

ANNEE $2015 - n^{\circ} 25 - 15 - ...$

GENOTYPAGE D'EXOPHIALA DERMATITIDIS PAR POLYMORPHISME DES MICROSATELLITES: DEVELOPPEMENT ET APPLICATION AU SUIVI DE LA COLONISATION DES PATIENTS ATTEINTS DE MUCOVISCIDOSE AU CHRU DE BESANÇON

MEMOIRE DU DIPLÔME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE

Tenant lieu de **THÈSE**

présenté et soutenue publiquement le 30 novembre 2015 pour obtenir le Diplôme d'État de

DOCTEUR EN PHARMACIE

PAR

David Le Bihan

Né le 8 septembre 1988 à Vannes

Président : Xavier Bertrand Professeur

Directeur de la thèse : Frédéric Grenouillet Professeur

Juges: Laurence Millon Professeur

Patrick Plésiat Professeur

Bénédicte Richaud-Thiriez Praticien Hospitalier

[•] UFR SMP 19 rue Ambroise Paré F-25030 Besançon cedex • Tél. +33 (0)3 63 08 22 00 • Fax +33 (0)3 81 66 56 83

http://medecine-pharmacie.univ-fcomte.fr

GENOTYPAGE D'EXOPHIALA DERMATITIDIS PAR POLYMORPHISME DES MICROSATELLITES: DEVELOPPEMENT ET APPLICATION AU SUIVI DE LA COLONISATION DES PATIENTS ATTEINTS DE MUCOVISCIDOSE AU CHRU DE BESANÇON

MEMOIRE DU DIPLÔME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE

Tenant lieu de **THÈSE**

présenté et soutenue publiquement le 30 novembre 2015 pour obtenir le Diplôme d'État de

DOCTEUR EN PHARMACIE

PAR

David Le Bihan

Né le 8 septembre 1988 à Vannes

Directeur de la thèse : Frédéric Grenouillet Professeur

Juges : Laurence Millon Professeur

Xavier Bertrand

Président :

Patrick Plésiat Professeur

Bénédicte Richaud-Thiriez Praticien Hospitalier

Professeur

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier dans un premier temps M. Xavier Bertrand de me faire l'honneur de présider le jury de soutenance de cette thèse.

Je remercie aussi mon directeur de thèse, M. Frédéric Grenouillet, pour la confiance et le temps qu'il m'a accordés lors de l'élaboration de cette thèse. Je lui suis reconnaissant pour les conseils et les encouragements qu'il m'a prodigués, sa patience et sa sympathie.

Mes remerciements vont également à Mme Laurence Millon, à Mme Bénédicte Richaud-Thiriez et à M. Patrick Plésiat qui ont eu la gentillesse d'accepter de constituer mon jury de thèse.

Je remercie Mme Florence Grenouillet du laboratoire de Parasitologie Mycologie du CHRU de Besançon, M. Fabrice Poncet et Mme Amandine Mariot de la plate-forme de séquençage et d'analyse de fragments de l'UFR SMP de Besançon pour l'aide précieuse qu'ils m'ont apporté dans la réalisation de mon travail.

Merci aussi à M. Gabriel Reboux qui a participé à la collection de souches de lave-vaisselles en 2012.

Merci également à toutes les personnes qui ont participé à l'enquête épidémiologique préliminaire de ce travail concernant les machines à café *Senseo^{MD}* ainsi qu'à toute l'équipe du laboratoire de Parasitologie Mycologie du CHRU de Besançon.

A titre plus personnel, un grand merci à Cynthia pour son amour et son soutien durant ces longs mois. Ses conseils et relectures m'ont été d'une grande aide.

Une pensée aussi à toute ma famille, mes amis, mes co-internes.

SOMMAIRE

Liste des abréviations	page 11
Liste des figures, tableaux et annexes	page 12
Introduction	page 15
Généralités	page 17
La mucoviscidose	page 17
Les infections pulmonaires dans la mucoviscidose	page 25
Exophiala spp.	page 34
Colonisation et typage moléculaire	page 47
Travail personnel	page 53
Présentation de l'étude et des objectifs	page 53
Matériels et méthodes	page 55
Résultats	page 64
Discussion	page 73
Annexes	page 79
Bibliographie	page 91
Plan détaillé	page 101

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABPA Aspergillose Broncho-Pulmonaire Allergique

BLAST Basic Local Alignment Search Tool

CBS Centraalbureau voor Schimmelcultures

CEC Circulation Extracorporelle

CFTR Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator

CFTR-RD CFTR-Related Disorder

CHRU Centre Hospitalier Régional Universitaire

CMI Concentration Minimale Inhibitrice

DHN 1,8-dihydroxynaphtalène

DNN Dépistage Néonatal

ENaC Epithelial sodium Channel

INSD International Nucleotide Sequence Database

ITS Internal Transcribed Spacer

PAP Protéine Associée à la Pancréatite

PCR Polymerase Chain Reaction

PNN Polynucléaire Neutrophile

RAPD Random Amplified Polymorphic DNA

TIR Trypsine Immunoréactive

UFR SMP Unité de Formation et de Recherche des Sciences Médicales et

Pharmaceutiques

LISTE DES FIGURES, TABLEAUX ET ANNEXES

Liste des figures :

- Figure 1 : Organigramme du dépistage néonatal de la mucoviscidose
- Figure 2 : Clinique selon l'activité résiduelle de CFTR
- Figure 3 : Fréquence d'isolement des bactéries par classe d'âge chez les patients atteints de mucoviscidose en France
- Figure 4 : Champignons filamenteux isolés dans la mucoviscidose selon leur pathogénicité et leur capacité de colonisation
- Figure 5 : Colonies d'E. dermatitidis sur milieu Sabouraud
- Figure 6 : E. dermatitidis, souche de référence CBS 748.88
- Figure 7 : E. phaeomuriformis
- Figure 8 : Lecture après électrophorèse sur capillaire de fragments de différentes tailles issus du polymorphisme d'un microsatellite
- Figure 9 : Images obtenues après RAPD et migration sur gel
- Figure 10 : Formule mathématique de l'indice de Hunter
- Figure 11 : Visualisation des fragments obtenus après migration sur gel
- Figure 12 : Mesure de la taille des fragments sur GeneMapper^{MD}

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Classification des mutations selon leurs conséquences cliniques

Tableau 2 : Interprétation du test à la sueur

Tableau 3 : Éléments du phénotype de la mucoviscidose

Tableau 4 : Diagnostic de la forme classique de l'ABPA dans la mucoviscidose

Tableau 5 : Couples d'amorces exodes

Tableau 6 : Indice de Hunter selon les couples d'amorces et les souches étudiées

Tableau 7 : Indice de Hunter selon le trio de couples d'amorces et les souches étudiées

Tableau 8 : Indice de Hunter selon le duo de couples d'amorces et les souches étudiées

Tableau 9 : Répartition des génotypes selon les souches

Tableau 10 : Caractéristiques des patients de la cohorte étudiée

Tableau 11 : Résultats des prélèvements réalisés en 2015 pour l'enquête épidémiologique sur la colonisation des joints de lave-vaisselles et de machines à café de la marque Senseo^{MD}

Liste des annexes :

Annexe 1 : Souches de référence, isolats environnementaux et isolats cliniques du laboratoire de Parasitologie Mycologie du CHRU de Besançon

Annexe 2 : Recherche d'Exophiala spp. au niveau des joints de lave-vaisselles et de machines à café de la marque $Senseo^{MD}$

Annexe 3 : Longueur des fragments selon la souche et le couple d'amorces

INTRODUCTION

La mucoviscidose est une maladie génétique entraînant des complications pulmonaires d'origine infectieuse. Au côté des bactéries qui constituent la cause majeure des infections pulmonaires dans la mucoviscidose, de nombreux micromycètes peuvent coloniser et infecter les voies respiratoires de ces patients (*Aspergillus fumigatus*, espèces du complexe *Scedosporium apiospermum*, ...).

Les « levures noires » du genre *Exophiala* sont retrouvées chez 1 à 19 % des patients atteints de mucoviscidose pour lesquels des cas d'infections pulmonaires prouvées ont été décrits. L'espèce *Exophiala dermatitidis* représente plus de 90 % des souches isolées de ces patients.

Ces micro-organismes extrêmophiles sont capables de se développer à des températures élevées et de survivre malgré des variations importantes d'hygrométrie et de pH.

L'objectif de mon travail a été le développement d'une technique de génotypage par polymorphisme des microsatellites d'*E. dermatitidis* et son application à l'étude du caractère clonal ou *a contrario* hétérogène de la colonisation par *E. dermatitidis* des patients atteints de mucoviscidose.

Après quelques rappels bibliographiques, le travail personnel de génotypage est présenté. Le polymorphisme de plusieurs marqueurs microsatellites préalablement identifiés a été évalué sur un panel de souches d'*E. dermatitidis* sans lien épidémiologique afin d'évaluer le pouvoir discriminant de la technique. Celle-ci a ensuite été appliquée sur l'ensemble des isolats d'*E. dermatitidis* provenant de patients atteints de mucoviscidose suivis au CHRU Centre Hospitalier Régional Universitaire de Besançon collectés entre 2004 et 2015.

GÉNÉRALITÉS

1. La mucoviscidose

1.1. Épidémiologie

La mucoviscidose est la maladie génétique autosomique récessive grave la plus fréquente dans la population caucasienne. La prévalence à la naissance de cette maladie a été estimée en France sur la période 2002-2006 à 1 pour 4 366 avec de grandes disparités régionales (1). Plus de 6 300 personnes atteintes étaient recensées en France en 2013 (2).

1.2. Le canal CFTR

Le gène responsable, isolé en 1989, est localisé sur le bras long du chromosome 7 en position 7q31 (3). Il est appelé CFTR pour *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*.

Le produit de ce gène est une protéine transmembranaire faisant partie de la superfamille des ABC *ATP Binding Cassette* transporteurs. Localisée sur la membrane apicale des cellules épithéliales, elle remplit le rôle de canal anionique. L'augmentation intracellulaire d'AMPc active le canal et permet la diffusion passive des ions chlorures vers la lumière épithéliale (4). D'autres molécules sont aussi transportées par CFTR : HCO₃⁻ et le glutathion (5).

De plus, il a été démontré que la protéine CFTR régule d'autres canaux ioniques. Citons l'activation des canaux chlorure ORCC *Outwardly Rectifying Chloride Channel* (6) et l'inhibition des canaux ENaC *Epithelial sodium Channel* (7).

Le défaut de CFTR chez les patients atteints de mucoviscidose perturbe les mouvements d'eau et d'électrolytes à la surface des cellules épithéliales, entraînant les signes cliniques de la maladie.

1.3. Relation génotype-phénotype

Plus de 2 000 allèles de ce gène ont été décrits à ce jour dont une vingtaine sont retrouvés à une fréquence supérieure à 0,1 % (8). La mutation la plus fréquente est la délétion du codon 508 codant pour la phénylalanine (dF508 selon la nomenclature traditionnelle ou p.Phe508del selon la nouvelle nomenclature HGVS *Human Genome Variation Society* des protéines) qui se retrouve chez 70 % des malades caucasiens.

La grande variété de ces mutations et de leur pathogénie peut être répertoriée selon deux approches. La plus ancienne datant de 1993 est une classification basée sur le type d'anomalie de CFTR et sert à l'approche thérapeutique de la maladie (9). Une classification plus récente basée sur la corrélation génotype-phénotype est utilisée pour le conseil génétique (10).

Classe A	Mutations causant la mucoviscidose (exemple : dF508)
Classe B	Mutations associées à une pathologie CFTR
Classe C	Mutations sans conséquence clinique
Classe D	Mutations de conséquence clinique incertaine

Tableau 1 : Classification des mutations selon leurs conséquences cliniques (D'après Castellani et al., 2010) (10)

Seules les mutations de classe A sont généralement à considérer dans les études familiales et le diagnostic prénatal. Cependant, les mutations de classe B peuvent se retrouver chez des patients souffrant de forme modérée de mucoviscidose si elles sont associées à des mutations de classe A.

1.4. Diagnostic biologique

Depuis 2002, la France a généralisé le DNN Dépistage Néonatal de la mucoviscidose chez tous les nouveau-nés (1). Ce DNN associe le dosage à trois jours de vie de la TIR

Trypsine Immunoréactive à la recherche des mutations les plus fréquentes du gène CFTR en cas de TIR supérieure au seuil décisionnel. En l'absence de consentement parental pour le dépistage génétique ou si aucune mutation n'a été détectée, un second dosage de TIR est réalisé à 21 jours.

En cas de mutation détectée ou de TIR à 21 jours supérieure au seuil décisionnel, un test à la sueur est réalisé pour confirmer le diagnostic de mucoviscidose (11).

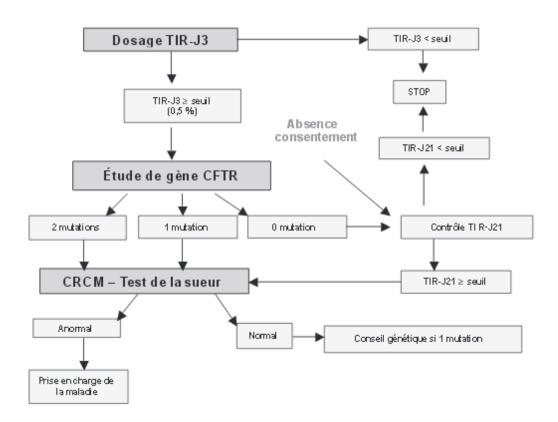


Figure 1 : Organigramme du dépistage néonatal de la mucoviscidose (Modifié d'après Munck et al, 2008) (11)

- Dosage de la trypsine immunoréactive

En cas d'obstruction des canaux pancréatiques comme dans le cas de la mucoviscidose, le trypsinogène ne peut pas être excrété dans le tube digestif et sa concentration sérique augmente. Bien que non spécifique d'une pathologie en particulier, son dosage à partir d'un échantillon de sang séché d'un nouveau-né récolté sur papier buvard type « Guthrie » permet un dépistage "de masse" de la mucoviscidose (12). Un résultat supérieur à la valeur seuil nécessite des examens complémentaires. Ce seuil

correspond à la valeur discriminant 99,5 % des nouveau-nés des 0,5 % restants avec les valeurs les plus hautes, jugées anormales (13).

Les deux techniques validées pour le DNN en France sont la technique radioimmunologique *RIA-Gnost Trypsin* (14) et la technique immunofluorimétrique *AutoDelfia Neonatal IRT* (15).

- Mutations du gène CFTR

Le kit *Elucigene^{MD} CF30* utilisé par les laboratoires inter-régionaux en charge du DNN génétique de la mucoviscidose permet de détecter 30 mutations (16) qui représentent au moins 80 % des mutations les plus fréquemment retrouvées dans la population française (17).

- Test à la sueur

Il s'agit du test de référence. Après stimulation de la sudation par iontophorèse à la pilocarpine sur une peau saine, la concentration sudorale en ions chlorure est dosée par titrimétrie après recueil de la sueur sur papier filtre ou *in situ* par coulométrie ou potentiométrie. Le dosage indirect de l'ion chlorure par conductimétrie n'est actuellement pas reconnu comme technique de diagnostic en France (18).

Concentration sudorale en ions chlorure	< 30 mmol/L	30 à 60 mmol/L	> 60 mmol/L
Interprétation	Mucoviscidose éliminée	Réitérer test à la sueur ou étude du gène CFTR	Mucoviscidose confirmée

Tableau 2 : Interprétation du test à la sueur

Note: Résultats validés pour les enfants âgés de trois semaines à trois mois avec un poids supérieur à 3 kg

(D'après Sermet-Gaudelus et al., 2010) (19)

- Mesure de la différence de potentiel transépithélial nasal

De sensibilité supérieure au test à la sueur, cette technique est réalisable chez les enfants présentant une hypertrypsinémie mais avec un test à la sueur normal ou intermédiaire afin d'exclure le diagnostic de mucoviscidose (20).

- Dosage de la PAP Protéine Associée à la Pancréatite

Cette protéine marqueur du stress pancréatique est synthétisée dès la vie *in utero* en cas de mucoviscidose (21). La Haute Autorité de Santé recommande dans un avis de février 2015 de remplacer la stratégie actuelle de dépistage (dosage de la TIR puis recherche des mutations du gène CFTR) par une stratégie associant le dosage de la TIR au dosage de la PAP en cas de TIR supérieure au seuil défini (22). Cette nouvelle stratégie TIR-PAP serait aussi performante mais moins chère que la stratégie actuelle TIR-recherche des mutations du gène CFTR. Elle multiplierait le nombre de tests à la sueur réalisés par trois et demi mais permettrait de s'affranchir des tests génétiques. La tension éthique liée à l'identification et au signalement des patients hétérozygotes serait ainsi levée.

1.5. Clinique

Les mutations du gène CFTR, qu'elles soient homozygotes ou hétérozygotes, combinées à l'expression d'autres gènes entraînent une expression clinique très variable de la maladie. L'atteinte des organes dépend de l'activité résiduelle de la protéine CFTR (23). On distingue ainsi la mucoviscidose "classique" et les pathologies monosymptomatiques liées à CFTR ou CFTR-RD *CFTR-Related Disorder* (24).

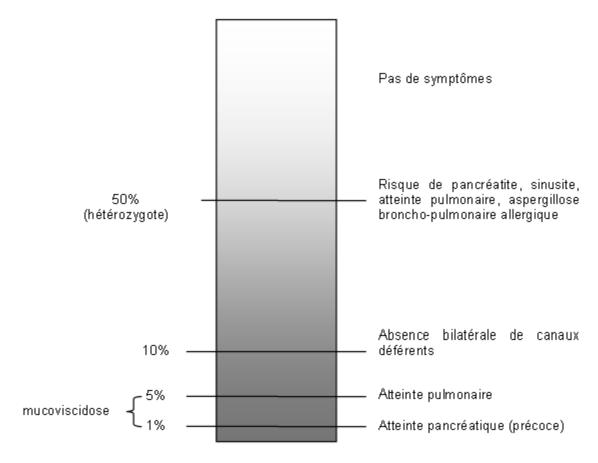


Figure 2 : Clinique selon l'activité résiduelle de CFTR (Modifié d'après Davis, 2006) (23)

1.5.1. Mucoviscidose

La conférence de consensus de la *Cystic Fibrosis Foundation* a revu en 2007 les critères de diagnostic définissant la forme classique de la mucoviscidose (25). La protéine CFTR étant distribuée sur l'ensemble des cellules épithéliales, son activité quasi-nulle conduit au dysfonctionnement de nombreux organes.

Maladie sino-pulmonaire chronique se manifestant par :

- Colonisation/infection persistante par des germes pathogènes caractéristiques de la mucoviscidose dont *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia et Burkholderia cepacia*
- Toux chronique productive
- Anomalies persistantes de la radiographie pulmonaire (par exemple bronchectasie, atélectasie, infiltrats, hyperinflation pulmonaire)
- Obstruction des voies aériennes se manifestant par un sifflement (*wheezing*) et un piégeage de l'air (*air trapping*)
- Polypes nasaux, anomalies des sinus paranasaux identifiées par radiographie ou tomodensitométrie
- Hippocratisme digital

Anomalies gastro-intestinales ou nutritionnelles dont:

- Intestinales : ileus meconial, syndrome d'obstruction intestinale distale, prolapsus rectal
- Pancréatiques : insuffisance pancréatique, pancréatite chronique, anomalies pancréatiques identifiées par imagerie
- Hépatiques : ictère néonatal prolongé, hépatopathie chronique avec aspects cliniques ou histologiques de cirrhose biliaire focale ou de cirrhose multilobaire
- Nutritionnelles : retard de croissance staturo-pondéral (dénutrition protéinoénergétique), hypoprotéinémie et œdème, complications de déficit en vitamines liposolubles

Syndrome de déplétion sodique :

- Déplétion sodique aiguë
- Alcalose métabolique chronique

Anomalies urogénitales masculines entraînant une azoospermie obstructive

Tableau 3 : Éléments du phénotype de la mucoviscidose (Modifié d'après Farrell et al., 2008) (25)

Au niveau pulmonaire, la production d'un mucus trop visqueux est propice au développement des micro-organismes, conduisant à une inflammation et une destruction du parenchyme pulmonaire. L'insuffisance respiratoire qui en découle est la principale cause de mortalité de cette maladie (26).

L'obstruction des canaux pancréatiques entraîne l'activation *in situ* des enzymes pancréatiques et une auto-digestion de l'organe. Il en découle un syndrome de malabsorption et un retard staturo-pondéral. Un diabète peut se développer ultérieurement par destruction des cellules β des îlots de Langerhans (27).

Les autres atteintes possibles sont localisées au niveau hépato-biliaire et gastrointestinal (27), une azoospermie par atteinte des canaux déférents (28) ou encore des manifestations ORL (29).

1.5.2. CFTR-RD

Ce terme désigne les formes atypiques, modérées ou mono-symptomatiques liées à une dysfonction de CFTR ne remplissant pas les critères de la forme classique de la mucoviscidose. Une classification des CFTR-RD a été proposée par l'Organisation Mondiale de la Santé en 2000 (30), les principales formes cliniques retenues étant l'absence bilatérale congénitale des canaux déférents, la pancréatite chronique et la bronchectasie, associées à des anomalies de CFTR (24).

2. Les infections pulmonaires dans la mucoviscidose

2.1. Physiopathologie de l'atteinte pulmonaire

Malgré les nombreux pathogènes inhalés en permanence, l'appareil respiratoire d'un individu sain est maintenu physiologiquement stérile à partir de la première division bronchique. Cette stérilité est assurée par plusieurs systèmes de défense. Le mucus tapissant l'épithélium bronchique piège les pathogènes puis est évacué par les cellules ciliées, on parle ainsi de clairance muco-ciliaire (31). À cette protection mécanique s'ajoute la présence dans le mucus de molécules antimicrobiennes (32) ainsi que l'action du système immunitaire.

Chez les patients atteints de mucoviscidose, on observe un très grand nombre d'infections des voies respiratoires basses difficiles à éradiquer. Plusieurs mécanismes ont été décrits.

2.1.1. Défaut de la clairance muco-ciliaire

Le défaut de CFTR et l'absence de régulation des canaux ENaC qui en découle entraînent une déshydratation de la couche périciliaire, un affaissement des cils et une stase du mucus à la surface épithéliale (33). La sur-expression des canaux ENaC chez des souris provoque des symptômes pulmonaires mimant ceux de la mucoviscidose (34). L'accumulation de mucus obstrue les voies respiratoires et forme un milieu propice au développement des pathogènes.

2.1.2. Perturbation de la réponse inflammatoire

Chez un individu sain, les PNN Polynucléaires Neutrophiles sont recrutés sur le site de l'infection par les cellules endothéliales via la production de médiateurs notamment l'interleukine 8. Sur place, les PNN phagocytent les agents infectieux et libèrent des molécules pour contrôler la prolifération bactérienne (dérivés réactifs de l'oxygène,

protéases, ...) (35). Lorsque l'infection est maîtrisée, la réaction inflammatoire cesse et les PNN entrent en apoptose pour prévenir un excès de dommages des tissus environnants.

Chez les patients atteints de mucoviscidose, la persistance des pathogènes entraîne une inflammation chronique et inefficace avec à terme la destruction du parenchyme pulmonaire par les protéases libérées en excès par les PNN. Plusieurs explications ont été trouvées, citons une inefficacité des β-défensines en cas de forte concentration en sel (36) ainsi que le défaut d'internalisation de *Pseudomonas aeruginosa* via CFTR par les cellules épithéliales (37).

2.1.3. Existence d'une inflammation intrinsèque

Des études ont montré que l'inflammation pulmonaire dans la mucoviscidose apparaît en dehors de tout phénomène infectieux (38) (39).

Ce phénomène est lié aux propriétés immunorégulatrices de CFTR au niveau des voies de signalisation NF-kb et AP-1 (40). Le défaut de CFTR entraînerait une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine 8 en présence (41) ou en l'absence de stimulation (42).

2.2. Colonisation par les micro-organismes

La principale cause de morbi-mortalité dans la mucoviscidose est l'insuffisance respiratoire liée à l'inflammation chronique et à la colonisation par des micro-organismes (26).

2.2.1. Bactéries

La surinfection bactérienne est constante et se fait classiquement de façon séquentielle (43).

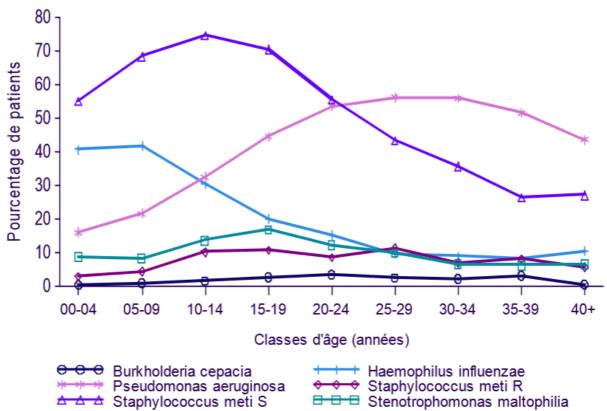


Figure 3 : Fréquence d'isolement des bactéries par classe d'âge chez les patients atteints de mucoviscidose en France

(D'après le rapport annuel 2013 du registre français de la mucoviscidose) (2)

Haemophilus influenzae apparaît de façon précoce puis décroît avec l'âge. Bien qu'il ne semble pas délétère seul, *Staphylococcus aureus* favorise l'implantation de *Pseudomonas aeruginosa* (43). En cas d'infection associée, *S. aureus* induit lui-même une dégradation de la fonction respiratoire (44). La différence de virulence entre les souches sensibles et les souches résistantes à la méticilline reste en débat (26).

La colonisation par *P. aeruginosa* constitue un tournant dans l'histoire clinique du patient en dégradant rapidement sa fonction respiratoire (45). En plus des facteurs de virulence, *P. aeruginosa* peut produire une grande quantité d'exopolysaccharides dont l'alginate (46). Ces souches dites mucoïdes contribuent à l'épaississement des sécrétions bronchiques et deviennent inaccessibles pour le système immunitaire et les antibiotiques.

La stratégie thérapeutique consiste à essayer d'éradiquer *P. aeruginosa* dès son premier isolement afin d'éviter son implantation. Une fois le patient colonisé de façon chronique, le traitement antibiotique ne sert plus qu'à réduire la taille de l'inoculum et à limiter l'inflammation qui en découle.

D'autres bacilles gram négatif non fermentant peuvent être isolés mais les conséquences cliniques de leur présence ne sont pas totalement élucidées (47). La colonisation par *Stenotrophomonas maltophilia* (48) ou *Achromobacter xylosoxydans* (49) serait davantage un marqueur de sévérité qu'une cause de l'atteinte respiratoire. Les bactéries du complexe *Burkholderia cepacia* seraient quant à elles associées à une altération de la fonction respiratoire selon le génomovar impliqué (50). Un génomovar est, chez les procaryotes, un groupe de souches d'une même espèce constituant une entité génétique distincte mais dont le manque de spécificités phénotypiques ne permet pas de les caractériser comme une sous-espèce (51). La colonisation par *Burkholderia cenocepacia* (génomovar III) est associée à une mortalité accrue en cas de transplantation pulmonaire (52).

2.2.2. Mycobactéries atypiques

Les mycobactéries des complexes *avium-intracellulare* et *abscessus-chelonae* se retrouvent chez 10 à 15 % des patients atteints de mucoviscidose, particulièrement chez les sujets d'âge avancé, dénutris ou colonisés par *Aspergillus fumigatus* (53). Bien que ce ne soit pas une contre-indication formelle à la transplantation pulmonaire, un antécédent de colonisation par *Mycobacterium abcessus* nécessite une thérapeutique agressive pour éviter une résurgence après immunosuppression (54).

2.2.3. Champignons

L'appareil respiratoire d'un patient atteint de mucoviscidose peut être colonisé par un grand nombre d'espèces fongiques. Parmi celles-ci, certaines exercent un rôle pathogène et sont responsables d'une dégradation de la fonction respiratoire (55).

2.2.3.1. Levures

Candida albicans colonise plus de 90 % des patients atteints de mucoviscidose. Les autres espèces du genre Candida les plus fréquemment retrouvées sont Candida glabrata, Candida dubliniensis et Candida parapsilopsis (56). Des candidoses systémiques peuvent survenir en cas d'immunodépression, notamment dans le cas de patients transplantés (55). Ces fongémies ont généralement pour origine la colonisation d'un cathéter.

2.2.3.2. Champignons filamenteux

Aspergillus fumigatus est le champignon filamenteux le plus souvent retrouvé dans la mucoviscidose avec une prévalence allant de 16 à 57 % selon les études. Son implantation survient vers 12 ans et suit classiquement la colonisation par *S. aureus* et *P. aeruginosa* (57). Les lésions de l'épithélium respiratoire par les bactéries et l'inflammation facilitent l'adhésion des spores. La colonisation au long cours se fait de façon non exclusive par un clone dominant (58).

A. fumigatus peut causer plusieurs types de complications : ABPA Aspergillose Broncho-Pulmonaire Allergique, exacerbations d'asthme, bronchites ou encore aspergillome en cas de lésion préexistante. L'aspergillose invasive peut survenir après transplantation pulmonaire (59).

L'ABPA ou maladie de Hinson-Pepys est une pathologie pulmonaire allergique causée par une hypersensibilité aux antigènes aspergillaires. La réponse de type Th2 des lymphocytes T CD4⁺ entraîne la synthèse d'immunoglobulines anti-*Aspergillus* de type IgG, IgE et IgA, la dégranulation des mastocytes et une infiltration massive du tissu pulmonaire par les polynucléaires éosinophiles. La dégradation de la fonction respiratoire qui en découle nécessite un traitement anti-inflammatoire par corticoïdes et un traitement antifongique afin d'éviter l'apparition de lésions pulmonaires irréversibles (fibrose, bronchectasie).

Cette maladie touche principalement les patients avec un terrain propice (asthme, mucoviscidose, broncho-pneumopathie chronique obstructive). Des facteurs de prédisposition génétique au niveau du système d'histocompatibilité HLA *Human Leukocyte Antigen* sont aussi évoqués (60). La prévalence de l'ABPA chez les malades atteints de mucoviscidose a été évaluée en 2015 à 9 % (61).

Les critères de diagnostic des formes classiques et frontières de l'ABPA dans la mucoviscidose ont été définis par la conférence de consensus de la *Cystic Fibrosis Foundation* de 2003 (60).

Détérioration clinique aiguë ou subaiguë (toux, expectorations, dyspnée, ...) sans autre étiologie

Concentration IgE totales sériques > 1000 UI/mL sans traitement corticoïde associé

Prick Test positif avec diamètre > 3mm ou IgE sériques anti-Aspergillus

IgG sériques ou précipitines anti-Aspergillus

Nouveaux infiltrats, impactions mucoïdes ou bronchectasies mal drainées

Tableau 4 : Diagnostic de la forme classique de l'ABPA dans la mucoviscidose (Modifié d'après Stevens et al., 2003) (60)

Cette classification est néanmoins régulièrement discutée. Récemment, le groupe de Manchester a appelé à sa révision et proposé une approche incluant IgG et IgE sériques spécifiques anti-Aspergillus d'une part, PCR Polymerase Chain Reaction quantitative ciblant Aspergillus spp. et antigène galactomannane sur crachats non induits d'autre part (62).

A. terreus est retrouvé de façon moins fréquente (2 à 6 % des patients) mais peut aussi être responsable d'épisodes d'ABPA (57). La présence d'un clone dominant chez les patients colonisés a été décrite (63).

D'autres espèces du genre *Aspergillus* peuvent être isolées de façon transitoire, citons *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* ou encore *Aspergillus nidulans* (57).

La colonisation par les espèces du complexe *Scedosporium apiospermum* survient après 14 ans chez environ 9 % des patients (57) (64) et est souvent associée à la colonisation par *A. fumigatus*. Ce complexe est constitué de cinq espèces : *Scedosporium aurantiacum*, *Scedosporium dehoogii*, *Scedosporium apiospermum*, *Pseudallescheria minutispora* et *Pseudallescheria boydii* (elle-même divisée en quatre sous-espèces). Une étude de 2013 conduite chez des patients français atteints de mucoviscidose a retrouvé une majorité de *P. boydii* (62 %) suivie par *S. apiospermum* (24 %), *S. auranticum* (10 %) et *P. minutispora* (4 %). *S. dehoogii* n'a pas été retrouvé dans les prélèvements étudiés (65).

Les espèces du complexe *S. apiospermum* peuvent causer des manifestations allergiques de type ABPA et des infections disséminées en cas d'immunodépression, notamment post-transplantation pulmonaire (66).

Le complexe Rasamsonia argillacea, anciennement Geosmithia argillacea, comprend quatre espèces: Rasamsonia argillacea, Rasamsonia aegroticola, Rasamsonia eburnea et Rasamsonia piperina. Ces filamenteux thermotolérants, résistants au voriconazole et sensibles aux échinocandines, étaient fréquemment confondus avec des espèces des genres Penicillium et Scedosporium (67). Depuis 2005, le développement de la biologie moléculaire et une meilleure connaissance de ces filamenteux ont entraîné un isolement croissant des espèces du complexe Rasamsonia argillacea au niveau pulmonaire chez les patients atteints de mucoviscidose (70 % des isolats cliniques) ou de granulomatose septique chronique (11 % des isolats cliniques). Excepté R. eburnea, toutes les espèces du complexe Rasamsonia argillacea ont déjà été isolées de prélèvements pulmonaires de patients atteints de mucoviscidose (67). En plus du risque d'infection invasive dans le cadre d'une immunodépression, un cas d'asthme récurrent chez un patient colonisé par R. argillacea a été décrit en 2012 par Marguet et al. L'éradication du filamenteux a entraîné une amélioration de la fonction respiratoire du patient (68).

Exophiala dermatitidis est un champignon dimorphique (filamenteux à température ambiante, levuriforme à 37°C) pouvant être retrouvé de façon transitoire ou chronique

au niveau des poumons des patients atteints de mucoviscidose. Sa description sera développée dans le chapitre suivant.

Une grande variété d'autres filamenteux peuvent être isolés sans qu'un éventuel caractère pathogène n'ait pu être affirmé : *Acrophialophora fusispora*, *Scedosporium prolificans*, *Paecilomyces variotii*, ainsi que les espèces des genres *Alternaria*, *Cladosporium* et *Penicillium* (55) (66).

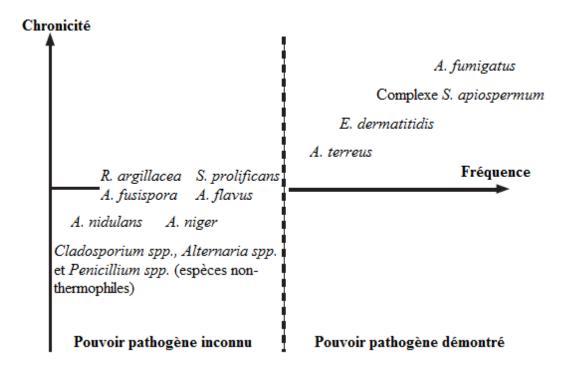


Figure 4 : Champignons filamenteux isolés dans la mucoviscidose selon leur pathogénicité et leur capacité de colonisation

(Modifié d'après Pihet et al., 2009) (57)

L'identification des champignons retrouvés dans la mucoviscidose se fait classiquement à partir des prélèvements respiratoires par examen direct et culture fongique. Elle se heurte à des problèmes de standardisation : volume de l'échantillon, choix des milieux de cultures, température et durée d'incubation (69).

A cela s'ajoute les problèmes causés par les espèces difficilement voire non cultivables ou encore nécessitant des interactions avec d'autres micro-organismes. Ces contraintes appliquées à *E. dermatitidis* seront développées dans le chapitre suivant.

Le développement des techniques de séquençage haut débit a permis une nouvelle approche : l'étude du mycobiome ou microbiome fongique, c'est-à-dire le séquençage direct des gènes de l'ensemble des espèces fongiques présentes dans un écosystème ou mycobiote, ici au niveau pulmonaire (70).

Une étude sur le microbiome bactérien et fongique de patients atteints de mucoviscidose a ainsi retrouvé 60 % d'espèces fongiques qui n'avaient pas été préalablement détectées par culture. De plus, une perte de la diversité bactérienne et fongique était associée à une dégradation de la fonction respiratoire (71).

Ainsi, cette nouvelle approche permettrait de mieux connaître la grande diversité des micro-organismes présents au niveau pulmonaire, que ce soit chez un individu sain ou chez un individu atteint de mucoviscidose, les interactions de ces micro-organismes entre eux et avec le système immunitaire ainsi que la physiopathologie responsable de l'atteinte pulmonaire, principale cause de mortalité de la mucoviscidose.

3. Exophiala spp.

3.1. Généralités

Les « levures noires » du genre *Exophiala* sont des micromycètes, pouvant présenter soit une morphologie levuriforme soit un aspect de champignon filamenteux et faisant partie du groupe des dématiés ou phaeohyphomycètes. Cette couleur sombre est liée à la présence de 1,8-dihydroxynaphtalène mélanine ou DHN mélanine au niveau de la paroi fongique, certaines espèces étant aussi capables de la secréter dans leur environnement. Ce pigment polymérique de haut poids moléculaire et ses métabolites sont utiles au micro-organisme. Ils lui offrent une protection vis-à-vis des rayonnements ultraviolets, des températures extrêmes, de la dessiccation et des métaux lourds ainsi qu'une défense vis-à-vis des prédateurs. La DHN mélanine intervient aussi dans le développement et la virulence du champignon (72).

Exophiala spp., et en particulier *E. dermatitidis*, est donc considéré comme un micromycète extrêmophile capable de se développer dans un environnement hostile aux autres espèces.

Le nom des différentes espèces a évolué au cours du temps du fait de ré-évaluations taxonomiques. Ainsi, *Exophiala dermatitidis* a été nommé jadis *Wangiella dermatitidis* et *Exophiala phaeomuriformis* a été nommé *Sarcinomyces phaeomuriformis*.

3.2. Habitats

Les « levures noires » du genre *Exophiala* ne sont pas présentes de façon ubiquitaire dans l'environnement.

D'après Sudhadham *et al.* (73), *E. dermatitidis* est absent du milieu naturel des régions tempérées. Dans les régions tropicales, il a été retrouvé sur des fruits ainsi que dans le tube digestif d'oiseaux et de chauve-souris. *E. dermatitidis* semble donc occuper une niche écologique particulière en se développant sur les fruits tropicaux et se répandant via les déjections d'animaux frugivores. Contrairement à ce qui était supposé jusque-là,

E. dermatitidis ne serait donc pas un champignon saprophyte du sol ou des végétaux.

Initialement présent uniquement dans la forêt tropicale, les « levures noires » du genre *Exophiala* ont trouvé dans les activités humaines des conditions propices à leur développement et leur diffusion mondiale.

En effet, *Exophiala* spp. est connu depuis de nombreuses années pour être présent en Asie dans les bains publics et les salles de bain (éviers, robinets, ...) (74).

Plus récemment, Matos *et al.* (75) a retrouvé ces « levures noires » dans les hammams ou bains turcs en Europe. Les principales espèces concernées sont *E. dermatitidis*, *E. phaeomuriformis* et *Exophiala mesophiala*. Elles y profitent d'un environnement favorable à leur croissance, pauvre en nutriments avec des températures et un taux d'humidité élevés. En effet, la quantité de « levures noires » retrouvée est inférieure dans les pièces adjacentes au hammam où la température y est plus basse (25°C au lieu de 60°C). De plus, la présence d'*Exophiala* spp. est beaucoup plus rare dans les saunas qui constituent un environnement plus sec. *Exophiala* spp. n'a pas non plus été retrouvé dans l'environnement des sources chaudes. Bien que la température comprise entre 20°C et 60°C soit favorable au développement de ces micromycètes, l'humidité de l'air y serait insuffisante (75).

La présence d'un abondant polysaccharide extracellulaire serait nécessaire à *Exophiala* spp. pour se développer à des températures supérieures à 40°C. Les souches déficientes n'ont en effet été retrouvées que dans les pièces adjacentes aux hammams, contrairement aux souches productrices (75).

D'autres niches écologiques pour *Exophiala* spp. ont été récemment découvertes. Une étude slovène (76) a ainsi observé la présence d'*Exophiala* spp., essentiellement *E. dermatitidis* et *E. phaeomuriformis*, sur 35 % des joints issus de 189 lave-vaisselles prélevés dans le monde entier. *Exophiala* spp. est donc capable de se développer dans cet environnement oligotrophe subissant des variations importantes de température et de pH ainsi qu'une salinité élevée. L'analyse de prélèvements domestiques réalisés dans la ville de Mersin en Turquie (77) a retrouvé cette colonisation des joints de lave-

vaisselles par *E. dermatitidis* et *E. phaeomuriformis* mais à un pourcentage plus faible (16 %). Les prélèvements réalisés sur des surfaces soumises à des températures plus basses (réfrigérateurs, pommeaux de douche, ...) n'ont quasiment pas permis de retrouver de « levures noires ».

L'autre importante niche écologique liée aux activités humaines se retrouve le long des voies de chemins de fer (78). En effet, les traverses en bois ou en béton traitées par la créosote, nom donné à l'huile issue du goudron de houille, présentent un taux élevé de « levures noires » du genre *Exophiala*. Ceci s'explique par la capacité d'*Exophiala* spp. à se développer dans les milieux riches en hydrocarbures (79), leur conférant un avantage sélectif vis-à-vis des autres champignons et des bactéries.

3.3. Impact clinique en médecine humaine

Bien que *Exophiala* spp. soit un champignon de l'environnement, sa présence dans les prélèvements biologiques ne doit pas être considérée comme une simple contamination. En effet, sur la trentaine d'espèces actuellement connues, dix-huit ont été décrites comme pathogènes ou colonisant l'Homme ou l'animal (80).

3.3.1. Infections cutanées et sous-cutanées

Exophiala spp. est décrit comme responsable de phaeohyphomycoses, de chromoblastomycoses, de mycétomes à grains noirs et d'onychomycoses en zones tropicales et tempérées (81). Ces atteintes sont d'origine traumatique (souillure tellurique d'une plaie, écharde, ...) (82). Les principales espèces retrouvées dans ces infections superficielles sont E. dermatitidis, Exophiala xenobiotica et Exophiala oligosperma (80).

3.3.2. Infections profondes

Exophiala spp. est aussi responsable d'infections disséminées au niveau pulmonaire, cardiaque, cérébral ou gastro-intestinal ainsi que de fongémies avec une mortalité supérieure à 40 % (83). E. dermatitidis est l'espèce la plus impliquée, suivi par E. oligosperma et E. phaeomuriformis (80).

Ces atteintes se retrouvent essentiellement chez les patients immunodéprimés (hémopathies, transplantés d'organes solides, dialysés chroniques, diabète, ...) (80). La colonisation du tube digestif chez les individus immunodéprimés avait été suggérée comme étant la porte d'entrée pour ces infections disséminées, notamment dans le cadre d'une réaction du greffon contre l'hôte gastro-intestinale (83). Néanmoins le portage digestif d'*E. dermatitidis* dans la population européenne est faible, de l'ordre de 0.5 % (84).

Les atteintes cérébrales de sujets immunocompétents semblent toucher exclusivement des jeunes asiatiques sans qu'une explication claire ne soit apportée (85). La survenue de cas groupés de méningites à *E. dermatitidis* aux États-Unis en 2002 dus à l'injection épidurale d'une préparation hospitalière de méthylprednisolone contaminée ont néanmoins permis d'exclure l'hypothèse d'une sensibilité spécifique des sujets asiatiques (86).

3.3.3. Sensibilité aux antifongiques

Badali *et al.* (87) ont étudié la sensibilité *in vitro* d'*E. dermatitidis* vis-à-vis de plusieurs antifongiques. L'amphotéricine B semble avoir une bonne activité contre ce champignon avec une CMI₉₀ Concentration Minimale Inhibitrice 90 % de 0,5 μg/ml. Parmi les antifongiques azolés, ce sont le posaconazole et l'itraconazole qui possèdent les CMI les plus basses avec des valeurs de CMI₉₀ de respectivement 0,125 μg/ml et 0,25 μg/ml, suivis par le voriconazole avec une CMI₉₀ de 0,5 μg/ml. Le fluconazole présente une activité trop faible pour être utilisé en thérapeutique. *E. dermatitidis* apparaît aussi comme insensible aux échinocandines du fait de la présence en trop faible quantité de 1,3-β-D-glucane au niveau de la paroi, qui est la cible de cette classe

de molécules. Ces résultats de sensibilité étaient indépendants de l'origine de la souche testée : localisation géographique, souche environnementale ou clinique, type d'infection, ...

On note cependant des résultats parfois contradictoires dans la littérature. Duarte *et al.* (88) observent ainsi une CMI plus importante pour l'amphotéricine B (CMI₅₀ de 1 μ g/ml et CMI₉₀ de 2 μ g/ml) alors que celle du voriconazole est retrouvée plus faible. Kondori *et al.* (89) observent eux aussi une CMI plus faible pour le voriconazole (CMI₉₀ de 0,008 μ g/ml).

Les CMI observées avec la terbinafine sont quant à elles compatibles avec les concentrations *in vivo* obtenues dans les études pharmacocinétiques, suggérant ainsi l'idée d'associer cette molécule aux autres molécules antifongiques (90).

Dans le cadre de la mucoviscidose, l'activité *in vitro* de la colistine (molécule antibiotique dotée d'une activité antifongique) vis-à-vis d'*E. dermatitidis* et la synergie observée entre la colistine et certains antifongiques (voriconazole, caspofungine et amphotéricine B) pourraient apporter des alternatives pour le traitement de ces patients en cas d'infections pulmonaires avec des souches résistantes aux antifongiques seuls (91).

Cependant, cette notion de résistance est difficile à établir, car il n'existe pas actuellement de valeurs seuils critiques définies pour *E. dermatitidis* ni de démonstration claire de corrélation entre l'activité *in vitro* et l'efficacité *in vivo* des antifongiques vis-à-vis de ce micromycète (87).

3.3.4. Prise en charge

Les atteintes superficielles nécessitent une prise en charge médico-chirurgicale qui ne pose généralement pas de difficultés : exérèse chirurgicale si accessible, traitement antifongique systémique par azolés ou amphotéricine B parfois associés à la terbinafine (92).

Les infections profondes sont plus difficiles à traiter, notamment les atteintes cérébrales qui entraînent un taux de mortalité élevé qu'importe la thérapeutique adoptée (85). La raison serait un passage insuffisant des antifongiques au niveau de la barrière hémato-encéphalique. Il est ainsi proposé d'utiliser préférentiellement le voriconazole ou le posaconazole qui possèdent une meilleure pénétration cérébrale (87).

3.4. Identification

3.4.1. Aspect macroscopique

Les espèces du genre *Exophiala* poussent lentement sur milieu de Sabouraud à 25°C, celles isolées en pathologie humaine sont capables de se développer à 37°C.

Les colonies atteignent un diamètre de 5 mm en 14 jours. Elles présentent initialement un aspect levuriforme : lisse en périphérie avec un aspect légèrement visqueux au centre. Elles deviennent veloutées ou duveteuses après trois à quatre semaines. La couleur est brune, noire ou vert-olive avec un verso foncé (93).



Figure 5 : Colonies d'E. dermatitidis sur milieu Sabouraud

Cultures à deux semaines (gauche) et six semaines (droite)

(Laboratoire de Parasitologie Mycologie, CHRU de Besançon, 2015)

E. dermatitidis est remarquable par sa capacité à se développer à une température de 42°C mais est inhibé par la présence de nitrites (94). *E. phaeomuriformis* est lui capable de se développer jusqu'à une température de 38°C.

3.4.2. Aspect microscopique

3.4.2.1. Exophiala dermatitidis

L'examen microscopique d'une culture jeune montre une majorité de formes levuriformes, ovoïdes à elliptiques (taille 2,5-3 x 3,5-5 μm). Ces cellules « *yeast-like* » sont initialement hyalines avec une paroi mince, elles acquièrent à maturité une pigmentation foncée et leur paroi s'épaissit.

Avec le vieillissement de la culture, le mycélium devient prédominant avec le développement d'un hyphe septé (cloisonné) hyalin à brun avec des parois lisses et une ramification plagiotrope (oblique). Les cellules ont une longueur comprise entre 18 et 25 µm pour un diamètre compris entre 1,5 et 3 µm. L'hyphe peut aussi prendre un aspect en « collier de perles » (toruloïde).

Les conidies se développent en amas à l'extrémité de conidiophores annelés. Ces conidies sont de forme ronde à ovale (taille 2,5-4 x 2-3 µm), hyalines à brun pâle et à bords lisses. *E. dermatitidis* peut présenter une autre forme de conidiogénèse de type « *Phialophora-like* ».

La présence de sclérotes est aussi décrite (93).

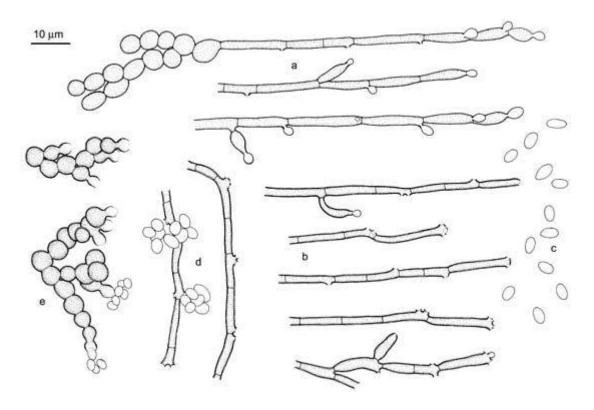


Figure 6 : E. dermatitidis, souche de référence CBS 748.88

a. Jeune appareil conidiogène avec conidies b. Cellules conidiogènes matures c.

Conidies d. têtes conidiennes e. Aspect « Phialophora-like » avec hyphe toruloïde

(Modifié d'après Hoog et al., 2000) (93)

3.4.2.2. Exophiala phaeomuriformis

L'hyphe est là aussi septé, parfois d'aspect toruloïde. Les conidies en paquets à l'extrémité des conidiophores sont de forme allongée (95).

La forme levuriforme peut évoluer vers la formation d'agrégats de sclérotes. Les cellules sont sphériques à irrégulières, d'un diamètre compris entre 12 et 20 µm avec un bourgeonnement multilatéral (93).

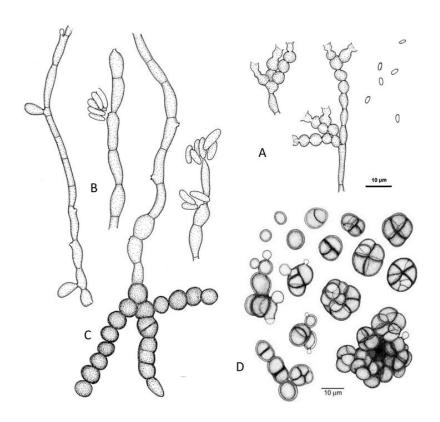


Figure 7: E. phaeomuriformis

A. Aspect de phialides « Phialophora-like » B. Hyphe avec production de d'annellospores latérales ou terminales (souche CBS 109135) C. Filaments toruloïdes se transformant en cellules méristématiques D. Cellules méristématiques et cellules bourgeonnantes (souche CBS 131.88)

(Modifié d'après Hoog et al., 2000 et Matos et al., 2003) (93) (95)

Les souches exclusivement levuriformes d'*E. dermatitidis* et d'*E. phaeomuriformis* ne sont pas différenciables morphologiquement. De plus, leurs profils physiologiques sont très proches à l'exception de la thermo-tolérance d'*E. dermatitidis*. Seules les méthodes de biologie moléculaire permettent de les séparer clairement.

3.4.3. Biologie moléculaire

Les techniques de biologie moléculaire permettent d'identifier un organisme en séquençant des régions du génome (en général des gènes codant pour des protéines de structure) présentant à la fois une variabilité inter-espèce et une stabilité intra-espèce suffisantes pour permettre une discrimination entre les différentes espèces de micro-organismes. La séquence obtenue à partir du micro-organisme à identifier est comparée à l'aide d'algorithmes bio-informatiques à une base de donnée regroupant les séquences de souches validées taxonomiquement (banques de données collaboratives internationales : INSD *International Nucleotide Sequence Database* regroupant GenBank, EMBL *European Molecular Biology Laboratory* et DDBJ *DNA Data Bank of Japan*; banques de données contrôlées : CBS *Centraalbureau voor Schimmelcultures* databank ou autres). Cette approche d'identification est appelée « *Barcoding* ».

En mycologie médicale, les régions ITS *Internal Transcribed Spacer* sont considérées comme le gène de référence pour l'identification de la plupart des espèces (96). Elles correspondent à des régions transcrites mais non-codantes localisées entre les gènes 18S et 5,8S de l'ARN ribosomal pour ITS1 et entre les gènes 5,8S et 28S de l'ARN ribosomal pour ITS2.

Après amplification par PCR et séquençage, l'analyse bio-informatique via BLAST *Basic Local Alignment Search Tool* identifie le pourcentage d'homologie par rapport aux séquences déposées de souches fongiques en théorie parfaitement identifiées du point de vue taxonomique.

Cependant la variabilité intra-spécifique des domaines ITS, due notamment à la difficulté de séquencer certaines régions homopolymériques et la mauvaise identification taxonomique des espèces de « levures noires » ayant permis la génération de séquences déposées dans Genbank (estimée à 27 % de l'ensemble des séquences fongiques ITS déposées dans INSD (97)) a conduit à mieux cibler les séquences pertinentes pour l'identification des « levures noires » par « Barcoding ». Ainsi, il a été proposé de restreindre la comparaison à une séquence non ambiguë de 30 à 50 paires de base présente au sein de la région ITS2, qui permet l'identification spécifique correcte des différentes espèces de « levure noire » (98).

Une alternative à la PCR séquençage a été proposée pour l'identification moléculaire des espèces d'*Exophiala* spp. les plus fréquemment rencontrées en routine (99). L'utilisation de sondes ciblant des polymorphismes nucléotidiques spécifiques

d'espèce a ainsi permis d'identifier rapidement par technique de réplication circulaire de l'ADN ou *Rolling Circle Amplification* des souches d'*E. dermatitidis*, *E. oligosperma*, *E. xenobiotica*, *Exophiala jeanselmei* et *Exophiala spinifera*.

3.4.4. Spectrométrie de masse

Depuis quelques années, une nouvelle technologie se développe dans les laboratoires de bactériologie et de mycologie. La désorption-ionisation laser assistée par matrice associée à un analyseur de temps de vol, qui forme l'acronyme *MALDI-TOF* en anglais, permet l'identification d'un micro-organisme isolé (bactérie, mycobactérie ou champignon) par comparaison du profil protéique obtenu après ionisation à une base de données constituée de souches préalablement identifiées (100).

Cette technologie permet un gain de temps important dans l'identification d'un microorganisme : durée d'analyse d'une dizaine de minutes, à comparer aux techniques phénotypiques ou génotypiques d'une durée de plusieurs heures à une journée.

Une étude turque a ainsi montré la capacité d'identifier de façon satisfaisante plusieurs espèces du genre *Exophiala (E. dermatitidis, E. phaeomuriformis, Exophiala crusticola* et *Exophiala heteromorpha)* par *MALDI-TOF* (101). Une colonie fraîche issue d'une souche cultivée sur gélose Sabouraud ou Columbia additionnée de sang de mouton, d'un diamètre compris entre un et deux millimètre, était prélevée puis analysée par *MALDI-TOF* après extraction par un mélange d'éthanol et d'acide formique.

Néanmoins, en raison du faible nombre de spectres du genre *Exophiala* dans les bases de données commercialisées (restriction à *E. dermatitidis* dans les bases de données commercialisées *Bruker*^{MD}), il serait nécessaire de constituer au préalable une base de données « maison » à partir de souches connues avant de pouvoir réaliser en routine l'identification des différentes espèces d'*Exophiala s*pp.

3.5 Exophiala dermatitidis dans la mucoviscidose

Initialement décrit par Haase *et al.* en 1990 (102), l'isolement d'*E. dermatitidis* dans les sécrétions respiratoires des patients atteints de mucoviscidose varie selon les pays : présent chez 19 % des patients suédois, chez 15 % des patients belges et chez 5 % des patients allemands (89) mais de façon beaucoup plus faible chez les patients français ou nord-américains (57). La prévalence de l'isolement respiratoire d'*E. dermatitidis* chez les patients atteints de mucoviscidose au CHRU de Besançon entre 2004 et 2014 était néanmoins de 9,5 % (103).

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer ces différences. Premièrement, les différences de mode de vie et notamment la fréquentation des hammams, lieux propices de par leur température au développement d'*Exophiala* spp. (75). La nature de l'anomalie génétique sous-jacente a aussi été évoquée comme facteur explicatif potentiel de ces différences de prévalence, comme cela avait été évoqué pour la colonisation par *P. aeruginosa* (104).

Cependant, la principale explication pourrait n'être que le manque de standardisation des techniques d'isolement employées en mycologie : volume de l'échantillon, choix des milieux de cultures, température et durée d'incubation (69).

P. aeruginosa inhibant la croissance des champignons par la production de pyocyanine et de 1-hydroxyphénazine, l'utilisation de milieux sélectifs est recommandée (57). Le milieu Erythritol-Chloramphénicol-Agar (94) associé à une incubation prolongée jusqu'à quatre semaines semble être le plus adapté à l'isolement d'E. dermatitidis (105). Présent de façon transitoire ou chronique dans les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose, E. dermatitidis est considéré habituellement comme inoffensif. Cependant, des cas d'infections respiratoires ou systémiques ont été décrits (102). Une corrélation a été établie entre insuffisance pancréatique et colonisation par E. dermatitidis. L'explication proposée étant que ces patients présenteraient une atteinte pulmonaire plus prononcée, nécessitant davantage l'administration de traitements antibiotiques qui favoriseraient la colonisation fongique (89).

L'isolement, notamment répété, de ce micromycète dans un prélèvement respiratoire chez un patient doit faire suspecter une mucoviscidose frustre non diagnostiquée en cas de signes cliniques associés évocateurs et faire entreprendre des investigations en ce sens. Ainsi, chez deux patientes de 68 et 87 ans chez lesquelles *E. dermatitidis* avait été isolé de façon répétée dans les secrétions bronchiques, l'examen de l'historique médical a révélé chez celles-ci des antécédents respiratoires (bronchectasies et hémoptysies chez l'une; ABPA, infections à *P. aeruginosa* et mycobactérie atypique chez la seconde) et gastro-intestinaux (chez la seconde : prolapsus rectal et stéatorrhée) évocateurs d'une mucoviscidose (103). Toutes deux ont présenté alors un test à la sueur positif. La première patiente présentait deux mutations compatibles avec une mucoviscidose (une de classe A, une de classe B), la seconde patiente était hétérozygote pour la mutation dF508 et porteuse d'une autre mutation rare du gène CFTR (103).

E. phaeomuriformis est une espèce étroitement liée à *E. dermatitidis*. Elle peut être retrouvée chez les patients atteints de mucoviscidose mais à une fréquence beaucoup plus faible (106).

4. Colonisation et typage moléculaire

L'isolement répété d'un micro-organisme fait suspecter une colonisation. Il est alors nécessaire de prouver la persistance d'une même souche par des techniques de typage. Celles-ci s'appuient sur l'étude du polymorphisme de marqueurs protéiques (typage moléculaire), de la taille de fragments d'ADN ou de séquences nucléotidiques (génotypage) (107).

4.1. Techniques disponibles en mycologie

4.1.1. Étude du polymorphisme de marqueurs protéiques

- MLLE Multilocus Enzyme Electrophoresis (108)

Dans cette technique, les enzymes obtenues après extraction cellulaire sont séparées par électrophorèse puis mises en évidence. Bien que possédant une bonne résolution, cette technique est chronophage car elle nécessite de combinés les résultats d'une dizaine d'enzymes pour permettre la comparaison de plusieurs souches.

4.1.2. Étude du polymorphisme de fragments d'ADN

- PFGE *Pulsed Field Gel Electrophoresis* ou électrophorèse en champs pulsé (107)

Utilisé pour le caryotypage des levures, cette méthode consiste à soumettre des chromosomes entiers ou de grands fragments d'ADN à plusieurs champs électriques d'orientation différente afin de les séparer. Technique de référence pour le typage des bactéries, elle est peu utilisée pour les champignons. La durée totale de l'analyse de l'ordre d'une semaine limite son utilisation pour de grandes séries.

- RFLP Restriction Fragment Lenght Polymorphism (108)

Après extraction, l'ADN est digéré par des enzymes de restriction qui exercent leur activité d'endonucléase au niveau de séquences spécifiques. Les mutations au niveau

de ces séquences entraînent une différence de digestion de l'ADN entre plusieurs souches (nombre et taille des fragments) qui se voit après électrophorèse. Afin d'être plus discriminant, il est possible d'ajouter une étape d'hybridation avec des sondes marquées spécifiques de séquences cibles.

Une variante consistant à appliquer cette méthode non pas sur le génome entier mais sur des fragments spécifiques préalablement amplifiés par PCR est appelée AFLP *Amplified Fragment Lenght Polymorphism* (107).

- RAPD *Random Amplified Polymorphic DNA* ou amplification aléatoire d'ADN polymorphe (108)

Plusieurs courtes séquences d'ADN définies arbitrairement sont utilisées comme amorces. L'éventuelle hybridation de ces amorces avec des séquences complémentaires dans le génome du micro-organisme se fait donc de façon aléatoire. L'analyse par électrophorèse sur gel des fragments obtenus après amplification donnera un profil particulier ou « *Fingerprint* » utilisable pour comparer différentes souches.

L'avantage de cette technique est qu'elle ne nécessite pas la connaissance préalable du génome étudié contrairement aux autres techniques de PCR pour lesquelles les amorces sont conçues selon des séquences cibles connues. Elle est donc utilisée pour l'étude des micro-organismes dont le génome est mal connu.

Ses principales limites sont la nécessité d'un ADN de bonne qualité (intact), une difficulté voire une subjectivité d'interprétation des images obtenues et donc une faible reproductibilité inter-laboratoire.

- STR *Short Tandem Repeats* ou séquences microsatellites (107)

Les microsatellites sont des séquences d'ADN répétées en tandem dont l'unité de répétition est comprise entre un et dix nucléotides. Ces séquences montrent un taux de polymorphisme élevé (10⁻² à 10⁻⁵) du nombre de répétitions. Après amplification par PCR, l'étude comparative de la taille des produits de PCR (fragments ou amplicons) permet de classer les souches entre elles. Cette comparaison est réalisée par électrophorèse sur gel ou capillaire après couplage avec un fluorochrome.

Cette technique est simple, rapide, d'interprétation aisée et ne nécessite que de très faibles quantités d'ADN. De plus, elle s'avère très reproductible et discriminante (109). Son pouvoir discriminant peut d'ailleurs être considérablement augmenté en multipliant le nombre de microsatellites étudiés.

Cette approche est ainsi très largement utilisée en mycologie depuis les années 2000 pour déterminer le génotype d'espèces fongiques impliquées en pathologie humaine (entre autres *C. albicans, C. glabrata, A. fumigatus...*) (110).

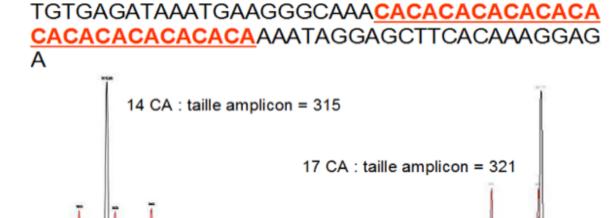


Figure 8 : Lecture après électrophorèse sur capillaire de fragments de différentes tailles issus du polymorphisme d'un microsatellite

Lecture : On observe en bleu un pic correspondant à un fragment de 315 paires de bases (dont 14 unités de répétitions CA) à gauche et un fragment de 321 paires de bases (dont 17 unités de répétitions CA) à droite.

Les pics en rouge correspondent à des fragments de taille connue ajoutés après PCR et servant d'étalon

(Laboratoire de Parasitologie Mycologie, CHRU de Besançon, 2015)

- Séquençage génétique (107)

L'étude de la variabilité de certaines séquences (régions ITS, sous-unités ribosomales ou gènes de ménages) par séquençage d'un gène isolé ou de plusieurs gènes en parallèle par MLST *Multilocus Sequence Typing* permet aussi de comparer plusieurs souches entre-elles.

4.2. Colonisation par les filamenteux

A. fumigatus ayant une large distribution dans l'environnement, une grande variété de spores sont inhalées régulièrement. C'est pourquoi une co-colonisation par plusieurs génotypes est observée chez la plupart des malades. Cependant un clone dominant est souvent retrouvé au long cours (58).

Au contraire, concernant les espèces présentes à un plus faible degré dans l'environnement (espèces du complexe *S. apiospermum* et *A. terreus*), un clone unique est conservé dans le temps malgré les traitements antifongiques (63) (111).

4.3. Colonisation par Exophiala spp.

Dans une étude de 2012, Packeu *et al.* ont génotypé par RAPD des souches d'*E. dermatitidis* et d'*E. phaeomuriformis* isolés chez des patients atteints de mucoviscidose. Chaque patient était colonisé par un clone unique présentant de légères variations au cours du temps (106). Ces résultats sont en concordance avec la distribution restreinte d'*Exophiala* spp. dans l'environnement.

Choisie pour des raisons de facilité d'exécution, la RAPD possède néanmoins une faible reproductibilité. La variabilité entre cinq expérimentations indépendantes a été évaluée à 15 % dans le travail de Packeu *et al.* (106). La mise en œuvre d'une autre technique plus reproductible peut donc sembler nécessaire pour confirmer ces résultats.

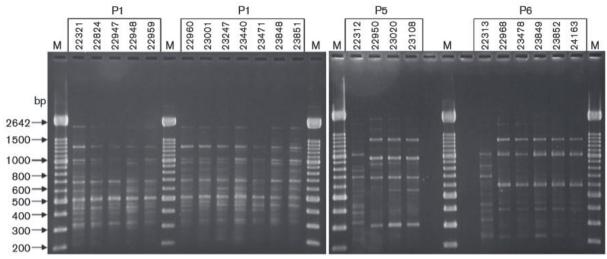


Figure 9 : Images obtenues après RAPD et migration sur gel

Lecture : Le patient P1 est colonisé par un clone, les patients P5 et P6 sont chacun colonisés successivement par deux clones

(Modifié d'après Packeu et al., 2012) (106)

4.4. Indice de Hunter

L'utilisation d'une technique de typage sur des souches possédant un potentiel lien épidémiologique nécessite préalablement de calculer son pouvoir discriminant à partir d'un panel de souches sans lien épidémiologique.

L'indice de Hunter D correspond à la probabilité de distinguer deux souches sans lien épidémiologique au sein d'une population test (112). Dérivé de l'indice de diversité de Simpson, il est aussi appelé « Indice numérique de la capacité discriminante des systèmes de typage ». La formule de calcul est présentée dans la figure suivante.

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^{s} x_j(x_j-1)$$

Figure 10 : Formule mathématique de l'indice de Hunter (d'après Hunter et al., 1988) (112)

Avec N le nombre total de souches dans l'échantillon test, s le nombre total de génotypes observés et x_i le nombre de souches appartenant au génotype j.

Si D = 0,98, il existe une probabilité de 0,02, soit 2 % de chances, d'affirmer à tort que deux souches sont identiques alors qu'elles sont en réalité différentes.

Pour un même nombre de souches N et un même nombre de génotypes s, l'indice de Hunter D sera d'autant plus élevé que la répartition des souches sera équivalente entre les génotypes.

Ainsi sur une population de 100 souches avec 20 génotypes différents, si chaque génotype est composé de 5 souches, l'indice de Hunter D est égal à 0,96. Au contraire si 81 souches appartiennent au même génotype, chaque autre génotype ne contenant qu'une souche, l'indice de Hunter D est égal à 0,36.

TRAVAIL PERSONNEL

1. Présentation de l'étude et des objectifs

Les « levures noires » du genre *Exophiala* sont isolées des sécrétions pulmonaires des patients atteints de mucoviscidose avec une fréquence très variable, comprise entre 1 et 19 % (57) (89). De plus, cette prévalence présente de fortes disparités géographiques dont l'origine est potentiellement multifactorielle : hétérogénéité génétique, diversité dans les modes de vie des populations et manque de standardisation dans les protocoles d'analyse mycologique des expectorations des patients atteints de mucoviscidose (89). Les données actualisées du laboratoire de Parasitologie Mycologie du CHRU de Besançon placent *E. dermatitidis* au cinquième rang des champignons filamenteux retrouvés chez les patients atteints de mucoviscidose au cours des dix dernières années (septembre 2005 à septembre 2015) avec 8,3 % des patients porteurs au moins une fois d'*E. dermatitidis*, loin derrière *A. fumigatus* (76,8 %) et *A. flavus* (47,0 %), mais très proche d'*A. terreus* (10,5 %) et des espèces du complexe *Scedosporium apiospermum* (9,9 %).

L'hypothèse du maintien ou non d'une colonisation permanente par *E. dermatitidis* chez les patients atteints de mucoviscidose n'a été jusqu'à présent étudiée que dans la cohorte de Packeu *et al.* (106). La plupart des patients restaient colonisés par un seul clone génotypiquement distinct de ceux des autres patients (106). Cependant, la technique utilisée (RAPD), permettant certes les études exploratoires chez les espèces dont le génome est mal connu, est peu reproductible et rend impossible les comparaisons de données inter-laboratoires. L'absence de technique alternative de typage d'*Exophiala* spp. dans la littérature, discriminante et reproductible et l'expérience du laboratoire dans le développement de techniques basées sur le polymorphisme des microsatellites nous a conduit à développer ce type de technique pour le typage d'*E. dermatitidis*.

Les objectifs de ce travail ont donc été:

- Développer une technique de typage moléculaire fiable et reproductible basée sur le polymorphisme des microsatellites pour *E. dermatitidis* à partir des données de son génome disponible sur les banques de données internationales de séquences.
- Réaliser en parallèle une collecte d'isolats environnementaux d'*Exophiala* spp. (joints de machines à café de la marque *Senseo^{MD}* et joints de lave-vaisselles), valider leur identification par PCR-séquençage des régions ITS afin de constituer ainsi, aux côtés de souches de références et d'isolats cliniques ou environnementaux stockés en biothèque, le panel d'isolats sans lien épidémiologique nécessaires à l'évaluation du pouvoir discriminant de la technique de typage développée.
- Appliquer cette technique au typage des isolats d'*E. dermatitidis* isolés chez les patients atteints de mucoviscidose suivis au CHRU de Besançon et collectés entre 2004 et 2015, afin d'étudier le caractère clonal ou non de la colonisation de ces patients.

2. Matériels et méthodes

2.1. Collection de souches d'Exophiala spp.

Les 112 souches et isolats d'*Exophiala* spp. inclus dans ce travail ont trois origines différentes :

- Des souches de référence déposées, provenant de la collection du CBS, Utrecht,
 Pays-Bas (n = 6).
- Des isolats collectés entre 2004 et 2015 par le laboratoire de Parasitologie Mycologie du CHRU de Besançon (n = 81). Elles provenaient d'expectorations de 14 patients atteints de mucoviscidose suivis au CHRU de Besançon (n = 71), d'isolats cliniques provenant de patients non atteints par la mucoviscidose (n = 8), d'un isolat provenant d'un contrôle de stérilité d'un circuit de CEC Circulation Extracorporelle et d'un isolat provenant d'un prélèvement d'évier réalisé dans un des services du CHRU de Besançon.
- D'isolats d'origine environnementale (n = 25) : 19 sont issus de prélèvements réalisés en 2012 au niveau de joints de lave-vaisselles de la région Franche-Comté suite aux travaux de Zalar *et al.* (76), les six autres isolats ont été obtenus en 2015 au cours de ce travail. Ces six isolats provenaient de prélèvements effectués au niveau de joints de lave-vaisselles (n = 4) et au niveau de joints de machines à café de la marque *Senseo^{MD}* (n = 2).

Les informations complètes concernant l'origine, la date d'isolement et l'identification d'espèce des souches et isolats d'*Exophiala* sp. incluses dans ce travail sont disponibles en annexe 1.

L'enquête environnementale réalisée pour ce travail est détaillée en annexe 2.

2.2. Extraction de l'ADN fongique

Deux techniques différentes ont été utilisées dans ce travail pour l'extraction de l'ADN fongique.

- Dneasy Plant Mini Kit de Qiagen^{MD}

Une pointe de colonies issues d'une culture pure âgée d'une semaine a été recueillie avec une öse stérile puis placée dans un tube contenant des billes en céramique *MagNa Lyser Green Beads* (*Roche^{MD}*, Meylan, France) et 200 µl de tampon de lyse (*Roche^{MD}*). Après trois cycles de vibrobroyage (6 000 tours/min pendant 30 secondes) dans l'automate *MagNa Lyser* (*Roche^{MD}*), entrecoupé de refroidissement dans la glace pendant une minute, l'extraction a été réalisée avec le kit *DNeasy Plant Mini Kit* (*Qiagen^{MD}*, Courtaboeuf, France) selon le mode opératoire du fournisseur (113).

Cette méthode a été utilisée lors de la phase initiale de mise au point et d'évaluation de la technique de typage (extraction plus fastidieuse et coûteuse mais génératrice d'un ADN de bonne qualité)

- Méthode CHELEX 100 de Bio-Rad^{MD}

Une pointe de colonies issues d'une culture pure âgée d'une semaine a été recueillie avec une öse stérile puis placée dans un tube contenant 200 µl d'eau distillée stérile et 100 µl de solution *CHELEX 100*. Cette solution est constituée de 0,1 % (wt/vol) de dodécylsulfate de sodium (*Sigma-Aldrich*^{MD}, Lyon, France), 1 % (vol/vol) de *Nonidet P-40* (*Sigma-Aldrich*^{MD}), 1 % (vol/vol) de *Tween 80* (*Sigma-Aldrich*^{MD}) et 15 % (wt/vol) de résine *CHELEX 100* (*Bio-Rad*^{MD}, Marnes-la-Coquette, France). Après 30 minutes à ébullition dans un bain-marie à 100°C et un cycle de centrifugation (14 000 tours/min pendant 10 minutes), un volume de 200 µl de surnageant a été recueilli (114). Cette méthode a été utilisée lors de la 2ème phase du travail (extraction simple, rapide et peu chère, mais ADN de qualité moindre, avec de nombreuses impuretés) après un essai comparatif préalable (non présenté).

Les extraits d'ADN fongique obtenus par ces deux méthodes ont ensuite été conservés à une température de +4°C.

2.3. Identification d'espèce des isolats d'Exophiala sp.

Pour chaque patient atteint de mucoviscidose colonisé par *Exophiala* sp., le premier isolat a d'abord été identifié sur des critères macro- et microscopique, puis identifié par PCR-séquençage des régions ITS des ADN ribosomaux selon le protocole recommandé par le Centre National des Mycoses et Antifongiques (Institut Pasteur, Paris) : utilisation des amorces V9D et LS266 (115) puis comparaison de la séquence obtenue sur l'interface web *BioloMics* du CBS (116) .

De la même manière, tous les autres isolats cliniques hors mucoviscidose et tous les isolats environnementaux de 2012 et de 2015 ont été identifiés à l'espèce.

De plus, six isolats environnementaux de 2015, à savoir quatre issus de joints de lave-vaisselles (6LV, 7LV, 26LV et 27LV) et deux issus de machines à café de la marque $Senseo^{MD}$ (10S et 30S) ont également été analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF de la marque $Bruker^{MD}$, en utilisant le protocole habituel après extraction par l'acide formique pur.

En parallèle, cinq souches d'*E. dermatitidis* (R12, R13, R14, R17 et R27) et 5 souches d'*E. phaeomuriformis* (R6, R9, R11, R16 et R24) ont également été analysées par spectrométrie de masse selon le même mode opératoire. Le logiciel utilisé était *IVD MALDI Biotyper* version 2.3, la base de données contenant trois spectres d'*E. dermatitidis* (VML, NRZ_133LFH et RVE_08IVML), mais aucun spectre des autres espèces du genre *Exophiala*.

2.4. Identification de cibles microsatellites au sein du génome d'Exophiala dermatitidis

L'ensemble des données du séquençage complet d'*E. dermatitidis* (Souche séquencée : *University of Texas & National Institutes of Health* UT/NIH 8656 = CBS 525.76 = *American Type Culture Collection* ATCC 34100) ont été téléchargées sur le site du NCBI *National Center for Biotechnology Information* en format FASTA (26,4 millions de bases) (117).

Ces données génomiques ont été soumises au logiciel en ligne *Tandem Repeats Finder* (118) en ciblant la recherche de microsatellite d'au moins 13 répétitions d'un motif de 3 à 10 nucléotides (119). Parmi les microsatellites ainsi identifiés, 13 cibles ont été retenues (exode 1 à exode 13) et des amorces PCR permettant leur amplification ont été dessinées à l'aide du logiciel en ligne *Primer 3* (120) (121) (122), en choisissant les paramètres par défaut, à savoir une température de fusion optimale de 60°C +/- 3 pour des amorces de 18 à 27 bases avec un optimal à 20.

Les cibles étudiées, incluant chacune un microsatellite, et les amorces PCR utilisées sont présentées dans le tableau suivant.

Cible	N° GenBank	Amorce forward (5'-3')	Amorce reverse (5'-3')	Motif microsatellite (répétitions)	Taille théorique amplicon
Exode 1	JH226132.1	ATAGTAGCCG TCGTCGTCGT	TGCATCTTTA GCACCATTGC	CGA (13)	274
Exode 2	JH226130.1	TGTCTGAGG AGTTCGCATT G	GATGCTGGAT GTTGGCATTT	ACC (14)	288
Exode 3	JH226136.1	CGCTCCATTT GTTGTACCA G	CTCACCCTCA CCTTCGACA C	TGG (13)	284
Exode 4	JH226136.1	TTTAGGCGG ACCATAACA CC	CACTGCTGC CAGTTCCAGT A	TGG (17)	291
Exode 5	JH226136.1	GCACGAATG AATTCGACA GC	TCTTCTCGTG ACACCACTG C	TCA (23)	252
Exode 6	JH226131.1	GGTAGTGGT CGGCGTCCT A	GGAGGAGTG GGTTGTGAA G	CTC (16)	259
Exode 7	JH226133.1	TGAGATAGT GCCCTGAGC AT	GGCCAATTG GGGTAATACT	GTG (14)	247
Exode 8	JH226133.1	TTATTCCCA TCTCGCTGAC	AGTGGTTCG GTTGGCTTGT A	CAC (16)	258
Exode 9	JH226133.1	CTCGGCTCTG CAAAGAAGT T	ACATGGTTGA TGCTCAGAC G	CAA (15)	246
Exode 10	JH226133.1	GGCAATGGC AACAACAAT AA	GTTGTGTCTG CGTTTGCATT	AAC (22)	287
Exode 10 « court »	JH226133.1	ACGGCAAAA AGCACAAGA AT	GTTGTGTCTG CGTTTGCATT	AAC (22)	121
Exode 11	JH226133.1	CTTGCGGTGT AGCTGTGGT	TGATCCCGCT GTGGAAGTA T	GGT (17)	253
Exode 12	JH226136.1	CAGCAAGGA GAAAAGCAA GC	GTGGACACT GACTGGGGT GT	CCTTTTC (14)	296
Exode 13	JH226130.1	CTCGGAAGA AGTGCCTAA CG	GATGACGGC GATGATTTCT T	CAAG (14)	330
Exode 13 « court »	JH226130.1	GTTCGTCGA AGCAGTTGA CA	GATGACGGC GATGATTTCT T	CAAG (14)	171

Tableau 5 : Couples d'amorces exodes

2.5. Évaluation des cibles microsatellites en PCR standard

Ces 13 cibles microsatellites ont été évaluées sur un panel-test de cinq souches sans lien épidémiologique d'*E. dermatitidis* (ADN extraits par *Dneasy Plant Mini Kit* de *Qiagen*^{MD}). Ce panel était composé d'une souche isolée à partir d'un joint de lavevaisselle d'origine morbihannaise (7LV), d'une souche isolée à partir d'un joint de lavevaisselle d'origine haute-saônoise (26LV) et de trois souches de référence (CBS 100341, CBS 149.90 et CBS 207.35).

Les réactions de PCR ont été réalisées avec un extrait d'ADN de 3 μl et un « mix PCR » de 17 μl. Pour chaque PCR, le milieu réactionnel était constitué de *FastStart PCR Master Mix 2X (Roche^{MD})*, les deux amorces étant ajustées à une concentration finale de 0,1 μM. Le cycle d'amplification PCR a inclus une étape d'incubation à 94°C pendant 3 minutes, 35 cycles d'amplification ont été réalisés, comprenant chacun une dénaturation de 30 secondes à 94°C, une hybridation des amorces à 65°C de 30 secondes et une phase d'élongation de 1 minute à 72°C, terminée par une élongation finale de 5 minutes.

Après amplification par PCR et migration sur un gel d'agarose à 3 %, les produits de PCR (amplicons) obtenus ont été analysés visuellement. Quatre couples d'amorces, permettant à la fois l'amplification des cinq extraits d'ADN testés et la visualisation de différence de taille des amplicons entre les cinq échantillons, ont été sélectionnés pour la suite de ce travail (exode 7, exode 9, exode 10 et exode 13).

2.6. Évaluation préalable des sondes marquées

Le même panel d'ADN de ces cinq souches a été retesté avec les couples d'amorces retenus, dont l'amorce *forward* était marqué par un fluorochrome. Les amorces *forward* pour exode 7 et exode 13 étaient couplées avec le fluorochrome *FAM*^{MD} (5-carboxyfluorescéine, absorption à 494 nm et émission à 518 nm). Celles pour exode 9 et exode 10 étaient couplés avec le fluorochrome *HEX*^{MD} (absorption à 535 nm et émission à 556 nm). Les fragments obtenus après PCR ont été analysés en analyse de

fragments (polymorphisme de la taille des amplicons), après ajout d'un mélange de fragments de taille connue couplés avec un fluorochrome 400HD ROX^{MD} (Applied Biosystems^{MD}, Foster City, États-Unis) servant d'étalon, sur séquenceur 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems^{MD}) par la plate-forme de séquençage et d'analyse de fragments de la structure fédérative de recherche 4234 (SFR FED 4234) située à l'UFR SMP Unité de Formation et de Recherche des Sciences Médicales et Pharmaceutiques (Hauts du Chazal, Besançon). Le logiciel GeneMapper^{MD} version 3.7 (Applied Biosystems^{MD}) a été utilisé pour déterminé la taille des fragments analysés.

Les amplicons ont d'abord été analysés individuellement (simplex). Deux couples d'amorces ont ensuite été modifiés afin de réduire la taille de l'amplicon généré (exode 10 et exode 13). Afin d'optimiser les coûts liés à la migration sur séquenceur pour l'analyse de fragments, cette modification des amorces *forward* pour deux cibles avait pour objectif de permettre le mélange pour une même souche et à parts égales des amplicons générés par deux couples d'amorces, amplicons de taille clairement différente et marqués par un fluorochrome différent (poolplex : exode 7 + exode 10 « court » et exode 9 + exode 13 « court »).

Enfin, un panel de huit souches d'*E. dermatitidis* isolées de huit patients distincts, atteints de mucoviscidose et extraites par méthode *CHELEX 100* (surnageant dilué extemporanément au 1/3 avec de l'eau ultra-pure de qualité biologie moléculaire) a été évalué avec les couples d'amorces exode 7, exode 9, exode 10 « court » et exode 13 « court » en simplex, puis en poolplex exode 7 + exode 10 « court » et exode 9 + exode 13 « court »).

Cette dernière approche (extraits d'ADN par méthode *CHELEX 100* et poolplex) a ensuite été appliquée à l'ensemble des souches à tester : souches de référence d'*Exophiala* spp., souches environnementales et souches cliniques d'*E. dermatitidis* et d'*E. phaeomuriformis*.

2.7. Performances de l'approche microsatellite comme outil de génotypage

La répétabilité de la méthode a été évaluée en testant trois fois chacun des trois ADN de souches distinctes dans une même série (PCR puis analyse de fragments). La

reproductibilité de la méthode a été évaluée en testant trois fois chacun des trois ADN de souches distinctes dans trois séries distinctes.

Le pouvoir discriminant de la méthode a été calculé par l'indice de Hunter (112), individuellement pour chaque marqueur (exode 7, exode 9, exode 10 « court » et exode 13 « court ») et en couplant deux, trois ou quatre de ces marqueurs. Le pouvoir discriminant a été calculé en incluant une souche de chaque patient bisontin atteint de mucoviscidose dans le panel, puis en excluant celles-ci (en émettant l'hypothèse d'une transmission croisée entre ces patients et donc d'isolats épidémiologiquement liés).

La spécificité de notre approche, dessinée pour le génotypage d'*E. dermatitidis*, a été évaluée en testant l'ensemble des souches environnementales d'*E. phaeomuriformis* (n = 9) et des souches de référence de *Rhinocladiella similis* (CBS 109135) et d'*E. jeanselmei* (CBS 507.90).

2.8. Évaluation du caractère clonal de la colonisation par *Exophiala dermatitidis*

Les 71 souches d'*E. dermatitidis* collectées depuis 2004 chez les 14 patients atteints de mucoviscidose ont été génotypées à partir d'ADN extrait par la méthode *CHELEX 100*, amplifiés puis analysés simultanément 2 à 2 en poolplex (marqueurs exode 7 + exode 10 « court » et exode 9 + exode 13 « court »).

2.9. Caractéristiques des patients atteints de mucoviscidose et colonisés par Exophiala dermatitidis

Les données suivantes ont été obtenues à partir du dossier clinique des patients atteints de mucoviscidose et colonisés par *E. dermatitidis*, complété par les données du système d'information du Laboratoire de Biologie Médicale du CHRU de Besançon *Laboserveur Inlog (Inlog Haemonetics^{MD}*, Signy, Suisse): sexe, âge (au premier isolement d'*Exophiala* sp.), insuffisance pancréatique (supplémentation ou non en enzymes pancréatiques), diabète (recours à une insulinothérapie ou non), colonisation préalable ou concomitante par *P. aeruginosa*, traitement préalable ou concomitant par

colistine inhalée, colonisation préalable ou concomitante par *A. fumigatus*, critères sérologiques d'ABPA (précipitines anti-*Aspergillus* et IgE anti-*Aspergillus fumigatus*) et traitement préalable ou concomitant par antifongiques azolés (itraconazole, voriconazole ou posaconazole).

3. Résultats

3.1. Enquête environnementale et identification des « levures noires » isolées

Sur les vingt-deux prélèvements de joints de lave-vaisselles, quatre étaient positifs à *Exophiala* sp. soit 18,2 %. Sur les 36 prélèvements de joints de machines à café de la marque *Senseo^{MD}*, trois étaient positifs à *Exophiala* sp. soit 8,3 %.

L'identification par séquençage des régions ITS a retrouvé trois *E. dermatitidis* (7LV, 26LV et 35S) et quatre *E. phaeomuriformis* (10S, 30S, 6LV et 27LV). L'isolat 35S n'ayant pu être conservé, il n'a pas été inclus dans l'étude de génotypage ni identifié par spectrométrie de masse.

L'identification par spectrométrie de masse n'a donné aucune identification au niveau de l'espèce (score ≥ 2). Une identification probable au niveau du genre (score $\geq 1,7$) a été obtenu pour deux isolats (sur 16 testés) : 26LV et R13. Devant le caractère décevant de ces résultats préliminaires et l'incapacité à discriminer *E. dermatitidis* de *E. phaeomuriformis* avec la base commerciale $Bruker^{MD}$, l'approche MALDI-TOF a été abandonnée.

3.2. Évaluation des couples d'amorces

Les 13 couples d'amorces dessinés avec le logiciel *Primer 3* ont permis l'amplification d'ADN d'*E. dermatitidis*. Dix couples sur 13 ont permis l'amplification des cinq extraits d'ADN testés initialement (7LV, 26LV, CBS 100341, CBS 149.90 et CBS 207.35). Parmi eux, quatre ont été sélectionné devant la qualité de l'amplification obtenue (intensité du signal) et la variabilité inter-échantillon de la taille des amplicons en gel d'agarose. La figure 11 illustre cette phase d'essai préliminaire (couples d'amorces pour les marqueurs exode 7 et exode 13).

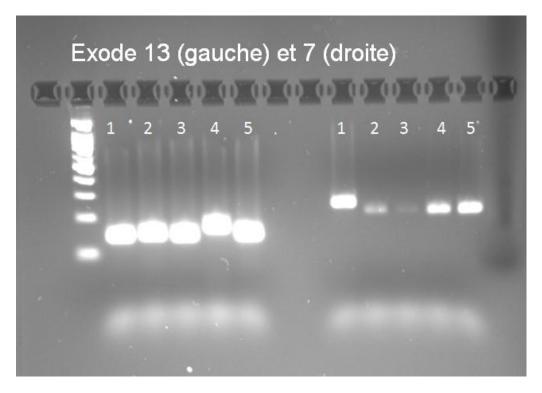


Figure 11: Visualisation des fragments obtenus après migration sur gel

Lecture: Couple d'amorces exode 13 (à gauche) et exode 7 (à droite)

1. Souche CBS 207.35 2. Souche CBS 149.90 3. Souche CBS 100341

4. Souche 26LV 5. Souche 7LV

(Laboratoire de Parasitologie Mycologie, CHRU de Besançon, 2015)

3.3. Visualisation des amplicons obtenus sur $Gene Mapper^{MD}$

Sur les 112 souches étudiées, des résultats complets, c'est-à-dire l'obtention de fragments détectables pour les quatre couples d'amorces (exode 7, exode 9, exode 10 « court » et exode 13 « court ») sont disponibles pour 94 d'entre elles. Les 18 souches restantes n'ont donné aucun résultat. Cinq souches (CHA et la totalité des souches issues de JAC) ont présenté un double pic (127 et 139 paires de bases, soit trois répétitions de quadruplets d'écart) avec exode 13 « court ».

La figure 12 illustre la lecture sur *GeneMapper^{MD}* de la taille des fragments obtenus par PCR poolplex et l'ensemble des résultats sont disponibles en annexe 3.

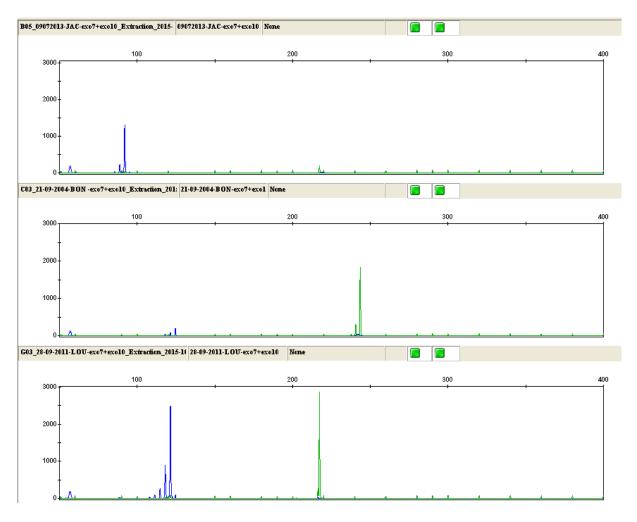


Figure 12 : Mesure de la taille des fragments sur Gene Mapper MD

Lecture : Exode 7 apparaît en vert et exode 10 « court » apparaît en bleu.

Le principal pic correspond à la longueur du fragment

Souche JAC 09/07/12: 217 et 91 paires de bases

Souche BON 21/09/04 : 244 et 124 paires de bases

Souche LOU 28/09/11 : 217 et 121 paires de bases

(Plate-forme de séquençage et d'analyse de fragments, UFR SMP de Besançon, 2015)

3.4. Performances de la technique développée

Des fragments de taille constante (+/- 0,3 bases) ont été obtenus lors des essais de répétabilité (trois ADN de souches distinctes testés trois fois au sein d'une même série) et de reproductibilité (trois ADN de souches distinctes testés trois fois dans trois séries distinctes).

Parmi les souches et isolats identifiés comme E. dermatitidis, des résultats ont été obtenus pour 93,1 % d'entre elles (94/101). Aucun résultat n'a été obtenu pour des souches ou isolats identifiés comme appartenant à une autre espèce (n = 11) : E. phaeomuriformis (n = 9), R. similis ou E. jeanselmei.

L'évaluation du pouvoir discriminant a été calculée en incluant les souches de référence (n = 4), les isolats environnementaux (n = 16) et les isolats cliniques du laboratoire de Parasitologie Mycologie du CHRU de Besançon hors patients atteints de mucoviscidose (n = 5) (rubrique « sans souches mucoviscidose »). Ont ensuite été incluses une souche isolée par patient atteint de mucoviscidose (n = 13) (rubrique « avec souches mucoviscidose »). Lorsque le couple d'amorces exode 13 « court » était considéré, les deux fragments 127 et 139 observés chez CHA et JAC ont été pris en compte.

	Exode 7	Exode 9	Exode 10	Exode 13	Génotype
	Exode /	Exode 9	« court »	« court »	complet
Sans souches	0,36	0,56	0,89	0,56	0,94
mucoviscidose	(n = 25)	(n = 25)	(n = 25)	(n = 26)	(n = 26)
Avec souches	0,29	0,54	0,84	0,53	0,89
mucoviscidose	(n = 38)	(n = 38)	(n = 38)	(n = 40)	(n = 40)

Tableau 6 : Indice de Hunter selon les couples d'amorces et les souches étudiées

Si on prend en compte trois couples d'amorces, le trio exode 7 + exode 10 « court » + exode « 13 » est aussi performant que les quatre couples d'amorces.

Le trio exode 7 + exode 9 + exode 10 « court » ne permet pas de différencier les

souches de CHA et JAC. De plus, le phénomène de doubles populations chez CHA et JAC n'est pas observable.

Le trio exode 9 + exode 10 « court » + exode 13 « court » ne permet pas lui de différencier les souches de référence CBS 100341 et CBS 149.90, à noter également qu'exode 9 n'augmente pas le pouvoir discriminant par rapport au duo exode 10 « court » et exode 13 « court ».

Le trio exode 7 + exode 9 + exode 13 « court » ne permet pas de différencier un grand nombre de souches, exode 10 « court » possédant le pouvoir discriminant le plus élevé parmi les couples d'amorces.

	Trio	Trio	Trio	Trio	Génotype	
	7 + 9 + 10	7 + 9 + 13	9 + 10 + 13	7 + 10 +13	complet	
Sans souches	0,93	0,63	0,93	0,94	0,94	
mucoviscidose	(n = 25)	(n = 26)	(n = 26)	(n = 26)	(n = 26)	
Avec souches	0,87	0,58	0,88	0,89	0,89	
mucoviscidose	(n = 38)	(n = 40)	(n = 40)	(n = 40)	(n = 40)	

Tableau 7 : Indice de Hunter selon le trio de couples d'amorces et les souches étudiées

En tenant compte uniquement de deux couples d'amorces, on observe que le duo exode 10 « court » et exode 13 « court » présente le pouvoir discriminant le plus important.

	Duo	Duo Duo		Génotype	
	10 + 7	10 + 9	10 + 13	complet	
Sans souches	0,92	0,93	0,93	0,94	
mucoviscidose	(n = 25)	(n = 25)	(n = 26)	(n = 26)	
Avec souches	0,87	0,87	0,88	0,89	
mucoviscidose	(n = 38)	(n = 38)	(n = 40)	(n = 40)	

Tableau 8 : Indice de Hunter selon le duo de couples d'amorces et les souches étudiées

3.5. Colonisation par *Exophiala dermatitidis* des patients atteints de mucoviscidose

Le suivi de la colonisation par *E. dermatitidis*, c'est-à-dire au moins deux souches isolées dont le génotype est connu, a pu être réalisé chez neuf patients atteints de mucoviscidose. Huit de ces patients étaient colonisés par un seul clone. Il n'a pas été possible de statuer avec certitude pour le patient JAC du fait du double pic avec le marqueur exode 13 « court » (un seul clone avec marqueur exode 13 « court » double ou coexistence de deux souches). Le rapport des pics s'est avéré constant pour ce patient (pic 139 dominant avec une aire 1,5 fois supérieure à celle du pic 127).

Parmi les patients atteints de mucoviscidose, 53,8 % (7/13) étaient colonisés par un clone commun (217-207-118-151) retrouvé aussi chez deux souches isolées de patients non atteints de mucoviscidose (CAR et MUH) et trois souches environnementales (R1, R10 et R21).

Exode 10 « court »	Exode 7	Exode 9	Exode 13 « court »	Souches non- mucoviscidose (n = 26)	Souches mucoviscidose (n = 14)
79	217	213	143	1 (CBS 100341)	0
79	244	213	143	1 (CBS 149.90)	0
112	217	213	143	1 (7LV)	0
115	247	249	151	1 (CBS 109139)	0
124	217	207	151	2 (R12, B1)	1 (KUE)
124	244	249	171	1 (ROY)	1 (BON)
127	217	207	151	4 (R13, R14, R19, VIT)	0
127	217	249	163	1 (26LV)	0
118	217	207	151	5 (R1, R10, R21, CAR, MUH)	7 (MER, ILT, SAL, MBA, POU, FRE, BUS)
118	241	249	139	1 (R7)	0
109	217	252	151	0	1 (REI)
130	217	207	151	2 (R8, R17)	0
121	217	207	151	3 (R25, R27, R28)	2 (JAS, LOU)
82	247	240	139	1 (CBS 207.35)	0
91	217	213	127	1 (CHA)	1 (JAC)
91	217	213	139	1 (CHA)	1 (JAC)

Tableau 9 : Répartition des génotypes selon les souches

Note : Pour faciliter la lecture, exode 10 « court » a été placé à gauche

3.6. Caractéristiques des patients atteints de mucoviscidose et colonisés par Exophiala dermatitidis

L'âge moyen au premier isolement d'*E. dermatitidis* était de 20,5 ans (4 à 87 ans). Si l'on exclu le diagnostic tardif de mucoviscidose pour la patiente LOU décrit dans la partie 3.5. des généralités (103), l'âge moyen était de 15,4 ans (4 à 30 ans). Le sexe ratio était de neuf hommes pour cinq femmes.

Parmi les 14 patients de la cohorte étudiée, 86 % souffraient d'insuffisance pancréatique exocrine (supplémentation en enzymes pancréatiques) et 36 % ont développé un diabète insulino-dépendant. Au niveau bactérien, 93 % présentaient une colonisation préalable ou concomitante à *P. aeruginosa* et 64 % avaient déjà reçu un traitement par colistine en aérosol. Au niveau fongique, la totalité des patients présentaient une colonisation préalable ou concomitante à *A. fumigatus*, 79 % remplissaient les critères sérologiques d'ABPA (précipitines anti-*Aspergillus* et IgE anti-*Aspergillus fumigatus*) et 57 % avaient déjà reçu un traitement par antifongiques azolés (itraconazole, voriconazole ou posaconazole).

Ces résultats sont disponibles dans le tableau suivant.

Patient	Sexe	Age 1er isolement	Insuf. pancréatique	Diabète	P. aeruginosa	Colistine	A. fumigatus	ABPA	Antifongiques
POU	M	15	oui	oui	oui	non	oui	oui	oui
MBA	M	14	oui	oui	oui	non	oui	oui	oui
JAC	M	16	oui	non	oui	oui	oui	oui	non
LOU	F	87	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui
BON	M	21	oui	oui	oui	oui	oui	non	oui
KUE	F	5	oui	non	oui	non	oui	non	non
BUS	M	4	oui	non	oui	oui	oui	oui	non
FRE	M	6	oui	non	non	non	oui	non	non
REI	M	29	oui	non	oui	non	oui	oui	non
SAL	F	28	non	non	oui	oui	oui	oui	non
JAS	F	30	non	non	oui	oui	oui	oui	oui
TAG	M	16	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui
ILT	M	7	oui	non	oui	oui	oui	oui	oui
MER	F	9	oui	non	oui	oui	oui	oui	oui

Tableau 10 : Caractéristiques des patients de la cohorte étudiée

4. Discussion

Notre travail a permis de mettre au point et d'évaluer une nouvelle technique de typage d'*Exophiala* spp., et d'appliquer cette technique au suivi de la colonisation par *Exophiala dermatitidis* de patients atteints de mucoviscidose.

Pour ce faire, nous avons dû au préalable réaliser une enquête environnementale pour constituer un panel suffisant d'isolats/souches sans lien épidémiologique, en ciblant notamment les joints de lave-vaisselles comme précédemment décrit (76). Ces prélèvements ont ainsi retrouvé un taux de colonisation par Exophiala spp. de 18,2 %, qui est proche de celui de Döğen et al. (77) (16 %). Ce taux de colonisation était plus élevé (35 %) dans les travaux de Zalar et al. (76). Les deux espèces (E. dermatitidis et E. phaeomuriformis) ont été retrouvées, comme dans les travaux de Dögen et al. (77) et de Zalar et al. (76) ainsi que lors de l'enquête épidémiologique réalisée en 2012 en Franche-Comté (données non publiées, Laboratoire de Parasitologie Mycologie du CHRU de Besançon). Nous avions choisi d'investiguer les machines à café de la marque Senseo^{MD}, car elles possèdent des caractéristiques proches de celles des lavevaisselles, à savoir un joint associé à de fortes variations de température et d'hygrométrie ainsi que la présence de matière organique. Un taux de colonisation des joints de machines à café de la marque Senseo^{MD} de 8,3 % a été retrouvé, avec l'isolement des deux espèces (E. dermatitidis et E. phaeomuriformis). Ces résultats prouvent que les « levures noires » du genre Exophiala, micromycètes extrêmophiles, sont capables de coloniser cette niche écologique. L'origine hydrique (nappe phréatique) de ces « levures noires » a été évoquée (123).

Parmi les logements étudiés, il n'a pas été retrouvé de colonisation concomitante des joints de lave-vaisselle et de machine à café de la marque *Senseo^{MD}*. L'hypothèse d'une contamination fongique via le réseau de distribution d'eau (123) (124) n'a donc pas pu être prouvée.

Concernant l'identification d'*Exophiala* spp. par spectrométrie de masse *MALDI-TOF*, le faible nombre de spectres d'*Exophiala* spp. dans la base de données $Bruker^{MD}$ (uniquement trois spectres d'*E. dermatitidis*) ne permet pas d'obtenir une identification fiable au niveau de l'espèce des isolats étudiés (score ≥ 2). La constitution d'une base de données « maison » est donc actuellement indispensable pour obtenir une identification fiable comme l'ont montré les travaux d'Özhak-Baysan *et al.* (101).

L'absence dans la littérature d'une technique de typage d'*Exophiala* spp. fiable et reproductible nous a conduit à mener ce travail. En effet, la seule technique décrite dans la littérature pour le génotypage d'*E. dermatitidis* était la RAPD (106), qui rend de plus impossible les comparaisons de données inter-laboratoires. Notre choix technique s'est porté vers l'évaluation du polymorphisme des microsatellites par analyse de fragments, technique maîtrisée au laboratoire (125) (126) (127).

Treize cibles microsatellites ont été identifiées à partir du génome d'E. dermatitidis (souche CBS 525.76), parmi celles-ci dix ont permis l'amplification des cinq extraits d'ADN testés initialement (7LV, 26LV, CBS 100341, CBS 149.90 et CBS 207.35). Les quatre couples d'amorces avec la meilleure amplification obtenue (intensité du signal) et la plus grande variabilité inter-échantillon de la taille des amplicons en gel d'agarose ont ainsi été sélectionnés (exode 7, exode 9, exode 10 et exode 13). Le marquage des amorces par un fluorochrome permet une lecture aisée de la taille des fragments par électrophorèse sur capillaire. Il est possible d'optimiser les coûts liés à la migration sur séquenceur pour l'analyse de fragments en mélangeant pour une même souche et à parts égales des amplicons générés par deux couples d'amorces, amplicons de taille clairement différente et marqués par un fluorochrome différent (poolplex). L'ADN nécessaire peut de plus être aisément obtenu par extraction simple, rapide et peu chère (CHELEX 100) (114). L'évaluation des performances de cette technique a montré une parfaite répétabilité et une parfaite reproductibilité. Celle-ci peut de plus être garantie par l'utilisation systématique d'une souche de référence, passée dans chaque série, ou d'un mélange d'amplicons de taille connu, utilisé comme contrôle de migration (127).

Aucun amplicon n'a été observé avec les souches environnementales d'*E. phaeomuriformis* ou les souches de référence d'*E. jeanselmei* et de *R. similis*. Les amorces définies dans ce travail semblent donc spécifiques vis-à-vis d'*E. dermatitidis*. L'absence d'amplicon pour cinq isolats d'*Exophiala* sp. et deux préalablement séquencés comme *E. dermatitidis* nécessitera de réaliser ou vérifier l'identification moléculaire de ces isolats. Une typabilité (128) imparfaite (absence d'amplification confirmée pour certaines souches d'*Exophiala* spp.) est néanmoins peu probable car les quatre marqueurs sont uniformément touchés. Un problème d'extraction d'ADN doit être prioritairement vérifié. La stabilité *in vitro* des marqueurs (capacité à générer le même profil sur des repiquages successifs du micro-organisme) n'a pas pu être, faute de temps, effectué au cours de ce travail (nécessité de subcultures sur au minimum 30 jours) et devra également être évaluée (128).

Par contre, la technique a montré un excellent pouvoir discriminant. Ce dernier a été évalué par le calcul de l'indice de Hunter à partir de souches sans lien épidémiologique (112). L'indice de Hunter D est égal à 0,94 soit 6 % de risque d'erreur de présenter deux souches indépendantes comme identiques. Cet indice diminue à 0,89 si l'on inclut une souche par patient atteint de mucoviscidose. Parmi les couples d'amorces testés, exode 10 « court » possède le pouvoir discriminant intrinsèque le plus élevé, avec D égal respectivement à 0,89 et à 0,84. Si notre stratégie a évalué 4 marqueurs, le nombre de couples d'amorces utilisés pourrait à l'avenir être diminué sans réduire les performances. En effet, le trio exode 7 + exode 10 « court » + exode « 13 » est aussi performant que le quatuor testé. Si l'on souhaite se limiter à deux couples d'amorces, le duo exode 10 « court » + exode 13 « court » est le plus discriminant. Dans cette configuration, les deux amplicons obtenus étant de taille voisine, l'utilisation d'un couple d'amorces « long » avec un couple d'amorces « court », chacun marqué avec un fluorochrome différent, serait indispensable. La technique pourrait être en outre être simplifiée en réalisant des PCR multiplex. Les isolats des patients CHA et JAC, avec un double pic pour le marqueur exode 13, nécessitent d'être revérifiés, notamment en génotypant, à partir d'une subculture, un nombre conséquent de colonies d'E. dermatitidis. La persistance d'un double pic incitera ensuite à cloner et séquencer les

produits PCR pour vérifier que les deux pics correspondent effectivement au microsatellite et non à une amplification non escomptée.

La question du caractère haploïde ou diploïde d'*E. dermatitidis* reste posée. Cette espèce semble pouvoir se présenter sous les deux formes, mais la forme haploïde est très majoritairement retrouvée (129). L'hypothèse d'une souche diploïde, homozygote pour trois marqueurs et hétérozygote pour le dernier, peut donc également être envisagée dans le cas du patient JAC.

L'hypothèse du maintien ou non d'une colonisation permanente par *E. dermatitidis* chez les patients atteints de mucoviscidose n'a été jusqu'à présent étudiée que dans la cohorte de Packeu *et al.* (106). La plupart des patients restaient colonisés par un seul clone génotypiquement distinct de ceux des autres patients (106).

Le suivi de la colonisation par *E. dermatitidis*, c'est à dire au moins deux souches isolées de génotype connu, a pu être réalisé chez 64,3 % des patients atteints de mucoviscidose de notre cohorte. Chacun de ces patients étaient colonisés par un seul clone à l'exception du patient JAC qui était colonisé par deux clones retrouvés dans chacun de ses prélèvements. Ce phénomène mis en évidence par un double pic en analyse de fragments ne peut être observé en RAPD.

Aucune variation génotypique au cours du temps n'a été observée dans notre cohorte contrairement à ce qui avait été observé sur les profils RAPD par Packeu *et al.* (106).

Une corrélation entre insuffisance pancréatique externe et colonisation par *E. dermatitidis* avait été mise en évidence par Kondori *et al.* (89). L'explication proposée étant que ces patients présenteraient une atteinte pulmonaire plus prononcée, nécessitant davantage l'administration de traitements antibiotiques qui favoriseraient la colonisation fongique. Ce lien entre insuffisance pancréatique, fonction pulmonaire altérée et colonisation par *E. dermatitidis* est visible dans la cohorte de patients étudiée dans ce travail. En effet, 86 % des patients étaient supplémentés en enzymes pancréatiques, 93 % présentaient une colonisation préalable ou concomitante par *P. aeruginosa* et la totalité une colonisation préalable ou concomitante par *A. fumigatus*.

Un clone commun a été retrouvé chez 53,8 % des patients atteints de mucoviscidose de la cohorte étudiée. Ce clone a aussi été retrouvé chez des patients non atteints de mucoviscidose et dans des prélèvements environnementaux de Franche-Comté.

L'existence d'un lien épidémiologique « géographique » entre ces prélèvements cliniques et environnementaux doit être envisagée. L'étude d'un plus grand nombre de souches d'origines géographiques différentes permettrait de trancher sur l'existence ou non d'un génotype majoritaire. En effet, cette inégalité géographique pourrait être aussi bien la conséquence d'un pouvoir discriminant insuffisant des couples d'amorces utilisés, qu'un réel lien épidémiologique « géographique » entre souches environnementales et patients atteints de mucoviscidose d'une même région.

Notre travail a donc permis l'évaluation d'une technique fiable et robuste de typage d'*E. dermatitidis* et de monter le caractère clonal de la colonisation des patients atteints de mucoviscidose par ce micromycète. La source initiale de contamination des patients n'a jamais été identifiée et l'environnement domestique de ces patients colonisés par *E. dermatitidis* n'a jamais été étudié. Il serait ainsi intéressant d'étudier de potentiels réservoirs dans l'environnement proche, en particulier domestique, des patients et de comparer le profil génotypique des souches domestiques et cliniques afin d'identifier la ou les sources possibles de contamination de ces patients. Notre technique de typage basée sur le polymorphisme de microsatellites et développée dans ce travail serait ainsi un outil accessible, fiable et reproductible pour une étude multicentrique visant à identifier de telles sources.

Annexe 1 : Souches de référence, isolats environnementaux et isolats cliniques du laboratoire de Parasitologie Mycologie du CHRU de Besançon

Nom	Origine	Date isolement	Espèce
CBS 100341	Souche de référence	-	E. dermatidis
CBS 109135	Souche de référence	-	R. similis
CBS 507.90	Souche de référence	-	E. jeanselmei
CBS 109139	Souche de référence	-	E. dermatidis
CBS 149.90	Souche de référence	-	E. dermatidis
CBS 207.35	Souche de référence	-	E. dermatidis
10S	Senseo ^{MD}	01/02/15	E. phaeomuriformis
30S	Senseo ^{MD}	01/02/15	E. phaeomuriformis
6LV	Lave-vaisselle	01/02/15	E. phaeomuriformis
7LV	Lave-vaisselle	01/02/15	E. dermatidis
26LV	Lave-vaisselle	01/02/15	E. dermatidis
27LV	Lave-vaisselle	01/02/15	E. phaeomuriformis
R1	Lave-vaisselle	01/06/12	E. dermatidis
R6	Lave-vaisselle	01/06/12	E. phaeomuriformis
R7	Lave-vaisselle	01/06/12	E. dermatidis
R8	Lave-vaisselle	01/06/12	E. dermatidis
R9	Lave-vaisselle	01/06/12	E. phaeomuriformis
R10	Lave-vaisselle	01/06/12	E. dermatidis
R11	Lave-vaisselle	01/06/12	E. phaeomuriformis
R12	Lave-vaisselle	01/06/12	E. dermatidis
R13	Lave-vaisselle	01/06/12	E. dermatidis
R14	Lave-vaisselle	01/06/12	E. dermatidis
R16	Lave-vaisselle	01/06/12	E. phaeomuriformis
R17	Lave-vaisselle	01/06/12	E. dermatidis
R19	Lave-vaisselle	01/06/12	E. dermatidis
R21	Lave-vaisselle	01/06/12	E. dermatidis
R24	Lave-vaisselle	01/06/12	E. phaeomuriformis
R25	Lave-vaisselle	01/06/12	E. dermatidis

R27	Lave-vaisselle	01/06/12	E. dermatidis
R28	Lave-vaisselle	01/06/12	E. dermatidis
B1	Lave-vaisselle	01/06/12	E. dermatidis
EVI	Évier CHRU	31/03/15	E. dermatidis
CEC	Matériel médical	29/06/15	E. dermatidis
CAR	Respiratoire	14/04/12	E. dermatidis
HAW	Respiratoire	13/06/12	E. dermatidis
MUH	Peau	11/08/10	E. dermatidis
VIT	Respiratoire	09/12/13	E. dermatidis
FRA	Ongle	08/08/08	E. dermatidis
СНА	Sinus	17/02/10	E. dermatidis
CHE	Ongle	26/11/10	E. dermatidis
ROY	Peau	06/05/05	E. dermatidis
MER	Mucoviscidose	03/04/13	E. dermatidis
ILT	Mucoviscidose	14/03/13	E. dermatidis
TAG	Mucoviscidose	15/01/14	E. dermatidis
JAS	Mucoviscidose	10/09/13	E. dermatidis
POU	Mucoviscidose	27/08/09	E. dermatidis
POU	Mucoviscidose	10/11/09	E. dermatidis
POU	Mucoviscidose	01/07/10	E. dermatidis
POU	Mucoviscidose	25/08/10	E. dermatidis
POU	Mucoviscidose	12/12/10	E. dermatidis
POU	Mucoviscidose	09/06/11	E. dermatidis
POU	Mucoviscidose	17/09/11	E. dermatidis
POU	Mucoviscidose	07/02/12	E. dermatidis
POU	Mucoviscidose	11/04/12	E. dermatidis
POU	Mucoviscidose	30/08/12	E. dermatidis
POU	Mucoviscidose	21/12/12	E. dermatidis
POU	Mucoviscidose	19/02/13	E. dermatidis
POU	Mucoviscidose	14/05/13	E. dermatidis
POU	Mucoviscidose	27/08/13	E. dermatidis
POU	Mucoviscidose	10/01/14	E. dermatidis

POU	Mucoviscidose	26/02/14	E. dermatidis
POU	Mucoviscidose	03/06/14	E. dermatidis
POU	Mucoviscidose	24/11/14	E. dermatidis
POU	Mucoviscidose	24/02/15	E. dermatidis
POU	Mucoviscidose	12/06/15	E. dermatidis
MBA	Mucoviscidose	26/05/10	E. dermatidis
MBA	Mucoviscidose	13/10/10	E. dermatidis
MBA	Mucoviscidose	25/10/10	E. dermatidis
MBA	Mucoviscidose	18/11/10	E. dermatidis
MBA	Mucoviscidose	13/01/11	E. dermatidis
MBA	Mucoviscidose	08/03/11	E. dermatidis
MBA	Mucoviscidose	01/06/11	E. dermatidis
MBA	Mucoviscidose	05/10/11	E. dermatidis
MBA	Mucoviscidose	24/02/12	E. dermatidis
MBA	Mucoviscidose	12/04/12	E. dermatidis
MBA	Mucoviscidose	05/09/12	E. dermatidis
MBA	Mucoviscidose	18/06/13	E. dermatidis
MBA	Mucoviscidose	17/09/13	E. dermatidis
MBA	Mucoviscidose	07/11/13	E. dermatidis
MBA	Mucoviscidose	07/01/14	E. dermatidis
MBA	Mucoviscidose	11/03/14	E. dermatidis
MBA	Mucoviscidose	23/06/14	E. dermatidis
MBA	Mucoviscidose	04/11/14	E. dermatidis
MBA	Mucoviscidose	27/02/15	E. dermatidis
MBA	Mucoviscidose	24/03/15	E. dermatidis
MBA	Mucoviscidose	09/06/15	E. dermatidis
BUS	Mucoviscidose	13/03/14	E. dermatidis
BUS	Mucoviscidose	05/06/14	E. dermatidis
BUS	Mucoviscidose	06/08/14	E. dermatidis
BUS	Mucoviscidose	17/09/14	E. dermatidis
BUS	Mucoviscidose	22/01/15	E. dermatidis
BUS	Mucoviscidose	22/04/15	E. dermatidis

FRE	Mucoviscidose	18/09/13	E. dermatidis
FRE	Mucoviscidose	04/12/13	E. dermatidis
FRE	Mucoviscidose	07/12/13	E. dermatidis
FRE	Mucoviscidose	06/03/14	E. dermatidis
JAC	Mucoviscidose	09/04/08	E. dermatidis
JAC	Mucoviscidose	07/12/10	E. dermatidis
JAC	Mucoviscidose	09/07/13	E. dermatidis
JAC	Mucoviscidose	27/11/13	E. dermatidis
REI	Mucoviscidose	26/03/14	E. dermatidis
REI	Mucoviscidose	13/06/14	E. dermatidis
REI	Mucoviscidose	02/09/14	E. dermatidis
LOU	Mucoviscidose	14/02/11	E. dermatidis
LOU	Mucoviscidose	17/05/11	E. dermatidis
LOU	Mucoviscidose	28/09/11	E. dermatidis
BON	Mucoviscidose	21/09/04	E. dermatidis
BON	Mucoviscidose	28/02/06	E. dermatidis
SAL	Mucoviscidose	14/01/08	E. dermatidis
SAL	Mucoviscidose	03/12/08	E. dermatidis
KUE	Mucoviscidose	14/12/11	E. dermatidis
KUE	Mucoviscidose	03/07/14	E. dermatidis

Note : La souche CBS 109135, actuellement rattachée à l'espèce *R. similis*, était antérieurement considérée comme appartenant à l'espèce *E. phaeomuriformis* (95).

Annexe 2 : Recherche d'*Exophiala* spp. au niveau des joints de lavevaisselles et de machines à café de la marque $Senseo^{MD}$

L'objectif principal de cette enquête épidémiologique était de collecter des isolats d'*Exophiala* sp. sans lien épidémiologique. Les objectifs annexes étaient d'investiguer une éventuelle nouvelle niche écologique pour *Exophiala* spp. constituée des joints de machines à café de la marque *Senseo^{MD}* ainsi qu'évaluer la contamination croisée entre plusieurs appareils, machine à café de la marque *Senseo^{MD}* et lave-vaisselle, connectés à un même réseau de distribution d'eau.

Les travaux de Zalar *et al.* (76) et Döğen *et al.* (77) ainsi que l'enquête épidémiologique réalisée en 2012 dans la région Franche-Comté ont montré la colonisation par *Exophiala* spp. des lave-vaisselles au niveau de leur joint, ceci à un pourcentage de 35 % pour Zalar *et al.* et de 16 % pour Döğen *et al.* Il a été émis l'hypothèse qu'*Exophiala* spp., micromycète extrêmophile, pouvait coloniser d'autres niches écologiques de nature semblable, c'est-à-dire présentant de fortes variations de température et d'hygrométrie, associées à la présence de matière organique ainsi qu'à un même support d'adhérence (joint).

Les machines à café de la marque *Senseo^{MD}* ont été choisies car elles remplissent ces quatre critères contrairement aux machines à café des principales autres marques qui sont dépourvues de joint. Leur relative abondance a aussi été un critère décisif dans le choix de ce support d'étude.

Entre le mois de décembre 2014 et le mois de février 2015, 36 joints de machines à café de la marque *Senseo^{MD}* ont été prélevés par écouvillonnage dans toute la France. Si possible, le joint de lave-vaisselle était prélevé en parallèle. Vingt-deux joints de lave-vaisselles ont ainsi été écouvillonnés. Les prélèvements étaient ensuite ensemencés sur une gélose Sabouraud et une gélose au Dichloran-Glycérol ou DG 18, cette dernière étant plus adaptée à l'isolement des moisissures xérophiles (130), puis incubés à 30°C pendant 21 jours. L'identification des colonies observées au genre *Exophiala* était réalisée au niveau macroscopique et microscopique.

Sur les 22 prélèvements de joints de lave-vaisselles, quatre étaient positifs à *Exophiala* sp. soit 18,2 %, ce qui correspond au pourcentage retrouvé par Döğen *et al.* (77). Sur les 36 prélèvements de joints de machines à café de la marque *Senseo^{MD}*, trois étaient positifs à *Exophiala* sp. soit 8,3 %.

Exophiala spp. a été retrouvé uniquement dans des prélèvements réalisés chez des particuliers. Aucune machine à café de la marque *Senseo^{MD}* prélevée dans les salles de repos des hôpitaux n'est positive.

En plus de l'obtention de sept isolats d'*Exophiala* sp., ces résultats indiquent que bien que présentes à un faible taux (8,3 %) les « levures noires » du genre *Exophiala* sont capables de coloniser les joints des machines à café de la marque *Senseo^{MD}*. Aucun lien n'a été observé entre colonisation du lave-vaisselle et colonisation de la machine à café de la marque *Senseo^{MD}*.

Les résultats détaillés sont présentés dans le tableau suivant.

Numéro	Département	Origine	Senseo ^{MD}	Lave-vaisselle
1	Doubs	Particulier	Négatif	Non réalisé
2	Doubs	Particulier	Négatif	Négatif
3	Finistère	Particulier	Négatif	Non réalisé
4	Finistère	Particulier	Négatif	Non réalisé
5	Finistère	Professionnel	Négatif	Non réalisé
6	Morbihan	Particulier	Négatif	Exophiala sp.
7	Morbihan	Particulier	Négatif	Exophiala sp.
8	Morbihan	Particulier	Négatif	Négatif
9	Morbihan	Particulier	Négatif	Non réalisé
10	Morbihan	Particulier	Exophiala sp.	Négatif
11	Morbihan	Particulier	Négatif	Non réalisé
12	Morbihan	Professionnel	Négatif	Non réalisé
13	Doubs	Particulier	Négatif	Non réalisé
14	Doubs	Particulier	Négatif	Non réalisé
15	Haute-Saône	Particulier	Négatif	Négatif
16	Doubs	Professionnel	Négatif	Négatif
17	Doubs	Particulier	Négatif	Négatif
18	Doubs	Particulier	Négatif	Négatif
19	Hérault	Particulier	Négatif	Non réalisé
20	Doubs	Particulier	Négatif	Négatif
21	Doubs	Professionnel	Négatif	Négatif
22	Doubs	Hospitalière	Négatif	Non réalisé
23	Doubs	Particulier	Négatif	Négatif
24	Doubs	Hospitalière	Négatif	Non réalisé
25	Doubs	Particulier	Négatif	Négatif
26	Haute-Saône	Particulier	Négatif	Exophiala sp.
27	Haute-Saône	Particulier	Négatif	Exophiala sp.
28	Haute-Saône	Particulier	Négatif	Négatif
29	Seine-Saint-Denis	Particulier	Non réalisé	Négatif
30	Côte-d'Or	Particulier	Exophiala sp.	Négatif

31	Côte-d'Or	Professionnel	Négatif	Non réalisé
32	Rhône	Hospitalière	Négatif	Non réalisé
33	Morbihan	Particulier	Non réalisé	Négatif
34	Morbihan	Particulier	Non réalisé	Négatif
35	Doubs	Particulier	Exophiala sp.	Négatif
36	Doubs	Particulier	Négatif	Négatif
37	Doubs	Hospitalière	Négatif	Non réalisé
38	Doubs	Hospitalière	Négatif	Non réalisé
39	Doubs	Hospitalière	Négatif	Non réalisé

Tableau 11 : Résultats des prélèvements réalisés en 2015 pour l'enquête épidémiologique sur la colonisation des joints de lave-vaisselles et de machines à café de la marque Senseo^{MD}

Annexe 3: Longueur des fragments selon la souche et le couple d'amorces

Nom	Exode 7	Exode 9	Exode 10 « court »	Exode 13 « court »
CBS 100341	217	213	79	143
CBS 109135	rien	rien	rien	rien
CBS 507.90	rien	rien	rien	rien
CBS 109139	247	249	115	151
CBS 149.90	244	213	79	143
CBS 207.35	247	240	82	139
10S	rien	rien	rien	rien
30S	rien	rien	rien	rien
6LV	rien	rien	rien	rien
7LV	217	213	112	143
26LV	217	249	127	163
27LV	rien	rien	rien	rien
R1	217	207	118	151
R6	rien	rien	rien	rien
R7	241	249	118	139
R8	217	207	130	151
R9	rien	rien	rien	rien
R10	217	207	118	151
R11	rien	rien	rien	rien
R12	217	207	124	151
R13	217	207	127	151
R14	217	207	127	151
R16	rien	rien	rien	rien
R17	217	207	130	151
R19	217	207	127	151
R21	217	207	118	151
R24	rien	rien	rien	rien

R25	217	207	121	151
R27	217	207	121	151
R28	217	207	121	151
B1	217	207	124	151
EVI	rien	rien	rien	rien
CEC	rien	rien	rien	rien
CAR	217	207	118	151
HAW	rien	rien	rien	rien
MUH	217	207	118	151
VIT	217	207	127	151
FRA	rien	rien	rien	rien
СНА	217	213	91	127 + 139
CHE	rien	rien	rien	rien
ROY	244	249	124	171
MER	217	207	118	151
ILT	217	207	118	151
TAG	rien	rien	rien	rien
JASMIN	217	249	121	171
POU 27/08/09	217	207	118	151
POU 10/11/09	217	207	118	151
POU 01/07/10	217	207	118	151
POU 25/08/10	217	207	118	151
POU 12/12/10	217	207	118	151
POU 09/06/11	217	207	118	151
POU 17/09/11	217	207	118	151
POU 07/02/12	217	207	118	151
POU 11/04/12	217	207	118	151
POU 30/08/12	217	207	118	151
POU 21/12/12	217	207	118	151
POU 19/02/13	217	207	118	151
POU 14/05/13	217	207	118	151
POU 27/08/13	217	207	118	151
POU 10/01/14	217	207	118	151
POU 26/02/14	217	207	118	151

POU 03/06/14	217	207	118	151
POU 24/11/14	217	207	118	151
POU 24/02/15	217	207	118	151
POU 12/06/15	217	207	118	151
MBA 26/05/10	217	207	118	151
MBA 13/10/10	217	207	118	151
MBA 25/10/10	217	207	118	151
MBA 18/11/10	217	207	118	151
MBA 13/01/11	217	207	118	151
MBA 08/03/11	217	207	118	151
MBA 01/06/11	217	207	118	151
MBA 05/10/11	217	207	118	151
MBA 24/02/12	217	207	118	151
MBA 12/04/12	217	207	118	151
MBA 05/09/12	217	207	118	151
MBA 18/06/13	217	207	118	151
MBA 17/09/13	217	207	118	151
MBA 07/11/13	217	207	118	151
MBA 07/01/14	217	207	118	151
MBA 11/03/14	217	207	118	151
MBA 23/06/14	217	207	118	151
MBA 04/11/14	217	207	118	151
MBA 27/02/15	217	207	118	151
MBA 24/03/15	217	207	118	151
MBA 09/06/15	217	207	118	151
BUS 13/03/14	217	207	118	151
BUS 05/06/14	217	207	118	151
BUS 06/08/14	217	207	118	151
BUS 17/09/14	217	207	118	151
BUS 22/01/15	217	207	118	151
BUS 22/04/15	217	207	118	151
FRE 18/09/13	217	207	118	151
FRE 04/12/13	217	207	118	151
FRE 07/12/13	217	207	118	151

FRE 06/03/14	217	207	118	151
JAC 09/04/08	217	213	91	127 + 139
JAC 07/12/10	217	213	91	127 + 139
JAC 09/07/13	217	213	91	127 + 139
JAC 27/11/13	217	213	91	127 + 139
REI 26/03/14	217	252	109	151
REI 13/06/14	217	252	109	151
REI 02/09/14	217	252	109	151
LOU 14/02/11	217	207	121	151
LOU 17/05/11	217	207	121	151
LOU 28/09/11	217	207	121	151
BON 21/09/04	244	249	124	171
BON 28/02/06	244	249	124	171
SAL 14/01/08	217	207	118	151
SAL 03/12/08	217	207	118	151
KUE 14/12/11	rien	rien	rien	rien
KUE 03/07/14	217	207	124	151

BIBLIOGRAPHIE

- Haute Autorité de Santé. Le dépistage néonatal systématique de la mucoviscidose en France: états des lieux et perspectives après 5 ans de fonctionnement [Internet]. c2009 [cited 2015 Aug 6]. Available from: http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2009-04/rapport_depistage_neonatal_systematique_de_la_mucoviscidose_en_france.pdf
- 2. Registre français de la mucoviscidose. Bilan des données 2013 [Internet]. c2015 [cited 2015 Aug 6]. Available from: http://www.vaincrelamuco.org/sites/default/files/registre-2013.pdf
- 3. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. Science. 1989;245(4922):1066–73.
- 4. Aleksandrov AA, Aleksandrov LA, Riordan JR. CFTR (ABCC7) is a hydrolyzable-ligand-gated channel. Pflüg Arch. 2007;453(5):693–702.
- 5. Linsdell P, Hanrahan JW. Glutathione permeability of CFTR. Am J Physiol. 1998;275(1 Pt 1):C323–6.
- 6. Hryciw DH, Guggino WB. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and the outwardly rectifying chloride channel: a relationship between two chloride channels expressed in epithelial cells. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2000;27(11):892–5.
- 7. Rubenstein RC, Lockwood SR, Lide E, Bauer R, Suaud L, Grumbach Y. Regulation of endogenous ENaC functional expression by CFTR and ΔF508-CFTR in airway epithelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2011;300(1):L88–101.
- 8. Cystic Fibrosis Mutation Database [Internet]. c2011 [cited 2015 Aug 6]. Available from: http://www.genet.sickkids.on.ca/ConsortiumDataPage1.html
- 9. Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. Cell. 1993;73(7):1251–4.
- 10. Castellani C, Cuppens H, Macek M, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. J Cyst Fibros. 2008;7(3):179–96.
- 11. Munck A, Roussey M. Le dépistage néonatal de la mucoviscidose : stratégie et résultats nationaux. Arch Pédiatrie. 2008;15:S1–6.
- 12. Biomnis. Trypsine Immuno-Réactive [Internet]. c2013 [cited 2015 Aug 6]. Available from: http://www.biomnis.com/referentiel/liendoc/precis/TRYPSINE_IMMUNO-REACTIVE.pdf
- 13. Travert G. Trypsine immunoréactive [Internet]. EM-Consulte. c2003 [cited 2015 Aug 6].

- Available from: http://www.em-consulte.com/article/61158/trypsine-immunoreactive
- Cisbio Bioassays. RIA-gnost® Trypsin [Internet]. c2011 [cited 2015 Aug 6]. Available from: http://riacis.iba.globulevs.com/sites/default/files/ressources/01-FR-RgTrypsin-Mod11_0.pdf
- 15. California Department of Public Health. Automated Dissociated Enhanced Lanthanide Fluoro Immunoassay System (AutoDELFIA) for the Determination of Thyrotropin (TSH), 17 Hydroxyprogesterone (17 OHP), and Immunoreactive Trypsin (IRT) [Internet]. [cited 2015 Aug 6]. Available from: https://www.cdph.ca.gov/programs/GDSP/Documents/APPENDIX%205G%20Automate d%20Dissociated%20Enhanced%20%28AutoDELFIA%29%20for%20%28TSH%29,%2017-Hydrox%20%28.pdf
- 16. Elucigene Diagnostics. Elucigene® CF30v2 Mode d'emploi [Internet]. c2014 [cited 2015 Aug 6]. Available from: http://www.elucigene.com/wp-content/uploads/2014/08/CF030BYFR002.pdf
- 17. Claustres M, Guittard C, Bozon D, Chevalier F, Verlingue C, Ferec C, et al. Spectrum of CFTR mutations in cystic fibrosis and in congenital absence of the vas deferens in France. Hum Mutat. 2000;16(2):143–56.
- 18. Nguyen-Khoa T, Borgard J-P, Marchand M, Sitruk-Khalfon D, Feuillet M-N, Feldmann D, et al. Qualités analytiques des techniques de dosage et comparaison des procédures utilisées pour le test de la sueur. Ann Biol Clin. 2012;70(1):5–12.
- 19. Sermet-Gaudelus I, Munck A, Rota M, Roussey M, Feldmann D. Recommandations françaises pour la réalisation et l'interprétation du test de la sueur dans le cadre du dépistage néonatal de la mucoviscidose. Arch Pédiatrie. 2010;17(9):1349–58.
- 20. Sermet-Gaudelus I, Girodon E, Roussel D, Deneuville E, Bui S, Huet F, et al. Measurement of nasal potential difference in young children with an equivocal sweat test following newborn screening for cystic fibrosis. Thorax. 2010;65(6):539–44.
- 21. Sarles J, Barthellemy S, Férec C, Iovanna J, Roussey M, Farriaux JP, et al. Blood concentrations of pancreatitis associated protein in neonates: relevance to neonatal screening for cystic fibrosis. Arch Dis Child. 1999;80(2):F118–22.
- 22. Haute Autorité de Santé. Place de la stratégie couplant les dosages de la trypsine immunoréactive (TIR) et de la protéine associée à la pancréatite (PAP) dans le dépistage systématique de la mucoviscidose en France [Internet]. c2015 [cited 2015 Aug 6]. Available from: http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2015-06/place_de_la_strategie_couplant_les_dosages_de_la_tir_et_de_la_pap_dans_le_depista ge_systematique_de_la_mucoviscidose_en_france.pdf
- 23. Davis PB. Cystic fibrosis since 1938. Am J Respir Crit Care Med. 2006;173(5):475–82.
- 24. Bombieri C, Claustres M, De Boeck K, Derichs N, Dodge J, Girodon E, et al. Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. J Cyst Fibros. 2011;10 Suppl 2:S86–102.
- 25. Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR, et al.

- Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. J Pediatr. 2008;153(2):S4–14.
- 26. Thumerelle C. L'infection respiratoire dans la mucoviscidose : le poids de l'infection dans l'évolution de la mucoviscidose, les prélèvements pour l'étude microbiologique des sécrétions bronchiques et les critères cliniques de l'infection. Rev Mal Respir. 2003;20(2 Pt 2):S37–48.
- 27. Gelfond D, Borowitz D. Gastrointestinal Complications of Cystic Fibrosis. Clin Gastroenterol Hepatol. 2013;11(4):333–42.
- 28. Mocanu E, Shattock R, Barton D, Rogers M, Conroy R, Sheils O, et al. All azoospermic males should be screened for cystic fibrosis mutations before intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril. 2010;94(6):2448–50.
- 29. Durupt S, Khenifer S, Zaouche S, Josserand RN, Reix P, Bellon G, et al. Les manifestations ORL révélatrices de la mucoviscidose : 11 cas. Rev Médecine Interne. 2011;32:S120.
- 30. World Health Organization. Classification of Cystic Fibrosis and Related Disorders [Internet]. c2000 [cited 2015 Aug 6]. Available from: http://www.cfww.org/docs/who/2002/who_report_classification_of_cf_and_related_disord.pdf
- 31. Launois-Rollinat S. Fonctions non ventilatoires [Internet]. c2012 [cited 2015 Aug 6]. Available from: http://unf3s.cerimes.fr/media/paces/Grenoble_1112/launois_rollinat_sandrine_p11/launois_rollinat_sandrine_p11.pdf
- 32. Cole AM, Dewan P, Ganz T. Innate antimicrobial activity of nasal secretions. Infect Immun. 1999;67(7):3267–75.
- 33. Boucher RC. Cystic fibrosis: a disease of vulnerability to airway surface dehydration. Trends Mol Med. 2007;13(6):231–40.
- 34. Mall M, Grubb BR, Harkema JR, O'Neal WK, Boucher RC. Increased airway epithelial Na+ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. Nat Med. 2004;10(5):487–93.
- 35. Balamayooran G, Batra S, Fessler MB, Happel KI, Jeyaseelan S. Mechanisms of neutrophil accumulation in the lungs against bacteria. Am J Respir Cell Mol Biol. 2010;43(1):5–16.
- 36. Smith JJ, Travis SM, Greenberg EP, Welsh MJ. Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. Cell. 1996;85(2):229–36.
- 37. Schroeder TH, Reiniger N, Meluleni G, Grout M, Coleman FT, Pier GB. Transgenic cystic fibrosis mice exhibit reduced early clearance of Pseudomonas aeruginosa from the respiratory tract. J Immunol. 2001;166(12):7410–8.
- 38. Armstrong DS, Hook SM, Jamsen KM, Nixon GM, Carzino R, Carlin JB, et al. Lower airway inflammation in infants with cystic fibrosis detected by newborn screening.

- Pediatr Pulmonol. 2005;40(6):500-10.
- 39. Tirouvanziam R, Khazaal I, Péault B. Primary inflammation in human cystic fibrosis small airways. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2002;283(2):L445–51.
- 40. Verhaeghe C, Remouchamps C, Hennuy B, Vanderplasschen A, Chariot A, Tabruyn SP, et al. Role of IKK and ERK pathways in intrinsic inflammation of cystic fibrosis airways. Biochem Pharmacol. 2007;73(12):1982–94.
- 41. Tabary O, Muselet C, Escotte S, Antonicelli F, Hubert D, Dusser D, et al. Interleukin-10 inhibits elevated chemokine interleukin-8 and regulated on activation normal T cell expressed and secreted production in cystic fibrosis bronchial epithelial cells by targeting the I(k)B kinase alpha/beta complex. Am J Pathol. 2003;162(1):293–302.
- 42. Hallows KR, Fitch AC, Richardson CA, Reynolds PR, Clancy JP, Dagher PC, et al. Upregulation of AMP-activated kinase by dysfunctional cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in cystic fibrosis airway epithelial cells mitigates excessive inflammation. J Biol Chem. 2006;281(7):4231–41.
- 43. Lenoir G, Vrielynck S, Clairicia M, Afsa Fezaa D, Sorin M, Sermet-Gaudelus I. Infection bactérienne et mucoviscidose. Rev Francoph Lab. 2007;37(397):49–57.
- 44. Hudson VL, Wielinski CL, Regelmann WE. Prognostic implications of initial oropharyngeal bacterial flora in patients with cystic fibrosis diagnosed before the age of two years. J Pediatr. 1993;122(6):854–60.
- 45. Kosorok MR, Zeng L, West SE, Rock MJ, Splaingard ML, Laxova A, et al. Acceleration of lung disease in children with cystic fibrosis after Pseudomonas aeruginosa acquisition. Pediatr Pulmonol. 2001;32(4):277–87.
- 46. May TB, Shinabarger D, Maharaj R, Kato J, Chu L, DeVault JD, et al. Alginate synthesis by Pseudomonas aeruginosa: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. Clin Microbiol Rev. 1991;4(2):191–206.
- 47. Parkins MD, Floto RA. Emerging bacterial pathogens and changing concepts of bacterial pathogenesis in cystic fibrosis. J Cyst Fibros. 2015;14(3):293–304.
- 48. Hansen CR. Stenotrophomonas maltophilia: to be or not to be a cystic fibrosis pathogen. Curr Opin Pulm Med. 2012;18(6):628–31.
- 49. De Baets F, Schelstraete P, Van Daele S, Haerynck F, Vaneechoutte M. Achromobacter xylosoxidans in cystic fibrosis: prevalence and clinical relevance. J Cyst Fibros. 2007;6(1):75–8.
- 50. Courtney JM, Dunbar KE, McDowell A, Moore JE, Warke TJ, Stevenson M, et al. Clinical outcome of Burkholderia cepacia complex infection in cystic fibrosis adults. J Cyst Fibros. 2004;3(2):93–8.
- 51. Ona-Nguema G, Roose-Amsaleg C, Paolozzi L, Liébart J-C, Bauda P, Bodilis J, et al. Microbiologie. Dunod; 2015. 540 p.
- 52. Alexander BD, Petzold EW, Reller LB, Palmer SM, Davis RD, Woods CW, et al. Survival

- after lung transplantation of cystic fibrosis patients infected with Burkholderia cepacia complex. Am J Transplant. 2008;8(5):1025–30.
- 53. Coolen-Allou N, Burgel P-R. Mycobactéries non tuberculeuses et mucoviscidose. J Anti-Infect. 2012;14(1):35–41.
- 54. Gilljam M, Scherstén H, Silverborn M, Jönsson B, Ericsson Hollsing A. Lung transplantation in patients with cystic fibrosis and Mycobacterium abscessus infection. J Cyst Fibros. 2010;9(4):272–6.
- 55. Cimon B, Chabasse D, Bouchara J-P. Rôle des champignons dans la pathologie respiratoire au cours de la mucoviscidose. Rev Francoph Lab. 2007;37(397):59–65.
- 56. Muthig M, Hebestreit A, Ziegler U, Seidler M, Müller F-M. Persistence of Candida species in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. Med Mycol. 2010;48(1):56–63.
- 57. Pihet M, Carrere J, Cimon B, Chabasse D, Delhaes L, Symoens F, et al. Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis--a review. Med Mycol. 2009;47(4):387–97.
- 58. Vanhee LM, Symoens F, Bouchara J-P, Nelis HJ, Coenye T. High-resolution genotyping of Aspergillus fumigatus isolates recovered from chronically colonised patients with cystic fibrosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2008;27(10):1005–7.
- 59. 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;26(12):879–86.
- 60. 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;37 Suppl 3:S225–64.
- 61. Maturu VN, Agarwal R. Prevalence of Aspergillus sensitization and allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis: systematic review and meta-analysis. Clin Exp Allergy. 2015;
- 62. Baxter CG, Dunn G, Jones AM, Webb K, Gore R, Richardson MD, et al. Novel immunologic classification of aspergillosis in adult cystic fibrosis. J Allergy Clin Immunol. 2013;132(3):560–6.e10.
- 63. Cimon B, Zouhair R, Symoens F, Carrère J, Chabasse D, Bouchara J-P. Aspergillus terreus in a cystic fibrosis clinic: environmental distribution and patient colonization pattern. J Hosp Infect. 2003;53(1):81–2.
- 64. Cimon B, Carrère J, Vinatier JF, Chazalette JP, Chabasse D, Bouchara JP. Clinical significance of Scedosporium apiospermum in patients with cystic fibrosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2000;19(1):53–6.
- 65. Zouhair R, Rougeron A, Razafimandimby B, Kobi A, Bouchara J-P, Giraud S. Distribution of the different species of the Pseudallescheria boydii/Scedosporium apiospermum complex in French patients with cystic fibrosis. Med Mycol. 2013;51(6):603–13.

- 66. Chotirmall SH, McElvaney NG. Fungi in the cystic fibrosis lung: bystanders or pathogens? Int J Biochem Cell Biol. 2014;52:161–73.
- 67. Giraud S, Favennec L, Bougnoux M-E, Bouchara J-P. Rasamsonia argillacea species complex: taxonomy, pathogenesis and clinical relevance. Future Microbiol. 2013;8(8):967–78.
- 68. Marguet C, Favennec L, Matray O, Bertout S, Giraud S, Couderc L, et al. Clinical and microbiological efficacy of micafungin on Geosmithia argillacea infection in a cystic fibrosis patient. Med Mycol Case Rep. 2012;1(1):79–81.
- 69. Borman AM, Palmer MD, Delhaes L, Carrère J, Favennec L, Ranque S, et al. Lack of standardization in the procedures for mycological examination of sputum samples from CF patients: a possible cause for variations in the prevalence of filamentous fungi. Med Mycol. 2010;48 Suppl 1:S88–97.
- 70. Botterel F, Angebault C, Bougnoux M-E. Le mycobiome humain : actualités et perspectives. Rev Francoph Lab. 2015;45(469):67–73.
- 71. Delhaes L, Monchy S, Fréalle E, Hubans C, Salleron J, Leroy S, et al. The airway microbiota in cystic fibrosis: a complex fungal and bacterial community--implications for therapeutic management. PloS One. 2012;7(4):e36313.
- 72. Couché E. Synthèse asymétrique de naphtalènones naturelles d'origine fongique. Neuchâtel; 2001.
- 73. Sudhadham M, Prakitsin S, Sivichai S, Chaiyarat R, Dorrestein GM, Menken SB, et al. The neurotropic black yeast Exophiala dermatitidis has a possible origin in the tropical rain forest. Stud Mycol. 2008;61:145–55.
- 74. Nishimura K, Miyaji M, Taguchi H, Tanaka R. Fungi in bathwater and sludge of bathroom drainpipes. 1. Frequent isolation of Exophiala species. Mycopathologia. 1987;97(1):17–23.
- 75. Matos T, de Hoog GS, de Boer AG, de Crom I, Haase G. High prevalence of the neurotrope Exophiala dermatitidis and related oligotrophic black yeasts in sauna facilities. Mycoses. 2002;45(9-10):373–7.
- 76. Zalar P, Novak M, de Hoog GS, Gunde-Cimerman N. Dishwashers--a man-made ecological niche accommodating human opportunistic fungal pathogens. Fungal Biol. 2011;115(10):997–1007.
- 77. Döğen A, Kaplan E, Oksüz Z, Serin MS, Ilkit M, de Hoog GS. Dishwashers are a major source of human opportunistic yeast-like fungi in indoor environments in Mersin, Turkey. Med Mycol. 2013;51(5):493–8.
- 78. Döğen A, Kaplan E, Ilkit M, de Hoog GS. Massive contamination of Exophiala dermatitidis and E. phaeomuriformis in railway stations in subtropical Turkey. Mycopathologia. 2013;175(5-6):381–6.
- 79. Zhao J, Zeng J, de Hoog GS, Attili-Angelis D, Prenafeta-Boldú FX. Isolation and identification of black yeasts by enrichment on atmospheres of monoaromatic

- hydrocarbons. Microb Ecol. 2010;60(1):149–56.
- 80. Zeng JS, Sutton DA, Fothergill AW, Rinaldi MG, Harrak MJ, de Hoog GS. Spectrum of Clinically Relevant Exophiala Species in the United States. J Clin Microbiol. 2007;45(11):3713–20.
- 81. Woo PC, Ngan AH, Tsang CC, Ling IW, Chan JF, Leung SY, et al. Clinical spectrum of exophiala infections and a novel Exophiala species, Exophiala hongkongensis. J Clin Microbiol. 2013;51(1):260–7.
- 82. Chabasse D. Mycoses à champignons noirs : chromoblastomycoses et phæohyphomycoses. EMC Mal Infect. 2011;8(2):1–13.
- 83. Chalkias S, Alonso CD, Levine JD, Wong MT. Emerging pathogen in immunocompromised hosts: Exophiala dermatitidis mycosis in graft-versus-host disease. Transpl Infect Dis. 2014;16(4):616–20.
- 84. de Hoog GS, Matos T, Sudhadham M, Luijsterburg KF, Haase G. Intestinal prevalence of the neurotropic black yeast Exophiala (Wangiella) dermatitidis in healthy and impaired individuals. Mycoses. 2005;48(2):142–5.
- 85. Li DM, de Hoog GS. Cerebral phaeohyphomycosis--a cure at what lengths? Lancet Infect Dis. 2009;9(6):376–83.
- 86. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Exophiala infection from contaminated injectable steroids prepared by a compounding pharmacy--United States, July-November 2002. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2002;51(49):1109–12.
- 87. Badali H, de Hoog GS, Sudhadham M, Meis JF. Microdilution in vitro antifungal susceptibility of Exophiala dermatitidis, a systemic opportunist. Med Mycol. 2011;49(8):819–24.
- 88. Duarte AP, Pagnocca FC, Baron NC, Melhem M de S, Palmeira GA, de Angelis D de F, et al. In vitro susceptibility of environmental isolates of Exophiala dermatitidis to five antifungal drugs. Mycopathologia. 2013;175(5-6):455–61.
- 89. Kondori N, Gilljam M, Lindblad A, Jönsson B, Moore ER, Wennerås C. High rate of Exophiala dermatitidis recovery in the airways of patients with cystic fibrosis is associated with pancreatic insufficiency. J Clin Microbiol. 2011;49(3):1004–9.
- 90. Krishnan-Natesan S. Terbinafine: a pharmacological and clinical review. Expert Opin Pharmacother. 2009;10(16):2723–33.
- 91. Schemuth H, Dittmer S, Lackner M, Sedlacek L, Hamprecht A, Steinmann E, et al. In vitro activity of colistin as single agent and in combination with antifungals against filamentous fungi occurring in patients with cystic fibrosis. Mycoses. 2013;56(3):297–303.
- 92. Schieffelin JS, Garcia-Diaz JB, Loss GE, Beckman EN, Keller RA, Staffeld-Coit C, et al. Phaeohyphomycosis fungal infections in solid organ transplant recipients: clinical presentation, pathology, and treatment. Transpl Infect Dis. 2014;16(2):270–8.

- 93. de Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas of Clinical Fungi, Second Edition. Amer Society for Microbiology; 2000. 1141 p.
- 94. de Hoog GS, Haase G. Nutritional physiology and selective isolation of Exophiala dermatitidis. Antonie Van Leeuwenhoek. 1993;64(1):17–26.
- 95. Matos T, Haase G, Gerrits van den Ende AH, de Hoog GS. Molecular diversity of oligotrophic and neurotropic members of the black yeast genus Exophiala, with accent on E. dermatitidis. Antonie Van Leeuwenhoek. 2003;83(4):293–303.
- 96. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109(16):6241–6.
- 97. Nilsson RH, Ryberg M, Kristiansson E, Abarenkov K, Larsson K-H, Kõljalg U. Taxonomic Reliability of DNA Sequences in Public Sequence Databases: A Fungal Perspective. Fairhead C, editor. PLoS ONE. 2006;1(1):e59.
- 98. Heinrichs G, de Hoog GS, Haase G. Barcode identifiers as a practical tool for reliable species assignment of medically important black yeast species. J Clin Microbiol. 2012;50(9):3023–30.
- 99. Najafzadeh MJ, Dolatabadi S, Saradeghi Keisari M, Naseri A, Feng P, de Hoog GS. Detection and identification of opportunistic Exophiala species using the rolling circle amplification of ribosomal internal transcribed spacers. J Microbiol Methods. 2013;94(3):338–42.
- 100. Patel R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in clinical microbiology. Clin Infect Dis. 2013;57(4):564–72.
- 101. Özhak-Baysan B, Öğünç D, Döğen A, Ilkit M, de Hoog GS. MALDI-TOF MS-based identification of black yeasts of the genus Exophiala. Med Mycol. 2015;53(4):347–52.
- 102. Haase G, Skopnik H, Kusenbach G. Exophiala dermatitidis infection in cystic fibrosis. Lancet. 1990;336(8708):188–9.
- 103. Grenouillet F, Richaud-Thiriez B, Millon L, Dalphin J-C. Exophiala colonization as a surrogate marker for cystic fibrosis in the elderly. In Angers; 2014 [cited 2015 Nov 5]. Available from:
 - http://www.isham.org/WorkingGroups/CysticFibrosis/ThirdMeeting 2014/8-Grenouillet.pdf
- 104. Koch C, Cuppens H, Rainisio M, Madessani U, Harms H, Hodson M, et al. European Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis (ERCF): comparison of major disease manifestations between patients with different classes of mutations. Pediatr Pulmonol. 2001;31(1):1–12.
- 105. Horré 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;71(4):360–6.
- 106. Packeu A, Lebecque P, Rodriguez-Villalobos H, Boeras A, Hendrickx M, Bouchara J-P,

- et al. Molecular typing and antifungal susceptibility of Exophiala isolates from patients with cystic fibrosis. J Med Microbiol. 2012;61(Pt 9):1226–33.
- 107. Ripert C. Mycologie médicale. Lavoisier; 2013. 750 p.
- 108. Soll DR. The Ins and Outs of DNA Fingerprinting the Infectious Fungi. Clin Microbiol Rev. 2000;13(2):332–70.
- 109. Richard GF, Hennequin C, Thierry A, Dujon B. Trinucleotide repeats and other microsatellites in yeasts. Res Microbiol. 1999;150(9-10):589–602.
- 110. Klaassen CH. MLST versus microsatellites for typing Aspergillus fumigatus isolates. Med Mycol. 2009;47 Suppl 1:S27–33.
- 111. Defontaine A, Zouhair R, Cimon B, Carrère J, Bailly E, Symoens F, et al. Genotyping study of Scedosporium apiospermum isolates from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 2002;40(6):2108–14.
- 112. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol. 1988;26(11):2465–6.
- 113. Qiagen. DNeasy Plant Mini Kit [Internet]. c2012 [cited 2015 Aug 6]. Available from: https://www.qiagen.com/fr/resources/resourcedetail?id=6b9bcd96-d7d4-48a1-9838-58dbfb0e57d0&lang=en
- 114. de Lamballerie X, Zandotti C, Vignoli C, Bollet C, de Micco P. A one-step microbial DNA extraction method using "Chelex 100" suitable for gene amplification. Res Microbiol. 1992;143(8):785–90.
- 115. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. 1990;315–22.
- 116. CBS. Pairwise sequence alignment [Internet]. [cited 2015 Nov 3]. Available from: http://www.fungalbiodiversitycentre.com/Collections/BioloMICSSequences.aspx?
- 117. NCBI. Exophiala dermatitidis (ID 2962) Genome [Internet]. [cited 2015 Nov 3]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/2962
- 118. Tandem Repeats Finder Welcome Page [Internet]. [cited 2015 Nov 3]. Available from: http://tandem.bu.edu/trf/trf.html
- 119. Benson G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. Nucleic Acids Res. 1999;27(2):573–80.
- 120. Primer3 Input [Internet]. [cited 2015 Nov 3]. Available from: http://bioinfo.ut.ee/primer3/
- 121. Koressaar T, Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. Bioinformatics. 2007;23(10):1289–91.
- 122. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3-new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Res. 2012;40(15):e115.

- 123. Gunde-Cimerman N, Zalar P. Black yeast Exophiala dermatitidis and other human fungal pathogens inhabit different domestic environments from dishwashers to kitchen surfaces. In Angers; 2014 [cited 2015 Nov 17]. Available from: http://www.isham.org/WorkingGroups/CysticFibrosis/ThirdMeeting2014/Fri-CF%202014%20abstract%20book.pdf
- 124. Kauffmann-Lacroix C, Bousseau A, Dalle F, Brenier-Pinchart M-P, Delhaes L, Machouart M, et al. Surveillance mycologique de l'eau pour la prévention des mycoses invasives dans les établissements de santé. Presse Médicale. 2008;37(5 Pt 1):751–9.
- 125. Sabino R, Sampaio P, Rosado L, Videira Z, Grenouillet F, Pais C. Analysis of clinical and environmental Candida parapsilosis isolates by microsatellite genotyping-a tool for hospital infection surveillance. Clin Microbiol Infect. 2015;21(10):954.e1–8.
- 126. Grenouillet F, Millon L, Bart J-M, Roussel S, Biot I, Didier E, et al. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for rapid typing of Candida glabrata. J Clin Microbiol. 2007;45(11):3781–4.
- 127. Garcia-Hermoso D, MacCallum DM, Lott TJ, Sampaio P, Serna M-JB, Grenouillet F, et al. Multicenter collaborative study for standardization of Candida albicans genotyping using a polymorphic microsatellite marker. J Clin Microbiol. 2010;48(7):2578–81.
- 128. van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. Clin Microbiol Infect. 2007;13 Suppl 3:1–46.
- 129. Yamaguchi M, Biswas SK, Suzuki Y, Furukawa H, Sameshima M, Takeo K. The spindle pole body duplicates in early G1 phase in the pathogenic yeast Exophiala dermatitidis: an ultrastructural study. Exp Cell Res. 2002;279(1):71–9.
- 130. Biokar diagnostics. Gélose au Dichloran-Glycérol (DG 18) [Internet]. c2010 [cited 2015 Nov 15]. Available from: http://www.solabia.fr/solabia/produitsDiagnostic.nsf/0/0D245E3CBA35F0B1C12574C80 0487116/\$file/FT BK170 BM109 v7.pdf

PLAN DÉTAILLÉ

Liste des abréviations	11
Liste des figures, tableaux et annexes	12
Introduction	15
Généralités	17
1. La mucoviscidose	17
1.1. Épidémiologie	17
1.2. Le canal CFTR	17
1.3. Relation génotype-phénotype	18
1.4. Diagnostic biologique	18
1.5. Clinique	21
1.5.1 Mucoviscidose	22
1.5.2 CFTR-RD	24
2. Les infections pulmonaires dans la mucoviscidose	25
2.1. Physiopathologie de l'atteinte pulmonaire	25
2.1.1. Défaut de la clairance muco-ciliaire	25
2.1.2. Perturbation de la réponse inflammatoire	25
2.1.3. Existence d'une inflammation intrinsèque	26
2.2. Colonisation par les micro-organismes	26
2.2.1. Bactéries	26
2.2.2. Mycobactéries atypiques	28
2.2.3. Champignons	28
2.2.3.1. Levures	29
2.2.3.2. Champignons filamenteux	29

3. Exophiala spp.	34
3.1. Généralités	34
3.2. Habitats	34
3.3. Impact clinique en médecine humaine	36
3.3.1 Infections cutanées et sous-cutanées	36
3.3.2. Infections profondes	37
3.3.3. Sensibilité aux antifongiques	37
3.3.4. Prise en charge	38
3.4. Identification	39
3.4.1. Aspect macroscopique	39
3.4.2. Aspect microscopique	40
3.4.2.1. Exophiala dermatitidis	40
3.4.2.2. Exophiala phaeomuriformis	41
3.4.3. Biologie moléculaire	42
3.4.4. Spectrométrie de masse	44
3.5. Exophiala dermatitidis dans la mucoviscidose	45
4. Colonisation et typage moléculaire	47
4.1. Techniques disponibles en mycologie	47
4.1.1. Étude du polymorphisme de marqueurs protéiques	47
4.1.2. Étude du polymorphisme de fragments d'ADN	47
4.2. Colonisation par les filamenteux	50
4.3. Colonisation par <i>Exophiala</i> spp.	50
4.4. Indice de Hunter	51
Travail personnel	53
1. Présentation de l'étude et des objectifs	53
2. Matériels et méthodes	55
2.1. Collection de souches d'Exophiala spp.	55
2.2. Extraction de l'ADN fongique	55

	2.3. Identification d'espèce des isolats d'Exophiala sp.	57
	2.4. Identification de cibles microsatellites au sein du génome	
	d'Exophiala dermatitidis	57
	2.5. Évaluation des cibles microsatellites en PCR standard	60
	2.6. Évaluation préalable des sondes marquées	60
	2.7. Performances de l'approche microsatellite comme outil de	
	génotypage	61
	2.8. Évaluation du caractère clonal de la colonisation par Exo	phiala
	dermatitidis	62
	2.9. Caractéristiques des patients atteints de mucoviscidose et col	lonisés
	par Exophiala dermatitidis	62
3. Rés	sultats	64
	3.1. Enquête environnementale et identification des « levures n	oires »
	isolées	64
	3.2. Évaluation des couples d'amorces	64
	3.3. Visualisation des amplicons obtenus sur <i>GeneMapper</i> ^{MD}	65
	3.4. Performances de la technique développée	67
	3.5. Colonisation par Exophiala dermatitidis des patients atteints de	e
	mucoviscidose	69
	3.6. Caractéristiques des patients atteints de mucoviscidose et color	nisés
	par Exophiala dermatitidis	71
4. Dis	scussion	73
Annexe 1		79
Annexe 2		83
Annexe 3		87
Bibliographi	e	91
Plan détaillé		101



PERMIS D'IMPRIMER

Thèse pou	ır obtenir l	e Diplôme	d'Etat de	Docteur o	en Pharmacie

Présentée par :

Mr David LE BIHAN

Né(e) le: 8 septembre 1988 à: Vannes

Et ayant pour titre:

Génotypage d'Exophiala dermatitidis par polymorphisme des microsatellites : développement et application au suivi de la colonisation des patients atteints de mucoviscidose au CHRU de Besançon

Vu,

Vu et Approuvé,

Besançon, le 2 novembre 2015

Besançon, le 6 novembre 2015

Le Président du jury de thèse,

Pour le Président et par délégation, Pour le Directeur de l'UFR SMP,

Le Doyen de Pharmacie,

Service d'Hygiène Hospitalièn et Infections Nosocomiales

Pr Xavier BERTRAND

Professeur M.C. WORONOFF-LEMSI



RÉSUMÉ

Nom - Prénom : Le Bihan David

Thèse soutenue le : 30 novembre 2015

Titre de la thèse :

Génotypage d'*Exophiala dermatitidis* par polymorphisme des microsatellites : développement et application au suivi de la colonisation des patients atteints de mucoviscidose au CHRU de Besançon

La mucoviscidose est une maladie génétique entraînant des complications pulmonaires d'origine infectieuse. Au côté des bactéries qui constituent la cause majeure des infections pulmonaires dans la mucoviscidose, de nombreux micromycètes peuvent coloniser et infecter les voies respiratoires de ces patients.

Les « levures noires » du genre *Exophiala* sont retrouvées chez 2 à 20 % des patients atteints de mucoviscidose et des cas d'infections pulmonaires prouvées ont été décrits. L'espèce *E. dermatitidis* représente plus de 90 % des souches isolées de ces patients.

L'objectif de ce travail a été de développer une technique de génotypage par microsatellites, et de l'appliquer aux souches de patients atteints de mucoviscidose suivis au CHRU de Besançon colonisés par *E. dermatitidis*.

Treize marqueurs microsatellites identifiés ont été testés sur un panel de cinq souches d'*E. dermatitidis* sans lien épidémiologique. Quatre ont été sélectionnés et évalués sur 25 souches d'*E. dermatitidis* sans lien épidémiologique. L'évaluation du pouvoir discriminant a été réalisée par le calcul de l'indice de Hunter D égal à 0,94.

L'étude sur une cohorte de 14 patients avec 71 souches d'*E. dermatitidis* (1 à 21 souches/patient sur une période de 70 mois) a montré que chaque patient était colonisé par un seul clone.

L'existence d'un clone dominant parmi les souches isolées de patients, et les souches environnementales de Franche-Comté appelle à une meilleure connaissance de l'environnement domestique de ces patients, et du mode de contamination pulmonaire des patients par ce micromycète.

Mots clés : Exophiala, Mucoviscidose, Colonisation, Génotypage, Microsatellites