

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Année 2007

N° 138

THESE

pour le

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Qualification en Médecine Interne

par

Jean-Philippe TALARMIN

Né le 09 Avril 1976 à RENNES

Présentée et soutenue publiquement le 23 Octobre 2007

**Développement d'une méthode de diagnostic moléculaire
(PCR-TGGE) pour l'identification des champignons
associés à la mucoviscidose**

Président : Mr le Professeur RAFFI F.
Directeur de thèse : Mme le Docteur APAIRE-MARCHAIS V.
Examineurs : Mr le Professeur HAMIDOU M.
Mr le Professeur VILLERS D.
Mme le Docteur GAY-ANDRIEU F.
Mr le Docteur BOUTOILLE D.

SOMMAIRE

SOMMAIRE	6
RESUME	10
LISTE DES ABREVIATIONS	11
INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX	12
INTRODUCTION	14
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	15
I. La mucoviscidose	15
I.1. Généralités	15
I.2. Génétique	15
I.3. Physiopathologie	16
I.4. Manifestations cliniques et paracliniques	18
I.4.1. Atteinte respiratoire	18
I.4.2. Atteinte digestive	18
I.4.3. Atteinte génito-urinaire	18
I.5. Diagnostic	19
I.6. Prise en charge thérapeutique	20
II. Complications infectieuses dans la mucoviscidose	20
II.1 Infections bactériennes	20
II.2. Infections fongiques	21
II.2.1. <i>Aspergillus</i> spp	21
II.2.2. <i>Candida</i> spp	21
II.2.3. <i>Scedosporium</i> spp	22
II.2.4. <i>Exophiala dermatitidis</i>	22
II.2.5. Autres champignons	22
III. Identification des champignons filamenteux	22
III.1. Problèmes posés par l'identification des champignons par les méthodes classiques dans la mucoviscidose	22

III.2. Utilisation des séquences ITS pour l'identification des champignons	23
III.2.1. Introduction	23
III.2.2. Rôle des régions ITS	24
III.2.3. Applications	24
IV. Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis	27
IV.1. Principe	27
IV.2. Applications	28
MATERIELS ET METHODES	29
I. Souches et conditions de culture	29
I.1. Levures	29
I.2. Champignons filamenteux	29
II. Extraction de l'ADN	30
II.1. Levures	30
II.2. Champignons filamenteux	30
II.3. Extraction de l'ADN de champignons à partir de crachats	30
III. Réaction d'amplification génique : PCR	30
III.1. Choix des amorces	31
III.1.1. Région ITS1	31
III.1.2. Région ITS2	31
III.2. Préparation du mélange réactionnel	31
III.2.1. Région ITS1	31
III.2.2. Région ITS2	32
III.3. Amplification	33
IV. Electrophorèse de contrôle sur gel d'agarose	34
IV.1. Electrophorèse	34
IV.2. Révélation	34
V. Electrophorèse TGGE	34
V.1. Détermination des paramètres de la migration	34
V.2. Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis	37
VI. Préparation de mélanges d'espèces fongiques	37
VI.1. Mélange d'extraits d'ADN fongique	37
VI.2. Mélange de broyats de champignons avant extraction	37
VI.3. Mélange de champignons après homogénéisation au Potter	37

RESULTATS	39
I. Extraction de l'ADN fongique et bactérien	39
II. Amplification génique par PCR de la région Internal Transcribed Spacer 1	39
III. Détection des différentes espèces fongiques par Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis	40
III.1. Vérification de la technique TGGE à l'aide de l'appareil DCode Universal Detection Mutation System™ (Bio-Rad)	40
III.2. Identification des champignons par PCR-TGGE en amplifiant la région Internal Transcribed Spacer 1	40
III.2.1. Définition de marqueurs de taille de référence	42
III.2.2. Identification des principales espèces de champignons rencontrées dans la mucoviscidose	42
III.2.3. Identification des autres espèces fongiques rencontrées dans la mucoviscidose	44
III.2.3.1. <i>Candida</i> spp	44
III.2.3.2. <i>Aspergillus</i> spp	44
III.2.3.3. <i>Scedosporium</i> spp	44
III.2.3.4. Autres espèces	44
III.2.4. Profil global de l'identification des espèces par PCR-TGGE	45
III.2.5. Vérification de l'absence de variations intraspécifiques	45
III.2.6. Différenciation des espèces ayant des profils de migration similaires	46
III.3. Identification des champignons par PCR-TGGE en amplifiant la région Internal Transcribed Spacer 2	49
IV. Analyse de mélanges d'espèces par PCR-TGGE	53
IV.1. Mélange d'extraits d'ADN fongique	53
IV.2. Mélange d'espèces de champignons	53
IV.3. Mélange de champignons homogénéisés à l'aide d'un Potter	53
V. Application de la PCR-TGGE à l'analyse de crachats de patients atteints de mucoviscidose	55
V.1. Extraction et amplification de l'ADN à partir des crachats	55
V.2. Optimisation de la réaction de PCR	57
V.2.1. Température d'hybridation des amorces	57
V.2.2. Concentration en MgCl ₂	58
V.2.3. Semi-nested PCR	59
V.3. PCR-TGGE à partir d'extraits de crachats	60

DISCUSSION – PERSPECTIVES	62
ANNEXES	68
REFERENCES	83

RESUME

Les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose sont fréquemment colonisées par des champignons, qui sont parfois difficiles à identifier par les techniques mycologiques classiques. La méthode moléculaire de « temporal temperature gradient gel electrophoresis » (TGGE), après amplification de la région Internal Transcribed Spacer (ITS) 1, a été développée afin de permettre la détection des espèces fongiques pouvant être présentes dans les expectorations de ces patients. La plupart des dix-huit espèces fongiques analysées dont l'ADN a été extrait à partir de souches pures ont pu être identifiées par PCR-TGGE. Lorsque plusieurs souches d'une même espèce ont été étudiées, aucune variabilité intraspécifique n'a été mise en évidence, hormis pour *Paecilomyces variotii*. Certaines espèces présentant des profils de migration identiques ont pu être différenciées après modification des paramètres de la migration ou amplification de la région ITS2. La technique développée a été utilisée directement sur les expectorations de patients atteints de mucoviscidose, sans toutefois permettre l'identification de toutes les espèces fongiques retrouvées lors de la culture. L'optimisation de l'étape d'amplification, par le biais d'une nested PCR, devrait permettre de détecter par TGGE les colonisations fongiques en s'affranchissant des contraintes de la culture.

LISTE DES ABREVIATIONS

ABPA : Aspergillose Broncho-Pulmonaire Allergique
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNr : ADN ribosomal
ARN : acide ribonucléique
ATP : Adénosine triphosphate
BET : bromure d'éthidium
CFTR : cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DHPLC: Denaturing High-Performance Liquid Chromatography
dNTP : désoxynucléotides triphosphates
DO : densité optique
EDTA : éthylène diamine tétra acétique
ITS : Internal Transcribed Spacer
pb : paire de bases
PCR : Polymerase Chain Reaction
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
RNP : ribonucléoprotéine
SDA : Sabouraud Dextrose Agar
TAE : tris acétate EDTA
Taq : polymérase extraite de *Thermophilus aquaticus*
TBE : tris borate EDTA
TEMED : N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine
TGGE : Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis
Tm : température de fusion (melting temperature)
UFC : unité formant une colonie
UV : ultra-violet
YPD : Yeast-extract Peptone Dextrose
YPDA : Yeast-extract Peptone Dextrose Agar
VEMS : volume expiratoire maximum seconde

INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Structure de la protéine CFTR (page 17)

Tableau 1 : critères diagnostiques de la mucoviscidose (page 19)

Figure 2 : Organisation de l'ADN ribosomal des champignons (page 24)

Figure 3 : Principales étapes de l'assemblage des ribosomes (page 26)

Figure 4 : Principe de la TGGE (page 28)

Figure 5 : Analyse des séquences ITS1 des différentes espèces fongiques avec le logiciel MacMelt™ (page 35)

Figure 6 : Analyse des séquences ITS2 des différentes espèces fongiques avec le logiciel MacMelt™ (page 36)

Figure 7 : PCR ITS1/ITS2 à partir des extraits de différentes espèces fongiques et bactériennes (page 39)

Figure 8 : TGGE de contrôle (page 40)

Figure 9 : (A) TGGE de quatre espèces fongiques rencontrées dans la mucoviscidose (GC-ITS1/ITS2, 51°C-70,5°C, incrément 1°C/h, 60V, 20h) et (B) représentation schématique des bandes observées (page 41)

Figure 10 : (A) TGGE d'espèces fongiques rencontrées dans la mucoviscidose (GC-ITS1/ITS2, 51°C-70,5°C, incrément 1°C/h, 60V, 20h) et (B) représentation schématique des bandes observées (page 41)

Figures 11, 12 et 13 : Profils de migration de toutes les espèces fongiques analysées en TGGE (région ITS1) (page 43)

Figure 14 : Schéma global de l'identification des espèces par PCR-TGGE (région ITS1) (page 45)

Figure 15 : Absence de variation intraspécifique au sein de quatre espèces d'*Aspergillus* (page 46)

Figure 16 : analyse de *Paecilomyces variotii*, *Aspergillus terreus*, et *Aspergillus niger* à l'aide de MacMelt™ (page 47)

Figure 17 : Analyse de *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus flavus* à l'aide de MacMelt™ (page 47)

Figure 18 : (A) Optimisation des paramètres de TGGE (56°C-61°C, 1°C/h, 130V, 5h) pour différencier les régions ITS1 de certaines espèces fongiques et (B) représentation schématique des bandes observées (page 48)

Figure 19 : (A) Optimisation des paramètres de TGGE (56°C-59°C, 0,7°C/h, 130V, 4h30) pour différencier les régions ITS1 de certaines espèces fongiques et (B) représentation schématique des bandes observées (page 48)

Figure 20 : TGGE après amplification des régions ITS1 et ITS2 (page 50)

Figure 21 : TGGE après amplification des régions ITS1 et ITS2 (page 51)

Figure 22 : TGGE après amplification des régions ITS1 et ITS2 (page 52)

Figure 23 : analyse de mélanges d'espèces fongiques en PCR-TGGE (page 55)

Figure 24 : Amplification de la région ITS1 (amorces ITS1-ITS2) à partir d'ADN extrait de crachats. Gel d'agarose à 2%.(page 56)

Figure 25 : Amplification de la région ITS1 (amorces GCITS1-ITS2) à partir d'ADN extrait de crachats. Gel d'agarose à 2% (page 57)

Figure 26 : PCR GC-ITS1/ITS2 en utilisant un gradient de température d'hybridation (page 58)

Figure 27 : PCR GC-ITS1/ITS2 et GC-ITS3/ITS4 en utilisant un gradient de MgCl₂ (page 59)

Figure 28 : Amplification de l'ADN extrait de crachats par semi-nested PCR (page 58)

Figure 29 : Analyse de crachats en TGGE (51°C-70,5°C, incrément 1°/h, 60V, 20h).(page 61)

Figure 30 : Représentation schématique de l'ADN ribosomal et positions des amorces utilisables (page 67)

INTRODUCTION

La gravité de la mucoviscidose, maladie génétique la plus fréquente, est liée aux atteintes pulmonaires, notamment infectieuses, qui conditionnent le pronostic vital. La surinfection bronchopulmonaire est le plus souvent d'origine bactérienne. Cependant, l'arbre bronchique des patients est fréquemment colonisé par des champignons, qui peuvent participer à la dégradation de la fonction respiratoire par le biais d'une exacerbation de l'inflammation bronchique, et être responsables d'infections invasives potentiellement mortelles lorsque ces patients sont immunodéprimés, par exemple après greffe pulmonaire.

Les techniques mycologiques classiques, basées sur la culture et l'analyse des critères morphologiques, sont peu adaptées à l'identification de la grande variété d'espèces fongiques qui peuvent être présentes dans les expectorations des patients atteints de mucoviscidose.

Plusieurs approches moléculaires ont été développées pour permettre une identification plus rapide et plus précise des champignons. Un grand nombre des méthodes moléculaires proposées, basées sur une réaction d'amplification génique, ont utilisé la région Internal Transcribed Spacer (ITS) 1 de l'ADN ribosomal.

Pour s'affranchir des contraintes de la culture, la PCR-TGGE (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis) peut être utilisée. Cette méthode permet de séparer des molécules d'ADN de même taille mais de séquences différentes, en les faisant migrer dans un gradient de température permettant d'obtenir une dénaturation partielle de l'ADN, chaque séquence s'arrêtant alors à un endroit dépendant de sa température de fusion.

Nous nous proposons dans ce travail de démontrer que l'utilisation de la TGGE après amplification de la région ITS1 par PCR peut permettre de détecter les différentes espèces fongiques pouvant coloniser les voies aériennes des patients atteints de mucoviscidose.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. La mucoviscidose

I.1. Généralités

La mucoviscidose est la maladie génétique la plus fréquente chez les caucasiens, touchant environ une naissance sur 3000 à 5000 en France. La transmission se fait sur un mode autosomique récessif, une personne sur 25 à 30 étant porteuse d'un allèle muté du gène *CF* (Cystic Fibrosis). Elle se caractérise par une anomalie de la sécrétion d'eau et d'électrolytes atteignant l'ensemble des tissus exocrines de l'organisme, notamment les voies aériennes pulmonaires, le pancréas exocrine, le foie, les tubes séminifères, les glandes sudoripares [1].

I.2. Génétique

La fréquence de la mucoviscidose est très variable dans le monde, touchant principalement l'Europe du nord et du centre [2].

La transmission est autosomique récessive. Toutes les mutations associées à la mucoviscidose touchent un locus situé sur le bras long du chromosome 7 (locus 7q31) [2].

Le gène *CF* a été identifié en 1989 [1], et code pour la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), qui fait partie de la super famille des transporteurs ABC (ATP binding cassette). Il s'agit d'une glycoprotéine de 1480 acides aminés et 170 kDa, comportant 2 domaines transmembranaires, 2 domaines de fixation des nucléotides et un domaine accessoire spécifique. Elle est exprimée principalement dans les cellules épithéliales des voies respiratoires, le tractus gastro-intestinal (dont le pancréas et les voies biliaires), les glandes sudorales, et le tractus génito-urinaire. La protéine CFTR joue le rôle de canal ionique pour le passage des ions chlorures [1, 2]. La figure 1 schématise la structure de la protéine CFTR.

Il existe plus de 1200 mutations identifiées sur le gène *CF*. La plus fréquente est la délétion d'une phénylalanine en position 508 ($\Delta F508$), rencontrée avec une fréquence variant de 50% (sud de l'Europe) à 90% (nord de l'Europe) [3]. La prévalence de chacune des autres mutations est faible, excepté dans certaines populations bien spécifiques ; ainsi la mutation W1282X est retrouvée chez 60% des juifs ashkénazes atteints de mucoviscidose [2].

La relation entre le génotype et le phénotype est complexe. Les mutations considérées comme « sévères », notamment la $\Delta F508$, sont très fréquemment associées à l'insuffisance pancréatique exocrine. D'autres mutations sont retrouvées chez des patients qui ont une concentration normale de chlore dans la sueur. La sévérité de l'atteinte pulmonaire ou la présence d'une atteinte hépatique ne peuvent pas être prédites par le génotype, suggérant l'existence de facteurs environnementaux ou la présence d'autres gènes pouvant influencer le phénotype de la mucoviscidose [2].

I.3. Physiopathologie

Les glandes exocrines permettent la sécrétion d'eau et d'électrolytes vers l'extérieur du corps ou dans les lumières des organes internes, notamment par le biais du canal chlorure apical codé par le gène *CF*. Dans la mucoviscidose, les dysfonctionnements de la protéine CFTR entraînent des perturbations de cette sécrétion, rendant compte de la symptomatologie. Toutes les glandes exocrines sont atteintes, à des degrés divers. Ces glandes exocrines exerçant des fonctions spécialisées dans de nombreux organes (peau, voies respiratoires, tractus gastro-intestinal, système reproducteur), les symptômes sont variés. L'obstruction des canaux exocrines par des sécrétions visqueuses semble être le principal mécanisme pathogénique des manifestations de la maladie [4].

De nombreuses études réalisées dans les années 1980 et 1990 ont démontré que la protéine CFTR avait une fonction de sécrétion des ions chlore en réponse à un signal médié par l'adénosine monophosphate (AMP) cyclique, et que cette fonction était absente dans les cellules épithéliales en cas de mutation du gène *CFTR* [2]. Les différentes mutations du gène peuvent altérer la fonction de la protéine CFTR de manière plus ou moins importante, les formes cliniques de la maladie étant corrélées au niveau de l'activité CFTR résiduelle [2].

Au niveau pulmonaire, les dysfonctionnements de la protéine CFTR se traduisent par une modification du liquide de surface bronchique recouvrant l'épithélium des voies aériennes, dont le rôle est normalement de piéger les particules inhalées, qui sont ensuite déversées dans l'œsophage par le biais du mouvement ciliaire. L'altération de la clairance mucociliaire et l'hyperviscosité des sécrétions bronchiques qui en résultent sont responsables d'une obstruction des voies aériennes, puis de la survenue d'infections broncho-pulmonaires et d'une réaction inflammatoire chronique [1-3]. Cette intense réaction inflammatoire, à laquelle contribuent plusieurs types cellulaires, notamment les polynucléaires neutrophiles, joue un rôle majeur dans la dégradation de la fonction respiratoire. Le poumon, normal à la naissance, est progressivement détruit, et présente une alternance de territoires atélectasiques (par obstruction des voies aériennes), de territoires distendus (pouvant parfois être

responsables de pneumothorax), et de territoires pneumoniques (pouvant évoluer vers la guérison, la fibrose ou la nécrose) [3]. Les petites voies respiratoires sont touchées les premières (bronchiolite), puis avec l'évolution de la maladie l'accumulation de mucus et l'inflammation s'étendent aux voies aériennes de plus gros calibres [2].

Au niveau digestif, la mucoviscidose est responsable de plusieurs types de manifestations. L'insuffisance pancréatique exocrine et endocrine est retrouvée chez 85% des patients [3]. Elle est consécutive à l'accumulation de bouchons muqueux au niveau des canaux pancréatiques, aboutissant à la dégénérescence fibreuse et graisseuse du tissu pancréatique, et participe à l'apparition d'un diabète. L'iléus méconial survient chez 10 à 15% des nouveaux-nés [3], et peut se compliquer d'une péritonite. Un reflux gastro-oesophagien est retrouvé chez 25% des malades. De nombreuses autres complications digestives peuvent survenir, notamment un prolapsus rectal, une invagination intestinale aiguë, un syndrome d'obstruction intestinale distale. L'atteinte hépatique (stéatose, cirrhose biliaire initialement focale puis diffuse) est également très fréquente ; elle est secondaire à l'obstruction biliaire due à l'hyperviscosité du mucus [3, 4].

De nombreuses autres atteintes peuvent survenir au cours de la mucoviscidose : oto-rhino-laryngologique (polypose naso-sinusienne), rhumatologique (ostéoarthropathie hypertrophiante pneumique, arthrites, ostéoporose), cardiovasculaire (cœur pulmonaire chronique), génitales (stérilité masculine, retard pubertaire), endocrinienne (diabète).

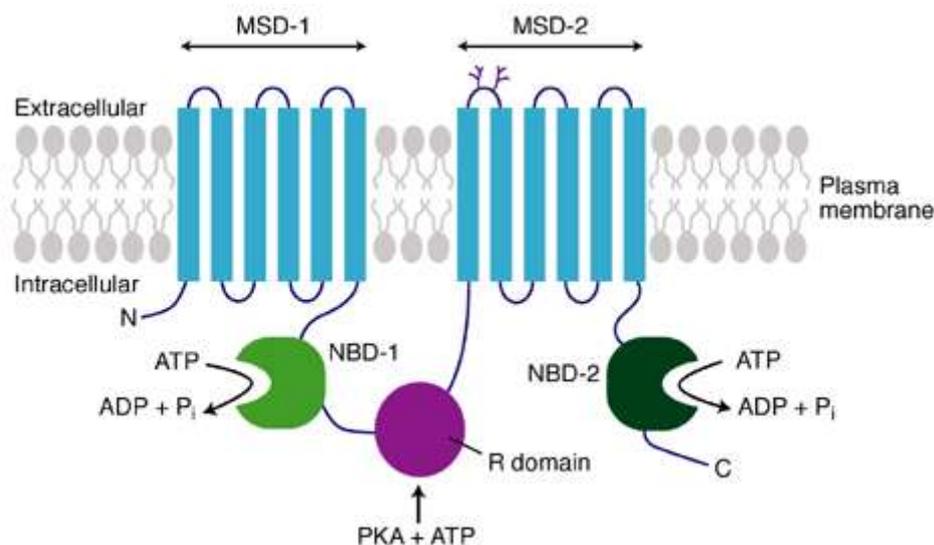


Figure 1 : Structure de la protéine CFTR. (D'après Davidson D.J. et Dorin J.R., Expert Reviews in Molecular Medicine, 2001, <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/01002563h.htm>).

La protéine CFTR comprend deux motifs répétés, chacun fait de six domaines transmembranaires (membrane-spanning domains, MSDs) et d'un domaine de liaison des nucléotides (nucleotide-binding domain, NBD), séparés par un domaine régulateur (regulatory domain, R domain). La phosphorylation par des protéines kinase (PK) telles que PKA et PKC permet l'interaction entre les NBDs et l'ATP et l'ouverture du pore. La mutation $\Delta F508$ touche le domaine NBD-1.

I.4. Manifestations cliniques et paracliniques

I.4.1. Atteinte respiratoire

La toux est constante, initialement sèche, puis productive avec expectorations purulentes. Les périodes de stabilité clinique alternent avec les exacerbations, qui deviennent de plus en plus fréquentes au fil du temps. Avec la progression de la maladie, apparaissent une dyspnée d'effort, puis une insuffisance respiratoire chronique avec présence d'une hypoventilation alvéolaire à la gazométrie artérielle. Les explorations fonctionnelles respiratoires mettent en évidence initialement une augmentation du rapport volume résiduel sur la capacité pulmonaire totale, puis plus tardivement des altérations du VEMS et de la capacité vitale forcée [2, 5].

De nombreuses complications peuvent survenir, hormis les complications infectieuses, notamment un pneumothorax (chez 10% des patients), une hémoptysie, un hippocratisme digital, un cœur pulmonaire chronique [2, 5].

I.4.2. Atteinte digestive

Chez 15 à 20% des nourrissons, l'iléon est complètement obstrué par le méconium (iléus méconial). Le tableau clinique associe une distension abdominale, des vomissements, un retard à l'évacuation du méconium. Un tableau équivalent peut survenir chez les enfants ou les jeunes adultes (syndrome d'obstruction intestinale distale), pouvant être confondu avec une appendicite [2, 5].

Plus de 85 à 90% des patients atteints par la mucoviscidose développent une insuffisance pancréatique exocrine, responsable d'un tableau de malabsorption des protéines et des lipides, avec carences en vitamines liposolubles, retard de croissance, hypoalbuminémie... Les îlots β du pancréas sont initialement préservés, mais leur fonction décroît avec l'âge, pouvant entraîner un diabète [2, 5]. Un prolapsus rectal est fréquent.

La cirrhose biliaire devient symptomatique chez seulement 2 à 3% des patients. Elle peut se manifester par un ictère, une ascite, une hématomèse liée à la présence de varices oesophagiennes, un hypersplénisme [2, 5].

I.4.3. Atteinte génito-urinaire

La puberté tardive (retardée en moyenne de deux ans) est habituelle, probablement en raison des effets de la pathologie respiratoire chronique et de la malnutrition sur la fonction reproductrice. Plus de 95% des patients de sexe masculin ont une azoospermie, secondaire à l'oblitération des canaux déférents. L'incidence des hernies inguinales, hydrocèles, et cryptorchidies est plus élevée que dans la population générale. 20% des femmes sont stériles,

en raison d'une aménorrhée secondaire, d'un mucus cervical épais qui s'oppose à la migration des spermatozoïdes, d'anomalies du transport liquidien au niveau des trompes utérines [2, 5].

I.5. Diagnostic

Les critères sur lesquels repose le diagnostic initial de mucoviscidose ont été précisés en 1998 [6] et sont détaillés dans le tableau 1.

Le test de la sueur consiste à mesurer la concentration en chlore de la sueur, recueillie par iontophorèse à la pilocarpine. Pour que les résultats soient valables, il faut un échantillon de sueur de 100 mg. Le test est pathologique si la concentration en chlore est supérieure à 60 mEq/L [2]. Il n'est pas interprétable chez le nouveau-né avant six semaines de vie.

En France, depuis 2002, un dépistage néonatal systématique est réalisé, par le dosage sanguin de la trypsine immunoréactive, dont le taux est très élevé chez les enfants atteints. Ce test n'a plus de valeur après l'âge de six mois. Il doit être confirmé par le test de la sueur.

Un dépistage prénatal est possible pour les couples à risque, par prélèvement de villosités chorales à 12 semaines d'aménorrhée, et étude de l'ADN fœtal.

Présence de manifestations cliniques typiques (respiratoires, gastro-intestinales, ou génito-urinaires)
OU
Antécédents de mucoviscidose dans la fratrie
OU
Dépistage néonatal positif
<u>ET</u>
Test de la sueur positif à au moins deux reprises
OU
Identification de deux mutations du gène <i>CF</i>
OU
Anomalie évocatrice de la mesure du potentiel transépithélial nasal

Tableau 1 : critères diagnostiques de la mucoviscidose (d'après Rosenstein B.J. et Cutting G.R.[6])

I.6. Prise en charge thérapeutique

Le traitement des manifestations respiratoires est complexe, et associe la kinésithérapie respiratoire, la prévention et le traitement des infections pulmonaires (antibiothérapie par voie générale et en aérosols), les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les broncho-dilatateurs, l'ADNase humaine recombinante, la prise en charge des diverses complications qui peuvent survenir. L'insuffisance pancréatique nécessite l'administration d'extraits pancréatiques, une supplémentation vitaminique, un support nutritionnel. L'apparition d'un diabète impose le plus souvent le recours à l'insulinothérapie. Les complications digestives sont prises en charge de manière spécifique. Le soutien psychologique est indispensable. [2, 5]

II. Complications infectieuses dans la mucoviscidose

II.1 Infections bactériennes

La surinfection bronchopulmonaire représente le problème majeur auquel sont confrontés les malades atteints de mucoviscidose. Les microorganismes en cause sont principalement des bactéries, d'espèces variables en fonction de la durée d'évolution de la pathologie.

Haemophilus influenzae est la bactérie la plus fréquemment rencontrée chez les jeunes enfants. Si elle est rarement responsable de colonisations chroniques, sa pathogénicité est très probable [3, 7].

Staphylococcus aureus est également impliqué dans les infections bronchopulmonaires chez les enfants âgés de moins de 10 ans. Sa virulence est liée à sa capacité d'adhérence à l'épithélium respiratoire, entraînant très fréquemment une colonisation chronique des voies aériennes [3, 7].

La troisième bactérie pathogène la plus souvent rencontrée est *Pseudomonas aeruginosa*. La primo-infection survient habituellement entre 8 et 10 ans, évoluant presque systématiquement vers une colonisation chronique. L'éradication de cette bactérie est difficile à obtenir, en raison de ses nombreuses résistances naturelles et acquises aux antibiotiques. En outre, elle a tendance à subir une transformation mucoïde dans les voies respiratoires, avec production de biofilm, diminuant encore la réponse immunitaire et l'action des antibiotiques [2]. La colonisation chronique à *Pseudomonas aeruginosa* est largement responsable de la dégradation de l'état clinique des patients, notamment de leur fonction respiratoire [3, 7].

D'autres bactéries pathogènes peuvent être plus rarement responsables d'infections dans la mucoviscidose : *Burkholderia cepacia*, entérobactéries, *Streptococcus pneumoniae*, autres *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes xylosoxidans*, mycobactéries (*Mycobacterium tuberculosis*, mycobactéries atypiques) [3, 7].

II.2. Infections fongiques

De nombreux agents fongiques peuvent être retrouvés au niveau des voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose.

II.2.1. *Aspergillus* spp

Aspergillus fumigatus est le champignon le plus fréquemment responsable d'infections pulmonaires [3], bien que son rôle dans la progression de la maladie reste incertain. Il peut être isolé des crachats chez 45,7% des patients [8], et colonise les patients vers l'âge de 12 ans [9]. Il est le plus souvent responsable d'aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA), dont la prévalence est estimée entre 0,5 et 11% [3], et dont les critères diagnostiques ont été précisés en 2003 [10] ; un traitement antifongique par itraconazole peut dans ce cas être bénéfique [11]. De plus, la simple colonisation par *Aspergillus fumigatus* peut entraîner une dégradation de la fonction respiratoire, qui peut alors s'améliorer après traitement antifongique [12]. L'aspergillose invasive, manifestation la plus grave de la maladie aspergillaire, est rare dans la mucoviscidose, et survient essentiellement après greffe pulmonaire, bien que le rôle d'une colonisation préalable dans la survenue de l'aspergillose invasive soit encore très débattu [13-15]. Une étude rétrospective récente réalisée sur 335 patients greffés pulmonaires a mis en évidence un taux significativement plus élevé de colonisations et d'infections invasives à *Aspergillus* chez les patients atteints de mucoviscidose que chez les patients transplantés pour une autre pathologie [16].

D'autres espèces d'*Aspergillus* colonisent les voies aériennes des patients atteints de mucoviscidose, sans que leur rôle pathogène soit très bien établi : *A. terreus* (1,9 à 6,2% des patients), *A. flavus*, *A. nidulans*.

II.2.2. *Candida* spp

Candida albicans est présent dans les expectorations de 70 % des patients. Cependant, ce champignon ne semble pas jouer habituellement de rôle pathogène dans la mucoviscidose, sa présence témoignant d'une colonisation chronique, favorisée par les cures d'antibiotiques séquentielles [13, 17].

Candida dubliniensis est présent dans les expectorations de 11,1% des patients, et n'est qu'occasionnellement responsable de pathologies [18, 19].

II.2.3. *Scedosporium spp*

Scedosporium apiospermum colonise les patients atteints de mucoviscidose vers l'âge de 14 ans, et peut être isolé dans les expectorations de 3,3 à 8,6% des patients. Il est résistant à de nombreux antifongiques. Son rôle pathogène n'est pas démontré, mais il pourrait participer à l'exacerbation de la réponse inflammatoire [13, 20]. Il peut être responsable d'infections invasives après greffe pulmonaire [21].

Une colonisation des voies aériennes par *Scedosporium prolificans* a été décrite dans la mucoviscidose. Ce champignon peut devenir hautement pathogène après transplantation pulmonaire, et être notamment responsable d'endophtalmie bilatérale [22].

II.2.4. *Exophiala dermatitidis*

Exophiala dermatitidis est retrouvé dans les expectorations de 1,8 à 15,7% des patients souffrant de mucoviscidose [23, 24], et a pu être responsable d'infections pulmonaires sur ce terrain [17, 25].

II.2.5. Autres champignons

D'autres agents fongiques peuvent coloniser les voies aériennes et jouer un rôle pathogène chez les patients atteints de mucoviscidose : *Acrophialophora fuispora* [26], *Penicillium emersonii* [27], *Paecilomyces variotii* [28].

III. Identification des champignons filamenteux

III.1. Problèmes posés par l'identification des champignons par les méthodes classiques dans la mucoviscidose

Actuellement, l'identification des champignons filamenteux repose essentiellement sur des critères morphologiques (macroscopiques et microscopiques), dont la reconnaissance n'est pas toujours facile et requiert une grande expérience du biologiste. En effet, si les espèces les plus courantes sont aisément reconnaissables par un biologiste entraîné, certaines espèces plus rares peuvent être confondues, comme par exemple *Acrophialophora fuispora* et *Scedosporium prolificans*.

D'autre part, les conditions de cultures varient entre différentes espèces fongiques. Ainsi, *Aspergillus fumigatus* a une croissance rapide à 37°C sur la plupart des milieux, alors que *Scedosporium apiospermum* ou *Exophiala dermatitidis* ont une croissance lente et restreinte. *Aspergillus fumigatus* étant le champignon filamenteux le plus fréquemment retrouvé dans la mucoviscidose, il envahit le milieu de culture en quelques jours et masque donc la présence d'autres espèces fongiques de croissance plus lente. L'ensemencement des prélèvements sur milieux sélectifs peut permettre de détecter ces champignons à croissance lente ; ainsi, *Scedosporium apiospermum* est plus facilement détecté en incorporant dans la gélose du cycloheximide, alors qu'*Exophiala dermatitidis* pousse sur une gélose contenant de l'érythritol. De plus, les géloses de Sabouraud disponibles sur le marché présentent des inégalités de performance, en relation avec des différences de composition, et peuvent donner des résultats très divers en terme de coloration ou de diamètre des colonies [29].

De même, la température optimale de croissance des diverses espèces fongiques peut être très différente : *Acrophialophora fusispora* et *Penicillium emersonii* ne poussent pas à des températures inférieures à 37°C, contrairement à *Aspergillus* spp et *Scedosporium* spp, et ne pourront donc pas être détectées si la culture est faite à 30°C.

Par ailleurs, les conditions de l'examen mycologique des crachats des patients atteints de mucoviscidose ne sont pas standardisées entre les différents laboratoires, que ce soit en terme de milieux de culture utilisés, de température d'incubation, ou de durée d'incubation. Il existe donc un risque de ne pas détecter certaines des espèces fongiques présentes dans les expectorations, ce qui pourrait avoir des conséquences dramatiques chez ces patients immunodéprimés et souvent candidats à une greffe pulmonaire.

III.2. Utilisation des séquences ITS pour l'identification des champignons

III.2.1. Introduction

Le ribosome est l'organe cellulaire qui permet la synthèse de protéines. Ses fonctions étant essentielles à la survie de la cellule, cette structure existe chez toutes les formes de vie. Cependant, au cours de l'évolution, des changements de certains composants des ribosomes sont apparus.

Les gènes codant pour l'ARN ribosomal ne sont que très lentement sujets à l'apparition de mutations au cours de l'évolution. L'hétérogénéité qui existe dans la séquence nucléotidique au sein de cette région peut être utilisée pour la caractérisation phylogénétique des micro-organismes. Ces gènes très conservés sont séparés par des séquences variables non codantes appelées ITS (Internal Transcribed Spacer). L'ADN ribosomal chez les champignons est organisé sous la forme d'un complexe comportant (dans le sens 5'→3') une séquence

codant pour l'ARNr 18S, une séquence ITS 1, une séquence codant pour l'ARNr 5,8S, une séquence ITS 2, et une séquence codant pour l'ARNr 28S (figure 2).

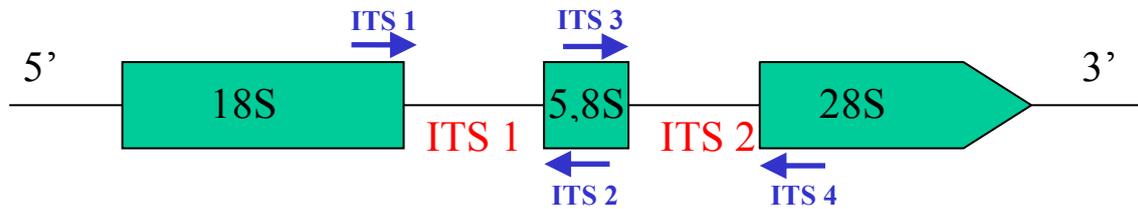


Figure 2 : Organisation de l'ADN ribosomal des champignons. En rouge sont figurées les régions Internal Transcribed Spacer 1 et 2. Les flèches bleues représentant les amorces utilisées pour amplifier les régions ITS1 et ITS2. En vert sont figurés les gènes codant pour l'ARN ribosomal 18S, 5,8S et 28S.

Les mutations au sein des régions ITS surviennent à une fréquence plus grande qu'au niveau des gènes codant pour l'ARN ribosomal, ce qui permet leur utilisation pour l'identification des genres et des espèces [30]. Leur intérêt en tant que cible moléculaire est renforcé par le fait qu'il en existe une centaine de copies par génome, ce qui augmente la sensibilité des techniques qui reposent sur l'analyse des régions ITS.

III.2.2. Rôle des régions ITS

Les principales étapes de l'assemblage des ribosomes dans la cellule eucaryote sont présentées dans la figure 3. L'ensemble du complexe génique de l'ADNr est transcrit en un pré-ARN 45S ; les séquences ITS sont alors éliminées par des enzymes, pour former les ARN matures 18S, 5,8S et 28S. Ces ARN se lient à des protéines pour constituer les ribosomes fonctionnels. Plusieurs études ont montré que la délétion des séquences ITS avant la transcription empêche la formation des ribosomes, notamment la délétion de ITS1 bloque la formation de l'ARNr 18S [30].

III.2.3. Applications

Plusieurs méthodes de biologie moléculaire pour l'analyse des régions ITS ont été utilisées : amplification génique (PCR), polymorphisme de longueur des fragments ITS, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), hybridation sur des sondes à ADN, séquençage [31].

Parmi ces méthodes, le séquençage des régions ITS après amplification a prouvé son intérêt dans l'identification de nombreuses espèces fongiques. Ainsi, la région ITS2 présente suffisamment de variabilité interspécifique pour permettre de distinguer entre elles de nombreuses espèces de levures pathogènes, notamment *Candida albicans* et *Candida dubliniensis*, qui sont difficiles à différencier par leurs caractères morphologiques et biochimiques [32]. Des résultats comparables sont retrouvés lorsque l'on étudie la séquence de la région ITS1 [33]. En outre, les régions ITS1 et ITS2 présentent une similitude très forte entre différentes souches d'une même espèce de *Candida*, supérieure à 99% [30, 32, 33]. Dans une étude portant sur des levures rencontrées en clinique humaine, l'analyse des séquences ITS1 et ITS2 a permis d'identifier respectivement 96,8% et 99,7% des 373 souches étudiées [31].

L'analyse de la séquence des régions ITS a également été appliquée à l'identification des champignons filamenteux. Les différentes espèces d'*Aspergillus* rencontrées en pathologie humaine présentent une variabilité interspécifique (de 8,3 à 20,7%) et une similitude intraspécifique (supérieure à 99%) suffisantes pour permettre de les distinguer par le séquençage de leurs régions ITS, la région ITS1 présentant plus de variabilité entre les espèces d'*Aspergillus* que la région ITS2. De même, les identités de séquences entre *Aspergillus* spp et d'autres champignons filamenteux (notamment des espèces opportunistes) sont inférieures à 89,6% [34].

Cependant, l'identification moléculaire des champignons par l'analyse de leurs séquences ITS présente certaines limites.

Il n'a pas été défini de critères de variations intraspécifiques maximales au sein des régions ITS. Toutefois, il est admis qu'une différence de 1 à 2% des séquences des régions ITS 1 et 2 est nécessaire pour distinguer deux espèces fongiques [33, 35].

Les séquences ITS de certaines espèces d'*Aspergillus* (*A. nidulans*, *A. niger*) peuvent présenter jusqu'à 99% d'homologie avec celles d'autres espèces fongiques (*Arthrotrix* sp.) ou d'autres espèces d'*Aspergillus* (*A. phoenicis*, *A. tubigenis*), non impliquées en pathologie humaine [34].

Certaines espèces de *Candida*, comme *C. kefyr* et *C. krusei*, présentent jusqu'à 1,6% de divergences entre différentes souches [33]. Cette variabilité intraspécifique se rencontre aussi chez *Exophiala dermatitidis* [30].

Certaines espèces de *Cryptococcus* présentent plus de 99% d'homologie de leurs régions ITS1 et ITS2 (*C. diffluens*, *C. liquefaciens*), alors qu'il s'agit de deux espèces distinctes [33].

Malgré ces quelques limites, le séquençage des fragments ITS est une des méthodes moléculaires les plus fiables et les plus reproductibles pour l'identification des champignons.

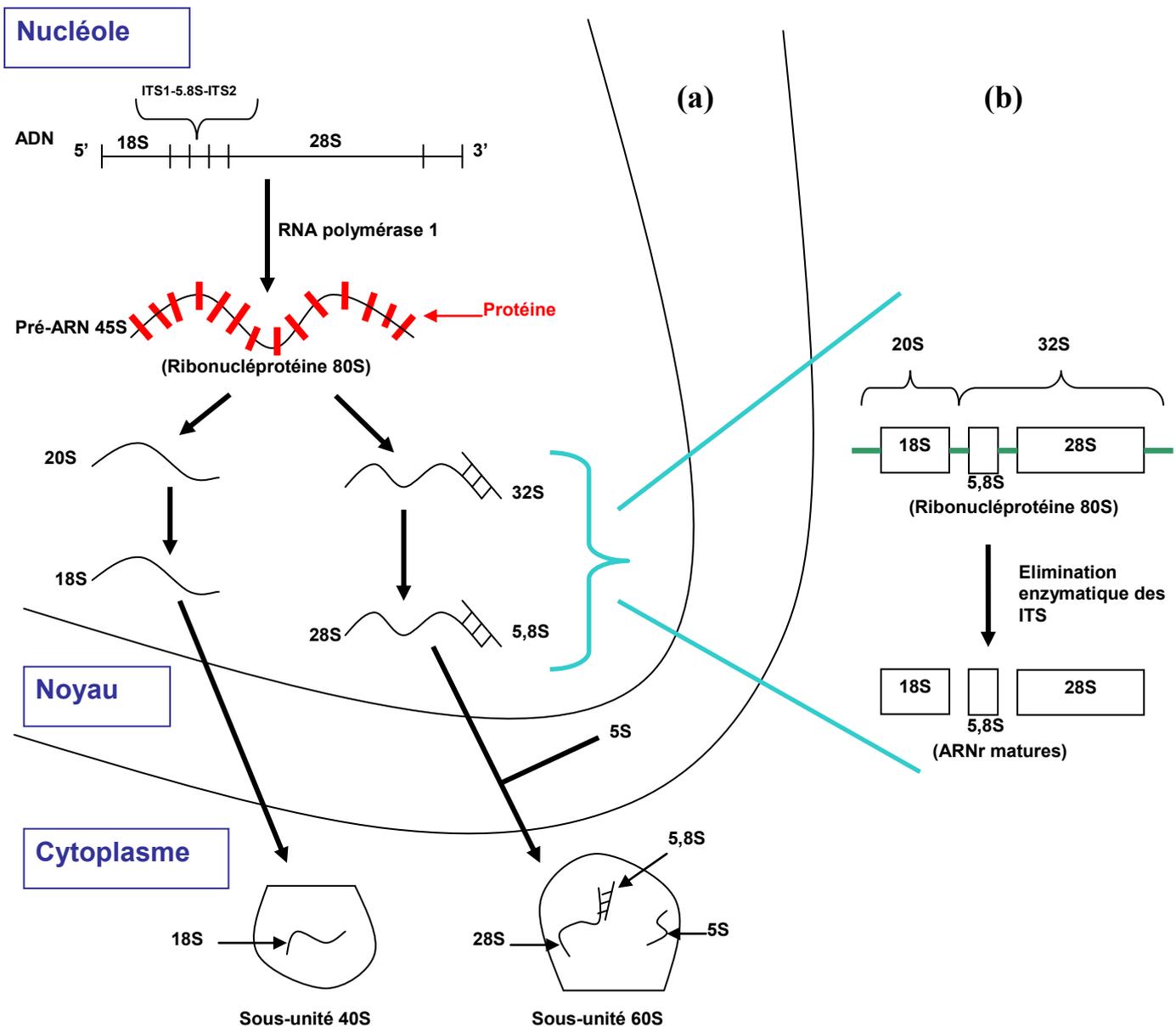


Figure 3. Principales étapes de l'assemblage des ribosomes. (a) Le pré-ARNr 45S, obtenu par transcription de l'ADNr, se combine avec des protéines pour former la ribonucléoprotéine (RNP) 80S. Cette RNPr subit différentes étapes de transformation pour produire les ARNr matures 18S, 5,8S et 28S. Ces ARNr matures s'associent avec des protéines et l'ARNr 5S pour former la grande sous-unité (60S) et la petite sous-unité (40S) ribosomales. (b) ITS1 et ITS2 sont éliminés par action enzymatique pendant la transformation de la RNPr 80S en ARNr matures. La délétion de ces régions avant cette maturation empêche la cellule de produire des ribosomes fonctionnels.

IV. Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis

IV.1. Principe

Avec l'avancée des techniques de biologie moléculaire, de nombreuses méthodes basées sur l'analyse de l'ADN sont apparues et permettent d'étudier la diversité des micro-organismes en s'affranchissant des contraintes de la culture. Une de ces techniques consiste à réaliser, après amplification par PCR d'une séquence cible, une électrophorèse en gradient de température (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis, ou TGGE), afin d'obtenir une dénaturation partielle de l'ADN.

La température de fusion (T_m , melting temperature) d'un produit de PCR (ADN double brin) est la température pour laquelle 50% des molécules d'ADN sont désappariées. Ce T_m est fonction de la quantité de liaisons hydrogènes présentes, c'est-à-dire de la séquence. Ce sont les appariements A-T qui se séparent les premiers au cours de la montée en température car ils ne possèdent que deux liaisons hydrogènes contrairement aux appariements G-C qui en possèdent trois.

La TGGE est basée sur les différences de mobilité électrophorétique des molécules d'ADN double brin partiellement dénaturées, dans un gel de polyacrylamide soumis à un gradient de température linéaire. En effet, la dénaturation de l'ADN crée des molécules branchées, ce qui entraîne l'arrêt de la migration. Des molécules de même taille mais de séquences nucléotidiques différentes auront des températures de fusion différentes, et donc s'arrêteront de migrer à différentes positions dans le gel ; chaque bande obtenue correspond alors à une séquence nucléotidique différente (figure 4) [36, 37].

Afin d'optimiser la TGGE, une des amorces doit comporter à son extrémité 5' une séquence riche en bases G et C, dite GC-clamp. Le but du GC-clamp est d'augmenter de manière très importante la température de dénaturation à l'extrémité 5' du produit de PCR. Sans cette séquence, le fragment d'ADN double brin soumis au gradient de température se dénature totalement, ce qui aboutit à la formation de deux molécules simple brin, qui vont migrer séparément dans le gel. Le GC-clamp permet de limiter la dénaturation et donc de bloquer la migration de la molécule branchée [38].

IV.2. Applications

La TGGE a été largement utilisée en microbiologie environnementale puis médicale, pour étudier la diversité de populations microbiennes (bactéries ou champignons).

Cette méthodologie a démontré son intérêt dans l'analyse de populations de levures dans l'eau, dans le vin, de populations fongiques dans la terre, pour la recherche de bactéries pathogènes dans les tiques, ou encore la recherche de modifications de la flore intestinale chez des patients atteints de la maladie de Crohn [37, 39-44].

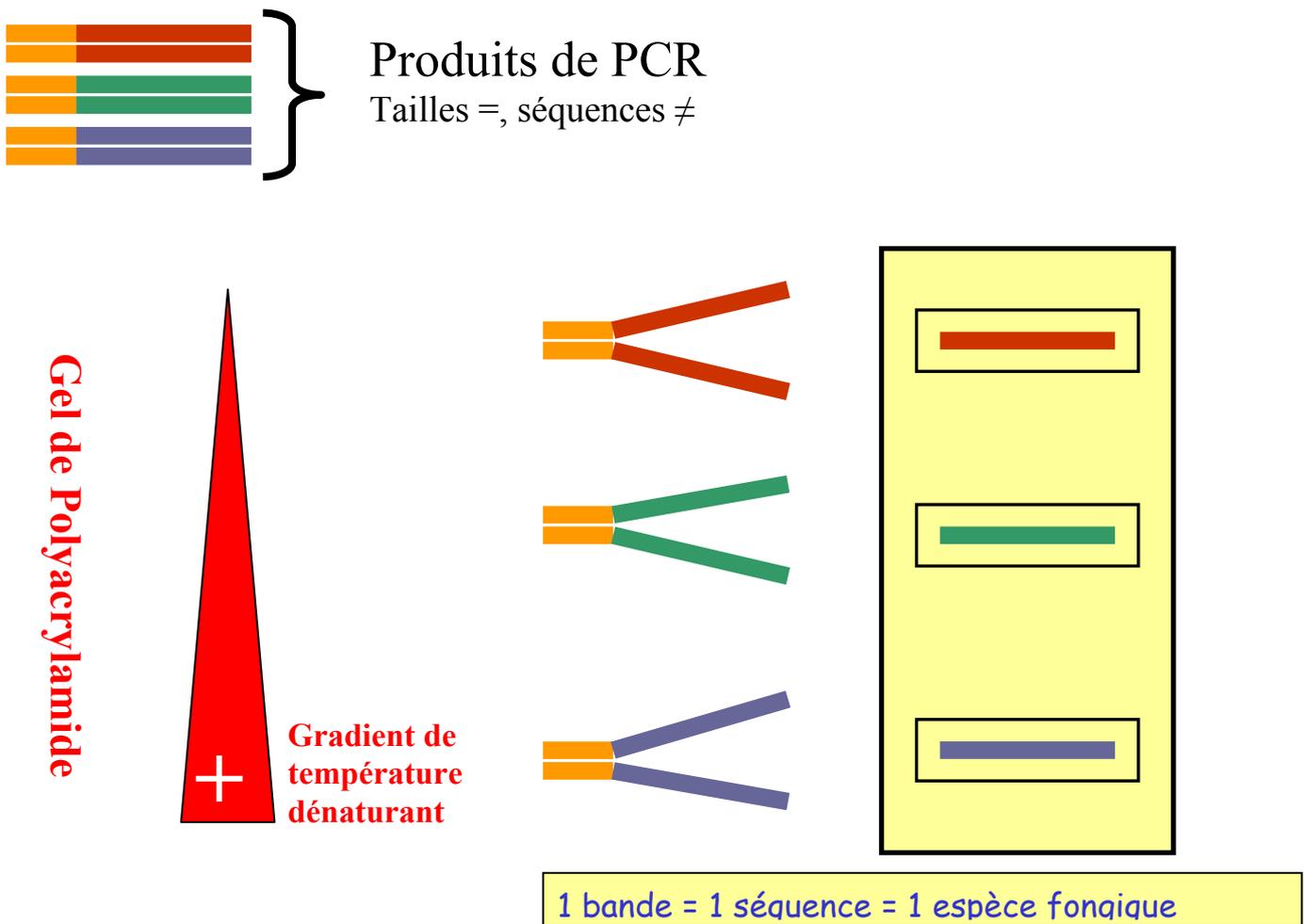


Figure 4 : Principe de la TGGE. Les fragments d'ADN double brin se dénaturent partiellement lorsqu'ils atteignent leur T_m et s'arrêtent dans le gel. A chaque bande correspond une séquence. Le GC-clamp (figuré en orange) prévient la dénaturation complète de l'ADN.

MATERIELS ET METHODES

I. Souches et conditions de culture

Les souches de levures et de champignons filamenteux utilisées lors de ce travail ainsi que leur température et durée d'incubation sont présentées dans l'annexe 1. Les milieux de culture utilisés sont répertoriés dans l'annexe 2.

I.1. Levures

Les souches de *Candida* sont cultivées en milieu gélosé de Sabouraud Dextrose Agar (SDA, Merck) additionné de chloramphénicol à 1g/L (Sigma). Après 24 h de culture à 37°C, les blastospores sont récupérées dans de l'eau distillée stérile à la surface de la gélose et dénombrées. La quantité de blastospores est évaluée par la mesure de la densité optique (DO) à 550 nm. Un tableau de correspondance DO/quantité de levures par millilitre, établi au laboratoire, permet d'en déduire la quantité de blastospores. A partir d'une suspension à 10⁶ cellules/mL, des aliquots de 1 mL sont réalisés et centrifugés 10 minutes à 2350 g à 4°C. Les culots sont conservés à -20°C.

I.2. Champignons filamenteux

Toutes les souches de champignons filamenteux sont cultivées en milieu gélosé Yeast-extract Peptone Dextrose Agar (YPDA), à 25°C ou 37°C en fonction de leur température optimale de croissance. Les souches de *Scedosporium apiospermum* sont cultivées en milieu YPDA additionné d'une solution de cycloheximide à 0,5 g/L (Sigma). Après une durée de culture de 48 heures à 15 jours selon les espèces, chaque souche est récupérée dans 50 mL de milieu liquide Yeast-extract Peptone Dextrose (YPD) additionné de chloramphénicol (0,5g/L, Cooper), et la suspension obtenue est incubée en fonction des conditions de croissance de chaque espèce. Puis le mycélium est récupéré directement en surface du bouillon et broyé en azote liquide à l'aide d'un mortier en porcelaine et d'un pilon, jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Le broyat est conservé à -20°C.

II. Extraction de l'ADN

II.1. Levures

L'extraction de l'ADN est réalisée à l'aide du kit QIAamp DNA mini® (Qiagen). Les culots de 10^6 cellules sont remis en suspension dans 300 µL de tampon de lyse (tampon ATL) et additionnés de 300 µL d'un mélange de billes de verre stériles [diamètre 0,25-0,3 mm et 1-1,05 mm (Braun)]. L'ensemble est fortement agité pendant 30 secondes à l'aide d'un vortex, puis refroidi dans la glace pendant 30 secondes ; cette manipulation est répétée 8 fois consécutives. L'extraction se fait ensuite conformément aux instructions recommandées par Qiagen. L'ADN élué est conservé à -20°C.

II.2. Champignons filamenteux

L'extraction de l'ADN est réalisée à partir de 500 µL de poudre fongique (Cf. paragraphe I.2.), d'une seule espèce ou d'un mélange de plusieurs espèces, à l'aide du kit DNeasy Plant Mini® (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. L'ADN élué est conservé à -20°C.

II.3. Extraction de l'ADN de champignons à partir de crachats

Les crachats très épais d'aspect muco-purulent nécessitent une préparation avant l'extraction de l'ADN. Ils sont broyés en azote liquide à l'aide d'un mortier en porcelaine et d'un pilon et la poudre obtenue peut être conservée à -20°C dans un tube eppendorf jusqu'à utilisation.

Les crachats fluides et clairs ne sont pas traités avant extraction de l'ADN.

L'extraction de l'ADN est ensuite réalisée à l'aide du kit DNeasy Plant Mini® (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. L'ADN élué est conservé à -20°C.

III. Réaction d'amplification génique : PCR

Les tailles, les T_m et les séquences des régions ITS1 et ITS2 des espèces fongiques étudiées sont présentées dans les annexes 3 et 4.

III.1. Choix des amorces

III.1.1. Région ITS1

Les amorces utilisées sont les amorces universelles ITS1 et ITS2 (Proligo) [31]. Elles permettent l'amplification de la séquence Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1) située sur l'ADN ribosomal. Ces amorces sont des oligonucléotides de 19 bases pour ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') et de 20 bases pour ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3').

Dans le but de réaliser ultérieurement l'électrophorèse TGGE, un GC clamp de 42 bases (5'-CGCCCGCCGCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACCGCGCG-3') a été ajouté à l'extrémité 5' de ITS1 (amorce GC-ITS1).

III.1.2. Région ITS2

Les amorces utilisées sont les amorces universelles ITS3 et ITS4 (Proligo) [35]. Elles permettent l'amplification de la séquence Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) située sur l'ADN ribosomal. Ces amorces sont des oligonucléotides de 20 bases pour ITS3 (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3') et ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3').

Un GC clamp a également été ajouté à l'extrémité 5' de ITS3 (amorce GC-ITS3).

III.2. Préparation du mélange réactionnel

III.2.1. Région ITS1

La réaction est effectuée dans un volume final de 50 µL. Les différents réactifs sont ajoutés dans les proportions suivantes :

Réactifs	Concentration mère des réactifs	Concentration finale des réactifs	Volume unitaire par tube (µL)
Tampon de dilution de la DNA polymérase (Eurogentec)	10X	1X	5
MgCl ₂ (Eurogentec)	25 mM	1,5 mM	3
dNTP (Eurogentec)	2,5 mM	0,2 mM	4
Amorce GC-ITS1 (Proligo)	16 pmol/µL	0,6 pmol/µL	1,88
Amorce ITS2 (Proligo)	20 pmol/µL	0,6 pmol/µL	1,5
Eau ultrapure stérile			29,5
HotGoldstar DNA polymérase (Eurogentec)	5 U/µL	0,05 U/µL	0,5
ADN			5
			50

Dans le tube qui servira de témoin négatif, 5 µL d'eau stérile sont déposés à la place de l'ADN.

III.2.2. Région ITS2

La réaction est effectuée dans un volume final de 50 µL. Les différents réactifs sont ajoutés dans les proportions suivantes :

Réactifs	Concentration mère des réactifs	Concentration finale des réactifs	Volume unitaire par tube (µL)
Tampon de dilution de la DNA polymérase (Eurogentec)	10X	1X	5
MgCl ₂ (Eurogentec)	25 mM	1,5 mM	3
dNTP (Eurogentec)	2,5 mM	0,2 mM	4
Amorce GC-ITS3 (Proligo)	16,5 pmol/µL	0,6 pmol/µL	1,82
Amorce ITS4 (Proligo)	20 pmol/µL	0,6 pmol/µL	1,5
Eau ultrapure stérile			29,18
HotGoldstar DNA polymérase (Eurogentec)	5 U/µL	0,05 U/µL	0,5
ADN			5
			50

Dans le tube qui servira de témoin négatif, 5 µL d'eau stérile sont déposés à la place de l'ADN

III.3. Amplification

L'amplification est réalisée à l'aide d'un thermocycleur PTC200 (MJ Research), selon le programme suivant :

Étapes	Durée et température	Nombre de cycles
Dénaturation de l'ADN	10 minutes à 95°C	1
Dénaturation, hybridation et élongation	30 secondes à 95°C 1 minute à 62°C 2 minutes à 72°C	33
Elongation finale	5 minutes à 72°C	1

Les amplicons sont conservés à 4°C jusqu'à la réalisation de l'électrophorèse, puis congelés à -20°C.

IV. Electrophorèse de contrôle sur gel d'agarose

IV.1. Electrophorèse

Les produits d'amplification sont révélés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% (Sigma) en tampon TBE 0,5X (Sigma), additionné de 0,1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de bromure d'éthidium (Sigma). Les échantillons déposés comportent 8 μL d'ADN fongique et 2 μL de bleu de migration (Sigma). Un marqueur de taille (DNA Molecular Weight Marker IX, Roche) est déposé dans un des puits. La migration s'effectue sous ampérage constant à 100 V pendant 30 minutes.

IV.2. Révélation

A la fin de la migration, le gel est révélé sous UV puis analysé à l'aide du logiciel Bio-Profil (Vilber Lourmat).

V. Electrophorèse TGGE

L'électrophorèse TGGE est réalisée à l'aide de l'appareil DCode Universal Detection Mutation System™ (Bio-Rad).

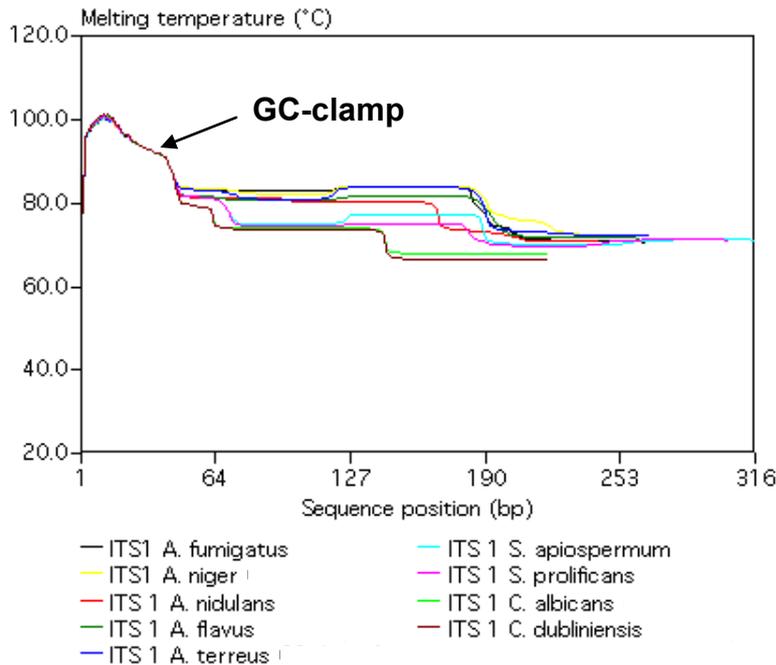
V.1. Détermination des paramètres de la migration

Les caractéristiques de la migration sont déterminées par le logiciel MacMelt (Bio-Rad), qui permet d'évaluer le comportement des séquences d'ADN soumises à un gradient de température en fonction de leur T_m (Melting Temperature). Les séquences ITS1 de l'ADN ribosomal des différentes espèces de champignons sont successivement analysées à l'aide du logiciel. Cette étape permet d'obtenir la courbe de dénaturation de chaque séquence et de définir les températures initiale et finale ainsi que la durée de la migration. La figure 5.A. représente la courbe de dénaturation des régions ITS1, la portion initiale correspondant au GC-clamp ; cependant le GC-clamp ne doit pas être pris en compte dans le choix des paramètres de la TGGE, car il doit rester sous forme double brin. La figure 5.B. montre le même graphique, en excluant le GC-clamp, ce qui permet de définir une température initiale à 65°C et une température finale à 84,5°C. L'appareil DCode Universal Detection Mutation System™ ne pouvant pas dépasser 70,5°C, le gel est additionné d'urée, 1M d'urée permettant

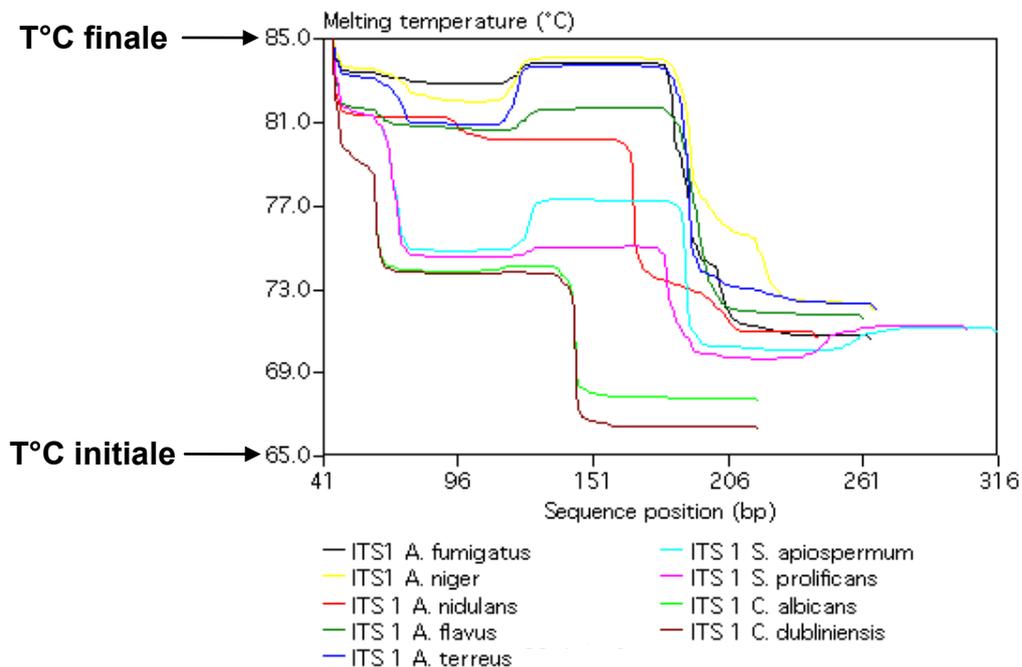
d'abaisser les températures initiales et finales de 2°C ; en faisant un gel à 7M d'urée, la température initiale devient 51°C et la température finale 70,5°C.

Figure 5 : Analyse des séquences ITS1 des différentes espèces fongiques avec le logiciel MacMelt™

5. A. Graphique global.



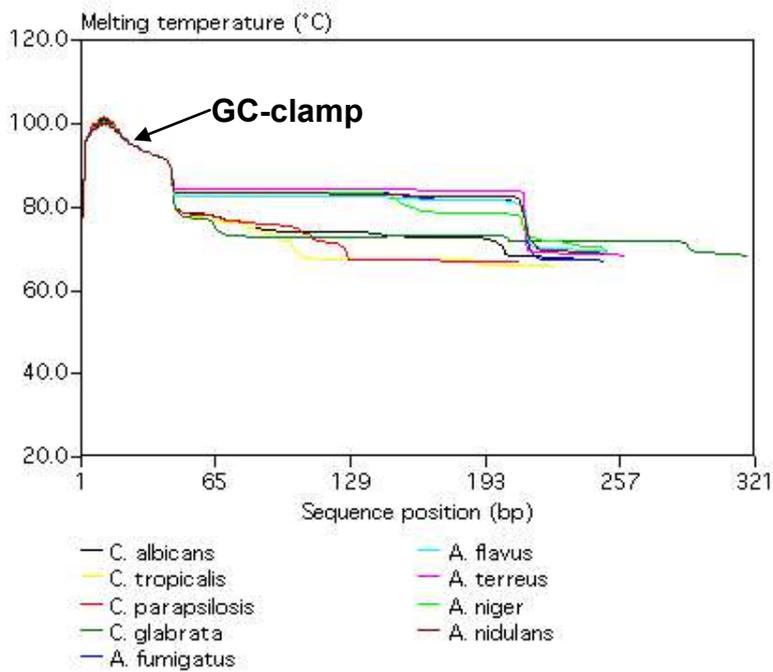
5. B. Graphique sans prendre en compte le GC-clamp



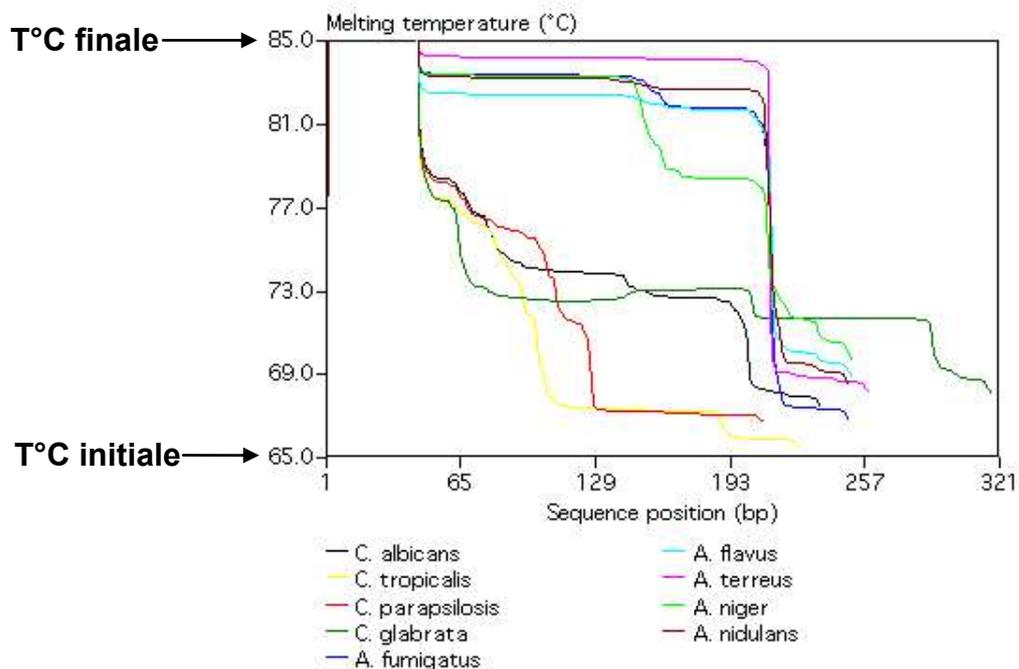
Les mêmes paramètres de migration sont retrouvés en analysant les séquences ITS2 des espèces fongiques, qui sont représentées dans les figures 6.A. et 6.B. (la figure 6.A. représentant la courbe de dénaturation des régions ITS2 avec le GC-clamp, la figure 6.B. montre le même graphique, en excluant le GC-clamp).

Figure 6 : Analyse des séquences ITS2 des différentes espèces fongiques avec le logiciel MacMelt™

6. A. Graphique global.



6. B. Graphique sans prendre en compte le GC-clamp



V.2. Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis

L'électrophorèse est effectuée sur un gel à 8% d'acrylamide/bisacrylamide (Bio-Rad), avec 7M d'urée (Bio-Rad), 40 µL de TEMED (Bio-Rad), 400 µL de persulfate d'ammonium à 10% (Bio-Rad). Les échantillons déposés comportent 5 µL d'ADN fongique et 5 µL de bleu de migration (Bio-Rad). La migration se fait sur 20 heures à voltage constant de 60 V, avec un gradient de température de 51°C à 70,5°C.

A la fin de la migration, le gel est immergé 10 minutes dans un bain de tampon TAE 1,25X contenant 0,1 µL/mL de bromure d'éthidium (Bio-Rad), puis rincé dans du TAE 1X. La lecture du gel se fait sous UV à l'aide du logiciel Bio-Profil (Vilber Lourmat).

Le protocole utilisé est présenté en annexe 5.

VI. Préparation de mélanges d'espèces fongiques

VI.1. Mélange d'extraits d'ADN fongique

Les extraits d'ADN obtenus à partir de quatre espèces fongiques en culture pure sont mélangés volume pour volume dans un tube eppendorf 1,5 mL. La PCR est ensuite réalisée en incorporant 5 µL de ce mélange dans le mélange réactionnel.

VI.2. Mélange de broyats de champignons avant extraction

Trois espèces fongiques en culture pure sont broyées séparément en azote liquide, puis les poudres fongiques obtenues sont mélangées dans un tube eppendorf de 1,5 mL (200 µL de chaque broyat sont utilisés). L'extraction de l'ADN est ensuite réalisée à l'aide du kit DNeasy Plant Mini® (Qiagen), et la PCR est effectuée en introduisant 5 µL de l'éluat obtenu dans le mélange réactionnel.

VI.3. Mélange de champignons après homogénéisation au Potter

Les mycéliums de quatre espèces fongiques en culture pure sont homogénéisés séparément à l'aide d'un broyeur de Potter-Elvehjem, permettant d'obtenir des suspensions mères. Les suspensions mères sont ensuite diluées au 1/100, au 1/1000, et au 1/10000. 10 µL des suspensions filles au 1/10000 sont ensemencés sur boîte de Pétri, puis les unités formant colonie (UFC) sont comptées sur chaque boîte, permettant d'établir une correspondance volume de suspension de mycélium/UFC. Divers mélanges associant 2, 3 ou 4 de ces

suspensions sont ensuite préparés dans des tubes eppendorf 1,5 mL, en veillant à réunir 10^5 UFC de chaque espèce fongique par mélange.

Les tubes eppendorf contenant les mélanges sont centrifugés 5 minutes à 2350 g/minute. Le surnageant est éliminé. L'extraction de l'ADN est réalisée à l'aide du kit DNeasy Plant Mini® (Qiagen).

RESULTATS

I. Extraction de l'ADN fongique et bactérien

L'extraction de l'ADN fongique ou bactérien a été réalisée à partir de cultures de 5 espèces de *Candida*, 13 espèces de champignons filamenteux et 3 espèces de bactéries. Pour un certain nombre d'entre elles, plusieurs isolats ont été extraits (Cf annexe 1).

La pureté de l'ADN extrait a été vérifiée pour certaines souches par mesure du rapport DO260/DO280 ; des rapports de 1,7 à 2 ont été obtenus.

II. Amplification génique par PCR de la région Internal Transcribed Spacer 1

Après amplification (en utilisant les amorces ITS1 et ITS2) de l'ADN extrait à partir de champignons et de bactéries, les produits de PCR ont été révélés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%. Des bandes correspondant à la région ITS1 amplifiée, comprises entre 250 et 500 pb, sont observées pour tous les champignons. Aucune bande n'a été mise en évidence pour les trois espèces bactériennes (figure 7).

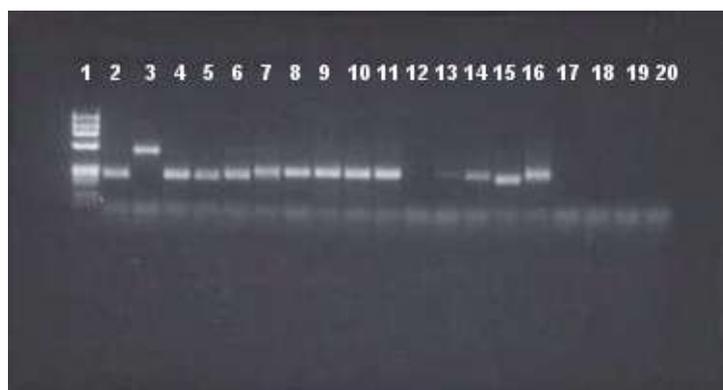


Figure 7. PCR ITS1/ITS2 à partir des extraits de différentes espèces fongiques et bactériennes. 1 : DNA Molecular Weight Marker IX ; 2 : *Candida albicans* 5875 ; 3 : *Candida glabrata* 5511 ; 4 : *Candida tropicalis* 5437 ; 5 : *Candida dubliniensis* 98258 ; 6 : *Candida parapsilosis* 911675 ; 7 et 16 : mélange d'extraits de *Candida albicans* 5875, *Aspergillus terreus* 40206202, *Aspergillus fumigatus* 40005719, *Scedosporium apiospermum* 40506325 ; 8 : *Aspergillus flavus* IHEM6741 ; 9 : *Aspergillus fumigatus* 40010506 ; 10 : *Aspergillus fumigatus* 40102597 ; 11 : *Aspergillus terreus* 40407483 ; 13 : *Scopulariopsis brevicaulis* LMA91307 ; 14 : *Scedosporium apiospermum* 40506325 ; 15 : *Penicillium emersonii* 49709694 ; 17 : *Staphylococcus aureus* ; 18 : *Pseudomonas aeruginosa* ; 19 : *Haemophilus influenzae* b ; 20 : Témoin négatif

III. Détection des différentes espèces fongiques par Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis

III.1. Vérification de la technique TGGE à l'aide de l'appareil DCode Universal Detection Mutation System™ (Bio-Rad)

Afin de contrôler la technique TGGE à l'aide de l'appareil DCode Universal Detection Mutation System™, une manipulation a été réalisée en utilisant le kit de contrôle fourni par le fabricant (DCode™ Control Reagent Kit for DGGE, CDGE, TTGE, Bio-Rad). Ainsi, après une migration de 3h à 130V, avec un gradient de température de 63°C à 66°C à 1°C/h, l'ADN d'une souche sauvage et d'un mutant ont pu être séparés, leurs séquences ne présentant qu'une base de différence (Figure 8).

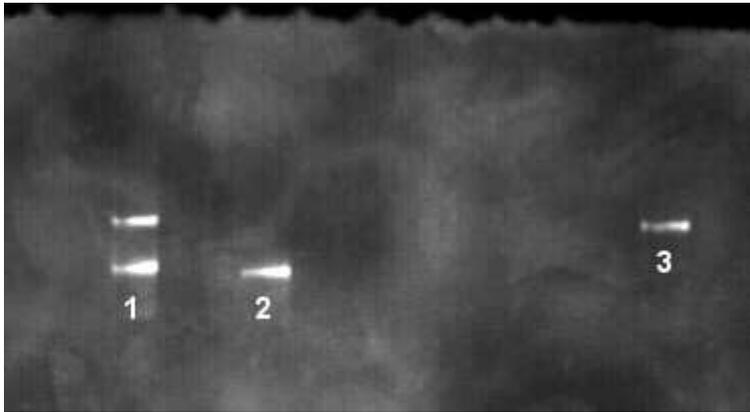


Figure 8. TGGE de contrôle. 1 : mélange ADN mutant et ADN sauvage ; 2 : ADN sauvage ; 3 : ADN mutant

III.2. Identification des champignons par PCR-TGGE en amplifiant la région Internal Transcribed Spacer 1

Les profils de migration des espèces fongiques analysées en TGGE après amplification de leur région ITS1 sont présentés dans les figures 9 à 19. Afin d'optimiser la méthode, certaines variations des conditions de migration ont pu être apportées (figures 18 et 19).

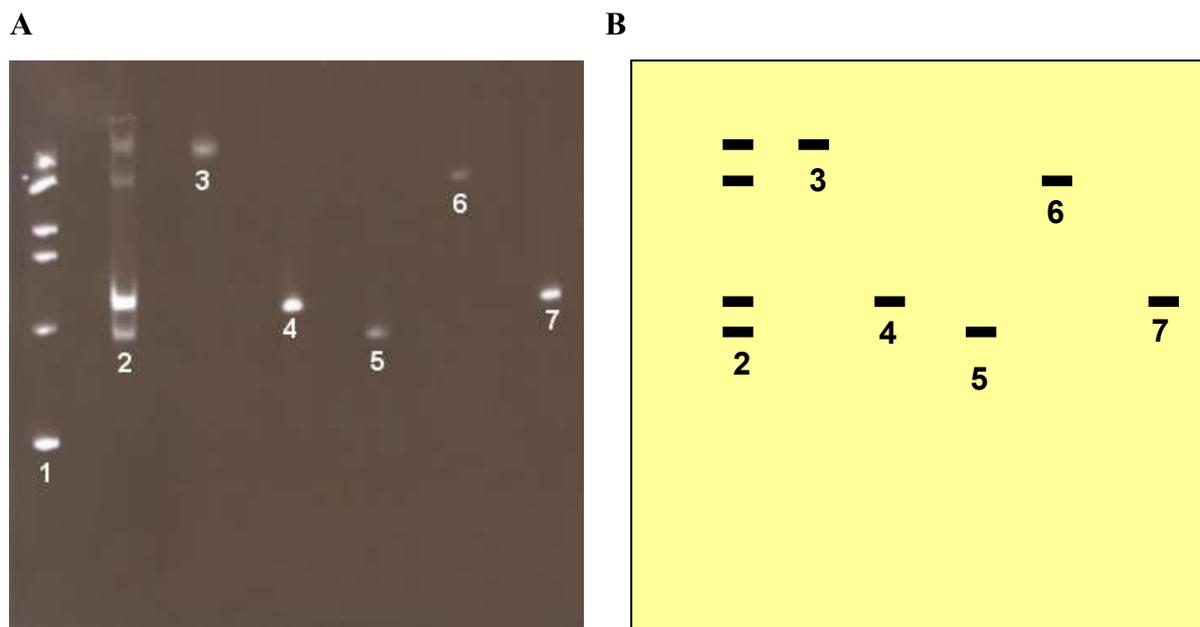


Figure 9. (A) TGGE de quatre espèces fongiques rencontrées dans la mucoviscidose (GC-ITS1/ITS2, 51°C-70,5°C, incrément 1°C/h, 60V, 20h) et (B) représentation schématique des bandes observées. 1 : marqueur de taille 100 ladder ; 2 : marqueur « mucoviscidose » (de haut en bas : *C. albicans*, *S. apiospermum*, *A. fumigatus*, *A. terreus*) ; 3 : *Candida albicans* ; 4 : *Aspergillus fumigatus* ; 5 : *Aspergillus terreus* ; 6 : *Scedosporium apiospermum* ; 7 : *Aspergillus fumigatus*.

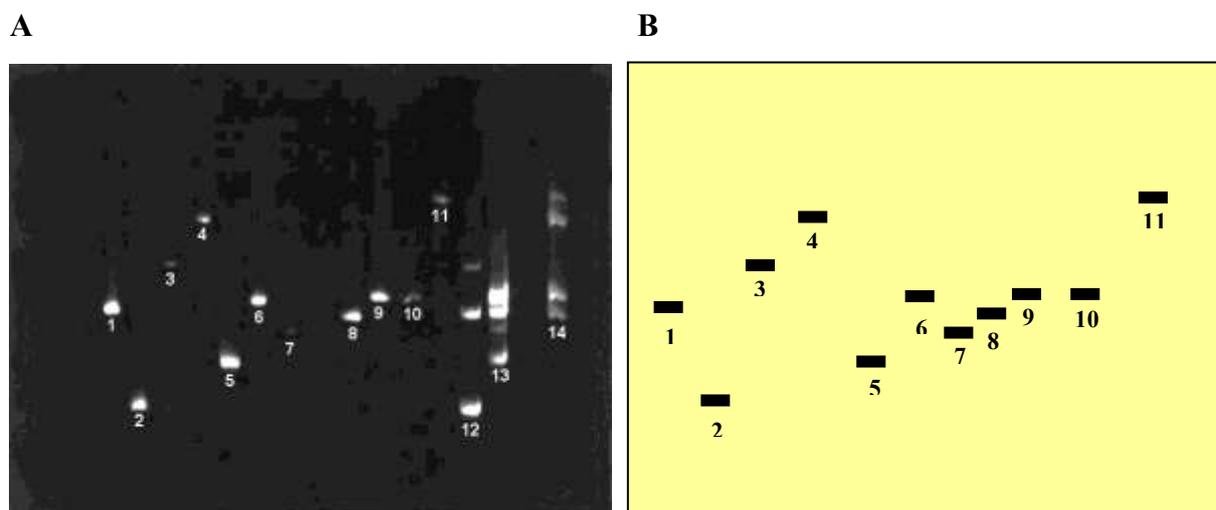


Figure 10. (A) TGGE d'espèces fongiques rencontrées dans la mucoviscidose (GC-ITS1/ITS2, 51°C-70,5°C, incrément 1°C/h, 60V, 20h) et (B) représentation schématique des bandes observées. 1: *Paecilomyces variotii* ; 2: *Penicillium emersonii* ; 3: *Acrophialophora fusispora* ; 4: *Scedosporium apiospermum* ; 5: *Aspergillus nidulans* ; 6: *Aspergillus flavus* ; 7: *Aspergillus niger* ; 8: *Aspergillus terreus* ; 9: *Aspergillus fumigatus* ; 10: *Aspergillus fumigatus* ; 11: *Candida albicans* ; 12: Marqueur "autre" ; 13: Marqueur "Aspergillus" ; 14: Marqueur "Mucoviscidose".

III.2.1. Définition de marqueurs de taille de référence

Dans un premier temps, un marqueur de taille 100 ladder a été utilisé ; il s'est révélé peu performant pour repérer la migration des différentes espèces fongiques (figure 9 piste 1). Différents marqueurs de taille ont donc été mis au point pour permettre l'identification de toutes les espèces de champignons testées. Ainsi, quatre marqueurs ont été définis et créés en mélangeant 5µL de chaque produit de PCR des différentes souches amplifiées.

Le marqueur 1 appelé « mucoviscidose » est constitué des quatre souches suivantes : *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Scedosporium apiospermum*. Ce marqueur a permis de repérer aisément les principaux champignons rencontrés dans les expectorations de patients atteints de la mucoviscidose (figure 9 piste 2).

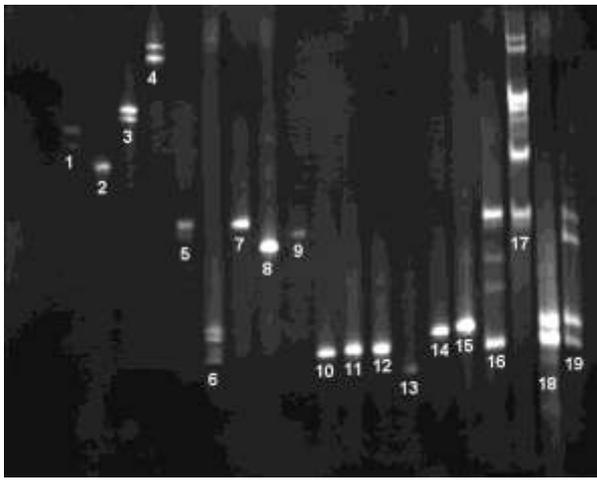
Le marqueur 2 est nommé « *Aspergillus* ». Il contient les cinq espèces suivantes : *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus terreus*. Ce marqueur n'a permis de repérer que 3 des 5 espèces d'*Aspergillus*. En effet, *A. fumigatus* et *A. flavus* migrent à des positions si proches qu'une seule bande plus intense est visible (figure 10 piste 13).

Le marqueur 3 (Marqueur « *Candida* ») correspond aux différentes espèces de *Candida* : *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida dubliniensis*. Il permet de repérer les cinq espèces, malgré l'apparition de doubles bandes (figure 11 piste 17).

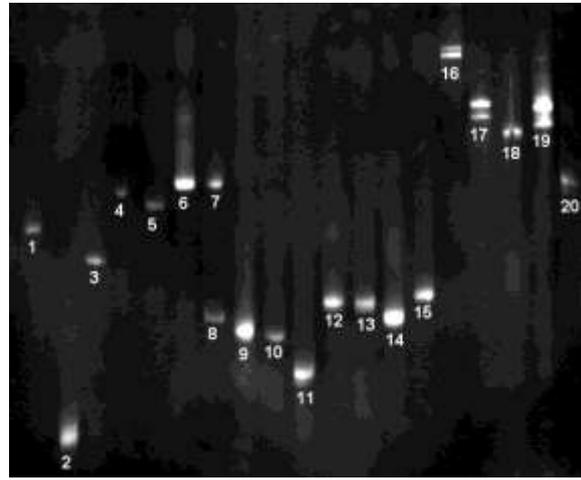
Le marqueur 4 (marqueur « autre ») comprend toutes les autres espèces fongiques étudiées (exceptés *Paecilomyces lilacinus* et *Scopulariopsis brevicaulis*): *Penicillium emersonii*, *Acrophialophora fuispora*, *Scedosporium prolificans*, *Exophiala dermatitidis*, *Paecilomyces variotii* (figure 11 piste 16).

III.2.2. Identification des principales espèces de champignons rencontrées dans la mucoviscidose

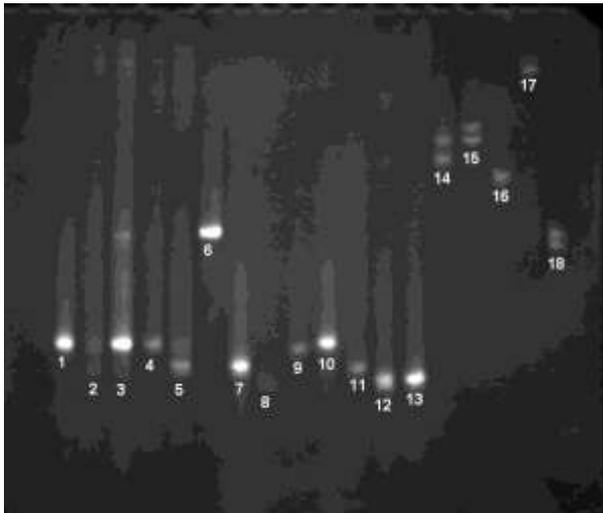
Les quatre espèces fongiques les plus fréquemment isolées des expectorations des patients atteints de mucoviscidose ont pu être différenciées par la PCR-TGGE (figure 9), l'électrophorèse révélant quatre bandes distinctes correspondant à *Candida albicans* (piste 3), *Scedosporium apiospermum* (piste 6), *Aspergillus fumigatus* (pistes 4 et 7) et *Aspergillus terreus* (piste 5).



11



12



13

Figures 11, 12 et 13 : Profils de migration de toutes les espèces fongiques analysées en TGGE (région ITS1).

Figure 11 (PCR GC-ITS1/ITS2 ; TGGE 51°C-70,5°C, 0,7°C/h, 60V). 1: *Candida parapsilosis* ; 2: *Candida dubliniensis* ; 3: *Candida tropicalis* ; 4: *Candida glabrata* ; 5: *Candida albicans* ; 6: Mélange (*S. apiospermum*, *A. fumigatus*, *A. terreus*) ; 7: *Exophiala dermatitidis* ; 8: *Scedosporium apiospermum* ; 9: *Scedosporium prolificans* ; 10: *Paecilomyces variotii* ; 11: *Aspergillus terreus* ; 12: *Aspergillus terreus* ; 13: *Aspergillus niger* ; 14: *Aspergillus flavus* ; 15: *Aspergillus fumigatus* ; 16: Marqueur « autre » ; 17: Marqueur « *Candida* » ; 18: marqueur « *Aspergillus* » ; 19: marqueur « mucoviscidose ». Le mélange en 6 est constitué de *S. apiospermum*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, et a été obtenu par extraction et PCR sur un mélange de champignons broyés.

Figure 12 (PCR GC-ITS1/ITS2 ; TGGE 51°C-70,5°C, 1°C/h, 60V). 1 : *Scopulariopsis brevicaulis* ; 2 : *Penicillium emersonii* ; 3 : *Acrophialophora fuispora* ; 4 : *Scedosporium prolificans* ; 5 : *Scedosporium apiospermum* ; 6 : *Exophiala dermatitidis* ; 7 : *Paecilomyces lilacinus* ; 8 : *Paecilomyces variotii* ; 9 : *Paecilomyces variotii* ; 10 : *Aspergillus niger* ; 11 : *Aspergillus nidulans* ; 12 : *Aspergillus flavus* ; 13 : *Aspergillus flavus* ; 14 : *Aspergillus terreus* ; 15 : *Aspergillus fumigatus* ; 16 : *Candida glabrata* ; 17 : *Candida tropicalis* ; 18 : *Candida dubliniensis* ; 19 : *Candida parapsilosis* ; 20 : *Candida albicans*.

Figure 13 (PCR GC-ITS1/ITS2 ; TGGE 51°C-70,5°C, 1°C/h, 60V). 1 : crachat inoculé par *Aspergillus fumigatus* ; 2 : mélange ; 3 : mélange ; 4 : mélange ; 5 : mélange ; 6 : *Exophiala dermatitidis* ; 7 : *Aspergillus terreus* ; 8 : *Aspergillus niger* ; 9 : *Aspergillus flavus* ; 10 : *Aspergillus fumigatus* ; 11 : *Paecilomyces variotii* ; 12 : *Paecilomyces variotii* ; 13 : *Paecilomyces variotii* ; 14 : *Candida parapsilosis* ; 15 : *Candida tropicalis* ; 16 : *Candida dubliniensis* ; 17 : *Candida glabrata* ; 18 : *Candida albicans*. Les mélanges pistes 2 et 5 contiennent *S. apiospermum*, *A. fumigatus*, et *A. terreus*, et ont été obtenus par extraction d'ADN et PCR à partir d'un mélange de champignons broyés. Les mélanges pistes 3 et 4 contiennent *S. apiospermum*, *A. fumigatus*, *A. terreus* et *C. albicans*, et ont été obtenus par PCR à partir d'un mélange d'extraits d'ADN.

III.2.3. Identification des autres espèces fongiques rencontrées dans la mucoviscidose

III.2.3.1. *Candida* spp

Cinq espèces de *Candida* ont été étudiées par TGGE. Les produits de PCR de *C. albicans*, *C. dubliniensis* et *C. glabrata* se sont immobilisés à des endroits différents, permettant de distinguer ces espèces. Concernant *C. parapsilosis* et *C. tropicalis*, une TGGE réalisée avec un incrément de température de 1°C/h n'a pas permis la différenciation de ces espèces (figure 12 pistes 17 et 19), différenciation qui a pu être obtenue en utilisant un incrément de 0,7°C/h (figure 11 pistes 1 et 3).

Des doubles bandes ont été observées pour *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* et *C. parapsilosis* sur plusieurs TGGE (figure 11 pistes 1, 3, 4 et 5 ; figure 12 piste 16, 17, 19 et 20). Ces résultats ont été vérifiés à partir de nouveaux amplifiats (figure 13 pistes 14, 15, 17 et 18).

III.2.3.2. *Aspergillus* spp

Cinq espèces d'*Aspergillus* ont également été analysées (figure 10, pistes 5-9). Trois d'entre elles (*A. niger*, *A. terreus*, *A. nidulans*) ont pu être correctement individualisées. Les deux autres espèces (*A. fumigatus* et *A. flavus*) ont migré au même endroit, rendant impossible leur distinction. Ces résultats ont été reproduits (figure 11 pistes 14 et 15).

III.2.3.3. *Scedosporium* spp

Les deux espèces analysées, *S. apiospermum* et *S. prolificans*, ont pu être séparées par PCR-TGGE (figure 11 pistes 8 et 9 ; figure 12 pistes 4 et 5).

III.2.3.4. Autres espèces

Scopulariopsis brevicaulis, *Penicillium emersonii* et *Acrophialophora fusicapna* ont pu être correctement identifiés par PCR-TGGE (figure 12 pistes 1, 2 et 3)

Exophiala dermatitidis (figure 11 piste 7, figure 12 piste 6) migre au même endroit que *Candida albicans* (figure 11 piste 5, figure 12 piste 20) et que *Paecilomyces lilacinus* (figure 12 piste 7).

Trois souches de *Paecilomyces variotii* ont été analysées. Deux de ces souches (IHEM16627 et LMA911262) ont le même profil de migration qu'*Aspergillus terreus* (figure 10 pistes 1 et 8, figure 11 pistes 10-12, figure 12 pistes 8 et 14, figure 13 pistes 7 et 11). La troisième souche de *Paecilomyces variotii* (LMA904820) migre différemment des deux autres, mais au même niveau qu'*Aspergillus niger* (figure 12 pistes 9 et 10, figure 13 pistes 8, 12 et 13).

Les deux espèces *Paecilomyces variotii* et *Paecilomyces lilacinus* sont bien différenciées par PCR-TGGE (figure 12 bande 7-8).

III.2.4. Profil global de l'identification des espèces par PCR-TGGE

Les résultats obtenus lors de l'analyse par PCR-TGGE de l'ensemble des espèces fongiques sont résumés dans la figure 14.

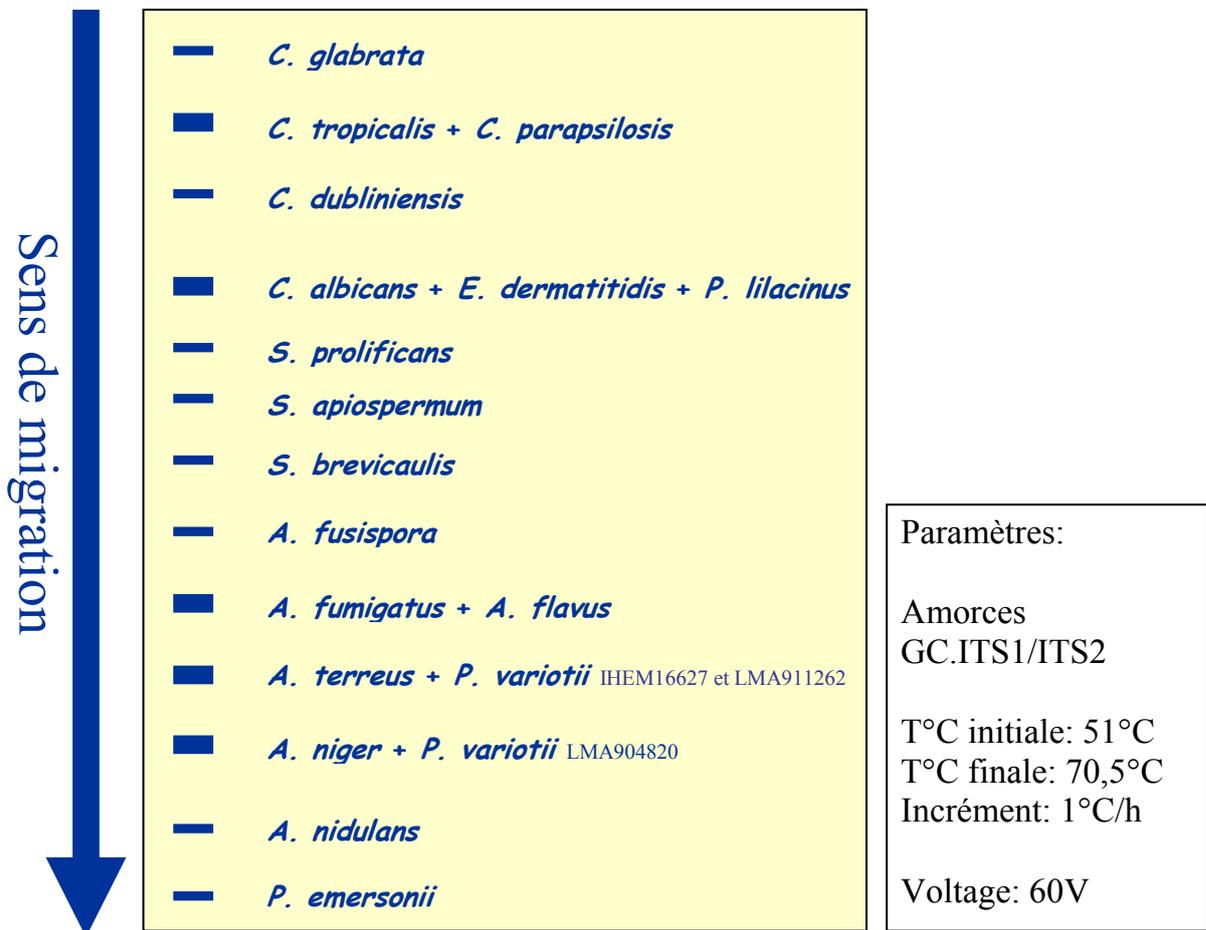


Figure 14. Schéma global de l'identification des espèces par PCR-TGGE (région ITS1)

III.2.5. Vérification de l'absence de variations intraspécifiques

Pour la plupart des espèces de champignons filamenteux, la PCR-TGGE a été réalisée sur deux à cinq souches différentes. Au sein d'une même espèce, toutes les souches analysées ont présenté le même profil de migration électrophorétique, hormis les souches de *Paecilomyces variotii* décrites au paragraphe III.2.3.4.

La figure 15 présente les profils de migration en PCR-TGGE de 3 souches d'*Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus fumigatus*. Aucune variation intraspécifique n'a été mise en évidence pour les différentes espèces testées,

cependant on retrouve toujours l'identité de migration entre *Aspergillus flavus* et *Aspergillus fumigatus*.

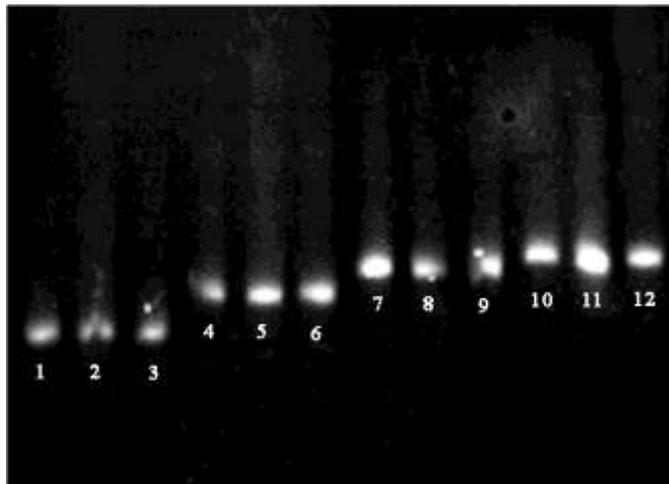


Figure 15. Absence de variation intraspécifique au sein de quatre espèces d'*Aspergillus*.
1 : *Aspergillus niger* 49903838 ; 2 : *Aspergillus niger* IHEM17033 ; 3 : *Aspergillus niger* IHEM5077 ; 4 : *Aspergillus terreus* 40407483 ; 5 : *Aspergillus terreus* 40601868 ; 6 : *Aspergillus terreus* 40601603 ; 7 : *Aspergillus flavus* 40601603 ; 8 : *Aspergillus flavus* 40600868 ; 9 : *Aspergillus flavus* 40600868 ; 10 : *Aspergillus fumigatus* 40010506 ; 11 : *Aspergillus fumigatus* 40007764 ; 12 : *Aspergillus fumigatus* 40005719.

III.2.6. Différenciation des espèces ayant des profils de migration similaires

Certaines espèces fongiques qui n'avaient pas pu être séparées ont été à nouveau analysées en modifiant les paramètres de la TGGE (figures 18 et 19).

Les séquences de ces souches ont été analysées à l'aide du logiciel MacMelt™, ce qui a permis de définir un gradient de température réduit, adapté à l'analyse des quatre espèces (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Paecilomyces variotii*). Ainsi, la figure 16 montre qu'il est possible de différencier *Paecilomyces variotii* et *Aspergillus terreus* en utilisant un gradient de température de 70°C à 75°C, c'est-à-dire 56°C à 61°C en utilisant un gel à 7M d'urée. De même, la figure 17 montre qu'un gradient de température de 70°C à 73°C permet de séparer *Aspergillus flavus* et *Aspergillus fumigatus*.

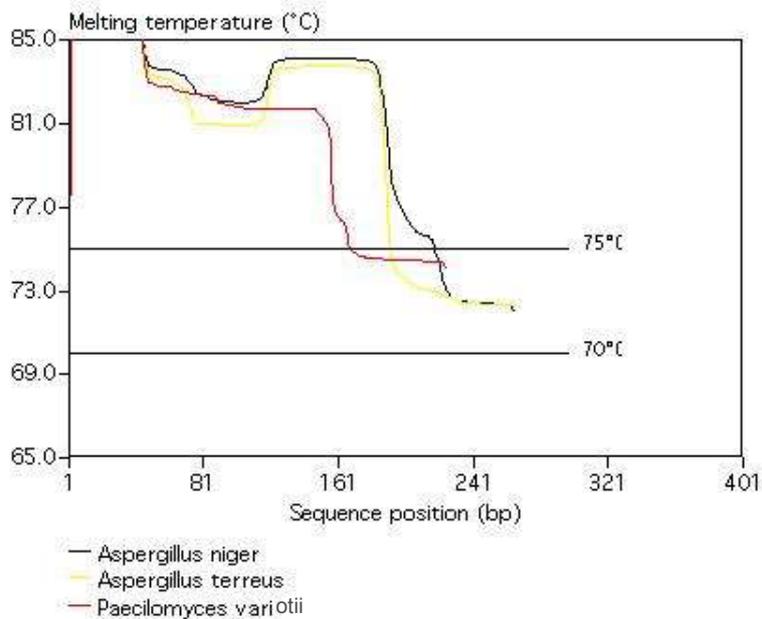


Figure 16 : analyse de *Paecilomyces variotii*, *Aspergillus terreus*, et *Aspergillus niger* à l'aide de MacMelt™

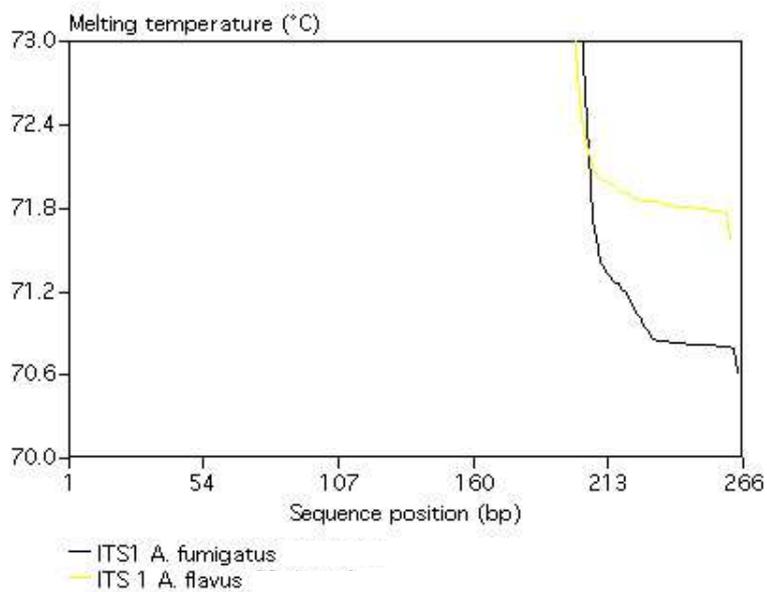


Figure 17 : Analyse de *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus flavus* à l'aide de MacMelt™

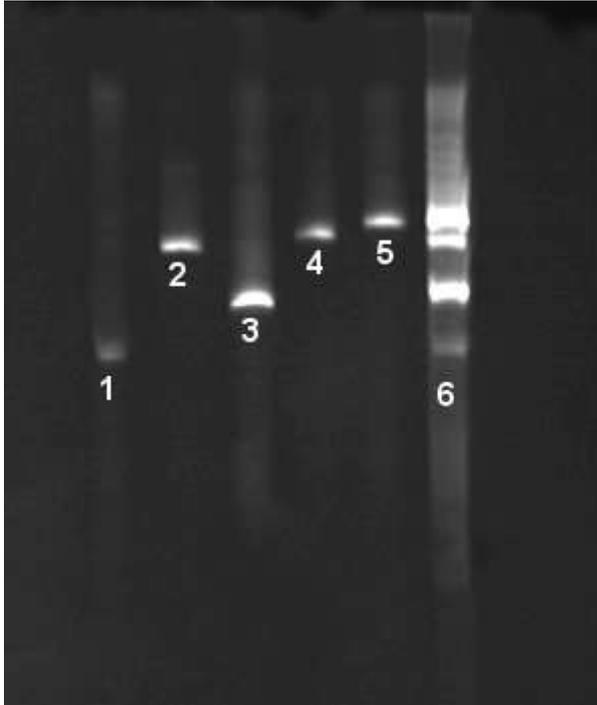
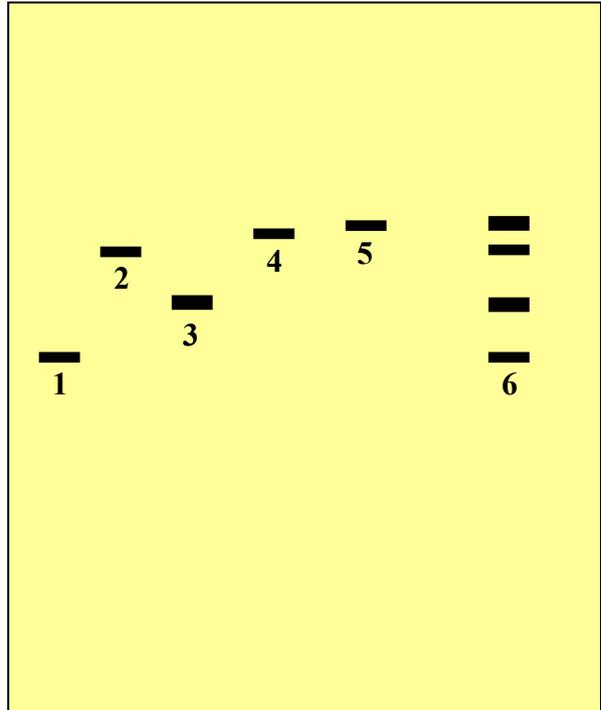
A**B**

Figure 18. (A) Optimisation des paramètres de TGGE (56°C-61°C, 1°C/h, 130V, 5h) pour différencier les régions ITS1 de certaines espèces fongiques et (B) représentation schématique des bandes observées. 1: *A. niger* ; 2: *P. variotii* (LMA911262) ; 3: *A. terreus* ; 4: *A. flavus* ; 5: *A. fumigatus* ; 6: Mélange des 5 espèces étudiées.

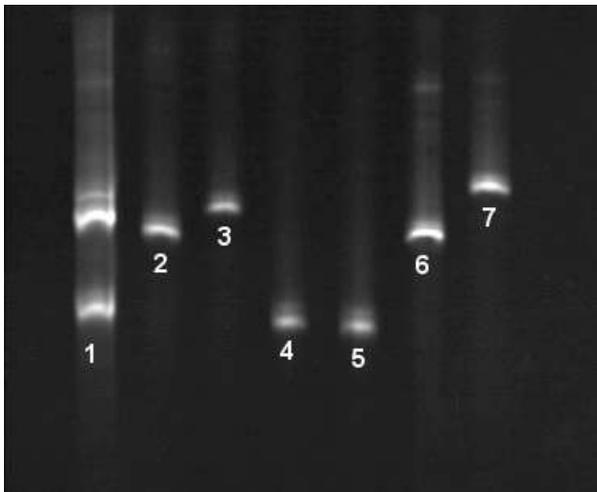
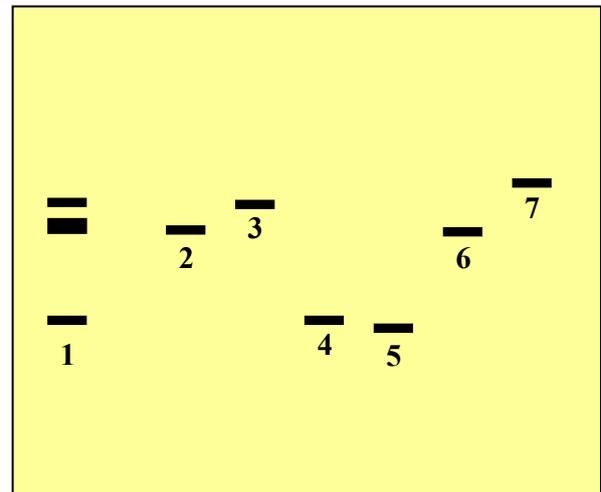
A**B**

Figure 19. (A) Optimisation des paramètres de TGGE (56°C-59°C, 0,7°C/h, 130V, 4h30) pour différencier les régions ITS1 de certaines espèces fongiques et (B) représentation schématique des bandes observées 1: Mélange des 6 souches étudiées ; 2: *A. flavus* ; 3: *A. fumigatus* ; 4: *A. terreus* ; 5: *A. terreus* ; 6: *P. variotii* (LMA904820) ; 7: *P. variotii* (LMA911262).

Une migration avec un gradient de 56°C à 61°C, à 1°C/h à 130V, a permis de distinguer *Aspergillus terreus* et *Paecilomyces variotii* (figure 18 pistes 2 et 3), mais pas *Aspergillus flavus* et *Aspergillus fumigatus* (figure 18 pistes 4 et 5).

Le gradient de température (56°C à 59°C) et l'incrément de température (0,7°C/h) ont encore été réduits, permettant alors de bien différencier *Aspergillus flavus* et *Aspergillus fumigatus* (figure 19 pistes 2 et 3). Cependant, la souche de *Paecilomyces variotii* LMA904820 a montré le même profil de migration qu'*Aspergillus flavus* (figure 19 pistes 2 et 6).

III.3. Identification des champignons par PCR-TGGE en amplifiant la région Internal Transcribed Spacer 2

Afin de tenter de différencier les espèces ayant le même profil de migration après amplification de leur région ITS1, l'ADN extrait à partir de cultures pures de champignons a été amplifié à l'aide des amorces GC-ITS3 et ITS4, les amplicons étant ensuite analysés en TGGE. Les profils de migration des différentes espèces fongiques sont présentés dans les figures 20 à 22.

Candida albicans et *Exophiala dermatitidis*, qui présentaient une migration identique après amplification par GC-ITS1/ITS2 (figure 20 pistes 11 et 13, figure 21 pistes 9 et 10), ont été bien différenciés par l'amplification de la région ITS2 (figure 20 pistes 12 et 14, figure 21 pistes 11 et 12).

De même, après amplification de ITS2, les deux espèces *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus flavus* ont été différenciées par TGGE (figure 20 pistes 16 et 18, figure 22 pistes 10 à 14).

Lorsque plusieurs souches d'une même espèce ont été analysées dans la région ITS2, il n'a pas été mis en évidence de variabilité intraspécifique en ce qui concerne *Aspergillus fumigatus* (figure 22 pistes 13 et 14) ou *Aspergillus flavus* (figure 22 pistes 10 à 12). Par contre, les deux souches de *Scedosporium apiospermum* étudiées ont eu un profil de migration différent (figure 22 pistes 18 et 19).

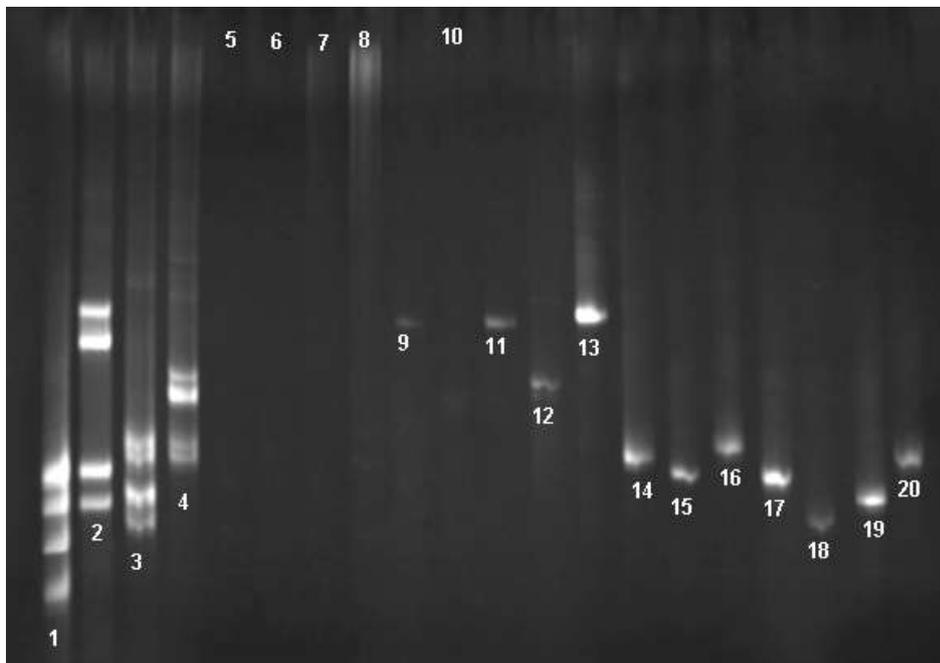


Figure 20. TGGE après amplification des régions ITS1 et ITS2. 1 : marqueur “*Aspergillus*”, GC-ITS1/ITS2 ; 2 : marqueur “mucoviscidose”, GC-ITS1/ITS2 ; 3 : marqueur “*Aspergillus*”, GC-ITS3/ITS4 ; 4 : marqueur “mucoviscidose”, GC-ITS3/ITS4 ; 5 : crachat 2027, GC-ITS1/ITS2 ; 6 : crachat 2027, GC-ITS3/ITS4 ; 7 : crachat 1603, GC-ITS1/ITS2 ; 8 : crachat 1603, GC-ITS3/ITS4 ; 9 : crachat 1933, GC-ITS1/ITS2 ; 10 : crachat 1933, GC-ITS3/ITS4 ; 11 : *Candida albicans* 66396, GC-ITS1/ITS2 ; 12 : *Candida albicans* 5875, GC-ITS3/ITS4 ; 13 : *Exophiala dermatitidis* 041747/1, GC-ITS1/ITS2 ; 14 : *Exophiala dermatitidis* 40504384/1, GC-ITS3/ITS4 ; 15 : *Aspergillus fumigatus* 40005719, GC-ITS1/ITS2 ; 16 : *Aspergillus fumigatus* 40005719, GC-ITS3/ITS4 ; 17 : *Aspergillus flavus* 40600868 , GC-ITS1/ITS2 ; 18 : *Aspergillus flavus* 40600868 , GC-ITS3/ITS4 ; 19 : *Aspergillus terreus* 40206202, GC-ITS1/ITS2 ; 20 : *Aspergillus terreus* 40206202, GC-ITS3/ITS4

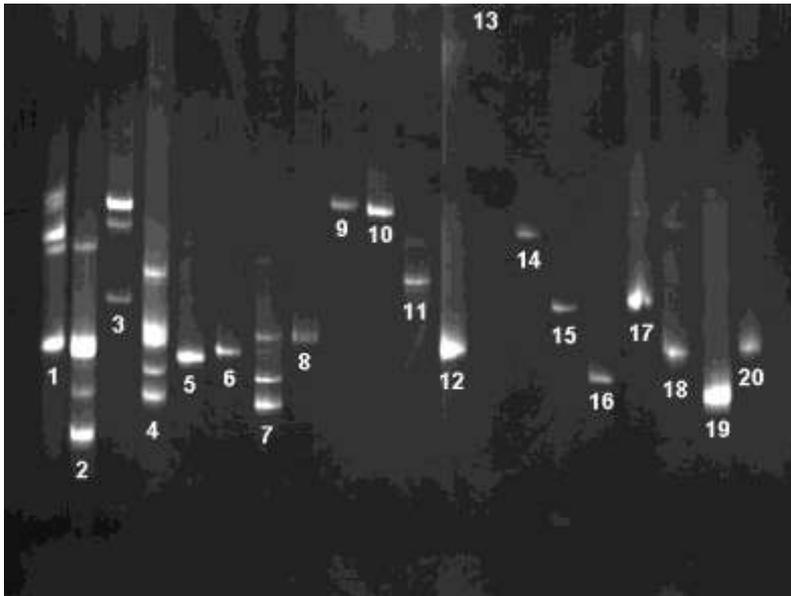


Figure 21. TGGE après amplification des régions ITS1 et ITS2. 1 : marqueur “Mucoviscidose”, GC-ITS1/ITS2 ; 2 : marqueur “*Aspergillus*”, GC-ITS1/ITS2 ; 3 : marqueur “Autre”, GC-ITS1/ITS2 ; 4 : marqueur “Différenciation” (*C. albicans*, *E. dermatitidis*, *A. fumigatus*, *A. flavus*), GC-ITS3/ITS4 ; 5 : *Aspergillus flavus*, GC-ITS1/ITS2 ; 6 : *Aspergillus fumigatus*, GC-ITS1/ITS2 ; 7 : *Aspergillus flavus*, GC-ITS3/ITS4 ; 8 : *Aspergillus fumigatus*, GC-ITS3/ITS4 ; 9 : *Candida albicans*, GC-ITS1/ITS2 ; 10 : *Exophiala dermatitidis*, GC-ITS1/ITS2 ; 11 : *Candida albicans*, GC-ITS3/ITS4 ; 12 : *Exophiala dermatitidis*, GC-ITS3/ITS4 ; 13 : *Scedosporium apiospermum*, GC-ITS1/ITS2 ; 14 : *Scedosporium prolificans*, GC-ITS1/ITS2 ; 15 : *Acrophialophora fuispora*, GC-ITS1/ITS2 ; 16 : *Aspergillus terreus*, GC-ITS1/ITS2 ; 17 : *Scedosporium apiospermum*, GC-ITS3/ITS4 ; 18 : *Scedosporium prolificans*, GC-ITS3/ITS4 ; 19 : *Acrophialophora fuispora*, GC-ITS3/ITS4 ; 20 : *Aspergillus terreus*, GC-ITS3/ITS4.

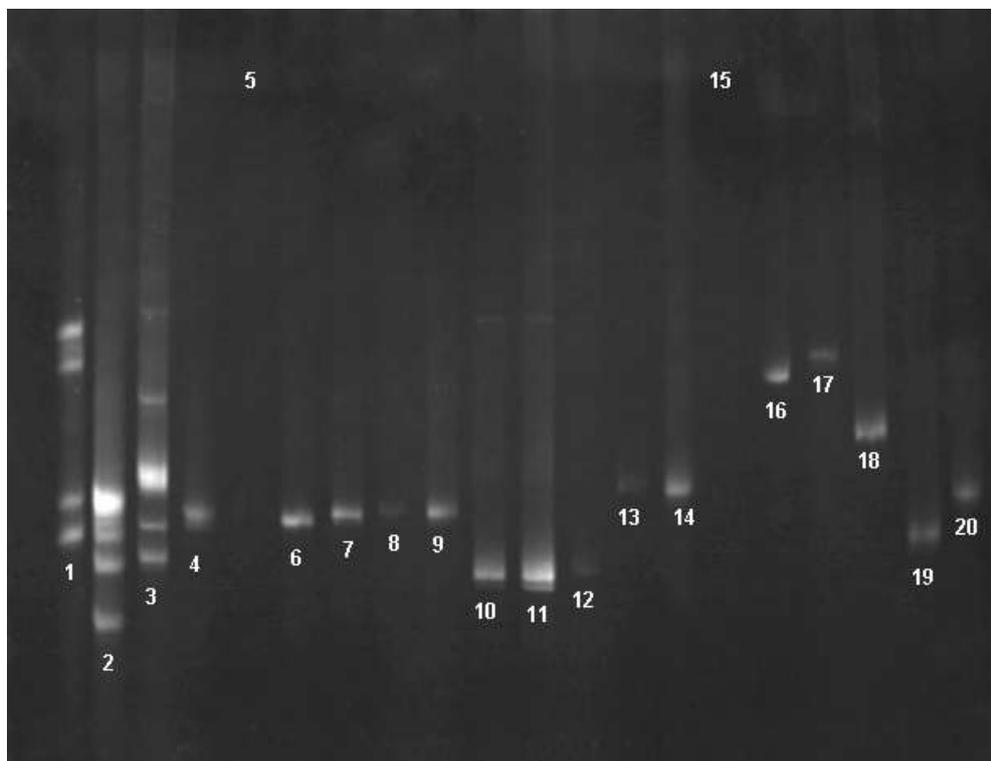


Figure 22. TGGE après amplification des régions ITS1 et ITS2. 1 : marqueur « Mucoviscidose », GC-ITS1/ITS2 ; 2 : marqueur « *Aspergillus* », GC-ITS1/ITS2 ; 3 : marqueur « différenciation », GC-ITS3/ITS4 ; 4 : *Aspergillus flavus* IHEM6741 ; 5 : *Aspergillus flavus* 4868 ; 6 : *Aspergillus flavus* 40600868 ; 7 : *Aspergillus fumigatus* 4002775 ; 8 : *Aspergillus fumigatus* 40502359 ; 9 : *Aspergillus fumigatus* 40010506 ; 10 : *Aspergillus flavus* 40600868 ; 11 : *Aspergillus flavus* 40601603 ; 12 : *Aspergillus flavus* 4868 ; 13 : *Aspergillus fumigatus* 40502359 ; 14 : *Aspergillus fumigatus* 40005719 ; 15 : *Scedosporium apiospermum* 40602683 ; 16 : *Scedosporium apiospermum* 40506325 ; 17 : *Scedosporium prolificans* 40500864 ; 18 : *Scedosporium apiospermum* 40506325 ; 19 : *Scedosporium apiospermum* 40603915 ; 20 : *Scedosporium prolificans* 40409298. Pistes 4 à 9 et 15 à 17 : GC-ITS1/ITS2. Pistes 10 à 14 et 18 à 20 : GC-ITS3/ITS4.

IV. Analyse de mélanges d'espèces par PCR-TGGE

L'objectif de notre étude étant d'individualiser les différentes espèces présentes dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose, des mélanges d'espèces ont été analysés.

IV.1. Mélange d'extraits d'ADN fongique

Les ADN extraits de quatre espèces fongiques (*C. albicans*, *A. terreus*, *A. fumigatus*, *S. apiospermum*) ont été mélangés avant réalisation de l'amplification génique. La réaction de PCR a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% (figure 7 pistes 7 et 16). Puis les amplifiats ont été analysés par TGGE. Seules 2 bandes ont pu être individualisées, l'une correspondant à *Aspergillus fumigatus* et l'autre à *Candida albicans* (figure 13 pistes 3 et 4).

IV.2. Mélange d'espèces de champignons

L'extraction de l'ADN a été réalisée à partir d'un mélange d'espèces de champignons, préalablement broyés en azote liquide (*S. apiospermum*, *A. fumigatus* et *A. terreus*). La réaction de PCR a été effectuée sur cet extrait, et vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% (résultats non montrés). Après réalisation de la TGGE, seules 2 bandes ont été visualisées, correspondant à *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus terreus* (figure 13 pistes 2 et 5).

IV.3. Mélange de champignons homogénéisés à l'aide d'un Potter

Des suspensions mères ont été réalisées à partir de quatre espèces fongiques (*Aspergillus fumigatus* 40502359, *Aspergillus flavus* 4868, *Aspergillus terreus* 3924, *Scedosporium apiospermum* 40603915). Après dilution et ensemencement sur boîte de Pétri, les colonies ont été comptées, permettant d'obtenir la concentration de chaque solution mère ; la concentration de la solution d'*Aspergillus fumigatus* était de 10^7 UFC/mL, celle d'*Aspergillus flavus* de 4.10^7 UFC/mL, celle d'*Aspergillus terreus* de 2.10^7 UFC/mL, et celle de *Scedosporium apiospermum* de 10^6 UFC/mL.

Plusieurs mélanges ont été préparés en associant 2, 3 ou 4 de ces solutions à 10^5 UFC chacune. Après extraction de l'ADN, les régions ITS1 et ITS2 ont été amplifiées ; l'électrophorèse de contrôle de la PCR a mis en évidence des bandes correspondant à l'amplification de la région ITS1 ou de la région ITS2 (données non présentées).

Les produits de PCR obtenus ont ensuite été analysés en TGGE (figure 23). Les champignons en culture pure ont été parfaitement détectés, à la fois en PCR GC-ITS1/ITS2 (pistes 9 à 12) et en PCR GC-ITS3/ITS4 (pistes 17 à 20). En ce qui concerne les mélanges, les résultats ont été variables suivant les espèces. En PCR GC-ITS1/ITS2, *Scedosporium apiospermum* n'a été détecté dans aucun mélange (pistes 6, 7, 8), alors que *Aspergillus fumigatus* a été correctement visualisé (pistes 5, 6, 7, en ce qui concerne la piste 8 il est impossible de trancher entre *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus flavus*) ; *Aspergillus terreus* a été identifié dans deux mélanges sur trois (pistes 5 et 7). En PCR GC-ITS3/ITS4, seul *Aspergillus fumigatus* a pu être correctement identifié (pistes 13 à 16).

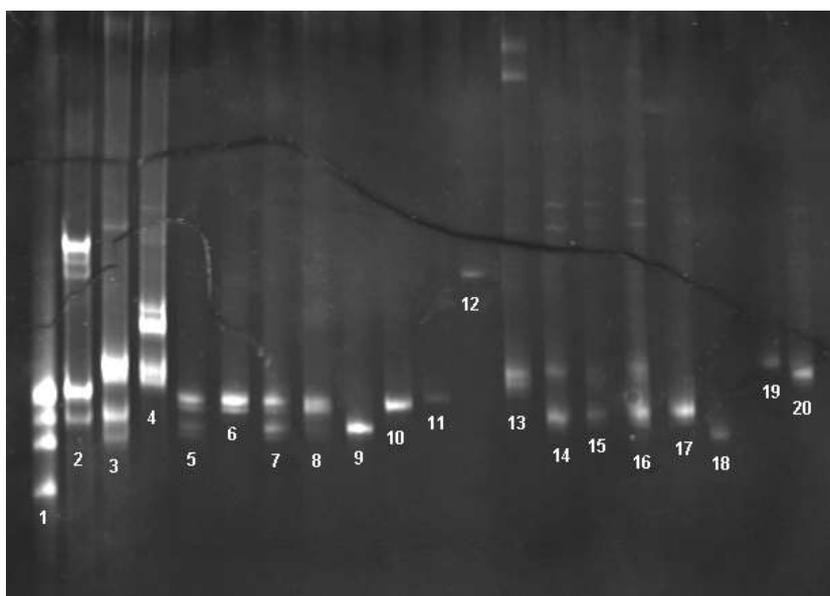


Figure 23 : analyse de mélanges d'espèces fongiques en PCR-TGGE. 1 : marqueur « *Aspergillus* », GC-ITS1/ITS2 ; 2 : marqueur « Mucoviscidose », GC-ITS1/ITS2 ; 3 : marqueur « *Aspergillus* », GC-ITS3/ITS4 ; 4 : marqueur « Mucoviscidose », GC-ITS3/ITS4 ; pistes 5 à 12 : GC-ITS1/ITS2 : 5 : mélange d'*Aspergillus terreus* et d'*Aspergillus fumigatus* ; 6 : mélange d'*Aspergillus fumigatus* et de *Scedosporium apiospermum* ; 7 : mélange d'*Aspergillus fumigatus*, d'*Aspergillus terreus* et de *Scedosporium apiospermum* ; 8 : mélange d'*Aspergillus fumigatus*, d'*Aspergillus terreus*, d'*Aspergillus flavus* et de *Scedosporium apiospermum* ; 9 : *Aspergillus terreus* 3924 ; 10 : *Aspergillus flavus* 4868 ; 11 : *Aspergillus fumigatus* 40502359 ; 12 : *Scedosporium apiospermum* 40603915 ; pistes 13 à 20 : GC-ITS3/ITS4 13 : mélange d'*Aspergillus terreus* et d'*Aspergillus fumigatus* ; 14 : mélange d'*Aspergillus fumigatus* et de *Scedosporium apiospermum* ; 15 : mélange d'*Aspergillus fumigatus*, d'*Aspergillus terreus* et de *Scedosporium apiospermum* ; 16 : mélange d'*Aspergillus fumigatus*, d'*Aspergillus terreus*, d'*Aspergillus flavus* et de *Scedosporium apiospermum* ; 17 : *Aspergillus terreus* 3924 ; 18 : *Aspergillus flavus* 4868 ; 19 : *Aspergillus fumigatus* 40502359 ; 20 : *Scedosporium apiospermum* 40603915.

V. Application de la PCR-TGGE à l'analyse de crachats de patients atteints de mucoviscidose

V.1. Extraction et amplification de l'ADN à partir des crachats

La méthode développée a été testée sur des prélèvements biologiques issus de malades suivis au Centre Hospitalier Universitaire d'Angers (la liste des prélèvements d'expectoration utilisés est présentée en annexe 6). L'extraction de l'ADN a été réalisée soit directement, pour les crachats les plus fluides, soit après une phase de broyage en azote liquide, pour les crachats les plus épais. La région ITS1 de l'ADN ribosomal a ensuite été amplifiée en

utilisant dans un premier temps les amorces ITS1 et ITS2, puis dans un second temps les amorces GC-ITS1 et ITS2.

La figure 24 présente les résultats obtenus sur gel d'agarose à 2% après amplification de l'ADN en utilisant les amorces ITS1 et ITS2 ; une ou plusieurs bandes, correspondant à la région ITS1 de l'ADN fongique, ont été observées lorsque l'extraction a été réalisée sur des crachats dont la culture était positive.

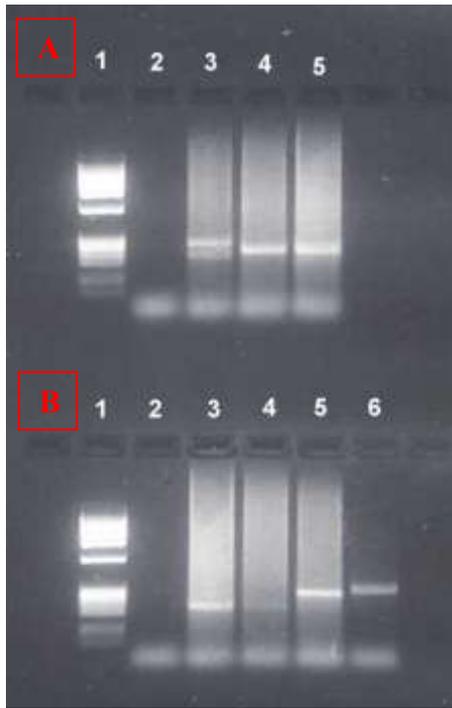


Figure 24. Amplification de la région ITS1 (amorces ITS1-ITS2) à partir d'ADN extrait de crachats. Gel d'agarose à 2%.

A. 1 : marqueur IX ; 2 : témoin négatif ; 3 : crachat 6194 (culture positive à *Candida albicans*) ; 4 : crachat 8030 (culture positive à *Candida albicans*, *Scedosporium prolificans*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus fumigatus*) ; 5 : crachat 2732 (culture positive à *C. albicans* et *A. fumigatus*).

B. 1 : marqueur IX ; 2 : témoin négatif ; 3 : crachat 2582 (culture positive à *C. albicans* et *A. fumigatus*) ; 4 : crachat 3502 (culture positive à *C. albicans* et *A. fumigatus*) ; 5 : crachat 1821 (culture positive à *C. albicans*, *A. fumigatus* et *A. terreus*) ; 6 : crachat 3942 (culture positive à *Pichia etchellsii*, *Geotrichum* sp., *Aspergillus versicolor* et *Trichoderma* sp.)

La figure 25 présente les résultats obtenus sur gel d'agarose à 2% après amplification de l'ADN en utilisant les amorces GC-ITS1 et ITS2 ; une bande ITS1 n'a été observée que dans 2 puits (5 et 7), alors que 4 des crachats analysés étaient positifs en culture. Ces résultats se sont répétés, l'addition du GC clamp semblant diminuer nettement la sensibilité de la PCR.

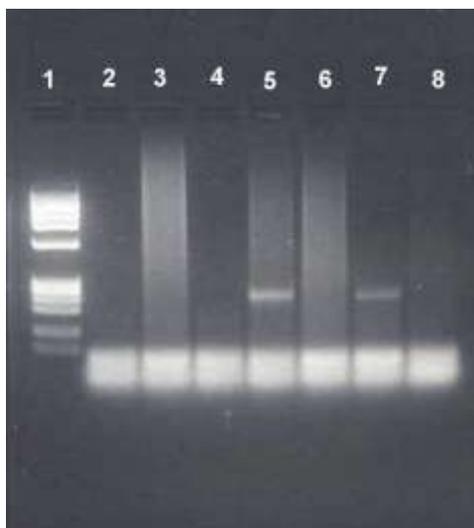


Figure 25. Amplification de la région ITS1 (amorces GCITS1-ITS2) à partir d'ADN extrait de crachats. Gel d'agarose à 2%. 1 : marqueur IX ; 2 : témoin négatif ; 3 : crachat 6194 (culture positive à *C. albicans*) ; 4 : crachat 5911 (culture négative) ; 5 : crachat 4897 (culture positive à *C. albicans*) ; 6 : crachat 1603 (culture positive à *C. albicans*, *A. fumigatus*, *A. flavus* et *A. terreus*) ; 7 : crachat 1933 (culture positive à *C. albicans*) ; 8 : crachat 2098 (culture négative)

V.2. Optimisation de la réaction de PCR

V.2.1 Température d'hybridation des amorces

Dans un premier temps, pour tenter d'optimiser la PCR, la température d'hybridation (initialement de 62°C) a été modifiée. Ainsi, l'ADN extrait à partir de deux souches de champignons filamenteux (une souche d'*Aspergillus flavus* et une souche de *Scedosporium apiospermum*) a été amplifié à l'aide des amorces GC-ITS1 et ITS2, en réalisant un gradient de température, de 60 à 70,1°C. Les résultats, présentés dans la figure 26, montrent une meilleure amplification pour une température d'hybridation de 60°C. Cette température d'hybridation a été retenue pour les amplifications suivantes. La PCR a donc été réalisée sur d'autres extraits d'ADN issus de crachats; mais des résultats similaires ont été obtenus, la sensibilité de la technique diminuant très nettement avec l'addition du GC-clamp (données non présentées).

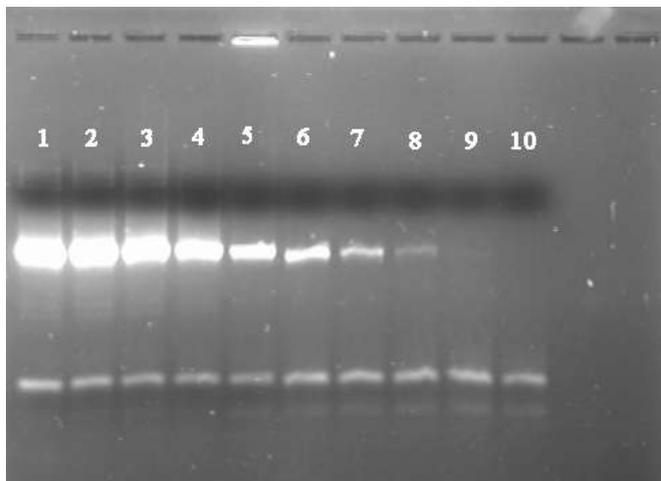


Figure 26. PCR GC-ITS1/ITS2 en utilisant un gradient de température d'hybridation.
 Pistes 1 à 5 : *Aspergillus flavus* (1 : 60°C ; 2 : 62,9°C ; 3 : 65,5°C ; 4 : 68,4°C ; 5 : 70,1°C).
 Pistes 6 à 10 : *Scedosporium apiospermum* (6 : 60°C ; 7 : 62,9°C ; 8 : 65,5°C ; 9 : 68,4°C ;
 10 : 70,1°C).

V.2.2. Concentration en MgCl₂

Dans un second temps, une gamme de concentration de chlorure de magnésium (MgCl₂) dans le mélange réactionnel a été réalisée, en conservant une température d'hybridation de 60°C. L'ADN extrait à partir d'une souche d'*Aspergillus flavus* et d'un crachat dont la culture était positive à *C. albicans*, *A. fumigatus*, *A. flavus* et *A. terreus* a ainsi été amplifié, avec les deux couples d'amorces GC-ITS1/ITS2 et GC-ITS3/ITS4 (figure 27). La concentration de MgCl₂ n'a pas eu d'influence sur l'amplification de la souche d'*Aspergillus flavus* ; par contre, l'amplification de l'ADN extrait du crachat a été meilleure pour une concentration de MgCl₂ de 1 ou 1,5 mmol/L, ce qui correspondait aux paramètres initiaux du mélange réactionnel.

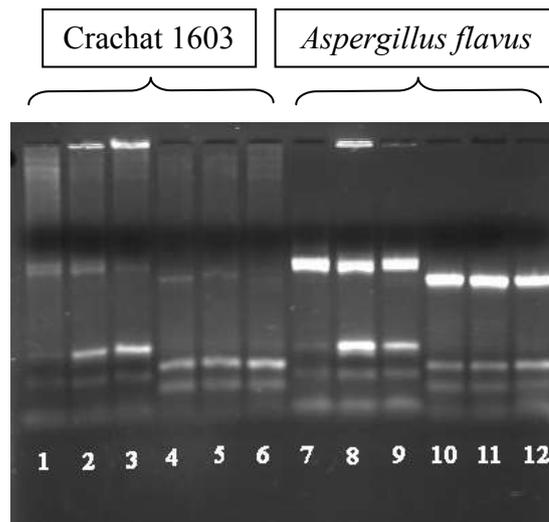


Figure 27. PCR GC-ITS1/ITS2 et GC-ITS3/ITS4 en utilisant un gradient de MgCl₂. Pistes 1 à 6 : crachat 1603 (culture positive à *C. albicans*, *A. fumigatus*, *A. flavus* et *A. terreus*). Pistes 7 à 12 : *Aspergillus flavus*. Pistes 1, 2, 3, 7, 8, 9: amorces GC-ITS3/ITS4. Pistes 4, 5, 6, 10, 11, 12: amorces GC-ITS1/ITS2. Pistes 1, 4, 7 et 10: MgCl₂ à 1 mM. Pistes 2, 5, 8 et 11 : MgCl₂ à 1,5 mM. Pistes 3, 6, 9 et 12: MgCl₂ à 2,5 mM.

V.2.3. Semi-nested PCR

Dans un troisième temps, une semi-nested PCR ou PCR nichée a été réalisée. L'ADN extrait à partir de crachats a été amplifié une première fois par le couple d'amorces ITS1/ITS2, puis les produits de PCR obtenus ont été à nouveau amplifiés en utilisant le couple d'amorces GC-ITS1/ITS2. Les résultats sont présentés dans la figure 28. Des bandes correspondant à l'amplification de l'ADN des crachats dans la région ITS1 sont visualisées en gel d'agarose à 2% sur les pistes 3, 4, 5, 6 et 8, correspondant à des crachats positifs en culture ; aucune bande n'est visualisée sur la piste 7, correspondant à un crachat stérile en culture.

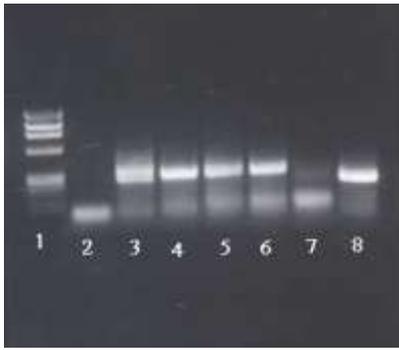


Figure 28. Amplification de l'ADN extrait de crachats par semi-nested PCR. 1 : marqueur de taille ; 2 : témoin négatif ; 3 : crachat 6194 (culture positive à *Candida albicans*) ; 4 : crachat 8030 (culture positive à *Aspergillus flavus*, *Candida albicans*, *Scedosporium prolificans* et *Aspergillus fumigatus*) ; 5 : crachat 2732 (culture positive à *Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus*) ; 6 : crachat 6071 (culture positive à *Aspergillus terreus*) ; 7 : crachat 5911 (culture négative) ; 8 : crachat 4897 (culture positive à *Candida albicans*).

V.3. PCR-TGGE à partir d'extraits de crachats

Les résultats obtenus après analyse en PCR-TGGE des ADN extraits à partir de prélèvements d'expectoration de patients atteints de mucoviscidose sont présentés dans la figure 29. Le GC-clamp diminuant la sensibilité de la PCR, certains prélèvements avaient été analysés après PCR avec le couple d'amorces ITS1/ITS2 (pistes 3 à 6) ; cependant la migration est aléatoire, rendant impossible toute identification. *Candida albicans* a été correctement identifié dans tous les prélèvements dont la culture était positive (pistes 7, 8, 9, 13, 14) sauf un (piste 12) ; par ailleurs la semi-nested PCR donne une bande beaucoup plus intense que la simple PCR lorsque le même échantillon est amplifié par ces deux méthodes (pistes 8 et 9). L'analyse du crachat 6071 (piste 11) permet de retrouver une bande correspondant à *Aspergillus terreus* (qui avait été identifié en culture), ainsi qu'une deuxième bande non identifiée. L'analyse du crachat 8030 (piste 13) permet d'identifier deux bandes, l'une correspondant à *Candida albicans*, et l'autre pouvant correspondre à *Aspergillus fumigatus* et/ou à *Aspergillus flavus*.

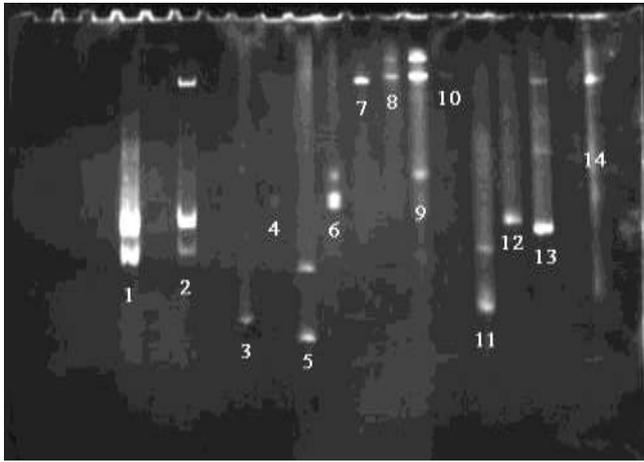


Figure 29. Analyse de crachats en TGGE (51°C-70,5°C, incrément 1°/h, 60V, 20h). 1 : marqueur « *Aspergillus* » ; 2 : marqueur « Mucoviscidose » ; Pistes 3 à 6 PCR ITS1/ITS2 sans GC clamp (3 : crachat 3942, 4 : crachat 5911, 5 : crachat 6071, 6: crachat 4897) ; Pistes 7 et 8 PCR GC-ITS1/ITS2 (7: crachat 1933, 8 : crachat 4897) ; pistes 9 à 14 : PCR ITS1/ITS2 puis GCITS1/ITS2 (9 : crachat 4897, 10 : crachat 5911, 11 : crachat 6071, 12 : crachat 2732, 13 : crachat 8030, 14 : crachat 6194).

[Résultats des cultures des crachats analysés : 3942 positif pour *Pichia etchellsii*, *Geotrichum* sp., *Aspergillus versicolor* et *Trichoderma* sp., 5911 négatif, 6071 positif pour *A. terreus*, 4897 positif pour *C. albicans*, 1933 positif pour *C. albicans*, 2732 positif pour *C. albicans* et *A. fumigatus*, 8030 positif pour *C. albicans*, *A. flavus*, *S. prolificans* et *A. fumigatus*, 6194 positif pour *C. albicans*]

DISCUSSION – PERSPECTIVES

Ce travail a consisté à mettre au point une méthode de PCR-TGGE basée sur l'amplification de la région ITS1 de diverses espèces fongiques rencontrées dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose. Ces patients sont souvent colonisés simultanément par des champignons et des bactéries. Ainsi, l'amorce ITS1 (modifiée par l'addition d'un GC-clamp) et l'amorce ITS2, utilisées pour la PCR-TGGE, ont permis d'amplifier toutes les espèces fongiques étudiées, ce qui a été vérifié par une électrophorèse sur gel d'agarose. Par contre, l'ADN des trois espèces bactériennes choisies en raison de leur particulière fréquence dans la mucoviscidose [3, 7] n'a pas été amplifié, et n'a donné lieu à aucune migration sur gel d'agarose ou en TGGE.

Pour la plupart des espèces fongiques étudiées, plusieurs souches ont été analysées en PCR-TGGE. Hormis pour *Paecilomyces variotii*, où une des trois souches avait un profil de migration différent des deux autres, aucune variabilité intraspécifique n'a été observée. Ces résultats concordent avec de nombreuses études qui ont montré une forte homologie des séquences ITS1 entre différentes souches d'une même espèce [30, 32-35].

Par ailleurs, en amplifiant la région ITS2, des problèmes de variabilité intraspécifiques sont apparus pour d'autres espèces, notamment *Scedosporium apiospermum*.

Cette variabilité pouvant toutefois être due à une erreur d'identification des souches de champignons utilisées, il faudrait pour confirmer le phénomène récupérer dans le gel les bandes après PCR-TGGE et effectuer le séquençage de l'ADN, afin de connaître avec certitude la nature de l'espèce fongique.

Certaines des espèces fongiques analysées ont des profils de migration identiques, notamment *Aspergillus flavus* et *Aspergillus fumigatus*, *Paecilomyces variotii* et *Aspergillus terreus*, *Exophiala dermatitidis* et *Candida albicans*. Ce phénomène n'est pas en rapport avec une similitude trop importante de leurs séquences ITS1, comme l'alignement de séquences réalisé sur Clustalw (Infobiogen) l'a démontré (données non présentées). D'autre part, la TGGE peut parfaitement différencier des séquences qui ne diffèrent que d'une base, comme cela a pu être vérifié à l'aide des réactifs de contrôle fournis par Bio-Rad.

L'analogie de migration est en partie due au grand nombre d'espèces différentes qui ont été analysées. En effet, les régions ITS1 de ces espèces ont des tailles et des séquences très différentes, ce qui est à la base de leur utilisation en identification moléculaire des champignons. Cependant, elles ont également des comportements très différents lorsqu'elles

sont soumises à un gradient de température, et leur résistance à la dénaturation est très variable. Ceci oblige à définir un gradient de température important qui permettra d'analyser les espèces les plus sensibles à la dénaturation comme les plus résistantes. Or, le comportement de chaque séquence dans le gradient de température n'est pas homogène, certaines parties de la séquence se dénaturant à des températures plus basses que d'autres ; donc pour une température donnée, la séquence d'une espèce fongique sera plus dénaturée et migrera moins vite qu'une autre, mais la situation pourra s'inverser avec l'élévation de la température. Ainsi, l'analyse des courbes de dénaturation produites par MacMelt™ pour *Aspergillus flavus* et *Aspergillus fumigatus*, montre qu'à 72°C *A. fumigatus* est plus dénaturé qu'*A. flavus* et migre donc moins vite, alors que c'est l'inverse à 82°C ; ceci peut expliquer leur proximité en fin de migration. En revanche, la TGGE sépare parfaitement *Candida dubliniensis* et *Candida albicans* malgré leurs analogies de séquences, les courbes de dénaturation ne se séparant que dans une seule zone.

La vitesse de migration dépend non seulement de la dénaturation mais également de la taille de la séquence. Les différences de taille parfois importantes qui peuvent exister entre les régions ITS1 de certaines espèces sont à prendre en compte pour comprendre les similitudes de profils de migration entre ces espèces ; ainsi, la séquence de *Candida albicans* est plus courte que celle d'*Exophiala dermatitidis* de 60 paires de bases, et *C. albicans* résiste moins bien à la dénaturation qu'*E. dermatitidis* (leurs courbes de dénaturation sont présentées en annexe 7), ce qui explique peut-être pourquoi ces espèces ont le même profil de migration.

Il est indispensable de parvenir à améliorer la séparation des espèces fongiques afin que la PCR-TGGE puisse détecter les colonisations fongiques dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose. Une des solutions pour contourner ce problème de migration identique consiste à réduire le gradient de température afin de travailler dans une zone thermique où les deux courbes sont bien séparées, c'est-à-dire où la séquence de l'une des espèces est plus dénaturée que l'autre, et de diminuer l'incrément pour augmenter la durée de migration [45]; ainsi, un gradient de température entre 56°C et 59°C (pour un gel à 7M d'urée) avec un incrément de 0,7°C/h permet de bien différencier *Aspergillus flavus* et *Aspergillus fumigatus* (figure 19).

Pour pouvoir individualiser toutes les espèces fongiques rencontrées dans la mucoviscidose, il faudrait alors réaliser deux TGGE. La première utiliserait un gradient de température large permettant de détecter toutes les espèces ; la deuxième ne serait effectuée qu'en cas de profil de migration pouvant correspondre à plusieurs espèces fongiques, et utiliserait un gradient de température réduit destiné à différencier ces espèces. Cette solution est efficace, mais présente l'inconvénient d'être plus lourde.

Pour améliorer la séparation des espèces fongiques, d'autres méthodes pourront être envisagées, notamment par le biais de modifications de paramètres de la PCR-TGGE. En effet, la difficulté de séparation de certaines espèces est récurrente dans la littérature, et diverses modifications de paramètres de PCR-TGGE ont été proposées pour optimiser la technique [45] : réduction de taille du fragment de PCR, diminution du pourcentage d'acrylamide dans le gel, augmentation du voltage.

Une autre possibilité consiste à changer d'ADN cible, la région ITS1 n'étant peut-être pas la plus adaptée à l'analyse par PCR-TGGE. Ainsi, la région ITS2 a été amplifiée en utilisant les amorces universelles ITS3 et ITS4 [31] avec ajout d'un GC-clamp en 5' de ITS3 ; en effet, cette région a démontré moins de variabilité interspécifique que la région ITS1 chez *Aspergillus* spp [34], et a permis d'obtenir un meilleur taux d'identification chez *Candida* spp [31]. Les paramètres de TGGE utilisés ont été les mêmes que pour l'étude de la région ITS1, l'analyse des séquences ITS2 à l'aide du logiciel MacMelt™ ayant montré que l'on pouvait utiliser les mêmes températures initiale et finale (figure 6). La PCR-TGGE appliquée à la région ITS2 a permis de séparer *Candida albicans* et *Exophiala dermatitidis*, ainsi qu'*Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus flavus* (figures 20 à 22). Cette solution présente l'avantage de ne nécessiter qu'une seule manipulation, les séquences ITS1 et ITS2 pouvant être analysées avec les mêmes paramètres de TGGE. Toutefois, il semble persister un problème de variabilité intraspécifique pour certaines espèces fongiques ; ainsi, les deux souches de *Scedosporium apiospermum* étudiées ont eu des profils de migration différents (figure 22, pistes 18 et 19).

Un autre région candidate pour tenter de différencier les espèces ayant le même profil de migration pourrait être la région D1-D2 (située à l'extrémité 5' du gène codant pour la grande sous-unité ribosomale 28S) qui est très conservée chez les champignons, avec notamment des identités de séquences de 91,9 à 99,6% chez *Aspergillus* spp [46]. Cette région a notamment été utilisée en PCR-TGGE ou en PCR-DGGE pour étudier des populations de levures [39, 47, 48].

On pourrait également envisager de remplacer la TGGE par une autre technique, émergente en microbiologie pour l'étude de la diversité de populations au sein d'un même échantillon, comme la DHPLC (Chromatographie liquide à haute pression en condition dénaturante). Cette technique permet de détecter des polymorphismes dans un fragment d'ADN double brin en séparant les homoduplexes et les hétéroduplexes, qui sont séparés dans une colonne de chromatographie en conditions dénaturantes. La PCR-DHPLC a déjà été utilisée pour l'identification de *Candida* spp., après amplification de la région ITS2, chaque espèce analysée donnant lieu à un pic spécifique [49] ; les résultats ont été reproductibles, à la fois pour des extraits d'ADN issus de souches pures ou de prélèvements biologiques.

Des doubles bandes ont été observées pour *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* et *C. parapsilosis* sur plusieurs TGGE. Malgré cela, l'identification des différentes espèces de *Candida* n'a pas posé de problème, en dehors de *C. parapsilosis* et *C. tropicalis*, ces 2 espèces n'étant toutefois pas retrouvées dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose. Ce phénomène de doubles bandes est souvent cité dans la littérature, sans qu'aucune explication univoque n'ait pu être apportée. Il est en rapport avec des anomalies de la réaction d'amplification, et pourrait être résolu en prolongeant le cycle d'élongation finale à 72°C pendant 30 minutes [45, 50].

Compte tenu de la fréquence de la colonisation de l'arbre bronchique des patients atteints de mucoviscidose par plusieurs espèces fongiques, il est nécessaire de pouvoir les détecter simultanément. Nous avons donc appliqué la PCR-TGGE à des mélanges d'espèces fongiques, préparés selon plusieurs protocoles. Seules deux espèces ont pu être détectées en PCR-TGGE à partir du mélange d'extraits d'ADN de quatre espèces fongiques ; une optimisation des paramètres de la réaction d'amplification serait nécessaire. Les PCR-TGGE qui ont porté sur des mélanges de trois espèces fongiques avant extraction de l'ADN n'ont permis de repérer que deux des trois espèces présentes. Ce défaut de détection pourrait provenir d'un problème au niveau de la réaction d'extraction de l'ADN, qui a été réalisée sur un mélange de champignons broyés ; la quantité de poudre fongique à utiliser pour chaque espèce n'ayant pas été standardisée, les différentes espèces n'étaient probablement pas présentes dans les mêmes proportions lors de la réaction d'extraction. Une optimisation de l'extraction de l'ADN a donc été réalisée, en préparant une suspension quantifiée de mycélium pour chaque espèce, puis en mélangeant ces suspensions dans les mêmes proportions. Là encore, les résultats ont été variables, une espèce fongique (*Scedosporium apiospermum*) n'étant détectée dans aucun mélange, une autre (*Aspergillus fumigatus*) étant correctement visualisée à la fois en PCR GC-ITS1/ITS2 et en PCR GC-ITS3/ITS4. Ces résultats témoignent probablement du manque de sensibilité de la réaction de PCR.

L'objectif de l'étude étant de permettre la détection des espèces fongiques présentes dans les expectorations des patients atteints de mucoviscidose, la méthode de PCR-TGGE a été appliquée à des prélèvements biologiques issus de patients suivis au Centre Hospitalier Universitaire d'Angers. Tous ces prélèvements avaient été préalablement analysés selon les techniques classiques de mycologie, et notamment ensemencés sur plusieurs milieux de culture.

L'extraction de l'ADN à partir des crachats a nécessité pour certains d'entre eux un broyage préalable en azote liquide ; d'autres ont pu être traités directement. L'électrophorèse sur gel d'agarose, réalisée après amplification des extraits d'ADN à l'aide du couple d'amorces ITS1/ITS2, a mis en évidence une bande correspondant à la région ITS1 amplifiée, pour tous les prélèvements dont la culture était positive. Cependant, l'ajout du GC clamp a nettement diminué l'amplification de l'ADN, l'électrophorèse sur gel d'agarose et la TGGE ne mettant aucune bande en évidence pour de nombreux échantillons.

Ce problème de diminution de la sensibilité de la PCR lorsque l'on ajoute un GC clamp a été décrit auparavant, dans une étude utilisant la TGGE pour analyser la diversité bactérienne dans l'eau [51]. Afin de tenter d'améliorer la sensibilité de la technique, des modifications ont été apportées au protocole de PCR, en jouant notamment sur la température d'hybridation des amorces et sur la concentration de MgCl₂ ; toutefois, ces changements n'ont pas été contributifs.

Une semi-nested PCR a ensuite été réalisée. La nested PCR correspond à la succession de deux amplifications, la première étant réalisée avec des amorces externes qui bornent la séquence à amplifier, la seconde avec des amorces internes situées à l'intérieur de la zone amplifiée. Cette technique permet une amplification plus importante et plus spécifique que la PCR classique [52]. La semi-nested PCR est une nested-PCR dans laquelle une des amorces est commune aux deux amplifications. L'ADN extrait a d'abord été amplifié avec le couple d'amorces ITS1/ITS2, puis les amplicons ont été réamplifiés avec les amorces GC-ITS1/ITS2. Les résultats de l'électrophorèse sur gel d'agarose ont été nettement meilleurs avec cette technique, une bande correspondant à la région ITS1 étant visualisée pour tous les crachats dont la culture était positive, mais pas pour celui qui était resté stérile. La TGGE a également donné de meilleurs résultats avec cette technique, sans toutefois permettre d'identifier la totalité des espèces fongiques qui avaient été détectées par la culture.

Les résultats obtenus avec la semi-nested PCR sont encourageants, mais pourraient peut-être être encore améliorés par l'utilisation d'une vraie nested PCR, en amplifiant dans un premier temps une zone large comportant la majeure partie de l'ADN ribosomal. Ainsi, les amorces V9D et LS266, qui amplifient l'ensemble du complexe Internal Transcribed Spacer (figure 30, [53], seront utilisées pour la première amplification. Puis une deuxième amplification sera réalisée à l'aide des amorces GC-ITS1/ITS2 ou GC-ITS3/ITS4 afin d'amplifier spécifiquement les régions ITS1 ou ITS2. L'analyse en parallèle de ces deux régions permettra ainsi de séparer les différentes espèces fongiques dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose.

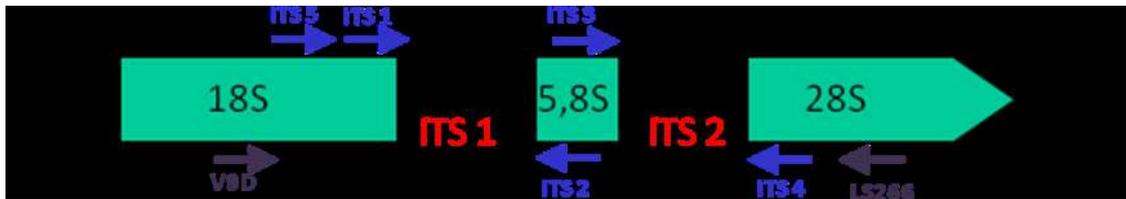


Figure 30. Représentation schématique de l'ADN ribosomal et positions des amorces utilisables ([53])

Utilisée sur des champignons en culture pure, la PCR-TGGE a permis d'identifier la plupart des espèces fongiques qui peuvent être rencontrées dans la mucoviscidose, avec une bonne reproductibilité. D'autres espèces ont été plus difficiles à différencier, nécessitant soit une modification des paramètres de la TGGE, soit un changement d'ADN cible. Appliquée directement aux expectorations de patients, la PCR-TGGE a permis d'identifier plusieurs espèces fongiques, sans toutefois détecter tous les champignons retrouvés par la culture. Malgré ces difficultés, la PCR-TGGE pourrait être d'un grand intérêt dans le diagnostic des colonisations fongiques chez les patients atteints de mucoviscidose, en permettant de s'affranchir des méthodes mycologiques classiques. Des améliorations restent toutefois à apporter, passant notamment par la mise au point d'une nested PCR pour l'amplification de l'ADN extrait des prélèvements d'expectoration, avant de pouvoir envisager l'utilisation de cette technique en routine et sa comparaison avec la culture.

Annexe 1 : Souches de levures et de champignons filamenteux étudiées.

Espèce	Numéro de souche	Type de prélèvement	Ville d'origine	Conditions de culture
<i>Candida albicans</i>	5875	ND	ND	37°C, 24 à 48h
<i>Candida tropicalis</i>	5437	ND	ND	37°C, 24 à 48h
<i>Candida glabrata</i>	5511	ND	ND	37°C, 24 à 48h
<i>Candida parapsilosis</i>	911675	ND	ND	37°C, 24 à 48h
<i>Candida dubliniensis</i>	98258	ND	ND	37°C, 24 à 48h
<i>Exophiala dermatitidis</i>	40504384/1	Expectoration	Angers	25°C, 2 à 3j
<i>Exophiala dermatitidis</i>	041747/1	Expectoration	Angers	25°C, 2 à 3j
<i>Aspergillus fumigatus</i>	40005719	Expectoration de mucoviscidose	Angers	37°C, 48h
<i>Aspergillus fumigatus</i>	40007764	Expectoration de mucoviscidose	Angers	37°C, 48h
<i>Aspergillus fumigatus</i>	40010506	Expectoration de mucoviscidose	Angers	37°C, 48h
<i>Aspergillus fumigatus</i>	40102597	Expectoration	Angers	37°C, 48h
<i>Aspergillus fumigatus</i>	40602775	Expectoration de mucoviscidose	Angers	37°C, 48h
<i>Aspergillus terreus</i>	40407483	Expectoration de mucoviscidose	Angers	25°C, 3 à 5j
<i>Aspergillus terreus</i>	40206202	Expectoration	Angers	25°C, 3 à 5j
<i>Aspergillus terreus</i>	40601868	Expectoration	Angers	25°C, 3 à 5j
<i>Aspergillus terreus</i>	40601603	ND	Angers	25°C, 3 à 5j
<i>Aspergillus nidulans</i>	40007599	Expectoration	Angers	25°C, 3 à 5j
<i>Aspergillus flavus</i>	IHEM6741	ND	Nantes	37°C, 2 à 3j
<i>Aspergillus flavus</i>	40600868	Expectoration	Angers	37°C, 2 à 3j
<i>Aspergillus flavus</i>	40600868	Expectoration	Angers	37°C, 2 à 3j
<i>Aspergillus flavus</i>	40601603	ND	Angers	37°C, 2 à 3j
<i>Aspergillus niger</i>	40204744	Prélèvement d'oreille	Angers	37°C, 2 à 3j
<i>Aspergillus niger</i>	49903838	ND	ND	37°C, 2 à 3j
<i>Aspergillus niger</i>	IHEM17033	ND	ND	37°C, 2 à 3j

Espèce	Numéro de souche	Type de prélèvement	Ville d'origine	Conditions de culture
<i>Aspergillus niger</i>	IHEM5077	Prélèvement d'oreille	Belgique (Ghent)	37°C, 2 à 3j
<i>Scedosporium apiospermum</i>	40506325	Expectoration de mucoviscidose	Angers	37°C, 1 à 2 sem, actidione
<i>Scedosporium apiospermum</i>	40602695	Expectoration	Angers	37°C, 1 à 2 sem, actidione
<i>Scedosporium apiospermum</i>	40602683	Expectoration	Angers	37°C, 1 à 2 sem, actidione
<i>Scedosporium prolificans</i>	40509180	ND	ND	25°C, 1 sem
<i>Scedosporium prolificans</i>	40500864	Prélèvement oculaire de cheval	ND	25°C, 1 sem
<i>Penicillium emersonii</i>	49708718	Expectoration de mucoviscidose	Giens	37°C, 1 sem
<i>Penicillium emersonii</i>	49709694	Expectoration de mucoviscidose	Giens	37°C, 1 sem
<i>Penicillium emersonii</i>	49709968	Expectoration de mucoviscidose	Giens	37°C, 1 sem
<i>Acrophialophora fusispora</i>	IHEM19209	Expectoration de mucoviscidose	Hôpital Necker - Paris	25°C, 1 sem
<i>Paecilomyces variotii</i>	LMA904820	Prélèvement vaginal	ND	25°C, 1 sem
<i>Paecilomyces variotii</i>	LMA911262	Prélèvement de pied	Angers	25°C, 1 sem
<i>Paecilomyces variotii</i>	IHEM16627	Prélèvement de surface (mur)	Montfermeil	25°C, 1 sem
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	IHEM10102	Ulcère de jambe	Belgique (Bruxelles)	25°C, 1 sem
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	IHEM19942	Expectoration mucoviscidose	Paris (Necker)	25°C, 1 sem
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	LMA91307	ND	ND	25°C, 1 sem

ND : non déterminé

Col. : collection

Annexe 2. Milieux de culture utilisés

Milieu YPDA

- Chloramphénicol 0.5 g (Cooper Rhône Poulenc Rorer)
- Yeast-extract 5 g (Biokar diagnostics A1202HA)
- Peptone 10 g (VWR international Prolabo)
- Glucose 20 g
- Agar-agar 20 g (Biokar diagnostics A1012HA)
- Eau 1 L
- pH = 6.5
- Stérilisation par autoclavage 20 minutes à 115°C

Milieu de culture utilisé pour *Scedosporium apiospermum* : milieu YPDA additionné d'une solution d'actidione (0,5 g/L)

Solution d'actidione :

- Actidione 0.5 g (Sigma) [actidione = cycloheximide]
- Acétone 3 ml
- Eau distillée 20 ml

Milieu liquide YPD

- Chloramphénicol 0.5 g
- Yeast-extract 5 g
- Peptone 10 g
- Glucose 20 g
- Eau distillée 1 L
- pH = 6.5
- Stérilisation par autoclavage 20 minutes à 115°C

Annexe 3. Tailles, Tm (logiciel DSI_oligoTM, <http://www.dsi.univ-paris5.fr/bio2/OligoTM.html>) et séquences des régions ITS1 des espèces fongiques étudiées (GenBank [54]).

Aspergillus fumigatus (AF453896)

Taille : 184pb

Tm : 98.1°C

Séquence :

ccgagtgagggccctctgggtccaacctcccaccctgtctatctgacctgttcttcggcgggcccgccgttcgacggccgcccggaggccttgccccggggcccgcccgcgcccgccgaagacccaacatgaacgctgttctgaaagtatgcagctctgagttgattatcgta atcagta

Aspergillus flavus (AF453891)

Taille : 181pb

Tm : 92.7°C

Séquence :

ccgagtgtagggtcctagcgagcccaacctcccaccctgttactgtaccttagttgcttcggcgggcccgccattcatggccgcccggggctctagccccggggcccgcccgcgcccgccggagacaccacgaactctgtctgatctagtgaaagtctgagttgattatcgcaatca gttta

Aspergillus niger (AF453901)

Taille : 185 pb

Tm : 98.3°C

Séquence :

ccgagtgcgggtcctttgggccaacctcccaccctgtctattgtacctgttcttcggcgggcccgccgcttctcggccgcccggggggcgctctgcccccgggcccgctgcccgccggagacccaacacgaactctgtgaaagctgcagctctgagttgattgaatga atcagta

Aspergillus nidulans (AJ557730)

Taille : 162 pb

Tm : 95°C

Séquence :

atcattaccgagtgcgggtgcctccgggcccgaacctcccacccttgactacctaactgttcttcggcgggggagccctctcggggcgagcccgccgggactactgaacttcatgcctgagagtgatgcagctctgagctctgaatataaaatcagta

Aspergillus terreus (AF453915)

Taille : 186pb

Tm : 96.6°C

Séquence :

ccgagtgcgggtctttatggccaacctcccaccctgactattgtacctgttcttcggcgggcccgccagcgttctggccgcccggggcgactcggccccggggcccgctgcccgccggagacccaacatgaacctgttctgaaagctgcagctctgagttgattctttgc atcagta

Candida albicans (CAY14002)

Taille : 139 pb

Tm : 91.1°C

Séquence :

ctgatttgctaattgcaccacatgtgttttcttgaacaaacttgcttggcggggggccagcctgccgccagagggtctaaacttaca
ccaatttttatcaactgtcacaccagattacttaataagca

Candida dubliniensis (AB041945)

Taille : 138 pb

Tm : 90.1°C

Séquence :

ctgatttgctaattgcaccacatgtgtttgtttggacaaacttgcttggcggggggcctctacctgccgccagaggacataaacttaca
accaaattttataaactgtcacagagatttttaataagca

Candida parapsilosis (AM117819)

Taille : 157 bp

Tm : 81°C

Séquence :

cagaaataggagaaggttgcttaactgcaatcctttcttacacatgtgtttctttttgaaaacttgcttggggggccacggcct
gccagagattaaactcaacaaattttatattaattgtcaactgattaactaataagca

Candida glabrata (AB182299)

Taille: 321 bp

Tm: 97.2°C

Séquence :

cttaagtgcgcggttggtgggtgttctgcagtgggggggagggagccgacaaagacctgggagtgctgctggatctctattccaag
gaggtgtttatcacacgactcgacacttctaactacacacagtgagggttacttactactattctttgtcgtgggggaacgctctct
ttcggggggggagttctcccagnngatgcaaacacaaacaaatatttttaaaataattcagtcacacaagatttcttttagtagaaaac
aacttcaaaacttcaacaatggatctcttgggtctcgcacgat

Candida tropicalis (AM117838)

Taille : 157 pb

Tm : 86.6°C

Séquence :

ctgatttgctaattgcaccacatgtgtttttattgaacaaatttcttggggggagcaatcctaccgccagaggtataactaaaccaa
actttttatttacagtcacaaactgatttattattacaatagtcacaaacttcaacaacggatc

Pseudallescheria boydii (*Scedosporium apiospermum*) (AJ842314)

Taille : 236 pb

Tm : 86.9°C

Séquence :

cagcggagggatcattacagagttactactcaaacccattgtgaaccttacctatgttctgttgccctcggcggcgtggtcagcgcctcc
ctctgaaaagaggacgatgccctcccggcggcagcaccacaaactttgaattttacagcggattacagttctgatttgaacacaaaaac
aagttaaaacttcaacaacggatctcttgggtctcgcacgatgaagaacgcagc

Scedosporium prolificans (AJ842338)

Taille : 223 pb

Tm : 87.2°C

Séquence :

cagcggaggatcattaccgagttactccaacccttgtgaacctacctatgttctgttgcctcggcggggagggaagacccttaa
aaagggccagccccggcggcagcaccaaactctgtcattatagcggattacatttctgaatacaatacaaaaacaatcaaaacttc
aacaacggatctctgttctggcatcgatgaagaacgcagc

Exophiala dermatitidis (AY857525)

Taille : 198 bp

Tm : 94.1°C

Séquence :

acgagtagggtcttctagggccgacctccaacccttgttaccggacctatgttctcggcggggcccgcttcgacggccgcc
ggaggaccgctattcaggtcctctggcccgcggccggtagccaattctaccaactcttgaatcaaatcgtgtccaatgtctgagc
atattacaaaataaaagca

Scopulariopsis brevicaulis (AJ853776)

Taille : 191 pb

Tm : 95.6°C

Séquence :

ccgaagtactcttcaaaaccattgtgaaccttacctcttgcgcggttgcctcggcggggaggcggggcttgggtcggcgcgccc
ctaccggggccgctccccgtccccgcccggccgcgcaaacctctaaattgaaaaagcgtactgcacgttctgattcaaaa
caaaaaacaagtcaa

Paecilomyces lilacinus (AM158217)

Taille : 188 bp

Tm : 95.4°C

Séquence :

ccgagttatacaactcccaaacctgtgaaccttacctcagttgcctcggcgggaacgccccggccgctgccccgcgcccggcg
ccggaccagggcggccgcccagggaccaccaactctctgcaatcagcccagcggggcgaatttcttctctgagttgcacaagcaa
aaacaatgaatca

Paecilomyces variotii (AY904061)

Taille : 184 pb

Tm: 97.8°C

Séquence :

ccgagtgagggtccctcggggggccaacctcccacctgttgttaaacacctgttgcctcggcggggcccgctggttcacgccgtgg
ccggcgggggcatctcggccccggcccgcgcccggcaagaccctcgaacgctgccttgaaggttgcctgtgagatgaaat
tcaatcgta

Penicillium emersonii (*Talaromyces emersonii*) (DQ317587)

Taille : 144 pb

Tm : 98.6°C

Séquence :

ccgagtgagggtccctcggggggccaacctcccacctgttctactgtacatgttgcctcggcggggcagcggcctgccccgc
ggagacccttgaacgctgttgaatgaggttctctgagtgagattgcaaacgtc

Acrophialophora fusispora (IHEM 19209)

Taille : 141 pb

Tm : 100.9°C

Séquence :

accattgtgaaccttacctcaaccgttgetteggcggggcgggcccacagcggccccggccccccagcggggcggccgcccga
ggataccaaactcttgatacttatggcctctctgagctctctgtactgaataa

Annexe 4. Tailles, T_m (logiciel DSI_oligoTM, <http://www.dsi.univ-paris5.fr/bio2/OligoTM.html>) et séquences des régions ITS2 des espèces fongiques étudiées (GenBank [54]).

Candida albicans (BCRC 20518; CBS 1905; ATCC 42266)

Taille: 154 pb

T_m : 89,9°C

Séquence :

ctcctcaaaccgctgggttggtgtgagcaatacgaactgggttgcttgaagacggtagtgtaaggcgggatcgttggacaatg
gcttaggtctaaccaaaacattgcttgcggcgtaacgtctaccacgtatatcttcaaactt

Candida tropicalis (BCRC 21436)

Taille: 144 pb

T_m : 87,8°C

Séquence :

ttcctcaaaccgggttggtgtgagcaatacgaactgggttgcttgaagaaatgaactggaaactattttaagcgaacttaggttat
cctaaacgctattttgcttagtgccaccacaattttcataactt

Candida parapsilosis (BCRC 21544)

Taille : 127 pb

T_m : 89,9°C

Séquence :

ctcctcaaaccctgggttggtgtgagcagatacgaactgggttgcttgaagaaaggcggagtataaactaatggataggtttttccac
tcattgtacaaactcctaaactttttcctaaattc

Candida glabrata (CBS 860)

Taille : 235 pb

T_m : 83,9°C

Séquence :

ccttctcaaacacgttgtgttggttagtgagtatactctctgttttgagttactgaaattgtagccatatacagtagtgggacacgagcg
caagcttctctataatctgctgctcgttgcgagcggcggggtaatactgtattaggtttaccaactcgggttgatctagggagg
gataagttagtgtttgtcgtgctgggcagacagcgtcttaagtt

Candida dubliniensis (YN73-151205)

Taille : 158 pb

T_m : 86,4°C

Séquence :

tcctcaaaccctaggggttggtgtgagcaatacgaactgggttgcttgaagatgatagtggataaggcggagatgcttggacaatg
gcttaggtgtaaccaaaacattgctaaggcgtctctgctcgccttttattcttcaaactt

Aspergillus fumigatus (ATCC 1022)

Taille : 168 pb

T_m : 101,7°C

Séquence :

gctgcccctcaagcagcgttgtgttgggccccctccccctctccgggggacgggcccgaaggcagcggcgccaccgcgc
cggtcctcgaagcgtatggggcttgtcacctgctctgtagggccggccggcggccagccgacaccaacttttttctaagg

Paecilomyces variotii (15L-123-Mexico)

Taille : 178 pb

Tm : 102°C

Séquence :

ctaaccctccagccccggctggtgtgttgggtcgacgtccccccgggggacgggcccgaaaggcagcggcggcgccgcgtccgat
cctcgagcgtatggggctttgtcacgcgctctggtagggtcggccggctggccagccagcgcacctcacggtcacctatttttcttta
gg

Scopulariopsis brevicaulis (UAMH 7771)

Taille : 192 pb

Tm : 100,2°C

Séquence :

tcttcctcgagcgggctagccctacggggcctgcccgtcggcggtgtggggctctacgggtggggctcgtccccccgcagtc
ccgaaatgtagtggcggtccagccgcggcggccctgcgtagtagatcctacatctcgcacatcgggtcccggcgaaggccagccgt
gaacctttattcatggt

Exophiala dermatitidis (CBS 116726)

Taille : 209 pb

Tm : 100,2°C

Séquence :

tccccctcaagcccccggttgggtgttgacggtctggtcgagcgtttccgcgcgacccctcccaaagacaatgacggcggcctg
gttgacccccggtacacggagcttctcactgagcacgtatcggtttcaaggtgtccccgggacccggtcgacctcttctgtccct
gcgggagtgggagagacccccctttatcaa

Annexe 5 : Protocole utilisé pour la TGGE

- a. Matériel utilisé:
 - i. Deux plaques 16 cm (une grande, une petite)
 - ii. Deux espaceurs 16cm * 1mm
 - iii. Joint
 - iv. Peigne
 - v. Urée
 - vi. Acrylamide/bis 40%
 - vii. TAE 50×
 - viii. Urée
 - ix. TEMED
 - x. Ammonium persulfate
 - xi. Eau distillée
 - xii. Clamps
 - xiii. Casting stand
 - xiv. Carte d'alignement
 - xv. Pipette 10 mL
 - xvi. Cônes effilés
 - xvii. Micropipettes 1000 μ L, 200 μ L, 20 μ L et cônes
 - xviii. Spatule
 - xix. Tube Falcon 50 mL et 15 mL
 - xx. Epprouvettes 50 mL, 100 mL, 2 L
 - xxi. Alcool
 - xxii. Entonnoir
 - xxiii. Deux boîtes hermétiques
 - xxiv. Un bidon 10 litres, un bidon 5 litres
- b. Préparation d'ammonium persulfate 10%
 - i. Ammonium persulfate : 1 g
 - ii. Eau distillée : 10 mL
- c. Préparation de 7L de tampon de migration TAE 1.25×
 - i. 175 mL de TAE 50×
 - ii. 6825 mL d'eau distillée
- d. Préchauffage du tampon de migration
 - i. Remplir la cuve avec 7L de tampon de migration
 - ii. Mettre en place le module de contrôle de température
 - iii. Allumer power, pump, heater
 - iv. Sélectionner la température initiale du gradient à 51°C, mettre le ramp rate à 200°C/h
- e. Assemblage du Gel Sandwich
 - i. Nettoyer les plaques à l'alcool, bien les sécher
 - ii. Poser la grande plaque
 - iii. Mettre les deux espaceurs
 - iv. Poser la petite plaque
 - v. Placer les deux clamps
 - vi. Mettre les joints en place
 - vii. Placer l'assemblage sur le casting stand, la petite plaque vers l'avant
 - viii. Mettre la carte d'alignement, aligner les plaques et les espaceurs, serrer les clamps, enlever la carte d'alignement

- ix. Enlever le sandwich, vérifier l'alignement, remettre le sandwich sur le casting stand
 - x. Tourner les bloqueurs
- f. Réalisation du gel (polyacrylamide 8%, Urée 7M), dans un tube Falcon 50mL
- i. 16,8g d'urée
 - ii. 8 mL d'acrylamide/bis à 40%
 - iii. 1 mL de TAE 50×
 - iv. Eau distillée QSP 40mL
 - v. 40 μ L TEMED
 - vi. 400 μ L d'ammonium persulfate 10%
- g. Coulage du gel (environ 30mL)
- i. Mettre en place le peigne, sur 1 côté
 - ii. Couler le gel à la pipette de 10 mL, avec cône de P200, sur l'autre bord
 - iii. Enfoncer le peigne en évitant la formation de bulles
 - iv. Laisser polymériser 60min
- h. Assemblage de la chambre supérieure
- i. Enlever le gel sandwich du casting stand
 - ii. Marquer les puits au marqueur indélébile
 - iii. Placer le sandwich sur le « core », petite plaque en dessous (humidifier le « core » avec de l'eau ou du tampon de migration pour faciliter la fixation). Appuyer jusqu'à entendre un clic
 - iv. Répéter ces opérations avec le second gel (si un seul gel, assembler les 2 autres plaques sans espaceurs)
 - v. Verser 350mL de tampon de migration 1.25× dans la chambre supérieure
- i. Assemblage de la cuve
- i. Une fois le tampon de migration à la température désirée, éteindre le système
 - ii. Enlever le module de contrôle de température. Mettre en place le «core» (repère rouge à droite, repère noir à gauche). Remettre le module de contrôle de température.
 - iii. Allumer le système.
 - iv. Enlever la grille de dépôt, laver les puits avec du tampon de migration 1.25×. Si besoin, ajouter du tampon de migration jusqu'à la limite « max ». Remettre la grille.
 - v. Laisser le système atteindre la température initiale
 - vi. Appuyer sur « °C/RR », sélectionner un ramp rate à 1°C/h. Laisser équilibrer 5 à 10 min avant de déposer les échantillons. Appuyer à nouveau sur « °C/RR »
- j. Dépôt des échantillons
- i. Enlever la grille
 - ii. Déposer les échantillons (5 μ L ADN et 5 μ L de bleu)
 - iii. Remettre la grille
- k. Electrophorèse
- i. Rentrer une température finale à 70,5°C, migration à 60V
- l. Enlever le gel
- i. A la fin de l'électrophorèse, éteindre le système
 - ii. Enlever le module de contrôle de température
 - iii. Enlever les sandwiches
 - iv. Enlever les clamps, enlever la petite plaque

v. Enlever les espaceurs

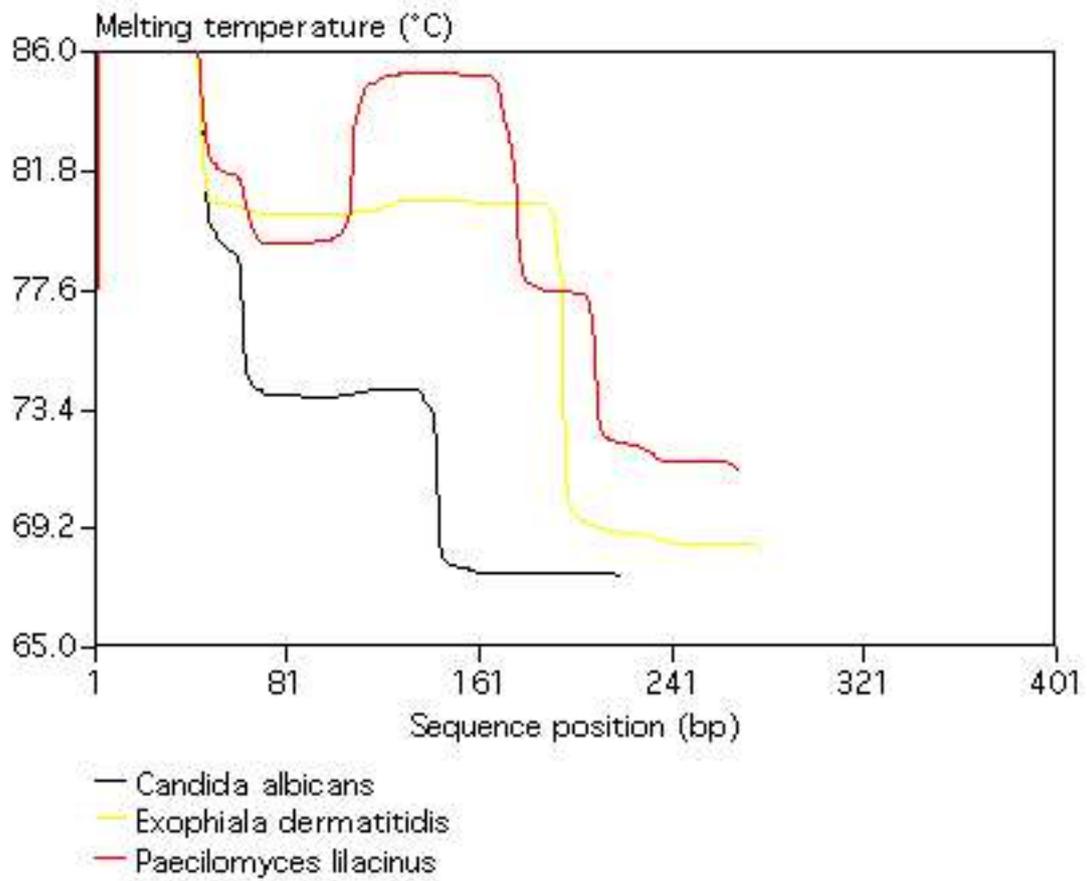
m. Révélation

- i. Enlever le gel de la plaque
- ii. Placer le gel dans un récipient contenant 250mL de tampon de migration, 25 μ L de BET (10 mg/mL) pendant 10 min minimum
- iii. Placer le gel dans un récipient contenant 250mL de tampon de migration à 1 \times pendant 5 à 20min
- iv. Lire le gel sous UV

Annexe 6. Liste des prélèvements d'expectoration de patients atteints de mucoviscidose analysés en PCR-TGGE

Numéro du prélèvement	Résultats de la culture
1603	Positive à <i>C. albicans</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> et <i>A. terreus</i>
1821	Positive à <i>C. albicans</i> , <i>A. fumigatus</i> et <i>A. terreus</i>
1933	Positive à <i>C. albicans</i>
2027	Négative
2098	Négative
2582	Positive à <i>C. albicans</i> et <i>A. fumigatus</i>
2732	Positive à <i>C. albicans</i> et <i>A. fumigatus</i>
3502	Positive à <i>C. albicans</i> et <i>A. fumigatus</i>
3942	Positive à <i>Pichia etchellsii</i> , <i>Geotrichum</i> sp., <i>Aspergillus versicolor</i> et <i>Trichoderma</i> sp.
5911	Négative
4897	Positive à <i>C. albicans</i>
6071	Positive à <i>A. terreus</i>
6194	Positive à <i>C. albicans</i>
8030	Positive à <i>C. albicans</i> , <i>S. prolificans</i> , <i>A. flavus</i> et <i>A. fumigatus</i>

Annexe 7. Analyses des courbes de dénaturation de *Candida albicans* et d'*Exophiala dermatitidis* à l'aide du logiciel MacMelt™



REFERENCES

- [1] Becq F. [CFTR and transepithelial ionic transport abnormalities in cystic fibrosis]. *Arch Pediatr*. 2003 Sep;10 Suppl 2:325s-32s.
- [2] Boat TF. Cystic Fibrosis. In: Behrman RE, Kliegman, R.M., Jenson, H.B., ed. *Nelson Textbook of Pediatrics*. 17th ed. Philadelphia: Elsevier 2004:1437-50.
- [3] Navarro J. BG. La mucoviscidose, de la théorie à la pratique. Editions Espaces ed. Montpellier 2001.
- [4] Robinson C, Scanlin, T.F. Cystic Fibrosis. In: Fishman AP, ed. *Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders*: McGraw-Hill 1998:803-24.
- [5] Boucher RC. Mucoviscidose. *Harrison-Principes de Médecine Interne*. 15th ed: Flammarion Médecine-Sciences 2001:1487-91.
- [6] Rosenstein BJ, Cutting GR. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr*. 1998 Apr;132(4):589-95.
- [7] Mariani-Kurkdjian P, Bingen E. [Pathogenic bacteria in cystic fibrosis]. *Arch Pediatr*. 2003 Sep;10 Suppl 2:342s-6s.
- [8] Bakare N, Rickerts V, Bargon J, Just-Nubling G. Prevalence of *Aspergillus fumigatus* and other fungal species in the sputum of adult patients with cystic fibrosis. *Mycoses*. 2003 Feb;46(1-2):19-23.
- [9] Cimon B. SF, Carrère J., Chabasse D., Bouchara J.P. Encyclopédie de pneumologie. Thème "mucoviscidose". Encyclopédie Médicale Multimedia Professionnelle [cited; Available from:
- [10] Stevens DA, Moss RB, Kurup VP, Knutsen AP, Greenberger P, Judson MA, et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis--state of the art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. *Clin Infect Dis*. 2003 Oct 1;37 Suppl 3:S225-64.
- [11] Nepomuceno IB, Esrig S, Moss RB. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis: role of atopy and response to itraconazole. *Chest*. 1999 Feb;115(2):364-70.
- [12] Shoseyov D, Brownlee KG, Conway SP, Kerem E. *Aspergillus* bronchitis in cystic fibrosis. *Chest*. 2006 Jul;130(1):222-6.
- [13] Yankaskas J, Knowles, M. Cystic fibrosis in adults. Philadelphia: Lipponcott-Raven Publishers 1999.
- [14] Helmi M, Love RB, Welter D, Cornwell RD, Meyer KC. *Aspergillus* infection in lung transplant recipients with cystic fibrosis: risk factors and outcomes comparison to other types of transplant recipients. *Chest*. 2003 Mar;123(3):800-8.

- [15] Mehrad B, Paciocco G, Martinez FJ, Ojo TC, Iannettoni MD, Lynch JP, 3rd. Spectrum of *Aspergillus* infection in lung transplant recipients: case series and review of the literature. *Chest*. 2001 Jan;119(1):169-75.
- [16] Iversen M, Burton CM, Vand S, Skovfoged L, Carlsen J, Milman N, et al. *Aspergillus* infection in lung transplant patients: incidence and prognosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007 Sep 15.
- [17] Haase G, Skopnik H, Groten T, Kusenbach G, Posselt HG. Long-term fungal cultures from sputum of patients with cystic fibrosis. *Mycoses*. 1991 Sep-Oct;34(9-10):373-6.
- [18] Peltroche-Llacsahuanga H, Dohmen H, Haase G. Recovery of *Candida dubliniensis* from sputum of cystic fibrosis patients. *Mycoses*. 2002 Feb;45(1-2):15-8.
- [19] Mubareka S, Vinh DC, Sanche SE. *Candida dubliniensis* bloodstream infection: a fatal case in a lung transplant recipient. *Transpl Infect Dis*. 2005 Sep-Dec;7(3-4):146-9.
- [20] Cimon B, Carrere J, Vinatier JF, Chazalotte JP, Chabasse D, Bouchara JP. Clinical significance of *Scedosporium apiospermum* in patients with cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2000 Jan;19(1):53-6.
- [21] 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*. 2006 May;25(5):603-7.
- [22] Vagefi MR, Kim ET, Alvarado RG, Duncan JL, Howes EL, Crawford JB. Bilateral endogenous *Scedosporium prolificans* endophthalmitis after lung transplantation. *Am J Ophthalmol*. 2005 Feb;139(2):370-3.
- [23] Kusenbach G, Skopnik H, Haase G, Friedrichs F, Dohmen H. *Exophiala dermatitidis* pneumonia in cystic fibrosis. *Eur J Pediatr*. 1992 May;151(5):344-6.
- [24] Horre R, Schaal KP, Siekmeier R, Sterzik B, de Hoog GS, Schnitzler N. Isolation of fungi, especially *Exophiala dermatitidis*, in patients suffering from cystic fibrosis. A prospective study. *Respiration*. 2004 Jul-Aug;71(4):360-6.
- [25] Diemert D, Kunimoto D, Sand C, Rennie R. Sputum isolation of *Wangiella dermatitidis* in patients with cystic fibrosis. *Scand J Infect Dis*. 2001;33(10):777-9.
- [26] Cimon B, Challier S, Beguin H, Carrere J, Chabasse D, Bouchara JP. Airway colonization by *Acrophialophora fusispora* in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 2005 Mar;43(3):1484-7.
- [27] Cimon B, Carrere J, Chazalotte JP, Vinatier JF, Chabasse D, Bouchara JP. Chronic airway colonization by *Penicillium emersonii* in a patient with cystic fibrosis. *Med Mycol*. 1999 Aug;37(4):291-3.

- [28] Das A, MacLaughlin EF, Ross LA, Monforte HL, Horn MV, Lam GL, et al. *Paecilomyces variotii* in a pediatric patient with lung transplantation. *Pediatr Transplant*. 2000 Nov;4(4):328-32.
- [29] Brun S, Bouchara JP, Bocquel A, Basile AM, Contet-Audonneau N, Chabasse D. Evaluation of five commercial Sabouraud gentamicin-chloramphenicol agar media. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2001 Oct;20(10):718-23.
- [30] Iwen PC, Hinrichs SH, Rupp ME. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Med Mycol*. 2002 Feb;40(1):87-109.
- [31] Leaw SN, Chang HC, Sun HF, Barton R, Bouchara JP, Chang TC. Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions. *J Clin Microbiol*. 2006 Mar;44(3):693-9.
- [32] Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassouljian-Barrett SL, LaFe K, Yarfitz SL, et al. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. *J Clin Microbiol*. 2000 Jun;38(6):2302-10.
- [33] Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassouljian-Barrett SL, Lafe K, Bui U, et al. Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts. *J Clin Microbiol*. 2001 Nov;39(11):4042-51.
- [34] Henry T, Iwen PC, Hinrichs SH. Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *J Clin Microbiol*. 2000 Apr;38(4):1510-5.
- [35] Hsiao CR, Huang L, Bouchara JP, Barton R, Li HC, Chang TC. Identification of medically important molds by an oligonucleotide array. *J Clin Microbiol*. 2005 Aug;43(8):3760-8.
- [36] Muyzer G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr Opin Microbiol*. 1999 Jun;2(3):317-22.
- [37] Hernan-Gomez S, Espinosa JC, Ubeda JF. Characterization of wine yeasts by temperature gradient gel electrophoresis (TGGE). *FEMS Microbiol Lett*. 2000 Dec 1;193(1):45-50.
- [38] Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*. 1993 Mar;59(3):695-700.
- [39] Gadanho M, Sampaio JP. Application of temperature gradient gel electrophoresis to the study of yeast diversity in the estuary of the Tagus river, Portugal. *FEMS Yeast Res*. 2004 Dec;5(3):253-61.

- [40] Manzano M, Cocolin L, Iacumin L, Cantoni C, Comi G. A PCR-TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) technique to assess differentiation among enological *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Int J Food Microbiol*. 2005 Jun 15;101(3):333-9.
- [41] Smit E, Leeflang P, Glandorf B, van Elsas JD, Wernars K. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*. 1999 Jun;65(6):2614-21.
- [42] Heuer H, Krsek M, Baker P, Smalla K, Wellington EM. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl Environ Microbiol*. 1997 Aug;63(8):3233-41.
- [43] Halos L, Mavris M, Vourc'h G, Maillard R, Barnouin J, Boulouis HJ, et al. Broad-range PCR-TTGE for the first-line detection of bacterial pathogen DNA in ticks. *Vet Res*. 2006 Mar-Apr;37(2):245-53.
- [44] Seksik P, Lepage P, de la Cochetiere MF, Bourreille A, Sutren M, Galmiche JP, et al. Search for localized dysbiosis in Crohn's disease ulcerations by temporal temperature gradient gel electrophoresis of 16S rRNA. *J Clin Microbiol*. 2005 Sep;43(9):4654-8.
- [45] Green SJ. A guide to denaturing gradient gel electrophoresis. 2005 [cited 2007; Available from: <http://ddgehelp.blogspot.com/2005/11/dgge-guide.html>
- [46] Hinrikson HP, Hurst SF, Lott TJ, Warnock DW, Morrison CJ. Assessment of ribosomal large-subunit D1-D2, internal transcribed spacer 1, and internal transcribed spacer 2 regions as targets for molecular identification of medically important *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol*. 2005 May;43(5):2092-103.
- [47] Tominaga T. Rapid identification of pickle yeasts by fluorescent PCR and microtemperature-gradient gel electrophoresis. *FEMS Microbiol Lett*. 2004 Sep 1;238(1):43-8.
- [48] Prakitchaiwattana CJ, Fleet GH, Heard GM. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Res*. 2004 Sep;4(8):865-77.
- [49] Goldenberg O, Herrmann S, Adam T, Marjoram G, Hong G, Gobel UB, et al. Use of denaturing high-performance liquid chromatography for rapid detection and identification of seven *Candida* species. *J Clin Microbiol*. 2005 Dec;43(12):5912-5.
- [50] Janse I, Bok J, Zwart G. A simple remedy against artifactual double bands in denaturing gradient gel electrophoresis. *J Microbiol Methods*. 2004 May;57(2):279-81.
- [51] Yasuda M, Shiaris MP. Differentiation of bacterial strains by thermal gradient gel electrophoresis using non-GC-clamped PCR primers for the 16S-23S rDNA intergenic spacer region. *FEMS Microbiol Lett*. 2005 Feb 1;243(1):235-42.

- [52] Haff LA. Improved quantitative PCR using nested primers. *PCR Methods Appl.* 1994 Jun;3(6):332-7.
- [53] Desnos-Ollivier M, Bretagne S, Dromer F, Lortholary O, Dannaoui E. Molecular identification of black-grain mycetoma agents. *J Clin Microbiol.* 2006 Oct;44(10):3517-23.
- [54] Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 2005 Jan 1;33(Database issue):D34-8.

Titre de la thèse : Développement d'une méthode de diagnostic moléculaire (PCR-TGGE) pour l'identification des champignons associés à la mucoviscidose

RESUME

Les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose sont fréquemment colonisées par des champignons, qui sont parfois difficiles à identifier par les techniques mycologiques classiques. La méthode moléculaire de « temporal temperature gradient gel electrophoresis » (TGGE), après amplification de la région Internal Transcribed Spacer (ITS) 1, a été développée afin de permettre la détection des espèces fongiques pouvant être présentes dans les expectorations de ces patients. La plupart des dix-huit espèces fongiques analysées dont l'ADN a été extrait à partir de souches pures ont pu être identifiées par PCR-TGGE. Lorsque plusieurs souches d'une même espèce ont été étudiées, aucune variabilité intraspécifique n'a été mise en évidence, hormis pour *Paecilomyces variotii*. Certaines espèces présentant des profils de migration identiques ont pu être différenciées après modification des paramètres de la migration ou amplification de la région ITS2. La technique développée a été utilisée directement sur les expectorations de patients atteints de mucoviscidose, sans toutefois permettre l'identification de toutes les espèces fongiques retrouvées lors de la culture. L'optimisation de l'étape d'amplification, par le biais d'une nested PCR, devrait permettre de détecter par TGGE les colonisations fongiques en s'affranchissant des contraintes de la culture.

MOTS-CLES : PCR-TGGE. Mucoviscidose. Infections fongiques. ITS. Champignons filamenteux