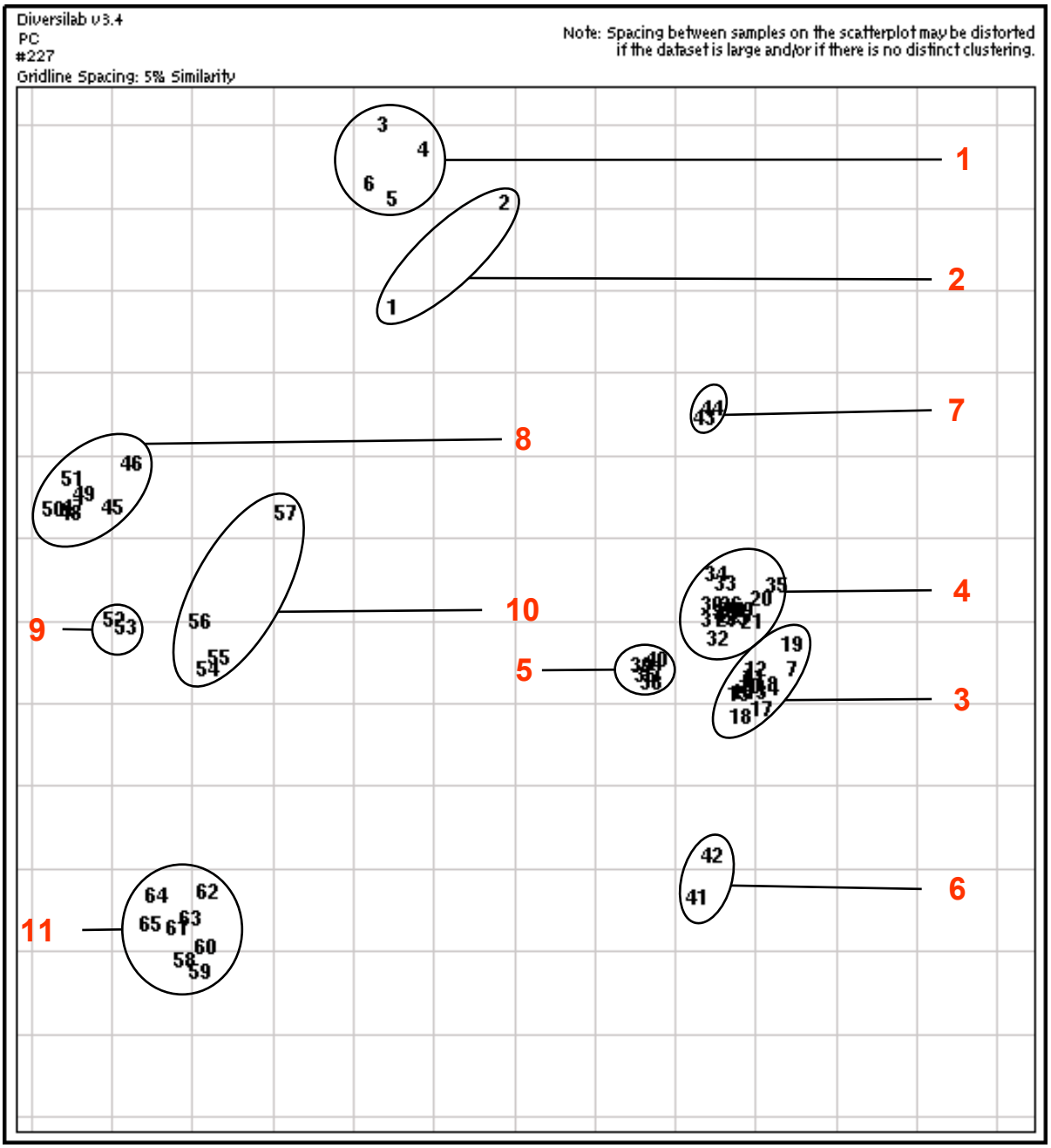
Annexe 6

Similarité entre les isolats, calculée selon la corrélation de Pearson

Diversilab *Aspergillus* kit

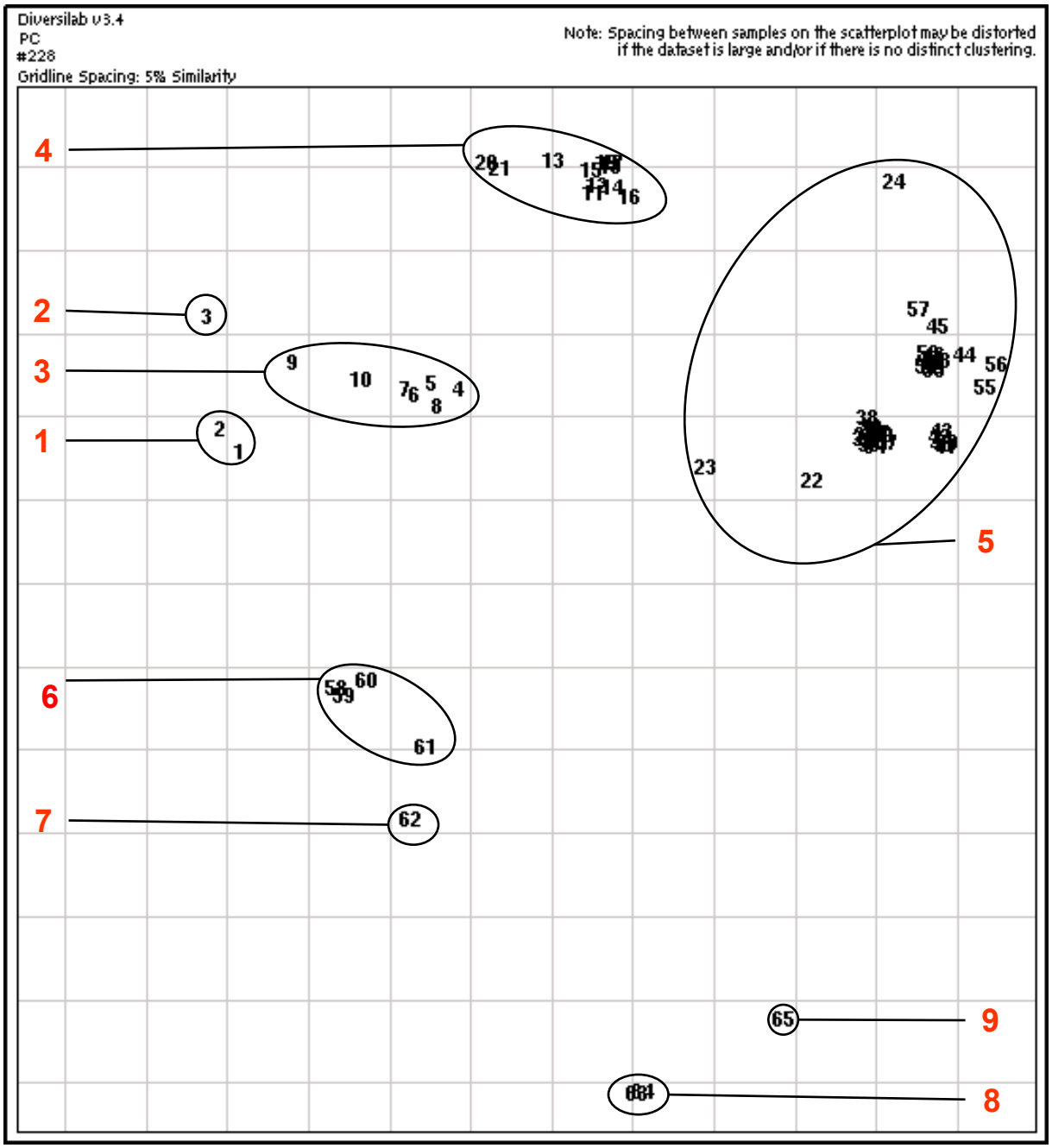


<u>Annexe 7</u> : Scatterplot obtenu à partir du *Fungal* kit



Chaque nombre en noir correspond à un isolat selon l'ordre obtenu sur le dendrogramme, un carré représente une différence de similarité calculée de 5%. Les nombres en rouge correspondent au numéro de génotype.

<u>Annexe 8</u> : Scatterplot obtenu à partir de l'*Aspergillus* kit



Chaque nombre en noir correspond à un isolat selon l'ordre obtenu sur le dendrogramme, un carré représente une différence de similarité calculée de 5%. Les nombres en rouge correspondent au numéro de génotype.

RÉSUMÉ

Les espèces du complexe *Pseudallescheria boydii / Scedosporium apiospermum* sont au second rang des champignons filamenteux colonisant les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose. Il est établi que ces champignons peuvent disséminer lors d'immunodépression et que la colonisation des voies respiratoires par ces pathogènes peut diminuer le succès d'une transplantation pulmonaire. Dans cette étude nous développons une nouvelle méthode de génotypage pour étudier l'épidémiologie de la colonisation des voies respiratoires par ces champignons.

Soixante-trois isolats, multiples et séquentiels, de *S. apiospermum*, provenant de 9 patients atteints de mucoviscidose, et sélectionnés parmi ceux étudiés précédemment par RAPD (random amplification of polymorphic DNA) par Defontaine et *al.* (2002) ont été analysés par le système semi-automatique de génotypage : DiversiLab® (Biomérieux), basé sur l'amplification par PCR de séquences répétées de l'ADN (rep-PCR). Deux kits différents ont été comparés : l'*Aspergillus* kit et le *Fungal* kit. Les produits d'amplification ont été séparés par électrophorèse capillaire. Les profils obtenus ont ensuite été comparés en utilisant le logiciel DiversiLab®. En parallèle, l'identification au rang d'espèce pour chacun des isolats a été effectuée par séquençage du locus TUB du gène de la β-tubuline.

Le *Fungal* kit s'est avéré plus discriminant que l'*Aspergillus* kit. La rep-PCR a confirmé le schéma de colonisation décrit par la méthode de RAPD. Seul un patient a présenté des génotypes distincts.

En conclusion, le système DiversiLab® de génotypage est une méthode facile et efficace pour étudier l'épidémiologie de la colonisation des voies respiratoires par les espèces du complexe *P.* boydii / S. *apiospermum*. De plus nos travaux confirment la capacité des ces champignons à coloniser de façon chronique les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose malgré des traitements antifongiques répétés.

MOTS-CLÉS : *Pseudallescheria*, *Scedosporium,* génotypage, PCR de séquences répétées, DiversiLab®, colonisation bronchique, mucoviscidose.