

POSTER

High resolution melting PCR et mucoviscidose, un voyage au laboratoire.

Hascoet E^{1,2}, Boisramé S^{1,2}, Fangous MS^{1,3}, Prigent G³, Gouriou S¹, Le Berre R¹, Héry-Arnaud G^{1,3}

1. Unité INSERM Brest Integrative Genetics, groupe Microbiota, Université de Bretagne Occidentale
2. Département de chirurgie orale, UFR odontologie - CHRU Brest
3. Unité de Bactériologie, Pôle de Biologie-Pathologie - CHRU Brest

La mucoviscidose (CF pour cystic fibrosis) est une maladie génétique entraînant l'absence ou le dysfonctionnement de la protéine Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator impliquée dans l'hydratation des sécrétions. Cette anomalie conduit à un mucus épais et à une altération de l'activité mucociliaire, induisant une susceptibilité aux infections pulmonaires. Chez les patients CF, ces infections sont les premières causes de morbidité et de mortalité (Wong et al. *J Microbiol Methods*, 107, :133-7.). La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (P.a.) est reconnue comme étant le pathogène principal de ces infections polymicrobiennes. Après son établissement, P.a. va pouvoir s'adapter à son environnement par des modifications génétiques et phénotypiques.

Le typage moléculaire est souvent nécessaire pour déterminer la présence d'une infection, son mode de transmission, son évolution et induire des stratégies thérapeutiques efficaces. Dans les génomes, on décrit des répétitions en tandem (RT) de motifs d'ADN appelés Variable Number of Tandem Repeats (VNTRs). Ces séquences répétées en tandem présentent un nombre de répétitions qui peuvent varier d'une souche à l'autre et participent ainsi au polymorphisme au sein d'un locus. La technologie de fusion haute résolution (HRM pour High Resolution Melting) est une extension de l'analyse en courbe de fusion utilisée lors de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel avec des agents marqués fluorescents se liant à l'ADN double brin. Le principe repose sur la détermination de la température de fusion des fragments initialement amplifiés par PCR. La technique de HRM-PCR ciblée sur les VNTRs a été appliquée à P.a. et a mis en évidence le caractère épidémique de cas d'infections à P.a. (Anuj et al. *Clin Microbiol Infect*, 17, :1403-8. et Naze et al. *J Clin Microbiol*, 48, :3146-52.) permettant une identification rapide des liens de clonalité entre les souches isolées de différents patients.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'efficacité de la méthode HRM-PCR pour obtenir un génotypage de manière simple, rapide, peu onéreuse et reproductible des souches de P.a. isolées d'expectorations de patients CF.

Les 216 souches cliniques (patients CF) de P.a. de la collection du laboratoire de bactériologie préalablement typées par les méthodes de référence (Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE et Multilocus Sequence Typing, MLST) sont utilisées pour la mise au point de l'analyse des VNTRs en HRM-PCR. Le locus VNTR ms142 est ciblé pour le typage moléculaire des souches de P.a. par une technique adaptée de la publication de Naze et al., 2010. Les analyses de HRM-PCR sont réalisées sur l'automate 7500 Fast (ABI).

L'hypothèse de ce travail est que la HRM-PCR sera capable de différencier les clones préalablement caractérisés par MLST. Si cette hypothèse est vérifiée, ce travail sera la preuve de concept de l'utilisation de la technique HRM-PCR pour le typage de bactérie d'intérêt dans la mucoviscidose.

Ce projet pourrait ainsi aboutir à la mise en place d'une méthode moléculaire performante pour génotyper rapidement l'agent pathogène P.a. isolé des patients CF et permettre ainsi de mettre en évidence une éventuelle transmission croisée entre les patients, de distinguer les ré-infections des échecs d'éradication (rechute) et de mettre en place une thérapeutique adaptée.

emilie.hascoet1@gmail.com