



HAL
open science

Analyse du microbiome fongique et bactérien dans les sinusites fongiques chroniques

Sarah Dellière

► **To cite this version:**

Sarah Dellière. Analyse du microbiome fongique et bactérien dans les sinusites fongiques chroniques. Médecine humaine et pathologie. 2019. dumas-03143885

HAL Id: dumas-03143885

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03143885>

Submitted on 17 Feb 2021

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

AVERTISSEMENT

Cette thèse d'exercice est le fruit d'un travail approuvé par le jury de soutenance et réalisé dans le but d'obtenir le diplôme d'Etat de docteur en médecine. Ce document est mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt toute poursuite pénale.

Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 122.4

Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 335.2-L 335.10

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES
Faculté de Médecine PARIS DESCARTES

Année 2019

N° 160

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE
DOCTEUR EN MÉDECINE

Analyse du microbiome fongique et bactérien
dans les sinusites fongiques chroniques

Présentée et soutenue publiquement
le 2 octobre 2019

Par

Sarah DELLIÈRE

Née le 2 octobre 1989 à Saint-Nazaire (44)

Dirigée par Mme Le Professeur Françoise Botterel, PU-PH

Jury :

Mme Le Professeur Fanny Lanternier, PU-PH..... Président

M. Le Professeur Stéphane Bretagne, PU-PH

M. Le Professeur Alban Le Monnier, PU-PH

M. Le Docteur Éric Dannaoui, MCU-PH

M. Le Docteur Florent Morio, MCU-PH

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ici mes sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de cette thèse ainsi qu'aux personnes qui vont prendre le temps de lire et d'évaluer ce travail.

Tout d'abord, je souhaite remercier ma directrice de thèse, le Pr **Françoise Botterel**, pour m'avoir proposée un sujet aussi enrichissant et formateur, pour son encadrement patient, pour tout le temps qu'elle m'a consacré et pour ses judicieux conseils prodigués sans compter.

Mes remerciements s'adressent ensuite à Mme le Pr **Fanny Lanternier**, pour avoir accepté la présidence de ce jury ainsi qu'au Pr Olivier Lortholary pour leur accueil chaleureux et la confiance qu'ils m'ont accordée pendant six mois au sein du service de Maladies Infectieuses de l'hôpital Necker.

Au Pr **Stéphane Bretagne**, pour avoir accepté de participer à ce jury et pour son soutien constant depuis mon passage à l'hôpital Saint-Louis il y a plus de 3 ans. C'est très certainement à ses côtés que j'ai compris ce que rigueur et précision voulaient dire et ce sera pour moi un honneur de bientôt exercer sous sa direction.

Au Dr **Eric Dannaoui**, pour sa participation active, sa gentillesse et sa disponibilité permanente pour mener à bien ce projet.

Au Dr **Florent Morio**, pour participer à l'évaluation de ce travail, ainsi qu'au Pr Patrice Le Pape et au Pr Carlos Alvarez, pour avoir été les premiers à me passionner pour la Parasitologie - Mycologie lors d'ED vivants en DCEM1 et à travers des projets de recherches stimulants lors du Master 1 de microbiologie à Nantes. Merci de m'avoir donnée la chance de participer à une collaboration unique et enrichissante avec la Colombie lors de ma dernière année d'externat.

Au Pr **Alban Le Monnier**, que je remercie d'avoir accepté de juger ce travail et d'y apporter son expertise en bactériologie.

Je souhaite sincèrement remercier Dr **Cécile Angebault** pour son encadrement infailible à toute heure du jour et de la nuit, pour ses relectures attentives et sans qui la qualité de ce travail n'aurait pas été la même. Un grand merci également au Dr **Christophe Rodriguez**, Vanessa Demontant, Guillaume Gricourt de la plateforme de métagénomique du CHU Henri-Mondor pour le temps qu'ils ont consacré à m'aider et à me former sur les aspects théoriques, techniques et bio-informatiques de ce projet utilisant le séquençage à haut débit. Un remerciement au Dr Maxime Fieux pour son expertise ORL, ses relectures minutieuses et sa bonne humeur qui ouvre les portes (et notamment celles des archives de l'HEGP). Merci à Frédéric Pirat, pour son expertise en *bidouillage* SHAMAN.

Je tiens aussi à exprimer ma gratitude à tous ces professeurs, docteurs, encadrants qui m'inspirent et qui ont bien voulu me soutenir et m'accorder leur temps et leur bienveillance depuis le début de mon cursus: Dr Alexandre Alanio, Dr Samia Hamane, Dr Maud Gits-Muselli, Dr Don Sheppard, Pr Christophe Hennequin, Dr Juliette Guitard, Dr Françoise Foulet, Dr Nawel Ait-Ammar, Dr Marie-Elisabeth Bournoux, Dr Jean-Luc Donay, Dr François Camelena, Dr Romain Guéry, Dr Stéphane Corvec, Pr Xavier Nassif, Pr Luc Cynober.

À PA, merci pour sa constance, pour sa force tranquille et rassurante qui équilibre ma vie et raisonne mes choix.

Un grand merci également,

À ma mère pour être notre pilier et pour ce temps qu'elle a donné sans compter, à mon père pour nous faire passer avant tout et pour m'avoir transmis sa curiosité insatiable. A Elise et Franck pour être toujours là malgré la distance, pour cette confiance sans limite. À ma grand-mère, Jeanne, à mes grands-parents, Suzanne et Raymond.

À Max, Guillaume, Anne, Alix, Claire, Adèle, pour ces dix années d'études à se serrer les coudes, pour les soirées pizza-ECN et les tonus au Calysto. Merci à mes chons, Marion, Flo et autres Callaghans pour des années de présence, de soutien, de voyages.

À tous ceux rencontrés le long du chemin de l'internat et qui ont transformé mon quotidien : Manon, Rémi, Mathilde et Abla, la petite famille du début d'internat. Jeanne, Johanna, Romain et Lorra pour des semestres *champinionesque*. Nathan, François, Ségo, Julie, Marion et Cécile pour un semestre rythmé par la sonnerie du téléphone de l'équipe mobile et les spectacles de claquettes. Pauline et Fanny, pour partager dans la bonne humeur ce dernier été d'internat caniculaire au doux fumet des antibiogrammes et à la fraîcheur de la pièce des congélateurs.

À tous ceux que j'ai oublié, et surtout, à ma petite Lou.

VALORISATION

Ce travail a été valorisé par 3 communications orales et affichées :

➤ Communications orales

- **Dellière S**, Angebault C, Bonfils P, Woerther PL, Dannaoui E, Botterel F. Etude du microbiote fongique et bactérien dans les sinusites fongiques chroniques. **Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale (SFMM), Nice, 2018.**
- **Dellière S**, Angebault C, Bonfils P, Podglajen I, Woerther E, Dannaoui E, Botterel F. Analysis of the microbiome and mycobiome in chronic fungal rhinosinusitis. **European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease (ECCMID), Amsterdam, Pays-Bas, 2019.** O0750 (Mini-oral ePoster ~7min)

➤ Communication affichée

- **Dellière S**, Angebault C, Fieux M, Bonfils P, Podglajen I, Woerther E, Dannaoui E, Botterel F. Mycobiome and microbiome in chronic fungal sinusitis. **Trend in Medical Mycology (TIMM), Nice, France, 2019.** P429

➤ Manuscrit en préparation

- **Dellière S**, Angebault C, Fieux M, Bonfils P, Podglajen I, Woerther E, Dannaoui E, Botterel F. Mycobiome and microbiome in chronic fungal sinusitis.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	2
VALORISATION	4
ABBREVIATIONS ET LEXIQUE SPECIFIQUE	7
PREAMBULE	8
FIGURES ET TABLES	9
FIGURES	9
TABLEAUX	10
INTRODUCTION	11
RHINOSINUSITES	11
<i>Classification générale des rhinosinusites</i>	12
<i>Classification des rhinosinusites chroniques</i>	13
<i>Classification des rhinosinusites fongiques</i>	14
<i>Les balles fongiques sinusiennes</i>	17
METAGENOMIQUE ET NEXT GENERATION SEQUENCING	19
<i>La métagénomique ciblée</i>	20
LES DONNEES DE METAGENOMIQUE DANS LES RHINO-SINUSITES CHRONIQUES.....	32
OBJECTIF	33
MATERIEL ET METHODES	33
POPULATION ET DESIGN DE L'ETUDE	33
TECHNIQUE	34
RESULTATS	38
CARACTERISTIQUES DE LA POPULATION	38
ANALYSE DES DONNEES BRUTES ISSUES DU <i>RUN</i> DE SEQUENÇAGE	40
<i>Analyse des témoins négatifs</i>	42
<i>Courbes de raréfaction des échantillons</i>	42
ANALYSE DE LA DIVERSITE MICROBIENNE DANS LES BALLEES FONGIQUES SINUSIENNES	43
<i>Description de la diversité en termes de taxa</i>	43

<i>Analyse GLOBALE de la diversité bactérienne et fongique entre balles fongiques et témoins ...</i>	45
<i>Analyse détaillée de la diversité bactérienne et fongique entre balles fongiques et témoins</i>	47
<i>Analyse de la diversité bactérienne et fongique au sein des balles fongiques.....</i>	51
<i>Comparaison culture et métagénomique</i>	53
DISCUSSION	54
CHOIX METHODOLOGIQUES.....	54
<i>Biais liés à la conservation des prélèvements.....</i>	55
<i>Biais liés à la technique d'extraction</i>	55
<i>Biais liés à l'amplification et au choix du couple d'amorces</i>	56
<i>Biais liés aux critères de validation qualitative du run de séquençage.....</i>	57
<i>Biais liés à la sélection de la base de donnée pour l'assignation taxonomique</i>	58
<i>Vers une standardisation de la métagénomique</i>	58
DE L'ANALYSE DES DONNEES DE METAGENOMIQUE A L'INTERPRETATION CLINIQUE	59
<i>Patient 8 - Balle fongique</i>	59
<i>Patient 15 - Balle fongique</i>	60
<i>Patient 44 - Témoin.....</i>	61
LES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET FONGIQUES DES BALLEES FONGIQUES SINUSIENNES	61
<i>Significativité et pertinence des résultats issus de données de métagénomique.....</i>	62
<i>Le microbiote fongique des balles fongiques sinusiennes.....</i>	62
<i>Pertinence du choix des témoins.....</i>	64
<i>Physiopathologie des balles fongiques, un flou persistant</i>	64
<i>Le microbiote bactérien des balles fongiques sinusiennes</i>	65
<i>Haemophilus joue-t-il un rôle dans la physiopathologie des balles fongiques ?</i>	66
<i>Peut-il exister une interaction entre Aspergillus et Haemophilus ?</i>	68
CONCLUSION	69
RÉFÉRENCES.....	71
ANNEXES	80

ABBREVIATIONS ET LEXIQUE SPECIFIQUE

ABPA: Aspergillose broncho-pulmonaire allergique

ADNr: ADN ribosomal

BPCO: Broncho-pneumopathie chronique obstructive

DRSC: Dysfonction rhino-sinusienne chronique

FISH : *Fluorescence in situ hybridation*

Flow cell : Support du séquenceur auquel s'attachent les amplicons à séquencer

GLM : *Generalized Linear Model* : modèle linéaire généralisé

HEGP : Hôpital Européen George Pompidou

IRM : Imagerie par résonance magnétique

ITS: Internal transcribed spacer

LBA: Lavage broncho-alvéolaire

NGS : New generation sequencing

OTU: Operational taxonomic unit

PCR: *Polymerase chain reaction*

PCoA : principal coordinates analysis

Read : amplicon d'ADN séquencé par l'automate

ROP: Rinçage oropharyngé

TDM: Tomodensitométrie

Trimming : nettoyage et élimination des séquences non conformes aux critères choisis

VRS : virus respiratoire syncytial

PREAMBULE

Ce travail a été effectué au sein du laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'hôpital Henri Mondor à Créteil, dirigé par Madame le Professeur Françoise Botterel et encadré par Madame le Docteur Cécile Angebault pour l'analyse métagénomique. Il a fait l'objet d'une collaboration étroite avec le Docteur Eric Dannaoui du CHU de Hôpital Européen Georges Pompidou, où ont été effectués les prélèvements des patients dans le service d'ORL du Professeur Pierre Bonfils. L'examen anatomopathologique des prélèvements a été effectué dans le service du Pr Patrick Bruneval.

Les travaux de métagénomique ont été effectués sur la plate-forme de caractérisation des génomes microbiens par séquençage à haut débit dirigée par le Docteur Christophe Rodriguez (laboratoire de recherche INSERM U955 Equipe 18).

FIGURES ET TABLES

FIGURES

Figure 1. Anatomie des cavités rhino-sinusiennes.....	11
Figure 2. Anatomie scannographique des cavités rhino-sinusiennes. Examen TDM de la face chez un sujet sain en coupe sagittale.....	12
Figure 3. Classification des dysfonctionnements rhino-sinusiens chroniques (DRSC)	14
Figure 4. Balle fongique du sinus maxillaire.....	18
Figure 5. Deux types de métagénomique.....	20
Figure 6. Carte du gène ADNr 16S bactérien (A) et opéron ribosomique fongique (B).....	23
Figure 7. Préparation des bibliothèques de séquençage.....	26
Figure 8. Courbe de raréfaction de deux échantillons x et y	30
Figure 9. Principe schématique de fonctionnement du QIAasymphony SP.....	35
Figure 10. Etapes de préparation de la bibliothèque d'amplicons.....	36
Figure 11. Diagramme de flux des patients inclus dans l'étude.....	39
Figure 13. Courbes de raréfaction obtenues pour chaque échantillon en 16S (A) et en ITS (B)	43
Figure 14. Distance de diversité microbienne entre les échantillons des patients cas et témoins par analyse en coordonnées principales selon l'indice de dissimilarité de Bray-Curtis.....	46
Figure 15. Dendrogramme en grappe exprimant la distance de diversité entre chaque échantillon selon l'indice de dissimilarité de Bray-Curtis.	47
Figure 16. Diversité bactérienne dans les balles fongiques et les échantillons témoins en nombre de <i>reads</i> et en abondance relative.....	48
Figure 17. Diversité fongique dans les balles fongiques et les échantillons témoins en nombre de <i>reads</i> et en abondance relative.	49
Figure 18. Diversité fongique (en nombre de <i>reads</i>) dans les balles fongiques et les échantillons témoins.....	50
Figure 19. Différence d'abondance entre les échantillons de balles fongiques pour les taxa <i>Aspergillus</i> (A) et <i>Haemophilus</i> (B).	51
Figure 20. Boîtes à moustaches représentant les taxa bactériens dont l'abondance relative diffère significativement par analyse GLM (modèle linéaire généralisé) en fonction (A) du sexe, (B) de la positivité de la culture fongique et (C) de la localisation de la sinusite.	52

TABLEAUX

Tableau 1. Classification et particularités des sinusites fongiques	16
Tableau 2. Etudes du mycobiome fongique dans les voies respiratoires.....	25
Tableau 3. Indicateurs de diversité utilisés pour décrire une communauté microbienne	29
Tableau 4. Caractéristiques des patients.	40
Tableau 5. Résultats qualitatifs du <i>run</i> de séquençage.	42
Tableau 6. Assignation et abondance relative des OTUs présentes dans le témoin négatif. ...	42
Tableau 7. OTUs identifiées à l'espèce pour les genres <i>Haemophilus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> et <i>Aspergillus</i> avec le nombre de <i>reads</i> et l'abondance relative.	45
Tableau 8. Taxa bactériens mis en évidence en culture et par la métagénomique dans les cas discordants.	54

INTRODUCTION

RHINOSINUSITES

Les sinusites et rhinosinusites correspondent à une inflammation des cavités rhino-sinusiennes (Fig. 1). La nosologie des maladies rhino-sinusiennes repose sur des bases anatomiques. Les cavités rhino-sinusiennes comprennent la cavité nasale proprement dite et les cavités sinusiennes. Les cavités sinusiennes sont divisées en deux secteurs :

- Les sinus antérieurs (maxillaires, frontaux et ethmoïdaux antérieurs) qui se drainent dans la cavité nasale au niveau du méat moyen en dehors du cornet nasal moyen (complexe ostio-méatal antérieur),
- Les sinus postérieurs (sphénoïdaux et ethmoïdaux postérieurs) qui se drainent dans la cavité nasale au niveau du récessus sphéno-ethmoïdal en dedans du cornet nasal moyen (complexe ostio-méatal postérieur) (Fig. 2).

Ces voies de drainage communes permettent de comprendre qu'une infection touchant une cavité au sein des sinus antérieurs ou postérieurs peut s'étendre aux autres sinus du même complexe.

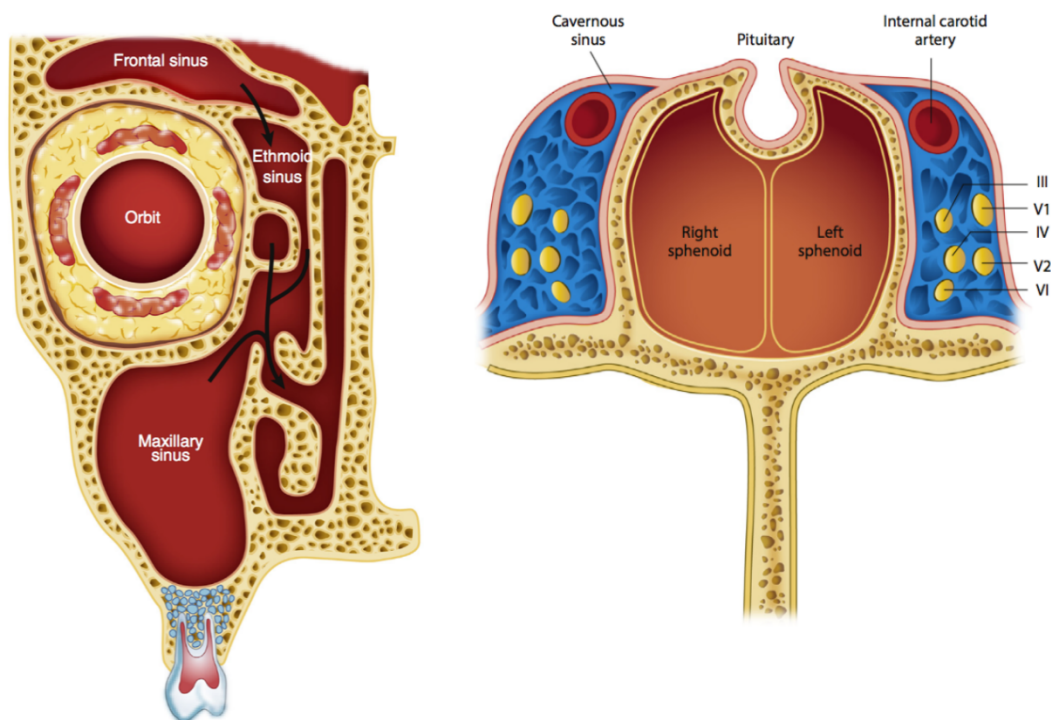


Figure 1. Anatomie des cavités rhino-sinusiennes. D'après Fokkens *et al.* [1].

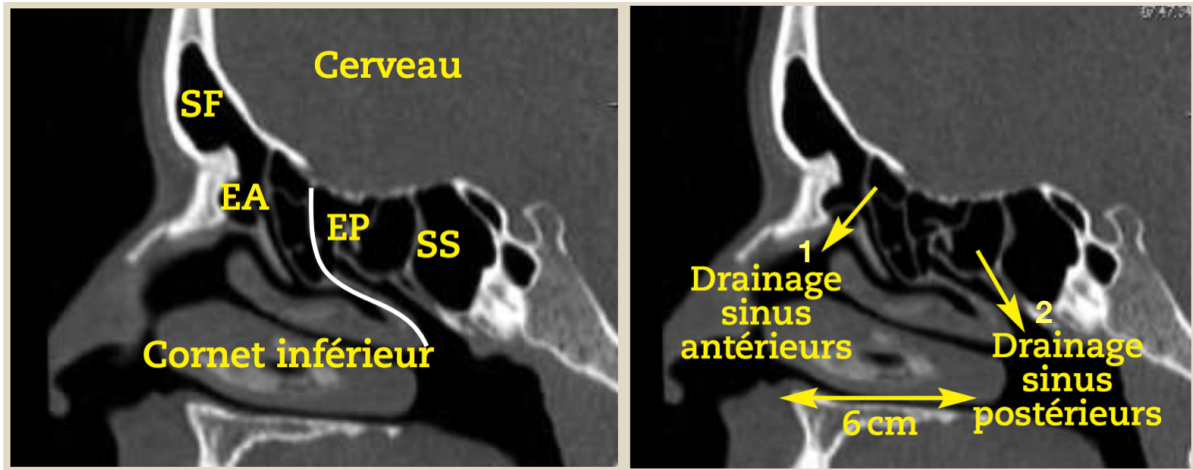


Figure 2. Anatomie scannographique des cavités rhino-sinusiennes. Examen TDM de la face chez un sujet sain en coupe sagittale. À gauche, la lame basale du cornet moyen (surlignée en blanc) sépare l'éthmoïde antérieur (EA) de l'éthmoïde postérieur (EP). À droite, les voies de drainage des sinus antérieurs et postérieurs sont séparées par une distance d'environ 6 cm. Sinus frontal (SF) ; sinus sphénoïdal (SS); méat moyen (1); récessus sphéno-ethmoïdal (2). Modifié, d'après Bonfils P. [2]

CLASSIFICATION GENERALE DES RHINOSINUSITES

La **rhinosinusite aiguë** entraîne rhinorrhée purulente et douleurs sinusiennes caractéristiques et dure moins de 4 semaines. La principale étiologie est virale, notamment liée aux rhinovirus, aux virus *Influenza* et *Parainfluenza* [3]. L'enjeu médical dans ce type de sinusite est de distinguer rhinosinusite aiguë virale et bactérienne, la seconde ne représentant que 0,5 à 2% des sinusites aiguës et compliquant souvent l'étiologie virale [4]. Les bactéries les plus fréquemment responsables sont *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* et *Moraxella catarrhalis*.

Une **rhinosinusite subaiguë** désigne une sinusite persistant entre 4 et 12 semaines. Elle reste une entité mal décrite dont la prise en charge n'est pas détaillée dans les recommandations et laissée à l'expertise du clinicien [5].

La **pathologie rhino-sinusienne chronique** ou "dysfonctionnement rhino-sinusien chronique" (DRSC) persiste plus de 12 semaines et affecte environ 20% de la population [2]. Elle constitue l'un des motifs les plus fréquents de consultation en médecine générale ce qui en fait un enjeu important de santé publique [2]. Il s'agit de plusieurs entités avec une physiopathologie différente et dont l'étiologie reste souvent indéterminée [5,6]. Les signes cardinaux de la pathologie sont une rhinorrhée antérieure et/ou postérieure purulente, une congestion nasale, une sensation de plénitude ou de pression au niveau des sinus et une

réduction de l'odorat, voire une anosmie. Les rhinosinusites chroniques sont souvent indolores en dehors des poussées de surinfection.

CLASSIFICATION DES RHINOSINUSITES CHRONIQUES

Parmi ces rhinosinusites chroniques, il faut distinguer la pathologie saisonnière, dont les manifestations cliniques intermittentes suffisent à porter le diagnostic, des dysfonctionnements per-annuels. La classification de ces derniers repose sur l'étude anatomique et distingue trois entités cliniques (Fig. 3):

1. Les pathologies de la cavité nasale. Il s'agit des rhinites chroniques per-annuelles.
2. Les pathologies diffuses des sinus de la face. Elles correspondent à une maladie inflammatoire diffuse de la muqueuse nasale et sinusienne. On retrouve, au sein de ces pathologies, la polypose naso-sinusienne et la rhinosinusite fongique allergique.
 - a. Rhinosinusite chronique avec polypose nasale [5]: il s'agit d'une entité caractérisée par la présence de polypes nasaux bilatéraux constitués de matériel inflammatoire et apparaissant comme des masses gélatineuses à la rhinoscopie. Ces polypes se retrouvent généralement autour du complexe ostio-métal antérieur et peuvent se voir secondairement dans les cavités nasales et sinusiennes. L'étiologie du développement initial ainsi que la physiopathologie de ces structures inflammatoires sont incomplètement élucidées à ce jour.
 - b. Rhinosinusite fongique allergique: elle touche le sujet immunocompétent atopique et est secondaire à une réaction d'hypersensibilité de type I, IgE médiée, liée au champignon [7]. Il est également fréquent de trouver des polypes dans cette forme, mais la différence majeure avec la polypose nasale repose sur la présence de mucines allergiques contenant des éléments fongiques [8]. Le diagnostic des sinusites fongiques allergiques repose ainsi sur 5 critères: (i) une sinusite confirmée à l'imagerie, (ii) la présence de mucus allergique dans les sinus avec des polynucléaires éosinophiles, (iii) la mise en évidence d'hyphes fongiques au sein de ce mucus, (iv) l'absence d'invasion de la muqueuse et (v) l'absence de facteurs d'immunodépression [9]. À l'instar de l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA), il est fréquent d'observer une hyperéosinophilie sanguine et une élévation des IgE totales. Si l'espèce responsable est *Aspergillus fumigatus*, la sérologie IgG anti-aspergillaire et les IgE spécifiques anti-aspergillaires sont fortement positives

[7]. Le traitement repose sur l'ablation endoscopique des polypes et du matériel inflammatoire afin d'aérer et drainer les sinus.

3. Les pathologies localisées à un ou plusieurs sinus de la face. Elles peuvent réaliser une pan-sinusite antérieure ou postérieure en cas de blocage inflammatoire de l'orifice de drainage. Dans la plupart des cas, la pathologie semble être inaugurée par une obstruction de l'ostium du sinus et une sinusite aiguë bactérienne. Si l'obstruction persiste, un processus inflammatoire s'installe. La participation d'une infection chronique dans ce processus reste débattue. En effet, les preuves microbiologiques d'infection sont rares en raison de l'utilisation fréquente empirique d'antibiotiques sans prélèvement préalable. Cependant, un certain nombre d'études ont mis en évidence la présence de biofilm bactérien au niveau de la muqueuse [10,11]. On retrouve dans cette dernière catégorie les sinusites chroniques bactériennes localisées (d'origine dentaire ou non) et les rhinosinusites fongiques sans allergie associée.

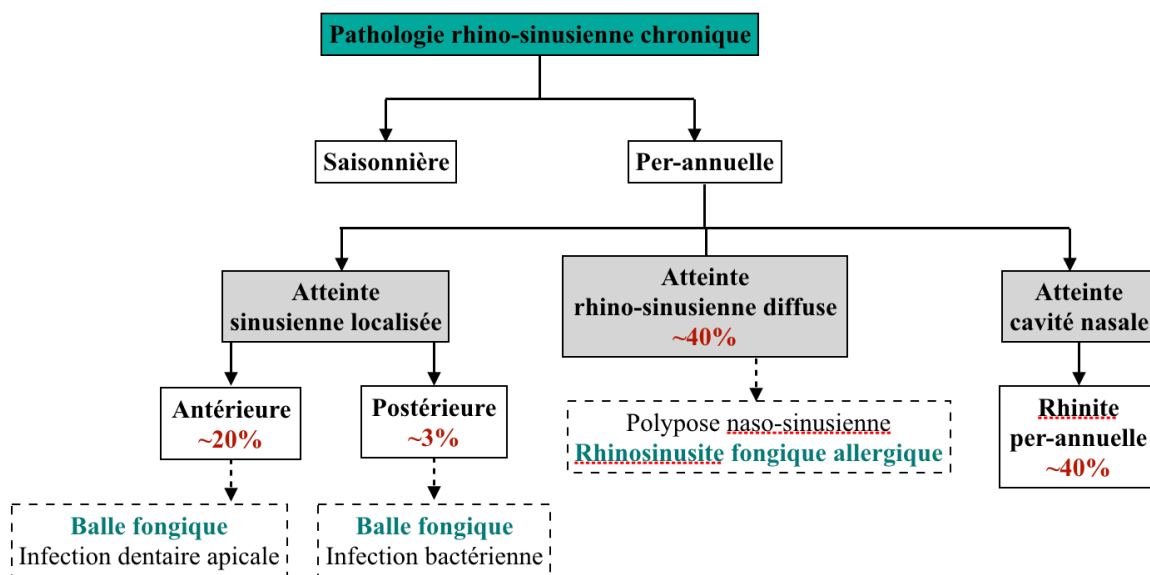


Figure 3. Classification des dysfonctionnements rhino-sinusiens chroniques (DRSC)

CLASSIFICATION DES RHINOSINUSITES FONGIQUES

Les rhinosinusites fongiques sont le plus fréquemment associées aux genres *Aspergillus* et *Fusarium* ainsi qu'à certains champignons dématiés (*Alternaria*, *Bipolaris*, ...) [12]. La classification des sinusites fongiques distingue sinusites fongiques invasives et non-invasives sur des critères cliniques, radiologiques et anatomopathologiques résumés dans le tableau 1 [13].

Parmi les **sinusites non-invasives**, sont représentées les **sinusites fongiques** allergiques (qui appartiennent aux DRSC diffus, décrits précédemment, cf. p13) et les **balles fongiques sinusiennes**, qui seront détaillées ultérieurement (cf. p.17) (tableau 1). Les **formes invasives** regroupent, quant à elles, trois entités :

Les **sinusites invasives aiguës** surviennent chez le patient immunodéprimé, notamment dans le cadre d'une hémopathie maligne ou d'une neutropénie. Elles sont majoritairement dues à *A. fumigatus* ou à des Mucorales donnant alors un tableau de mucormycoses rhino-orbito-cérébrales. Ces dernières surviennent particulièrement chez les patients atteints de diabète mal équilibré et sont des urgences diagnostiques et thérapeutiques. En effet, ces formes, très rapidement progressives, envahissent les tissus mous et osseux adjacents. Le traitement requiert une chirurgie de débridement en urgence ainsi que des antifongiques systémiques à forte dose.

Les **sinusites invasives chroniques** évoluent de façon plus progressive (>12 semaines) et seraient la conséquence d'une baisse de l'immunité dans le cadre d'une sinusite fongique non invasive sous-jacente, comme une balle fongique [13]. Le diabète et la corticothérapie sont les principaux facteurs de risque d'évoluer d'une sinusite fongique non-invasive vers une sinusite fongique invasive. La sinusite se présente initialement sous forme de céphalées, douleurs et congestion nasale, donnant ensuite des symptômes liés à l'envahissement des tissus et nerfs adjacents. Le traitement repose sur les antifongiques systémiques.

Les **sinusites invasives chroniques granulomateuses** représentent une entité particulière, liée à *Aspergillus flavus*, survenant chez le sujet jeune immunocompétent dans certaines zones géographiques, notamment au Maghreb, au Soudan, en Inde et au Moyen-Orient. L'évolution se fait sur plusieurs années, souvent de façon asymptomatique, avec un envahissement progressif des tissus adjacents et finalement une lyse osseuse. Une réaction granulomateuse sans nécrose caséuse, une fibrose importante et une absence d'angio-invasion sont classiquement observées à l'anatomopathologie. Le traitement repose sur les antifongiques par voie systémique. La mortalité est quasi nulle, mais les récurrences fréquentes [12].

	Type	Caractéristiques de l'hôte	Clinique	Microbiologie	Anatomopathologie	Autres
Non-invasive	Sinusite allergique fongique	Immunocompétent Terrain atopique (asthme et rhinite allergique)	Polypes nasaux Pansinusite chronique récidivante	<i>Pays tempérés :</i> Champignons dématiés (<i>Alternaria</i> sp., <i>Curvularia</i> sp., <i>Bipolaris</i> sp.), <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Fusarium</i> sp. <i>Inde et Moyen-Orient:</i> <i>Aspergillus flavus</i>	Eosinophiles altérés et cristaux de Charcot-Leyden Hyphes Absence d'invasion de la muqueuse	Infection bactérienne souvent associée
	Balle fongique sinusienne	Immunocompétent	Sinusite chronique Douleur faciale Cacosmie	<i>A. fumigatus</i>	Absence d'invasion de la muqueuse	
Invasive	Sinusite fongique aiguë invasive	Immunodéprimé (diabète, neutropénie, hémopathie maligne, transplanté d'organe solide)	Présentation aiguë Fièvre Céphalées Epistaxis Douleur faciale	<i>A. fumigatus</i> Mucorales (<i>Rhizopus</i> sp., <i>Mucor</i> sp., <i>Lichteimia</i> sp., ...)	Invasion de la muqueuse et des vaisseaux sanguins Infarctus tissulaire Nécrose	
	Sinusite fongique chronique invasive	Immunodéprimé (diabète et corticothérapie)	Evolution progressive > 3 mois Douleurs nasales Céphalées Anosmie	<i>Aspergillus</i> sp.	Invasion de la muqueuse et des vaisseaux sanguins Infiltrat inflammatoire chronique	
	Sinusite fongique granulomateuse	Immunocompétent	Asymptomatique	<i>A. flavus</i>	Granulome sans nécrose caséuse Fibrose importante Pas d'angio-invasion	

Tableau 1. Classification et particularités des sinusites fongiques

La balle fongique sinusienne représente jusqu'à 28,5% des sinusites chroniques maxillaires [14]. C'est de loin la sinusite fongique la plus fréquente et la plus étudiée [14]. Il s'agit d'un amas dense de filaments mycéliens obstruant le sinus (Fig. 2). Elle touche particulièrement les femmes âgées de 50 à 60 ans [15,16]. La physiopathologie de cette entité reste mal comprise, mais deux portes d'entrée sont proposées : respiratoire ou dentaire. La balle fongique d'origine respiratoire se formerait après inhalation de spores via l'ostium naturel du sinus. La balle fongique d'origine dentaire ferait suite à une communication iatrogène créée lors d'une extraction dentaire ou d'un traitement endocanalair, qui permettrait la colonisation sinusienne par le champignon. Une combinaison des deux mécanismes est envisageable. Elle serait favorisée par la composition riche en zinc des pâtes dentaires qui peuvent secondairement saillir au niveau de la muqueuse sinusienne et favoriser ainsi l'implantation des champignons. Cette théorie n'est néanmoins pas valable pour les balles fongiques des sinus frontaux et sphénoïdaux. Certains auteurs ont aussi émis l'hypothèse que la fermeture d'un ostium, rendant l'environnement anaérobie, serait à l'origine de la transformation d'une colonisation saprophyte fongique en un envahissement pathogène du sinus [17]. Cette théorie semble démentie par une étude montrant qu'une obstruction ostioméatale est rarement observée dans le cas des balles fongiques sinusiennes [18]. Le diagnostic de balle fongique est probablement souvent sous-estimé, mais devrait être envisagé dans tous les cas de sinusites chroniques réfractaires à un traitement antibiotique, notamment lorsqu'elles sont unilatérales. Une obstruction sinusienne à centre hypodense, sans notion de corps étranger à l'interrogatoire, devrait aussi faire évoquer le diagnostic. Seuls l'examen direct et l'anatomopathologie pourront confirmer le diagnostic et son caractère non invasif. Un traitement chirurgical est systématiquement requis dans le cas des balles fongiques, plus ou moins associé à un traitement médical par azolés en péri-opératoire. Ce traitement est notamment proposé dans des cas d'ophtalmoplégie ou de syndrome méningé avec présence d'une ostéolyse sans mise en évidence de filaments invasifs à l'examen anatomopathologique [19]. Le pronostic est bon, seules de rares récurrences ont été décrites [14].

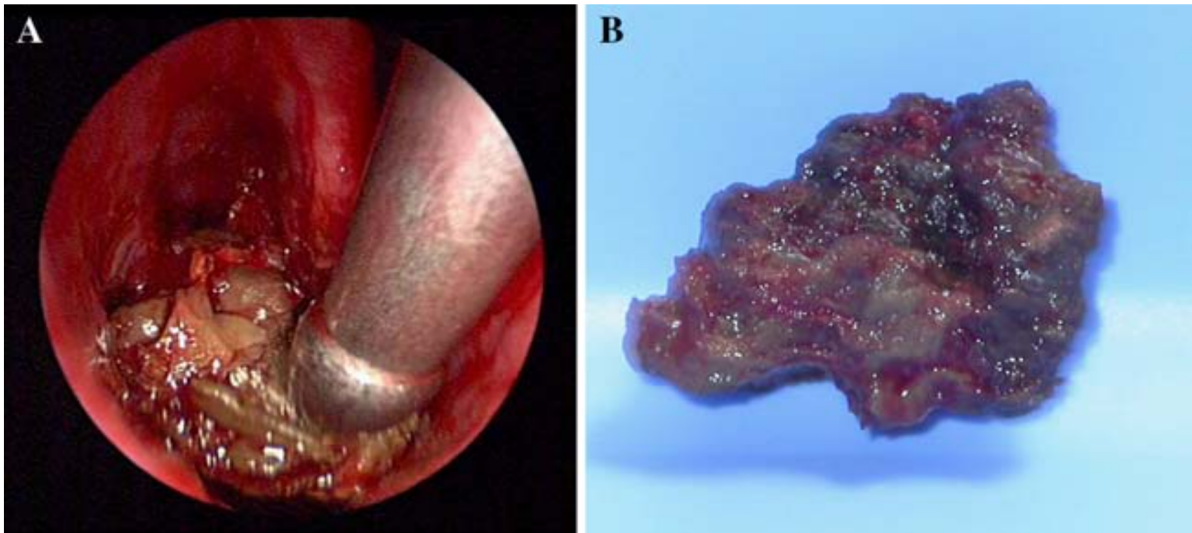


Figure 4. Balle fongique du sinus maxillaire. (A) Vue endoscopique peropératoire: muqueuse œdémateuse et inflammatoire (B) Aspect macroscopique de la balle fongique après exérèse chirurgicale.

Après exérèse chirurgicale, l'anatomopathologie et l'examen direct mycologique des balles fongiques montre quasi systématiquement la présence de filaments mycéliens. Néanmoins, le champignon n'est que rarement isolé en culture (30-35% des cas), ce qui pose problème pour évaluer les options thérapeutiques [20,21]. Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer cette discordance. La première hypothèse est que nos techniques diagnostiques et milieux de culture utilisés en routine mycologique (Sabouraud) soient insuffisants pour mettre en évidence des espèces fongiques nécessitant des conditions de croissance particulières. Dans une cohorte nantaise de 2018 incluant 137 patients, Morio *et al.* ont utilisé, en complément de la culture, une PCR ciblant l'ADN ribosomal 28S d'*A. fumigatus* sur l'ADN extrait à partir de balles fongiques. Alors que la culture n'était positive que dans 32,1% des cas, la PCR permettait d'identifier *A. fumigatus* dans 77,4% des cas [21]. *A. fumigatus* est pourtant une des moisissures les plus fréquentes et facilement cultivée sur milieu de culture classique. Dans une cohorte rennaise, une PCR panfongique ciblant la région *internal transcribed spacer* (ITS) a été réalisée sur des balles fongiques sinusiennes, permettant de mettre en évidence 79% d'*Aspergillus* spp. [22]. Cette première hypothèse est donc peu probable. Une seconde hypothèse serait que les structures fongiques au sein de la balle sinusienne sont altérées et/ou que le métabolisme du champignon est ralenti, rendant la croissance du champignon *in vitro* lente ou difficile dans les conditions de culture standards. Enfin, on peut faire une dernière hypothèse: la présence concomitante d'espèces bactériennes, commensales ou pathogènes, interagissant avec le champignon, pourrait fragiliser son

intégrité et inhiber sa croissance [23]. Dans une étude récente basée sur la culture, Zhang *et al.* ont montré que des bactéries pathogènes étaient associées dans plus de 75% des balles fongiques [23]. De façon intéressante, la présence de *Pseudomonas aeruginosa* était significativement associée à l'observation de filaments mycéliens altérés à l'examen direct et à une culture mycologique non contributive [23]. Il est donc envisageable que les sinusites chroniques décrites comme des balles fongiques soient en fait le produit d'interactions microbiennes complexes, rendant difficile l'isolement *in vitro* des espèces impliquées.

METAGENOMIQUE ET NEXT GENERATION SEQUENCING

L'étude de la diversité microbienne et de son abondance a reposé jusqu'à la fin du XXème siècle sur des techniques de culture, en particulier bactériennes. Ces techniques présentent aujourd'hui de nombreuses limites. En effet, le milieu de culture et les conditions de croissance influencent fortement l'isolement des micro-organismes présents dans le prélèvement. On estime ainsi que la culture ne permet d'identifier que 1% des bactéries dans la plupart des échantillons environnementaux [24]. De plus, la culture entraîne une sur-représentation des souches et espèces à croissance rapide et une sous-représentation des espèces anaérobies, à culture lente ou exigeante. En outre, elle ne permet pas toujours d'identifier facilement les infections mixtes. Enfin, l'étude de la biodiversité fongique est souvent omise.

Le terme de métagénomique a été défini pour la première fois en 1998 comme "*la collecte de tous les génomes des membres d'une communauté microbienne à partir d'un certain environnement*" [25]. L'avènement des techniques de métagénomique ou en d'autres termes, de séquençage à très haut débit, permet depuis plusieurs années des analyses précises des microbiotes humains. Le microbiote, concept récent également, est défini comme "*la communauté écologique des micro-organismes commensaux, symbiotiques et pathogènes qui se partagent notre corps*" [26]. Le microbiome vient secondairement préciser un microbiote dans un environnement donné et à un temps donné. À l'inverse de la génomique qui consiste à séquencer un génome unique, la métagénomique séquence l'ADN de l'ensemble des espèces de micro-organismes présents dans un milieu donné et permet d'apporter des indications concernant leur identification et leurs abondances relatives. Il existe deux grands types d'analyses métagénomiques : le *whole genome shotgun* et la métagénomique ciblée (Fig. 5). Le *whole genome shotgun* permet de séquencer la totalité de l'ADN et/ou ARN contenu dans un échantillon, donnant des séquences issues de plusieurs génomes. Cette technique apporte

une quantité d'information maximale concernant un échantillon, mais l'analyse est coûteuse, complexe et nécessite un assemblage minutieux des séquences afin de reconstituer les génomes présents dans l'échantillon. Dans ce type d'analyse, les proportions de chaque organisme au sein du microbiote sont conservées. Dans les analyses par métagénomique ciblée, on amplifie et on séquence une région choisie pour ses capacités en tant que marqueur de la taxonomie. L'analyse est moins onéreuse et plus rapide que le *whole genome shotgun*, mais elle entraîne de nombreux biais notamment taxonomiques, liés au choix de la région d'amplification, mais aussi des biais quantitatifs liés à l'amplification inégale de certains gènes par rapport à d'autres. Jusqu'aux années 2010, seules des analyses de métagénomique ciblée portant sur le microbiote bactérien étaient publiées. L'analyse concomitante de la diversité fongique des microbiotes est encore très rare, notamment pour les prélèvements de type respiratoire [27].

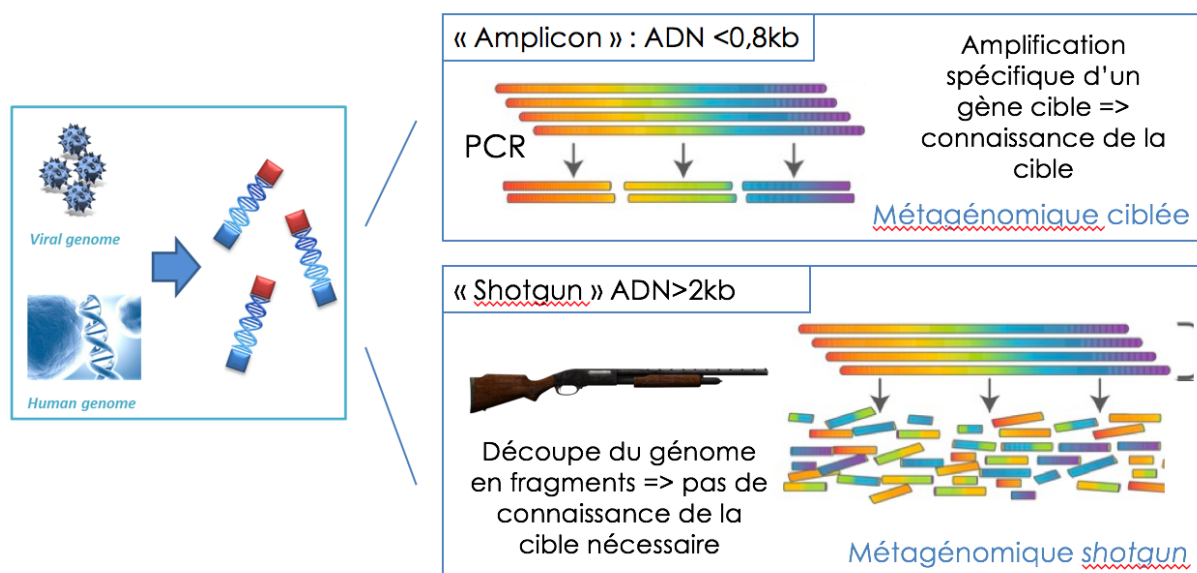


Figure 5. Deux types de métagénomique. La métagénomique ciblée est basé sur l'amplification puis le séquençage d'un fragment d'ADN/ARN ubiquitaire chez les organismes étudiés. La métagénomique non ciblée ou *whole genome shotgun* fragmente l'ADN/ARN présent et séquence la totalité des fragments sans amplification préalable. Schéma de C. Rodriguez.

LA METAGENOMIQUE CIBLEE

LES DIFFERENTES ETAPES

L'étape fondamentale de toute étude de métagénomique ciblée est la réalisation d'un plan d'expérience répondant à une question biologique claire permettant de guider les choix technologiques, les protocoles techniques et les méthodes d'analyses.

COLLECTION DES ECHANTILLONS

Chaque prélèvement doit être représentatif du milieu étudié. Les prélèvements doivent être réalisés de manière stérile afin de réduire au maximum le risque d'introduction d'ADN exogène contaminant. L'idéal est d'extraire l'ADN dès que l'échantillon est prélevé, car la matrice vivante est sujette à évolution après retrait de son milieu d'origine. En pratique, il est souvent nécessaire de transporter et stocker les échantillons en les congelant ou en leur ajoutant des conservateurs afin de figer la composition du microbiome. Ces différentes méthodes de préservation peuvent quand même altérer la composition des échantillons. Choo *et al.* ont notamment décrit des compositions différentes entre échantillons frais, congelés et conservés à l'aide de différents conservateurs [28,29]. La réfrigération à 4°C, la conservation à température ambiante et l'utilisation de différents conservateurs (RNAlater®, OMNIgene.GUT® et Tris-EDTA) étaient comparées à la congélation à -80°C pour des prélèvements fécaux. La réfrigération n'entraînait pas d'altération significative de la diversité. L'utilisation des conservateurs entraînait des modifications plus ou moins importantes en fonction du produit utilisé : le Tris-EDTA, par exemple, altérait de façon significative la diversité [28]. Dans une autre étude, Angebault *et al.* ont comparé le stockage à -80°C avec et sans RNAlater®. Des différences significatives dans l'abondance relative de certains taxa étaient notées pour 7/41 taxa bactériens et 6/40 taxa fongiques. Un taxon fongique, *Cryptococcus*, était uniquement détecté dans les échantillons stockés dans du RNAlater® [29].

EXTRACTION

L'étape d'extraction et son optimisation sont une étape essentielle du protocole de métagénomique ciblée. Cette étape permet d'accéder à l'ADN des organismes présents dans l'échantillon et la méthode d'extraction doit être adaptée à la nature de l'échantillon et à celle des micro-organismes que l'on cherche à étudier. Par exemple, l'approche sera très différente si l'on cherche à extraire de l'ADN viral circulant ou de l'ADN fongique, protégé par une membrane nucléaire, une membrane plasmique et une paroi cellulaire. En effet, la paroi fongique, constituée d'une épaisse couche de chitine, de β -glucanes et autres polysaccharides associés à des protéines et, dans certains cas, de mélanine, protège efficacement la cellule fongique contre la lyse chimique et enzymatique. Les protocoles permettant d'extraire l'ADN fongique doivent donc intégrer des étapes de lyse mécanique à l'aide de microbilles [29,30] ainsi qu'une lyse enzymatique. De la même manière, l'extraction des bactéries à Gram positif

ou des Mycobactéries est souvent difficile et nécessite de combiner aussi lyse mécanique et enzymatique [31]. Dans un travail comparant 21 méthodes d'extraction, Costea *et al.* ont d'ailleurs montré qu'une étape de lyse mécanique était associée à une meilleure appréciation de la diversité bactérienne et que cette étape était essentielle au rendement d'extraction des bactéries Gram positif [31]. Concernant les fungi, Huseyin *et al.* ont comparé 5 protocoles d'extraction du microbiote intestinal et seuls les protocoles avec une étape de lyse mécanique avec microbilles permettait d'extraire l'ADN en quantité suffisante permettant une amplification et un séquençage de l'ADN fongique [32]. Des résultats similaires sont observés par Vesty *et al.* lors de l'extraction du microbiome bactérien et fongique salivaire avec 4 protocoles différents [33]. Pour l'extraction combinée de l'ADN bactérien et fongique, Angebault *et al.* ont récemment souligné que le choix de la technique d'extraction affecte plus l'abondance relative des taxa fongiques que bactériens [34]. Dans un autre travail comparant 8 protocoles d'extraction pour l'étude du microbiote oral, Rosenbaum *et al.* ont montré que les différences de protocoles d'extraction affectaient plus le rendement de l'extraction que la composition en taxa [35]. Le rendement de l'extraction d'acides nucléiques est important pour la métagénomique bactérienne, mais plus encore pour la métagénomique fongique en raison des faibles charges fongiques au sein des microbiomes humains [36]. L'ADN exogène issu de l'hôte ou de certains réactifs pouvant être à l'origine de contamination, il est important de traiter en parallèle les témoins négatifs faisant office de contrôles.

CHOIX DE LA CIBLE ET DES AMORCES

Afin d'identifier au mieux la diversité microbienne d'un échantillon, l'amplification cible un locus génomique d'intérêt taxonomique. Un bon marqueur taxonomique est à la fois **universel**, présent dans tous les génomes extraits et contenant des séquences conservées permettant d'hybrider des amorces, et **spécifique**, contenant des séquences suffisamment variables pour discriminer correctement les taxa. Différents loci se sont imposés comme cibles privilégiées en fonction des règnes étudiés. Ils sont souvent retrouvés au niveau de l'opéron ribosomique :

- ADNr 16S pour les bactéries
- ITS pour les eucaryotes appartenant au règne fongique
- ADNr 18S pour les autres eucaryotes

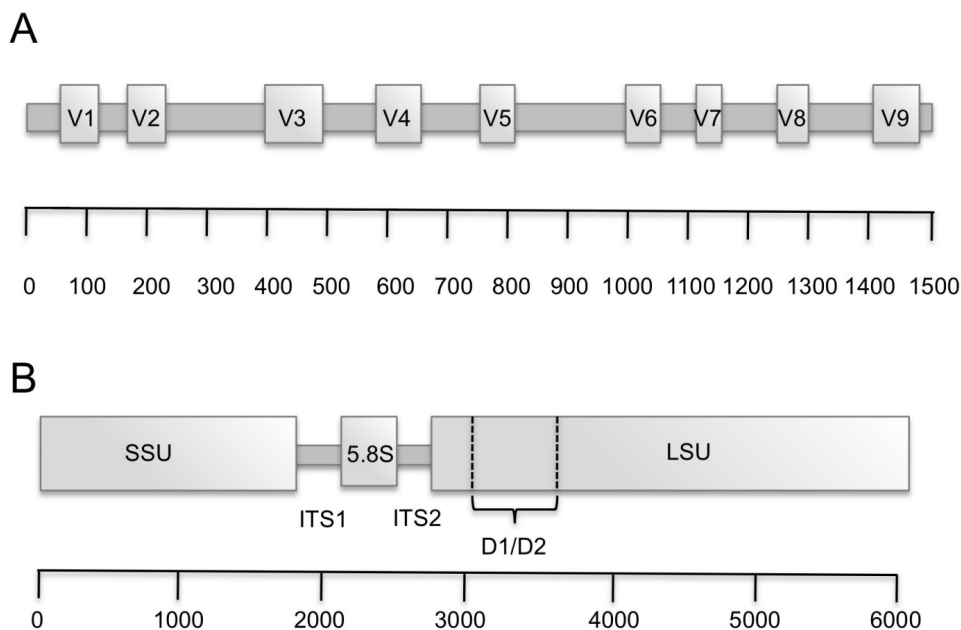


Figure 6. Carte du gène ADNr 16S bactérien (A) et opéron ribosomique fongique (B). Échelle en paire de bases. De Bokulich *et al.* [37].

Ces marqueurs ne sont pas parfaits et la variation du nombre de copies du locus cible entre microorganismes provoque une estimation biaisée de l'abondance relative de chaque espèce microbienne. En effet, le nombre de copies de l'opéron est variable selon les génomes et peut aller de 1 à 15 copies selon l'espèce bactérienne [38] ou fongique [39]. Une espèce à grand nombre de copies sera préférentiellement amplifiée et plus représentée dans les *reads* issus du séquençage. Les différentes copies peuvent également présenter des variations de séquences rendant l'identification des organismes complexe [39].

Par ailleurs, les techniques actuelles de séquençage ne permettent pas de séquencer l'intégralité des régions cibles et il est donc nécessaire de choisir pour chaque région un fragment d'intérêt (450 à 550 nucléotides). Ainsi, il est recommandé de cibler la région V3-V4 de l'ADNr 16S pour étudier le microbiome intestinal humain [40] alors qu'on préférera la région V1-V2 pour l'étude des eaux usées [41]. Le choix des amorces est également dépendant de la composition du microbiote attendu, et doit faire un compromis entre la compatibilité des amorces avec un maximum de taxa et leur spécificité. En effet, l'utilisation de certaines amorces peut entraîner des biais taxonomiques. Ainsi, Bellemain *et al.* [42] explorent, par une méthode bio-informatique de PCR *in silico*, les biais d'amplification fongique des couples d'amorces les plus fréquemment utilisés. L'appariement des amorces sur des séquences vérifiées de bases de données est analysée en fonction de différents paramètres

de PCR. L'amorce sens ITS1-F ciblant la région ITS1 (Figure 6B) présente de nombreux non-appariements entraînant des biais taxonomiques durant la PCR. Les amorces ITS1-F, ITS1, ITS5 entraînent des biais taxonomiques en faveur de l'amplification des basidiomycètes tandis que les amorces ITS2, ITS3 et ITS4 favorisent les ascomycètes [42]. Pour augmenter la sensibilité des amorces, il est possible d'ajouter des bases dégénérées aux amorces, mais aux dépens de la spécificité puisque cela augmente le risque d'amplification de séquences contaminantes, notamment humaines. Ihrmark *et al.* [43] proposent trois nouvelles amorces-sens comprenant des bases dégénérées, ciblant la région ITS2 en association avec une amorce anti-sens ITS4 précédemment décrite [44]. La longueur de la région amplifiée est également variable et certains auteurs amplifient la région ITS1 ou ITS2 tandis que d'autres amplifient la totalité de ITS1-5,8S-ITS2 (Figure 6B)[45]. Amplifier une région plus longue donne plus d'information taxonomique et permet parfois d'identifier jusqu'à l'espèce, mais cela entraîne également des biais de sélection liés aux variations importantes de longueur de la région ITS d'une espèce à l'autre. Dans tous les cas, l'amplification de la région ITS2 aura toujours tendance à favoriser les ascomycètes, en raison de la différence de longueur systématique de cette région entre ascomycètes et basidiomycètes. Afin de comparer les résultats des études de métagénomique de la littérature, il faut prendre en compte les amorces utilisées. Les projets étudiant le mycobiome des voies aériennes supérieures et inférieures utilisent majoritairement des amorces ciblant la région ITS1 ou ITS2 (Tableau 1).

Sites de prélèvement	Statut clinique	Région amplifiée	Amorces utilisées	Référence
ROP (n = 20)	patients sains	ITS1	ITS1-F/ITS2	Ghannoun <i>et al.</i> (2010) [46]
ROP/ BAL (n = 24)	sains/transplantés pulmonaires	ITS1	ITS1-F/ITS2	Charlson <i>et al.</i> (2012) [47]
Expectorations	mucoviscidose	ITS2	ITS2-F/ITS2-R	Delhaes <i>et al.</i> (2012) [48]
Expectorations induities (n = 43)	Asthme	18S	Euk1a/Euk516r	Van Woerden <i>et al.</i> (2013) [49]

ROP (n = 24)	VIH/ non VIH	ITS1	ITS1-F/ITS2	Mukherjee <i>et al.</i> (2014) [50]
Salive (n = 6)	Sains, non- fumeurs	ITS1	ITS1F/ITS2	Dupuy <i>et al.</i> (2014) [51]
Expectorations (n = 6)	mucoviscidose	ITS1	ITS1F/ITS1R	Willger <i>et al.</i> (2014) [52]
Ecouvillon nasal (n = 23)	Sinusites chroniques	18S	funSSUF/SSUfunR	Cleland <i>et al.</i> (2014) [53]
Expectorations (n = 56)	mucoviscidose	ITS1	ITS1/ITS2	Kramer <i>et al.</i> (2015) [54]
ROP/LBA (n = 56)	BPCO	18S ITS1	18S0067a/NSR399 ITS1-F/ITS2	Cui <i>et al.</i> (2015) [55]
Ecouvillon nasal (n=8)	Rhinite allergique	18S	NR	Jung <i>et al.</i> (2015) [56]
Expectorations (n=4)	mucoviscidose	ITS2	ITS3/ITS4	Botterel <i>et al.</i> (2017) [27]
LBA (n=59)	ABPA	ITS1	NR	Fraczek <i>et al.</i> (2017) [57]
LBA (n=89)	<i>Blastomyces</i> obtenu en culture	ITS1	ITS1F/ITS1R	McTaggart <i>et al.</i> (2019) [58]

Tableau 2. Études du mycobiome fongique dans les voies respiratoires. ROP Rinçages oropharyngés; LBA: Lavage broncho-alvéolaire; BPCO: Broncho-pneumopathie chronique obstructive; NR: non renseigné

Il est donc important de sélectionner méticuleusement la cible et les amorces, notamment pour les échantillons environnementaux très riches en taxa. Par ailleurs, il est recommandé, au moins pour les validations de protocole, d'utiliser plusieurs jeux d'amorces en parallèle.

AMPLIFICATION ET SEQUENCAGE

Préparation des bibliothèques de séquençage

La première étape consiste à amplifier, selon la cible choisie, les fragments d'ADN contenus dans le mélange initial d'ADN génomique issu de l'échantillon. Des séquences artificielles sont ensuite ajoutées par ligation aux extrémités des amplicons (Figure 7) :

1. Séquences index, marqueurs choisis par l'expérimentateur afin de retrouver l'origine des séquences produites (*reads*) après le run de séquençage (au cours duquel tous les fragments à séquencer ont été mélangés)
2. Séquences d'adaptateurs qui permettent d'ancrer les amplicons au support du séquenceur (*flow cell*) et d'initier le séquençage

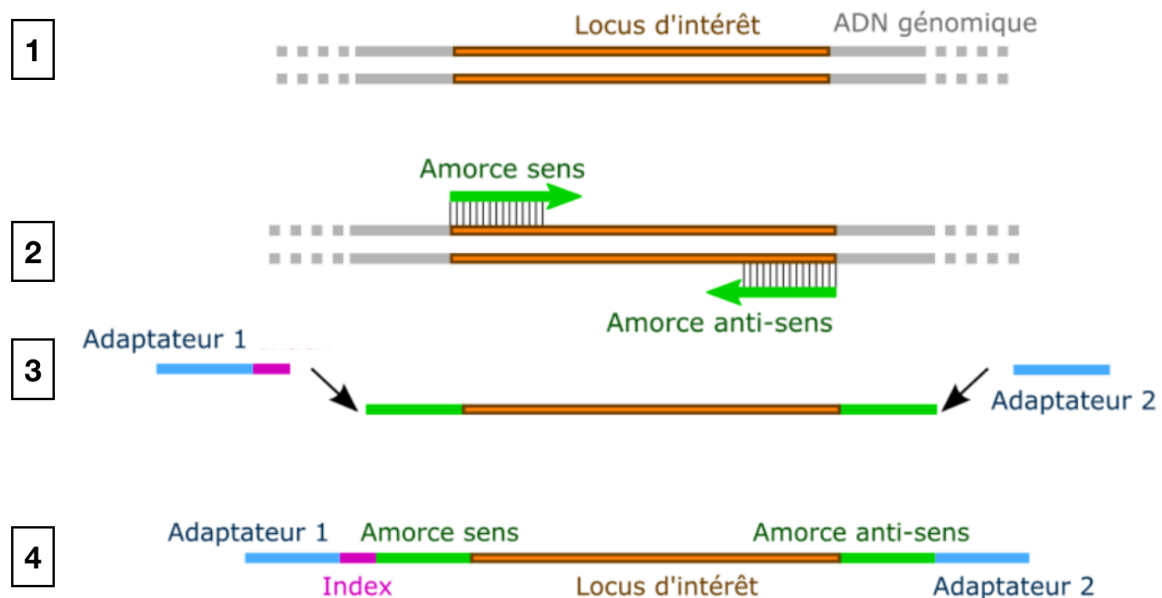


Figure 7. Préparation des bibliothèques de séquençage. (1) ADN génomique avec locus d'intérêt à amplifier; (2) amplification du locus cible avec amorces sélectionnées; (3) ligation des adaptateurs (bleu) et index (rose); (4) obtention du produit final

Durant cette étape, les amplicons vont également subir plusieurs purifications et une quantification. Cette dernière permettra la normalisation manuelle des échantillons et l'homogénéisation de la quantité d'amplicons séquencée pour chaque échantillon. À l'issue de ces différents stades de préparation, les bibliothèques de séquençage sont prêtes à être traitées. Elles sont alors transformées en séquences (*reads*) par un séquenceur haut débit.

Séquençage à haut débit

Il existe plusieurs générations de séquenceurs à haut débit avec différents modes de fonctionnement. Les séquenceurs de deuxième génération correspondent au 454 GS-FLX et GS-FLX+ de Roche, Illumina HiSeq & MiSeq, Ion torrent PGM. Les trois derniers sont les plus utilisés actuellement dans les services hospitaliers en raison de leur bon rapport qualité-prix, de leur accessibilité technique et de leur taille réduite adaptée au travail dans un laboratoire de petite taille. Je présenterai ici uniquement la technologie utilisée dans ce travail,

le séquenceur Illumina MiSeq. Arrivée sur le marché en 2011, cette technologie est basée sur du séquençage par synthèse faisant intervenir des nucléotides porteurs de 4 fluorochromes différents, un pour chaque base nucléique. Les fragments d'ADN sont fixés sur un support de séquençage appelé *flow cell* sur laquelle une amplification de fragments se fait en pont (*bridge-PCR*) formant des clusters de fragments identiques sur la lame. L'étape de séquençage peut être à l'origine de biais et certains points doivent être contrôlés après le *run* afin de préparer l'analyse bio-informatique. En premier lieu, il convient de vérifier la profondeur de séquençage. Elle correspond au nombre maximum de séquences obtenues (*reads*) par le séquenceur. Ce nombre de *reads* total est divisé par le nombre d'échantillons injectés sur la *flow cell* ce qui revient à avoir un nombre de *reads* moyen par échantillon. Plus la *flow cell* est chargée avec beaucoup d'échantillons et plus le risque est grand de manquer un amplicon faiblement représenté. Il est possible de réduire le nombre d'échantillons pour augmenter la profondeur de séquençage aux dépens du coût de l'expérience ou du nombre d'échantillons passés.

Analyse bio-informatique : nettoyage (*trimming*) des données

Si la profondeur globale du *run* est acceptable, le nettoyage (*trimming*) des données peut débuter. Les *reads* sont d'abord filtrés s'ils présentent des marqueurs de qualité insuffisante. Il s'agit d'éliminer les *reads* contenant un pourcentage trop important de bases indéterminées, les *reads* trop courts et ceux qui possèdent un score de qualité Phred insuffisant. Le score Phred (Q) était initialement assigné à chaque base nucléique issue d'un électrophorégramme lors du séquençage Sanger. Il est par la suite devenu un standard permettant de caractériser la qualité d'une séquence d'ADN afin de comparer différentes techniques. Ce score est relié à la probabilité d'erreur d'identification d'une base. Un score Phred de 30 (seuil usuel d'acceptabilité) signifie que la probabilité que cette base ait été identifiée incorrectement est de 1 pour 1000 selon la formule $Q = -10 \log_{10} P$. Un score global est ensuite donné à chaque *read* obtenu. Ces *reads* sont ensuite démultiplexés grâce à l'index nucléotidique qui marque chaque séquence, ce qui permet de les associer à leur échantillon de départ.

Analyse bio-informatique : assignation des données

L'analyse bio-informatique des données consiste à assigner à chaque *read* une identification taxonomique fiable afin d'évaluer la composition et la diversité de l'échantillon. La conception de *pipelines* d'analyse a permis d'alléger cette démarche complexe. Il en existe actuellement deux catégories distinctes :

1. Les pipelines *clustering-first* qui regroupent les *reads* en clusters appelés *Operational Taxonomic Units* (OTU) en se basant sur leurs similarités et qui identifient ces OTUs en comparant une séquence représentative du cluster à une base de données de séquences annotées. Cette démarche nécessite de fixer un seuil de similarité pour définir une OTU.
2. Les pipelines *assignement-first* qui annotent chaque *read* puis les regroupent secondairement en clusters en fonction de l'annotation.

Le choix de la banque de séquences de référence est une étape primordiale pour l'assignation taxonomique. Généralement, les *pipelines* sont associés à une base privilégiée. La base de données doit être adaptée à la cible d'intérêt, annotée correctement, exhaustive et elle doit suivre une taxonomie standardisée. Pour l'ARNr 16S bactérien, trois banques principales font référence [59]: SILVA [60], Greengenes [61] et RDP (Ribosomal Database Project) [62]. La base SILVA propose des séquences tirées de l'ENA (European Nucleotide Archive) et elle est régulièrement mise à jour (incrémentation des nouvelles séquences). Greengenes est l'équivalent américain et se base uniquement sur des séquences issues de Genbank. RDP est une autre initiative américaine qui a la particularité d'avoir un alignement et un arbre taxonomique de référence, basé sur un ensemble restreint de 10 000 séquences issues du séquençage de souches types. Concernant les banques de séquences de référence pour les ITS fongiques, elles sont moins standardisées. Elles ont longtemps été difficiles à utiliser en raison de nombreuses séquences incomplètes et/ou mal annotées sur Genbank [63]. Des bases de données publiques avec séquences contrôlées ont été récemment développées telles que la NCBI RefSeq [64], BOLD [65], UNITE [66] et l'ISHAM-ITS database [67]. Certaines bases de données sont spécifiques des champignons pathogènes pour l'homme, comme pour Fungibank, créée et mise à jour par le Centre National de Référence des Mycoses invasives et Antifongiques (CNRMA) français (<http://fungibank.pasteur.fr>). Le groupe de travail international de l'ISHAM (International Society for Human and Animal Mycoses) a mis au point en 2011 une base de données de pathogènes humains et animaux contenant aujourd'hui

plus de 3750 séquences d'ITS [63]. Cette base de données est également parfaitement intégrée à NCBI RefSeq, UNITE et BOLD via des liens directs [63]. UNITE, créée en 2003, se concentrait initialement sur des séquences de champignons mycorrhiziens. Plus récemment, des changements majeurs ont été apportés à cette base, qui a élargi son spectre de séquences de référence, et UNITE est désormais considérée comme une base de données fiable pour la plupart des champignons [66]. De plus, elle permet l'analyse directe de séquences issues d'une analyse de métagénomique [66].

À l'issue de cette étape bio-informatique, une table d'OTU est obtenue, contenant le nombre de *reads* assignés pour chaque échantillon à chaque OTU et les assignations taxonomiques correspondantes (cf. annexe 1). Il est ensuite nécessaire de normaliser les comptages entre échantillons qui n'ont pas forcément un nombre total de *reads* identique et ce malgré la normalisation manuelle des échantillons faite avant l'étape de séquençage. On s'intéresse ensuite aux abondances relatives de chaque OTU ou de chaque taxon au sein de l'échantillon pour analyser le microbiote.

EVALUATION DE LA DIVERSITE (DETECTEE) A PARTIR DE DONNEES METAGENOMIQUES

L'analyse des données de la table d'OTUs permet de répondre aux questions biologiques posées dans le plan d'expérience. Les définitions des principaux indicateurs de la diversité sont détaillées dans le tableau 3. La comparaison de la composition en organismes est permise par différents indicateurs biologiques : alpha-diversité et bêta-diversité.

Indicateur de diversité	Définition
Richesse (<i>species richness</i>)	Nombre d'OTU ou taxa
Uniformité de la répartition (<i>evenness</i>)	Abondance relative des différents OTUs ou taxa
Dominance	Emergence d'un seul OTU ou taxon
Index de diversité	Index permettant d'évaluer la biodiversité d'un milieu calculé sur la base de la richesse et de l'uniformité de la répartition des OTUs ou taxa
Alpha-diversité	Diversité observée au sein d'un échantillon
Bêta-diversité	Diversité observée inter-échantillons

OTU: Operational taxonomic unit

Tableau 3. Indicateurs de diversité utilisés pour décrire une communauté microbienne

L'alpha-diversité correspond à la diversité d'un échantillon et peut-être calculée pour chaque échantillon à partir de la table d'OTUs. Elle est déclinée en 2 types de métrique : la richesse (compte total des différents OTUs) et l'uniformité de répartition (compte des OTUs en prenant compte de leur abondance relative). La richesse peut être sous-estimée si la profondeur de séquençage n'a pas été suffisante pour mettre en évidence tous les organismes présents dans l'échantillon. Il est possible de modéliser ce phénomène par une courbe de raréfaction en sous-échantillonnant un échantillon à différents intervalles de profondeur (Figure 8). La profondeur est suffisante si l'échantillon atteint une asymptote qui représente la richesse réelle de l'échantillon. Augmenter la profondeur de séquençage ne permettrait pas de découvrir de nouveaux OTUs si l'asymptote est atteinte. Certains indices de richesse comme Chao1 [68] ou ACE (*abundance-based coverage estimator*) [69] permettent de corriger le nombre d'OTUs en se basant sur des formules mathématiques modélisant cette courbe de raréfaction. Des échantillons ayant une richesse similaire peuvent néanmoins avoir une diversité différente, notamment en termes d'uniformité (ou homogénéité) de la répartition des taxa. Des indices de diversité évaluent ces différences de richesse et de répartition. Les indices les plus fréquemment utilisés sont l'indice de Shannon [70], l'indice de Simpson [71] et l'indice de Simpson inverse.

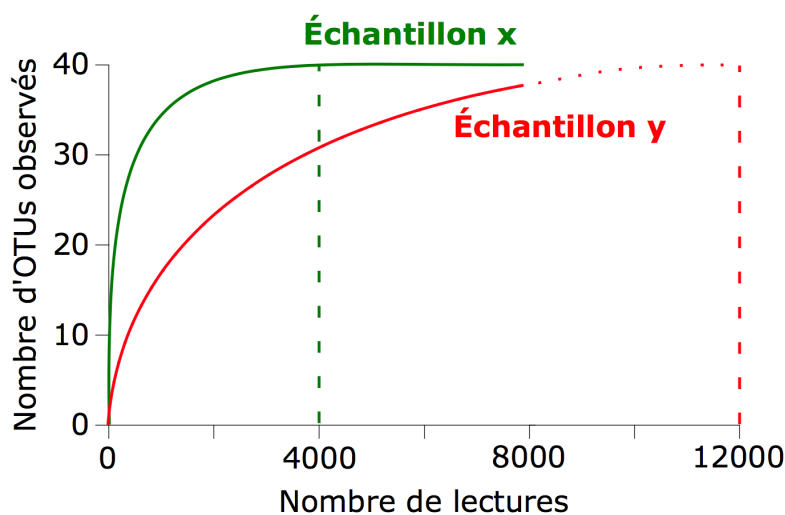


Figure 8. Courbe de raréfaction de deux échantillons x et y. L'asymptote est atteinte pour l'échantillon x et a une profondeur de séquençage suffisante à 8000 *reads* lus. L'échantillon y n'atteint pas l'asymptote à 8000 *reads* et il est probable que des OTUs minoritaires n'aient pas été mises en évidence. Il aurait fallu séquencer au moins 12000 *reads* pour obtenir la totalité des OTUs présents dans l'échantillon y. D'après Siegwald L. [72]

L'indice de Shannon est une mesure de l'entropie, représentée par un nombre souvent compris entre 0 et 5, mais n'ayant en théorie pas de maximum. Une valeur élevée représente un

microbiote avec une richesse importante et dont les OTUs ont des proportions similaires. Il est calculé de la façon suivante :

$$Shannon = - \sum_{i=1}^N p_i \log_2 p_i$$

N est le nombre total de taxa ou d'OTUs dans un échantillon et p_i la fréquence de l'OTU dans l'échantillon.

L'indice de diversité de Simpson calcule la probabilité que deux *reads* tirés au hasard dans un échantillon appartiennent au même OTU et se calcule selon la formule suivante :

$$Simpson = 1 - \sum_{i=1}^N p_i^2$$

La valeur est comprise entre 0 et 1. Plus la valeur est élevée, plus la diversité est importante. Il permet d'exprimer la dominance d'une espèce lorsqu'il tend vers 0 et la codominance d'espèces lorsqu'il tend vers 1. L'indice de Simpson inverse commence à 1, il représente une communauté ne contenant qu'un seul taxon ou OTU. Sa valeur augmente également avec la diversité de l'échantillon.

$$Simpson\ inverse = 1 / \sum_{i=1}^N p_i^2$$

Ces indices peuvent être utilisés pour évaluer si une différence significative de richesse et/ou d'uniformité de répartition existe entre des groupes d'échantillons.

La bêta-diversité évalue la différence de diversité inter-échantillons en évaluant le degré de différence entre deux communautés microbiennes. En comparant la bêta-diversité entre différents groupes d'échantillons, on peut évaluer le changement des communautés en fonction du temps, de l'espace géographique ou de certaines conditions particulières, physiologiques ou non. L'un des indices fréquemment utilisé pour évaluer la bêta-diversité est l'indice de dissimilarité de Bray Curtis [73]. Cet indice va de 0 (les deux échantillons partagent les mêmes OTUs ou taxa) à 1 (les deux échantillons n'ont aucune OTU en commun). D'autres indices, tels que la distance UniFrac, prennent en compte la phylogénie des OTUs et se basent sur les longueurs des branches de l'arbre partagées entre les

échantillons [74]. Dans une étude de métagénomique, calculer la bêta-diversité entre toutes les paires d'échantillons permet de générer une matrice de distances interprétée par analyse en coordonnées principales (principal coordinates analysis ou PCoA). Cela permet d'identifier les échantillons partageant les mêmes profils et de représenter les variables associées à chaque échantillon pour évaluer leur impact.

TESTS STATISTIQUES POUR EVALUER LES DIFFERENCES DE DIVERSITE

Une analyse statistique est nécessaire pour évaluer la nature des variations entre les échantillons et leur corrélation avec les variables biologiques du plan d'expérience. Les données complexes obtenues en métagénomique nécessitent des méthodes statistiques multi-variées rendant impossible l'application de tests paramétriques standards. De nombreuses méthodes statistiques adaptées à ces données ont été développées telles que Metastats [75] ou DESeq [76]. Cependant, l'utilisation de ces nouvelles méthodes d'analyse et leur interprétation sont difficiles pour un biologiste n'ayant pas de solides connaissances en bio-statistiques adaptées à ce type de données ainsi qu'en langage de programmation. Afin de répondre à ce problème, des logiciels proposant une interface graphique intuitive et des recommandations d'analyses statistiques ont vu le jour et permettent la comparaison d'échantillons deux à deux, entre deux groupes ou en multi-groupes en fonction des variables biologiques utilisées par le biologiste. Pour ce travail, nous avons utilisé le logiciel SHAMAN [77] (<http://shaman.pasteur.fr/>), développé par l'Institut Pasteur et dont les particularités sont détaillées dans les méthodes.

LES DONNEES DE METAGENOMIQUE DANS LES RHINO-SINUSITES CHRONIQUES

La physiopathologie des sinusites chroniques est complexe et résulte de l'interaction entre différents facteurs tels que l'espèce microbienne en cause, la flore sous-jacente, l'existence d'un déficit immunitaire mineur et les anomalies muco-ciliaires locales [78]. L'importance de chacun de ces facteurs est toujours en débat et certains auteurs pensent que les anomalies immunitaires et les facteurs locaux sont à l'origine de modifications de la flore sinusienne [79] tandis que d'autres préfèrent l'hypothèse de la présence d'une flore anormale à l'origine de l'inflammation [80]. Pour tenter de répondre à ces questions, l'étude du microbiome par des techniques de métagénomique ciblée a déjà été réalisée à plusieurs reprises [81-83]. Mais tandis que les communautés bactériennes présentes dans les sinusites chroniques ont fait l'objet de nombreuses études, les communautés fongiques sont fréquemment oubliées malgré

leur mise en évidence au sein du biofilm des sinusites chroniques [84,85]. En effet, deux études ont montré, par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), la présence de biofilm fongique dans les sinusites chroniques dans plus de 25% des cas, soit isolé, soit au sein d'un biofilm mixte, bactérien et fongique [84,85]. Une seule étude analyse la diversité et l'évolution du microbiome fongique dans les sinusites chroniques par métagénomique ciblée [53]. Celle-ci détecte plus de 200 genres fongiques, mais dans ce cas, c'est le microbiome bactérien associé qui n'a pas été étudié [53]. Concernant les balles fongiques sinusiennes plus spécifiquement, et toutes les sinusites fongiques en général, il n'existe aucune étude de métagénomique réalisée à ce jour pour analyser le microbiome bactérien et fongique. Pourtant, une meilleure connaissance de ce microbiome pourrait permettre de proposer de nouvelles hypothèses concernant la physiopathologie de la balle fongique sinusienne. Cette connaissance pourrait participer à prévenir la formation des balles fongiques et éviter ainsi un traitement chirurgical invasif.

OBJECTIF

L'objectif de notre étude était d'évaluer, par métagénomique ciblée, la diversité du microbiome bactérien et fongique dans des biopsies de balles fongiques sinusiennes, en comparaison d'autres sinusites chroniques, afin de rechercher une composante mixte bactérienne et fongique.

MATERIEL ET METHODES

POPULATION ET DESIGN DE L'ETUDE

Patients

Il s'agit d'une étude monocentrique rétrospective portant sur 48 patients opérés pour sinusites chroniques entre 2015 et 2017 à l'Hôpital Européen George Pompidou (HEGP) dans le service d'ORL du Pr Bonfils. Ces patients présentaient majoritairement des balles fongiques sinusiennes (n=40). Les témoins étaient des patients opérés pour sinusite chronique sans mise en évidence d'éléments fongiques à l'examen direct ou en culture (n=8). Les informations cliniques concernant l'âge, la localisation anatomique de la sinusite, les particularités du terrain sous-jacent, l'existence d'un traitement antifongique et antibiotique concomitant et la formule leucocytaire ont été collectées dans les dossiers cliniques et analysées. Les résultats d'anatomopathologie étaient inclus dans l'analyse lorsqu'ils étaient disponibles.

Approbation éthique et consentement

Cette étude a été réalisée en accord avec la déclaration de Helsinki et la loi Jardé. Tous les patients de l'institution ont lu et approuvé le livret d'accueil de l'hôpital indiquant que leurs échantillons biologiques sont susceptibles, après utilisation à des fins diagnostiques, d'être utilisés pour publication dans le cadre de collections biologiques, à l'exception d'analyses génétiques humaines.

TECHNIQUE

Prélèvements, cultures et anatomopathologie

Les prélèvements per-opératoires de sinus étaient acheminés au laboratoire de mycologie de l'HEGP à température ambiante. En mycologie, un morceau était congelé à - 80 °C et un morceau était analysé afin de réaliser un examen direct au Calcofluor White, May_Grunwald_Giemsa et Gomori-Grocott. Le prélèvement était mis en culture sur 3 tubes gélosés Sabouraud supplémentés en gentamicine et chloramphénicol (Biorad, Basel, Suisse), une boîte Sabouraud, une boîte Chromagar et un bouillon BHI (Brain Heart Infusion). La boîte de Pétri et deux tubes étaient incubés à 37 °C pendant 3 semaines. Le bouillon BHI et le troisième tube étaient incubés à 30°C pendant 3 semaines. Lorsque le prélèvement était également analysé en bactériologie, celui-ci était ensemencé sur 2 géloses au sang ANC (Acide Nalidixique Colistine), une gélose chocolat polyvitaminée (PVX), une gélose Columbia au sang de cheval (COH), une gélose Drigalski et un bouillon Schaedler. Les géloses étaient incubées à 37 °C pendant 48h. Une gélose ANC était incubée en anaérobiose. Le bouillon Schaedler était incubé pendant 14 jours. Lorsque le prélèvement était envoyé en parallèle au laboratoire d'anatomopathologie, une coloration hématoxyline et eosine (HES) et un Gomori-Grocott étaient réalisés.

Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN a été réalisée sur le prélèvement conservé à - 80 °C. Si la quantité était suffisante, jusqu'à 250 mg de biopsie était soumis à une étape de lyse mécanique dans un tube de microbille en céramique de 1,4 mm avec 450 µL de buffer de lyse ATL (Qiagen, Hilden, Allemagne) sur un MagNA Lyser instrument (Roche, Mannheim, Allemagne). Deux cycles de 60 secondes à 6400 rpm étaient réalisés avec 1 min d'incubation sur glace après chaque cycle. L'échantillon était ensuite centrifugé à 10 000 g pendant 3 min et 450µL du surnageant était incubé avec 25 µL de protéinase K à 56 °C pendant 45 min. La suite de l'extraction était

automatisée sur QIASymphony avec le kit DSP DNA midi (Qiagen) et le protocole VB400 default IC. Le QIASymphony SP réalise une purification entièrement automatisée des acides nucléiques utilisant une technologie à base de particules magnétiques (billes de silice). Les échantillons sont soumis à une lyse puis les acides nucléiques se lient à la surface des billes et sont lavés pour éliminer les contaminants (Figure 9). Après extraction, l'ADN purifié était élué dans 100 μ L de tampon ATE (Qiagen). Des contrôles négatifs (250 μ L d'eau sans ADN) étaient extraits en parallèle de chaque série d'extraction. Un dosage des ADN extraits a été réalisé par spectrophotométrie sur NanodropTM 2000 Thermo ScientificTM (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). Les ADN étaient ensuite stockés à -20 °C jusqu'à amplification par PCR.

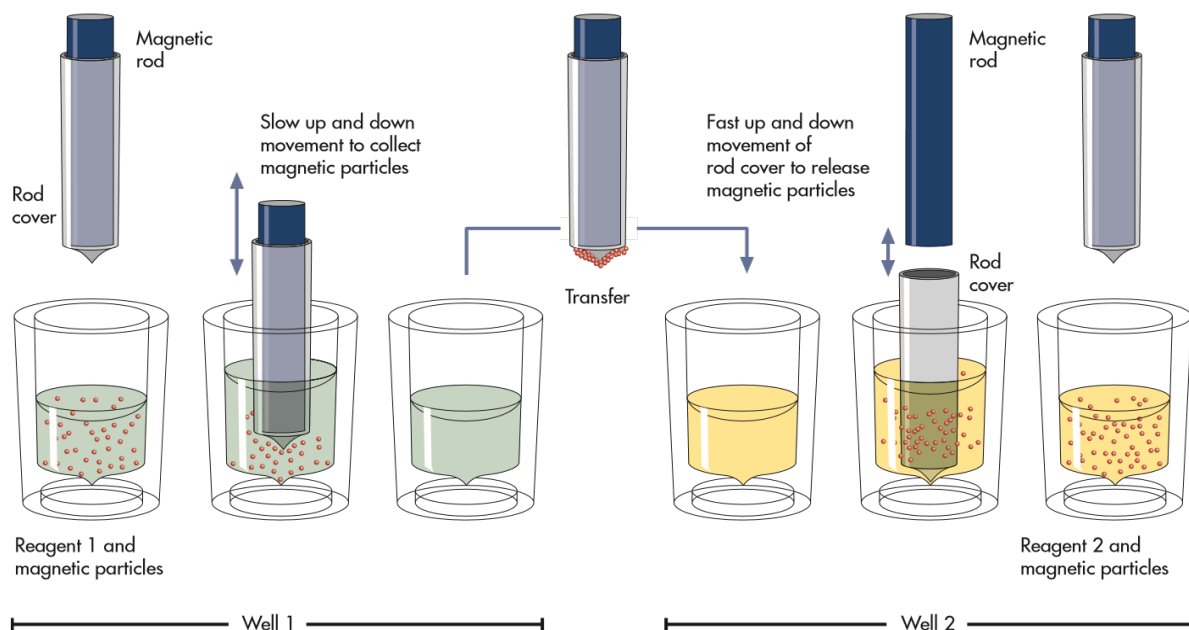


Figure 9. Principe schématique de fonctionnement du QIASymphony SP. Le QIASymphony SP traite un échantillon contenant des billes magnétiques comme suit : une barre magnétique protégée automatisée descend dans un puits contenant un échantillon afin d'en extraire les particules magnétiques liées aux acides nucléiques. La barre magnétique se positionne au-dessus d'un autre puits où les particules sont relâchées. Le QIASymphony SP utilise une tête magnétique contenant 24 barres magnétiques permettant le traitement de 24 échantillons de façon simultanée.

Amplification par PCR et séquençage

Pour notre travail, les bibliothèques d'amplicons ont été construites en ciblant les régions V3-V4 de l'ARN 16S et ITS2 (amorces ITS3 et ITS4) de l'ADN fongique [42]. Le protocole de constitution des bibliothèques a été développé à partir du protocole Illumina "16S Metagenomic Sequencing Library Preparation", document #15044223 revB (accessible sur le site :

https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf.

La première étape d'amplification par PCR ou « *PCR amplicon* » (Figure 10), a été réalisée en plaque 96-puits (Biorad, Basel, Suisse) avec le thermocycleur Veriti™ (Applied Biosystem, Foster City, USA). Les échantillons étaient préparés selon le protocole fabricant utilisant l'ADN polymérase KAPA HiFi Hotstart Ready Mix (Roche). Les échantillons étaient initialement chauffés à 95 °C pendant 3 min, suivis de 35 cycles de PCR avec 30 sec à 95 °C, 30 sec à 53 °C et 30 sec à 72 °C. La PCR était complétée par une extension de 5 min à 72 °C. La purification des produits de PCR ou « *PCR clean-up 1* » (Figure 10) était automatisée en plaque 96-puits sur Hamilton Microlab STAR (Hamilton, Reno, USA) avec des billes AMPure XP beads (Beckman Coulter, Villepinte, France). Suite à cette étape, il était possible de s'arrêter sans compromettre le protocole, « *Safe stopping point* » (Figure 10).

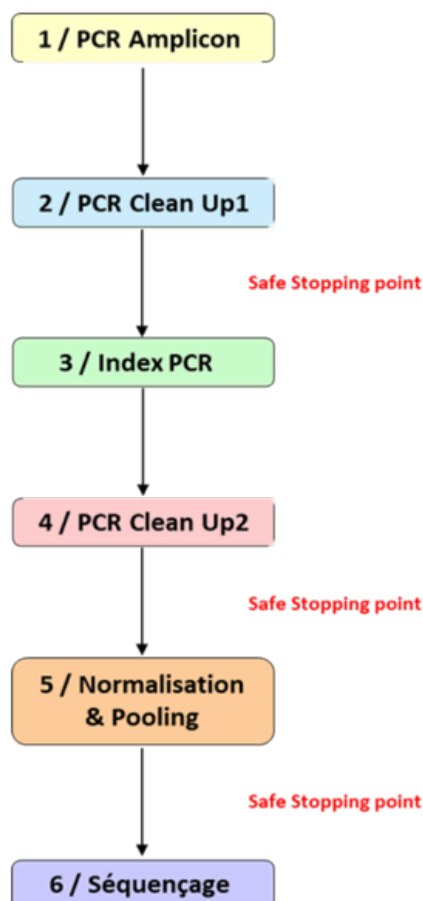


Figure 10. Étapes de préparation de la librairie d'amplicons. *Safe stopping point* : étape après laquelle il est possible de s'arrêter sans compromettre le protocole.

La PCR d'indexage, *Index PCR* (Figure 10), permet la ligation des index et des adaptateurs. Cette étape était réalisée avec un kit Nextera XT index (Illumina, Evry, France). Afin d'éviter les erreurs d'indexage, une plaque TruSeq Index Plate Fixture était utilisée. Les index étaient ajoutés aux produits purifiés de la « *PCR amplicon* » avec la KAPA HiFi Hotstart selon les recommandations du fabricant. Les échantillons étaient initialement chauffés à 95 °C pendant 3 min suivis de 8 cycles de PCR de 30 sec à 95 °C, 30 sec à 55 °C et 30 sec à 72 °C. La PCR était complétée par une extension de 5 min à 72 °C. La seconde purification, *PCR clean-up 2* (Figure 10), était réalisée selon les mêmes modalités que la « *PCR clean-up 1* ». La concentration en acides nucléiques était mesurée par le Tristar2 S LB 942 (Berthold, Wilbad, Allemagne) avec le kit Quant-IT PicoGreen dsDNA (ThermoFisher Scientific, Dardilly, France). Les échantillons étaient ensuite normalisés à 20nM avant d'être mélangés ou "poolés". Le *pool* d'échantillons était dilué à une concentration finale de 4nM dans du Tris-HCl 10mM, pH 8,0 avec 0,1% de Tween 20. Un contrôle Phix (Illumina) était ajouté au pool à une concentration de 4nM. Le séquençage haut débit était réalisé sur MiSeq (Illumina) avec un kit V2 500 (2 x 250) cycles [86]. Les *reads* inférieurs à 200 pb étaient supprimés et les amplicons restants étaient analysés et assignés à différents OTUs par le *pipeline* d'analyse QIIME [87]. Le processus incluait une étape de *trimming* durant laquelle les séquences de qualité insuffisante, les séquences chimères, les séquences singletons étaient détectées et supprimées. QIIME est un *pipeline* de type *clustering-first* et le seuil de similarité était fixé selon l'algorithme du logiciel Deblur [88].

Assignment taxonomique et diversité

L'assignation taxonomique des OTUs a été réalisée avec SILVA [60] pour assigner les séquences bactériennes (16S) et UNITE [66] pour les séquences fongiques (ITS) via QIIME [87]. Tous les *reads* non-assignés au règne *Bacteria* ou au règne *Fungi* et donc sans correspondance dans ces bases de données étaient *trimmées*. Il s'agissait notamment des séquences d'ADN humain. Les bases de données Mycobank [89], Fungibank (<http://fungibank.pasteur.fr>), BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), Arbsilva (<http://www.arb-silva.de>), qui permet de comparer simultanément SILVA, Greengenes [61] et RDP [62]) ainsi qu'EzBioCloud [90] (<http://www.ezbiocloud.net>) ont ensuite été utilisées manuellement pour vérifier et préciser les assignations de certaines OTUs jusqu'au genre voire à l'espèce. Pour l'assignation manuelle, une e-value de 0,0 et une homologie $\geq 94,5\%$ et $\geq 98,7\%$ étaient considérées comme acceptables pour assigner les OTUs au genre ou à l'espèce, respectivement [91].

Statistiques

Des courbes de raréfaction ont été réalisées afin d'évaluer la qualité des analyses de diversité taxonomique. Les indices de diversité (Shannon, Simpson et inverse de Simpson) ont été calculés afin de comparer l'homogénéité entre les échantillons en termes de diversité bactérienne et fongique. Les structures communautaires et abondances relatives des taxa fongiques et bactériens ont été comparées en fonction du groupe, cas (balles fongiques) ou témoins (autres sinusites chroniques). Les données ont été analysées avec SHAMAN (<http://shaman.pasteur.fr/>). Dans SHAMAN, la normalisation est réalisée au niveau des OTUs en appliquant la méthode DESeq2 [92]. Les statistiques pour détecter des différences d'abondance relative de certains taxa entre conditions différentes (ex : cas vs. témoins) s'appuient sur un modèle linéaire généralisé (*Generalized Linear Model* ou GLM) proposé dans le *package* DESeq2 de R [76] pour l'analyse des données de métagénomique. Les valeurs *P* ont été ajustées selon la procédure de Benjamini et Hochberg [93].

RESULTATS

CARACTERISTIQUES DE LA POPULATION

Quarante-huit patients ont été inclus initialement dans l'étude, 40 balles fongiques (= cas) et 8 sinusites chroniques d'un autre type (= témoins). Les cas étaient des patients opérés pour une sinusite chronique entre 2015 et 2017 à l'HEGP et pour lesquels un diagnostic de balle fongique a été posé sur un aspect chirurgical évoquant une balle fongique associé à un examen direct mycologique et/ou une culture positive. Les témoins correspondaient à des patients opérés pour une sinusite chronique durant la même période, pour lesquels les prélèvements adressés en mycologie étaient négatifs à l'examen direct et en culture avec des résultats d'anatomopathologie ne mettant pas en évidence de filaments mycéliens. Ces patients présentaient, soit une polypose naso-sinusienne (n=3), soit un corps étranger intra-sinusien (n=4), soit une obstruction chronique sans étiologie évidente (n=1). L'examen anatomopathologique a été réalisé chez 30 patients (25/37 cas et 5/7 témoins).

Parmi les 48 patients inclus, trois patients (deux cas et un témoin) ont été exclus secondairement en raison d'une absence de produits d'amplification après la PCR 16S et ITS pré-séquençage. Un patient supplémentaire (un cas) a également été écarté pour la rédaction de ce mémoire en raison d'un complément d'analyse encore en attente. L'analyse présentée ici porte donc sur 37 cas de balles fongiques sinusiennes et 7 témoins (Figure 11).

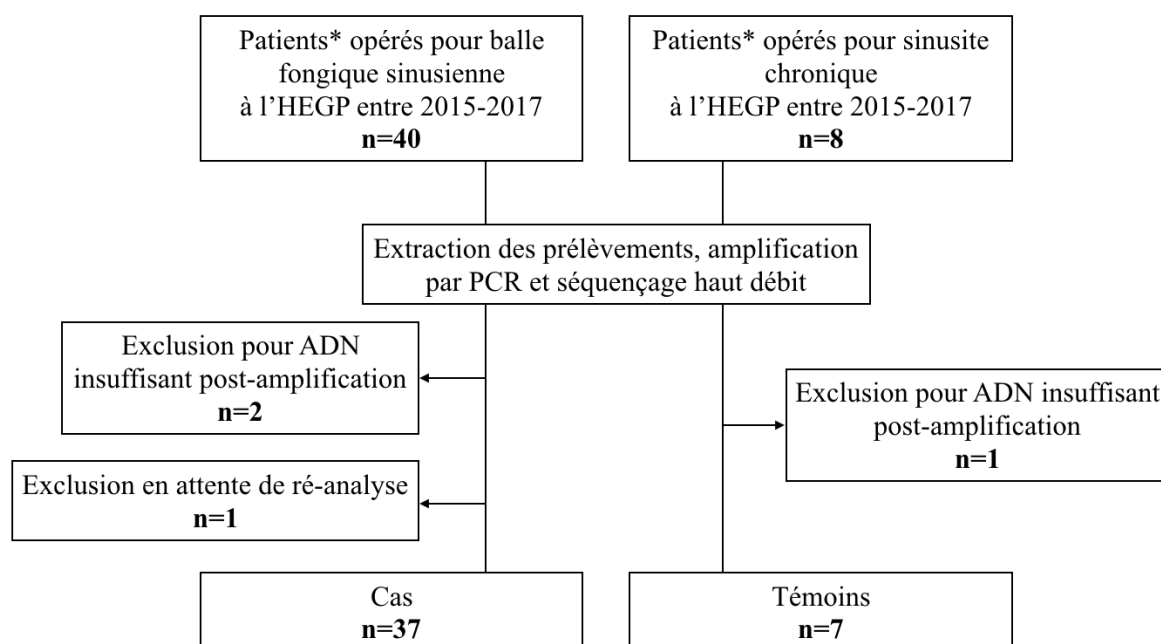


Figure 11. Diagramme de flux des patients inclus dans l'étude. HEGP: Hôpital Européen George Pompidou. *patients non consécutifs.

Les caractéristiques des patients sont décrites dans le Tableau 4. La population des cas et des témoins est statistiquement identique pour l'âge, le sexe et le type de sinusite. Deux patients, un cas et un témoin, étaient immunodéprimés en raison d'une transplantation d'organe solide (coeur et rein-pancréas). Deux cas ont reçu un traitement antifongique, le premier par voriconazole après la mise en évidence d'une sinusite invasive à l'examen anatomopathologique et le second par posaconazole, car il s'agissait d'un transplanté cardiaque et présentait donc un facteur de risque d'infection fongique invasive. Parmi les 37 balles fongiques, l'examen mycologique était positif dans 97% (36/37) des cas tandis que l'examen anatomopathologique était positif dans 80% (20/25) des cas où il avait été réalisé.

	Cas (n=37)	Témoins (n=7)	<i>P</i>
	n (%)	n (%)	
Age (années), écart-type	60 +/-13	55 +/-15	NS
Sex ratio (F/H)	1,85	1,33	NS
Type de sinusite (n (%))			
○ Maxillaire	24 (64,9)	3 (42,9)	
○ Frontale	1 (2,7)	1 (14,3)	NS
○ Ethmoïdale	1 (2,7)	1 (14,3)	
○ Sphénoïdale	6 (16,2)	0	

○ <i>Pansinusite</i>	5 (13,5)	2 (28,6)	
Prise de corticoïdes > 1mg/kg/j, >3 sem.	3 (8,1)	2 (28,6)	NS
Immunodépression	1 (2,7)	1 (14,3)	NS
Mycologie			
<i>Examen direct positif</i>	36 (97,2)	0 (0)	p<0,001
<i>Culture positive</i>	12 (32,4)	0 (0)	NS
Bactériologie			
<i>Culture réalisée</i>	13 (35,1)	7 (100)	<0,001
<i>Culture informative</i>	11 (29,7)	7 (100)	-
Anatomopathologie			
<i>Examen réalisé</i>	25 (67,5)	5 (71,4)	NS
<i>Filaments fongiques</i>	20 (54,0)	0 (0)	-

NS: non significatif

Tableau 4. Caractéristiques des patients. Résultat de culture informatif si le germe était précisé.

ANALYSE DES DONNEES BRUTES ISSUES DU RUN DE SEQUENÇAGE

Le nombre total de *reads* obtenus après séquençage 16S, avant et après *trimming*, était de 3 198 013 et 3 139 819, respectivement. Le nombre total de *reads* obtenus après séquençage ITS2, avant et après *trimming*, était de 2 968 251 et 2 569 091, respectivement. Le nombre moyen, minimum et maximum de *reads* bruts puis *trimmés* par échantillon, le nombre de *reads* finaux qui ont pu être assignés au règne des bactéries ou des fungi (après élimination des séquences humaines, <200pb et <10 copies) et le nombre d'OTUs finales obtenues par échantillon en 16S et en ITS2 sont détaillés dans le Tableau 5. Le nombre moyen de *reads* pré et post-*trimming* obtenues en 16S et en ITS2 par échantillon était similaire entre les cas et les témoins (p=0,79 et p=0,74 respectivement). Le nombre de *reads* assignés au règne des bactéries (après élimination des séquences humaines) était, lui aussi, similaire entre cas et témoins (p=0,24). En revanche, le nombre de *reads* assignés au règne fongique (après

élimination des séquences humaines) était plus important chez les cas que chez les témoins ($p < 0,001$) (Tableau 5). En effet, au sein des balles fongiques 97,3% (36/37) des échantillons ont produit des amplicons ITS2 avec >5000 *reads* assignés au règne des Fungi. En comparaison, 42,9% (3/7) seulement des échantillons témoins ont produits >5000 *reads* fongiques. À l'inverse, 86,5% (32/37) des balles fongiques ont produits $>10\ 000$ *reads* assignés à la base de donnée bactérienne SILVA en 16S tandis que 100% (7/7) des échantillons témoins ont produit $> 10\ 000$ *reads*.

	16S			ITS2		
Nombre moyen de <i>reads</i> bruts/échantillon [min - max]	70 355 [46 359 – 110 092]			63 268 [26 384 – 131 564]		
Nombre moyen de <i>reads</i> après <i>trimming</i> primaire*/échantillon [min - max]	68 461 [45 835 – 103 482]			54 296 [16 363 – 99 373]		
Nombre moyen de <i>reads</i> bactériens ou fongiques après <i>trimming</i> secondaire**/échantillon [min - max]	38 443 [366 – 68 881]			27 592 [2 – 61 821]		
Nombre moyen d'OTUs /échantillon [min - max]/	38 [12 - 118]			16 [3 - 54]		
	Balles fongiques	Témoins	<i>P</i>	Balles fongiques	Témoins	<i>P</i>
Nombre moyen de <i>reads</i> après <i>trimming</i> primaire*/échantillon	68 461	75 562	NS	60 219	47 913	NS
Nombre moyen de <i>reads</i> bactériens ou fongiques après <i>trimming</i> secondaire**/échantillon	37 815	48 848	NS	32 488	8 517	<0,001
% de <i>reads</i> bactériens ou fongiques assignés au genre	99,7%	99,9%	NS	99,9%	100%	NS

OTU: Operational taxonomic unit; NS: non significatif.*suppression des séquences avec indice de qualité insuffisant **suppression des séquences humaines, <200pb et en nombre insuffisant pour former une OTU (minimum de 10 séquences)

Tableau 5. Résultats qualitatifs du *run* de séquençage.

ANALYSE DES TEMOINS NEGATIFS

L'amplification du témoin négatif en 16S a produit 78 912 et 77 796 *reads* bruts et après *trimming*, respectivement. Le nombre de *reads* assignés au règne bactérien était de 53 128 et leurs assignations taxonomiques sont récapitulées dans le Tableau 6. L'amplification du témoin négatif en ITS a produit 11 521 et 5 582 *reads* bruts et après *trimming*, respectivement. Le nombre de *reads* assignés au règne des Fungi était de 3 862 et les OTUs étaient majoritairement assignées à l'espèce *Sarocladium kiliense* et au genre *Byssochlamys* (Tableau 6).

Espèces	Abondance en nombre d'OTUs	Proportion de l'espèce (%)
Témoin négatif en 16S		
<i>Pseudomonas non-aeruginosa</i>	35 629	82,8
<i>Serratia sp.</i>	3 740	8,7
<i>Escherichia-Shigella sp.</i>	1 203	2,8
<i>Carnobacterium sp.</i>	1 014	2,4
<i>Bacillus</i>	870	2,0
Autres	593	1,4
Témoin négatif en ITS		
<i>Sarocladium kiliense</i>	2 901	75,1
<i>Byssochlamys sp.</i>	950	24,6
Protist	11	0,3

Tableau 6. Assignation et abondance relative des OTUs présentes dans le témoin négatif.

COURBES DE RAREFACTION DES ECHANTILLONS

Les courbes de rarefaction obtenues en 16S et ITS pour chaque échantillon sont présentées en Figure 12. L'asymptote de diversité n'est pas atteinte pour les échantillons des patients 2, 11,

19, 20, 25 et 44 en 16S et pour les échantillons des patients 26, 42, 43, 46 et 48 en ITS. Ces échantillons ont toutefois été gardés et leur analyse sera discutée secondairement.

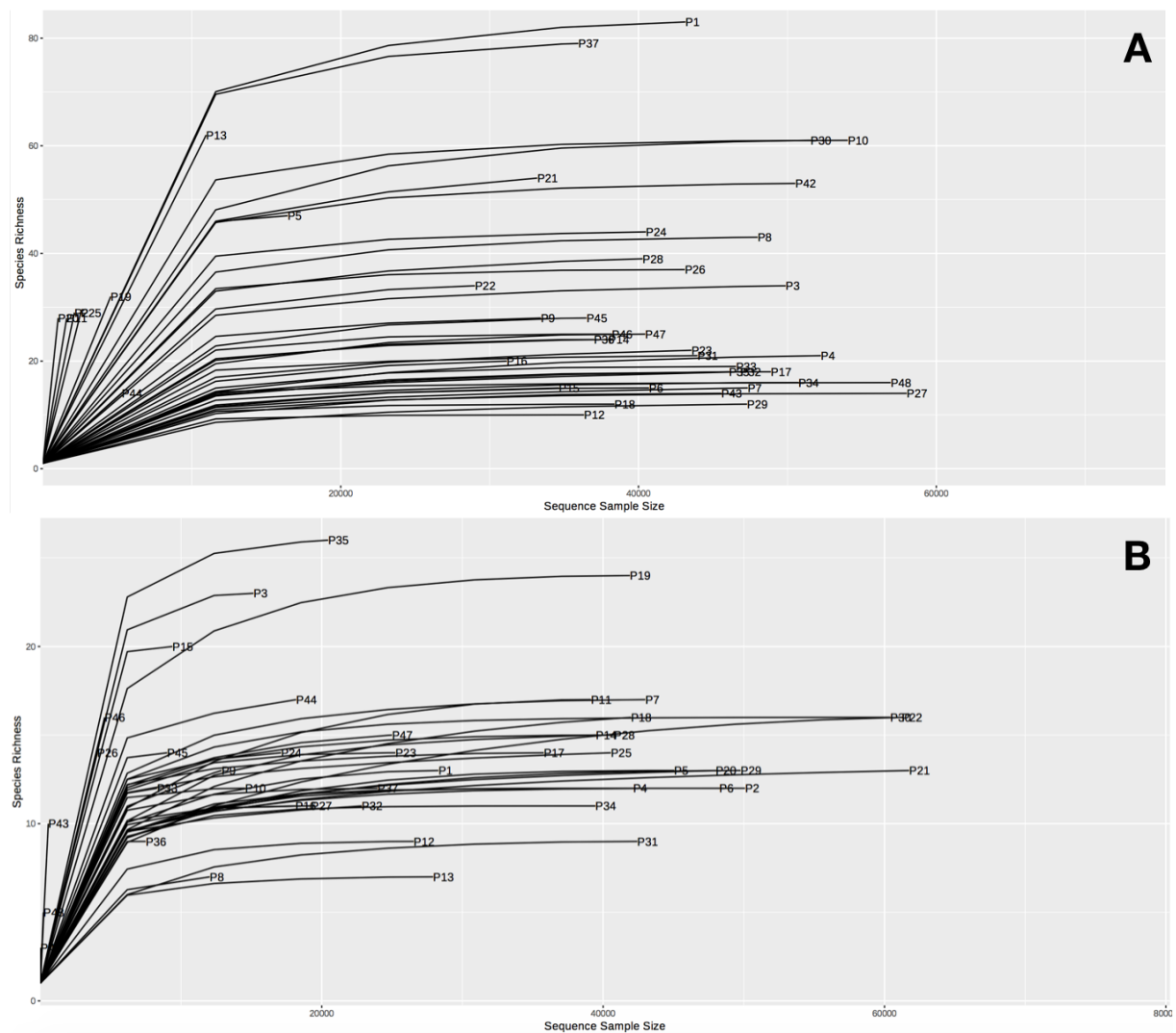


Figure 12. Courbes de raréfaction obtenues pour chaque échantillon en 16S (A) et en ITS (B). Abscisses: diversité représentée en nombre d'OTUs (*species richness*) ; Ordonnées: nombre de *reads* assignés au règne bactérien et fongique par échantillon

ANALYSE DE LA DIVERSITE MICROBIENNE DANS LES BALLES FONGIQUES SINUSIENNES

DESCRIPTION DE LA DIVERSITE EN TERMES DE TAXA

Un total de 122 taxa bactériens et 56 taxa fongiques assignés au genre ont été détectés dans les échantillons. En moyenne, les échantillons comprenaient 16 (3 - 37) taxa bactériens et 4 (1 - 29) taxa fongiques. Les taxa bactériens majoritaires (abondance relative >1% chez >25%

des échantillons) étaient *Haemophilus*, *Pseudomonas* et *Staphylococcus* tandis que les taxa fongiques majoritaires étaient *Aspergillus* et *Malassezia*.

Lorsqu'une OTU bactérienne était assignée au genre *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* et *Haemophilus* par analyse bio-informatique standardisée (base SILVA), une analyse complémentaire manuelle était réalisée sur les bases de données EzBioCloud, RDP, Greengenes et BLAST afin d'assigner l'OTU jusqu'à l'espèce lorsque cela était possible. De façon similaire, lorsqu'une OTU fongique était assignée au genre *Aspergillus* une analyse complémentaire était réalisée sur Mycobank. Les espèces retrouvées sont présentées dans le Tableau 7. La quasi-totalité (93,5%) des OTUs assignées au genre *Haemophilus* appartiennent à l'espèce *Haemophilus influenzae*. Parmi les OTUs assignées à *Pseudomonas*, 52,4% appartenaient à l'espèce *aeruginosa*, 15,3% appartenaient à l'espèce *migulae*, notamment retrouvée dans le témoin négatif et 29,2% n'ont pu être identifiées jusqu'à l'espèce. La quasi-totalité (87,4%) des OTUs assignées au genre *Staphylococcus* correspondaient à l'espèce *S. aureus*. Parmi les *Streptococcus*, 72,0% étaient des *Streptococcus constellatus* ou *intermedius*, appartenant au groupe *milleri* et 22,3% était des *Streptococcus pneumoniae*. Concernant les *Aspergillus*, 82,9% appartenaient à la section *Fumigati* et 13,1% à la section *Flavi*.

	Nombre d'OTUs	(%)
<i>Haemophilus</i>	476 764	100
<i>H. influenzae</i>	445 629	93,5
<i>H. parainfluenzae</i>	11	<0,01
<i>H. aegyptius</i>	17	<0,01
<i>Haemophilus</i> sp.	31 107	6,5
<i>Pseudomonas</i>	217 763	100
<i>P. aeruginosa</i>	114 087	52,4
<i>P. migulae</i>	33 300	15,3
<i>P. putida</i>	19	<0,01
<i>P. synxantha</i>	3 713	1,7
<i>P. syringae</i>	3 143	1,4
<i>Pseudomonas</i> sp.	63 501	29,2
<i>Staphylococcus</i>	149 245	100
<i>S. aureus</i>	130 428	87,4
<i>S. lugdunensis</i>	7 481	5,0

<i>S. epidermidis</i>	5 773	3,9
<i>S. carnosus</i>	5 204	3,5
<i>S. caprae</i>	322	0,2
<i>S. saprophyticus</i>	14	<0,01
<i>S. warnerii</i>	10	<0,01
<i>Staphylococcus</i> sp.	13	<0,01
<i>Streptococcus</i>	73 751	100
<i>S. intermedius</i>	38 340	52,0
<i>S. pneumoniae</i>	16 437	22,3
<i>S. constellatus</i>	14 743	20,0
<i>S. equinus</i>	3 476	4,7
<i>S. sanguinis</i>	66	0,1
<i>S. dysgalactiae</i>	51	0,1
<i>Streptococcus</i> sp.	0	0
<i>Aspergillus</i>	1 090 960	100
<i>Aspergillus</i> section <i>Fumigati</i>	904 137	82,9
<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	143 381	13,1
<i>Aspergillus</i> section <i>Nidulantes</i>	42 813	3,9
<i>Aspergillus</i> sp.	629	0,1

Tableau 7. OTUs identifiées à l'espèce pour les genres *Haemophilus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* et *Aspergillus* avec le nombre de *reads* et l'abondance relative.

ANALYSE GLOBALE DE LA DIVERSITE BACTERIENNE ET FONGIQUE ENTRE BALLEES FONGIQUES ET TEMOINS

Une analyse PERMANOVA au niveau du genre selon l'indice de dissimilarité de Bray-Curtis confirme qu'il existe une différence significative de microbiote bactérien ($p=0.005$) et fongique ($p<0.001$) entre les cas et les témoins. Les résultats sont présentés sous forme d'analyse en coordonnées principales et sous forme de dendrogramme dans les Figure 13 et Figure 14 respectivement.

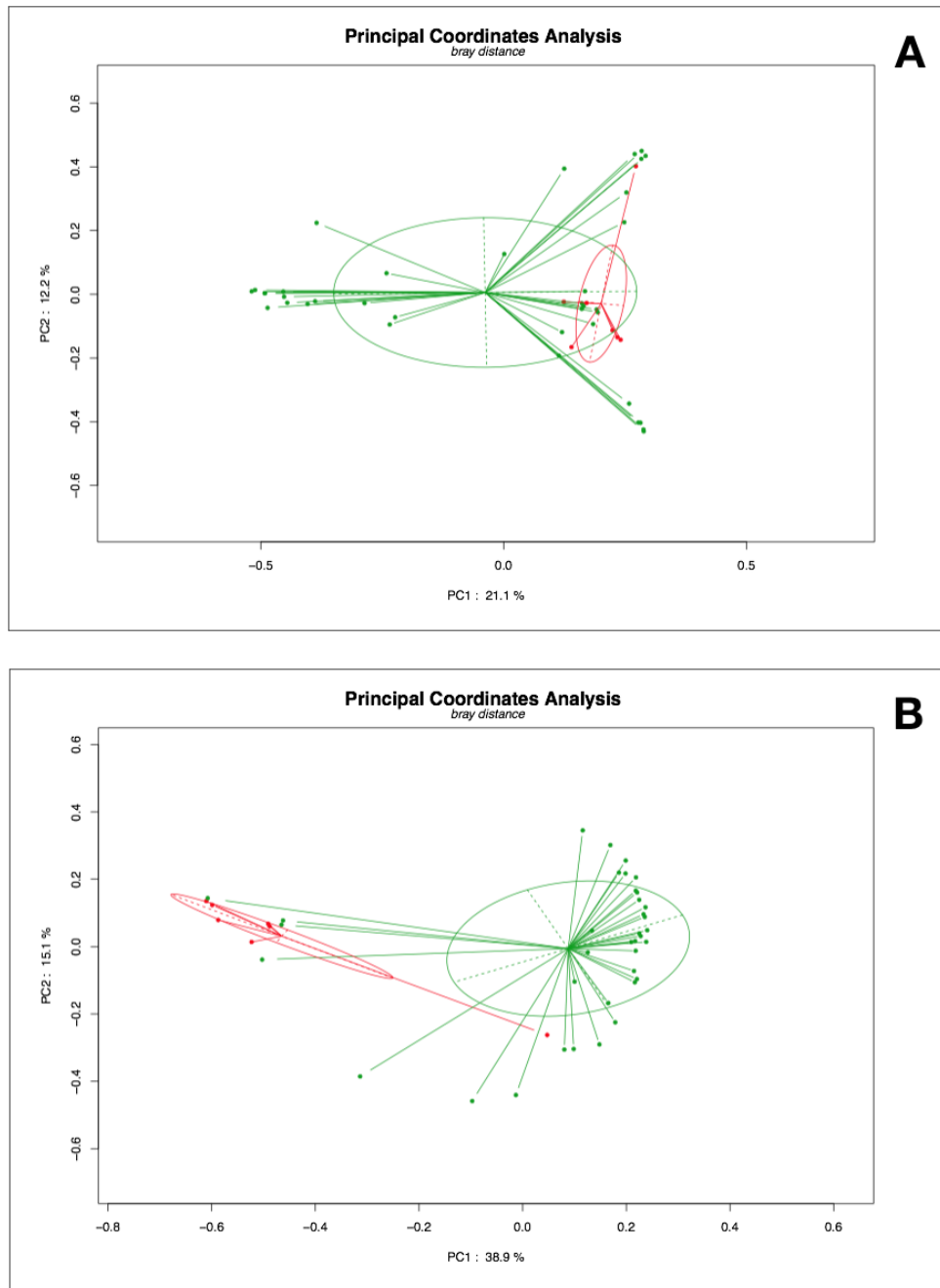


Figure 13. Distance de diversité microbienne entre les échantillons des patients cas (vert) et témoins (rouge) par analyse en coordonnées principales selon l'indice de dissimilarité de Bray-Curtis. (A) Diversité bactérienne (B) Diversité fongique.

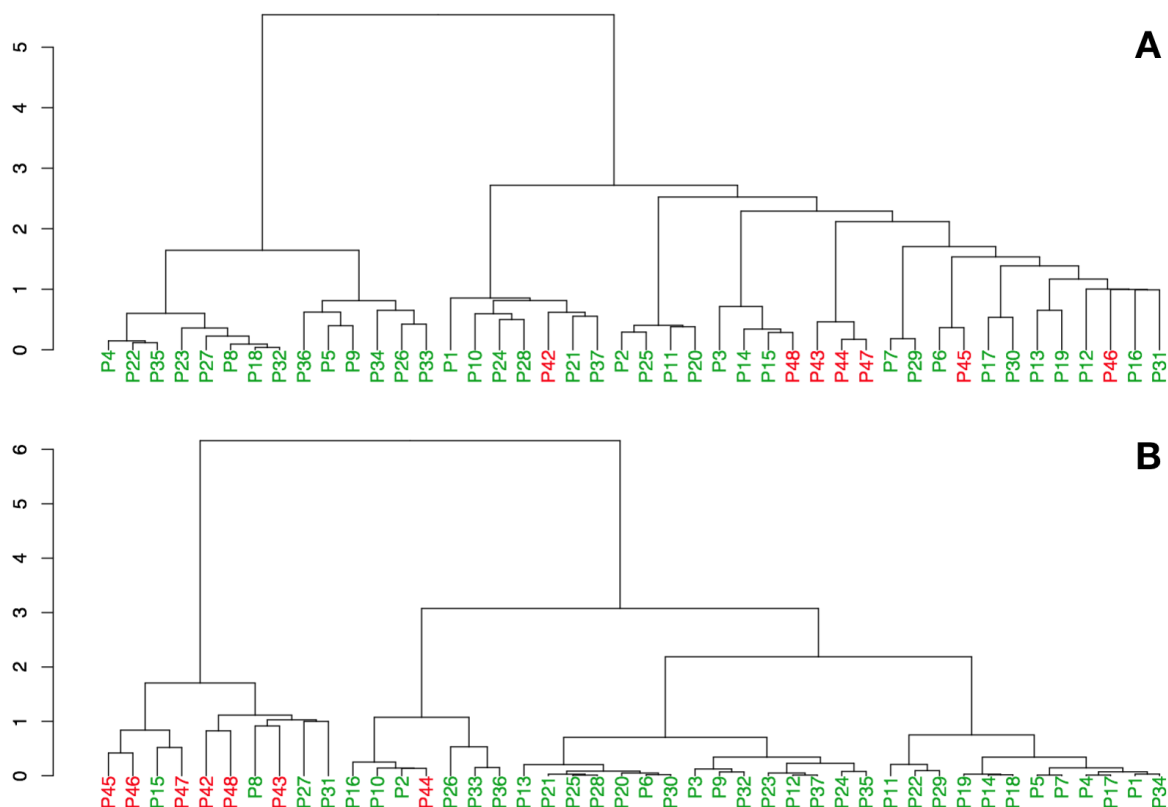
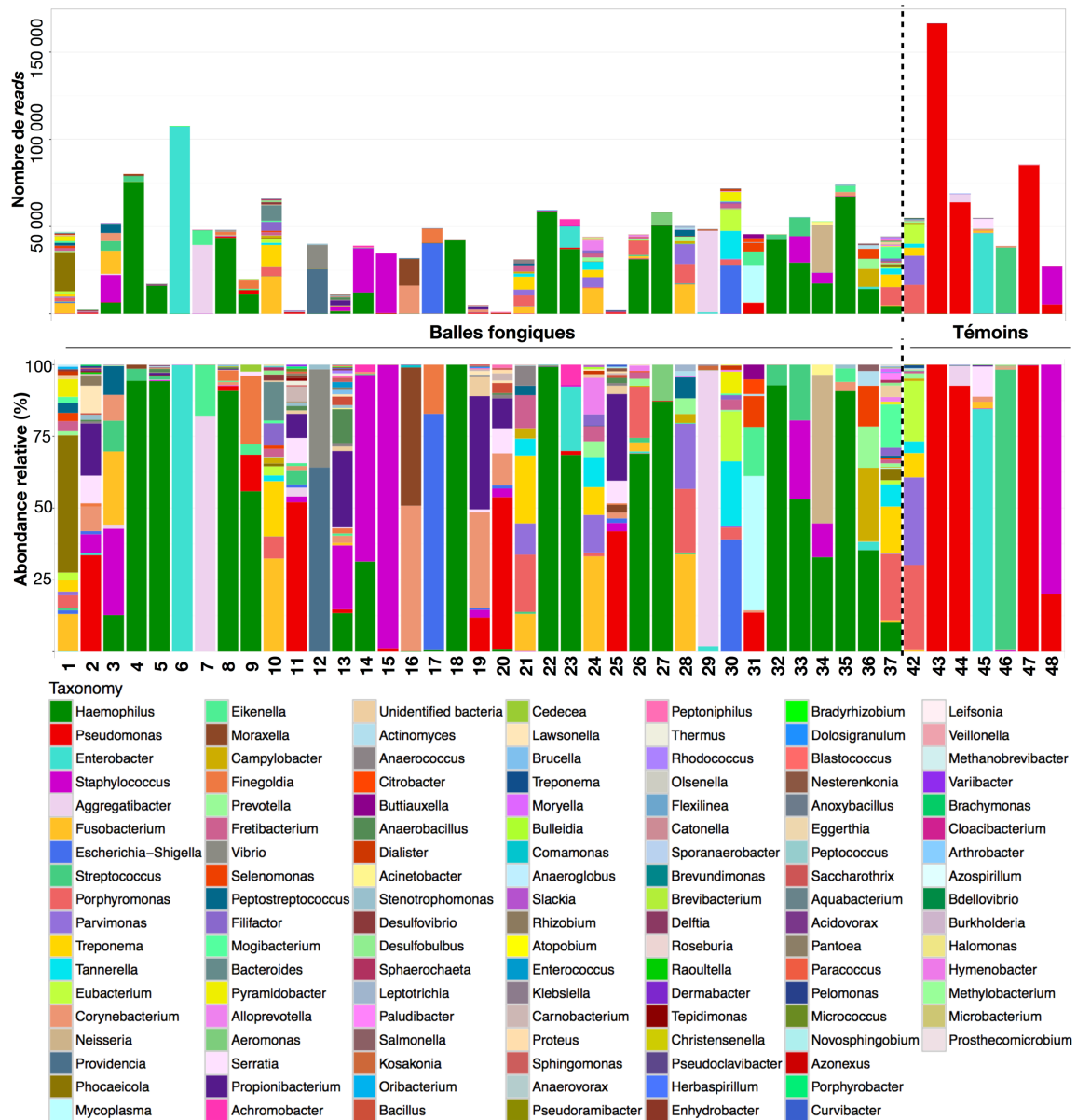


Figure 14. Dendrogramme en grappe exprimant la distance de diversité entre chaque échantillon selon l'indice de dissimilarité de Bray-Curtis. (A) Diversité bactérienne (B) Diversité fongique. Échantillons des cas et des témoins en vert et rouge respectivement.

La diversité taxonomique bactérienne par échantillon n'était pas significativement différente entre les cas (=balles fongiques) et les témoins. Toutefois, les indices de Shannon (1,12 vs 0,45 ($p=0,35$)), Simpson (0,49 vs 0,21 ($p=0,67$)) et inverse de Simpson (2,96 vs 1,61 ($p=0,15$)) indiquaient une plus grande diversité bactérienne chez les cas. En effet, différents taxa bactériens étaient co-détectés dans les balles fongiques alors que chez les témoins, il existait, le plus souvent, un taxon bactérien majoritaire (Figure 15). La diversité taxonomique fongique par échantillon était significativement plus faible dans les balles fongiques comparées aux témoins avec des indices de Shannon, Simpson et inverse de Simpson de 0,25 vs 0,47 ($p=0,43$), 0,10 vs 0,22 ($p=0,07$) et 1,17 vs 1,52 ($p=0,003$), respectivement.

ANALYSE DETAILLÉE DE LA DIVERSITÉ BACTÉRIENNE ET FONGIQUE ENTRE BALLES FONGIQUES ET TÉMOINS

Les diversités taxonomiques bactériennes et fongiques sont détaillées respectivement en nombre de *reads* et en abondance relative dans les Figure 15 et Figure 16.



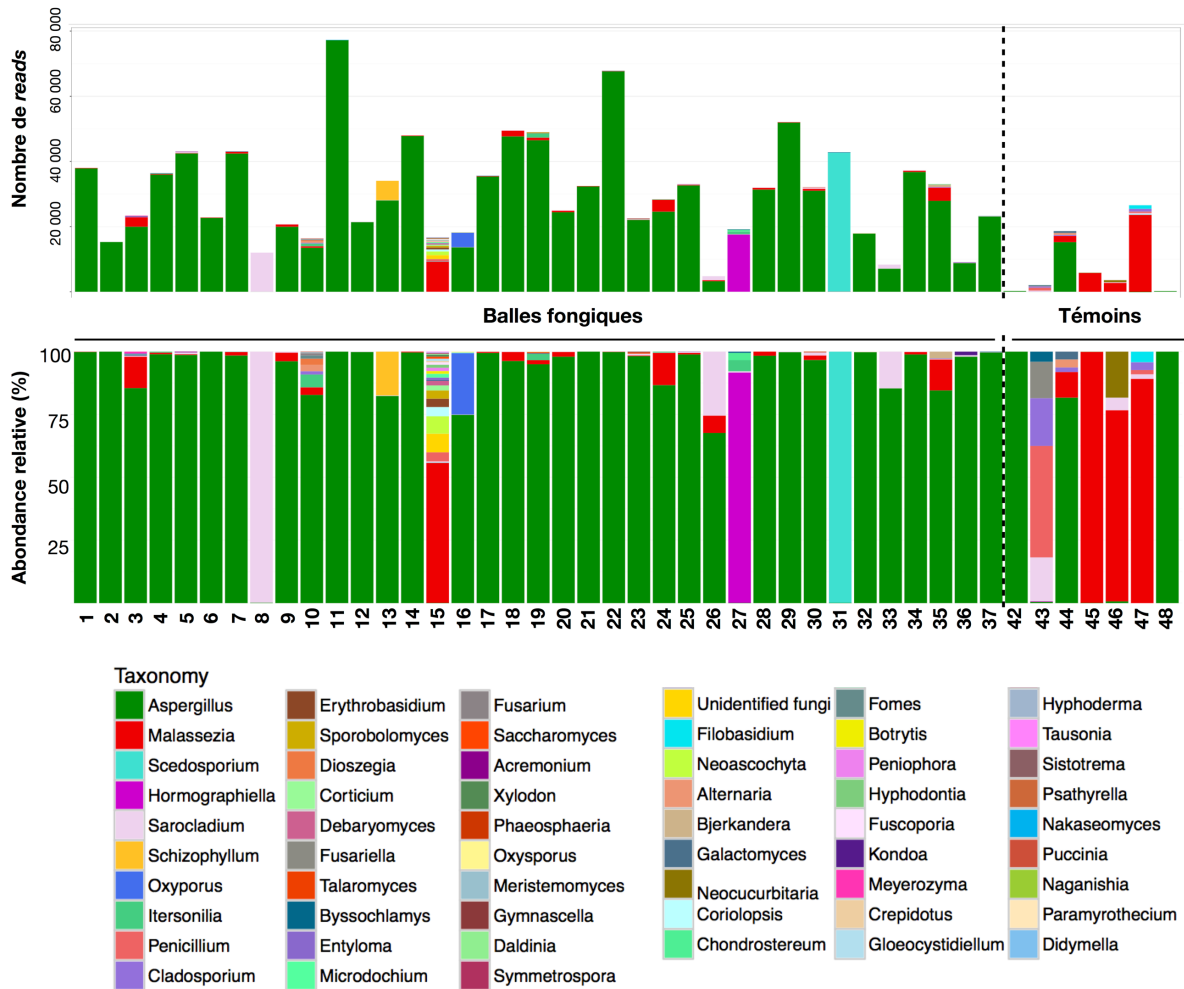


Figure 16. Diversité fongique dans les balles fongiques et les échantillons témoins en nombre de *reads* et en abondance relative. Légende de haut en bas et de gauche à droite ordonnée par taxa les plus représentés.

Concernant la diversité taxonomique fongique, un taxon majoritaire *Aspergillus* (abondance relative >75%) est présent dans la quasi-totalité des prélèvements excepté chez le patient 15 (cas) et le patient 43 (témoin)(Figure 17). *Aspergillus* a été identifié avec une abondance >1000 *reads* dans 89,2% (33/37) des balles fongiques et dans 14,3% (1/7) des échantillons témoins. Les autres taxa majoritaires retrouvés dans les balles fongiques étaient *Sarcocladium* (patient 8), *Hormographiella* (patient 27), *Scedosporium* (patient 31). *Malassezia* était présent dans 68,2% (30/44) des échantillons, soit dans 70,2% (26/37) des balles fongiques avec une abondance relative moyenne de 3,3% (0,1-55,6%) et dans 57,2% (4/7) des témoins avec une abondance relative moyenne de 53,2% (10,2-99,8%).

La diversité taxonomique fongique peut également être présentée sous forme de graphique Krona, comme c'est le cas dans la Figure 17. Ce graphe permet de détailler l'abondance de

chaque taxon jusqu'à l'espèce lorsque l'identification a été possible. Ce graphe permet de voir la différence nette de profil fongique entre les cas, majoritairement porteurs d'*Aspergillus* section *Fumigati* (70%) et d'*Aspergillus* section *Flavi* (15%) en comparaison des témoins, porteurs à 56% de *Malassezia*.



Figure 17. Diversité fongique (en nombre de *reads*) dans les balles fongiques à gauche et des échantillons témoins à droite.

La comparaison en abondance relative des différents taxa bactériens et fongiques entre cas et témoin par modèle linéaire généralisé (package DESeq2, SHAMAN) a permis de confirmer que le genre *Haemophilus* et le genre *Aspergillus* étaient significativement plus abondants au sein des balles fongiques comparées aux autres sinusites chroniques ($p < 0,001$ et $p = 0,032$, respectivement). Ces résultats sont présentés sous forme de boîte à moustache en Figure 18.

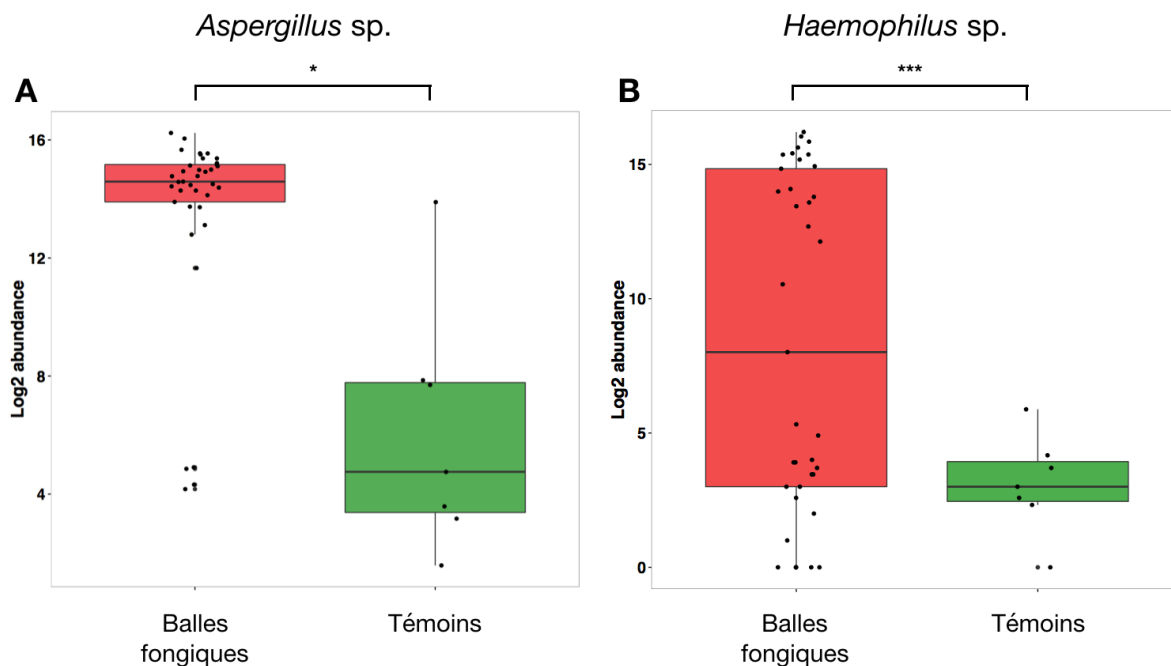


Figure 18. Différence d'abondance (échelle logarithmique) entre les échantillons de balles fongiques pour les taxa *Aspergillus* (A) et *Haemophilus* (B). * = $p < 0,05$, *** = $p < 0,001$

ANALYSE DE LA DIVERSITE BACTERIENNE ET FONGIQUE AU SEIN DES BALLEES FONGIQUES

Analyse des microbiotes bactériens et fongiques en fonction du sexe, du type de sinusite ou de la culture mycologique

Au sein des balles fongiques (n=37), il n'existe pas de différence de diversité fongique en fonction du sexe du patient, de la localisation de la sinusite ou de la positivité de la culture fongique (analyse en PCoA avec l'indice de dissimilarité de Bray-Curtis). Aucun taxon n'est significativement associé à ces variables en modèle linéaire généralisé. Concernant la diversité bactérienne, il n'existe pas de différence pour ces mêmes variables (analyse en PCoA). Cependant, des différences significatives ont été observées en comparant les abondances relatives de plusieurs taxa en fonction du sexe masculin (n=13/37) ou féminin (n=24/37) et du résultat de la culture fongique, négative (n=25/37) ou positive (n=12/37) (Figure 19A et B). Il existe également des différences concernant certains taxa minoritaires entre les sinusites maxillaires (n=24) et les autres localisations (n=13) (Figure 19C).

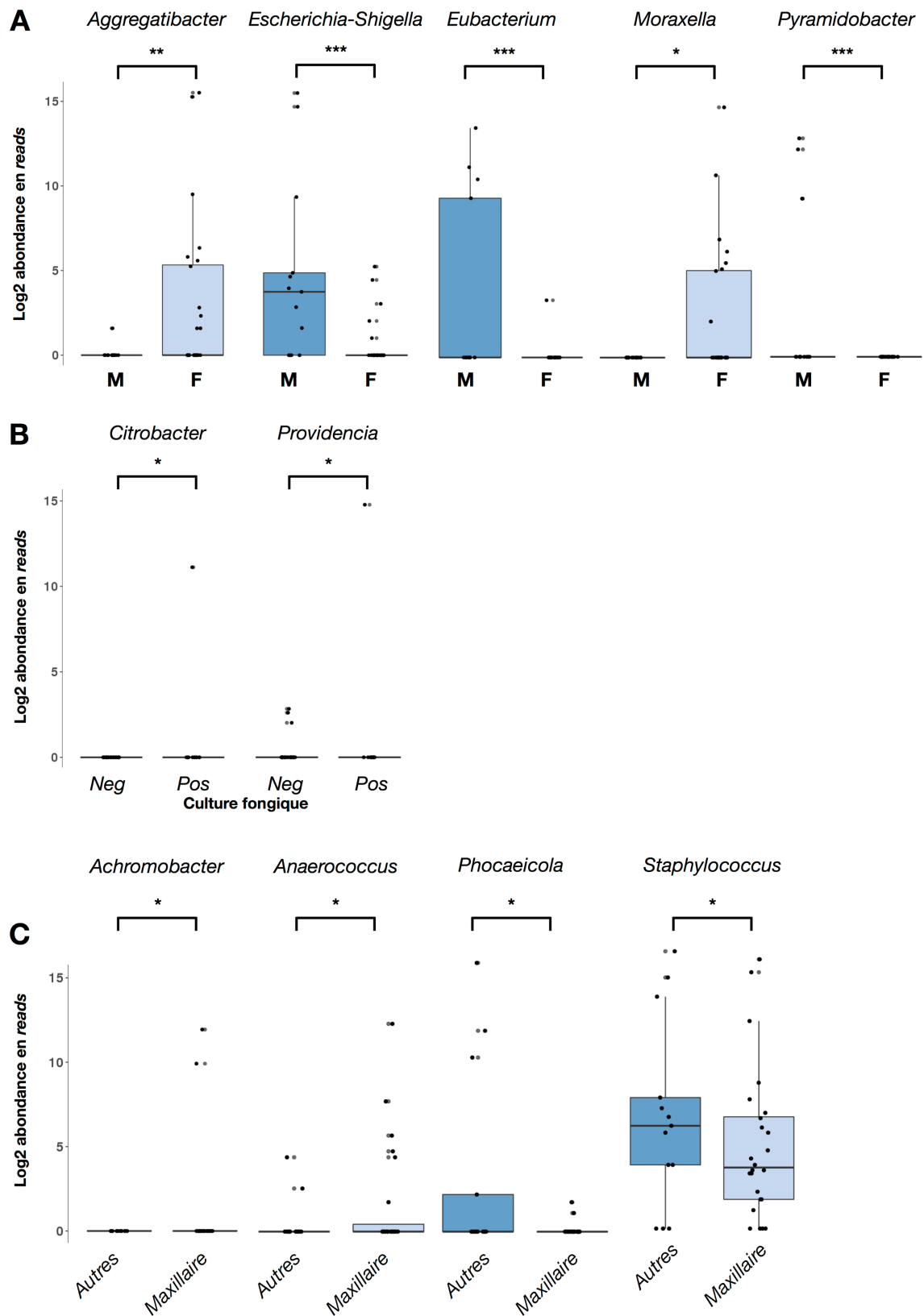


Figure 19. Boîtes à moustaches représentant les taxa bactériens dont l'abondance relative diffère significativement par analyse GLM (modèle linéaire généralisé) en fonction (A) du sexe, (B) de la

positivité de la culture fongique et (C) de la localisation de la sinusite. * = p<0,05, ** = p<0,01, *** = p<0,001

COMPARAISON CULTURE ET METAGENOMIQUE

Les résultats de culture bactérienne ont été comparés aux taxa prédominants identifiés par métagénomique. Les résultats étaient concordants, partiellement concordants et non concordants dans 35% (7/20), 35% (7/20) et 30% (6/20) des cas respectivement, en sachant que 20 échantillons seulement avaient été mis en culture pour la bactériologie (Tableau 8). Pour 6/7 échantillons qui présentaient une concordance partielle, l'espèce prédominante en culture était retrouvée également en métagénomique, mais elle n'était pas le taxon majoritaire ou unique. Pour le 7^{ème} échantillon, une espèce co-dominante en culture n'était pas détectée en métagénomique. Les cas de discordance vraie entre culture et métagénomique seront discutés ultérieurement dans ce manuscrit (cf. p.61).

	Patient (cas/témoin)	Résultat de la culture	Résultat de la métagénomique (abondance relative)
Résultat non concordant	4 (cas)	<i>Branhamella catarrhalis</i>	<i>H. influenzae</i> (94,4%)
	5 (cas)	Flore oropharyngée	<i>H. influenzae</i> (94,0%)
	7 (cas)	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	<i>Aggregatibacter</i> sp. (82,1%)
	24 (cas)	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Fusobacterium</i> sp. (33,2%) <i>Parvimonas</i> (13,1%)
	28 (cas)	<i>Streptococcus constellatus</i> <i>Streptococcus anginosus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Veillonella</i> sp.	<i>Fusobacterium</i> sp. (33,7%) <i>Parvimonas</i> sp. (22,6%) <i>Porphyromonas</i> sp. (22,1%)
	44 (témoin)	<i>S. aureus</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. (20,9%)
Résultat partiellement concordant	12 (cas)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Providencia</i> sp. (64,1%) <i>Vibrio</i> sp. (34,2%) <i>Stenotrophomonas</i> sp. (1,6%)
	14 (cas)	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (65,0%) <i>H. influenzae</i> (31,4%)
	36 (cas)	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>H. influenzae</i> (35,2%) <i>Campylobacter</i> sp. (25,5%) <i>Prevotella</i> sp (14,4%) <i>Enterobacter cloacae</i> (2,9%)
	42 (témoin)	<i>Parvimonas micra</i>	<i>Parvimonas</i> sp. (30,5%) <i>Porphyromonas</i> sp. (29,7%)

	45 (témoin)	<i>S. aureus</i> <i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Eubacterium</i> sp. (20,9%) <i>Enterobacter</i> sp. (84,3%) (pour information <i>S. aureus</i> = 0,2%)
	46 (témoin)	<i>S. aureus</i> <i>Streptococcus intermedius</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	<i>S. intermedius</i> (97,5%) (pour information <i>S. aureus</i> = 0,3%)
	48 (témoin)	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (80,1%) <i>P. aeruginosa</i> (19,9%)

Tableau 8. Taxa bactériens mis en évidence en culture et par la métagénomique dans les cas discordants.

Concernant la culture fongique, elle était positive dans les balles fongiques chez 12/37 (32.4%) patients. Le résultat de la culture était concordant avec la métagénomique dans 85,3% des cas (10/12). Pour le patient 15 détaillé dans la discussion, *Aspergillus* avait été mis en évidence en culture, mais pas en métagénomique. Pour le patient 24, du *Penicillium* avait été isolé en culture tandis que la quasi-totalité des *reads* séquencés en métagénomique correspondait à *Aspergillus*.

DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons étudié la diversité fongique et bactérienne au sein de balles fongiques sinusiennes. Le genre fongique majoritairement identifié chez les patients était *Aspergillus*. La présence d'une balle fongique, quel qu'en soit l'étiologie fongique, était associée à une augmentation significative du genre bactérien *Haemophilus*.

CHOIX METHODOLOGIQUES

Les études de diversité microbienne sont très influencées par le choix des méthodes utilisées. L'observation finale dépend de la capacité de la technique utilisée à extraire, amplifier, séquencer et analyser chaque genre microbien. Les biais de ces techniques font actuellement l'objet de recherche collaborative à l'initiative d'un consortium international. Ainsi, le projet IHMS (International Human Microbiome Standards) coordonne actuellement le développement de procédures standardisées afin d'optimiser la qualité des data et leur comparabilité dans le domaine du microbiome humain, mais pour le microbiome fécal bactérien essentiellement (<http://www.microbiome-standards.org>). Les biais de ces techniques de *New Generation Sequencing* (NGS) sont actuellement abondamment étudiés pour l'évaluation des communautés bactériennes sans qu'aucune méthode n'ait totalement pu les

résoudre à ce jour [94,95]. Concernant l'étude des communautés fongiques, très peu de travaux comparent les différences d'efficacité ou d'assignation taxonomique entre différentes techniques d'extraction, différentes cibles, différentes paires d'amorces ou différentes bases de données. De plus, la majeure partie des études techniques sur le sujet décrivent des communautés fongiques environnementales, ou au mieux digestives chez l'Homme, très différentes des communautés des voies aériennes supérieures étudiées dans notre travail [29,34,96]. Avant de discuter les résultats de métagénomique bactérienne et fongique dans le cadre de notre étude sur les sinusites chroniques fongiques, nous allons analyser les biais possibles, liés à la conservation des échantillons ou à la technique du NGS.

BIAIS LIÉS A LA CONSERVATION DES PRELEVEMENTS

Les biopsies utilisées dans notre étude ont été conservées par congélation simple à - 80 °C. D'après la littérature, pauvre sur le sujet, la diversité taxonomique bactériologique et fongique varie peu en fonction des conditions de conservation, à l'exception du genre *Cryptococcus*, plus facilement isolé dans les échantillons de selles conservés dans le RNeasy® [29]. Dans notre étude, aucune OTU obtenue n'était assignée à ce taxon, d'ailleurs rarement décrit comme agent étiologique des balles fongiques [97]. Il pourrait être intéressant de comparer des résultats de métagénomique, dans des prélèvements de type respiratoire, avec conservation des prélèvements sans et avec RNeasy®.

BIAIS LIÉS A LA TECHNIQUE D'EXTRACTION

Notre protocole d'extraction reposait sur une technique automatisée comprenant une étape manuelle préalable de lyse mécanique à l'aide de microbilles de 1.4 mm et de lyse enzymatique à l'aide de protéinase K. L'utilisation de billes favorise l'extraction d'ADN des cellules fongiques, notamment sous forme de mycélium [30]. L'extraction d'ADN bactérien varie également en fonction des techniques et des protocoles utilisés. Ainsi, une étude récente a comparé 21 techniques d'extraction de selles à l'issue desquelles une analyse métagénomique ciblée était réalisée pour étudier leur impact sur l'étude du microbiote bactérien digestif [31]. La lyse mécanique à l'aide de billes de taille comprise entre 0.1 mm et 0.5 mm permettait d'augmenter de façon significative l'alpha-diversité d'un échantillon par rapport à l'utilisation de billes > 1 mm de diamètre. L'augmentation de l'alpha-diversité était liée principalement à l'augmentation des bactéries Gram positif, comme les *Staphylococcus*, possédants des parois plus complexe et difficile à lyser. Les billes de 1,4 mm de diamètre,

utilisées dans notre étude et ciblant les parois fongiques ont pu contribuer à créer un biais en faveur des bactéries Gram négatif. C'est peut-être la raison pour laquelle il est observé des discordances entre nos cultures positives à Gram positif, particulièrement à *S. aureus* et le faible nombre, voire l'absence de *reads*, assignés au genre *Staphylococcus* pour le même échantillon en métagénomique ciblée (cf. patient 44, p. 61). Il serait intéressant, dans une prochaine étude, de combiner des billes de petite taille ~0.1 mm qui favorisent l'extraction des bactéries Gram positif avec les billes de gros diamètre pour l'extraction des parois fongiques.

BIAIS LIÉS À L'AMPLIFICATION ET AU CHOIX DU COUPLE D'AMORCES

Dans ce travail, nous avons choisi de cibler la région ITS2 à l'aide du couple d'amorces ITS3-ITS4. Le choix du couple d'amorces entraîne des biais connus dans la littérature qui se répercutent sur l'abondance relative de certaines espèces et qui sont à prendre en compte dans l'analyse des résultats obtenus. D'autres cibles et couples d'amorces auraient également pu être considérés. Une étude montrant un meilleur rendement d'amplification de la cible avec le marqueur ARNr 18S note une bêta-diversité comparable avec le couple ITS3-ITS4 ciblant ITS2 [96]. Cependant le marqueur 18S est peu recommandé en raison de deux limitations majeures: (i) le haut niveau de conservation de ce gène rend l'analyse de la diversité parfois complexe avec seulement 2-3 nucléotides pouvant varier d'un genre à l'autre [96]; (ii) l'utilisation de l'ARNr 18S, composé de régions variables et conservées, augmente le risque de production de séquence chimère entraînant alors une surestimation de la diversité [98]. Ce biais peut être réduit par la diminution du nombre de cycles de PCR et par l'utilisation d'outils de bio-informatique spécifiques [96]. Bokulich et Mills préfèrent les ITS1 en raison d'une taille moyenne plus faible et plus uniforme entre ascomycètes et basidiomycètes permettant une meilleure classification taxonomique [99]. Il faut peut-être utiliser conjointement différentes cibles et combinaisons d'amorces pour obtenir la meilleure représentativité des différentes communautés fongiques, comme c'est le cas pour les bactéries [40,41]. En effet, la plupart des études comparant l'efficacité des couples d'amorces ciblant les ITS ont été réalisées sur des communautés environnementales très éloignées des mycobiomes humains [42,99,100]. Pour le mycobiome respiratoire et oropharyngé, c'est les couples d'amorces ciblant ITS1 ou ITS2 les plus fréquemment utilisés dans les études (Tableau 2). Une seule étude compare trois cibles (ITS1, ITS2, ITS1-5,8S-ITS2) pour une communauté artificielle composée de pathogènes humains respiratoires [58]. Le profil de diversité généré par le couple d'amorces ciblant ITS1 était le plus proche, en terme d'abondance relative, des taxons

de la communauté artificielle. Le couple d'amorces utilisé dans notre étude pour l'analyse taxonomique fongique (ITS3-ITS4) pourrait sous-estimer les basidiomycètes et notamment le genre *Malassezia* en raison de son produit d'amplification plus long que les autres genres (>600pb) [96]. Les basidiomycètes sont généralement moins impliqués en pathologie humaine, bien que certaines espèces émergent actuellement [101]. Le genre *Malassezia*, détaillé dans la suite de ce manuscrit (cf p.62), est retrouvé essentiellement dans la flore cutanée où il peut être pathogène. Il a la particularité de nécessiter des lipides pour sa culture fongique et il est donc rarement retrouvé en culture classique. Une sous-estimation de sa présence au sein des balles fongiques n'est probablement pas fondamentale, même si dans toutes les études de métagénomique ciblée respiratoires, il est retrouvé en abondance relative non négligeable [27,48]. *Schizophyllum commune*, basidiomycète environnemental fréquemment décrit dans les balles fongiques, n'a pas été mis en évidence dans notre étude, peut-être en raison de la localisation urbaine de nos patients [102]. Cependant, un genre proche, *Hormographiella*, a été mis en évidence comme taxon dominant dans la balle fongique d'un de nos patients. *Hormographiella* fait partie des basidiomycètes émergents dans les infections fongiques invasives chez l'homme et n'a, à notre connaissance, jamais été décrit dans une balle fongique sinusienne [101,103]. Finalement, dans notre étude qui cherchait à mettre en évidence le ou les taxon(s) dominant(s) responsable(s) de la pathologie, un biais entraînant une surestimation ou sous-estimation de l'abondance de certains taxa n'a probablement pas eu beaucoup d'impact sur le résultat attendu. Néanmoins, une analyse concomitante de la cible ITS1 sur nos prélèvements pourrait être intéressante et permettrait d'évaluer l'impact de la sur- ou sous-représentation de certains taxa, en particulier parmi les basidiomycètes.

BIAIS LIÉS AUX CRITÈRES DE VALIDATION QUALITATIVE DU *RUN* DE SÉQUENÇAGE

Pour certains échantillons, les courbes de raréfactions en ITS ou en 16S n'atteignaient pas l'asymptote. Il est donc possible que la diversité ait été sous-estimée dans ces échantillons, conséquence d'une profondeur de séquençage insuffisante (cf. p. 29). Dans ces cas particuliers (i.e. échantillons 2, 19, 20, 25 pour le 16S), le nombre de *reads* bruts et *trimmés* étaient similaires aux autres échantillons, mais contenaient un nombre très important de séquences contaminantes, notamment humaines, éliminées par le pipeline lors de la comparaison aux bases de données. C'est le cas, par exemple de 91,5% et 96,7% des *reads* pour les échantillons 19 et 25, respectivement. Les courbes de raréfactions ont été réalisées à

partir des *reads* et OTUs assignés au règne *Bacteria* et référencés dans la base de données SILVA. Si l'on avait construit les courbes de raréfaction en incluant également les *reads* et OTUs associées au genre humain, ou autres séquences contaminantes non retrouvées dans la base de donnée utilisée, l'asymptote aurait été probablement atteint avec épuisement de la diversité du prélèvement confirmant une profondeur de séquençage adéquate, à l'instar des autres échantillons. Pour ces échantillons qui présentent un nombre de *reads* bruts et *trimmés* important, mais une courbe de raréfaction n'atteignant pas l'asymptote, la biomasse microbienne était donc très faible, comparée à la biomasse humaine et/ou contaminante. Il est intéressant de noter qu'en ITS, la courbe de raréfaction de chacun des prélèvements cités ci-dessus (échantillons 2, 19, 20, 25) atteint l'asymptote avec très peu de *reads* contaminants éliminés. Ces différents échantillons correspondent systématiquement à un patient avec une balle fongique et non un témoin. Ces balles fongiques contenaient probablement une biomasse quasi exclusivement fongique et c'est pourquoi l'amplification 16S a majoritairement amplifié des séquences contaminantes ou humaines.

BIAIS LIÉS À LA SÉLECTION DE LA BASE DE DONNÉE POUR L'ASSIGNATION TAXONOMIQUE

Le pipeline QIIME utilisé dans ce travail permet une assignation à la base SILVA pour le 16S et UNITE pour les ITS. Une assignation inexacte des OTUs contribue à l'obtention de résultats biaisés. Le choix de la base de données pour l'assignation taxonomique est donc essentiel [104]. Pour les Fungi, comparativement aux bactéries, une difficulté supplémentaire existe, puisque certaines OTUs ont pu être assignées à la forme anamorphe (asexuée) d'un champignon tandis que d'autres ont été assignées à la forme téléomorphe (sexuée) du même champignon, entraînant une fausse diversité puisqu'il s'agit en fait du même organisme. L'assignation initiale a été réalisée grâce à UNITE, mais la totalité des OTUs fongiques a été vérifiée à l'aide de Mycobank (www.mycobank.org), plateforme permettant de comparer les résultats d'assignation d'une séquence sur différentes bases de données. Pour les séquences obtenues en 16S, les OTUs prédominantes ont été vérifiées et comparées sur les bases SILVA, Greengenes, RDP et EzBioCloud (www.ezbiocloud.net). Les identifications à l'espèce ont également été vérifiées en comparant ces différentes bases de données.

VERS UNE STANDARDISATION DE LA MÉTAGÉNOMIQUE

L'utilisation de la métagénomique ciblée est freinée par l'absence de standardisation permettant de la valider, mais aussi par le fait que l'on amplifie ce qui est connu, en

comparaison avec la technique *shotgun* qui amplifie tout ce qu'il y a dans le prélèvement. Tandis qu'une étude de transcriptomique peut être validée grâce à des méthodes de RT-qPCR permettant d'estimer la variation d'une cible d'ARN de référence entre deux conditions, cette procédure n'est pas réalisée de façon systématique en métagénomique. Une normalisation des données aurait pu être envisagée dans notre étude au moment du montage du plan d'expérience. À l'instar des études de transcriptomique, il est possible d'ajouter dans chaque échantillon un ADN exogène avec une quantité définie (*spike-in*) [105]. Ceci permettrait par la suite d'évaluer sa variation de proportion dans les tables finales. Néanmoins, il faut être certain que l'ADN exogène soit soumis aux mêmes biais techniques et analytiques que l'ADN endogène. Dans notre situation, il aurait fallu ajouter deux types d'ADN exogènes afin de normaliser la diversité fongique et bactérienne. En réalité, une validation de la proportion d'un groupe taxonomique par qPCR en parallèle est complexe et onéreuse à mettre en place. En outre, elle ne permettrait d'évaluer la variation de proportion que pour un seul groupe taxonomique. L'idéal pourrait être de tester le pipeline avec une communauté artificielle contenant les espèces attendues dans les prélèvements d'intérêts et qui pourrait être considéré comme témoin positif.

Pour finir, outre le manque de standardisation technique des études de métagénomique, il n'existe pas pour l'instant de recommandations pour orienter le biologiste, à l'instar des recommandations MIQE en PCR quantitative [106]. Un consensus entre experts dans ce domaine récent et en expansion permettrait de faciliter l'utilisation de cet outil et la comparaison entre les études.

DE L'ANALYSE DES DONNEES DE METAGENOMIQUE A L'INTERPRETATION CLINIQUE

L'analyse des données de métagénomique doit être méticuleuse et l'analyse requiert des connaissances rigoureuses non seulement sur le choix des techniques, mais également sur le pouvoir pathogène des taxa mis en évidence. Afin d'illustrer les challenges d'interprétation de ces données, trois cas sont détaillés dans ce manuscrit.

PATIENT 8 - BALLE FONGIQUE

Il s'agit d'une femme de 71 ans opérée pour une balle fongique sphénoïdale d'allure typique au TDM. Devant l'aspect typique per-opératoire, le prélèvement n'a pas été envoyé en bactériologie et en anatomopathologie. L'examen direct mycologique mettait en évidence de

nombreux filaments, mais la culture est restée négative après 3 semaines d'incubation. En 16S, l'amplification de l'échantillon a produit 48 010 *reads* assignés à 90,7% à l'espèce *Haemophilus influenzae*, 3,6% au genre *Finegoldia* et les *reads* restant assignés à une dizaine d'espèces minoritaires. Une prochaine partie de la discussion est dédiée à l'espèce *H. influenzae* (cf. p. 66). En ITS, l'échantillon a produit 12 003 *reads* assignés à 99,7% à l'espèce *Sarocladium kiliense*. *S. kiliense*, ex-*Acremonium kiliense*, est une espèce récemment décrite en pathologie humaine dans une épidémie nosocomiale de fongémies associées à la prise d'anti-vomitif chez des patients cancéreux en Colombie et au Chili [107]. Cette espèce n'a jamais été décrite dans les sinusites fongiques, mais elle est proche de genres fongiques responsables de ce genre de pathologie [108]. Les *reads* obtenus dans ce prélèvement sont identiques au témoin négatif d'extraction dont 75,1% des *reads* sont assignés à *S. kiliense*. En revanche, aucun *reads* assignés au genre *Byssochlamys* (également détecté dans le témoin négatif) n'étaient retrouvés dans l'échantillon 8. Dans ce contexte, il est difficile d'attribuer ou non cette balle fongique à *S. kiliense*.

PATIENT 15 - BALLE FONGIQUE

L'échantillon 15 a été prélevé chez une patiente de 53 ans avec une pansinusite secondaire à une balle fongique suspectée à l'imagerie. En mycologie, aucun élément fongique a été mis en évidence au direct, mais la culture a isolé *Aspergillus* sp. La culture bactérienne mettait en évidence *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis* et *Pseudomonas aeruginosa*. L'anatomopathologie observait des remaniements inflammatoires sans mise en évidence de pathogènes. En 16S, l'amplification et le séquençage a produit 34 741 *reads* assignés à 98,7% à *S. aureus*. Les OTUs restantes étaient assignées à 8 genres bactériens supplémentaires dont *Pseudomonas* et *Proteus*. Côté fongique, 16 704 *reads* ont été analysés dont 55,6% appartenaient au taxon prédominant *Malassezia*. Un total de 28 autres genres fongiques minoritaires étaient également présents. L'abondance de taxa observée dans cet échantillon est probablement liée à la sur-représentation de champignons transitoires et/ou contaminants dans un échantillon avec une faible biomasse fongique [109]. Il est probable que cet échantillon ait été classé à tort dans les balles fongiques en raison d'une culture positive pouvant être le résultat soit d'une contamination exogène lors du prélèvement ou de l'ensemencement, soit de la présence transitoire de spores d'*Aspergillus* chez cette patiente présentant une sinusite à *S. aureus*. Devant cet exemple, les critères d'inclusion initiaux, qui autorisaient l'inclusion des patients avec culture mycologique positive sans examen direct positif en « balles fongique » pourraient éventuellement être remis en cause.

PATIENT 44 - TEMOIN

Cette patiente est une femme âgée de 48 ans déjà opérée d'un kyste du sinus maxillaire droit à l'âge de 20 ans. Elle présente au moment de la consultation une sinusite maxillaire droite chronique d'origine dentaire. Le TDM retrouve un épaissement muqueux partiel des cellules sinusiennes de la face sans argument en faveur d'une greffe aspergillaire. L'IRM met en évidence une ostéite du plancher de l'orbite droite. Le chirurgien retire « un gros bouchon » faisant suspecter un aspergillome et les prélèvements sont envoyés en mycologie, bactériologie et anatomopathologie. L'examen direct et la culture restent négatifs en mycologie. En bactériologie, la culture est positive à *S. aureus*. L'anatomopathologie étudie trois fragments présentant des remaniements fibro-inflammatoires sans mettre en évidence de filaments mycéliens. La patiente rentre à domicile avec un traitement par clindamycine. En 16S, le fragment extrait produit 68 881 *reads* assignés à 92,7% à *Pseudomonas*, 6,8% à *Aggregatibacter* et les OTUs restantes à 11 genres minoritaires. En ITS, 18 005 *reads* ont été obtenus, dont 81,8% étaient assignés au genre *Aspergillus*, 10,1% à *Malassezia* et le reste était assigné à 3 taxa minoritaires, *Cladosporium*, *Alternaria* et *Galactomyces*. Une analyse supplémentaire a pu assigner l'*Aspergillus* à la section *flavi* pour la majorité des *reads*. La discordance entre les résultats obtenus en culture bactérienne et en métagénomique 16S peut s'expliquer par un défaut d'extraction de *S. aureus*, comme précédemment discuté (cf. p. 55). Cette hypothèse semble confirmée puisque deux autres cas de discordance entre culture et métagénomique (patients 43 et 46) sont liés à un défaut de détection de *S. aureus* en métagénomique alors que la culture avait permis de l'identifier. De plus, le cas de discordance partielle (patient 48) évoqué p. 53 correspondait également à une sous-détection de *S. aureus* en métagénomique comparé à la culture. *In fine*, il est très probable que *Pseudomonas* ait été présent en quantité faible dans l'échantillon 44 et qu'il n'ait pas été détecté en culture en raison de la forte charge en *S. aureus*. Concernant les résultats ITS de cet échantillon, la métagénomique a mis en évidence un nombre important de *reads* associés au genre *Aspergillus* qui n'avait pas été détecté par l'examen direct ou la culture. L'interprétation de cet *Aspergillus* est à discuter. L'ED et la culture étant négatifs, il peut être considéré comme un colonisant transitoire ou un contaminant. Dans ce cas, la métagénomique a permis de démasquer des genres bactériens pathogènes minoritaires dans une infection probablement pluri-microbienne montrant l'intérêt de cette technique pour dépister les espèces minoritaires.

LES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET FONGIQUES DES BALLEES FONGIQUES SINUSIENNES

SIGNIFICATIVITE ET PERTINENCE DES RESULTATS ISSUS DE DONNEES DE METAGENOMIQUE

L'approche purement **descriptive** de la métagénomique ciblée est une de ses limites et reste insuffisante pour analyser les variations des microbiotes étudiés. À titre d'exemple, un profil particulier de flore peut être un élément pour interpréter certaines données cliniques, mais il faut être pertinent et ne pas associer systématiquement un profil à une étiologie. Ceci est très bien illustré par la recherche actuelle d'association entre pathologies du tube digestif et microbiote intestinal. En effet, les patients atteints de maladie cœliaque ont un microbiote différent des patients sains suggérant une implication du microbiote dans la symptomatologie et/ou la physiopathologie de la maladie cœliaque [110]. Cependant, il n'est pas exclu que ce microbiote soit la conséquence d'une inflammation locale chronique et/ou d'un régime particulier sans gluten et non une étiologie de la maladie cœliaque.

Un regard critique sur la pertinence des données significatives est primordial. En effet, la multiplication des analyses statistiques et la multitude de variables et de taxa entraînent parfois une mise en valeur de résultats discutables. C'est notamment le cas dans ce travail lorsque nous avons cherché à mettre en évidence des sur- ou sous-représentations de taxa en fonction du sexe ou de la localisation de la sinusite (Figure 19). *Aggregatibacter* et *Moraxella* prédominent chez les femmes ($p < 0,01$ et $p < 0,05$ respectivement) tandis que *Escherichia-Shigella* et *Eubacterium* semblent être retrouvés en plus grande abondance chez les hommes ($p < 0,001$). Aucun argument physiopathologique ne permet d'expliquer ces associations qui sont probablement fortuites ou liées à un facteur de confusion technique. Il semblerait également que les genres *Achromobacter* et *Anaerococcus* soient en plus grande abondance dans les sinusites maxillaires *versus* les autres localisations ($p < 0,05$) (Figure 19). Néanmoins, ces genres très minoritaires sont retrouvés en faible quantité et dans peu d'échantillons. Ces genres sont aussi fréquemment décrits comme contaminants de laboratoire, comme retrouvés ici en petite quantité dans le témoin négatif. Ces résultats, bien que significatifs, sont peu pertinents et probablement le résultat d'une contamination de certains échantillons.

LE MICROBIOTE FONGIQUE DES BALLEES FONGIQUES SINUSIENNES

L'analyse du microbiote fongique, ou mycobiome, au sein de ces balles fongiques révèle essentiellement la présence du genre *Aspergillus*. Les études sur le mycobiome respiratoire rapportent également *Aspergillus*, mais aussi *Candida* comme étant les taxa les plus fréquemment détectés [45,48,52,57,58,111]. Aucune OTU assignée au genre *Candida* n'a été

détecté dans notre étude. Il ne faut pas omettre qu'il s'agit ici d'une étude sur les sinusites et non sur des prélèvements du tractus respiratoire ou oropharyngés. Il est également possible que ce taxa ait pu être sous-estimé par l'utilisation de ITS2 versus ITS1 [34]. La présence d'*Aspergillus* et l'absence de *Candida* étaient des résultats attendus et permettent de témoigner de la qualité des prélèvements. *Aspergillus* est le genre majoritaire, un champignon normalement bien adapté à nos milieux de culture qui, dans le cas présent, reste le plus souvent négatif en culture. Ce résultat est concordant avec les études relatives aux balles fongiques précédemment décrites dans l'introduction (cf. p. 17) [16,21]. Une seule autre étude à notre connaissance, de Cleland *et al.*, évalue le mycobiome dans les sinusites chroniques [53]. L'objectif de cette étude était de décrire la diversité du mycobiome chez des patients opérés par voie endoscopique pour sinusite chronique. Cette étude australienne incluait 23 cas de sinusites chroniques et 11 témoins opérés par voie transphénoïdale pour une autre raison médicale. Dans ce travail, l'amplification et l'analyse étaient réalisées sur un écouvillon nasal et non sur un prélèvement profond de type biopsie ou aspiration. Ce prélèvement, dans lequel 207 taxa fongiques étaient mis en évidence, ne permettait probablement pas de différencier la flore fongique commensale, présente dans l'environnement et inhalée quotidiennement, de la ou les espèces responsables de la pathogénicité au niveau des sinus. Bien qu'il ait été montré que l'utilisation d'un écouvillon *versus* un échantillon tissulaire n'avait pas d'impact sur l'analyse du microbiome bactérien sinusien [81], ce n'est probablement pas vrai pour le mycobiome en raison de l'inhalation quotidienne de diverses spores fongiques. *Malassezia* était détecté dans tous les échantillons et prédominait comme taxon. Le type de sinusites étudié dans cette étude correspondait à nos témoins chez lesquels nous trouvons également le genre *Malassezia*. *Malassezia* spp. sont des levures basidiomycètes qui composent jusqu'à 80% de la flore cutanée fongique et sont également associées à un spectre de maladies dermatologiques incluant entre autres le *pityriasis versicolor* et la dermatite séborrhéique [112]. Ce genre est souvent mis en évidence dans les études de métagénomique ciblée, mais peu dans les études basées sur la culture en raison de la nécessité d'utiliser des milieux enrichis en lipides. Dans une étude sur le mycobiome des rhinites allergiques, Jung *et al.* identifiaient également *Malassezia* dans 100% des cas. Dans ces deux dernières études, l'abondance relative de *Malassezia* ne variait pas entre les patients atteints de dysfonction rhino-sinusienne chronique (DRSC) ou de rhinite allergique [56]. Chez des patients asthmatiques, *Malassezia pachydermatis* était significativement plus fréquemment retrouvé dans les expectorations des malades *versus* les témoins [49]. Il est possible que ces observations soient une conséquence de la pathologie et éventuellement secondaire à

l'utilisation de corticostéroïdes inhalés. Les données disponibles actuellement suggèrent que *Malassezia* pourrait être un commensal des cavités rhino-sinusiennes mais plus d'études sont nécessaires afin d'établir si ces champignons jouent un rôle dans la physiopathologie des DRSC.

PERTINENCE DU CHOIX DES TEMOINS

Les cas de balles fongiques correspondaient à des diagnostics effectués sur des arguments cliniques (enchevêtrement très dense « en truffe » de filaments mycéliens), radiologiques et chirurgicaux ainsi que sur l'aspect macroscopique associé à un examen direct et/ou une culture positive. Les témoins correspondaient à des patients opérés pour sinusites chroniques pour lesquels ni la mycologie, ni l'anatomopathologie n'avait mis de filaments en évidence. Du côté des cas, un seul patient avait un examen direct négatif avec une culture positive. Ce cas discuté précédemment (p. 60) aurait probablement dû être considéré comme témoin. Concernant les témoins, les patients présentaient une polypose naso-sinusienne (n=3), un corps étranger intra-sinusien (n=3) et une obstruction chronique sans étiologie évidente (n=1, patient 44 discuté p. 61). Ces échantillons avaient été envoyés en mycologie ce qui constitue d'emblée un premier biais. En effet, les prélèvements per-opératoires ne sont pas systématiquement envoyés en mycologie et dans ces cas une étiologie fongique avait probablement été suspectée par le chirurgien et infirmée par la mycologie et l'anatomopathologie. Chez nos témoins, les corps étrangers sinusiens correspondaient à (i) une lésion pseudo-tumorale qui s'est avérée être des pseudo-polypes inflammatoires (patient 42), (ii) un noyau de pâte dentaire (patient 48) et (iii) une suspicion de balle fongique au TDM (patient 47). Pour ce dernier patient, le compte-rendu opératoire rapporte la mise en évidence d'une lésion de "type truffe aspergillaire" envoyée en mycologie et en anatomopathologie. Néanmoins, les examens directs des deux laboratoires s'accordent pour réfuter la présence de filaments. En bactériologie, la culture est pure à *P. aeruginosa*, ce que confirment les résultats de la métagénomique. Il est donc envisageable de proposer que *P. aeruginosa*, par sa capacité à faire du biofilm, puisse avoir la capacité de créer une structure macroscopiquement similaire à une balle fongique, soulignant ainsi l'importance de l'envoi systématique des prélèvements en microbiologie générale et spécialisée.

PHYSIOPATHOLOGIE DES BALLES FONGIQUES, UN FLOU PERSISTANT

La physiopathologie des balles fongiques reste débattue. Il est probable que l'origine soit multifactorielle (i) liée à l'hôte (predisposition génétique et anatomique), (ii) liée à

l'environnement et (iii) liée au pathogène. Jiang *et al.* ont recherché des facteurs prédisposants, dans une cohorte de 91 patients opérés pour une balle fongique sinusienne, incluant le profil cytokinique des cellules de la muqueuse et des polymorphismes génétiques des gènes de l'immunité, déjà retrouvés chez des patients développant un aspergillome pulmonaire [15]. Aucune mutation particulière des gènes de l'immunité n'a été retrouvée pour le moment chez ces patients [15]. Toutefois, un polymorphisme associé à l'expression épithéliale de la cadhérine E, habituellement retrouvé chez les patients asthmatiques, semble plus fréquemment retrouvé chez ces patients [15].

Notre travail s'est concentré sur le ou les pathogènes à l'origine de la sinusite chronique. Le champignon impliqué dans la majorité des cas est *Aspergillus*. Notre hypothèse était que l'absence de pousse en culture puisse être secondaire à la présence concomitante de bactéries. Ceci aurait eu pour conséquence de fragiliser le champignon, mais cela n'est pas vérifié par nos résultats. En effet, le microbiote bactérien des balles fongiques ayant poussé en culture ne n'est pas significativement différent de celui où la culture est restée négative. Il est probable que le champignon au sein des balles fongiques soit plutôt assimilé à un biofilm et dans un état d'hypométabolisme empêchant sa pousse secondaire en culture [113]. L'état "viable, mais non cultivable" est bien démontré chez les bactéries évoluant dans un biofilm, mais ne semble pas avoir été décrite chez *Aspergillus* [114]. Cet état de dormance se caractérise par l'échec de pousse d'un organisme en culture sur des milieux habituellement adéquats tandis que des preuves de viabilité persistent telles qu'une activité respiratoire, la présence d'ARNr et l'intégrité de la membrane cellulaire [114]. Les discussions autour du rôle du biofilm dans la physiopathologie des aspergilloses est un concept récent. Des études anatomopathologiques de tissus humains et de modèles animaux d'aspergillose aiguë invasive et chronique ont montré qu'*A. fumigatus* produit un biofilm composé d'agrégats d'hyphes multicellulaires enchâssés dans une matrice extracellulaire [115,116]. Des études ont montré que cette capacité à produire du biofilm contribuait à la virulence en favorisant l'adhérence aux cellules de l'hôte [117] et en augmentant la résistance aux antifongiques [118] et au système immunitaire [119]. Il est probable que ces balles fongiques correspondent à un biofilm aspergillaire.

Le genre *Haemophilus* était significativement plus abondant au sein des balles fongiques comparées aux autres sinusites ($p < 0.001$). En effet 48,6% (18/37) des échantillons contenaient une abondance relative d'*Haemophilus* $> 10\%$. De plus, dans 5,4% (2/37) des échantillons, le genre *Aggregatibacter*, très proche d'*Haemophilus*, prédominait. Le genre *Aggregatibacter* fut d'ailleurs créé en 2006 afin de renommer certaines espèces du genre *Haemophilus*, notamment les espèces ex-*Haemophilus segnis* et ex-*Haemophilus aphrophilus* [120]. Le potentiel rôle d'*Haemophilus* dans les balles fongiques fait l'objet d'une partie particulière détaillée ci-dessous. Parmi les échantillons restants, 10,8% (4/37) présentaient moins de 5 000 *reads* bactériens, probablement liés à des échantillons essentiellement fongiques comme discuté précédemment. Les 35,1% d'échantillons sans *Haemophilus* ou assimilés présentaient des profils bactériens variés. Un grand nombre de bactéries anaérobies a également été mis en évidence par la métagénomique, non présent systématiquement dans la culture lorsque celle-ci était réalisée. Il s'agit notamment des *Streptococcus* du groupe *milleri*, des genres *Fusobacterium*, *Parvimonas*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fingoldia*, *Bacteroides* et *Peptostreptococcus*. L'isolement de bactéries anaérobies est plus difficile en culture, car elle requiert des conditions de prélèvement, de transport et de manipulation particulières. La plupart des genres cités ne sont pas forcément pathogènes, car également présents dans la flore oropharyngée. Néanmoins, ils peuvent être responsables de complications odontologiques (i.e. parodontite), de sinusites et d'otites et sont probablement sous-estimés dans ces pathologies [121]. Une étude, réalisée sur une cohorte de 47 patients atteints de balle fongique, avec mise en culture bactérienne systématique mettait en évidence des anaérobies dans 55,3% des cas [122]. Les genres les plus fréquemment retrouvés étaient *Prevotella* et *Peptostreptococcus* [122]. Dans cette étude comme dans la nôtre, il est difficile d'évaluer si la présence de ces bactéries est en lien avec la physiopathologie des balles fongiques.

HAEMOPHILUS JOUE-T-IL UN ROLE DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DES BALLES FONGIQUES ?

Haemophilus spp. sont des cocobacilles Gram négatif dépendant du facteur X (hème) et/ou du facteur V (dinucléotide adénine nicotinamide) [123]. *Haemophilus influenzae* est dépendant des deux facteurs. Certaines souches sont encapsulées et typables avec des sérotypes *a* à *f* en fonction du polysaccharide de la capsule [123]. Les autres ne sont pas typables et nommés *Haemophilus influenzae* non typables (HINT). Les souches encapsulées de sérotype *b* (Hib) étaient responsables d'épiglottites et méningites graves chez l'enfant de moins de 5 ans, mais ces pathologies ont drastiquement diminuées depuis l'introduction du vaccin Hib [120]. En

France, le rapport d'activité du CNR *Haemophilus influenzae* retrouve 89,1% de HINT dans les infections invasives (i.e. bactériémies et méningites) [124]. Les HINT sont retrouvés dans la flore oropharyngée, mais aucune méthode ne permet de différencier une souche commensale d'une souche pathogène bien qu'une étude suggère que l'activité protéase anti-IgA1 soit plus importante chez les souches isolées de patients symptomatiques [125]. Les HINT sont surtout retrouvés dans des infections non-invasives telles que les otites moyennes aiguës, les sinusites, les conjonctivites, les exacerbations de broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) et les pneumonies sans bactériémies [123]. Ces infections ne touchent généralement que la muqueuse et sont polymicrobiennes. Le rôle des HINT dans ces infections peut donc être sous-estimé. Comparés à ses autres co-pathogènes, les HINT ne secrètent pas d'exotoxines, d'enzymes protéolytiques (hormis les endopeptidases d'IgA1), de lipases, de superantigènes ou de capsule. Pourtant, ils arrivent à faire concurrence aux autres micro-organismes et colonisent les voies aériennes supérieures. La colonisation par les HINT est une cause majeure d'inflammation des voies respiratoires et de lésions tissulaires dans la BPCO, notamment au moment des exacerbations [126]. Dans ce cas, les co-colonisations ou co-infections sont fréquemment observées avec *S. pneumoniae* et *M. catarrhalis*. Ils sont également fréquemment détectés pendant ou suite à des infections par le virus de la grippe, les rhinovirus ou le VRS (virus respiratoire syncytial). Il est possible que les HINT soit particulièrement bien adaptés aux autres bactéries avec lesquelles ils communiquent par le biais de molécules de *quorum sensing* ainsi qu'avec le microenvironnement épithélial de l'hôte affecté par une infection virale [127]. Les HINT participent aussi probablement à initier le processus inflammatoire conduisant à la colonisation par *P. aeruginosa* dans la mucoviscidose [123,128]. Nous pourrions imaginer que c'est également le cas pour l'implantation d'*Aspergillus*. La colonisation de la muqueuse par les HINT et leur persistance repose sur quatre stratégies principales [127]:

- La perturbation du système de clairance muco-ciliaire impliquant l'activation d'une protéine kinase C *epsilon* chez la cellule hôte
- L'adhérence aux cellules épithéliales via des adhésines
- La formation de biofilm
- L'invasion des cellules épithéliales

Une perturbation du système de clairance muco-ciliaire serait particulièrement propice à la persistance et à la germination des spores d'*Aspergillus* inhalées quotidiennement de l'environnement.

PEUT-IL EXISTER UNE INTERACTION ENTRE *ASPERGILLUS* ET *HAEMOPHILUS* ?

Une étude portant sur les rhinosinusites fongiques allergiques (n=4) et les rhinosinusites chroniques (n=7) a examiné des échantillons de muqueuses sinusiennes prélevés lors d'une chirurgie endoscopique à la recherche de biofilm bactérien et fongique [85]. La présence de *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *H. influenzae*, *P. aeruginosa* et d'éléments fongiques étaient recherchés par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) à l'aide de sondes nucléotidiques spécifiques. Sur les 11 échantillons étudiés, la FISH mettait en évidence un biofilm pour 9 d'entre eux contenant à la fois des éléments fongiques et *H. influenzae*. *S. pneumoniae*, *S. aureus* et *P. aeruginosa* étaient également associés à ce biofilm polymicrobien dans 4, 4 et 3 cas respectivement. Bien que ces types de sinusites soient différents des balles fongiques, cette étude confirme l'existence de biofilm associant *Haemophilus* et *Aspergillus*.

Par ailleurs, une équipe australienne a développé un modèle *in vivo* de sinusite fongique chez le mouton [129]. Dans ce modèle, aucun biofilm fongique ne se formait lorsque *A. fumigatus* était inoculé seul. Par contre, lorsque qu'il était co-inoculé avec *S. aureus*, *S. epidermidis* ou *P. aeruginosa* un important biofilm mixte était visible à J8 sur les biopsies de muqueuse [129]. L'utilisation d'une toxine ciliaire permettait également la formation de biofilm fongique. De façon surprenante, la co-inoculation avec *H. influenzae* n'aboutissait pas à la formation d'un biofilm. Cependant, la souche ATCC 49247 utilisée pour l'étude ne produit pas de biofilm comme l'a démontré plus récemment Wajima *et al.* [130]. Il est probable qu'avec d'autres souches d'*H. influenzae*, un biofilm mixte se serait formé comme c'est le cas entre certaines souches d'autres bacilles Gram négatif et *Aspergillus* [131,132].

Notre étude ne permet pas de savoir si la co-existence de *H. influenzae* et *A. fumigatus* au sein des balles fongiques correspond à une association fortuite ou une véritable interaction entre ces micro-organismes. Il est théoriquement possible que le champignon et la bactérie puissent interagir de façon coopérative afin d'augmenter leurs mécanismes de défense vis-à-vis de l'hôte, mais aussi pour faciliter l'accès à certains nutriments par des échanges spécifiques [114]. Nous ne pouvons pas non plus exclure que la présence d'*H. influenzae* puisse être liée à une simple surinfection compliquant transitoirement cette pathologie chronique. Toutefois, la chirurgie se réalise plutôt "à froid" et la plupart des patients étaient décrits comme apyrétiques et sans symptômes aigus lorsque l'information était disponible. Une analyse par FISH de coupes fines de nos balles fongiques avec des sondes spécifiques d'*A. fumigatus* et *H. influenzae* aurait pu montrer leur coexistence au cœur de la structure. D'autres études d'abord

in vitro sur polystyrène, puis sur cellules épithéliales sont nécessaires pour mettre en évidence de potentielles interactions entre ces deux micro-organismes.

CONCLUSION

Les balles fongiques sinusiennes sont des entités particulières des rhino-sinusites chroniques. Elles étaient jusqu'alors décrites comme un enchevêtrement dense de filaments fongiques obstruant un sinus. Sans surprise, la métagénomique ciblée permet de valider qu'elles sont essentiellement dues à des *Aspergillus* section *fumigati*, confirmant les données de la littérature même si la culture reste le plus souvent négative. De façon plus intéressante, les résultats de notre étude révèlent que des bactéries et notamment *H. influenzae*, par sa présence spécifique en association avec *Aspergillus* pourrait jouer un rôle dans ces balles fongiques sinusiennes. Cela nous permet de souligner l'importance de multiplier l'envoi des prélèvements per-opératoires, quels qu'ils soient, dans les différents laboratoires diagnostiques disponibles (bactériologie, mycologie, anatomopathologie) sans *a priori* sur l'étiologie. La fréquence des faux négatifs retrouvés par le laboratoire d'anatomopathologie, plus fréquemment qu'en mycologie en cas d'étiologie fongique vient renforcer cette suggestion.

L'analyse du microbiome par métagénomique ciblée permet de détecter un large panel de taxa fongiques et bactériens, plus important que les études basées sur la culture. L'avènement des techniques de séquençage haut débit apporte de nouvelles perspectives. Les objectifs microbiologiques évoluent : nous sommes passés de la mise en évidence d'une espèce pour une pathologie à la recherche d'un profil de communautés microbiennes normales (flore) ou anormales permettant l'analyse fine des coexistences ou des co-exclusions entre bactéries, virus et champignons. Les techniques de séquençage à très haut débit permettent également d'étudier l'importance des prédispositions génétiques de l'hôte en permettant le séquençage rapide de génomes humains entiers. Ceci donne lieu à l'analyse complexe de mécanismes pathologiques non élucidés. Les limitations principales aujourd'hui restent le manque de standardisation entre les études et les difficultés d'appréhender la totalité des biais liés à la méthode choisie. Cette technologie est également très prometteuse pour les laboratoires de microbiologie clinique pour détecter les pathogènes lorsque les techniques traditionnelles de microscopie et de culture restent négatives alors que la suspicion d'infection est importante. C'est particulièrement vrai dans le cas des infections liées aux biofilms. Le rôle du biologiste est majeur dans l'analyse de ces sets complexes de données. Il est donc important de tester et connaître ce genre de techniques afin d'en interpréter les résultats en connaissance de cause.

Ce type d'études, présenté dans ce mémoire, permet de discuter les biais et les limites du choix des critères utilisés afin de mieux appréhender la prise en charge prochaine par séquençage haut débit des échantillons des patients à des fins diagnostiques immédiates. Une des perspectives principales de notre étude à court terme pour l'écriture prévue de l'article scientifique est la comparaison des résultats entre la cible ITS2 décrite dans ce manuscrit et la cible ITS1 qui en cours d'analyse.

Les trois hypothèses avancées initialement pour expliquer l'absence de pousse en culture des prélèvements de balles fongiques étaient : premièrement la présence d'espèces fongiques non cultivables, déjà réfutée par d'autres études et confirmée ici. Deuxièmement, la concomitance de certaines bactéries spécifiques, tel que *P. aeruginosa*, aurait pu empêcher la pousse en culture, mais aucun taxon bactérien spécifique ne semble associé aux cultures négatives. Enfin, la troisième hypothèse proposait que cette structure particulière de balle fongique, proche d'un biofilm fongique, soit constituée de structures fongiques altérées et/ou que le métabolisme du champignon soit ralenti rendant sa croissance *in vitro* lente et difficile dans des conditions de culture classique. Les bactéries au sein des biofilms sont décrites comme "viables, mais non-cultivables" et c'est probablement également le cas pour les champignons.

Contrôler les facteurs qui conduisent à la formation du biofilm fongique dans les sinus permettrait une prévention de la formation des balles fongiques et une meilleure prise en charge des patients. Il reste à comprendre la raison pour laquelle *H. influenzae* s'associe avec *A. fumigatus* dans les balles fongiques de façon significativement plus importante que dans les autres types de sinusites chroniques. Cette étude descriptive ne permet pas de savoir si la bactérie est présente au préalable et participe à la formation de la balle fongique ou si sa présence est une conséquence liée à l'obstruction chronique du sinus qui favoriserait sa prolifération. Finalement, il est probable que les souches d'*H. influenzae* soient capables d'inhiber l'activité ciliaire des cellules épithéliales et de synthétiser du biofilm propice à l'implantation du champignon à la surface de la muqueuse. D'autres études sont requises pour mettre en évidence des interactions directes symbiotiques entre ces deux micro-organismes.

REFERENCES

- [1] Wyler B, Mallon WK. Sinusitis Update. *Emergency Medicine Clinics of NA* 2019;37:41–54. doi:10.1016/j.emc.2018.09.007.
- [2] Bonfils P. Rhinites et sinusites chroniques. *Le Généraliste* 2007;1–8.
- [3] Gwaltney JM. Acute community-acquired sinusitis. *Clin Infect Dis* 1996;23:1209–23. doi:10.1093/clinids/23.6.1209.
- [4] Fokkens W, Lund V, Mullol J, European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps Group. EP3OS 2007: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2007. A summary for otorhinolaryngologists. *Rhinology* 2007;45:97–101.
- [5] Rosenfeld RM, Piccirillo JF, Chandrasekhar SS, Brook I, Ashok Kumar K, Kramper M, et al. Clinical Practice Guideline (Update): Adult Sinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2015;152:S1–S39. doi:10.1177/0194599815572097.
- [6] Hastan D, Fokkens WJ, Bachert C, Newson RB, Bislimovska J, Bockelbrink A, et al. Chronic rhinosinusitis in Europe - an underestimated disease. A GA2LEN study. *Allergy* 2011;66:1216–23. doi:10.1111/j.1398-9995.2011.02646.x.
- [7] Glass D, Amedee RG. Allergic fungal rhinosinusitis: a review. *Ochsner J* 2011;11:271–5.
- [8] Ponikau JU, Sherris DA, Kern EB, Homburger HA, Frigas E, Gaffey TA, et al. The Diagnosis and Incidence of Allergic Fungal Sinusitis. *Mayo Clinic Proceed* 1999;74:877–84. doi:10.4065/74.9.877.
- [9] deShazo RD, Swain RE. Diagnostic criteria for allergic fungal sinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 1995;96:24–35. doi:10.1016/s0091-6749(95)70029-3.
- [10] Singhal D, Psaltis AJ, Foreman A, Wormald P-J. The impact of biofilms on outcomes after endoscopic sinus surgery. *Am J Rhinol Allergy* 2010;24:169–74. doi:10.2500/ajra.2010.24.3462.
- [11] Sanclement JA, Webster P, Thomas J, Ramadan HH. Bacterial Biofilms in Surgical Specimens of Patients with Chronic Rhinosinusitis. *The Laryngoscope* 2009;115:578–82. doi:10.1097/01.mlg.0000161346.30752.18.
- [12] Lafont E, Aguilar C, Vironneau P, Kania R, Alanio A, Poiree S, et al. Sinusites fongiques. *Revue Des Maladies Respiratoires* 2017;34:1–21. doi:10.1016/j.rmr.2016.09.004.
- [13] deShazo RD, Chapin K, Swain RE. Fungal sinusitis. *New England Journal of Medicine* 1997;337:254–9. doi:10.1056/NEJM199707243370407.
- [14] Grosjean P, Weber R. Fungus balls of the paranasal sinuses: a review. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2007;264:461–70. doi:10.1007/s00405-007-0281-5.
- [15] Jiang R-S, Huang W-C, Liang K-L. Characteristics of Sinus Fungus Ball: A Unique Form of Rhinosinusitis. *Clin Med Insights Ear Nose Throat* 2018;11:1179550618792254. doi:10.1177/1179550618792254.
- [16] Dufour X, Kauffmann-Lacroix C, Ferrie JC, Goujon JM, Rodier MH, Klossek JM. Paranasal sinus fungus ball: epidemiology, clinical features and diagnosis. A retrospective analysis of 173 cases from a single medical center in France, 1989–2002. *Medical Mycology* 2006;44:61–7. doi:10.1080/13693780500235728.
- [17] Stammberger H. Endoscopic surgery for mycotic and chronic recurring sinusitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 1985;119:1–11.
- [18] Tsai T, Guo YC, Ho CY, Lin CZ. The Role of Ostiomeatal Complex Obstruction in Maxillary Fungus Ball. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery* 2006;134:494–8.

- doi:10.1016/j.otohns.2005.10.009.
- [19] Toussain G, Botterel F, Alsamad IA, Zerah-Lancner F, Pruliere-Escabasse V, Coste A, et al. Sinus fungal balls: characteristics and management in patients with host factors for invasive infection. *Rhinology* 2012;50:269–76. doi:10.4193/Rhino11.223.
- [20] Pagella F, Matti E, Bernardi FD, Semino L, Cavanna C, Marone P, et al. Paranasal sinus fungus ball: diagnosis and management. *Mycoses* 2007;50:451–6. doi:10.1111/j.1439-0507.2007.01416.x.
- [21] Morio F, Dannaoui E, Chouaki T, Cateau E, Malard O, Bonfils P, et al. PCR-based detection of *Aspergillus fumigatus* and absence of azole resistance due to TR34/L98H in a french multicenter cohort of 137 patients with fungal rhinosinusitis. *Mycoses* 2018;61:30–4. doi:10.1111/myc.12702.
- [22] Comacle P, Belaz S, Jegoux F, Ruaux C, Le Gall F, Gangneux J-P, et al. Contribution of molecular tools for the diagnosis and epidemiology of fungal chronic rhinosinusitis. *Medical Mycology* 2016;54:794–800. doi:10.1093/mmy/myw041.
- [23] Zhang J, Li Y, Lu X, Wang X, Zang H, Wang T, et al. Analysis of fungal ball rhinosinusitis by culturing fungal clumps under endoscopic surgery. *Int J Clin Exp Med* 2015;8:5925–30.
- [24] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 1995;59:143–69.
- [25] Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol* 1998;5:R245–9.
- [26] Lederberg J, McCray A. “Ome Sweet ”Omics - a genealogical treasury of words. *Scientist* 2001;15:8–9.
- [27] Botterel F, Angebault C, Cabaret O, Stressmann FA, Costa J-M, Wallet F, et al. Fungal and Bacterial Diversity of Airway Microbiota in Adults with Cystic Fibrosis: Concordance Between Conventional Methods and Ultra-Deep Sequencing, and Their Practical use in the Clinical Laboratory. *Mycopathologia* 2017;183:1–13. doi:10.1007/s11046-017-0185-x.
- [28] Choo JM, Leong LE, Rogers GB. Sample storage conditions significantly influence faecal microbiome profiles. *Scientific Reports* 2015:1–10. doi:10.1038/srep16350.
- [29] Angebault C, Ghozlane A, Volant S, Botterel F, d’Enfert C, Bougnoux M-E. Combined bacterial and fungal intestinal microbiota analyses: Impact of storage conditions and DNA extraction protocols. *PloS One* 2018;13:e0201174–17. doi:10.1371/journal.pone.0201174.
- [30] Fredricks DN, Smith C, Meier A. Comparison of Six DNA Extraction Methods for Recovery of Fungal DNA as Assessed by Quantitative PCR. *J Clin Microbiol* 2005;43:5122–8. doi:10.1128/JCM.43.10.5122-5128.2005.
- [31] Costea PI, Zeller G, Sunagawa S, Pelletier E, Alberti A, Levenez F, et al. Towards standards for human fecal sample processing in metagenomic studies. *Nat Biotechnol* 2017;35:1069–76. doi:10.1038/nbt.3960.
- [32] Huseyin CE, Rubio RC, O’Sullivan O, Cotter PD, Scanlan PD. The Fungal Frontier: A Comparative Analysis of Methods Used in the Study of the Human Gut Mycobiome. *Frontiers in Microbiology* 2017;8:515–5. doi:10.3389/fmicb.2017.01432.
- [33] Vesty A, Biswas K, Taylor MW, Gear K, Douglas RG. Evaluating the Impact of DNA Extraction Method on the Representation of Human Oral Bacterial and

- Fungal Communities. *PloS One* 2017;12:e0169877–13. doi:10.1371/journal.pone.0169877.
- [34] Angebault C, Payen M, Woerther P-L, Rodriguez C, Botterel F. Combined bacterial and fungal metagenomic analysis of respiratory samples : does DNA extraction matter ? Submitted 2019.
- [35] Rosenbaum J, Usyk M, Chen Z, Zolnik CP, Jones HE, Waldron L, et al. Evaluation of Oral Cavity DNA Extraction Methods on Bacterial and Fungal Microbiota. *Scientific Reports* 2019:1–10. doi:10.1038/s41598-018-38049-6.
- [36] Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010;464:59–65. doi:10.1038/nature08821.
- [37] Bokulich NA, Mills DA. Next-generation approaches to the microbial ecology of food fermentations. *BMB Reports* 2012;45:377–89. doi:10.5483/BMBRep.2012.45.7.148.
- [38] Klappenbach JA, Dunbar JM, Schmidt TM. rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 2000;66:1328–33.
- [39] Amend AS, Seifert KA, Bruns TD. Quantifying microbial communities with 454 pyrosequencing: does read abundance count? *Molecular Ecology* 2010;19:5555–65. doi:10.1111/j.1365-294X.2010.04898.x.
- [40] Nossa CW. Design of 16S rRNA gene primers for 454 pyrosequencing of the human foregut microbiome. *World Journal of Gastroenterology* 2010;16:4135–10. doi:10.3748/wjg.v16.i33.4135.
- [41] Guo F, Ju F, Cai L, Zhang T. Taxonomic Precision of Different Hypervariable Regions of 16S rRNA Gene and Annotation Methods for Functional Bacterial Groups in Biological Wastewater Treatment. *PloS One* 2013;8:e76185–11. doi:10.1371/journal.pone.0076185.
- [42] Bellemain E, Carlsen T, Brochmann C, Coissac E, Taberlet P, Kauserud H. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiol* 2010;10:189. doi:10.1186/1471-2180-10-189.
- [43] Ihrmark K, Bödeker ITM, Cruz-Martinez K, Friberg H, Kubartova A, Schenck J, et al. New primers to amplify the fungal ITS2 region - evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiology Ecology* 2012;82:666–77. doi:10.1111/j.1574-6941.2012.01437.x.
- [44] White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols a guide to methods and applications*, 1990, pp. 315–22.
- [45] Cui L, Morris A, Ghedin E. The human mycobiome in health and disease. *Genome Med* 2013;5:63. doi:10.1186/gm467.
- [46] Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, Cui F, Sikaroodi M, Naqvi A, et al. Characterization of the Oral Fungal Microbiome (Mycobiome) in Healthy Individuals. *PLoS Pathogens* 2010;6:e1000713–8. doi:10.1371/journal.ppat.1000713.
- [47] Charlson ES, Diamond JM, Bittinger K, Fitzgerald AS, Yadav A, Haas AR, et al. Lung-enriched Organisms and Aberrant Bacterial and Fungal Respiratory Microbiota after Lung Transplant. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186:536–45. doi:10.1164/rccm.201204-0693OC.
- [48] 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:e36313–4.

- doi:10.1371/journal.pone.0036313.
- [49] van Woerden HC, Gregory C, Brown R, Marchesi JR, Hoogendoorn B, Matthews IP. Differences in fungi present in induced sputum samples from asthma patients and non-atopic controls: a community based case control study. *BMC Infect Dis* 2013;13:1–1. doi:10.1186/1471-2334-13-69.
- [50] Mukherjee PK, Chandra J, Retuerto M, Sikaroodi M, Brown RE, Jurevic R, et al. Oral Mycobiome Analysis of HIV-Infected Patients: Identification of *Pichia* as an Antagonist of Opportunistic Fungi. *PLoS Pathogens* 2014;10:e1003996–17. doi:10.1371/journal.ppat.1003996.
- [51] Dupuy AK, David MS, Li L, Heider TN, Peterson JD, Montano EA, et al. Redefining the Human Oral Mycobiome with Improved Practices in Amplicon-based Taxonomy: Discovery of *Malassezia* as a Prominent Commensal. *PloS One* 2014;9:e90899–11. doi:10.1371/journal.pone.0090899.
- [52] Willger SD, Grim SL, Dolben EL, Shipunova A, Hampton TH, Morrison HG, et al. Characterization and quantification of the fungal microbiome in serial samples from individuals with cystic fibrosis. *Microbiome* 2014;2:1–15. doi:10.1186/2049-2618-2-40.
- [53] Cleland EJ, Bassioni A, Boase S, Dowd S, Vreugde S, Wormald P-J. The fungal microbiome in chronic rhinosinusitis: richness, diversity, postoperative changes and patient outcomes. *International Forum of Allergy & Rhinology* 2014;4:259–65. doi:10.1002/alr.21297.
- [54] Kramer R, Sauer-Heilborn A, Welte T, Guzman CA, Abraham W-R, Höfle MG. Cohort Study of Airway Mycobiome in Adult Cystic Fibrosis Patients: Differences in Community Structure between Fungi and Bacteria Reveal Predominance of Transient Fungal Elements. *J Clin Microbiol* 2015;53:2900–7. doi:10.1128/JCM.01094-15.
- [55] Cui L, Lucht L, Tipton L, Rogers MB, Fitch A, Kessinger C, et al. Topographic Diversity of the Respiratory Tract Mycobiome and Alteration in HIV and Lung Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2015;191:932–42. doi:10.1164/rccm.201409-1583OC.
- [56] Jung WH, Croll D, Cho JH, Kim YR, Lee YW. Analysis of the nasal vestibule mycobiome in patients with allergic rhinitis. *Mycoses* 2015;58:167–72. doi:10.1111/myc.12296.
- [57] Fraczek MG, Chishimba L, Niven RM, Bromley M, Simpson A, Smyth L, et al. Corticosteroid treatment is associated with increased filamentous fungal burden in allergic fungal disease. *J Allergy Clin Immunol* 2017;142:1–8. doi:10.1016/j.jaci.2017.09.039.
- [58] McTaggart LR, Copeland JK, Surendra A, Wang PW, Husain S, Coburn B, et al. Mycobiome Sequencing and Analysis Applied to Fungal Community Profiling of the Lower Respiratory Tract During Fungal Pathogenesis. *Frontiers in Microbiology* 2019;10:403. doi:10.3389/fmicb.2019.00512.
- [59] Santamaria M, Fosso B, Consiglio A, De Caro G, Grillo G, Licciulli F, et al. Reference databases for taxonomic assignment in metagenomics. *Briefings in Bioinformatics* 2012;13:682–95. doi:10.1093/bib/bbs036.
- [60] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* 2012;41:D590–6. doi:10.1093/nar/gks1219.
- [61] DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, et al. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology* 2006;72:5069–

72. doi:10.1128/AEM.03006-05.
- [62] Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, et al. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research* 2013;42:D633–42. doi:10.1093/nar/gkt1244.
- [63] Prakash PY, Irinyi L, Halliday C, Chen S, Robert V, Meyer W. Online Databases for Taxonomy and Identification of Pathogenic Fungi and Proposal for a Cloud-Based Dynamic Data Network Platform. *J Clin Microbiol* 2017;55:1011–24. doi:10.1128/JCM.02084-16.
- [64] Schoch CL, Robbertse B, Robert V, Vu D, Cardinali G, Irinyi L, et al. Finding needles in haystacks: linking scientific names, reference specimens and molecular data for Fungi. *Database* 2014;2014:1–21. doi:10.1093/database/bau061.
- [65] Ratnasingham S, Hebert PDN. bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Mol Ecol Notes* 2007;7:355–64. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x.
- [66] Kõljalg U, Nilsson RH, Abarenkov K, Tedersoo L, Taylor AFS, Bahram M, et al. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular Ecology* 2013;22:5271–7. doi:10.1111/mec.12481.
- [67] Irinyi L, Serena C, Garcia-Hermoso D, Arabatzis M, Desnos-Ollivier M, Vu D, et al. International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM)-ITS reference DNA barcoding database--the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi. *Medical Mycology* 2015;53:313–37. doi:10.1093/mmy/myv008.
- [68] Chao A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scand J Statist* 1984;11:265–70. doi:10.2307/4615964.
- [69] Chao A, Chiu C-H. Species richness: Estimation and Comparison. *Encyclopedia of Statistical Sciences* 2006:7907–16.
- [70] Shannon CE. A Mathematical Theory of Communication. *Bell System Technical Journal* 1948;27:379–423. doi:10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x.
- [71] Simpson. Measurement of diversity. *Nature* 1949;163:688–9.
- [72] Siegwald L. Solutions d'amélioration des études de métagénomique ciblée. Thèse de doctorat. (Université de Lille, France). 2017.
- [73] Bray JR, Curtis JT. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs* 1957;27:325–49. doi:10.2307/1942268.
- [74] Lozupone CA, Knight R. Species divergence and the measurement of microbial diversity. *FEMS Microbiol Rev* 2008;32:557–78. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00111.x.
- [75] White JR, Nagarajan N, Pop M. Statistical Methods for Detecting Differentially Abundant Features in Clinical Metagenomic Samples. *PLoS Comput Biol* 2009;5:e1000352–11. doi:10.1371/journal.pcbi.1000352.
- [76] Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* 2010;11:R106. doi:10.1186/gb-2010-11-10-r106.
- [77] Quereda JJ, Dussurget O, Nahori M-A, Ghoulane A, Volant S, Dillies M-A, et al. Bacteriocin from epidemic *Listeria* strains alters the host intestinal microbiota to favor infection. *Proc Natl Acad Sci* 2016;113:5706–11. doi:10.1073/pnas.1523899113.
- [78] Hamilos DL. Host-microbial interactions in patients with chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 2013;133:1–18. doi:10.1016/j.jaci.2013.06.049.
- [79] Ooi EH, Wormald P-J, Tan LW. Innate immunity in the paranasal sinuses: a review of nasal host defenses. *Am J Rhinol* 2008;22:13–9. doi:10.2500/ajr.2008.22.3127.
- [80] Ou J, Wang J, Xu Y, Tao Z-Z, Kong Y-G, Chen S-M, et al. *Staphylococcus aureus*

- superantigens are associated with chronic rhinosinusitis with nasal polyps: a meta-analysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2014;271:2729–36. doi:10.1007/s00405-014-2955-0.
- [81] Joss TV, Burke CM, Hudson BJ, Darling AE, Forer M, Alber DG, et al. Bacterial Communities Vary between Sinuses in Chronic Rhinosinusitis Patients. *Frontiers in Microbiology* 2016;6:151ra124–11. doi:10.3389/fmicb.2015.01532.
- [82] Choi EB, Hong SW, Kim DK, Jeon SG, Kim KR, Cho SH, et al. Decreased diversity of nasal microbiota and their secreted extracellular vesicles in patients with chronic rhinosinusitis based on a metagenomic analysis. *Allergy* 2014;69:517–26. doi:10.1111/all.12374.
- [83] Ramakrishnan VR, Hauser LJ, Frank DN. The sinonasal bacterial microbiome in health and disease. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery* 2016;24:20–5. doi:10.1097/MOO.0000000000000221.
- [84] Foreman A, Psaltis AJ, Tan LW, Wormald P-J. Characterization of bacterial and fungal biofilms in chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy* 2009;23:556–61. doi:10.2500/ajra.2009.23.3413.
- [85] Healy DY, Leid JG, Sanderson AR, Hunsaker DH. Biofilms with fungi in chronic rhinosinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2008;138:641–7. doi:10.1016/j.otohns.2008.02.002.
- [86] Ravi RK, Walton K, Khosroheidari M. MiSeq: A Next Generation Sequencing Platform for Genomic Analysis. In: Brand AC, MacCallum DM, editors. *Host-Fungus Interactions*, vol. 1706, New York, NY: Springer New York; 2018, pp. 223–32. doi:10.1007/978-1-4939-7471-9_12.
- [87] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 2010;7:335–6. doi:10.1038/nmeth.f.303.
- [88] Amir A, McDonald D, Navas-Molina JA, Kopylova E, Morton JT, Zech Xu Z, et al. Deblur Rapidly Resolves Single-Nucleotide Community Sequence Patterns. *mSystems* 2017;2:759–7. doi:10.1128/mSystems.00191-16.
- [89] Robert V, Vu D, Amor ABH, van de Wiele N, Brouwer C, Jabas B, et al. MycoBank gearing up for new horizons. *Imafungus* 2013;4:371–9. doi:10.5598/imafungus.2013.04.02.16.
- [90] Park S-C, Won S. Evaluation of 16S rRNA Databases for Taxonomic Assignments Using a Mock Community. *Genomics Inform* 2018;16:e24–4. doi:10.5808/GI.2018.16.4.e24.
- [91] Yarza P, Yilmaz P, Pruesse E, Glöckner FO, Ludwig W, Schleifer K-H, et al. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat Biotechnol* 2014;12:635–45. doi:10.1038/nrmicro3330.
- [92] Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 2014;15:31–21. doi:10.1186/s13059-014-0550-8.
- [93] Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Statist Soc* 1995;57:289–300. doi:10.2307/2346101.
- [94] Wesolowska-Andersen A, Bahl MI, Carvalho V, Kristiansen K, n TS-P, Gupta R, et al. Choice of bacterial DNA extraction method from fecal material influences community structure as evaluated by metagenomic analysis 2014;2:1–11. doi:10.1186/2049-2618-2-19.
- [95] D'Amore R, Ijaz UZ, Schirmer M, Kenny JG, Gregory R, Darby AC, et al. A comprehensive benchmarking study of protocols and sequencing platforms for 16S

- rRNA community profiling. *BMC Genomics* 2016;17:55–20. doi:10.1186/s12864-015-2194-9.
- [96] Frau A, Kenny JG, Lenzi L, Campbell BJ, Ijaz UZ, Duckworth CA, et al. DNA extraction and amplicon production strategies deeply influence the outcome of gut mycobiome studies. *Scientific Reports* 2019;9:1–17. doi:10.1038/s41598-019-44974-x.
- [97] Park SK, Kim DH. An Immunocompetent Patient with Isolated Cryptococcosis of the Nasal Cavity: Surgical Treatment without Systemic Antifungal Agents. *Aijcr* 2017;10:36–8. doi:10.5005/jp-journals-10013-1302.
- [98] Bjørnsgaard Aas A, Davey ML, Kausrud H. ITS all right mama: investigating the formation of chimeric sequences in the ITS2 region by DNA metabarcoding analyses of fungal mock communities of different complexities. *Mol Ecol Resour* 2016;17:730–41. doi:10.1111/1755-0998.12622.
- [99] Bokulich NA, Mills DA. Improved Selection of Internal Transcribed Spacer-Specific Primers Enables Quantitative, Ultra-High-Throughput Profiling of Fungal Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 2013;79:2519–26. doi:10.1128/AEM.03870-12.
- [100] Ihrmark K, Bödeker ITM, Cruz-Martinez K, Friberg H, Kubartova A, Schenck J, et al. New primers to amplify the fungal ITS2 region - evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiology Ecology* 2012;82:666–77. doi:10.1111/j.1574-6941.2012.01437.x.
- [101] Chowdhary A, Kathuria S, Agarwal K, Meis JF. Recognizing filamentous basidiomycetes as agents of human disease: A review. *Medical Mycology* 2014;52:782–97. doi:10.1093/mmy/myu047.
- [102] Premamalini T, Ambujavalli BT, Anitha S, Somu L, Kindo AJ. *Schizophyllum Communea* Causative Agent of Fungal Sinusitis: A Case Report. *Case Reports in Infectious Diseases* 2011;2011:1–4. doi:10.1155/2011/821259.
- [103] Delliere S, Rivero-Menendez O, Gautier C, Garcia-Hermoso D, Alastrey-Izquierdo A, Alanio A. Emerging mould infections: Get prepared to meet unexpected fungi in your patient. *Medical Mycology* 2019;30:1. doi:10.1093/mmy/myz039.
- [104] Anslan S, Nilsson RH, Wurzbacher C, Bahram M, Baldrian P, Tedersoo L. Great differences in performance and outcome of high-throughput sequencing data analysis platforms for fungal metabarcoding. *MycKeys* 2018;39:29–40. doi:10.3897/mycokeys.39.28109.
- [105] Stämmler F, Gläsner J, Hiergeist A, Holler E, Weber D, Oefner PJ, et al. Adjusting microbiome profiles for differences in microbial load by spike-in bacteria. *Microbiome* 2016;4:1–13. doi:10.1186/s40168-016-0175-0.
- [106] Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009;55:611–22. doi:10.1373/clinchem.2008.112797.
- [107] Etienne KA, Roe CC, Smith RM, Vallabhaneni S, Duarte C, Escadon P, et al. Whole-Genome Sequencing to Determine Origin of Multinational Outbreak of *Sarocladium kiliense* Bloodstream Infections. *Emerging Infectious Diseases* 2016;22:476–81. doi:10.3201/eid2203.151193.
- [108] Durbec M, Bienvenu AL, Picot S, Dubreuil C, Cosmidis A, Tringali S. Maxillary sinus fungal infection by *Acremonium*. *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases* 2011;128:41–3. doi:10.1016/j.anorl.2010.10.004.
- [109] Lusk RW. Diverse and Widespread Contamination Evident in the Unmapped Depths of High Throughput Sequencing Data. *PloS One* 2014;9:e110808–8. doi:10.1371/journal.pone.0110808.

- [110] Cenit M, Olivares M, Codoñer-Franch P, Sanz Y. Intestinal Microbiota and Celiac Disease: Cause, Consequence or Co-Evolution? *Nutrients* 2015;7:6900–23. doi:10.3390/nu7085314.
- [111] Krause R, Halwachs B, Thallinger GG, Klymiuk I, Gorkiewicz G, Hoenigl M, et al. Characterisation of *Candida* within the Mycobiome/Microbiome of the Lower Respiratory Tract of ICU Patients. *PloS One* 2016;11:e0155033–29. doi:10.1371/journal.pone.0155033.
- [112] Theelen B, Cafarchia C, Gaitanis G, Bassukas ID, Boekhout T, Dawson TL. *Malassezia* ecology, pathophysiology, and treatment. *Medical Mycology* 2018;56:S10–S25. doi:10.1093/mmy/myx134.
- [113] Ramage G, Rajendran R, Gutierrez-Correa M, Jones B, Williams C. *Aspergillus* biofilms: clinical and industrial significance. *FEMS Microbiol Lett* 2011;324:89–97. doi:10.1111/j.1574-6968.2011.02381.x.
- [114] Flemming H-C, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Biotechnol* 2016;14:563–75. doi:10.1038/nrmicro.2016.94.
- [115] Loussert C, Schmitt C, Prevost M-C, Balloy V, Fadel E, Philippe B, et al. In vivo biofilm composition of *Aspergillus fumigatus*. *Cellular Microbiology* 2010;12:405–10. doi:10.1111/j.1462-5822.2009.01409.x.
- [116] Morisse H, Heyman L, Salaün M, Favennec L, Picquenot JM, Bohn P, et al. In vivo molecular microimaging of pulmonary aspergillosis. *Medical Mycology* 2013;51:352–60. doi:10.3109/13693786.2012.729138.
- [117] Gravelat FN, Beauvais A, Liu H, Lee MJ, Snarr BD, Chen D, et al. *Aspergillus* Galactosaminogalactan Mediates Adherence to Host Constituents and Conceals Hyphal β -Glucan from the Immune System. *PLoS Pathogens* 2013;9:e1003575–17. doi:10.1371/journal.ppat.1003575.
- [118] Seidler MJ, Salvenmoser S, Muller FMC. *Aspergillus fumigatus* Forms Biofilms with Reduced Antifungal Drug Susceptibility on Bronchial Epithelial Cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2008;52:4130–6. doi:10.1128/AAC.00234-08.
- [119] Lee MJ, Liu H, Barker BM, Snarr BD, Gravelat FN, Abdallah Al Q, et al. The Fungal Exopolysaccharide Galactosaminogalactan Mediates Virulence by Enhancing Resistance to Neutrophil Extracellular Traps. *PLoS Pathogens* 2015;11:e1005187. doi:10.1371/journal.ppat.1005187.
- [120] Nørskov-Lauritsen N. Classification, identification, and clinical significance of *Haemophilus* and *Aggregatibacter* species with host specificity for humans. *Clin Microbiol Rev* 2014;27:214–40. doi:10.1128/CMR.00103-13.
- [121] Brook I. *Anaerobic Bacteria. Infectious Diseases. Fourth Edition*, Elsevier Ltd; 2017, pp. 1628–44. doi:10.1016/B978-0-7020-6285-8.00184-2.
- [122] Brook I. Recovery of aerobic and anaerobic bacteria in sinus fungal ball. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2011;145:851–2. doi:10.1177/0194599811417066.
- [123] Van Eldere J, Slack MP, Ladhani S, Cripps AW. Non-typeable *Haemophilus influenzae*, an under-recognised pathogen. *Lancet Infect Dis* 2014:1–12. doi:10.1016/S1473-3099(14)70734-0.
- [124] Gaillot O. Rapport d'activités du C.N.R. *Haemophilus influenzae*. 2014.
- [125] Vitovski S, Dunkin KT, Howard AJ, Sayers JR. Nontypeable *Haemophilus influenzae* in carriage and disease: a difference in IgA1 protease activity levels. *Jama* 2002;287:1699–705. doi:10.1001/jama.287.13.1699.
- [126] Clancy RL, Dunkley M. Acute Exacerbations in COPD and Their Control with Oral Immunization with Non-Typeable *Haemophilus Influenzae*. *Front Immunol*

- 2011;2:1–6. doi:10.3389/fimmu.2011.00007.
- [127] Jalalvand F, Riesbeck K. *Haemophilus influenzae*. *Current Opinion in Infectious Diseases* 2014;27:268–74. doi:10.1097/QCO.0000000000000056.
- [128] Abman SH, Ogle JW, Harbeck RJ, Butler-Simon N, Hammond KB, Accurso FJ. Early bacteriologic, immunologic, and clinical courses of young infants with cystic fibrosis identified by neonatal screening. *J Pediatr* 1991;119:211–7. doi:10.1016/s0022-3476(05)80729-2.
- [129] Boase S, Jervis-Bardy J, Cleland E, Pant H, Tan L, Wormald P-J. Bacterial-induced epithelial damage promotes fungal biofilm formation in a sheep model of sinusitis. *International Forum of Allergy & Rhinology* 2013;3:341–8. doi:10.1002/alr.21138.
- [130] Wajima T, Anzai Y, Yamada T, Ikoshi H, Noguchi N. *Oldenlandia diffusa* Extract Inhibits Biofilm Formation by *Haemophilus influenzae* Clinical Isolates. *PloS One* 2016;11:e0167335–10. doi:10.1371/journal.pone.0167335.
- [131] Melloul E, Roisin L, Durieux M-F, Woerther P-L, Jenot D, Risco V, et al. Interactions of *Aspergillus fumigatus* and *Stenotrophomonas maltophilia* in an in vitro Mixed Biofilm Model: Does the Strain Matter? *Frontiers in Microbiology* 2018;9:2850. doi:10.3389/fmicb.2018.02850.
- [132] Briard B, Mislin GLA, Latgé J-P, Beauvais A. Interactions between *Aspergillus fumigatus* and Pulmonary Bacteria: Current State of the Field, New Data, and Future Perspective. *J Fungi* 2019;5:48–20. doi:10.3390/jof5020048.

ANNEXES

Annexe 1. Table d'OTUs fongique obtenue après analyse des données de séquençage (portion de la table uniquement, à titre d'exemple)

superkingdom	phylum	class	order	family	genus	species	adn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreales	Acremonium		GCATCGATGAAGAA	0	0	0	0	139	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	Alternaria		GCATCGATGAAGAA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	146	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	Alternaria		GCATCGATGAAGAA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	279	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus flavus	GCATCGATGAAGAA	2	3	6	0	0	5	42315	2	0	85	37205	0	2	5	2	2	0	6	2
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus flavus	CATCGATGAGAAC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	319	0	0	0	0	0	0	0	0
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus flavus	GCATCGATGAGAAC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus fumigatus	CTTGGCTATTAGAC	0	8	5	0	10	7	0	0	0	0	2	0	0	3	10	0	0	3	0
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus fumigatus	TCCTCCGCTATTGG	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	53	0	0	0	0	0	0	0	0
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus fumigatus	GCTCGATGAAGAAC	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus fumigatus	GCATCGATGAAGAA	27844	49740	12971	41482	44381	45698	14	15	12093	13376	6	28441	21	37090	7	44	34847	40311	39725
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus fumigatus	CATCGATGAAGAAC	500	0	51	0	80	2455	0	0	241	0	0	0	0	2180	0	0	565	0	103
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus fumigatus	GCACGATGAAGAAC	35	102	18	79	72	0	0	1	22	0	18	44	0	0	0	0	24	80	67
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus fumigatus	GCATCGATGAAGAC	0	0	0	118	0	52	0	0	36	0	0	0	106	0	0	0	91	0	0
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus fumigatus	TCCTCCGCTATTGG	6	80	4	5	20	10	0	3	2	0	0	0	7	0	0	10	2	11	
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus fumigatus	CTTGGCTATTAGAC	28	23	3	28	22	27	2	1	5	0	3	14	8	11	0	0	9	9	2
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus fumigatus	GCATCGATGAGAAC	0	0	15	0	0	81	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus fumigatus	GCATCGATGAAGAAC	15	0	8	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	32	23	0
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus fumigatus	GCATCGATGAAGAAC	6	50	3	0	5	0	0	0	0	0	9	0	6	0	0	0	0	0	15
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus fumigatus	GCATCGATGAAGAAC	0	41	0	0	2	0	0	0	0	0	10	0	2	0	0	0	0	0	5
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus fumigatus	GCATCGATGAAGAA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus fumigatus	GCATCGATGAAGAAC	0	28	12	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus fumigatus	GCATCGATTAGAC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus fumigatus	CTTGGCTATTAGAC	0	0	0	0	0	0	0	11	1	0	0	0	7	0	0	8	0	0	0
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus fumigatus	GCATCGATGAAGAA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus fumigatus	GATGAAGAACGACG	2	4	0	4	0	4	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus fumigatus	GCATCGAAGAAC	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus fumigatus	GCATCGATGAAGAA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	0	29	0	0
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus fumigatus	GCATCGATGAAGAA	0	31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus fumigatus	GCATGAGAACGCA	0	3	2	4	3	0	0	0	0	0	0	4	0	1	0	0	0	0	4
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus fumigatus	GCATCGATGAAGAA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus fumigatus	GCATCGATGAAGAAC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus fumigatus	GCATCGATGAAGAA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24	0	5
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus fumigatus	GCATCGATGAAGAAC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus fumigatus	GCATCGATGAAGAAC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus fumigatus	GCATCGATGAAGAAC	2	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	3	0
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus fumigatus	GCAGAAGAACGACG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus nidulans	GCATCGATGAAGAA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2772	0	0	5299	0	0
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus nidulans	GCATCGATGAAGAA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus sydowii	TCCTCCGCTATTGG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus sydowii	GCACGATGAAGAAC	0	0	0	0	0	59	0	0	0	0	40	0	0	0	0	0	0	0	0
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus fumigatus	GCATCGATGAAGAA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	136	0	0	0	0	0	
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus fumigatus	GCATCGATGAAGAAC	0	0	0	0	0	0	27	0	0	0	13	0	0	0	0	0	0	0	
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus fumigatus	CATCGATGAAGAAC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	59	0	0	0	0	
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus fumigatus	GCACGATGAAGAAC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus fumigatus	GCATCGATGAAGAAC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27	0	0	0	0	0	0	0	
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus fumigatus	GCATCGATGAAGAAC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	22	0	0	
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus fumigatus	GCATCGATGAAGAAC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus fumigatus	GCACGATGAAGAAC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus fumigatus	GCATCGATGAAGAA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	14	0	0	
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Aspergillaceae	Aspergillus	Aspergillus fumigatus	GCATCGATGAAGAA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Polyporales	Meruliaceae	Bjerkandera	Bjerkandera adusta	GCATCGATGAAGAAC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Polyporales	Meruliaceae	Bjerkandera	Bjerkandera adusta	CATCGATGAAGAAC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Fungi	Ascomycota	Leotiomycetes	Helotiales	Sclerotiniaceae	Botrytis		GCATCGATGAAGAA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	182	0	0	27	
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotales	Thermosaccaceae	Byssoschlamys		GCATCGATGAAGAA																			

Analyse du microbiome fongique et bactérien dans les sinusites fongiques chroniques

L'examen direct (ED) des balles fongiques sinusiennes montre systématiquement des filaments mais la culture reste négative dans 70% des cas pouvant être la conséquence d'interactions microbiennes inhibant la croissance du champignon. L'objectif est d'évaluer, par métagénomique ciblée, la diversité du microbiome fongique et bactérien dans des biopsies sinusiennes de balles fongiques et de rechercher d'éventuelles associations microbiennes. L'ADN total a été extrait à partir de 44 biopsies sinusiennes, de 44 patients opérés pour sinusites chroniques entre 2015 et 2017. Les loci fongique ITS2 et de l'ARN 16S bactérien ont été amplifiés et séquencés (MiSeq™ Illumina). Une analyse de la diversité microbienne a été réalisée via le pipeline QIIME à partir des bases de données UNITE et SILVA pour ITS et 16S, respectivement. Ces données ont été comparées aux données microbiologiques et cliniques. Parmi ces 44 patients, 37 avait une balle fongique sinusienne (cas) et 7 avaient une sinusite chroniques sans étiologie fongique (témoins). L'ED et la culture étaient positifs dans 97,2% et 32,4% respectivement chez les cas. L'analyse métagénomique a mis en évidence 56 taxa fongiques et 122 taxa bactériens. Une analyse en coordonnées principales (distance de Bray-Curtis; permanova test) montre que les profils de diversité microbienne étaient différents entre cas et témoins ($p < 0,001$ et $p = 0,005$ respectivement). *Aspergillus* était le genre majoritaire (89,2%). Le taxon bactérien *Haemophilus* était sur-représenté chez les cas ($p < 0,001$). La physiopathologie des balles fongiques est encore mal comprise et pourrait résulter de l'interaction entre bactéries et champignons au sein d'un biofilm.

Rhinosinusites chroniques; Balles fongiques; Microbiome; Mycobiome; *Aspergillus*; *Haemophilus*

Analysis of fungal and bacterial microbiome in chronic fungal rhinosinuitis

In fungal ball rhinosinuitis, fungal hyphae are observed on direct examination (DE) of biopsy samples but culture remains negative in most cases. This could be the result of microbial interactions weakening the fungus. The aim of this study was to describe and analyze bacterial and fungal microbiota by targeted metagenomics in fungal balls and find possible microbial. A total of 44 sinus biopsies were studied from 44 patients who underwent surgery for chronic rhinosinuitis from 2015 to 2017 in Paris. DNA was extracted and fungal ITS2 loci and bacterial V3-V4 16S ribosomal DNA locus were amplified and sequenced (MiSeq™ Illumina). Microbial diversity was analyzed with QIIME, associated with UNITE and SILVA databases for ITS and 16S, respectively. These data were compared to microbiological and clinical data. Among these 44 patients, 37 had fungal balls and 7 had non-fungal chronic rhinosinuitis (controls). Among the 37 fungal balls, DE and culture were positive for fungi in 97.2% and 32.4% of biopsies, respectively. Targeted metagenomic analysis yielded 56 fungal taxa and 122 bacterial taxa. Using principal coordinate analysis (Bray-Curtis distance; permanova test), a significantly different bacterial and fungal metagenomic profiles in patients with fungal balls compare to controls was found ($p = 0.047$ and $p < 0.001$, respectively). *Aspergillus* was predominantly identified in 89.2% of fungal balls. One bacterial taxon, *Haemophilus*, was significantly over-represented in patients with fungal balls compared to controls ($p < 0.001$). Fungal balls pathogenesis remains unclear and could result from microbial interactions between fungi and bacteria in mixed biofilm-like structure.

Chronic rhinosinuitis; Fungal ball; Microbiome; Mycobiome; *Aspergillus*; *Haemophilus*

Université Paris Descartes - Faculté de Médecine Paris Descartes
15, rue de l'École de Médecine - 75270 Paris cedex 06