



HAL
open science

Mise au point d'une technique de séquençage pour l'identification fongique

Émilie Simon

► **To cite this version:**

Émilie Simon. Mise au point d'une technique de séquençage pour l'identification fongique. Sciences pharmaceutiques. 2020. dumas-03213063

HAL Id: dumas-03213063

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03213063v1>

Submitted on 30 Apr 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.

UNIVERSITE DE ROUEN NORMANDIE
UFR SANTE – Département PHARMACIE

Année 2020

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE
BIOLOGIE MÉDICALE

Présentée et soutenue publiquement le 1^{er} octobre 2020

Par SIMON Emilie

Née le 18/05/1992 à Paris

MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE SEQUENÇAGE
POUR L'IDENTIFICATION FONGIQUE

Président du jury et co-directeur : Mr le Professeur FAVENNEC Loïc, PUPH Doyen de la section pharmacie de l'UFR Santé de Rouen

Directeur de thèse : Mr le Docteur COSTA Damien, AHU

Membres du jury : Mme le Professeur GUEUDRY Julie, PUPH
Mme le Docteur GIROT Hélène, PH

Remerciements

Au Professeur Loïc FAVENNEC,

Pour m'avoir fait le grand honneur de présider ce jury de thèse. Merci pour les connaissances qu'il m'a apportées tout au long de mon cursus et pour la convivialité qu'il a su instaurer durant toutes ces années. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Au Docteur Damien COSTA,

Mon directeur de thèse, pour la bienveillance et la disponibilité dont il a fait preuve tout au long de ce projet. Pour son implication, sa gentillesse et pour m'avoir apporté une aide de loin non négligeable grâce à ses relectures. De manière plus générale, un grand merci pour sa bonne humeur communicative !

Au Docteur Hélène GIROT,

Pour avoir accepté de juger ce travail et surtout pour m'avoir fait généreusement part de ses connaissances ces derniers semestres, tant au niveau analytique que méthodologique. La qualité n'a (presque) plus de secrets pour moi ! Merci également pour sa gentillesse et sa disponibilité.

Au Professeur Julie GUEUDRY,

Pour m'avoir fait l'honneur de porter un jugement sur ce travail. Veuillez accepter ma reconnaissance et mes remerciements les plus sincères.

À l'ensemble des membres du laboratoire de Parasitologie / Mycologie du CHU de Rouen et de l'équipe de recherche, pour m'avoir chaleureusement accueillie et aider lors de ma formation et de mes expérimentations.

À toute l'équipe du laboratoire du CH de Dieppe pour leur soutien et pour m'avoir permis de finaliser ce projet ; travailler à vos côtés est un réel plaisir. Veuillez trouver ici toute ma gratitude et ma profonde sympathie.

Tout au long de ma formation, j'ai aussi pu m'appuyer sur le soutien de mes proches. Pour cela, je tiens à remercier ma famille et particulièrement ma grand-mère, mon père et ma cousine Sarah. Enfin je voudrais remercier tout spécialement William pour son aide et son soutien sans faille au cours de ces derniers mois.

L'Université de Rouen et l'UFR de Médecine et de Pharmacie de Rouen n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans cette thèse. Ces opinions sont propres à leurs auteurs.

ANNEE UNIVERSITAIRE 2019 - 2020

U.F.R. SANTÉ DE ROUEN

DOYEN : **Professeur Benoît VEBER**

ASSESEURS : **Professeur Michel GUERBET**
Professeur Agnès LIARD
Professeur Guillaume SAVOYE

I - MEDECINE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mr Frédéric ANSELME	HCN	Cardiologie
Mme Gisèle APTER	Havre	Pédopsychiatrie
Mme Isabelle AUQUIT AUCKBUR	HCN	Chirurgie plastique
Mr Jean-Marc BASTE	HCN	Chirurgie Thoracique
Mr Fabrice BAUER	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya BEKRI	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Ygal BENHAMOU	HCN	Médecine interne
Mr Jacques BENICHOU	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mr Olivier BOYER	UFR	Immunologie
Mme Sophie CANDON	HCN	Immunologie
Mr François CARON	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe CHASSAGNE	HCN	Médecine interne (gériatrie)
Mr Vincent COMPERE	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Jean-Nicolas CORNU	HCN	Urologie
Mr Antoine CUVELIER	HB	Pneumologie
Mr Jean-Nicolas DACHER	HCN	Radiologie et imagerie médicale
Mr Stéfan DARMONI	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
Mr Pierre DECHELOTTE	HCN	Nutrition
Mr Stéphane DERREY	HCN	Neurochirurgie
Mr Frédéric DI FIORE	CHB	Cancérologie

Mr Fabien DOGUET	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire
Mr Jean DOUCET	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie
Mr Bernard DUBRAY	CHB	Radiothérapie
Mr Frank DUJARDIN	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologique
Mr Fabrice DUPARC	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mr Eric DURAND	HCN	Cardiologie
Mr Bertrand DUREUIL	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène ELTCHANINOFF	HCN	Cardiologie
Mr Manuel ETIENNE	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Thierry FREBOURG	UFR	Génétique
Mr Pierre FREGER (<i>surnombre</i>)	HCN	Anatomie - Neurochirurgie
Mr Jean François GEHANNO	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel GERARDIN	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille GERARDIN	HCN	Pédopsychiatrie
M. Guillaume GOURCEROL	HCN	Physiologie
Mr Dominique GUERROT	HCN	Néphrologie
Mr Olivier GULLIN	HCN	Psychiatrie Adultes
Mr Claude HOUDAYER	HCN	Génétique
Mr Fabrice JARDIN	CHB	Hématologie
Mr Luc-Marie JOLY	HCN	Médecine d'urgence
Mr Pascal JOLY	HCN	Dermato – Vénérologie
Mme Bouchra LAMIA	Havre	Pneumologie
Mme Annie LAQUERRIERE	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent LAUDENBACH	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Joël LECHEVALLIER	HCN	Chirurgie infantile
Mr Hervé LEFEBVRE	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry LEQUERRE	HCN	Rhumatologie
Mme Anne-Marie LEROI	HCN	Physiologie
Mr Hervé LEVESQUE	HCN	Médecine interne
Mme Agnès LIARD-ZMUDA	HCN	Chirurgie Infantile
Mr Pierre Yves LITZLER	HCN	Chirurgie cardiaque
Mr Bertrand MACE	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. David MALTETE	HCN	Neurologie
Mr Christophe MARGUET	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle MARIE	HCN	Médecine interne
Mr Jean-Paul MARIE	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Loïc MARPEAU	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Stéphane MARRET	HCN	Pédiatrie

Mme Véronique MERLE	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre MICHEL	HCN	Hépatogastro-entérologie
M. Benoit MISSET (<i>détachement</i>)	HCN	Réanimation Médicale
Mr Marc MURAINÉ	HCN	Ophthalmologie
Mr Christophe PEILLON	HCN	Chirurgie générale
Mr Christian PFISTER	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe PLANTIER	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier PLISSONNIER	HCN	Chirurgie vasculaire
Mr Gaëtan PREVOST	HCN	Endocrinologie
Mr Jean-Christophe RICHARD (<i>détachement</i>)	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Vincent RICHARD	UFR	Pharmacologie
Mme Nathalie RIVES	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Horace ROMAN (<i>disponibilité</i>)	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe SABOURIN	HCN	Anatomie – Pathologie
Mr Mathieu SALAUN	HCN	Pneumologie
Mr Guillaume SAVOYE	HCN	Hépatogastrologie
Mme Céline SAVOYE-COLLET	HCN	Imagerie médicale
Mme Pascale SCHNEIDER	HCN	Pédiatrie
Mr Lilian SCHWARZ	HCN	Chirurgie Viscérale et Digestive
Mr Michel SCOTTE	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne TAMION	HCN	Thérapeutique
Mr Luc THIBERVILLE	HCN	Pneumologie
Mr Hervé TILLY (<i>surnombre</i>)	CHB	Hématologie et transfusion
M. Gilles TOURNEL	HCN	Médecine Légale
Mr Olivier TROST	HCN	Chirurgie Maxillo-Faciale
Mr Jean-Jacques TUECH	HCN	Chirurgie digestive
Mr Benoît VEBER	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre VERA	CHB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric VERIN	Les Herbiers	Médecine Physique et de Réadaptation
Mr Eric VERSPYCK	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier VITTECOQ	HC	Rhumatologie
Mme Marie-Laure WELTER	HCN	Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme Najate ACHAMRAH	HCN	Nutrition
Mme Noëlle BARBIER-FREBOURG	HCN	Bactériologie – Virologie
Mr Emmanuel BESNIER	HCN	Anesthésiologie - Réanimation
Mme Carole BRASSE LAGNEL	HCN	Biochimie
Mme Valérie BRIDOUX HUYBRECHTS	HCN	Chirurgie Vasculaire
Mr Gérard BUCHONNET	HCN	Hématologie
Mme Mireille CASTANET	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie CHASTAN	HCN	Neurophysiologie
Mr Moïse COEFFIER	HCN	Nutrition
Mr Serge JACQUOT	UFR	Immunologie
Mr Joël LADNER	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste LATOUCHE	UFR	Biologie cellulaire
M. Florent MARGUET	HCN	Histologie
Mme Chloé MELCHIOR	HCN	Gastroentérologie
Mr Thomas MOUREZ (<i>détachement</i>)	HCN	Virologie
Mr Gaël NICOLAS	UFR	Génétique
Mme Muriel QUILLARD	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mme Laëtitia ROLLIN	HCN	Médecine du Travail
Mme Pascale SAUGIER-VEBER	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire TOBENAS-DUJARDIN	HCN	Anatomie
Mr David WALLON	HCN	Neurologie
Mr Julien WILS	HCN	Pharmacologie

PROFESSEUR AGREGÉ OU CERTIFIÉ

Mr Thierry WABLE	UFR	Communication
Mme Mélanie AUVRAY-HAMEL	UFR	Anglais

II - PHARMACIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Mr Jérémy BELLIEN (PU-PH)	Pharmacologie
Mr Thierry BESSON	Chimie Thérapeutique
Mr Jean COSTENTIN (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Abdelhakim EL OMRI	Pharmacognosie
Mr François ESTOUR	Chimie Organique
Mr Loïc FAVENNEC (PU-PH)	Parasitologie
Mr Jean Pierre GOULLE (Professeur émérite)	Toxicologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mme Christelle MONTEIL	Toxicologie
Mme Martine PESTEL-CARON (PU-PH)	Microbiologie
Mr Rémi VARIN (PU-PH)	Pharmacie clinique
Mr Jean-Marie VAUGEUIS	Pharmacologie
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et Minérale
Mr Frédéric BOUNOURE	Pharmacie Galénique
Mr Thomas CASTANHEIRO-MATIAS	Chimie Organique
Mr Abdeslam CHAGRAOUI	Physiologie
Mme Camille CHARBONNIER (LE CLEZIO)	Statistiques
Mme Elizabeth CHOSSON	Botanique
Mme Marie Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Cécile CORBIERE	Biochimie
Mme Nathalie DOURMAP	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUC	Pharmacologie
Mme Dominique DUTERTE- BOUCHER	Pharmacologie
Mr Gilles GARGALA (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Nejla EL GHARBI-HAMZA	Chimie analytique
Mme Marie-Laure GROULT	Botanique

Mr Hervé HUE	Biophysique et mathématiques
Mme Hong LU	Biologie
Mme Marine MALLETER	Toxicologie
M. Jérémie MARTINET (MCU-PH)	Immunologie
Mme Tiphaine ROGEZ-FLORENT	Chimie analytique
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Malika SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Christine THARASSE	Chimie thérapeutique
Mr Frédéric ZIEGLER	Biochimie

PROFESSEURS ASSOCIES

Mme Cécile GUERARD-DETUNCQ	Pharmacie officinale
Mme Caroline BERTOUX	Pharmacie

PAU-PH

M. Mikaël **DAOUPHARS**

PROFESSEUR CERTIFIE

Mme Mathilde GUERIN	Anglais
----------------------------	---------

ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES

Mme Alice MOISAN	Virologie
M. Henri GONDÉ	Pharmacie

ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

M. Abdel MOUHJIR	Parasitologie
M. Maxime GRAND	Bactériologie

ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT

Mme Ramla SALHI	Pharmacognosie
------------------------	----------------

LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et minérale
Mr Thierry BESSON	Chimie thérapeutique
Mr Abdeslam CHAGRAOUI	Physiologie
Mme Elisabeth CHOSSON	Botanique
Mme Marie-Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation et économie de la santé
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Abdelhakim EL OMRI	Pharmacognosie
Mr François ESTOUR	Chimie organique
Mr Loïc FAVENNEC	Parasitologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mme Martine PESTEL-CARON	Microbiologie
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mr Rémi VARIN	Pharmacie clinique
M. Jean-Marie VAUGEOIS	Pharmacologie
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

III – MEDECINE GENERALE

PROFESSEUR MEDECINE GENERALE

Mr Jean-Loup **HERMIL** (PU-MG) UFR Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCE MEDECINE GENERALE

Mr Matthieu **SCHUERS** (MCU-MG) UFR Médecine générale

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTE

Mr Emmanuel **LEFEBVRE** UFR Médecine Générale

Mme Elisabeth **MAUVIARD** UFR Médecine générale

Mr Philippe **NGUYEN THANH** UFR Médecine générale

Mme Yveline **SEVRIN** UFR Médecine générale

Mme Marie Thérèse **THUEUX** UFR Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTES

Mr Pascal **BOULET** UFR Médecine générale

Mme Laëtitia **BOURDON** UFR Médecine Générale

Mr Emmanuel **HAZARD** UFR Médecine Générale

Mme Lucile **PELLERIN** UFR Médecine générale

ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

PROFESSEURS

Mr Paul MULDER (phar)	Sciences du Médicament
Mme Su RUAN (med)	Génie Informatique

MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sahil ADRIOUCH (med)	Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)
Mme Gaëlle BOUGEARD-DENOYELLE (med)	Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)
Mme Carine CLEREN (med)	Neurosciences (Néovasc)
M. Sylvain FRAINEAU (med)	Physiologie (Inserm U 1096)
Mme Pascaline GAILDRAT (med)	Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)
Mr Nicolas GUEROUT (med)	Chirurgie Expérimentale
Mme Rachel LETELLIER (med)	Physiologie
Mr Antoine OUVRARD-PASCAUD (med)	Physiologie (Unité Inserm 1076)
Mr Frédéric PASQUET	Sciences du langage, orthophonie
Mme Christine RONDANINO (med)	Physiologie de la reproduction
Mr Youssan Var TAN	Immunologie
Mme Isabelle TOURNIER (med)	Biochimie (UMR 1079)

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique DELAFONTAINE

HCN - Hôpital Charles Nicolle

HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME

CB - Centre Henri Becquerel

CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray

CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation

SJ - Saint Julien Rouen

Table des matières

Table des matières	14
Liste des tableaux.....	17
Liste des figures.....	19
Liste des abréviations	21
I. Introduction	23
II. Généralités	25
1. Bilan annuel.....	25
2. Classification	26
2.1. Zygomycota.....	28
2.2. Ascomycota.....	28
2.3. Basidiomycota.....	29
3. Identification fongique.....	29
3.1. Conditions de culture mycologique	30
3.2. Aspect macroscopique	31
3.3. Aspect microscopique	31
3.4. Identification par MALDI/TOF	33
3.4.1 Méthodologie et principe de fonctionnement du MALDI/TOF	33
3.5. Génétique moléculaire	34
3.5.1 Généralités sur l'amplification génique	34
3.5.2 Séquençage.....	35
3.5.3 Méthodologie et principe du séquençage par méthode Sanger	35

4.	Analyse bibliographique	37
4.1.	ADN ribosomal et région ITS.....	38
4.2.	Code-barres fongique.....	40
4.3.	Limites de la région ITS et marqueurs secondaires	42
4.3.1	Région TEF1-alpha.....	44
4.4.	Identification au rang d'espèce.....	44
5.	Objectif de la thèse	46
III.	Matériel et méthode	47
1.	Souches.....	47
2.	Conditions de culture et préparation des échantillons.....	47
3.	Technique MALDI/TOF.....	48
4.	Extraction des échantillons en vue du séquençage	48
4.1.	Extraction par technique PowerFecal.....	48
4.2.	Extraction en EZ1.....	49
5.	Amplification des extraits par PCR.....	49
6.	Révélation des amplicons.....	51
7.	Purification et PCR séquence.....	51
7.1.	Purification post PCR séquence.....	52
8.	Séquençage	52
9.	Évaluation des performances de sensibilité de la technique.....	53
IV.	Résultats	54
1.	Bilan des identifications fongiques par technique MALDI/TOF	54
2.	Évaluation des techniques d'extraction	56

3. Tests de la limite de détection	57
4. Optimisation de l'étape de PCR séquence	59
5. Comparaison des identifications par MALDI/TOF et du séquençage de la région ITS.....	61
6. Identification des souches non identifiées par MALDI/TOF.....	63
6.1. Première intention : séquençage de la région ITS	63
6.2. Seconde intention : séquençage des régions LSU et TEF1-alpha.....	69
6.2.1 Séquençage de la région LSU	70
6.2.2 Séquençage de la région TEF1-alpha	71
7. Comparaison des identifications par séquençage de la région ITS avec les régions LSU et TEF1-alpha.....	72
8. Contexte clinique et pathogénicité.....	74
V. Discussion	78
VI. Conclusion	92
VII. Annexes.....	93
VIII. Références	114

Liste des tableaux

Tableau I : Liste des prélèvements reçus pour culture mycologique en 2019 au laboratoire de Mycologie du CHU de Rouen	25
Tableau II : Exemples de genres de champignons appartenant au phylum des Ascomycètes, Basidiomycètes et Zygomycètes retrouvés en clinique	27
Tableau III : Conditions d'incubation des cultures et modalités de lecture des champignons d'intérêt médical	31
Tableau IV : Amorces utilisées pour évaluer les performances de nouvelles amorces conçues dans l'article de Stielow et al. 2015.....	43
Tableau V : Tableau récapitulatif des couples d'amorces pouvant être utilisés pour l'identification fongique.	45
Tableau VI : Mélange réactionnel pour amplification par PCR.....	49
Tableau VII : Couples d'amorces utilisés.....	50
Tableau VIII : Constituants du mix PCR séquence.....	51
Tableau IX : Identifications fongiques réalisées par spectrométrie MALDI/TOF « filamenteux » sur l'année 2019.....	55
Tableau X : Résultats du séquençage des souches de référence de <i>C. albicans</i> et d' <i>A. fumigatus</i> avec les amorces ITS 1 ou ITS 4 après extraction en EZ1 15min.	57
Tableau XI : Limites de détection en UFC/ml selon deux types d'extraction pour trois couples d'amorces. Réalisées à partir de souches de référence de <i>C. albicans</i> et d' <i>A. fumigatus</i>	59
Tableau XII : Résultats du séquençage de huit souches pour comparaison des amorces sens (ITS1) et anti-sens (ITS4) utilisées à l'étape de PCR séquence. 60	

Tableau XIII : Comparaison de l'identification de plusieurs levures par technique MALDI/TOF versus séquençage de la région ITS (identification sur le site NCBI blastn).....	62
Tableau XIV : Identifications des 53 échantillons, non identifiés par technique MALDI/TOF, réalisées après séquençage de la région ITS et concordance avec l'aspect macroscopique et microscopique.....	65
Tableau XV : Identifications des échantillons 1, 18, 19, 21, 24 et 42 après séquençage de la région LSU.	70
Tableau XVI : Identifications des échantillons 1, 18, 19, 21, 24 et 42 après séquençage de la région TEF1-alpha	71
Tableau XVII : Identifications des échantillons 7, 11, 12, 15, 20, 23, 27, 34 et des souches de référence <i>C. albicans</i> (CA) et <i>A. fumigatus</i> (AF) réalisées avec les amorces LROR/LR5 (LSU) et concordance avec l'identification via la région ITS	73
Tableau XVIII : Identifications des échantillons 7, 11, 12, 15, 20, 23, 27, 34 et des souches de référence <i>C. albicans</i> (CA) et <i>A. fumigatus</i> (AF) réalisées avec les amorces EF1-1018F/EF1-1620R (TEF1-alpha) et concordance avec l'identification via la région ITS	74
Tableau XIX : Liste des identifications obtenues avec le séquençage des régions ITS et/ou LSU et TEF1-alpha, contexte clinique et revue bibliographique de la pathogénicité des souches.....	76

Liste des figures

Figure 1 : Répartition des différents types de prélèvements avec culture mycologique reçus en 2019 au laboratoire de Mycologie du CHU de Rouen	26
Figure 2 : Exemple de zygomycète	28
Figure 3 : Exemples d'ascomycètes	29
Figure 4 : Empreinte sur cellophane adhésive	32
Figure 5 : Aspects macroscopiques et microscopiques de divers champignons filamenteux	32
Figure 6 : Schéma du fonctionnement d'un automate de type MALDI/TOF	34
Figure 7 : Principe de fonctionnement du séquençage par électrophorèse capillaire	36
Figure 8 : Opéron du gène d'ARNr fongique avec emplacement des amorces ITS1/ITS4 et LROR/LR5.....	39
Figure 9 : Illustration du "barcode gap".....	41
Figure 10 : Structure du gène TEF1-alpha avec emplacement des amorces EF1-1018F/EF1-1620R.....	44
Figure 11 : Protocole PCR utilisé pour les amorces ITS1/ITS4 et LROR/LR5	50
Figure 12 : Protocole PCR utilisé pour les amorces EF1-1018F/EF1-1620R.....	50
Figure 13 : Protocole de la PCR Séquence.....	52
Figure 14 : Exemple de séquence ADN de qualité satisfaisante.....	53
Figure 15 : Révélation sur gel d'agarose de l'amplification par PCR (amorces ITS1/ITS4) de souches de <i>Candida albicans</i> (CA) et d' <i>Aspergillus fumigatus</i> (AF).....	56
Figure 16 : Limites de détection des PCR sur les souches de référence de <i>Candida albicans</i> et <i>Aspergillus fumigatus</i> selon 2 types d'extraction (EZ1 et PowerFecal)	

pour les 3 couples d'amorces suivants : ITS1/ITS4, LROR/LR5 et EF1-1018F/EF1-1620R.....	58
Figure 17 : Révélation sur gel d'agarose de l'amplification par PCR (amorces ITS1/ITS4) de huit souches différentes	60
Figure 18 : Révélation sur gel d'agarose de l'amplification par PCR (amorces ITS1/ITS4) de souches de <i>Candida</i> sp. et autres levures	61
Figure 19 : Révélation de l'amplification sur gel d'agarose des échantillons 1 à 9 après PCR ITS, réalisés à partir de bouillons congelés	63
Figure 20 : Révélation de l'amplification sur gel d'agarose des échantillons 10 à 53 après PCR ITS1/ITS4.....	64
Figure 21 : Liste des dix premiers résultats d'identification de l'échantillon 1 sur le site NCBI blastn	67
Figure 22 : Liste des quinze premiers résultats d'identification de l'échantillon 18 sur le site NCBI blastn.....	67
Figure 23 : Liste des dix premiers résultats d'identification de l'échantillon 24 sur le site NCBI blastn.....	68
Figure 24 : Liste des dix premiers résultats d'identification de l'échantillon 48 sur le site NCBI blastn.....	68
Figure 25 : Liste des dix premiers résultats d'identification de l'échantillon 52 sur le site NCBI blastn.....	69
Figure 26 : Révélation de l'amplification sur gel d'agarose des échantillons 1, 18, 19, 21, 24 et 42 après PCR LSU et TEF1-alpha.	70
Figure 27 : Révélation de l'amplification sur gel d'agarose des échantillons 7, 11, 12, 15, 20, 23, 27, 34 et des souches de référence <i>C. albicans</i> (CA) et <i>A. fumigatus</i> (AF). A : PCR LSU / B : PCR TEF1-alpha.....	72

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNr : Acide désoxyribonucléique ribosomal

ARN : Acide ribonucléique

ARNr : Acide ribonucléique ribosomal

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

BOLD : Barcode of Life Data System

BPCO : Bronchopneumopathie Chronique Obstructive

CBOL : Consortium for the Barcode of Life

CIQ : Contrôle Interne de Qualité

DDBJ : DNA Data Bank of Japan

ddNTPs : didéoxynucléotides

dNTPs : déoxynucléotides

DO : Densité Optique

EEQ : Evaluation Externe de Qualité

EMBL : European Molecular Biology Laboratory

ENA : European Nucleotide Archive

ETS : External Transcribed Spacer

iBOL : international Barcode of Life

INSDC : International Nucleotide Sequence Database Collaboration

ITS : Internal Transcribed Spacer

LBA : Lavage bronchoalvéolaire

LCR : Liquide céphalo-rachidien

LSU : Large subunit (grande sous-unité 28S)

MALDI/TOF : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation / Time Of Flight

MGG : May-Grünwald-Giemsa

MSI : Mass Spectrometry Identification platform
NCBI : National Center for Biotechnology Information
NTS : Non Transcribed Spacer
pb : Paire de bases
PCI : Probabilité d'identification correcte
PCR : Polymerase Chain Reaction
QC : Query Cover
Réf. : Référence bibliographique
SSU : Small subunit (petite sous-unité 18S)
TAE : Tris Acétate EDTA
TEF1-alpha : Translation elongation factor 1-alpha
Tm : Température de fusion (melting temperature)
UFC : Unité Formant Colonie
UV : Ultra-Violet
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

I. Introduction

Les infections fongiques connaissent globalement une incidence croissante. La pathogénicité est très variable d'une espèce fongique à une autre ; parmi la grande diversité du règne fongique, peu de champignons sont pathogènes pour l'Homme cependant certains sont ubiquitaires (*Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., etc) et de ce fait il est d'autant plus difficile de s'en prémunir. Les agents étiologiques mis en évidence chez l'Homme sont de plus en plus variés en lien avec l'augmentation du nombre de patients immunodéprimés, l'amélioration des techniques d'identification et les connaissances grandissantes vis-à-vis du règne fongique. Bien que le diagnostic soit souvent difficile et tardif, l'instauration précoce d'un traitement antifongique adapté au patient est cruciale pour une évolution clinique favorable, en particulier, dans le cadre des infections fongiques invasives.

À l'heure actuelle, les méthodes diagnostiques au laboratoire reposent principalement sur l'examen direct des prélèvements et l'identification des colonies obtenues par culture. L'examen direct, bien que de faible sensibilité, a l'avantage de fournir une réponse rapide (en quelques heures) au clinicien pour la prise en charge du patient. Les cultures fongiques sur milieux appropriés sont plus sensibles mais ont un délai de pousse très variable d'une espèce à une autre (de quelques jours à plusieurs semaines). L'identification des espèces ayant poussées se fait alors par confrontation des aspects morphologiques (macroscopiques et microscopiques) et des données de spectrométrie de masse issues de la technologie MALDI/TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation / Time Of Flight) pour les laboratoires disposant de cette technologie. L'identification au rang d'espèce devient de plus en plus exhaustive grâce à l'évolution des banques de spectres disponibles mais il est encore fréquent de faire face à des lacunes d'identification.

La détection d'ADN fongique par PCR (Polymerase Chain Reaction) se développe rapidement de façon à être soit spécifique d'un genre ou d'une espèce donnée soit « panfongique ». Cette dernière technique, couplée au séquençage, progresse dans les laboratoires de recherche depuis que le Consortium for the Barcode of Life (CBOL) a défini le gène codant pour la région ITS (Internal Transcribed Spacer) comme marqueur fongique universel. Cependant, cette

technique longue et coûteuse se heurte encore à de nombreuses difficultés techniques parmi lesquelles un manque d'homogénéisation flagrant entre les utilisateurs.

L'objectif de ce travail a été de mettre au point une technique complémentaire d'identification fongique précise au rang d'espèce des souches issues d'isolats cliniques lorsque les techniques usuelles du laboratoire ne parviennent pas à une identification correcte. Cette technique repose sur la mise en place du séquençage fongique au sein du laboratoire, nécessitant une application concrète, adaptée de la littérature scientifique, et une évaluation des performances de la technique pour l'utiliser dans les meilleures conditions.

II. Généralités

1. Bilan annuel

En 2019, près de 18 000 recherches mycologiques ont été réalisées au laboratoire de Mycologie du CHU de Rouen. Environ 8% de ces prélèvements (~1 500) ont fait l'objet d'une annulation du dossier à cause d'une non-conformité préanalytique (problème d'identitovigilance, conditions préanalytiques non respectées, doublons, etc.). Le tableau I illustre de manière non exhaustive la diversité des prélèvements reçus.

Tableau I : Liste des prélèvements reçus pour culture mycologique en 2019 au laboratoire de Mycologie du CHU de Rouen

Types de prélèvements	Nombre de prélèvements
Aspirations bronchiques	891
Crachats	885
LBA (Lavage bronchoalvéolaire)	1 023
Autres prélèvements respiratoires	265
Biopsies	59
Ecouvillons vaginaux	5 091
Ecouvillons autres	1 079
Hémocultures	255
LCR (Liquide céphalo-rachidien)	95
Liquides divers (amniotiques, gastriques, articulaires...)	842
Liquides abdominaux	1 236
Liquides de conservation	2 064
Matériels (cathéters, prothèses, valves...)	113
Morceaux	325
Peau et phanères	557
Prélèvements oculaires	434
Protocoles Mucoviscidose	930
Urines	1 041
Autres (souches extérieures, selles, pus, EEQ...)	772
Total	17 957

Les écouvillons vaginaux, les prélèvements respiratoires et les liquides de conservation représentent respectivement 28%, 17% et 11% des cultures mycologiques réalisées, soit plus de la moitié de l'activité globale (Figure 1). Sur les 16 596 échantillons mis en culture, 6 159 se sont avérés positifs à un ou plusieurs champignons, amenant ainsi à 37% le taux de positivité. Parmi les cultures positives 71% étaient pures et 29% ont révélé la présence de plusieurs espèces fongiques.

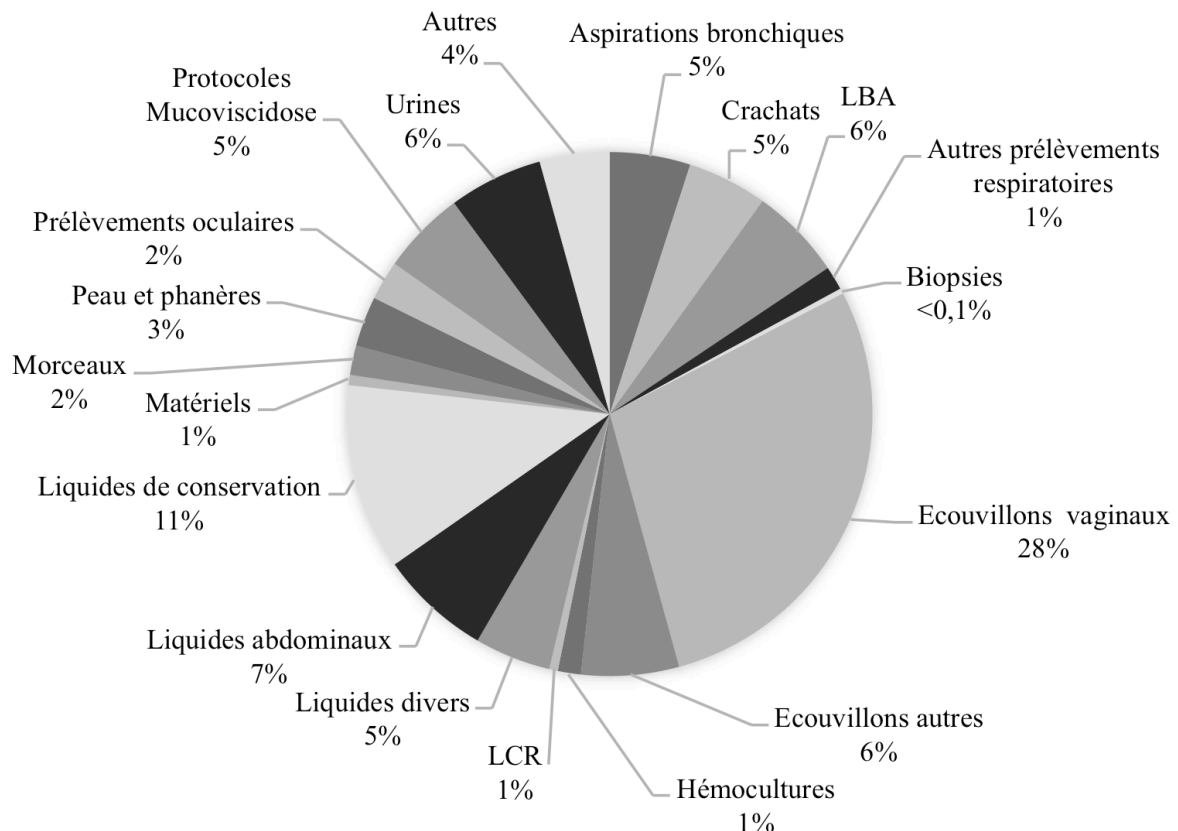


Figure 1 : Répartition des différents types de prélèvements avec culture mycologique reçus en 2019 au laboratoire de Mycologie du CHU de Rouen

2. Classification

Le règne des champignons est représenté par une incroyable diversité, ce sont des organismes eucaryotes uni- ou pluricellulaires. Ils partagent cependant comme caractères communs le fait d'être des hétérotrophes (assimilation de substances organiques), absorbotrophes (nutrition par absorption des nutriments à travers la paroi extérieure), de se reproduire grâce à des spores et de posséder une paroi cellulaire riche en chitine. Ils se développent via des filaments mycéliens appelés thalles (unicellulaires pour les levures ou pluricellulaires pour les filamenteux).

De multiples classifications détaillées du règne fongique ont été élaborées à partir du XX^{ème} siècle, basées notamment sur les caractéristiques morphologiques et les modalités de reproduction. Avec l'avènement des techniques actuelles de biologie moléculaire, la phylogénie fongique est de plus en plus précise entraînant une classification en constante évolution.

Parmi les champignons impliqués en pathologie humaine, on peut citer ceux appartenant au phylum des Zygomycota, Ascomycota et des Basidiomycota (Tableau II). Les Deuteromycota (nommés également champignons imparfaits) ont longtemps regroupé les espèces sans reproduction sexuée connue : ils sont désormais rattachés aux phylums précédemment cités au vu des données phylogénétiques récentes.

Tableau II : Exemples de genres de champignons appartenant au phylum des Ascomycètes, Basidiomycètes et Zygomycètes retrouvés en clinique

Ascomycètes	Basidiomycètes	Zygomycètes
Eurotiales : <i>Aspergillus</i> sp. <i>Paecilomyces</i> sp. <i>Penicillium</i> sp. <i>Rasamsonia</i> sp. Hypocreales : <i>Acremonium</i> sp. <i>Fusarium</i> sp. <i>Trichoderma</i> sp. Onygenales : <i>Onychocola</i> sp. <i>Epidermophyton</i> sp. <i>Microsporum</i> sp. <i>Trichophyton</i> sp. Microascales : <i>Scedosporium</i> sp. <i>Scopulariopsis</i> sp. Saccharomycetales : <i>Candida</i> sp. <i>Geotrichum</i> sp. <i>Saccharomyces</i> sp. Autres : <i>Alternaria</i> sp. <i>Aureobasidium</i> sp. <i>Cladosporium</i> sp. <i>Exophiala</i> sp.	Tremellales : <i>Cryptococcus</i> sp. <i>Trichosporon</i> sp. Autres : <i>Malassezia</i> sp. <i>Rhodotorula</i> sp.	Mucorales : <i>Absidia</i> sp. <i>Mucor</i> sp. <i>Rhizomucor</i> sp. <i>Rhizopus</i> sp.

2.1. Zygomycota

Le phylum des Zygomycota est constitué de champignons filamenteux ayant une reproduction sexuée avec des zygospores (1). Quant à la reproduction asexuée, elle aboutit à la formation de sporangium contenant des sporangiospores (Figure 2). Leur appareil végétatif est constitué d'hyphes non cloisonnés et ils sont considérés comme des champignons dits « inférieurs ». Au sein de la classe des zygomycètes (2) on rencontre par exemple l'ordre des mucorales regroupant environ 260 espèces dont 38 déclarées pathogènes pour l'homme (3), à l'origine des mucormycoses (pathologies rares en France, mais d'évolution rapidement invasive et réputées difficiles à traiter). Cette classe regroupe plusieurs centaines d'autres espèces.

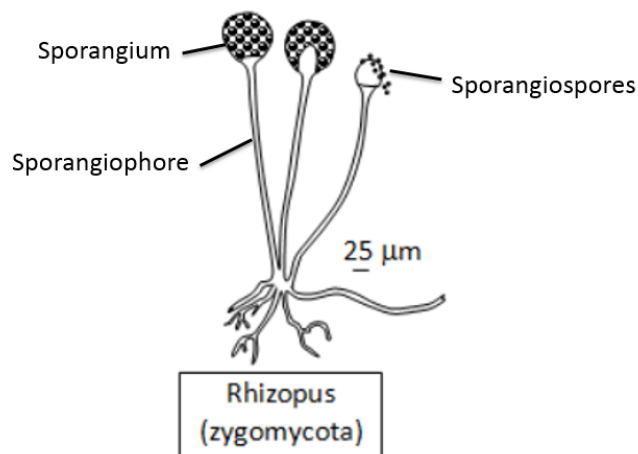


Figure 2 : Exemple de zygomycète, d'après banque de schémas de l'Académie de Dijon : microflore du sol (4)

2.2. Ascomycota

Les ascomycètes font partie des champignons dits « supérieurs » aux côtés des basidiomycètes. La reproduction sexuée produit des ascospores tandis que la multiplication asexuée aboutit à des conidies au sommet d'un conidiophore (Figure 3). Parmi les milliers d'espèces regroupées au sein de ce phylum, plusieurs sont d'intérêt majeur en pathologie humaine : que ce soit parmi les champignons filamenteux ou les levures (*Aspergillus species* ou *Candida species*).

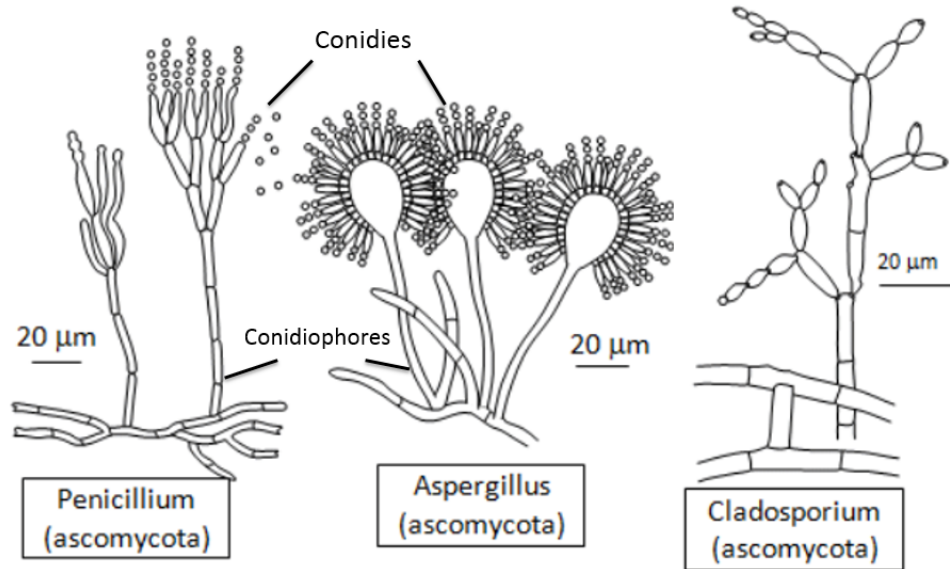


Figure 3 : Exemples d'ascomycètes, d'après banque de schémas de l'Académie de Dijon : microflore du sol (4)

2.3. Basidiomycota

Les basidiomycètes renferment une multitude de champignons divers et variés ; on rencontre à la fois des levures unicellulaires encapsulées pathogènes pour l'Homme comme *Cryptococcus* sp., des champignons filamenteux et des macromycètes sans intérêt majeur en pathologie humaine. Ils produisent des basidiospores au sommet de basides au cours de leur reproduction sexuée ; leurs hyphes sont cloisonnés comme chez les ascomycètes.

3. Identification fongique

L'identification précise des espèces fongiques est indispensable pour la mise en place d'un traitement antifongique adapté chez les patients. L'enjeu est le diagnostic le plus précoce possible pour améliorer le pronostic qui peut être parfois très sombre dans certaines infections fongiques invasives notamment chez les patients immunodéprimés.

L'examen direct, étape la plus rapide et précoce de la démarche diagnostique au laboratoire, s'effectue directement à partir du prélèvement soit à l'état frais, soit après coloration ou marquage (May-Grünwald-Giemsa, calcofluor etc.). Bien que de

faible sensibilité, il permet parfois de mettre en évidence des levures, des spores, des filaments mycéliens ou encore des pseudofilaments, et donc signe la présence d'éléments fongiques.

L'identification fongique à partir des cultures positives repose principalement sur des critères macroscopiques (aspect, couleur, forme des colonies), microscopiques (spores, thalle, etc.) et peut s'appuyer également sur les conditions de culture (vitesse de croissance, température optimale de pousse, sensibilité à certains agents). Cette approche reste d'actualité malgré l'avènement de techniques récentes comme la technologie MALDI/TOF ou de biologie moléculaire (méthode diagnostique indirecte par PCR associée ou non au séquençage).

3.1. Conditions de culture mycologique

La mise en culture des prélèvements se fait essentiellement sur gélose Sabouraud, du fait du pH acide de 5,6 la croissance de nombreuses bactéries est limitée. Il s'agit d'un milieu d'isolement non sélectif pour les champignons filamenteux et levures. Le milieu Sabouraud peut être additionné d'antibiotiques pour constituer des milieux plus sélectifs (chloramphénicol, gentamicine) ou de cycloheximide afin d'inhiber certains champignons saprophytes et levures permettant par exemple l'isolement plus aisé des dermatophytes.

Afin d'augmenter la sensibilité, il convient d'ensemencer des volumes importants (de l'ordre de 0,5 mL si possible).

Selon le type de prélèvement (superficiels ou profonds) et les espèces fongiques attendues (levures ou filamenteux), les températures d'incubation sont à adapter (Tableau III). Le délai de culture varie généralement de quelques jours pour les levures, mais peut aller jusqu'à plusieurs semaines pour certains dermatophytes par exemple.

Les cultures sont ensuite lues soit quotidiennement soit de manière bihebdomadaire jusqu'à l'observation d'une ou plusieurs colonies de taille suffisante pour permettre une identification.

Tableau III : Conditions d'incubation des cultures et modalités de lecture des champignons d'intérêt médical d'après ANOFEL (5)

champignons d'intérêt médical attendus	Principaux prélèvements	Durée d'incubation	Température	Fréquence de lecture
Levures hors <i>Cryptococcus</i>	Tous types	≤ 1 semaine	30 et 35 (± 2 °C)	Quotidienne
<i>Cryptococcus neoformans</i> et <i>gattii</i>	LCR, urine, peau, bronchopulmonaires, biopsies tissulaires, etc.	3 semaines surtout si suivi post-traitement	30 et 35 (± 2 °C)	Quotidienne
Champignons filamenteux hors dermatophytes	Bronchopulmonaires, liquide de drainage ou ponction, biopsies tissulaires, plaies, etc.	2 semaines	30 et 35 (± 2 °C)	Quotidienne puis 2 à 3 fois par semaine
Dermatophytes	Peau et phanères	4 semaines	27 (± 2 °C)	Bi-hebdomadaire
Champignons dimorphiques	Moelle osseuse, peau, bronchopulmonaires, biopsies tissulaires, etc.	8 semaines	25 (± 2 °C)	Bi-hebdomadaire

3.2. Aspect macroscopique

À partir des cultures positives, une première orientation sur le diagnostic du genre fongique est faite via l'aspect des colonies qui seront plutôt petites, glabres, et brillantes pour les levures contrairement aux champignons filamenteux souvent d'aspect plus étendu et aérien, duveteux ou cotonneux. L'observation de la couleur des colonies (recto et verso des géloses) peut être un précieux indice concernant la classe et la famille des champignons, par exemple avec les dématiés (champignons noirs) ou certains dermatophytes.

3.3. Aspect microscopique

L'examen microscopique au bleu de lactophénol entre lame et lamelle (grossissement x400) permet l'observation du mycélium, des spores et des organes de fructification. Il est réalisé sur la culture (à partir d'un tube ou d'une gélose Sabouraud) à l'aide d'une oese et d'un morceau de cellophane adhésive directement apposé à la surface de la culture et déposé en sandwich entre deux gouttes de colorant (Figure 4).

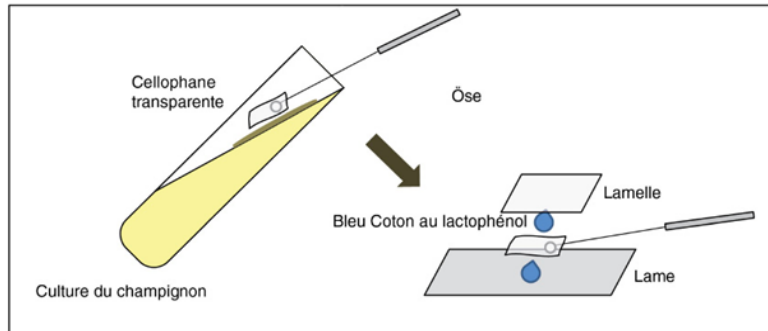


Figure 4 : Empreinte sur cellophane adhésive d'après collection ANOFEL (5)

Quelques exemples d'aspects macroscopiques et microscopiques de plusieurs champignons pour illustrer leur grande diversité morphologique (Figure 5) :

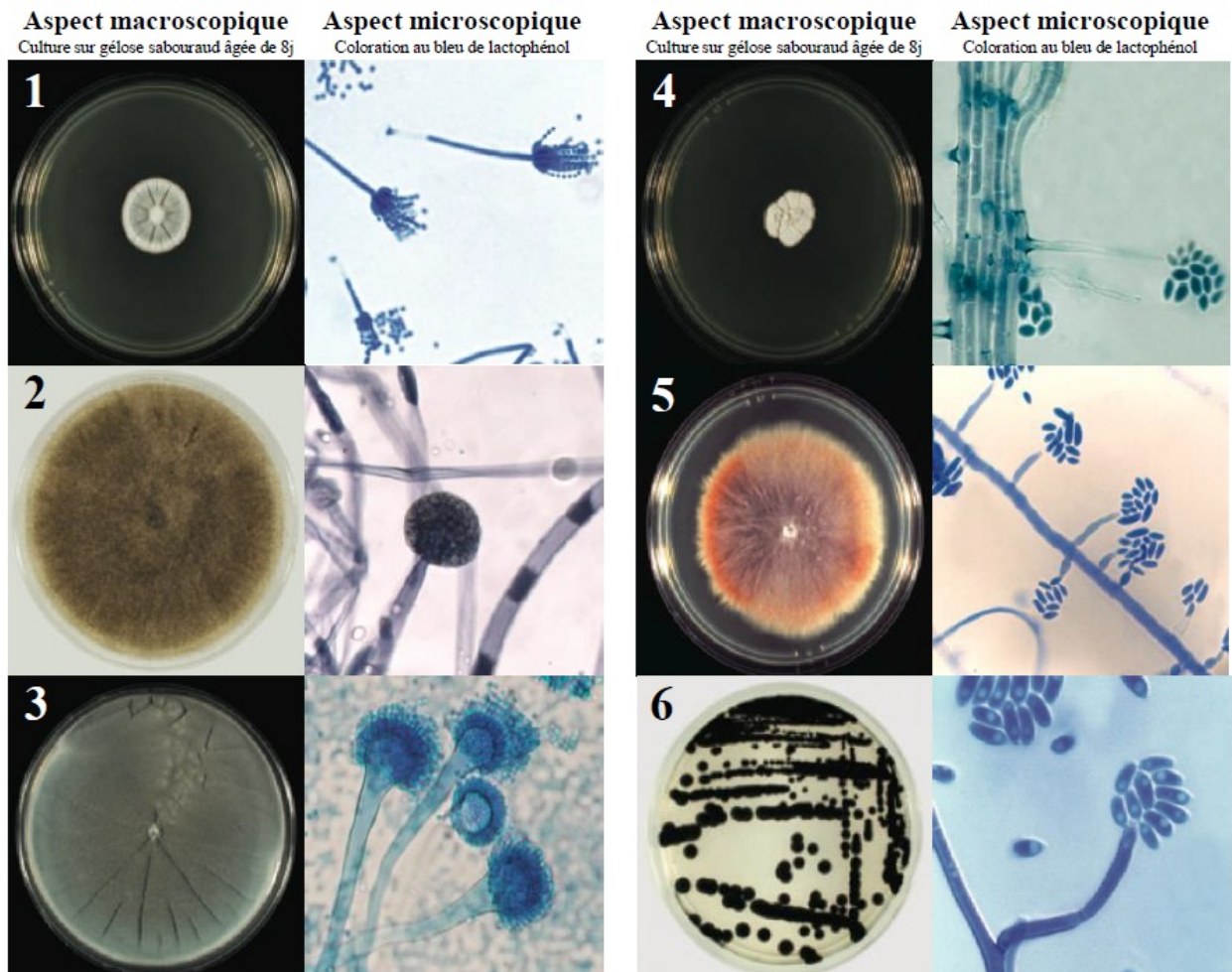


Figure 5 : Aspects macroscopiques et microscopiques de divers champignons filamenteux

1. *Penicillium* sp. 2. *Mucor* sp. 3. *Aspergillus* sp. 4. *Acremonium* sp. 5. *Fusarium* sp. 6. *Exophiala* sp.
Photos d'après cahier de formation Bioforma mars 2002 (6)

L'aspect macroscopique et microscopique, au vu de la large diversité des champignons en pathologie humaine, peut conduire le mycologue avisé à identifier au niveau du genre, voire même du complexe d'espèces, certains isolats. Cependant les caractéristiques morphologiques sont parfois limitées pour permettre une identification précise ; d'où l'intérêt grandissant de mettre en place des techniques complémentaires comme la technologie MALDI/TOF couplée à la spectrométrie de masse ou la génétique moléculaire.

3.4. Identification par MALDI/TOF

Le technologie MALDI/TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation/Time Of Flight) s'est imposée depuis la fin des années 2000 comme une technologie indispensable dans les laboratoires de microbiologie (7) ; initialement pour l'identification bactérienne de par sa rapidité d'analyse et sa simplicité d'utilisation. Aujourd'hui, il a également sa place au sein des laboratoires de Mycologie dans le cadre d'identifications des levures et champignons filamenteux. Cet automate comporte une source d'ionisation laser, un analyseur de temps de vol et un détecteur couplé à un spectromètre de masse, le tout étant analysé informatiquement.

3.4.1 Méthodologie et principe de fonctionnement du MALDI/TOF

Chaque échantillon à identifier est déposé en fine couche homogène sur une plaque métallique de 96 puits (après une étape d'extraction protéique pour certains champignons). Le dépôt est ensuite recouvert après séchage par une matrice permettant d'une part de le protéger et d'autre part de faciliter son analyse dans l'automate. Au sein de l'appareil, un rayon laser vient irradier et ioniser l'échantillon en transférant des charges positives aux analytes (majoritairement des protéines mais également lipides, polysaccharides, etc.). Les molécules ionisées obtenues vont ensuite accélérer et migrer vers le détecteur dans l'analyseur (colonne d'environ 1 mètre). Le temps de vol entre ces deux points est enregistré, il est inversement proportionnel à la taille des molécules de même charge (8) ; ainsi la vitesse des molécules dépend du ratio masse/charge. Ces données sont traduites sous forme d'empreintes spectrales et superposées à des spectres de référence dans une base

de données (Figure 6). Les spectres varient selon l'âge des colonies prélevées ou encore le milieu de culture utilisé, mais l'identification précise ne sera rendue que si les scores d'identification sont suffisamment bons (9).

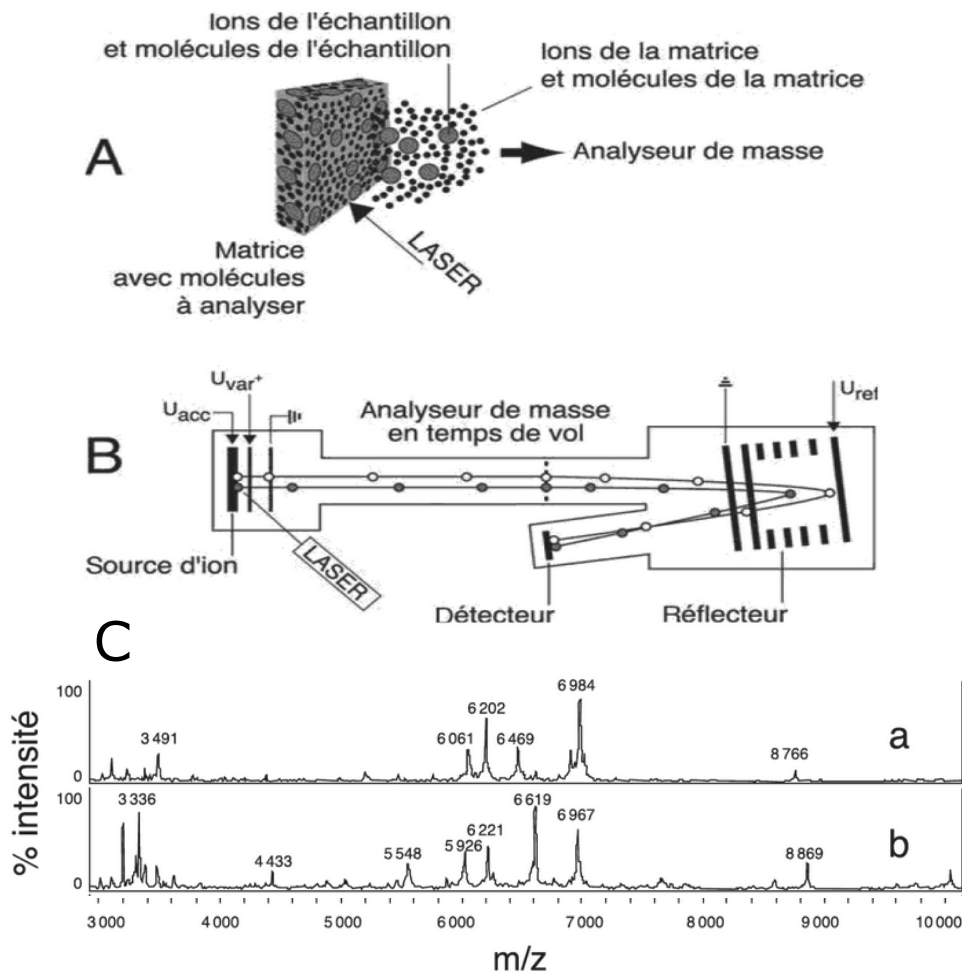


Figure 6 : Schéma du fonctionnement d'un automate de type MALDI/TOF (A et B) et exemple de spectres de masse MALDI/TOF (C) de *Candida albicans* (a) et *Candida glabrata* (b) d'après RIPERT (8)

3.5. Génétique moléculaire

3.5.1 Généralités sur l'amplification génique

Les techniques d'amplification génique par Polymerase Chain Reaction (PCR), permettent l'identification de pathogènes ciblés (par détection de l'ADN fongique) à l'aide d'amorces spécifiques de genre ou d'espèce (*Candida* sp., *Aspergillus fumigatus*, *Pneumocystis jirovecii*...). Elles peuvent également être « panfongiques »

grâce à des amorces plus universelles, et l'identification au rang d'espèce pourra se faire grâce à un séquençage ultérieur.

3.5.2 Séquençage

Depuis la fin du XXème siècle, les techniques de séquençage se développent et leurs coûts décroissent, les rendant de plus en plus accessibles au sein des laboratoires (10). Ainsi, seulement quelques décennies après la découverte de la structure de l'ADN en double hélice par James Watson et Francis Crick en 1953 (11) il est désormais possible de déterminer la succession des nucléotides le composant. Diverses méthodes de séquençages ont été élaborées ces dernières années, mais le principe de Sanger mis au point dans les années 1970 est toujours largement utilisé (12,13).

3.5.3 Méthodologie et principe du séquençage par méthode Sanger

Plusieurs étapes préalables sont nécessaires avant l'utilisation du séquenceur. Il faut d'abord réaliser une extraction d'ADN, puis une réaction de PCR à l'aide d'amorces appropriées ciblant le ou les fragments d'intérêt. Après purification des amplicons obtenus suite à la première PCR, une autre PCR : dite « séquence » est réalisée, qui diffère des PCR classiques par l'ajout de didéoxynucléotides (ddNTPs) bloquant l'ADN polymérase contrairement aux déoxynucléotides (dNTPs). Une fois incorporés les ddNTPs mettent fin à l'élongation du brin complémentaire car ils ne possèdent pas de groupement hydroxyle en position 3' rendant impossible l'incorporation d'un nouveau nucléotide. Dans le mélange réactionnel, l'enzyme incorpore aléatoirement les dNTPs ou les ddNTPs en plus faible concentration, créant de multiples fragments de tailles différentes selon l'endroit où les ddNTPs se sont insérés. Chaque ddNTPs est marqué par un fluorophore selon s'il s'agit d'Adénine, de Thymine, de Cytosine ou de Guanine. Après l'étape d'amplification, les fragments vont migrer par électrophorèse pour être discriminés selon leur poids moléculaire (Figure 7).

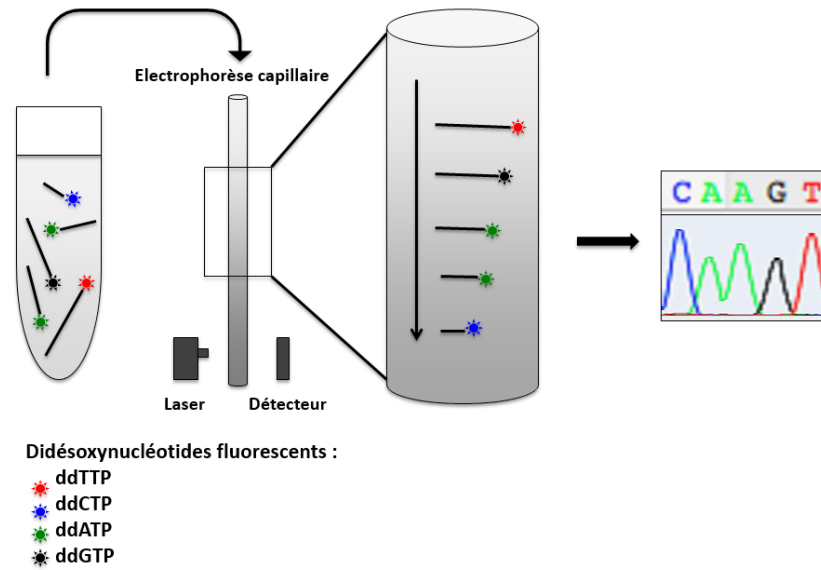


Figure 7 : Principe de fonctionnement du séquençage par électrophorèse capillaire
ddTTP = didésoxythymidine triphosphate ; ddCTP = didésoxycytidine triphosphate ;
ddATP = didéoxyadénosine triphosphate ; ddGTP = didésoxyguanosine triphosphate

Les séquences ADN obtenues peuvent être identifiées, grâce à des bases de données constamment enrichies, par comparaison avec des séquences de références ou bien des séquences déposées par des laboratoires de recherche. Des programmes informatiques tels que BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) permettent l'alignement de séquences homologues et le calcul d'un score d'identification par rapport à une séquence d'intérêt.

4. Analyse bibliographique

Bien que les critères morphologiques macroscopiques et microscopiques soient essentiels dans le cadre de l'identification fongique, ils restent cependant limités et ne permettent pas une discrimination au rang d'espèce *stricto sensu*. Cette approche reste communément employée dans les laboratoires de Mycologie, mais demande des compétences approfondies et une certaine expérience. Certaines caractéristiques de la reproduction sexuée ou asexuée, sur lesquelles se base l'identification, ne sont parfois pas observables en culture. De ce fait, l'identification au complexe d'espèces n'est pas toujours possible au vu des caractères morphologiques et culturels. De plus, la diversité fongique est telle que de nombreuses espèces n'ont pas encore été étudiées. La publication de Blackwell en 2011 estimait à plus de 5 millions le nombre d'espèces de champignons sur Terre (14) dont environ 100 000 seraient décrites, soit seulement 2%.

Toutefois en pathologie humaine, une identification correcte et rapide au niveau d'espèce peut être cruciale pour la mise en route d'un traitement antifongique adapté. Par exemple pour le genre *Aspergillus* sp., couramment impliqué dans les infections fongiques invasives chez l'Homme, l'espèce *A. fumigatus* sera sensible à l'amphotéricine B tandis qu'*A. terreus* sera quant à lui résistant naturellement à cet antifongique (15).

Pour toutes ces raisons, il a été nécessaire de mettre au point de nouvelles méthodes d'identification et de classification fongique basées sur la séquence ADN. Depuis les années 1980 - 1990 des amorces universelles ont été recherchées pour amplifier certains fragments d'intérêt et analyser les relations phylogénétiques entre les champignons. L'enjeu était de concevoir des amorces sur des gènes présents dans la majorité voire la totalité des génomes étudiés, avec une amplification et un séquençage facilités ; les gènes ciblés devant néanmoins contenir des régions variables non codantes, pouvant subir des mutations, permettant de discriminer les différentes espèces fongiques. Les amorces « panfongiques » ciblent des régions codantes très conservées et sont constituées en général d'une vingtaine de paires de bases (pb) ; elles permettent d'amplifier des fragments d'environ 700 pb (compromis entre une amplification facilitée et une variabilité suffisante) comportant une ou plusieurs régions variables.

Les séquences d'ADN ribosomal sont rapidement apparues comme séquences de choix : en 1982 Walker et Doolittle (16) ont été les premiers à utiliser la séquence du gène ribosomal ARNr 5S pour séquencer certains basidiomycètes. Par la suite White et al. en 1990 (17) ont marqué un tournant dans l'histoire du séquençage fongique en développant des amorces universelles fongiques au niveau de la région ITS (Internal Transcribed Spacer), largement utilisées aujourd'hui.

4.1. ADN ribosomal et région ITS

Les gènes ribosomiques se répètent en de multiples copies en tandem au sein du génome fongique ce qui facilite l'amplification ; les occurrences de ce gène peuvent différer selon l'espèce fongique, mais dépassent souvent la centaine de copies. Les régions codant pour les ARN ribosomiques sont très conservées et peu variables, ainsi les amorces sont souvent conçues sur la base de leurs séquences. Par ailleurs ces précurseurs d'ARNr sont séparés par des régions variables ITS, transcrites mais non codantes, présentant une grande variabilité inter espèces. La région ITS entière représente environ 600 pb et comporte les zones ITS 1 et ITS 2 encadrant la région codant pour l'ARNr 5,8S. En 5' de ITS 1 on trouve l'ARNr 18S (SSU small-subunit) et en 3' de ITS 2 l'ARNr 28S (LSU large-subunit). La région 28S contient deux domaines D1 et D2 hypervariables où plusieurs amorces ont également été conçues.

D'une part les ARNr matures 18S vont s'associer à d'autres protéines pour former la petite sous unité ribosomique 40S tandis que d'autre part les ARNr matures 5,8S, 28S et 5S (provenant d'un autre locus) vont former un complexe ribonucléoprotéique avec d'autres protéines aboutissant à la grande sous unité 60S. Le tout constituant le ribosome eucaryote (Figure 8).

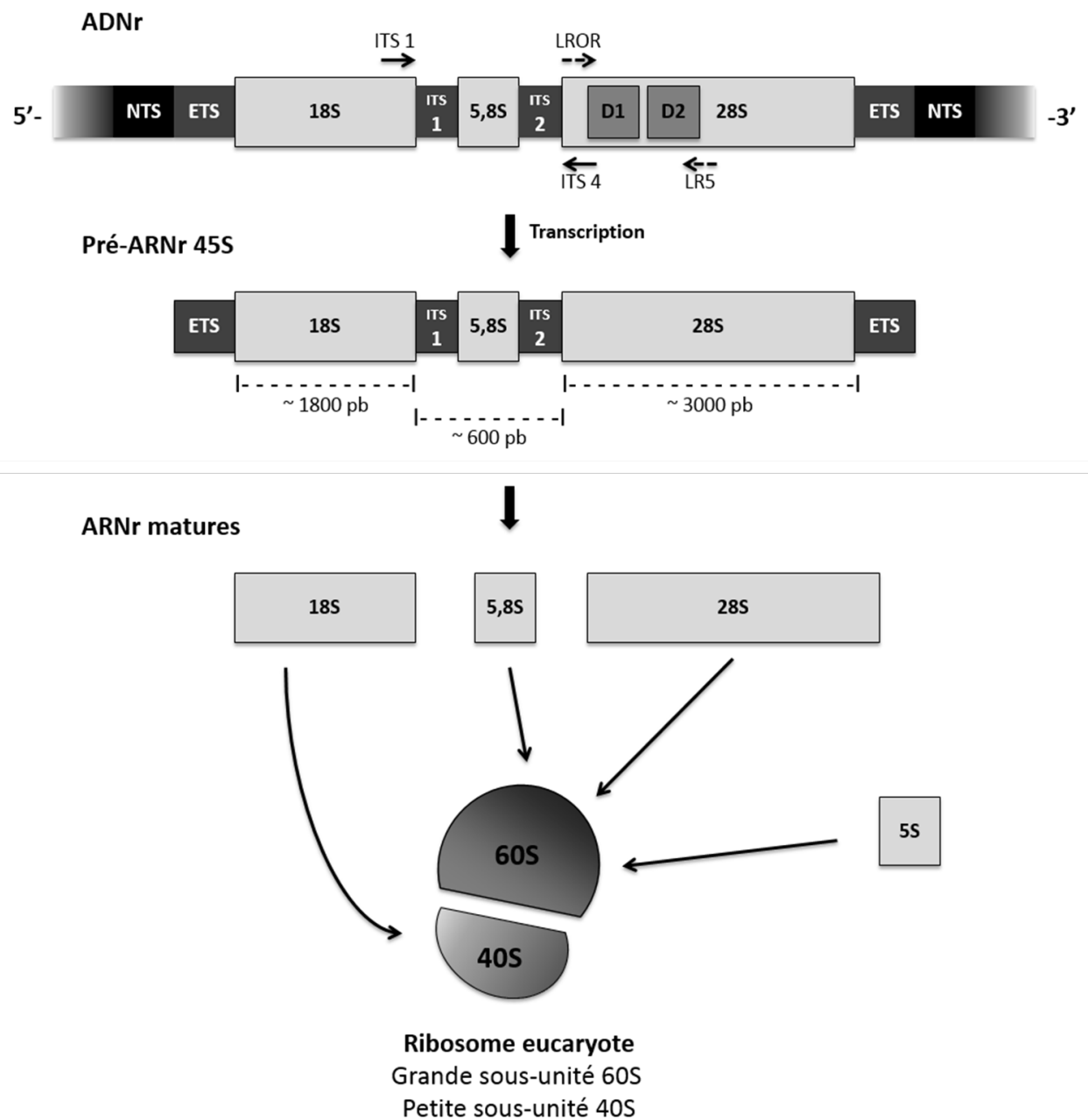


Figure 8 : Opéron du gène d'ARNr fongique avec emplacement des amorces ITS1/ITS4 et LROR/LR5

NTS = Non Transcribed Spacer ; ETS = External Transcribed Spacer ; ITS = Internal Transcribed Spacer ; D1/D2 domaines hypervariables 1 et 2

4.2. Code-barres fongique

En 2003, la notion de code-barres génétique a été introduite par Hebert et al. (18). En partant du principe qu'à chaque position de la séquence ADN, l'incorporation d'un des quatre nucléotides différents est possible, cela engendre par exemple pour une séquence de seulement 15 nucléotides plus d'un milliard de « codes » possibles. Ainsi, en supposant que des mutations apparaissent sur des régions variables, il est envisageable de penser que chaque espèce possède un « code » qui lui est propre constituant en quelque sorte son « code-barres » d'identification.

Le Consortium for the Barcode of Life (CBOL), créé en 2004, a permis de réunir de nombreux scientifiques internationaux pour étudier tous les organismes vivants, à l'exception des bactéries, afin de promouvoir et de standardiser l'utilisation des codes-barres à ADN dans l'identification et l'étude des relations phylogénétiques. L'objectif étant d'appliquer la technologie du séquençage à haut débit au criblage à grande échelle d'un ou plusieurs gènes définis comme référence.

La région de 650 pb de la sous-unité 1 du cytochrome c oxydase mitochondrial (CO1) constitue le code-barres pour le règne animal. Cependant, il a été exclu comme marqueur pour le règne des champignons à cause de ses difficultés à être amplifié et sa variabilité insuffisante (19).

Le groupe de travail formé s'est penché, en ce qui concerne le règne fongique, sur diverses régions ADN pour établir le meilleur candidat au code-barres à ADN fongique à savoir : SSU (small subunit), LSU (low subunit), ITS (internal transcribed spacer), RPB1 (RNA polymerase II largest subunit), RPB2 (RNA polymerase II 2nd largest subunit) et MCM7 (Minichromosome maintenance complex component 7) (20). Dans l'idéal la région code-barres doit avoir une séquence constante et unique pour chaque espèce, la variation interspécifique doit être bien supérieure à la variation intraspécifique (19). La différence entre la variabilité génétique d'isolats de la même espèce et la variabilité entre différentes espèces est nommée « barcode gap » (Figure 9) ; pour permettre une bonne différenciation et ne pas conduire à une identification erronée cet écart doit être positif (pas de chevauchement) entre deux espèces proches (21).

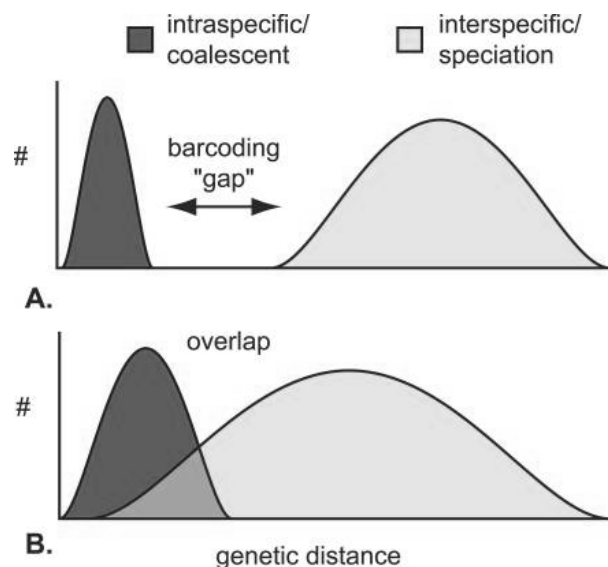


Figure 9 : Illustration du "barcode gap" ; (A) « barcode gap » positif présageant d'une identification correcte au rang d'espèce / (B) « barcode gap » avec chevauchement d'où une mauvaise discrimination des espèces au sein d'un genre donné. Illustration d'après MEYER (21)

Les mycologues au sein de l'initiative internationale du CBOL ont finalement défini la région ITS comme la région code-barres universelle pour les champignons.

Un des objectifs de l'international Barcode of Life (iBOL) a été de créer une base de données accessible à tous pour mettre en commun les travaux de chaque nation. En 2015, déjà 500 000 espèces (du règne animal, végétal et fongique) ont pu être intégrées dans cette base de données et ce nombre ne cesse de croître à l'aide des nouvelles techniques de séquençage. Leur objectif est d'étendre ce nombre à 2 millions d'espèces d'ici 2026 (<https://ibol.org/programs/program-overview/>). Concernant le règne fongique, de nombreuses séquences ITS ont été ajoutées à la bibliothèque du Barcode of Life Data System BOLD (<http://v4.boldsystems.org/>) ce qui porte à près de 30 000 le nombre d'espèces fongiques avec une séquence ITS connue en 2019 (~16 000 Ascomycètes, ~12 000 Basidiomycètes, ~500 zygomycètes, etc.).

Dans l'article de Schoch et al., basé sur l'étude du « barcode gap », ont été comparées les performances en matière d'identification des régions ITS, LSU, SSU et RBP1. En ce qui concerne RBP1, il présente une meilleure discrimination entre les espèces que la région ITS, cependant il présente un taux de succès par amplification

PCR bien inférieur. Ces données renforcent encore une fois l'utilisation de la région ITS comme code-barres de référence avec son taux élevé d'amplification PCR à plus de 90% de succès et sa probabilité d'identification correcte (PCI) pour différentes espèces tout à fait convenable (73% pour ITS contre 76% pour RBP1) (19). Le calcul du PCI est complexe et non standardisé dans le milieu scientifique, globalement ce calcul est basé sur la mesure du « barcode gap » (22) ; il s'agit du nombre d'espèces correctement identifiées, c'est-à-dire que la distance intraspécifique maximale est inférieure à la distance interspécifique minimale, sur le nombre total d'espèces (23).

4.3. Limites de la région ITS et marqueurs secondaires

Au vu de l'incroyable diversité du règne fongique, il est utopique de penser qu'une seule région code-barres puisse permettre d'identifier chaque spécimen au rang d'espèce. De ce fait, lorsque la séquence ITS n'est pas suffisante, des codes-barres de deuxième voire de troisième ligne ont été cherchés.

Dans l'article de Stielow et al. datant de 2015, les auteurs, formés de membres issus de plusieurs équipes internationales, ont passé en revue de nombreux candidats comme code-barres ADN secondaires à la région ITS (24). Ils ont testé des amorces déjà connues et employées (Tableau IV) et les ont comparées avec de nouvelles amorces créées (ciblant des régions déjà étudiées ou non) amplifiant entre autres TEF1-alpha (translation elongation factor 1-alpha), TEF3 (translation elongation factor 3), TOPI (DNA topoisomerase I), PGK (phosphoglycerate kinase), LNS2 (Lipin/Ned1/Smp2), etc.

Tableau IV : Amorces utilisées pour évaluer les performances de nouvelles amorces conçues dans l'article de Stielow et al. 2015 (24)

Locus	Primer	Oligo nucleotides (5'-3')	Reference
ITS	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	Ward & Adams (1998)
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al. (1990)
	ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	White et al. (1990)
	ITS1-F	CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTAA	Gardes & Bruns (1993)
LSU	LROR	ACCCGCTGAACTTAAGC	Vilgalys & Hester (1990)
	LR5	TCCTGAGGGAAACTTCG	
TUB2	Btub2Fd	GTBCACCTYCARACCGGYCARTG	Woudenberg et al. (2009)
	Btub4Rd	CCRGAYTGRCCRAARACRAAGTTGTC	Lesage-Meessen et al. (2011)
	Bsens	ATCACWCACTCICTIGGTGGTGG	
	Brev	CATGAAGAARTGIAGACGIGGG	
ACT	ACT512f	ATGTGCAAGCCGGTTTTCG	Carbone & Kohn (1999)
	ACT783r	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	Daniel et al. (2001), Daniel & Meyer (2003)
	CA5R	GTGAACAATGGATGGACCAGATTCGTCG	
	CA14	AACTGGGATGACATGGAGAAGATCTGGC	
RPB2	fRPB2-5f	GAY GAY MGW GAT CAY TTY GG	Liu et al. (1999), Binder & Hibbett
	fRPB2-7cF	ATG GGY AAR CAA GCY ATG GG	
	fRPB2-7cR	CCC ATR GCT TGY TTR CCC AT	
TEF1 α	EF1-983F	GCY CCY GGH CAY CGT GAY TTY AT	Rehner & Buckley (2005)
	EF1-1567R	ACH GTR CCR ATA CCA CCR ATC TT	

Ils ont évalué l'efficacité de l'amplification pour les différentes amorces et ce pour différents genres et familles de champignons. Il en ressort premièrement que la région ITS, déjà considérée comme code-barres fongique universel, présente un taux de succès pour la PCR d'environ 92% (résultats très proches de ceux obtenus par Schoch et al. en 2012) suivi de près par la région LSU avec 88%. Par ailleurs, parmi les amorces nouvellement mises au point sur la région TEF1-alpha, le couple EF1-1018F/EF1-1620R montre lui aussi un taux de succès intéressant qui s'élève à 82%.

À ce stade, d'autres paires d'amorces semblent prometteuses ciblant le gène de gamma-actine (ACT) et de bêta-tubuline (TUB2) avec respectivement un taux de succès de 80% et 85%, mais leur efficacité n'est pas homogène entre les différents taxons et les amplicons souvent de mauvaise qualité.

En plus d'avoir une amplification et un séquençage efficace pour différents taxons, les potentiels codes-barres secondaires se doivent d'avoir un pouvoir discriminant important entre différentes espèces ce qui est évalué à l'aide du « barcode gap » évoqué précédemment. L'analyse comparative du « barcode gap »

montre, entre autres, une meilleure résolution pour les régions PGK, TOP1 et TEF1-alpha que pour ITS.

Au total, avec plus de 500 paires d'amorces évaluées sur plus de 1500 espèces fongiques, il en ressort que la région TEF1-alpha, et plus particulièrement les amorces EF1-1018F/EF1-1620R, possède à l'heure actuelle le plus grand potentiel pour être définie comme code-barres secondaire.

4.3.1 Région TEF1-alpha

Le gène TEF1-alpha comprend environ 1 600 pb avec trois introns. Il code pour le facteur d'élongation 1-alpha, protéine ubiquitaire nécessaire à la synthèse protéique (Figure 10). Plusieurs amorces ont été mises au point sur ce gène depuis 2005 par Rehner et Buckley (25) et améliorées au cours de la décennie, aboutissant à des amorces universelles de plus haute fidélité.

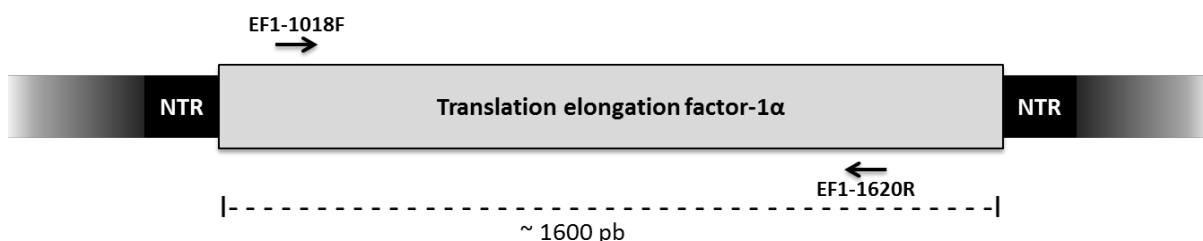


Figure 10 : Structure du gène TEF1-alpha avec emplacement des amorces EF1-1018F/EF1-1620R

4.4. Identification au rang d'espèce

La région ITS n'est pas idéale pour certains genres comprenant de nombreuses espèces notamment *Cladosporium* (26), *Penicillium* (27), *Fusarium* (28), *Trichoderma* (20) et *Aspergillus* (29) à cause d'un manque de variabilité inter espèces. Dans ce cas, l'identification au rang d'espèce peut nécessiter l'utilisation de couples d'amorces plus spécifiques des genres étudiés.

Le tableau V résume les différents locus ciblés et les amorces correspondantes pouvant être utiles pour l'identification fongique de manière générale ainsi que les principaux candidats proposés pour l'identification des genres cités ci-dessus.

Tableau V : Tableau récapitulatif des couples d'amorces pouvant être utilisés pour l'identification fongique.

	Locus	Amorces	Séquences 5'-3'	Réf.
Code-barres panfongique officiel	ITS	ITS1 ITS4	TCCGTAGGTGAACCTGCGG TCCTCCGCTTATTGATATGC	(17)
Code-barres secondaire proposé	TEF1- α	EF1-1018F EF1-1620R	GAYTTCATCAAGAACATGAT GACGTTGAADCCRACRTTGTC	(24)
Alternatives	LSU	LROR LR5	ACCCGCTGAACTTAAGC TCCTGAGGGAAACTTCG	(30)
	RBP2	RPB2-5f RPB2-7cR	GAYGAYMGWGATCAYTTYGG CCCATRGCTTGYYTRCCCAT	(31)

<i>Aspergillus</i>	Calmoduline (CaM)	Cmd5 Cmd6	CCGAGTACAAGGARGCCTTC CCGATRGAGGTCATRACGTGG	(32)
	Beta-tubuline (BenA)	Bt2a Bt2b	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGCC	(33)
<i>Fusarium</i>	TEF1- α	ef1 ef2	ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT	(34)
	TOP1	TOP_501-F TOP_501-R	TGTA AACGACGGCCAGTACGAT CAGGAAACAGCTATGAC	(24,35)
	PGK	PGK_533-F PGK_533-R	GTYGAYTTCAAYGTYCC ACACCDGGDGGRCCGTTCCA	(24,35)
<i>Penicillium</i>	Beta-tubuline (BenA)	Bt2a Bt2b	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGCC	(33)
<i>Trichoderma</i>	TEF1- α	EF1-728F TEF1LLIrev	CATCGAGAAGTTGAGAAGG AACTTGCAGGCAATGTGG	(36,37)
<i>Cladosporium</i>	Approche multilocus ITS, Actine (ACT), TEF1- α +/- Calmoduline, Histone H3			(26)

5. Objectif de la thèse

L'objectif de la thèse a été de mettre en place une technique de séquençage fongique performante pour répondre à une lacune d'identification fongique du MALDI/TOF. L'intérêt étant de pouvoir répondre systématiquement une identification fongique au rang d'espèce et donc de pouvoir conseiller une option thérapeutique probabiliste si besoin.

Au vu des données bibliographiques, il a semblé judicieux d'utiliser les amorces ITS1/ITS4 ciblant la région ITS constituant le code-barres panfongique officiel. De plus, deux autres couples d'amorces ont été sélectionnés, pour pallier d'éventuels manquements du couple ITS1/ITS4, ciblant les locus LSU et TEF1-alpha.

III. Matériel et méthode

1. Souches

Les souches de référence de *Candida albicans* ATCC 90028 (Biomerieux, France) et d'*Aspergillus fumigatus* (UK NEQAS-2015 spécimen 2646) ont été utilisées.

Les échantillons ont été sélectionnés à partir de prélèvements patients réalisés au CHU de Rouen entre 2019 et 2020, de diverses natures (prélèvements respiratoires, cutanés, etc.), ou bien à partir de souches provenant de laboratoires extérieurs envoyées au CHU de Rouen pour identification fongique dans le cadre de l'activité de routine du laboratoire. Des échantillons, congelés à - 80°C, déjà identifiés par technique MALDI/TOF ont été sélectionnés afin de les comparer avec la méthode de séquençage mise au point. Par la suite, les expérimentations ont été focalisées sur les isolats en échec d'identification par technique MALDI/TOF au cours de l'année 2019/2020.

2. Conditions de culture et préparation des échantillons

Les cultures ont été réalisées sur gélose Sabouraud additionnée de chloramphénicol et gentamicine (Biorad, France). Les prélèvements ont été manipulés sous hotte à flux laminaire afin d'éviter tout risque de contamination des cultures.

Après culture, les champignons filamenteux ont été prélevés au scalpel stérile et les levures à l'oese stérile, ils ont ensuite été dilacérés dans des tubes contenant 900 µl d'éthanol et 300 µl d'eau HPLC (CARLO ERBA réactifs).

En cas d'extraction devant être différée, les souches ont pu être congelées dans des cryotubes avec cryoperles (Technical Service) et conservées à - 20°C.

3. Technique MALDI/TOF

Après prélèvement des souches de champignons filamenteux, de préférence à partir de cultures jeunes, une étape d'extraction est réalisée à l'aide d'acide formique et d'acétonitrile (38). Cette étape d'extraction n'est pas nécessaire pour les levures hormis si un échec d'identification persiste. Une fois extraits, les échantillons sont déposés sur plaque 96 puits en quatre exemplaires chacun et recouverts de 1 µl de matrice. Ensuite, l'analyse est effectuée avec l'automate MALDI-TOF microflex (Bruker). Les spectres des champignons filamenteux, ainsi que des levures non identifiées par le système Bruker, sont analysés sur la plateforme MSI (<https://msi.happy-dev.fr/>). Pour qu'une identification soit jugée satisfaisante, au moins deux des quatre résultats d'un même isolat doivent être concordants et obtenir un score supérieur à 20 (score optimal défini par la plateforme MSI).

4. Extraction des échantillons en vue du séquençage

Deux méthodes d'extraction ont été testées afin d'optimiser cette étape à savoir : l'EZ1 DNA Tissue kit de chez Qiagen et le QIAamp PowerFecal DNA kit de chez Qiagen (détaillées ci-dessous).

4.1. Extraction par technique PowerFecal

Cette technique permet d'obtenir des échantillons de grande pureté, exempts d'inhibiteurs et pouvant être directement utilisés en PCR. Elle peut être appliquée à d'autres types de prélèvements et présente un coût raisonnable ainsi qu'une utilisation relativement simple malgré la non-automatisation et le temps de travail important qu'elle demande. Cette technique repose sur de nombreuses étapes d'agitation, lavage, centrifugation et filtration. Les premières étapes sont essentielles et reposent sur une lyse thermique, mécanique et chimique des échantillons (voir protocole en annexe 1).

4.2. Extraction en EZ1

Avec cette méthode les acides nucléiques purifiés sont de haute qualité, directement prêts à l'emploi. De plus, cette technique automatisée et facile d'utilisation offre un gain de temps non négligeable, ainsi qu'une très bonne reproductibilité. Un prétraitement des échantillons à base d'une enzyme de digestion est nécessaire avant l'utilisation de l'EZ1 Advanced XL dont l'extraction comporte quatre étapes (lyse, fixation, lavage et élution) et repose sur la technologie des particules magnétiques (voir protocole en annexe 2).

5. Amplification des extraits par PCR

Suite à l'étape d'extraction, une première PCR est effectuée afin d'amplifier les ADN extraits. Chaque mélange réactionnel a été réalisé à partir d'IQ Supermix selon le protocole fournisseur (Bio-Rad, France) (Tableau VI).

Tableau VI : Mélange réactionnel pour amplification par PCR

Constituants	Quantité par puits
IQ Supermix	10 μ l
Amorce F à 10 μ M	1 μ l
Amorce R à 10 μ M	1 μ l
Eau	8 μ l
ADN extrait	5 μ l
Total	25 μl

Les amorces utilisées Forward (F) sens, et Reverse (R) anti-sens sont présentées dans le tableau VII.

Tableau VII : Couples d'amorces utilisés

Locus	Primer	Séquence (5'-3')
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
LSU	LROR	ACCCGCTGAACTTAAGC
	LR5	TCCTGAGGGAAACTTCG
TEF1 α	EF1-1018F	GAYTTCATCAAGAACATGAT
	EF1-1620R	GACGTTGAADCCRACRTTGTC

Dans un premier temps, afin d'optimiser la réaction de PCR un gradient de température a été réalisé pour déterminer la Température de fusion (T_m) optimum d'hybridation des amorces. Le choix des protocoles de PCR a été orienté grâce aux données fournisseurs et bibliographiques (19,20,24,39–42). Les protocoles PCR utilisés figurent ci-dessous (Figures 11 et 12). Ils ont été réalisés avec le thermocycleur de chez Bio-Rad CFX96.

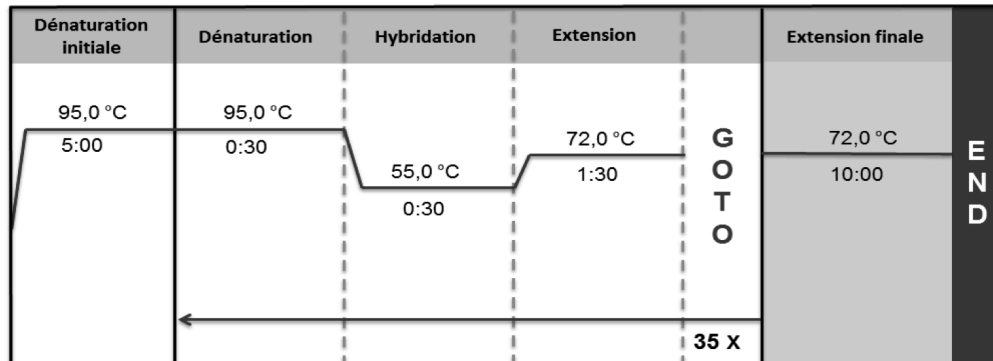


Figure 11 : Protocole PCR utilisé pour les amorces ITS1/ITS4 et LROR/LR5

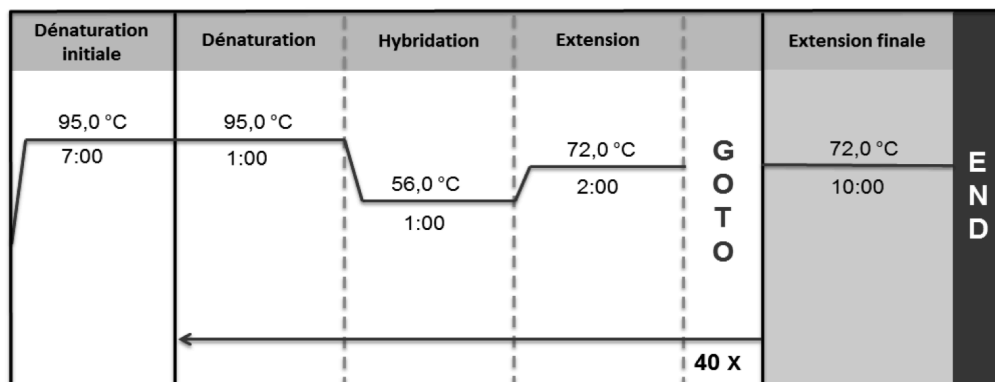


Figure 12 : Protocole PCR utilisé pour les amorces EF1-1018F/EF1-1620R

6. Révélation des amplicons

Une fois les extraits amplifiés, les amplicons ont été révélés sur gel d'agarose à 2% sous lampe UV (voir protocole en annexe 3). Une échelle de poids moléculaire a été ajoutée pour vérifier la taille des fragments obtenus par rapport aux tailles attendues. Seuls les échantillons positifs avec un signal satisfaisant ont été par la suite séquencés.

7. Purification et PCR séquence

Afin d'éliminer les amorces et nucléotides en excès non incorporés lors de la réaction de PCR, un nettoyage enzymatique a été effectué avec 2 μ l d'ExoSAP-IT (ThermoFischer Scientific) mélangé à 5 μ l de produit PCR. S'en suit une incubation en thermocycleur à 37°C pendant 15 minutes puis à 80°C pendant 15 minutes selon les recommandations du fournisseur.

Une fois les premiers amplicons purifiés, il est nécessaire de réaliser la "PCR séquence" visant à amplifier un seul brin sens ou anti-sens de l'ADN cible. La préparation du mix pour la réalisation de la PCR séquence a été réalisée selon les recommandations fournisseur (ThermoFisher, France) dans les proportions suivantes (Tableau VIII) :

Tableau VIII : Constituants du mix PCR séquence

Constituants	Quantité par puits
Tampon 5X BigDye	1,5 μ l
Enzyme Taq BigDye	0,5 μ l
Primer à 3,2 μ M	1 μ l
Eau	6 μ l
ADN extrait	1 μ l
Total	10 μl

Le programme PCR utilisé a été le suivant avec augmentation de la température de 1°C par seconde (« ramping ») entre chaque étape (Figure 13).

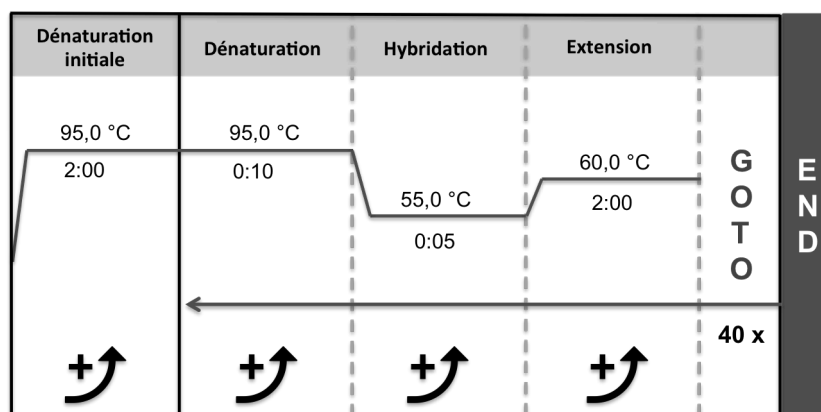


Figure 13 : Protocole de la PCR Séquence

7.1. Purification post PCR séquence

Une étape de purification a été réalisée sur résine Sephadex afin d'éliminer les nucléotides et amorces en excès.

Dans une plaque MultiScreen 96 puits (Dutscher), une quantité de 45 µl de résine Sephadex G50 (GE Healthcare) a été introduite dans chaque puits. Les colonnes de Sephadex ont été reconstituées avec 250 µl d'eau, puis un temps de repos de deux heures à température ambiante est nécessaire avant centrifugation (2000g, 3 minutes) afin d'éliminer l'eau et de compacter les mini-colonnes. Les 10 µl de produit d'amplification ont été additionnés de 10 µl d'eau PCR et déposés sur la résine. Une dernière centrifugation (2000g 3 minutes) est nécessaire après avoir appliqué une plaque 96 puits spécifique pour le séquençage sous la plaque contenant les colonnes de Sephadex. L'ADN purifié ainsi recueilli est prêt à être séquençé.

8. Séquençage

Le séquençage a été réalisé par méthode Sanger en capillaire sur le séquenceur Applied Biosystems 3500 xL Genetic Analyzer Hitachi. Les données ont été analysées informatiquement avec l'application 4peaks ; pour être exploitables les séquences doivent être pures avec des pics bien différenciés (Figure 14). Elles ont ensuite été comparées à la base de données GenBank (BLASTn <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) aboutissant à un score d'identification et un

pourcentage de recouvrement qui doit être le plus élevé possible. Le score d'identification donné en pourcentage est considéré comme satisfaisant pour l'identification au rang d'espèce lorsqu'il est $\geq 97\%$. Concernant le pourcentage de recouvrement, appelé communément Query Cover (QC), il est jugé correct lorsqu'il est $\geq 95\%$; il correspond au pourcentage de la séquence à analyser qui est alignée sur une séquence de la base de données, plus ce pourcentage est faible moins l'identification est pertinente, et ce malgré un score élevé d'identification.



Figure 14 : Exemple de séquence ADN de qualité satisfaisante obtenue à partir d'une souche de référence de *Candida albicans*, analysée avec le logiciel 4peaks.

9. Évaluation des performances de sensibilité de la technique

Une gamme de concentration a été réalisée à partir de souches de référence de *Candida albicans* et d'*Aspergillus fumigatus* dans du sérum physiologique.

D'après la littérature scientifique, une suspension de levures à 0.5 McFarland de densité optique (DO) équivaut à environ 10^7 UFC/mL (43–45). Par conséquent, une gamme de concentration à partir de dilutions en cascade de 10^7 à 10^1 UFC/mL a été réalisée pour ces deux souches à partir de suspension de DO = 0.5 McFarland. Un test de dénombrement a été fait en parallèle en cellule de Kova concordant avec les concentrations souhaitées.

IV. Résultats

1. Bilan des identifications fongiques par technique MALDI/TOF

L'analyse rétrospective des souches identifiées par MALDI/TOF en 2019/2020 (de janvier 2019 à janvier 2020) totalise plus de 1 900 tests d'identification réalisés sur champignons filamenteux.

En moyenne, 18 isolats ont été analysés par série d'identification de champignons filamenteux au MALDI/TOF. Sur les 104 séries étudiées sur l'année 2019/2020 (à raison de deux séries par semaine), ~79% des identifications ont été correctes au premier passage.

À partir des échantillons repassés une seconde fois, ~43% ont abouti à une identification exacte. Moins de 5% des isolats repassés ont été bien identifiés au bout du troisième passage, la plupart aboutissent à une identification partielle au niveau du genre, une identification incohérente avec l'aspect macro/microscopique ou encore à une non-identification complète pour ~30% d'entre eux. Au total, entre 5 et 6% des souches isolées en culture sur l'année 2019/2020 n'ont pas réussi à être identifiées au rang d'espèce par l'ensemble des techniques jusqu'à présent disponibles au laboratoire (tableau IX).

Parmi les isolats correctement identifiés, ~30% étaient du genre *Aspergillus* sp. dont les 2/3 ont mis en évidence l'espèce *fumigatus*. Par ailleurs une trentaine d'autres espèces de ce genre ont été rencontrées, certaines fréquemment (*A. tubingensis*, *A. flavus*, *A. creber*, etc.) d'autres moins (*A. chevalieri*, *A. persii*, *A. tritici*, etc.). La liste exhaustive des identifications au rang d'espèce est disponible en annexe (Annexe 4) néanmoins le tableau VIII synthétise les genres les plus représentés. Il est à noter que pour des raisons d'organisation, certaines levures sont passées dans les séries de MALDI/TOF pour champignons filamenteux sans pour autant avoir eu une identification qui a échoué en condition classique, d'où un nombre non négligeable de *Candida* sp. (~11%) identifiés.

**Tableau IX : Identifications fongiques réalisées par spectrométrie MALDI/TOF
« filamenteux » sur l'année 2019**

Identifications	Nombre
<i>Acremonium</i> sp.	5
<i>Alternaria</i> sp.	20
<i>Aspergillus fumigatus</i>	277
<i>Aspergillus</i> sp. (autres que <i>A. fumigatus</i>)	158
<i>Candida</i> sp.	154
<i>Cladosporium</i> sp.	13
<i>Cryptococcus neoformans</i>	6
<i>Epidermophyton</i> sp.	1
<i>Exophiala</i> sp.	22
<i>Fusarium</i> sp.	22
<i>Galactomyces</i> sp.	117
<i>Microsporum</i> sp.	21
<i>Mucor</i> sp.	9
<i>Penicillium</i> sp.	203
<i>Rasamsonia</i> sp.	31
<i>Rhizomucor</i> sp.	2
<i>Rhodotorula</i> sp.	10
<i>Scedosporium</i> sp.	19
<i>Scopulariopsis</i> sp.	9
<i>Talaromyces</i> sp.	34
<i>Trichoderma</i> sp.	31
<i>Trichophyton</i> sp.	127
<i>Trichosporon</i> sp.	4
Autres (60 Ascomycètes, 28 Basidiomycètes)	88
Espèces non identifiées	81
Total général	1 464

Tableau X : Résultats du séquençage des souches de référence de *C. albicans* et d'*A. fumigatus* avec les amorces ITS 1 ou ITS 4 après extraction en EZ1 15min, réalisés en duplicata.

	Amorce	Souche de référence	Identification NCBI	Query Cover (%)	Score d'identification (%)	Taille séquence étudiée (pb)
Puits 1	ITS 1	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	100	99,3	286
	ITS 1	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	100	99,8	427
	ITS 4	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	100	100	449
	ITS 4	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	100	100	379
Puits 3	ITS 1	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	100	100	437
	ITS 1	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	100	100	369
	ITS 4	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	100	100	348
	ITS 4	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	100	100	393

Au vu des performances pleinement satisfaisantes et similaires des différentes techniques testées, il a été décidé de privilégier la technique la plus rapide et donc d'opter pour la technique EZ1 DNA Tissue kit 15 minutes. Afin de conforter ce choix, des tests de sensibilité ont été entrepris en EZ1 DNA Tissue kit (Qiagen, France) 15 minutes et en QIAamp DNA PowerFecal kit (Qiagen, France) vis-à-vis des trois couples d'amorces ITS1/ITS4 (ITS), LROR/LR5 (LSU) et EF1-1018F/EF1-1620R (TEF1-alpha).

3. Tests de la limite de détection

Afin d'évaluer la limite de détection de la technique de séquençage, des essais en gamme de concentration en levure (*C. albicans*) et en champignons filamenteux (*A. fumigatus*) ont été réalisés. L'influence potentielle des méthodes d'extraction a été évaluée lors de la première PCR d'amplification.

Ainsi, à partir des gammes de dilution de 10^7 à 10^1 UFC/ml, les PCR d'amplification pour les trois couples d'amorces ont été effectuées, et ce pour les deux techniques d'extraction : EZ1 (15min) et PowerFecal. L'amplification a été vérifiée par migration sur gel d'agarose, la limite de détection étant définie comme le dernier point de gamme avec un signal d'amplification positif. Les résultats comparatifs des deux techniques pour les différentes amorces sont présentés dans la figure 16.

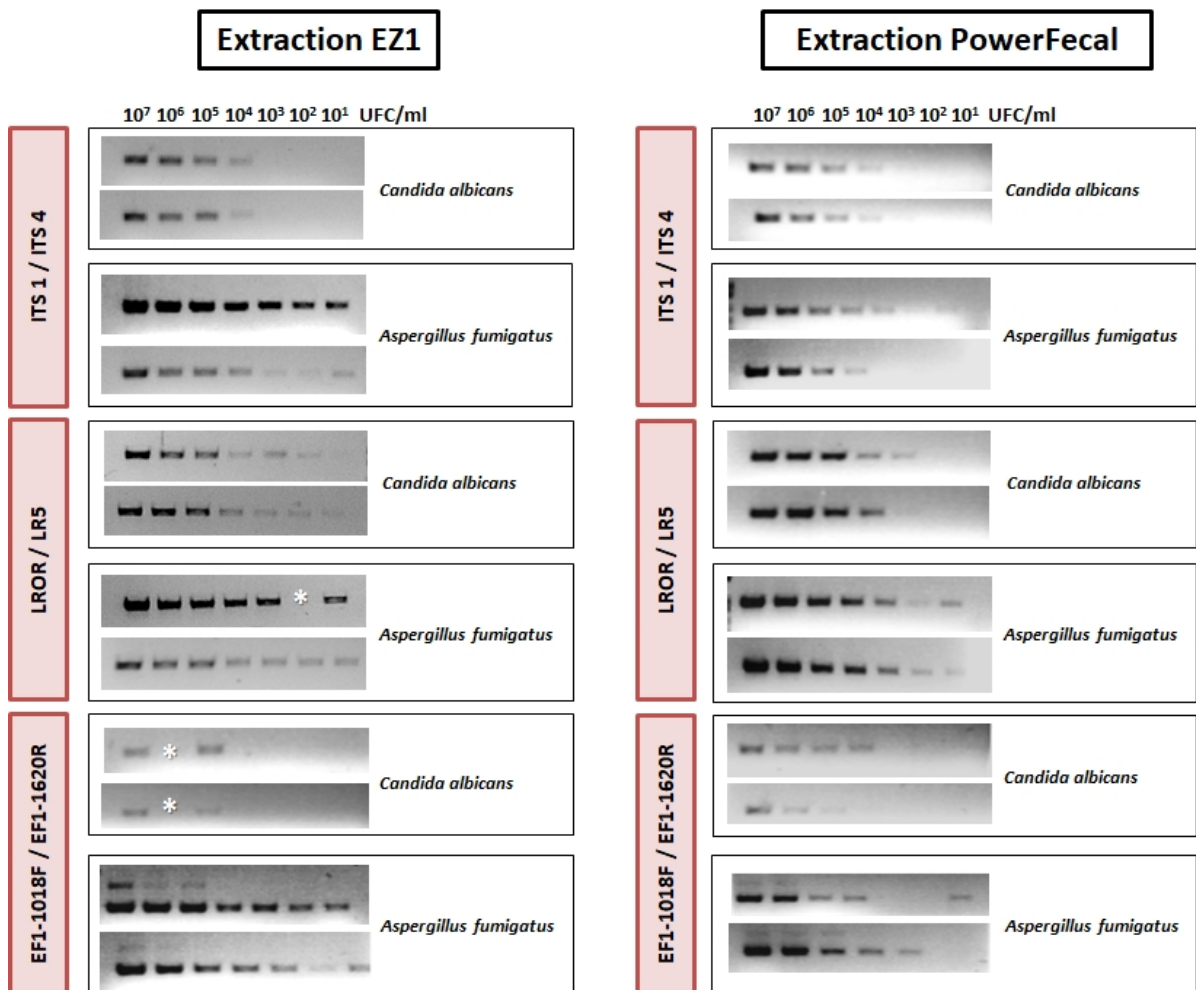


Figure 16 : Limites de détection des PCR sur les souches de référence de *Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus* selon 2 types d'extraction (EZ1 et PowerFecal) pour les 3 couples d'amorces suivants : ITS1/ITS4, LROR/LR5 et EF1-1018F/EF1-1620R. Chaque point de gamme de 10^7 à 10^1 UFC/mL a été passé en duplicata.
* : Résultats aberrants

L'intensité des signaux observée pour chaque gamme de concentration était bien décroissante en fonction de la dilution, et les gammes réalisées en duplicata ont montré une bonne reproductibilité.

Une différence a été détectée entre la souche de *C. albicans* et celle d'*A. fumigatus* ; en effet le seuil de détection a été plus faible concernant *A. fumigatus*, par exemple en extraction EZ1 le seuil de détection est de 10^1 pour *A. fumigatus* contre 10^4 pour *C. albicans* après PCR ITS (tableau XI).

Tableau XI : Limites de détection en UFC/ml selon deux types d'extraction pour trois couples d'amorces. Réalisées à partir de souches de référence de *C. albicans* et d'*A. fumigatus*

	Souche	Extraction EZ1 Seuil en UFC/ml	Extraction PowerFecal Seuil en UFC/ml
ITS	<i>C. albicans</i>	10 ⁴	10 ⁴
	<i>A. fumigatus</i>	10 ¹	10 ³
LSU	<i>C. albicans</i>	10 ²	10 ³
	<i>A. fumigatus</i>	10 ¹	10 ¹
TEF1-alpha	<i>C. albicans</i>	10 ⁵	10 ⁴
	<i>A. fumigatus</i>	10 ¹	10 ³

Concernant les différences observées entre les deux techniques d'extraction, la méthode semi-automatisée EZ1 semble légèrement plus performante. Enfin, pour ce qui est des trois couples d'amorces, ils ont tous permis l'amplification des souches de référence au minimum jusqu'au seuil de 10⁵ UFC/ml. Les meilleures performances ont été obtenues avec le locus LSU suivi de près par la région ITS. Ces résultats confortent l'idée d'opter pour l'extraction par EZ1 (15min) et ce qu'importe le couple d'amorces utilisé.

4. Optimisation de l'étape de PCR séquence

Lors de la réalisation de la PCR en amont du séquençage (appelée "PCR séquence"), il est essentiel d'obtenir un fragment d'ADN simple brin de bonne qualité pour permettre un succès du séquençage en lui-même. Ce travail a donc consisté à sélectionner l'amorce la plus judicieuse à utiliser lors de cette étape. Pour cela, après avoir sélectionné sept souches d'identification connue (et une souche supplémentaire à identifier), la première PCR d'amplification a été validée par migration sur gel (Figure 17), puis chacun des amplicons obtenus a été testé en PCR séquence en utilisant l'amorce sens (ITS1) ou l'amorce anti-sens (ITS4). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau XII.

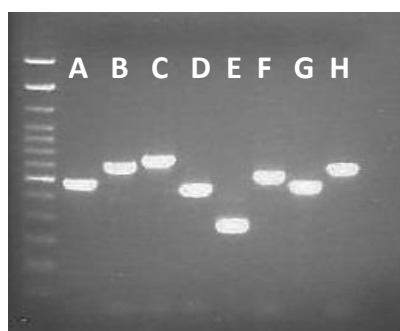


Figure 17 : Révélation sur gel d'agarose de l'amplification par PCR (amorces ITS1/ITS4) de huit souches différentes

Tableau XII : Résultats du séquençage de huit souches pour comparaison des amorces sens (ITS1) et anti-sens (ITS4) utilisées à l'étape de PCR séquence

NS = Non Séquencé ; NI = Non identifié

	Identification MALDI/TOF	Amorce ITS 1			Amorce ITS 4		
		pb	Identification NCBI	Score d'identification (%)	pb	Identification NCBI	Score d'identification (%)
A	<i>Penicillium crustosum</i>	NS	NS	-	108	<i>Penicillium</i> sp.	100
B	<i>Trichophyton rubrum</i>	351	<i>T. rubrum</i>	100	415	<i>T. rubrum</i>	100
C	<i>Microsporium canis</i>	NS	NS	-	171	<i>M. canis</i>	99,42
D	<i>Cryptococcus neoformans</i>	390	<i>C. neoformans</i>	100	477	<i>C. neoformans</i>	100
E	<i>Galactomyces geotrichum</i>	308	<i>G. geotrichum</i>	100	308	<i>G. geotrichum</i>	98,38
F	<i>Trichophyton tonsurans</i>	254	<i>T. tonsurans</i>	100	474	<i>T. tonsurans</i>	100
G	<i>Penicillium glabrum</i>	NS	NS	-	475	<i>P. glabrum</i>	100
H	Souche non identifiée	NS	NS	-	393	NI	-

Des séquences exploitables ont été obtenues en utilisant l'amorce anti-sens ITS4 pour 100% (n=8) des souches d'identification connue. Concernant l'amorce sens ITS1, des séquences exploitables ont été obtenues dans seulement 50% (n=4) des cas. Les résultats de séquençage obtenus étaient tous concordants avec les identifications attendues des souches (réalisées préalablement par MALDI/TOF). Par conséquent : l'amorce anti-sens ITS4 a été sélectionnée pour la suite des essais et figure désormais comme amorce de prédilection à utiliser dans le mode opératoire de la réalisation du séquençage (Annexe 5). Le résultat de cet essai a été extrapolé aux régions LSU et TEF1-alpha.

NB : nous souhaitons profiter de cet essai pour tester l'identification de la souche H que nous n'avons pas réussi à identifier au préalable par MALDI/TOF, mais

malheureusement au cours de cet essai, l'identification n'a pas non plus été possible en séquençage malgré l'obtention d'une séquence de bonne qualité avec ITS4.

5. Comparaison des identifications par MALDI/TOF et du séquençage de la région ITS

Afin de compléter les précédents résultats aboutissant au choix de l'amorce ITS4 basés sur la comparaison de l'identification entre MALDI/TOF et séquençage, des tests plus complets ont été réalisés afin de déterminer la comparabilité des résultats obtenus selon ces deux méthodes. Le choix des souches à identifier s'est porté au minimum sur des levures étant donné que la plateforme MSI (servant pour l'identification par MALDI/TOF) est enrichie régulièrement avec des spectres de champignons filamenteux qui sont vérifiés par analyse génétique ; ainsi les identifications de champignons filamenteux par MSI bénéficient *de facto* d'une grande fiabilité. De plus l'aspect macroscopique et microscopique est peu contributif pour les levures d'où la nécessité d'avoir des identifications sûres par biologie moléculaire ou spectrométrie de masse.

Pour ce faire, diverses souches de *Candida* sp. et plusieurs autres levures ont été choisies dans les souchiers de collection du laboratoire. Après mise en culture des souches congelées, le séquençage a été effectué selon le protocole défini précédemment (Annexe 5).

Sur les 21 levures étudiées, toutes ont été amplifiées avec un signal correct correspondant à des amplicons de taille comprise entre 200 et 600 pb (Figure 18).



Figure 18 : Révélation sur gel d'agarose de l'amplification par PCR (amorces ITS1/ITS4) de souches de *Candida* sp. et autres levures

Toutes les identifications par séquençage ont abouti à un score d'identification > 98% associé à un Query Cover \geq 99% (Tableau XIII).

Tableau XIII : Comparaison de l'identification de plusieurs levures par technique MALDI/TOF versus séquençage de la région ITS (identification sur le site NCBI blastn)

N°	Identification MALDI/TOF	Nature de prélèvement	Taille séquence (pb)	Identification NCBI	Query Cover (%)	Score d'identification (%)
1	<i>C. parapsilosis</i>	HEMOCULTURE	448	<i>C. parapsilosis</i>	100	100
2	<i>C. glabrata</i>	URINES	277	<i>C. glabrata</i>	100	100
3	<i>C. tropicalis</i>	CRACHAT	379	<i>C. tropicalis</i>	100	99,21
4	<i>C. kefyri</i>	URINES	432	<i>C. parapsilosis</i>	100	99,54
5	<i>C. allociferrii</i>	OREILLE	465	<i>C. allociferrii</i>	99	100
6	<i>C. krusei</i>	CUTANE	328	<i>C. krusei</i>	100	100
7	<i>C. dubliniensis</i>	CRACHAT	376	<i>C. dubliniensis</i>	100	100
8	<i>C. lusitaniae</i>	LIQUIDE ABDOMINAL	229	<i>C. lusitaniae</i>	100	99,57
9	<i>C. guilliermondii</i>	URINES	453	<i>C. guilliermondii</i>	100	100
10	<i>C. nivariensis</i>	LBA	459	<i>C. nivariensis</i>	100	100
11	<i>C. pintolopessii</i>	LIQUIDE BILIAIRE	470	<i>C. pintolopessii</i>	100	99,58
12	<i>C. norvegensis</i>	URINES	314	<i>C. norvegensis</i>	100	100
13	<i>C. lipolytica</i>	LENTILLE	276	<i>C. lipolytica</i>	99	98,55
14	<i>C. albicans</i>	P. VAGINAL	425	<i>C. albicans</i>	100	100
15	<i>C. albicans</i>	CRACHAT	429	<i>C. albicans</i>	100	100
16	<i>C. albicans</i>	EXPECTORATION	403	<i>C. albicans</i>	100	100
17	<i>C. albicans</i>	CRACHAT	451	<i>C. albicans</i>	100	100
18	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	LBA	476	<i>R. mucilaginosa</i>	100	100
19	<i>Debaryomyces hansenii</i>	SOUCHE	538	<i>D. hansenii</i>	100	99,81
20	<i>Trichosporon asahii</i>	LIQUIDE ABDOMINAL	469	<i>T. asahii</i>	100	100
21	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SOUCHE	151	<i>S. cerevisiae</i>	100	99,34

Les résultats des deux méthodes sont tous concordants à l'exception d'une souche ayant été identifiée comme *Candida kefyri* par la technologie MALDI/TOF contre *Candida parapsilosis* au séquençage.

6. Identification des souches non identifiées par MALDI/TOF

6.1. Première intention : séquençage de la région ITS

Dans le cadre de ce travail, les souches fongiques isolées à partir des prélèvements patients, et n'ayant pas pu être initialement identifiées par MALDI/TOF, ont été pour la plupart conservées à - 20°C jusqu'à la réalisation des analyses de séquençage selon le protocole validé précédemment. Il s'agit majoritairement de prélèvements respiratoires (n=35) et cutanés (n=14).

Afin de travailler à partir de colonies selon la méthode décrite précédemment (paragraphe III.2.), les souches ont été repiquées après décongélation sur gélose Sabouraud et incubées à 30°C ou 37°C. Cependant la plupart de ces souches n'ont pas poussé en culture après décongélation. Il a donc été décidé de tester l'extraction d'ADN directement à partir des bouillons de congélation ; tous les essais ainsi réalisés se sont avérés concluants (Figure 19 : échantillons 1 à 9).

NB : Par la suite les extractions ont été réalisées en première intention à partir des cultures jeunes ou à partir de souches congelées en cas de technique devant être différée.

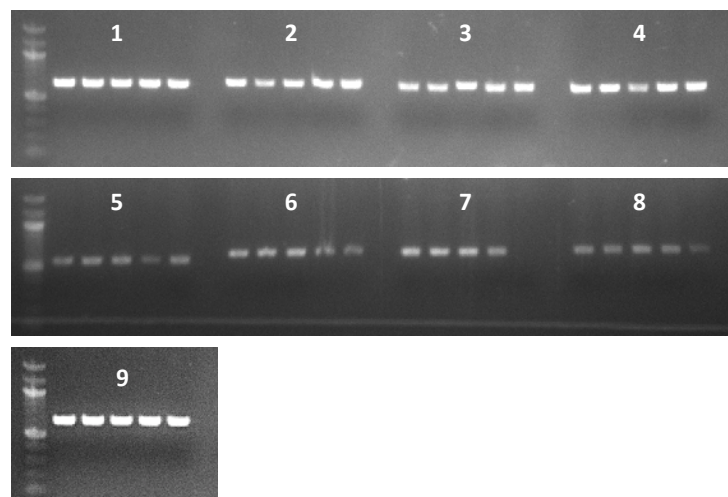


Figure 19 : Révélation de l'amplification sur gel d'agarose des échantillons 1 à 9 après PCR ITS, réalisés à partir de bouillons congelés (n=5 puits par échantillon)

Au total, 53 échantillons non préalablement identifiés par MALDI/TOF ont été testés. Le couple d'amorces de première intention ITS1/ITS4 a permis d'amplifier avec succès 50 de ces 53 échantillons (Figure 20 : échantillons 10 à 53). Parmi ceux-ci, certains ont montré un faible signal sur gel d'agarose (échantillons 12, 20, 25, 27, 32) mais ont tout de même été séquencés par la suite avec succès. Les amplicons obtenus sont en général de taille comprise entre 400 et 600 pb.

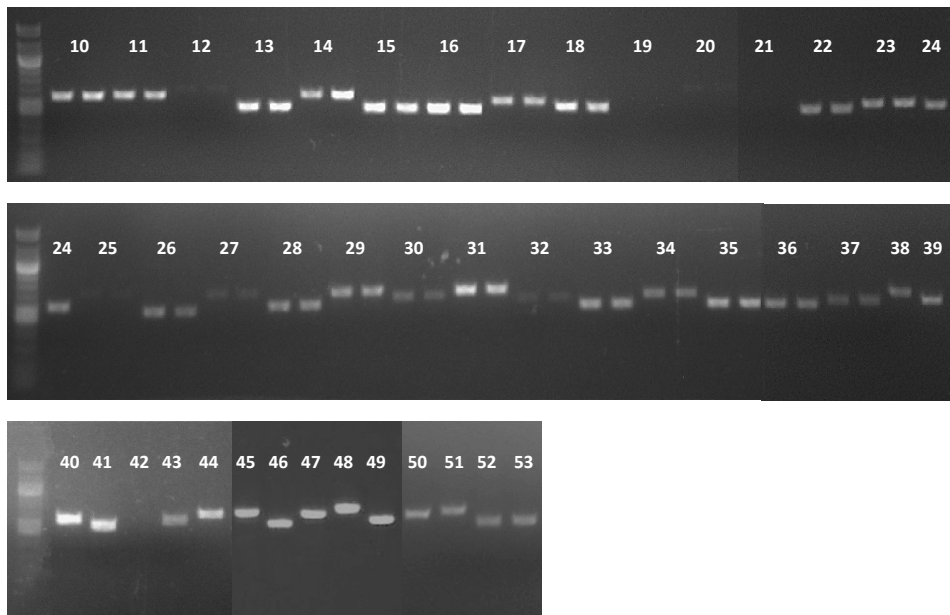


Figure 20 : Révélation de l'amplification sur gel d'agarose des échantillons 10 à 53 après PCR ITS1/ITS4. Échantillons 19, 21 et 42 : non amplifiés. Échantillons 12, 20, 25, 27,32 : faible amplification ayant tout de même abouti au séquençage.

Concernant les trois échantillons n'ayant pas été amplifiés (échantillons n°19, 21 et 42), un second essai d'extraction puis d'amplification avec le couple ITS1/ITS4 a été réalisé mais sans succès. Ces trois échantillons ont ainsi fait l'objet par la suite d'une amplification avec les deux autres régions LSU et TEF1-alpha pour tenter de les identifier (paragraphe IV.6.2).

Sur les 50 échantillons ayant été séquencés, l'analyse des séquences ADN obtenues par alignement via le site NCBI blastn a permis une identification satisfaisante au rang d'espèce pour 45 échantillons avec un score d'identification > 97% et un Query Cover > 95% (Tableau XIV). Les identifications ont toutes été confrontées aux données macroscopiques et microscopiques préalablement collectées, il s'est avéré que pour ces 45 souches les résultats étaient concordants.

Tableau XIV : Identifications des 53 échantillons, non identifiés par technique MALDI/TOF, réalisées après séquençage de la région ITS et concordance avec l'aspect macroscopique et microscopique.

NI = Non Identifié ; NA = Non Amplifié

N°	Nature de prélèvement	Taille séquence étudiée (pb)	Identification NCBI	Query Cover (%)	Score d'identification (%)	Aspect macroscopique et microscopique cohérent
1	SOUCHE	554	NI	-	-	-
2	EXPECTORATION	580	<i>Polyporus brumalis</i>	100	99,66	Oui
3	LBA	181	<i>Calosphaeria pulchella</i>	100	98,9	Oui
4	ASPI BRONCHIQUE	497	<i>Rhinocladiella similis</i>	100	99,6	Oui
5	CRACHAT	491	<i>Phialemonium inflatum</i>	100	98,16	Oui
6	CRACHAT	418	<i>Phoma fimeti</i>	100	99,28	Oui
7	LBA	546	<i>Cephalotrichum gorgonifer</i>	100	99,82	Oui
8	LBA	430	<i>Microascus cirrosus</i>	100	100	Oui
9	CUTANE	401	<i>Trichophyton rubrum</i>	100	100	Oui
10	ASPI PHARYNGEE	529	<i>Pseudopithomyces chartarum</i>	100	100	Oui
11	CRACHAT	545	<i>Scedosporium boydii</i>	100	99,82	Oui
12	CUTANE	453	<i>Trichophyton benhamiae</i>	100	100	Oui
13	ASPI BRONCHIQUE	455	<i>Radulidium subulatum</i>	100	99,56	Oui
14	PBDP	561	<i>Trametes hirsuta</i>	100	100	Oui
15	ASPI BRONCHIQUE	445	<i>Candida tropicalis</i>	100	99,77	Oui
16	LBA	455	<i>Candida tropicalis</i>	100	99,78	Oui
17	ASPI BRONCHIQUE	482	<i>Paraconiothyrium variabile</i>	100	98,55	Oui
18	CUTANE	482	NI	-	-	-
19	CUTANE	NA	NA	-	-	-
20	CUTANE	439	<i>Microsporum canis</i>	100	99,77	Oui
21	CUIR CHEVELU	NA	NA	-	-	-
22	LBA	488	<i>Phialemonium atrogriseum</i>	100	99,79	Oui
23	ASPI BRONCHIQUE	514	<i>Aspergillus flavus</i>	100	100	Oui
24	CUTANE	505	<i>Acremonium sp.</i>	100	94,29	Oui
25	LBA	521	<i>Coprinopsis strossmayeri</i>	100	99,81	Oui
26	CRACHAT	480	<i>Montagnula scabiosae</i>	100	100	Oui
27	SOUCHE	513	<i>Onychocola canadensis</i>	99	99,61	Oui
28	CUTANE	513	<i>Acremonium breve</i>	100	99,61	Oui
29	ONGLES	557	<i>Onychocola canadensis</i>	97	99,27	Oui
30	LBA	566	<i>Absidia glauca</i>	100	99,65	Oui

N°	Nature de prélèvement	Taille séquence étudiée (pb)	Identification NCBI	Query Cover (%)	Score d'identification (%)	Aspect macroscopique et microscopique cohérent
31	ASPI BRONCHIQUE	599	<i>Abortiporus biennis</i>	100	99,83	Oui
32	ASPI BRONCHIQUE	496	<i>Microascus cirrosus</i>	100	100	Oui
33	LBA	470	<i>Microdochium bolleyi</i>	100	100	Oui
34	CUTANE	560	<i>Exophiala phaeomuriformis</i>	100	100	Oui
35	CRACHAT	480	<i>Neocucurbitaria keratinophila</i>	100	99,79	Oui
36	CRACHAT	518	<i>Leptosphaeria biglobosa</i>	100	99,81	Oui
37	ASPI BRONCHIQUE	566	<i>Peniophora lycii</i>	99	100	Oui
38	ASPI BRONCHIQUE	627	<i>Phlebia tremellosa</i>	100	100	Oui
39	LBA	568	<i>Physisporinus vitreus</i>	100	99,12	Oui
40	LIQUIDE ABDOMINAL	271	<i>Scopulariopsis candida</i>	100	100	Oui
41	CRACHAT	318	<i>Rasamsonia piperina</i>	100	100	Oui
42	CUIR CHEVELU	NA	NA	-	-	-
43	ASPI PHARYNGEE	279	<i>Scopulariopsis brumptii</i>	100	99,64	Oui
44	CUTANE	413	<i>Trichophyton interdigitale</i>	100	100	Oui
45	SOUCHE	461	<i>Acremonium persicinum</i>	100	100	Oui
46	LBA	409	<i>Cephalotrichum gorgonifer</i>	99	100	Oui
47	CUTANE	444	<i>Trichophyton bennhamiae</i>	100	99,78	Oui
48	ASPI BRONCHIQUE	429	<i>Phellinus sp.</i>	100	97,9	Oui
49	ASPI BRONCHIQUE	555	<i>Trametes versicolor</i>	100	99,82	Oui
50	PEAU	568	<i>Exophiala lecanii-corni</i>	100	100	Oui
51	CRACHAT	474	<i>Pyrenochaeta uniguis-hominis</i>	100	100	Oui
52	ASPI BRONCHIQUE	494	<i>Penicillium sp.</i>	100	99,6	Oui
53	LBA	571	<i>Perenniporia medulla-panis</i>	100	99,12	Oui

Voici des précisions relatives aux cinq échantillons non identifiés ou partiellement identifiés :

- Échantillon 1 : La séquence analysée était de très bonne qualité avec une taille de plus de 550 pb. Cependant, l'alignement de séquence sur le site NCBI blastn n'a pas permis d'identification correcte (Query Cover < 95% et score d'identification < 97%) (Figure 21).

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
✓	Mucor variisporus strain CBS 837.70 internal transcribed spacer 1, partial sequence;	449	449	58%	6e-122	92.00%	MH859970.1
✓	Mucor variisporus strain CBS 837.70 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; int	449	449	58%	6e-122	92.00%	JN206175.1
✓	Mucor variisporus CBS 837.70 ITS region; from TYPE material	449	449	58%	6e-122	92.00%	NR_152951.1
✓	Mucor sp. BAB-3377 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribe	446	446	62%	7e-121	90.23%	KU504304.1
✓	Mucor azygosporus strain CBS 292.63 internal transcribed spacer 1, partial sequenc	442	442	67%	9e-120	88.30%	MH858287.1
✓	Mucor azygosporus CBS 292.63 ITS region; from TYPE material	442	442	67%	9e-120	88.30%	NR_103639.1
✓	Mucor sp. SM14-21-15-2 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosc	438	438	68%	1e-118	87.89%	MN905928.1
✓	Mucor hiemalis isolate SR74 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; ir	438	438	68%	1e-118	87.89%	MK911690.1
✓	Mucor sp. isolate ARMI-10 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribo	438	438	68%	1e-118	87.89%	MH794198.1
✓	Mucor hiemalis f. silvaticus strain CBS 412.71 18S ribosomal RNA gene, partial seq	438	438	68%	1e-118	87.89%	JN206124.1

Figure 21 : Liste des dix premiers résultats d'identification de l'échantillon 1 sur le site NCBI blastn

- Échantillon 18 : La séquence étudiée est de très bonne qualité avec une taille de près de 480 pb. Parmi les dix premiers résultats obtenus sur NCBI blastn le Query Cover est > 95% mais le score d'identification ne dépasse pas les 95%, donnant comme résultat majoritairement « fungal sp. » (Figure 22). Le premier résultat qualifiable apparaît en 12^{ème} position avec un Query Cover de 100% et un score d'identification médiocre à 92,4% donnant *Phaeococcomyces eucalypti*.

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
✓	Uncultured fungus clone PRL.2.21 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; inter	732	732	98%	0.0	94.35%	KX147795.1
✓	Fungal sp. TRN449 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and int	732	732	97%	0.0	94.70%	AY843147.1
✓	Fungal sp. TRN452 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and int	726	726	97%	0.0	94.49%	AY843150.1
✓	Uncultured Pezizomycotina clone LTSP_EUKA_P4K22 18S ribosomal RNA, 18S-25	725	725	100%	0.0	93.79%	FJ553844.1
✓	Uncultured Lecanoromycetidae clone LTSP_EUKA_P1C08 18S ribosomal RNA, 18S	719	719	100%	0.0	93.58%	FJ552744.1
✓	Uncultured fungus clone S245 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal t	715	715	100%	0.0	93.16%	FJ820733.1
✓	Fungal sp. voucher ARIZ:EAB444 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.	710	710	97%	0.0	93.61%	MG761164.1
✓	Fungal sp. voucher ARIZ:EAB346 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.	710	710	97%	0.0	93.61%	MG761090.1
✓	Fungal sp. voucher ARIZ:EAB337 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.	708	708	97%	0.0	93.60%	MG761081.1
✓	Fungal sp. voucher ARIZ:EAB358 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.	706	706	97%	0.0	93.42%	MG761101.1
✓	Fungal sp. voucher ARIZ:EAB343 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.	699	699	95%	0.0	93.87%	MG761087.1
✓	Phaeococcomyces eucalypti CPC 17606 ITS region; from TYPE material	699	699	100%	0.0	92.40%	NR_120226.2
✓	Phaeococcomyces eucalypti culture-collection CPC:17606 18S ribosomal RNA gene	699	699	100%	0.0	92.40%	KC005769.1
✓	Uncultured fungus genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene,	697	697	100%	0.0	92.29%	HG764547.1
✓	Uncultured fungus genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene,	697	697	100%	0.0	92.29%	HG764529.1

Figure 22 : Liste des quinze premiers résultats d'identification de l'échantillon 18 sur le site NCBI blastn

- Échantillon 24 : Le fragment amplifié de plus de 500 pb est de bonne qualité donnant après analyse informatique un score d'identification > 94% (associé à un Query Cover > 95%) permettant l'identification au rang de genre uniquement d'*Acremonium* sp. (Figure 23).

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
✓	Fungal endophyte sp. SS-1489 5.8S rRNA gene, ITS1 and ITS2, isolate 1489	878	878	95%	0.0	100.00%	AM262378.1
✓	Acremonium sp. L17_BA internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribos	793	793	94%	0.0	97.04%	KX098313.1
✓	Acremonium sp. AT10 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosom	780	780	94%	0.0	96.62%	KT377204.1
✓	Uncultured fungus clone CMH100 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; inter	773	773	99%	0.0	94.48%	KF800191.1
✓	Acremonium breve culture MUT<ITA>;4975 internal transcribed spacer 1, partial se	771	771	99%	0.0	94.47%	KY081463.1
✓	Acremonium sp. 3 MMW-2015 strain OUCMBI110137 internal transcribed spacer 1,	769	769	100%	0.0	94.29%	KP269047.1
✓	Sarocladium sp. isolate SFC101632 small subunit ribosomal RNA gene, partial seq	767	767	99%	0.0	94.28%	MF186051.1
✓	Acremonium breve strain CBS 150.62 ex type internal transcribed spacer 1, partial :	758	758	98%	0.0	94.39%	MH424706.1
✓	Parasarocladium radiatum CBS 142.62 ITS region; from TYPE material	756	756	99%	0.0	93.89%	NR_161112.1
✓	Hypocreales sp. HWJ2(1) 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal trans	756	756	99%	0.0	93.89%	KM268693.1

Figure 23 : Liste des dix premiers résultats d'identification de l'échantillon 24 sur le site NCBI blastn

- Échantillon 48 : Le score d'identification de cet échantillon est de plus de 97% avec un Query Cover à 100% permettant d'identifier au rang de genre *Phellinus* sp. (Figure 24). Étant donné que sur les dix premiers résultats seulement deux sont en faveur de l'espèce *Phellinus mori*, il semble plus prudent d'identifier cette souche uniquement au rang de genre.

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
✓	Basidiomycota sp. P19 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcri	793	793	100%	0.0	100.00%	KF615758.1
✓	Phellinus mori voucher Dai8309 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; interne	737	737	100%	0.0	97.90%	FJ627259.1
✓	Phellinus mori genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and t	732	732	100%	0.0	97.67%	LC002815.1
✓	Phellinus sp. JV-2017a 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcri	588	588	99%	9e-164	92.07%	KY230518.1
✓	Phellinus spiculosus CBS 345.63 ITS region; from TYPE material	544	544	100%	2e-150	90.26%	NR_160093.1
✓	Phellinus spiculosus strain KTCC 6658 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosom	544	544	100%	2e-150	90.26%	AY558648.1
✓	Phellinus ellipsoideus voucher MUCL47822 internal transcribed spacer 1, partial se	492	492	92%	7e-135	89.28%	JQ837954.1
✓	Phellinus ellipsoideus voucher MUCL47866 18S ribosomal RNA gene, partial seque	492	492	92%	7e-135	89.28%	JQ837953.1
✓	Phellinus ellipsoideus voucher Cui 4270 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	492	492	92%	7e-135	89.28%	JQ837948.1
✓	Phellinus ellipsoideus voucher Cui 6622 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	492	492	92%	7e-135	89.28%	JQ837951.1

Figure 24 : Liste des dix premiers résultats d'identification de l'échantillon 48 sur le site NCBI blastn

- Échantillon 52 : La séquence de près de 500 pb a abouti à un score d'identification très élevé de 99,60% (avec un Query Cover de 100%) avec trois souches recensées dans la base de données NCBI (Figure 25). Cependant ces trois souches ne sont référencées qu'au niveau de genre *Penicillium* sp..

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
✓	Penicillium sp. STE-U 6575 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tran	904	904	100%	0.0	99.60%	FJ491806.1
✓	Penicillium sp. I74 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed s	902	902	100%	0.0	99.60%	FJ491808.1
✓	Penicillium sp. STE-U 6576 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tran	902	902	100%	0.0	99.60%	FJ491807.1
✓	Penicillium sp. A94 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal R	784	784	94%	0.0	97.00%	KT898660.1
✓	Talaromyces dendriticus isolate Sp-VIII-2.2 small subunit ribosomal RNA gene, partia	678	678	100%	0.0	91.92%	MF476038.1
✓	Talaromyces dendriticus isolate Sp-VII-2.1 small subunit ribosomal RNA gene, partial	678	678	100%	0.0	91.92%	MF476033.1
✓	Talaromyces dendriticus isolate Sp-VII-1.1 small subunit ribosomal RNA gene, partial	678	678	100%	0.0	91.92%	MF476031.1
✓	Talaromyces dendriticus CBS 660.80 ITS region; from TYPE material	675	675	100%	0.0	91.73%	NR_167968.1
✓	Talaromyces dendriticus isolate A66A 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; in	675	675	100%	0.0	91.72%	JQ781816.1
✓	Talaromyces dendriticus isolate A64E 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; in	675	675	100%	0.0	91.72%	JQ781810.1

Figure 25 : Liste des dix premiers résultats d'identification de l'échantillon 52 sur le site NCBI blastn

Dans l'ensemble, sur les 53 échantillons candidats au séquençage (en échec d'identification par MALDI/TOF), 85% ont été correctement identifiés au rang de genre et d'espèce lors du premier passage avec les amorces ITS1/ITS4 et ~6% ont abouti à une identification au rang de genre seulement.

6.2. Seconde intention : séquençage des régions LSU et TEF1-alpha

En prenant en compte les échantillons non amplifiés (n°19, 21 et 42) et les échantillons non identifiés présentant possiblement un intérêt clinique (n°1, 18 et 24), six échantillons ont nécessité une investigation supplémentaire notamment à l'aide des deux autres couples d'amorces : LROR/LR5 (LSU) et EF1-1018F/EF1-1620R (TEF1-alpha).

La première PCR d'amplification, d'une part avec les amorces LROR/LR5 et d'autre part avec les amorces EF1-1018F/EF1-1620R, a été vérifiée par migration sur gel d'agarose (Figure 26). Les six échantillons ont été amplifiés avec la région LSU tandis que quatre échantillons ont été amplifiés avec la région TEF1-alpha.

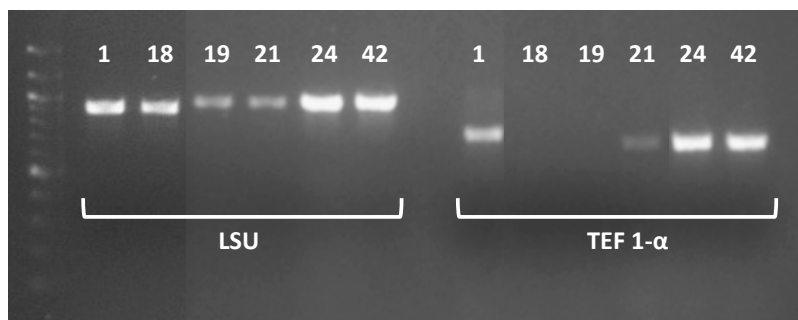


Figure 26 : Révélation de l'amplification sur gel d'agarose des échantillons 1, 18, 19, 21, 24 et 42 après PCR LSU et TEF1-alpha.

Ensuite, sur chacun des amplicons, une PCR séquence a été effectuée avec les amorces anti-sens LR5 (LSU) et EF1-1620R (TEF1-alpha). Les résultats sont présentés dans les tableaux XV et XVI.

6.2.1 Séquençage de la région LSU

Des séquences exploitables pour la région LSU ont été obtenues en utilisant l'amorce anti-sens LR5 pour les six souches (Tableau XV). Les échantillons n°18 et 24, avec un score d'identification > 98%, ont tous deux été identifiés avec succès et concordent avec l'aspect macroscopique / microscopique ainsi qu'avec les identifications préliminaires obtenues avec la région ITS.

Tableau XV : Identifications des échantillons 1, 18, 19, 21, 24 et 42 après séquençage de la région LSU.

LSU (LROR/LR5)						
N°	Nature de prélèvement	Taille séquence étudiée (pb)	Identification NCBI	Query Cover (%)	Score d'identification (%)	Aspect macroscopique et microscopique cohérent
1	SOUCHE	528	<i>Mucor sp.</i>	100	95,08	Non
18	CUTANE	561	<i>Phaeococcomyces eucalypti</i>	100	98,93	Oui
19	CUTANE	492	<i>Trichophyton violaceum / rubrum / interdigitale / tonsurans</i>	100	99,80 / 99,80 / 99,39 / 99,39	Oui
21	CUIR CHEVELU	582	<i>Trichophyton rubrum / tonsurans / interdigitale</i>	100	99,66 / 99,49 / 99,49	Oui
24	CUTANE	521	<i>Acremonium breve</i>	100	98,27	Oui
42	CUIR CHEVELU	573	<i>Trichophyton violaceum / rubrum / interdigitale / tonsurans</i>	100	99,65 / 99,65 / 99,48 / 99,48	Oui

Concernant les échantillons n°19, 21 et 42, lors de l'alignement des séquences sur blastn NCBI, ils ont présenté des identifications différentes pour un même score d'identification ; il est à noter que ces trois échantillons appartiennent au genre *Trichophyton* suggérant des espèces très proches phylogénétiquement.

Par ailleurs l'échantillon n°1 n'a pas abouti à une identification correcte. Avec un score d'identification médiocre de 95% et la non-compatibilité de l'aspect microscopique, la conclusion débouche sur le même résultat qu'avec la région ITS.

6.2.2 Séquençage de la région TEF1-alpha

Pour la région TEF1-alpha, les échantillons n°18 et 19 n'ont pas été amplifiés lors de la première PCR (Tableau XVI).

Tableau XVI : Identifications des échantillons 1, 18, 19, 21, 24 et 42 après séquençage de la région TEF1-alpha. NA = Non Amplifié

TEF 1- α (EF1-1018F/EF1-1620R)						
N°	Nature de prélèvement	Taille séquence étudiée (pb)	Identification NCBI	Query Cover (%)	Score d'identification (%)	Aspect macroscopique et microscopique cohérent
1	SOUCHE	524	<i>Mucor indicus</i>	100	96,38	Non
18	CUTANE	NA	NA	-	-	-
19	CUTANE	NA	NA	-	-	-
21	CUIR CHEVELU	503	<i>Trichophyton violaceum / rubrum</i>	100	100 / 99,80	Oui
24	CUTANE	513	<i>Acremonium sp.</i>	100	93,76	Oui
42	CUIR CHEVELU	578	<i>Trichophyton rubrum</i>	100	100	Oui

L'échantillon n°24, avec un score d'identification de près de 94% n'a permis qu'une identification au rang de genre, et donc n'apporte pas d'information supplémentaire que lors du séquençage de la région ITS.

L'échantillon n°42 a été correctement identifié au rang d'espèce avec un score d'identification de 100%.

Concernant l'échantillon n°21, lui aussi du genre *Trichophyton*, deux propositions d'identification ressortent avec un score relativement semblable.

Quant à l'échantillon n°1, malgré le Query Cover de 100% et le score d'identification de plus de 96%, la proposition d'identification dans la classe des mucorales n'est en rien compatible avec les données macroscopiques et microscopiques de la culture.

7. Comparaison des identifications par séquençage de la région ITS avec les régions LSU et TEF1-alpha

À partir des échantillons bien identifiés grâce au séquençage de la région ITS, le choix s'est porté sur huit échantillons diversifiés pour comparer les résultats obtenus avec les deux autres régions LSU et TEF1-alpha. À ces échantillons, deux souches de référence ont été ajoutées pour valider l'amplification et le séquençage.

La première PCR d'amplification, vérifiée par révélation sur gel d'agarose, a permis d'amplifier la totalité des échantillons que ce soit avec les amorces LROR/LR5 (LSU) ou EF1-1018F/EF1-1620R (TEF1-alpha) (Figure 27).

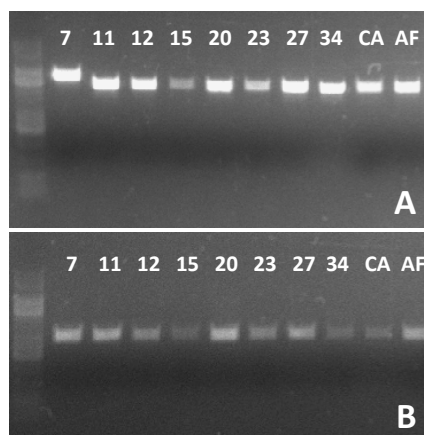


Figure 27 : Révélation de l'amplification sur gel d'agarose des échantillons 7, 11, 12, 15, 20, 23, 27, 34 et des souches de référence *C. albicans* (CA) et *A. fumigatus* (AF). A : PCR LSU / B : PCR TEF1-alpha

Les tableaux XVII et XVIII présentent respectivement les résultats d'identification après les PCR LSU et TEF1-alpha. Après séquençage de la région

LSU, tous les échantillons ont été identifiés avec un score > 99% et un Query Cover de 100%. Les identifications se sont avérées identiques à celles obtenues avec le séquençage de la région ITS à l'exception de l'échantillon n°34.

Tableau XVII : Identifications des échantillons 7, 11, 12, 15, 20, 23, 27, 34 et des souches de référence *C. albicans* (CA) et *A. fumigatus* (AF) réalisées avec les amorces LROR/LR5 (LSU) et concordance avec l'identification via la région ITS. RG = Rang de Genre

LSU (LROR/LR5)					
N°	Taille séquence (pb)	Identification NCBI	Query Cover (%)	Score d'identification (%)	Identification ITS identique
7	579	<i>Cephalotrichum gorgonifer</i>	100	100	Oui
11	573	<i>Scedosporium boydii</i>	100	100	Oui
12	529	<i>Trichophyton benhamiae</i>	100	99,81	Oui
15	575	<i>Candida tropicalis</i>	100	99,83	Oui
20	467	<i>Microsporium canis</i>	100	100	Oui
23	524	<i>Aspergillus flavus</i>	100	100	Oui
27	520	<i>Onychocola canadensis</i>	100	99,81	Oui
34	529	<i>Exophiala dermatitidis</i> / <i>E. phaeomuriformis</i>	100	99,81	RG
CA	524	<i>Candida albicans</i>	100	99,81	Oui
AF	467	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	99,79	Oui

En effet, l'échantillon n°34 pour lequel il avait été conclu à un *Exophiala phaeomuriformis* avec la région ITS, donne ici avec la région LSU le choix entre *Exophiala dermatitidis* et *Exophiala phaeomuriformis*. Les scores entre ces deux résultats sont strictement identiques tout comme les séquences de référence.

Tableau XVIII : Identifications des échantillons 7, 11, 12, 15, 20, 23, 27, 34 et des souches de référence *C. albicans* (CA) et *A. fumigatus* (AF) réalisées avec les amorces EF1-1018F/EF1-1620R (TEF1-alpha) et concordance avec l'identification via la région ITS. NI = Non Identifié ; RG = Rang de Genre

TEF 1- α (EF1-1018F/EF1-1620R)					
N°	Taille séquence (pb)	Identification NCBI	Query Cover (%)	Score d'identification (%)	Identification ITS identique
7	525	<i>Cephalotrichum gorgonifer</i>	100	100	Oui
11	499	<i>Scedosporium boydii</i>	99	100	Oui
12	525	<i>Trichophyton benhamiae</i>	100	99,62	Oui
15	515	<i>Candida tropicalis</i>	100	100	Oui
20	520	<i>Microsporium canis</i>	100	100	Oui
23	560	<i>Aspergillus flavus</i>	100	100	Oui
27	492	NI	-	-	-
34	284	<i>Exophiala</i> sp.	100	93,3	RG
CA	488	<i>Candida albicans</i>	100	99,8	Oui
AF	499	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	100	Oui

Après séquençage de la région TEF1-alpha, parmi les huit échantillons six ont donné des identifications semblables à celles obtenues avec la région ITS. L'échantillon n°27 n'a pas pu être identifié car cette séquence n'a pas été reconnue par la base de données NCBI. Quant à l'échantillon n°34, il n'a été identifié qu'au rang de genre, du fait des résultats divergents au rang d'espèce avec un score d'identification médiocre.

8. Contexte clinique et pathogénicité

Dans le cadre de ce mémoire de thèse, la pathogénicité de chaque souche identifiée a été étudiée à l'aide d'une recherche bibliographique pour juger de la pertinence du séquençage des isolats séquencés qui n'ont pas été identifiés par MALDI/TOF. Par ailleurs, quand il était disponible, le contexte clinique de chaque patient, dont le prélèvement a mis en évidence une ou plusieurs souches

séquencées, a été examiné. Les points principalement retenus ont été la présence ou non d'une immunodépression ou d'une pathologie respiratoire. Ces différentes données sont synthétisées dans le tableau XIX.

En ce qui concerne le contexte clinique des patients pour qui un séquençage a été nécessaire pour l'identification, il n'a pas été consultable pour six d'entre eux ; soit parce qu'il s'agissait de souches provenant d'un autre établissement sans renseignements cliniques (n=2), soit parce que le compte rendu clinique du CHU n'était pas consultable (n=4). Parmi les patients au contexte clinique investigué, la présence d'une proportion importante de patients présentant une immunodépression (30%, n=16) ou atteints de mucoviscidose (15%, n= 8) a été notée. Les causes d'immunodépression retrouvées sont multiples : pathologies tumorales, hémopathies malignes, traitements immunosuppresseurs (méthotrexate, biothérapie, corticothérapie au long court, etc.). Quant aux patients présentant un syndrome interstitiel radiologique, une BPCO, une pneumopathie interstitielle diffuse, une bronchiectasie ou une pneumopathie infectieuse, ils ont été regroupés sous le terme de « pathologie respiratoire » (17%, n=9). Pour ce qui est des prélèvements superficiels à la recherche de dermatophytes (26%, n=14), ils ont été effectués dans les services de soins ou au sein du centre de prélèvement du laboratoire et ne présentent pas de contexte particulier hormis la clinique évocatrice.

Parmi les espèces identifiées, 43% (n=22) sont des pathogènes connus et impliqués en pathologie humaine (*Aspergillus* sp., *Candida* sp., *Acremonium* sp., *Trichophyton* sp., *Scedosporium* sp., etc.) ; d'autres, près de 18% (n=9), sont considérés comme des pathogènes possibles, c'est-à-dire qu'ils n'ont été que peu décrits dans la littérature bien que plusieurs cas d'infections avérées aient été recensés (*Microascus* sp., *Phialemonium* sp., *Rhinoctadiella* sp., etc.). Par ailleurs, 39% (n=20) des souches identifiées correspondent à des espèces fongiques non décrites actuellement en pathologie humaine.

Tableau XIX : Liste des identifications obtenues avec le séquençage des régions ITS et/ou LSU et TEF1-alpha, contexte clinique et revue bibliographique de la pathogénicité des souches.

NI = Non identifié ; ID = Immunodépression ; PR = Pathologie respiratoire ; HM = Hémopathie maligne ; Muco. = Mucoviscidose ; BPCO = Bronchopneumopathie chronique obstructive ; RD = Recherche de dermatophytes ; K = Pathologie tumorale ; IS = Immunosuppresseur ; ND = Non décrit ; +/- = pathogène possible (peu de description) ; Φ = Phytopathogène

N°	Nature de prélèvement	Identification	Espèce déjà rencontrée au MALDI/TOF	Contexte clinique	Souche pathogène connue ?	Réf.
1	SOUCHE	NI	NI	ID (HM)	NI	-
2	EXPECTORATION	<i>Polyporus brumalis</i>	Non	Muco.	ND	-
3	LBA	<i>Calosphaeria pulchella</i>	Non	BPCO / PR	ND Φ	(46)
4	ASPI BRONCHIQUE	<i>Rhinocladiella similis</i>	Non	PR	+/-	(47,48)
5	CRACHAT	<i>Phialemonium inflatum</i>	Oui	Muco.	+/-	(49,50)
6	CRACHAT	<i>Phoma fimeti</i>	Non	Muco.	+/-	(51,52)
7	LBA	<i>Cephalotrichum gorgonifer</i>	Non	PR	ND	-
8	LBA	<i>Microascus cirrosus</i>	Non	BPCO / PR	+/- Φ	(53-57)
9	CUTANE	<i>Trichophyton rubrum</i>	Oui	RD	Oui	(58,59)
10	ASPI PHARYNGEE	<i>Pseudopithomyces chartarum</i>	Non	Muco.	+/- Φ	(60,61)
11	CRACHAT	<i>Scedosporium boydii</i>	Oui	Muco.	Oui	(62)
12	CUTANE	<i>Trichophyton benhamiae</i>	Oui	RD	Oui	(58,59)
13	ASPI BRONCHIQUE	<i>Radulidium subulatum</i>	Non	PR	ND	-
14	PBDP	<i>Trametes hirsuta</i>	Non	PR	ND	-
15	ASPI BRONCHIQUE	<i>Candida tropicalis</i>	Oui	ID (K)	Oui	(63)
16	LBA	<i>Candida tropicalis</i>	Oui	ID (K)	Oui	(63)
17	ASPI BRONCHIQUE	<i>Paraconiothyrium variabile</i>	Non	ID (IS)	ND	-
18	CUTANE	<i>Phaeococcomyces eucalypti</i>	Non	RD	ND	-
19	CUTANE	<i>Trichophyton sp.</i>	-	RD	Oui	(58,59)
20	CUTANE	<i>Microsporum canis</i>	Oui	RD	Oui	(58,59)
21	CUIR CHEVELU	<i>Trichophyton sp.</i>	-	RD	Oui	(58,59)
22	LBA	<i>Phialemonium atrogriseum</i>	Non	ID	+/-	(49,50)
23	ASPI BRONCHIQUE	<i>Aspergillus flavus</i>	Oui	ID (IS)	Oui	(63)
24	CUTANE	<i>Acremonium breve</i>	Non	RD	Oui	(64)
25	LBA	<i>Coprinopsis strossmayeri</i>	Non	ID (K)	ND	-

N°	Nature de prélèvement	Identification	Espèce déjà rencontrée au MALDI/TOF	Contexte clinique	Souche pathogène connue ?	Réf.
26	CRACHAT	<i>Montagnula scabiosae</i>	Non	Muco.	ND	-
27	SOUCHE	<i>Onychocola canadensis</i>	Non	-	Oui	(65)
28	CUTANE	<i>Acremonium breve</i>	Non	RD	Oui	(64)
29	ONGLES	<i>Onychocola canadensis</i>	Non	RD	Oui	(65)
30	LBA	<i>Absidia glauca</i>	Non	ID (K)	ND	-
31	ASPI BRONCHIQUE	<i>Abortiporus biennis</i>	Non	PR	ND	-
32	ASPI BRONCHIQUE	<i>Microascus cirrosus</i>	Non	-	+/-	(53-57)
33	LBA	<i>Microdochium bolleyi</i>	Non	ID	ND Φ	(66)
34	CUTANE	<i>Exophiala phaeomuriformis</i>	Oui	RD	Oui	(67)
35	CRACHAT	<i>Neocucurbitaria keratinophila</i>	Non	ID (IS)	+/-	(68)
36	CRACHAT	<i>Leptosphaeria biglobosa</i>	Non	ID (IS)	ND Φ	(69)
37	ASPI BRONCHIQUE	<i>Peniophora lycii</i>	Non	ID (K)	ND	-
38	ASPI BRONCHIQUE	<i>Phlebia tremellosa</i>	Non	ID (K)	ND	-
39	LBA	<i>Physisporinus vitreus</i>	Non	ID (IS)	ND	-
40	LIQUIDE ABDOMINAL	<i>Scopulariopsis candida</i>	Oui	-	Oui	(70-72)
41	CRACHAT	<i>Rasamsonia piperina</i>	Oui	Muco.	Oui	(73)
42	CUIR CHEVELU	<i>Trichophyton sp.</i>	-	RD	Oui	(58,59)
43	ASPI PHARYNGEE	<i>Scopulariopsis brumptii</i>	Non	Muco.	Oui	(70-72)
44	CUTANE	<i>Trichophyton interdigitale</i>	Oui	RD	Oui	(58,59)
45	SOUCHE	<i>Acremonium persicinum</i>	Non	-	Oui	(64)
46	LBA	<i>Cephalotrichum gorgonifer</i>	Non	-	ND	-
47	CUTANE	<i>Trichophyton bennhamiae</i>	Oui	RD	Oui	(58,59)
48	ASPI BRONCHIQUE	<i>Phellinus sp.</i>	-	-	ND	-
49	ASPI BRONCHIQUE	<i>Trametes versicolor</i>	Oui	ID (K)	ND	-
50	PEAU	<i>Exophiala lecanii-corni</i>	Non	RD	Oui	(74)
51	CRACHAT	<i>Pyrenochaeta uniguis-hominis</i>	Oui	PR	+/-	(75)
52	ASPI BRONCHIQUE	<i>Penicillium sp.</i>	-	PR	-	-
53	LBA	<i>Perenniporia medulla-panis</i>	Non	ID (K)	ND	-

V. Discussion

Au sein du laboratoire, sur l'année 2019-2020, près de 94% des identifications réalisées par MALDI/TOF microflex (Bruker) ont été correctement identifiées au complexe d'espèces après analyse des spectres sur la plateforme MSI (Mass Spectrometry Identification). Ce résultat est comparable à ceux de la littérature, notamment de l'article de Dupont et al. (étude française de 2018) qui, sur un panel de 102 champignons filamenteux reflétant la diversité épidémiologique au sein d'un laboratoire, obtint un taux d'identification de plus de 92% au complexe d'espèces sur automate MALDI/TOF microflex (Bruker) et analyse des spectres via MSI (76). Cependant, les résultats de cette analyse rétrospective au laboratoire ont démontré la persistance d'un échec d'identification pour un pourcentage non négligeable de souches par MALDI-TOF (5,5% ; n=81 sur une année) ; d'où la nécessité de ce travail de thèse visant à développer une alternative efficace d'identification fongique au rang d'espèce.

À l'heure actuelle, l'automate MALDI-TOF microflex et son système informatique associé commercialisé par Bruker, ne disposent pas d'une base de données suffisamment exhaustive pour les champignons filamenteux à l'inverse des levures qui sont plus représentées (77,78). Malgré la participation de la société Bruker au projet international « MBT Filamentous Fungi Library » pour enrichir sa base de données, celle-ci reste insuffisante (seulement 180 espèces de champignons filamenteux recensées dans la version 3.0 de mars 2019) (79). En 2020, la plateforme MSI quant à elle comptabilise 1274 espèces de référence incluant levures et filamenteux (80,81). Plusieurs articles corroborent le fait que MSI est la base de données en spectrométrie de masse qui présente le plus fort taux d'identification pour les espèces fongiques (82,83). L'étude canadienne de Stein et al. en 2018 a évalué les performances de l'automate MALDI/TOF microflex (Bruker) en utilisant trois bases de données (Bruker Library, National Institutes of Health Library (NIH) et MSI) comparées aux méthodes conventionnelles d'identification (morphologiques), le tout évalué suite à l'identification par biologie moléculaire (séquençage ITS). Il s'est avéré que MSI a montré un taux d'identification au rang d'espèce nettement supérieur aux autres bases de données (72% vs 19,5% et

13,6%) ainsi que comparé aux méthodes conventionnelles (31,7%). Les isolats non identifiés l'étaient en raison de spectres de mauvaise qualité (probable problème d'extraction) ou de lacunes dans les bases de données. Ces résultats ont été confirmés dans l'étude de Heireman et al. de 2020 où les performances d'identification au rang d'espèce ont là encore été supérieures via l'utilisation de MSI (version 2018) versus la bibliothèque Bruker (version 2.0) : 92% d'identification correcte versus 73% sur 75 champignons filamenteux.

Suite à l'analyse rétrospective des espèces identifiées au MALDI/TOF sur l'année 2019/2020, une comparaison a été effectuée avec les souches séquencées dans ce travail. Il s'avère que parmi les champignons correctement identifiés au rang d'espèce par la technologie optimisée de séquençage n'ayant pas obtenu d'identification fiable par MALDI/TOF / MSI, plus de 68% (n=32) n'ont jamais été rencontrés au laboratoire en 2019/2020 (Annexe 4). Cela est potentiellement lié à la base de données non exhaustive de la plateforme MSI, qui inclut pour l'instant majoritairement des souches d'intérêt clinique prouvé. D'ailleurs, parmi les souches séquencées ayant déjà eu un homologue identifié par MALDI/TOF au laboratoire, plus de 80% étaient des pathogènes connus (n=12).

Bien que constamment enrichies par de nouveaux spectres, les banques de données constituent encore aujourd'hui la limite majeure des identifications par MALDI/TOF à cause de leur manque d'exhaustivité. Les spectres incrémentés s'appuient systématiquement sur des données morphologiques et de biologie moléculaire pour garantir la fiabilité des données. Par ailleurs, la pureté des cultures et la qualité de la technique d'extraction avant passage au MALDI/TOF conditionnent grandement la qualité des spectres obtenus et donc des résultats. Des différences significatives des spectres de champignons filamenteux sont observées selon si la technique a été effectuée à partir de colonies jeunes ou matures ; de ce fait il est nécessaire que les bases de données incorporent plusieurs spectres pour une même espèce dans des conditions différentes pour améliorer le taux d'identification (84).

L'analyse des données de la littérature a démontré que nous utilisons le couple MALDI/TOF – banque de données de la manière la plus performante décrite actuellement, à savoir : l'association MALDI/TOF microflex (Bruker) couplée à l'analyse informatique via MSI. Cependant, certains isolats ont nécessité plusieurs

repasses au MALDI/TOF avant d'aboutir à un résultat d'identification convenable. Les résultats ont finalement démontré qu'un seul essai d'identification supplémentaire, lorsque la première identification par MALDI/TOF était infructueuse, permettait de récupérer un nombre non négligeable d'identifications fiables au rang d'espèce (la plupart des tentatives supplémentaires se soldant par un échec). Il est néanmoins intéressant de soulever l'observation de fluctuations dans l'identification correcte des souches par MALDI/TOF au début de chaque semestre. Ce travail de routine est confié aux internes du laboratoire et ces fluctuations semblent en partie expliquées par le délai de formation des nouveaux internes car une certaine expérience technique est requise pour obtenir une identification correcte. Il semble donc pertinent d'augmenter temporairement le nombre de repasses en cas d'un premier échec d'identification au MALDI/TOF en début de formation des internes. Il apparaît donc que l'expertise technique humaine est également un facteur important à prendre en compte pour une efficacité optimale de cette technique. Il est ressorti de ce travail qu'en cas d'un échec d'identification au rang d'espèce par technique MALDI/TOF – MSI au bout de deux tentatives (en période où le personnel est déjà habilité), il apparaissait judicieux de proposer une identification par séquençage.

Après quelques étapes d'optimisation technique (extraction automatisée, utilisation de l'amorce anti-sens de façon préférentielle), les travaux de cette thèse ont abouti à la mise en pratique d'une technique de séquençage aux performances maîtrisées et satisfaisantes (près de 89% d'identification au rang d'espèce après séquençage de la région ITS associé ou non aux régions LSU et TEF1-alpha). En outre, même un signal faible lors de la révélation a de grandes chances d'aboutir à une séquence exploitable. Au vu de la robustesse de la technique, le passage en duplicata de chaque isolat ne semble pas nécessaire. Aussi, il a été démontré qu'il était possible de séquencer directement à partir de souches congelées et ce avec des performances similaires que lors du travail à partir de souches jeunes en culture. Ceci signifie qu'un séquençage efficace des souches est possible *a posteriori* (si la souche a été congelée) et même en s'affranchissant des problèmes de culture après décongélation ; que ce soit à visée épidémiologique ou par demande différée du clinicien selon confrontation des données clinico-biologiques.

Concernant les tests de la limite de détection effectués à partir des différents couples d'amorces et selon les deux méthodes d'extraction sur deux souches de référence, il a été démontré une meilleure sensibilité avec *A. fumigatus* comparé à *C. albicans* (10^1 UFC/mL versus 10^4 UFC/mL avec ITS en extraction EZ1) ainsi qu'une meilleure efficacité de l'extraction par EZ1 versus PowerFecal. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cela. D'une part, l'obtention d'une DO précise avec des champignons filamenteux est plus complexe que pour des levures et celle-ci pourrait différer quant à l'équivalence en UFC/mL comparativement aux levures (théoriquement 0,5 McFarland équivaut à 10^7 UFC/mL). D'autre part, selon l'espèce fongique, l'extraction par PowerFecal pourrait entraîner une destruction trop importante des fragments d'ADN liée à la lyse mécanique et thermique intense entraînant une perte de sensibilité. Enfin, les gènes codant pour l'ARN ribosomal apparaissent en de multiples copies en tandem qui peuvent varier en nombre d'occurrences d'une espèce fongique à une autre et donc faciliter ou non l'amplification (85). Ainsi les limites de détection semblent varier grandement en fonction des espèces fongiques, ce fait devrait être confirmé sur un plus large panel de champignons.

Lors des tests de comparaison de la technique MALDI/TOF versus séquençage une discordance a été observée sur l'une des souches, à savoir une identification différente au rang d'espèce (*Candida kefyr* par MALDI/TOF, *Candida parapsilosis* par séquençage). Après étude du dossier concernant ce prélèvement d'urines, il s'est avéré qu'une antériorité de 3 jours avait mis en évidence un *Candida parapsilosis* dans les urines de ce même patient. De ce fait, il est envisageable de penser que la culture initiale n'ait pas été pure ; de manière générale sur gélose CAN2 (BioMérieux) les colonies de *C. kefyr*, grâce à l'hydrolyse d'un substrat spécifique, apparaissent roses, cependant ce n'est pas toujours le cas, le délai de culture jouerait là-dessus (observation de colonies blanches au bout de 24h de culture possible). Le séquençage a été effectué à partir d'un repiquage du bouillon congelé, en culture un seul type de colonies blanches a été observé même après 48h de culture sur gélose CAN2. Il est possible que lors de la congélation initiale un seul type de colonies ait été prélevé et conservé expliquant le résultat du séquençage. Le repiquage ayant servi au séquençage a été réanalysé par technique

MALDI/TOF et a cette fois-ci identifié également un *Candida parapsilosis*. Ceci ne remet donc pas en cause la technique de séquençage ni la technique MALDI/TOF.

Suite à l'optimisation technique du séquençage réalisée dans le cadre de ce travail, pour l'identification des souches inconnues, il a été décidé en première intention de réaliser une PCR ITS avec les amorces ITS1/ITS4. Sur 53 échantillons 50 ont été amplifiés avec succès soit 94% et 45/50 ont abouti à une identification correcte au rang d'espèce ; ces résultats se rapprochent de ceux obtenus par Stielow et al. (24). L'étude internationale de Stielow et al., testant sur plus de 1 500 espèces fongiques l'efficacité de l'amplification de plusieurs couples d'amorces, a montré une PCR d'amplification réussie pour plus de 92% de tous les taxons étudiés avec la région ITS.

Concernant deux échantillons partiellement identifiés (au rang du genre) après le séquençage de la région ITS (échantillons 48 et 52), il a été décidé de ne pas investiguer plus loin, c'est à dire au rang d'espèce. En effet, l'échantillon 48, du genre *Phellinus* sp. est un basidiomycète qui n'a pas été décrit comme étant impliqué en pathologie humaine, il est donc considéré, jusqu'à preuve du contraire, comme ne présentant pas de risque infectieux pour l'Homme. Quant à l'échantillon 52, identifié au rang du genre *Penicillium* sp., il est probable qu'il s'agisse d'un portage asymptomatique chez le patient au vu du contexte clinique (patient consultant en chirurgie ambulatoire pour une pneumopathie interstitielle diffuse). Par ailleurs, le lavage bronchoalvéolaire prélevé conjointement a retrouvé un *Penicillium glabrum*, probablement la même souche que celle incriminée dans l'aspiration bronchique. Les infections constatées au genre *Penicillium* sp. sont très rares, hormis celles à *Penicillium marneffeii*, champignon endémique de l'Asie du Sud-Est, responsable d'infections opportunistes (86).

En seconde intention, pour les six échantillons non amplifiés ou non identifiés avec la région ITS, il a été décidé de tester les amorces des régions LSU et TEF1-alpha. D'une part, avec les amorces LROR/LR5 (LSU), la totalité des souches (n=6) a pu être amplifiée et séquencée ; cependant seulement deux échantillons (n°18 et 24) ont obtenu une identification correcte au rang de genre et d'espèce. D'autre part,

avec les amorces EF1-1018F/EF1-1620R (TEF1-alpha), deux échantillons n'ont pas été amplifiés, et sur les quatre échantillons amplifiés, seuls trois ont obtenu une identification correcte au rang de genre.

Au cours de l'analyse informatique, la discrimination entre plusieurs espèces a semblé médiocre du fait de scores d'identification similaires au rang d'espèce pour le genre *Trichophyton* sp. notamment avec les amorces LROR/LR5 (LSU). Ceci suggère qu'au sein de ce genre, certaines espèces sont très proches phylogénétiquement. L'identification des dermatophytes, et en particulier celle des *Trichophyton* sp., est connue pour être compliquée de par leurs variations morphologiques et la variabilité de leurs caractères cultureux. À l'inverse, certaines espèces ne sont pas distinguables macroscopiquement et microscopiquement. Naturellement l'identification au laboratoire de ces champignons pathogènes est toujours à combiner au contexte clinique. La nomenclature des dermatophytes a été révisée en 2016 avec l'utilisation de la biologie moléculaire, ce qui a eu pour effet de nombreux réarrangements taxonomiques (87). Les relations phylogénétiques entre les différentes espèces se sont basées sur une étude multi-locus et le genre *Trichophyton* a été réduit à une quinzaine d'espèces (*T. benhamiae*, *T. bullosum*, *T. concentricum*, *T. equinum*, *T. eriotrephon*, *T. erinacei*, *T. interdigitale*, *T. mentagrophytes*, *T. quinckeanum*, *T. rubrum*, *T. schoenleinii*, *T. simii*, *T. soudanense*, *T. tonsurans*, *T. verrucosum*, *T. violaceum*) (88).

Pour le diagnostic des dermatophytes, le séquençage de la région ITS est conseillé, cependant certaines espèces restent difficilement distinguables, c'est le cas par exemple de *T. violaceum*, *T. soudanense* et *T. rubrum* (89). En effet, certaines séquences ADN diffèrent parfois d'un seul nucléotide entre deux espèces proches (90). Le séquençage de la région LSU a été décrit comme moins discriminant que celui de la région ITS (87,91). Ces faits bibliographiques étayent ce qui a été observé avec les identifications incertaines lors de l'utilisation des amorces LROR/LR5 (région LSU). Néanmoins, lorsque le séquençage ITS n'est pas suffisant pour déterminer une espèce du genre *Trichophyton*, il semble pertinent de séquencer les deux autres régions LSU et TEF1-alpha pour croiser les informations. Ou éventuellement d'y ajouter le séquençage du gène de la bêta-tubuline qui aurait un pouvoir de discrimination plus important au niveau des complexes d'espèces (88). Il pourrait être intéressant de créer une base de données à partir d'espèces du genre

Trichophyton obtenues au laboratoire (préalablement identifiées par microscopie et MALDI/TOF) comprenant l'étude des régions ITS, LSU et TEF1-alpha afin de pouvoir réaliser des alignements de séquences multi-locus et permettre une identification plus assurée. Ces données pourraient être soumises à GenBank pour incrémentation parmi les séquences de référence et servir à la communauté scientifique.

Un autre problème d'identification s'est posé concernant la souche provenant d'un laboratoire extérieur (échantillon n°1), qui, malgré une séquence obtenue de bonne qualité avec les différents couples d'amorces, n'a pu être alignée avec succès avec une séquence de référence. Les scores d'identification (ITS : QC = 58%, score d'identification = 92% ; LSU : QC = 100%, score d'identification = 95% ; TEF1-alpha : QC = 100%, score d'identification = 96%) répondaient la présence de champignons du genre *Mucor* sp., cependant l'aspect macroscopique et microscopique ne concordait pas du tout avec un champignon de la classe des mucorales. Il s'agit vraisemblablement d'une souche non encore répertoriée dans cette base de données, ou du moins sans étude des régions ITS, LSU et TEF1-alpha. De ce fait, d'autres bases de données ont été recherchées au sein de l'INSDC (International Nucleotide Sequence Database Collaboration) regroupant en plus de GenBank NCBI : l'European Nucleotide Archive (ENA) de l'European Molecular Biology Laboratory (EMBL) et le DNA Data Bank of Japan (DDBJ). Ces essais d'alignements se sont également avérés infructueux (identification de *Mucor* sp.).

Les deux échantillons issus de prélèvements cutanés (n°18 et 24), l'un non identifié et l'autre identifié uniquement au rang de genre avec ITS, ont finalement été identifiés avec succès après séquençage de la région LSU. Ils ont soulevé eux aussi une lacune dans les bases de données lors de l'alignement des séquences de la région ITS. Effectivement, plusieurs souches référencées sont décrites de manière rudimentaire « Fungal sp. », « Uncultured fungus » ou encore identifiés simplement au rang d'ordre ou de genre (valable également pour les échantillons 48 et 52). Il s'agit donc encore ici d'une des limites de cette technique, à savoir une lacune des bases de données.

En effet, l'INSDC, qui inclut GenBank, représente la plus grande base de données que ce soit pour le règne animal, végétal ou fongique ; elle comprend

d'innombrables séquences nucléotidiques disponibles publiquement. Il s'agit d'une banque de séquences d'ADN collaborative alimentée par la communauté scientifique de par le monde. Chacun peut y déposer ses propres séquences issues du domaine de la recherche ou du milieu médical ; chaque donnée devant être précisément annotée. Cependant, il a été révélé que de nombreuses erreurs étaient contenues dans ces bases de données notamment dans les séquences de gènes mitochondriaux humains qui contiendraient des erreurs pour la moitié des séquences publiées (92). Alors qu'en est-il pour les séquences d'ADN fongique ? Dans l'article de Nilsson et al. publié en 2006, il a été constaté qu'environ 20% des entrées dans les bases de données publiques pourraient être incorrectement identifiées au rang d'espèce fongique et que la majorité des entrées manquent d'annotations descriptives à l'heure actuelle (93,94).

Par ailleurs, moins de 1% des 1,5 million d'espèces fongiques existantes estimées ont été séquencées pour la région ITS (93), l'échantillonnage taxonomique est donc loin d'être satisfaisant ; s'ajoutent à cela les problèmes de nomenclature avec des noms d'espèces non à jour. Avant la mise en application de l'International Code of Nomenclature (ICN), il était de pratique courante de nommer d'une manière différente les formes sexuées et asexuées d'un même champignon créant ainsi de nombreuses confusions (20). En outre, les séquences nouvellement générées dans ces bases de données sont généralement identifiées par comparaison et étude de similarités avec les autres séquences de ces mêmes bases de données et non plus par une identification taxonomique poussée (critères morphologiques, biochimiques, etc.). Les nouvelles séquences entrées dans ces bases de données peuvent ainsi être faussées et perpétuer l'erreur avec des répercussions considérables sur l'identification des espèces basée uniquement sur l'alignement de séquences ADN (95). L'approche par code-barres, méthode d'identification moléculaire basée sur la comparaison de courtes séquences ADN avec des séquences de référence, reste au cœur de l'identification des espèces fongiques ; cela dit, au vu du peu de champignons séquencés à l'heure actuelle, de la pénurie d'experts taxonomistes et le manque de rigueur scientifique, la fiabilité de ces bases de données est compromise. Le Barcode of Life Data System (BOLD) souffre des problèmes similaires étant donné qu'une proportion importante de ses séquences est extraite de GenBank.

Suite à ce constat, plusieurs projets de bases de données ont vu le jour (User-friendly Nordic ITS Ectomycorrhiza UNITE, Ribosomal Database Project RDP, etc.) (96). Néanmoins l'approche la plus intéressante semble être de résoudre les problèmes à la source, c'est à dire dans GenBank, principale base de données utilisée. C'est pourquoi NCBI a lancé le « RefSeq projet » (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>) qui ne recense que des séquences de référence bien authentifiées (ITS et LSU en moindre mesure), cependant la collection reste encore limitée pour une utilisation en pratique courante, bien que mettant en partie l'accent sur les champignons médicalement importants (en 2015 : près de 3000 séquences ITS recensées) (97). En l'occurrence ces différentes bases de données n'ont pas non plus apporté d'informations supplémentaires vis-à-vis des échantillons non identifiés ou partiellement identifiés de ce travail.

Dans l'idéal, la base de données utilisée devrait présenter un échantillonnage taxonomique convenable, contenir des données de référence correctement identifiées et annotées ainsi qu'être régulièrement mise à jour avec des noms d'espèces standardisés. Sachant que la base de données RefSeq, bien que ne comprenant que des séquences de référence, n'est à l'heure actuelle pas assez exhaustive, surtout concernant les champignons filamenteux peu représentés, il semble plus pertinent de privilégier pour l'instant la base de données GenBank. Évidemment, dans cette démarche il est essentiel de garder un esprit critique sur tous les résultats obtenus en les comparant systématiquement aux données macroscopiques et microscopiques ainsi qu'au contexte clinique. De plus, il peut être utile de croiser les informations de diverses bases de données plus ou moins spécifiques, qui régulièrement mises à jour peuvent apporter des informations de choix pour l'identification fongique en pratique courante. Au vu de l'évolutivité des techniques et bases de données, il n'est pas exclu que dans un futur proche des échantillons non identifiés aujourd'hui, puissent l'être demain.

Globalement les comparaisons des résultats du séquençage des trois régions (ITS, LSU et TEF1-alpha), bien que réalisées sur un petit nombre d'échantillons, ont été satisfaisantes. Les bases de données sont cependant moins fournies pour les régions LSU et TEF1-alpha que pour la région ITS. Ceci s'explique en partie par le

fait que la région ITS soit utilisée de plus longue date et récemment déclarée comme code-barres officiel.

Au total, avec l'utilisation en première intention de la région ITS et en seconde intention celle des régions LSU et TEF1-alpha, tous les échantillons ont été séquencés avec succès. Sur les 53 échantillons, 52 ont abouti à une identification au minimum au rang de genre, et parmi ceux-ci 47 ont été correctement identifiés au rang d'espèce soit plus de 88,6%. La question de réaliser d'emblée le séquençage des trois régions pour chaque échantillon pourrait se poser dans l'optique de limiter le temps technique en cas d'échec du séquençage ITS en première intention. En effet, de l'étape d'extraction à l'analyse informatique des séquences, deux jours de délai sont à prendre en compte (voir annexe 6). Néanmoins, au vu du coût de la technique et de la forte proportion de souches identifiées uniquement via ITS, il semble pertinent de garder les couples d'amorces LROR/LR5 (LSU) et EF1-1018F/EF1-1620R (TEF1-alpha) uniquement en deuxième intention, principalement quand l'amplification n'a pas marché au bout de deux essais avec les amorces ITS1/ITS4 (voir logigramme en annexe 5). Bien évidemment cet algorithme sera à mettre à jour en fonction de la pratique courante, après avoir eu plus de recul.

Les différents résultats ont besoin d'être consolidés avec de futures identifications, en effet relativement peu de taxons sont représentés dans ce travail et de nouvelles lacunes pourraient être soulevées.

De manière générale, l'identification au rang d'espèce est utile à plusieurs niveaux ; d'une part pour l'étude des relations phylogénétiques, d'autre part pour étudier l'épidémiologie des infections fongiques, et plus concrètement pour sélectionner rapidement (avant d'avoir les résultats d'un antifongogramme) le traitement probabiliste le plus adapté à certaines espèces fongiques. Au vu de la constante augmentation du nombre de patients présentant une immunodépression, les infections fongiques opportunistes connaissent une incidence croissante avec un net élargissement du spectre des champignons pathogènes potentiels. L'émergence de nouveaux pathogènes opportunistes est effectivement en lien avec l'augmentation de la population à risque présentant une immunodéficience acquise (infection par le

VIH, pathologies tumorales, patients greffés, traitements immunosuppresseurs, corticothérapie au long terme, etc.). L'épidémiologie des infections fongiques invasives, d'abord dominée par les espèces de *Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus*, évolue en laissant progressivement place à des champignons considérés jusqu'à lors comme des saprophytes non pathogènes pour l'Homme (98). Ces champignons, responsables d'infections fongiques émergentes, sont souvent de mauvais pronostic du fait d'un manque d'informations cliniques, du diagnostic biologique parfois complexe ainsi que de profils de résistances multiples (99,100).

Il est important de prendre en compte que les infections fongiques sont aussi présentes chez les patients immunocompétents avec habituellement une évolution plus chronique. L'évolution souvent lente avec des symptômes peu intenses et peu caractéristiques entraîne régulièrement un retard diagnostique. Bien que les formes invasives et disséminées soient plus rares chez ces patients, les atteintes pulmonaires suite à l'inhalation de spores fongiques ne sont pas exceptionnelles et il est important de pouvoir les identifier.

Concernant les souches identifiées par séquençage panfongique dans ce travail, l'analyse des données bibliographiques et cliniques a permis d'évaluer l'utilité de cette technique appliquée au laboratoire. Nous aurions pu penser que les résultats ne révéleraient principalement que des espèces sans intérêt clinique, étant donné que la première étape d'identification par MALDI/TOF couplé à la base de données MSI se focalise surtout sur des souches pathogènes connues. Or, il s'avère que la majorité des espèces identifiées par séquençage sont des pathogènes connus (43%) ou possibles (18%). Parmi ces pathogènes possibles, il est intéressant de montrer qu'ils sont majoritairement rencontrés chez des patients immunodéprimés, atteints de la mucoviscidose ou BPCO. Par conséquent, la mise au point de cette technique de séquençage est bien une technique venant se placer en complément de la technologie MALDI/TOF, puisqu'elle permet de mettre en évidence un certain nombre d'espèces fongiques non décrites au laboratoire jusqu'à maintenant. Bien que certains isolats ne présentent pas d'intérêt en pathologie humaine connu à ce jour, le fait de révéler des souches pathogènes avérées ou potentiellement émergentes démontre un intérêt clinique incontestable. *Microascus cirrosus* peut être cité en exemple, souche non identifiée par MALDI/TOF, a été retrouvé dans deux prélèvements respiratoires (dont un chez un patient présentant une BPCO) ; il s'agit

d'un pathogène opportuniste de diagnostic difficile présentant des résistances multiples (Amphotéricine B, azolés, caspofungine) rendant son identification importante pour les cliniciens (55,57). À noter également, entre autres, la présence de *Neocucurbitaria keratinophila* dans un crachat d'un patient immunodéprimé ; ce champignon opportuniste émergent est décrit en Espagne depuis plusieurs années, causant principalement des mycoses superficielles mais pourrait se propager (68).

Les résultats de ce travail de thèse ont abouti à l'obtention d'une technique d'identification des champignons par PCR panfongique aux performances très satisfaisantes ouvrant sur de nombreuses perspectives.

Cette technique permettra un suivi épidémiologique des souches nouvellement identifiées et de les confronter aux données bibliographiques. Ainsi, il sera permis de réaliser localement au sein du CHU de Rouen, une surveillance des souches rares et difficiles à identifier notamment en termes d'incidence. Grâce à la confrontation au contexte clinique, il sera permis d'évaluer le potentiel infectieux de ces souches qui pour la plupart aujourd'hui sont très peu décrites dans la littérature scientifique. Le cas échéant, il pourra être réalisé sur demande du clinicien des antifongigrammes de façon à caractériser également les profils de résistances aux antifongiques de ces espèces rares de façon à pouvoir proposer ultérieurement des conseils thérapeutiques probabilistes sur isollements de ces espèces. Nos données locales pourront alors être confrontées aux données de la communauté scientifique internationale.

Il conviendra également de suivre l'évolution des bases de données pour l'identification de séquences fongiques, qui avec l'effort commun pour standardiser la collecte des données et la création de bibliothèques de séquences de références vont gagner en fiabilité.

De plus, avec l'évolution des techniques de séquençage et l'approfondissement de l'approche par code-barres à ADN pour l'identification fongique, Il sera judicieux de suivre l'évolution des nouveaux couples d'amorces qui pourraient être prometteurs.

Il est indéniable que l'identification précise et rapide des agents pathogènes responsables d'infections fongiques est essentielle pour sélectionner le traitement le plus adapté et améliorer le pronostic du patient. Cependant, au vu de la difficulté à obtenir certaines souches en culture, de par un manque de sensibilité de la technique ou bien d'un manque de viabilité suite à l'instauration d'un traitement antifongique, l'étiologie fongique bien que fortement suspectée n'est pas toujours documentée ; de plus, le délai de mise en culture précédant l'identification est souvent long. Un moyen de pallier au moins en partie à ce problème serait l'utilisation de la technique de PCR panfongique sur échantillons primaires. Si à l'heure actuelle, la PCR panfongique semble efficace pour l'identification de souches isolées en culture, son efficacité sur échantillon primaire reste à démontrer et probablement à optimiser. De toute évidence, au vu des résultats de ce travail de thèse et particulièrement des limites de sensibilité de la technique et de la charge de travail importante qu'elle implique : le champ d'application semble néanmoins restreint. Cette technique ne pourra clairement pas être utilisée en systématique sur chacun des prélèvements reçus au laboratoire de Mycologie.

Il pourrait être intéressant de proposer cette technique dans plusieurs contextes. D'une part en amont de la mise en culture, lorsque par exemple le laboratoire fait face à un examen direct positif (présageant d'une concentration suffisante pour permettre un résultat en biologie moléculaire) associé à un prélèvement précieux et dont le clinicien précise une urgence diagnostique ; ou bien en cas de forte suspicion clinique d'infection fongique si un traitement antifongique a été préalablement instauré. D'autre part en second lieu d'une culture négative si forte suspicion d'infection fongique.

À cause de la sensibilité modérée et variable de la technique, un résultat négatif ne permettrait en aucun cas de réaliser un diagnostic d'exclusion. Un gain de sensibilité pourrait probablement être obtenu avec un ciblage plus restreint des micromycètes recherchés.

À l'inverse un résultat positif serait parfois délicat à interpréter : l'obtention d'une identification ne présage pas que la souche concernée soit le pathogène en cause. En effet, il est possible que seule l'espèce majoritaire, ou exprimant le plus la cible (nombre d'occurrences en tandem de ITS plus important) soit amplifiée. Par ailleurs,

dans le cas d'une co-infection fongique dans un échantillon donné, il est possible que cela interfère sur le séquençage panfongique en donnant des séquences illisibles par superposition des séquences provenant de plusieurs espèces différentes. Une étape supplémentaire d'essai d'isolement serait alors nécessaire en diluant l'échantillon primaire, mais risquant la perte de détection des espèces fongiques si faiblement représentées. Le risque de révéler des contaminants ou des souches liées à un portage asymptomatique est grand rendant la technique de faible spécificité dans cette optique précise.

Ainsi il semble inéluctable de réserver la possibilité de réaliser cette PCR « panfongique » directe sur échantillons primaires provenant de sites normalement stériles avec, soit un examen direct positif, soit une forte suspicion d'infection fongique, le tout dans un contexte d'urgence.

VI. Conclusion

L'objectif de ce travail de thèse était de pallier à une lacune d'identification fongique, en particulier des champignons filamenteux, au laboratoire de Mycologie du CHU de Rouen. Malgré les techniques conventionnelles et l'utilisation de la technologie MALDI/TOF couplée à l'analyse informatique via la base de données MSI, qui dans la littérature présente les meilleures performances, plus de 5% des souches restaient non identifiées.

Ainsi, il a été décidé de mettre au point une technique de séquençage panfongique adaptée au besoin du laboratoire. Les performances obtenues avec l'utilisation des amorces ITS1/ITS4 (région ITS) en première intention ont été satisfaisantes. En complément, les régions LSU et TEF1-alpha, avec des performances intéressantes et des résultats d'identification comparables, peuvent apporter elles aussi des informations. Au total plus de 98% des souches ont été identifiées au minimum au rang de genre et 89% au complexe d'espèces. La région ITS, étant considérée à l'heure actuelle comme la région code-barres officielle pour l'identification au sein du règne fongique, présente de nombreuses séquences référencées dans les banques de données telles que GenBank. Bien qu'essentielles à la communauté scientifique, il faut avoir conscience que la plupart des bases de données présentent pour l'instant un certain nombre de lacunes ; malgré une énorme diversité d'informations, certaines espèces fongiques restent inconnues à cause d'un manque de données scientifiques rigoureuses.

Ce travail a montré qu'il fallait porter un regard critique quant aux identifications obtenues et ne pas hésiter à croiser les informations entre plusieurs bases de données, notamment pour ne pas confondre des espèces proches phylogénétiquement. Le suivi prospectif épidémiologique des souches identifiées sera intéressant au vu de la mise en évidence possible de mycoses émergentes. De plus, le séquençage panfongique laisse entrevoir de belles perspectives quant à la détection de souches pathogènes directement à partir d'échantillons cliniques normalement stériles, toujours dans un souci d'aider le clinicien dans sa démarche et d'améliorer la rapidité diagnostique.

Annexes

Annexe 1

Protocole QIAGEN QIAamp® PowerFecal® DNA Kit

Réaliser toutes les étapes de centrifugation dans une pièce à température 15-25°C

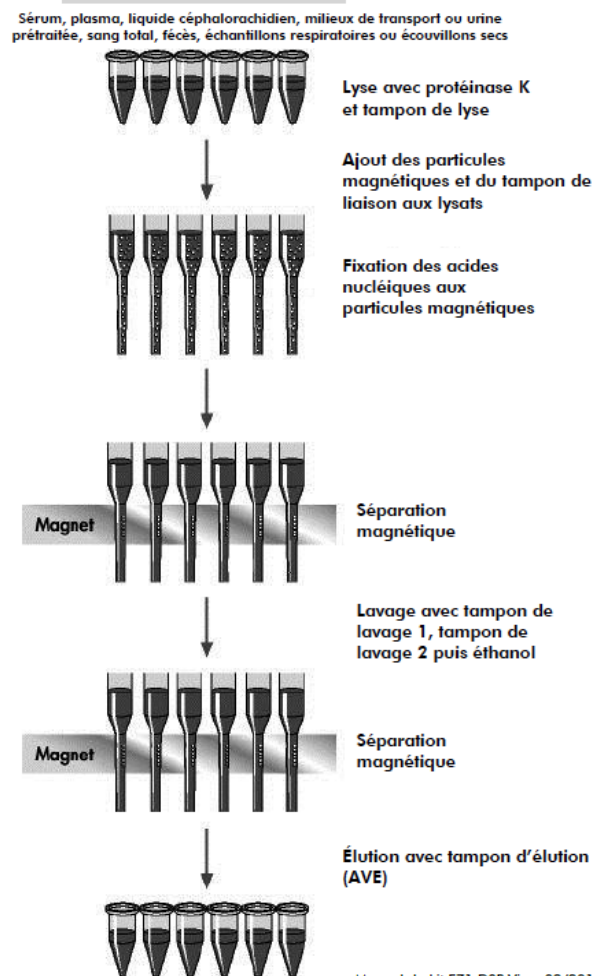
1. Ajouter 0.25 g (ou 250 µl) d'échantillon dans le tube fourni contenant des billes d'agitation
2. Ajouter 750 µl de la solution PowerBead dans le tube contenant des billes d'agitation
3. Ajouter 60 µl de solution C1 et retourner plusieurs fois ou vortexer brièvement.
4. Chauffer les tubes à 65°C pendant 10 min.
5. Sécuriser les tubes horizontalement en utilisant un adaptateur. Vortexer à vitesse maximale pendant 10 min.
6. Centrifuger les tubes à 13000 g pendant 1 min.
7. Transférer le surnageant, entre 400 et 500 µl attendus, dans un tube collecteur propre de 2 ml.
8. Ajouter 250 µl de solution C2 et vortexer brièvement pour mélanger. Incuber à 2-8°C pendant 5 min.
9. Centrifuger les tubes à 13000 g pendant 1 min.
10. En évitant le culot, transférer jusqu'à 600 µl du surnageant dans un tube collecteur propre de 2 ml.
11. Ajouter 200 µl de solution C3 et vortexer brièvement. Incuber à 2-8°C pendant 5 min.
12. Centrifuger les tubes à 13000g pendant 1 min.
13. En évitant le culot, transférer le surnageant dans un tube collecteur propre de 2ml, pas plus de 750 µl.
14. Ajouter 1200 µl de solution C4 au surnageant et vortexer 5 secondes.
15. Mettre 650 µl du surnageant dans la colonne MB Spin et centrifuger à 13000 g pendant 1 min. Éliminer la solution passée au travers de la colonne et répéter jusqu'à ce que tout le surnageant soit traité.

16. Ajouter 500 μ l de solution C5 et centrifuger pendant 1 min à 13000 g.
17. Éliminer la solution passée au travers de la colonne et centrifuger encore pendant 1 min à 13000 g.
18. Placer délicatement la colonne MB Spin dans un tube collecteur propre de 2 ml.
19. Ajouter 100 μ l de solution C6 au centre de la membrane filtre blanche.
20. Centrifuger à 13000 g pendant 1 min et jeter le Spin Filter. L'ADN dans le tube est prêt à l'emploi.

Annexe 2

Protocole d'extraction par EZ1 Advanced kit QIAGEN

1. Mettre dans un tube de digestion 10 µl de protéinase K
2. Ajouter 190 µl de tampon de lyse
3. Ajouter 200 µl d'échantillon
4. Vortexer et réaliser une courte centrifugation
5. Incuber pendant 15 min ou toute la nuit (overnight) à 56°C
6. Vortexer et réaliser une courte centrifugation
7. Lancer un run d'extraction de 15 min sur l'appareil EZ1 Advanced avec la carte DNA Tissue card avec un volume d'élution de 100 µl



Annexe 3

Réalisation d'un gel d'agarose à 2%

1. Au préalable, reconstituer du TAE (Tampon de migration contenant Tris, acide acétique, EDTA) : 20ml de solution mère concentrée TAE 50X et ajouter de l'eau distillée QSP 1L
2. Peser 4g d'agarose dans un bécher
3. Ajouter 250 ml de solution TAE diluée
4. Chauffer au micro-ondes à puissance maximale pendant 5min
5. Refroidir quelques instants sous l'eau courante
6. Ajouter 12 µl d'un agent alkylant (midori green) pour la révélation sous UV et homogénéiser doucement
7. Mettre le nombre de peignes comprenant le nombre de puits nécessaires et couler doucement le gel en prenant soin de retirer les bulles d'air avec un cône.
8. Une fois le gel pris, retirer les peignes avec soin.
9. Déposer le gel avec son support dans le bain de tampon TAE, il doit être complètement immergé.
10. Déposer 10 µl de produit d'amplification de PCR
11. Déposer le ladder (échelle de poids moléculaire)
12. Faire migrer 40 min à 120 V
13. Révéler sous lampe UV

Annexe 4

Liste des identifications par MALDI/TOF sur l'année 2019/2020

Identifications	Nombre
<i>Acremonium kiliense</i>	1
<i>Acremonium sclerotigenum</i>	2
<i>Acrodontium salmoneum</i>	1
<i>Acrophialophora levis</i>	1
<i>Alternaria abundans</i>	1
<i>Alternaria alternata</i>	3
<i>Alternaria caespitosa</i>	7
<i>Alternaria infectoria</i>	8
<i>Alternaria ventricosa</i>	1
<i>Arthrinium marii</i>	1
<i>Arthrographis kalrae</i>	4
<i>Ascochyta pisi</i>	1
<i>Aspergillus alabamensis</i>	1
<i>Aspergillus amoenus</i>	5
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	4
<i>Aspergillus calidoustus</i>	3
<i>Aspergillus candidus</i>	1
<i>Aspergillus chevalieri</i>	1
<i>Aspergillus clavatus</i>	1
<i>Aspergillus creber</i>	10
<i>Aspergillus flavus</i>	5
<i>Aspergillus flavus/oryzae</i>	15
<i>Aspergillus fumigatus</i>	277
<i>Aspergillus hiratsukae</i>	1
<i>Aspergillus jensenii</i>	8
<i>Aspergillus latus</i>	9
<i>Aspergillus montevidensis</i>	9
<i>Aspergillus neoellipticus</i>	1
<i>Aspergillus nidulans</i>	5
<i>Aspergillus niger</i>	3
<i>Aspergillus parasiticus</i>	1
<i>Aspergillus persii</i>	1
<i>Aspergillus protuberus</i>	2
<i>Aspergillus puulaauensis</i>	5
<i>Aspergillus spinulosporus</i>	2
<i>Aspergillus sydowii</i>	12
<i>Aspergillus tabacinus</i>	1
<i>Aspergillus terreus</i>	12
<i>Aspergillus thermomutatus</i>	1

<i>Aspergillus tritici</i>	1
<i>Aspergillus tubingensis</i>	24
<i>Aspergillus unguis</i>	1
<i>Aspergillus Versicolor</i>	1
<i>Aspergillus welwitschiae</i>	9
<i>Aspergillus westerdijkiae</i>	3
<i>Aurantiporus fissilis</i>	3
<i>Aureobasidium melanogenum</i>	1
<i>Aureobasidium pullulans</i>	2
<i>Beauveria bassiana</i>	1
<i>Bjerkandera adusta</i>	10
<i>Candida africana</i>	3
<i>Candida albicans</i>	41
<i>Candida allociferrii</i>	1
<i>Candida blankii</i>	3
<i>Candida ciferii</i>	5
<i>Candida dubliniensis</i>	10
<i>Candida famata</i>	1
<i>Candida glabrata</i>	20
<i>Candida guilliermondii</i>	1
<i>Candida intermedia</i>	1
<i>Candida lipolytica</i>	3
<i>Candida lusitaniae</i>	3
<i>Candida metapsilosis</i>	1
<i>Candida orthopsilosis</i>	1
<i>Candida parapsilosis</i>	19
<i>Candida pintolopesii</i>	1
<i>Candida pulcherrima</i>	1
<i>Candida rugosa</i>	1
<i>Candida sorbosivorans</i>	2
<i>Candida tropicalis</i>	20
<i>Ceriporia lacerata</i>	3
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	7
<i>Cladosporium halotolerans</i>	2
<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>	2
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	2
<i>Clavispora lusitaniae</i>	2
<i>Coniochaeta hoffmannii</i>	1
<i>Coprinellus domesticus</i>	1
<i>Cryptococcus neoformans</i>	6
<i>Cutaneotrichosporon dermatis</i>	3
<i>Debaryomyces hansenii</i>	1
<i>Engyodontium album</i>	3
<i>Epicoccum nigrum</i>	3
<i>Epidermophyton floccosum</i>	1
<i>Eutypella scoparia</i>	1


<i>Exophiala dermatitidis</i>	21
<i>Exophiala phaeomuriformis</i>	1
<i>Fomes fomentarius</i>	2
<i>Fomitopsis betulina</i>	1
<i>Fusarium annulatum</i>	1
<i>Fusarium dimerum</i>	3
<i>Fusarium graminearum</i> -group	1
<i>Fusarium incarnatum</i>	1
<i>Fusarium keratoplasticum</i>	2
<i>Fusarium oxysporum</i>	3
<i>Fusarium petrophilum</i>	3
<i>Fusarium proliferatum</i>	6
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	1
<i>Fusarium verticillioides</i>	1
<i>Galactomyces candidum</i>	23
<i>Galactomyces geotrichum</i>	91
<i>Geotrichum capitatum</i>	1
<i>Geotrichum marinum</i>	1
<i>Hannaella luteola</i>	1
<i>Kluyveromyces lactis</i>	4
<i>Kluyveromyces marxianus (Candida kefyr)</i>	1
<i>Lentinus tigrinus</i>	1
<i>Lichtheimia ramosa</i>	5
<i>Lomentospora prolificans</i>	2
<i>Magnusiomyces capitatus (G. capitatum)</i>	1
<i>Meyerozyma caribbica</i>	2
<i>Microascus murinus</i>	2
<i>Microsporum audouinii</i>	9
<i>Microsporum canis</i>	11
<i>Mucor circinelloides</i>	2
<i>Mucor circinelloides f. janssenii</i>	2
<i>Nannizzia persicolor</i>	1
<i>Paecilomyces dactylothromorphus</i>	1
<i>Paecilomyces formosus</i>	1
<i>Paecilomyces roseolus</i>	1
<i>Paecilomyces variotii</i>	5
<i>Penicillium albocoremium</i>	1
<i>Penicillium allii</i>	1
<i>Penicillium biforme</i>	1
<i>Penicillium brevicompactum</i>	3
<i>Penicillium camemberti</i>	4
<i>Penicillium capsulatum</i>	1
<i>Penicillium cf. ochrochloron</i>	4
<i>Penicillium chrysogenum</i>	17
<i>Penicillium citreonigrum</i>	7
<i>Penicillium citrinum</i>	5

<i>Penicillium copticola</i>	1
<i>Penicillium corylophilum</i>	4
<i>Penicillium crateriforme</i>	1
<i>Penicillium crustosum</i>	26
<i>Penicillium decumbens</i>	2
<i>Penicillium digitatum</i>	1
<i>Penicillium freii</i>	3
<i>Penicillium frequentans</i>	2
<i>Penicillium glabrum</i>	46
<i>Penicillium griseofulvum</i>	6
<i>Penicillium hetheringtonii</i>	1
<i>Penicillium italicum</i>	4
<i>Penicillium murcianum</i>	2
<i>Penicillium nalgiovense</i>	7
<i>Penicillium olsonii</i>	1
<i>Penicillium oxalicum</i>	3
<i>Penicillium polonicum</i>	9
<i>Penicillium roqueforti</i>	18
<i>Penicillium roseomaculatum</i>	2
<i>Penicillium rubens</i>	4
<i>Penicillium sanguifluum</i>	3
<i>Penicillium sizovae</i>	2
<i>Penicillium solitum</i>	1
<i>Penicillium sp.</i>	8
<i>Penicillium spinulosum</i>	1
<i>Penicillium venetum</i>	1
<i>Phialemonium inflatum</i>	1
<i>Phlebia radiata</i>	1
<i>Pichia anomala</i>	1
<i>Pichia cactophila</i>	2
<i>Pichia kudriavzevii (Candida krusei)</i>	2
<i>Pithomyces chartarum</i>	1
<i>Plectosporium tabacinum</i>	1
<i>Psathyrella candolleana</i>	1
<i>Pseudogymnoascus pannorum</i>	1
<i>Pseudozyma flocculosa</i>	1
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	10
<i>Pyrenochaeta unguis-hominis</i>	2
<i>Pythium insidiosum</i>	1
<i>Rasamsonia aegroticola</i>	27
<i>Rasamsonia argillacea</i>	3
<i>Rasamsonia piperina</i>	1
<i>Rhizomucor pusillus</i>	2
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	9
<i>Rhodotorula sp.</i>	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6

<i>Sarocladium kiliense</i>	1
<i>Sarocladium strictum</i>	1
<i>Scedosporium apiospermum</i>	11
<i>Scedosporium boydii</i>	4
<i>Scedosporium prolificans</i>	2
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	3
<i>Scopulariopsis candida</i>	3
<i>Scopulariopsis lutea</i>	1
<i>Sporotrichum pruinosum</i>	1
<i>Talaromyces albobiverticillius</i>	2
<i>Talaromyces amestolkiae</i>	9
<i>Talaromyces cf.diversus</i>	2
<i>Talaromyces cf.primulinus</i>	1
<i>Talaromyces columbinus</i>	2
<i>Talaromyces diversus</i>	2
<i>Talaromyces flavovirens</i>	1
<i>Talaromyces heiheensis</i>	1
<i>Talaromyces kabodanensis</i>	2
<i>Talaromyces pinophilus</i>	2
<i>Talaromyces purpurogenus</i>	1
<i>Talaromyces ruber</i>	1
<i>Talaromyces rugulosus</i>	5
<i>Talaromyces stollii</i>	3
<i>Trametes trogii</i>	1
<i>Trametes versicolor</i>	1
<i>Trichoderma atroviride</i>	1
<i>Trichoderma ghanense</i>	1
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	28
<i>Trichoderma stilbohypoxyli</i>	1
<i>Trichophyton benhamiae</i>	7
<i>Trichophyton concentricum</i>	3
<i>Trichophyton interdigitale</i>	17
<i>Trichophyton kuryangei</i>	11
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	3
<i>Trichophyton mentagrophytes-gr.</i>	6
<i>Trichophyton rubrum</i>	53
<i>Trichophyton soudanense</i>	2
<i>Trichophyton tonsurans</i>	1
<i>Trichophyton tonsurans/equinum</i>	16
<i>Trichophyton violaceum</i>	8
<i>trichosporon dermatis</i>	1
<i>Trichurus spiralis</i>	1
<i>Westerdykella centenaria</i>	1
<i>Yarrowia lipolytica</i>	7
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	1
Total	1383

Annexe 5

Mode opératoire du séquençage fongique (p.104-111)

	Type	Réf. Modèle	Réf. Documentaire	Version	Appliqué(e) le
	04- Mode opératoire (2 signatures)	003	32594	002	28/08/2020
Pôle Biologie Clinique\Microbiologie\Parasitologie					
Mode opératoire du séquençage fongique					

Description de la dernière évolution :		
coquille dans valeur % identif et Query cover		
	Rédaction	Approbation
Nom(s) et fonction(s)	Damien COSTA (Gedi : Rédacteur - CHU\Pôles - Directions\Pôles Médicaux\Biologie Clinique\Microbiologie\Parasitologie)	Damien COSTA (Gedi : Approbateur - CHU\Pôles - Directions\Pôles Médicaux\Biologie Clinique\Microbiologie\Parasitologie)
Date	28/08/2020 09:22:43	28/08/2020 09:22:46

Sommaire

1	Objet.....	1
2	Domaine d'application	1
3	Référence(s) et document(s) associé(s)	1
3.1	Référence(s)	1
3.2	Document(s) associé(s).....	1
4	Définitions et abréviations.....	2
5	Responsabilités et personne(s) ressource(s).....	2
5.1	Responsabilités	2
5.2	Personne(s) ressource(s).....	2
6	Contenu.....	2
6.1	Extraction d'ADN (EZ1 DNA Tissue kit, Qiagen).....	2
6.2	Logigramme pour le choix des amorces	3
6.3	Réalisation de la PCR	4
6.4	Révélation sur Gel d'Agarose à 2%	5
6.5	Séquençage des échantillons positifs	6
6.6	Interprétation des séquences	7
6.7	CIQ.....	8
6.8	Procédure dégradée.....	8

1 Objet

Mode opératoire du séquençage panfongique

2 Domaine d'application

Cette procédure est applicable au secteur de Mycologie du laboratoire de Parasitologie-Mycologie.

3 Référence(s) et document(s) associé(s)

3.1 Référence(s)

3.1.1 Liens vers des documents internes

3.1.2 Références externes

3.2 Document(s) associé(s)

4 Définitions et abréviations

5 Responsabilités et personne(s) ressource(s)

5.1 Responsabilités

Biologistes, techniciens et internes du laboratoire de Parasitologie-Mycoologie.

5.2 Personne(s) ressource(s)

5.2.1 Participant(s) à la rédaction

COSTA Damien, SIMON Emilie

5.2.2 Référent(s)

COSTA Damien

6 Contenu

6.1 Extraction d'ADN (EZ1 DNA Tissue kit, Qiagen)

NB: Les prélèvements sont manipulés sous hotte à flux laminaire.

Il est possible de réaliser l'extraction à partir de champignons en culture ou conservés congelés dans des cryotubes à -20°C ou à partir des échantillons primaires.

À partir des cultures, les champignons filamenteux sont prélevés au scalpel stérile, les levures à l'oëse stérile, ils sont ensuite dilacérés dans des tubes contenant 900 µl d'éthanol et 300 µl d'eau HPLC.

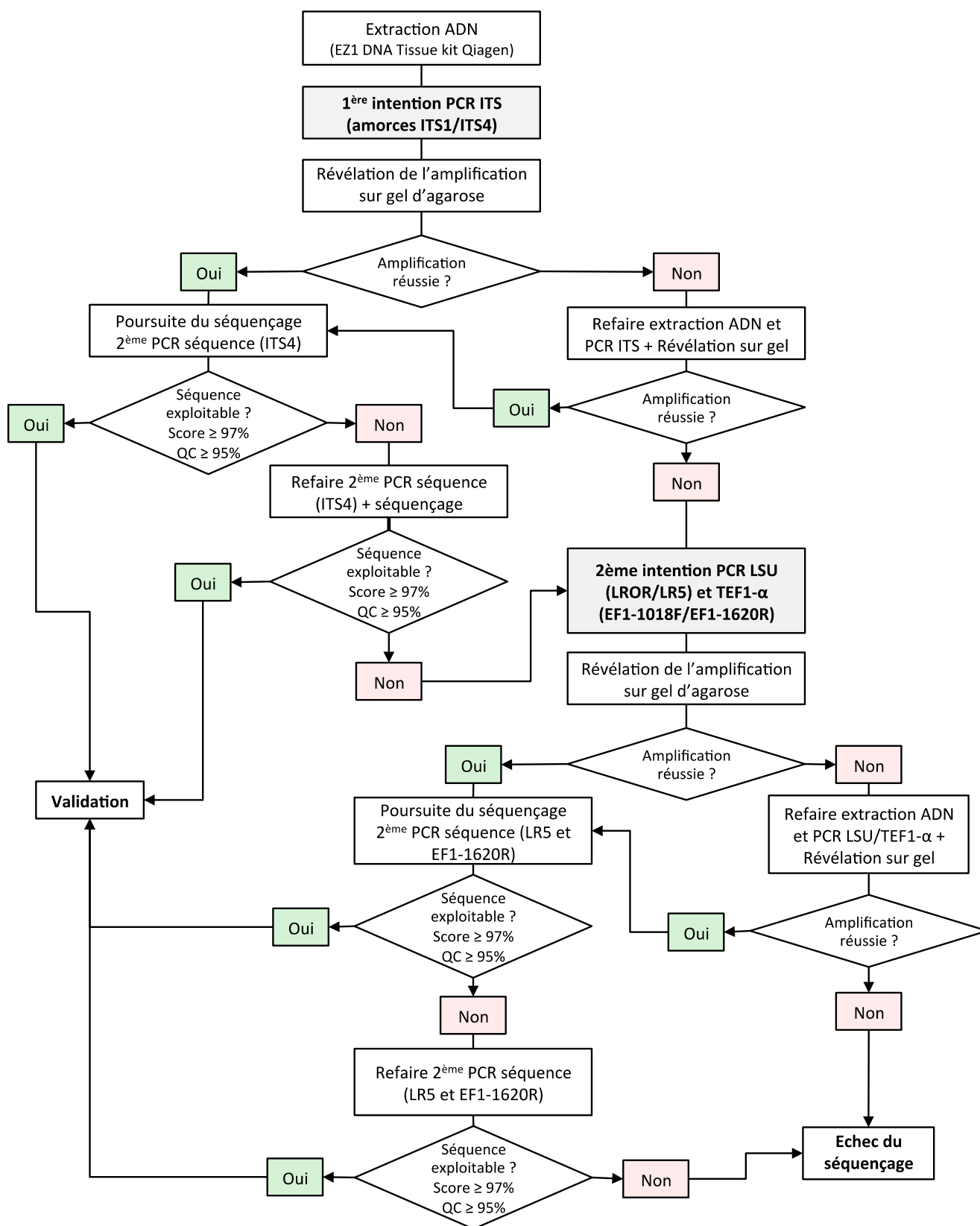
À partir des échantillons congelés en cryotubes environ 100 µl du bouillon, préalablement décongelé et vortexé, est déposé dans des tubes contenant 900 µl d'éthanol et 300 µl d'eau HPLC.

À partir des échantillons primaires, au moins 200µL sont prélevés et déposés directement en tube d'extraction comme ci-dessous.

Suivre le protocole adapté du manuel du kit EZ1 (Qiagen) :

- Mettre dans un tube de digestion 10 µl de protéinase K
- Ajouter 190 µl de tampon de lyse
- Ajouter 200 µl d'échantillon
- Vortexer et réaliser une courte centrifugation
- Incuber pendant 15 min à 56°C
- Vortexer et réaliser une courte centrifugation
- Lancer un run d'extraction de 15 min sur l'appareil EZ1 Advanced avec la carte DNA Tissue card

6.2 Logigramme pour le choix des amorces



6.3 Réalisation de la PCR

Préparation du mix PCR

Les quantités ci-dessous s'expriment pour un seul échantillon. Il est nécessaire de multiplier par autant d'échantillons que nécessaire et de prévoir une marge de 2 échantillons minimum (ex : pour 8 échantillons, prévoir un mix pour 10 échantillons).

Mix PCR volume final de 25 μ L (**adapter les amorces selon la PCR souhaitée**) :

- IQ Supermix (Bio-Rad) : 10 μ L
- Primer (10 μ M) F : 1 μ L
- Primer (10 μ M) R : 1 μ L
- Eau : 8 μ L
- ADN extrait : 5 μ L

Locus	Amorces	Séquence 5'-3'	Taille attendue	Référence
ITS	ITS 1 (F) ITS 4 (R)	TCCGTAGGTGAACCTGCGG TCCTCCGCTTATTGATATGC	200-600 pb	White et al. (1990)
TEF1- α	EF1-1018F EF1-1620R	GAYTTCATCAAGAACATGAT GACGTTGAADCCRACRTTGTC	300-600 pb	Stielow et al. (2015)
LSU	LROR (F) LR5 (R)	ACCCGCTGAACTTAAGC TCCTGAGGGAAACTTCG	400-700 pb	Vigalys et Hester (1990)

Prélever 5 μ L d'ADN matrice et les déposer au fond de chaque puits préalablement rempli avec 20 μ L de mix PCR. Lancer la première PCR selon le programme détaillé ci-dessous selon le couple d'amorces utilisé.

Programme du thermocycleur pour ITS et LSU :

- Dénaturation initiale : 95°C pendant 5 minutes
- Puis 35 cycles :
 - Dénaturation : 95°C pendant 30 secondes
 - Hybridation : 55°C pendant 30 secondes
 - Elongation : 72°C pendant 1 min30
- Elongation finale : 72°C pendant 10 minutes

Programme du thermocycleur pour TEF1- α :

- Dénaturation initiale : 95°C pendant 7 minutes
- Puis 40 cycles :
 - Dénaturation : 95°C pendant 1 minute
 - Hybridation : 56°C pendant 1 minute
 - Elongation : 72°C pendant 2 minutes
- Elongation finale : 72°C pendant 10 minutes

6.4 Révélation sur Gel d'Agarose à 2%

Au préalable, reconstituer du TAE : 20mL de TAE 50X et ajouter de l'eau distillée (QSP 1L)

Pour un petit gel :

- Peser 2 g d'agarose, déposer dans le contenant prévu. Déposer 150 mL de TAE, chauffer à puissance maximale au micro-ondes pendant 5min. 50 mL de TAE environ se seront évaporés, il restera ainsi 100 mL de préparation
- Refroidir quelques instants le contenant et y déposer 6 μ L de MIDORI Green pour la révélation aux UV. Homogénéiser doucement.
- Mettre un peigne comportant le nombre de puits désirés, et couler doucement le gel. Attention aux bulles d'air qu'il faut retirer avec un cône.

Pour un gel moyen :

- Peser 3 g d'agarose, déposer dans le contenant prévu. Déposer 200 mL de TAE, chauffer à puissance maximale au micro-ondes pendant 5min. Environ 50 mL de TAE seront évaporés, il restera ainsi 150 mL de préparation
- Refroidir quelques instants le contenant et y déposer 9 μ L de MIDORI Green pour la révélation aux UV. Homogénéiser doucement.
- Mettre jusqu'à deux peignes (équidistants) comprenant le nombre de puits nécessaires, et couler doucement le gel. Attention aux bulles d'air qu'il faut retirer avec un cône.

Pour un grand gel:

- Peser 4 g d'agarose, déposer dans le contenant prévu. Déposer 250 mL de TAE, chauffer à puissance maximale au micro-ondes pendant 5min. Environ 50 mL de TAE seront évaporés, il restera ainsi 200 mL de préparation
- Refroidir quelques instants le contenant et y déposer 12 μ L de MIDORI Green pour la révélation aux UV. Homogénéiser doucement.
- Mettre jusqu'à trois peignes (équidistants) comprenant le nombre de puits nécessaires, et couler doucement le gel. Attention aux bulles d'air qu'il faut retirer avec un cône.

Procédure de dépôt :

- Une fois le gel pris, retirer les peignes avec soin. Déposer le gel avec son support dans le bain de tampon TAE. Ajouter du TAE si nécessaire afin de remplir les puits du gel : le gel doit être complètement immergé dans le TAE.
- Déposer 10 μ L de produits d'amplification de la PCR. Le produit de PCR étant incolore, il sera nécessaire de le colorer dans une plaque de puits en U à part. Déposer ainsi 2 μ L de colorant bleu (bromophénol par exemple) et mélanger avec 10 μ L de produit de PCR. Déposer le mélange coloré dans les puits correspondants du gel.
- Déposer le Ladder (échelle de poids moléculaire) de façon à pouvoir discriminer la taille des fragments qui ont migré.
- Faire migrer 40 minutes à 120V (ou plus si besoin : selon la taille des fragments attendus)
- Révéler sous UV (attention à éteindre les UV avant d'ouvrir la porte). Il est nécessaire d'effectuer les réglages nécessaires afin d'obtenir la mise au point nette de l'image.
- Imprimer le résultat obtenu.

6.5 Séquençage des échantillons positifs

Le séquençage est à réaliser après révélation de la première PCR et si les bandes obtenues sont à la taille désirée.

1. Purification des amplicons

Cette étape élimine les primers et les nucléotides non incorporés lors de la réaction de PCR.

Utilisation de ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (Ref 78200 ; Thermofisher).

Etapes :

- 1- Mélanger 5 µL de produit PCR avec 2 µL d'EXO SAP IT dans une plaque PCR propre
- 2- Incuber à 37°C pendant 15 minutes
- 3- Incuber à 80°C pendant 15 minutes

2. PCR Séquence

- Préparer les solutions filles d'amorces (Amorce à 3,2 µM) : prélever 64 µl de la solution de primer à 10 µM et ajouter 136 µL d'eau PCR. Pour la PCR séquence l'amorce R a été retenue pour les 3 couples d'amorces.
- Préparer le mix:

	Volume (µl)/puits
Tampon 5X BigDye (Thermofisher)	1,5
Enzyme Taq BigDye (Thermofisher)	0.5
Primer R à 3.2 µM	1
Eau	6
ADN	1

Distribuer 9 µl du mix dans chaque puits, ajouter 1 µL ADN

- Programme PCR séquence :
 - Dénaturation initiale à 95°C pendant 2 minutes
 - Dénaturation à 95°C pendant 10 secondes
 - Hybridation à 55°C pendant 5 secondes
 - Elongation à 60°C pendant 2 minutes
 - Répétitions 40X
 - Avec un ramping de 1°C/sec

3. Purification avant séquençage : filtration sur résine Sephadex® G50 fine grade

NB: La résine Sephadex® G50 utilisée permet de dessaler les échantillons, d'éliminer les nucléotides non incorporés et les amorces de PCR en excès. La limite d'exclusion de la résine G50 est d'environ 20 bases (taille des amorces).

- Déposer la résine Sephadex® G 50 dans chaque puits (45 µl) du chargeur de colonne
- Retirer l'excès de résine avec la raclette.
- Placer la plaque MultiScreen HV (Multiscreen HV 96 well plate, Millipore #MAHVN4510 par exemple) à l'envers sur le chargeur jusqu'au butoir et retourner l'ensemble.
- Taper sur le chargeur pour évacuer la résine vers la plaque. 17-0573-01 D
- Reconstituer autant de colonnes (de 8 puits chacune) de Sephadex que nécessaire avec 250 µl d'eau
- Enlever les éventuelles bulles d'air
- Laisser reposer le Sephadex pendant 2h à température ambiante ou toute une nuit à 4°C
- Centrifuger à 2000g pendant 3min pour éliminer l'eau et compacter les mini-colonnes
- Déposer le produit d'amplification (10 µL additionné de 10 µL d'eau), appliquer une plaque 96 puits (spécifique pour le séquençage) sous la plaque contenant les colonnes de Sephadex afin de récolter les ADN après la dernière centrifugation
- Centrifuger 2000g pendant 3min
- Vérifier le niveau dans chaque puits, en cas de doute sur le volume suffisant, ajouter 5 µL d'eau pcr dans les puits correspondants (environ 20 µL sont nécessaires).
- Procéder au séquençage

Note : 1 Run séquence = 8 puits, si le nombre d'échantillons est inférieur à ce dernier, remplir les puits vides avec 20 µl d'eau

6.6 Interprétation des séquences

Les séquences seront ouvertes sur un logiciel adapté (par exemple : le logiciel Bioedit sur PC ou 4peaks sur MAC). Pour cela ouvrir « Bioedit » ou « 4peaks » et ouvrir le fichier contenant la séquence à analyser.

Critères d'acceptabilité d'une séquence : les pics obtenus doivent être fins et avec suffisamment d'intensité de fluorescence pour que le logiciel propose une succession nucléotidique. Des corrections manuelles peuvent être apportées à la séquence si besoin. La séquence est ensuite comparée à la base de données Genbank (BLASTn <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) aboutissant à un score d'identification et un pourcentage de recouvrement qui doivent être le plus élevé possible. La séquence obtenue sera validée avec un Query Cover (QC) $\geq 95\%$ et un score d'identification $\geq 97\%$, de plus la concordance de l'identification devra être vérifiée avec les données macroscopiques et microscopiques avant validation des résultats.

6.7 CIQ

Les CIQ seront traités comme un échantillon patient.

Pour valider la première amplification et le run de séquence il est possible d'intégrer dans la série une souche de référence, par exemple : *Candida albicans* ATCC 90028 référence 300914 Biomerieuxensemencé sur milieu de culture CAN ID2.

6.8 Procédure dégradée

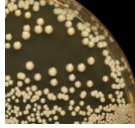
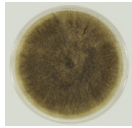
Les essais réalisés lors de la validation de méthode montrent que les résultats sont comparables entre le séquenceur de la fac et celui du CHU, en conséquence, si l'un ou l'autre tombe en panne, nous pouvons utiliser l'autre (pour les autres appareils utilisés pour cette analyse, ils existent tous en plusieurs exemplaires et là aussi les essais de validation de méthode ont été réalisés sans tenir compte des thermocycleurs utilisés, ils sont donc interchangeables).

Annexe 6

Estimation du temps technique pour la réalisation du séquençage (p.113)

Echantillon en culture

Champignons filamenteux
(Prélevés au scalpel)



Levures
(Prélevés à l'anse)



Extraction par automate EZ1



Obtention d'acides nucléiques purifiés

30 min

1^{ère} PCR (ITS)

Préparation du mix, dépôt sur plaque et utilisation du thermocycleur

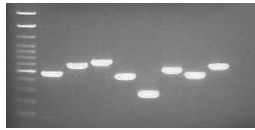


Obtention d'amplicons

3h

Révélation de l'amplification

Par électrophorèse sur gel d'agarose, révélation sous UV



1h

Purification et PCR séquence

Préparation du mix (amorce anti-sens), dépôt sur plaque des échantillons amplifiés et utilisation du thermocycleur

4h

Séquençage

Purification sur résine Séphadex et utilisation du séquenceur

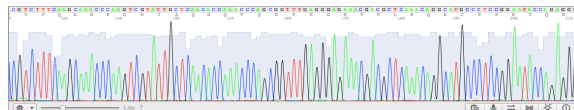


1h

Analyse informatique

Correction de la séquence si besoin, comparaison avec les bases de données (BLAST) et interprétation

30 min



	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Candida albicans isolate 23_04_09 small subunit ribosomal RNA.g	785	785	100%	0.0	100.00%	MT193530.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Candida albicans voucher SCGSU 30 small subunit ribosomal RN/	785	785	100%	0.0	100.00%	MT186273.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Candida albicans CA404 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, IT	785	785	100%	0.0	100.00%	LC524167.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Candida albicans CA201 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, IT	785	785	100%	0.0	100.00%	LC524165.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Candida albicans CA148 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, IT	785	785	100%	0.0	100.00%	LC524164.1

J1

J2

VIII. Références

- (1) Moreau F. Les champignons: physiologie, morphologie, développement et systématique. Vol. 2. Paris: Paul Lechevalier éditeur; 1953.
- (2) Spatafora JW, Chang Y, Benny GL, Lazarus K, Smith ME, Berbee ML, et al. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*. 2016;108(5):1028-46.
- (3) Dannaoui E, Lackner M. Special Issue: Mucorales and Mucormycosis. *J Fungi (Basel)*. 23 déc 2019;6(1). Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7151165/pdf/jof-06-00006.pdf>
- (4) Banque de Schémas - SVT - Académie de Dijon [Internet]. Disponible sur: <http://svt.ac-dijon.fr/schemassvt/>
- (5) Dardé M-L, Kauffmann-Lacroix C, Roques C, Debourgogne A, Delhaes L, Houzé S, et al. Parasitologie et mycologie médicales: guide des analyses et pratiques diagnostiques. Issy-les-Moulineaux : Elsevier-Masson; 2018. xx+497.
- (6) Chabasse D, Bouchara J-P, De Gentile L, Brun S, Cimon B, Penn P. Les moisissures d'intérêt médical. Cahier de formation biologie médicale [Internet]. 2002;(25) : 9-161. Disponible sur: <https://sjbm.fr/images/cahiers/2002-Bioforma-25-Les%20moisissures%20d%27int%C3%A9ret%20m%C3%A9dical.pdf>
- (7) Karas M, Bachmann D, Hillenkamp F. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int J Mass Spectrom Ion Process*. 1987;78: 53-78.
- (8) Ripert C. Mycologie médicale. Lavoisier; 2013. 750 p.
- (9) Alanio A, Beretti J-L, Dauphin B, Mellado E, Quesne G, Lacroix C, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for fast and accurate identification of clinically relevant *Aspergillus* species. *Clin Microbiol Infect*. mai 2011;17(5):750-5.
- (10) Garrido-Cardenas JA, Garcia-Maroto F, Alvarez-Bermejo JA, Manzano-

Agugliaro F. DNA Sequencing Sensors: An Overview. *Sensors (Basel)*. 14 mars 2017;17(3):588

(11) Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Clin Orthop*. sept 2007;462:3-5.

(12) Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, et al. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature*. 24 févr 1977;265(5596):687-95.

(13) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. déc 1977;74(12):5463-7.

(14) Blackwell M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *Am J Bot*. mars 2011;98(3):426-38.

(15) Imbert S. Caractérisation moléculaire et détermination de la sensibilité in vitro aux antifongiques d'isolats cliniques d'*Aspergillus* section *Terrei*: étude multicentrique impliquant 8 hôpitaux français. *J Mycol Médicale*. sept 2017;27(3).

(16) Walker WF, Doolittle WF. Redividing the basidiomycetes on the basis of 5S rRNA sequences. *Nature*. 21 oct 1982;299(5885):723-4.

(17) White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. *PCR Protocols*. 1990; 18(1):315-322.

(18) Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Biol Sci*. 7 févr 2003;270(1512):313-21.

(19) Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 17 avr 2012;109(16):6241-6.

(20) Raja HA, Miller AN, Pearce CJ, Oberlies NH. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *J Nat Prod*. 24 2017;80(3):756-70.

- (21) Meyer CP, Paulay G. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biol.* déc 2005;3(12):e422.
- (22) Spouge JL, Mariño-Ramírez L. The practical evaluation of DNA barcode efficacy. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2012;858:365-77.
- (23) Badotti F, de Oliveira FS, Garcia CF, Vaz ABM, Fonseca PLC, Nahum LA, et al. Effectiveness of ITS and sub-regions as DNA barcode markers for the identification of Basidiomycota (Fungi). *BMC Microbiol.* 23 févr 2017;17(1):42.
- (24) Stielow JB, Lévesque CA, Seifert KA, Meyer W, Iriny L, Smits D, et al. One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia.* déc 2015;35:242-63.
- (25) Rehner SA, Buckley E. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-alpha sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia.* févr 2005;97(1):84-98.
- (26) Schubert K, Groenewald JZ, Braun U, Dijksterhuis J, Starink M, Hill CF, et al. Biodiversity in the *Cladosporium herbarum* complex (Davidiellaceae, Capnodiales), with standardisation of methods for *Cladosporium* taxonomy and diagnostics. *Stud Mycol.* 2007;58:105-56.
- (27) Skouboe P, Frisvad JC, Taylor JW, Lauritsen D, Boysen M, Rossen L. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences from the ITS region of terverticillate *Penicillium* species. *Mycol res.* 1999;103(7):873-81.
- (28) O'Donnell K, Cigelnik E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol Phylogenet Evol.* févr 1997;7(1):103-16.
- (29) Geiser DM, Klich MA, Frisvad JC, Peterson SW, Varga J, Samson RA. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Stud Mycol.* 2007;59:1-10.
- (30) Vilgalys R, Hester M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *J*

Bacteriol. août 1990;172(8):4238-46.

(31) Liu YJ, Whelen S, Hall BD. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Mol Biol Evol.* déc 1999;16(12):1799-808.

(32) Hong S-B, Go S-J, Shin H-D, Frisvad JC, Samson RA. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia.* déc 2005;97(6):1316-29.

(33) Glass NL, Donaldson GC. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microbiol.* avr 1995;61(4):1323-30.

(34) O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 3 mars 1998;95(5):2044-9.

(35) Al-Hatmi AMS, Van Den Ende AHGG, Stielow JB, Van Diepeningen AD, Seifert KA, McCormick W, et al. Evaluation of two novel barcodes for species recognition of opportunistic pathogens in *Fusarium*. *Fungal Biol.* févr 2016;120(2):231-45.

(36) Chaverri P, Castlebury LA, Samuels GJ, Geiser DM. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum*/*Hypocrea lixii* complex. *Mol Phylogenet Evol.* mai 2003;27(2):302-13.

(37) Jaklitsch WM, Komon M, Kubicek CP, Druzhinina IS. *Hypocrea voglmayrii* sp. nov. from the Austrian Alps represents a new phylogenetic clade in *Hypocrea*/*Trichoderma*. *Mycologia.* déc 2005;97(6):1365-78.

(38) Cassagne C, Ranque S, Normand A-C, Fourquet P, Thiebault S, Planard C, et al. Mould routine identification in the clinical laboratory by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *PloS One.* 2011;6(12):e28425.

(39) Khot PD, Ko DL, Fredricks DN. Sequencing and analysis of fungal rRNA

operons for development of broad-range fungal PCR assays. *Appl Environ Microbiol.* mars 2009;75(6):1559-65.

(40) Vu D, Groenewald M, de Vries M, Gehrman T, Stielow B, Eberhardt U, et al. Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. *Stud Mycol.* mars 2019;92:135-54.

(41) Kwiatkowski NP, Babiker WM, Merz WG, Carroll KC, Zhang SX. Evaluation of nucleic acid sequencing of the D1/D2 region of the large subunit of the 28S rDNA and the internal transcribed spacer region using SmartGene IDNS [corrected] software for identification of filamentous fungi in a clinical laboratory. *J Mol Diagn JMD.* juill 2012;14(4):393-401.

(42) Martin KJ, Rygiewicz PT. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiol.* 18 mai 2005;5:28.

(43) Vecchione A, Florio W, Celandroni F, Barnini S, Lupetti A, Ghelardi E. A Rapid Procedure for Identification and Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts From Positive Blood Cultures. *Front Microbiol.* 2018;9:2400.

(44) Lee JA, Chee HY. In Vitro Antifungal Activity of Equol against *Candida albicans*. *Mycobiology.* déc 2010;38(4):328-30.

(45) Guinea J, Recio S, Escribano P, Torres-Narbona M, Peláez T, Sánchez-Carrillo C, et al. Rapid antifungal susceptibility determination for yeast isolates by use of Etest performed directly on blood samples from patients with fungemia. *J Clin Microbiol.* juin 2010;48(6):2205-12.

(46) Berbegal M, Garcia Jimenez J, Armengol J. First Report of *Calosphaeria pulchella* Causing Canker and Branch Dieback of Sweet Cherry Trees in Spain. *Plant Dis.* 1 juill 2014;98:1008-1008.

(47) Heidrich D, González G, Pagani D, Ramírez-Castrillón M, Scroferneker M. Chromoblastomycosis caused by *Rhinocladiella similis*: Case report. *Med Mycol Case Rep.* 1 avr 2017;16:25-27.

- (48) Richarz N, Jaka-Moreno A, Fernández-Rivas G, Bassas J, Bielsa I, Ferrándiz C. First case of chronic cutaneous chromoblastomycosis by *Rhinocladiella similis* acquired in Europe. *Clin Exp Dermatol*. 1 juin 2018;43(8):925-927.
- (49) Rivero M, Hidalgo A, Alastruey-Izquierdo A, Cía M, Torroba L, Rodríguez-Tudela JL. Infections due to *Phialemonium* species: case report and review. *Med Mycol*. nov 2009;47(7):766-74.
- (50) Proia L, Hayden M, Kammeyer P, Ortiz J, Sutton D, Clark T, et al. *Phialemonium*: An Emerging Mold Pathogen That Caused 4 Cases of Hemodialysis-Associated Endovascular Infection. *Clin Infect Dis*. 1 sept 2004;39:373-9.
- (51) Bennett A, Ponder MM, Garcia-Diaz J. *Phoma* Infections: Classification, Potential Food Sources, and Their Clinical Impact. *Microorganisms*. 23 juin 2018;6(3).
- (52) Adamopoulou A, Sakellaris D, Koronis S, Balidis M, Zachariadis Z, Tranos P, et al. Rare Persistent Corneal Infection by *Phoma* sp. - A Case Report. *Ophthalmol Ther*. mars 2019;8(1):143-8.
- (53) Mirzaee M-R, Asgari B, Zare R, Mohammadi M. Association of *Microascus cirrosus* (Microascaceae, Ascomycetes) with Brown Leaf Spot of Pistachio in Iran. *Plant Dis*. 1 mai 2010;94:642.
- (54) Krisher KK, Holdridge NB, Mustafa MM, Rinaldi MG, McGough DA. Disseminated *Microascus cirrosus* infection in pediatric bone marrow transplant recipient. *J Clin Microbiol*. mars 1995;33(3):735-7.
- (55) Miossec C, Morio F, Lepoivre T, Le Pape P, Garcia-Hermoso D, Gay-Andrieu F, et al. Fatal Invasive Infection with Fungemia Due to *Microascus cirrosus* after Heart and Lung Transplantation in a Patient with Cystic Fibrosis. *J Clin Microbiol*. juill 2011;49(7):2743-7.
- (56) Gao L, Chen J, Gao D, Li M. Primary cutaneous infection due to *Microascus cirrosus*: a case report. *BMC Infect Dis*. 3 déc 2018;18.
- (57) Ustun C, Huls G, Stewart M, Marr K. Resistant *Microascus cirrosus* pneumonia can be treated with a combination of surgery, multiple anti-fungal agents

and a growth factor. *Mycopathologia*. 1 nov 2006;162:299-302.

(58) White TC, Findley K, Dawson TL, Scheynius A, Boekhout T, Cuomo CA, et al. Fungi on the Skin: Dermatophytes and *Malassezia*. *Cold Spring Harb Perspect Med*. août 2014;4(8).

(59) Segal E, Frenkel M. Dermatophyte Infections in Environmental Contexts. *Res Microbiol*. 26 janv 2015;166:564-9.

(60) da Cunha K, Sutton D, Gené J, Cano J, Capilla J, Madrid H, et al. *Pithomyces* species (Montagnulaceae) from clinical specimens: Identification and antifungal susceptibility profiles. *Med Mycol*. 16 août 2014;52(7):748-757.

(61) Perelló A, Aulicino M, Stenglein SA, Labuda R, Moreno MV. *Pseudopithomyces chartarum* associated with wheat seeds in Argentina, pathogenicity and evaluation of toxigenic ability. *Eur J Plant Pathol*. 1 juin 2017;148(2):491-6.

(62) Cortez KJ, Roilides E, Quiroz-Telles F, Meletiadiis J, Antachopoulos C, Knudsen T, et al. Infections Caused by *Scedosporium* spp. *Clin Microbiol Rev*. janv 2008;21(1):157-97.

(63) Köhler JR, Casadevall A, Perfect J. The Spectrum of Fungi That Infects Humans. *Cold Spring Harb Perspect Med*. janv 2015;5(1).

(64) Aït-Ammar N, Guitard J, Hennequin C. Infections à *Acremonium*. *EMC Biologie médicale*. 2015;10(2):[90-35-0087-A].

(65) Gupta AK, Horgan-Bell CB, Summerbell RC. Onychomycosis associated with *Onychocola canadensis*: ten case reports and a review of the literature. *J Am Acad Dermatol*. sept 1998;39(3):410-7.

(66) Murray DIL, Gadd GM. Preliminary studies on *Microdochium bolleyi* with special reference to colonization of barley. *Trans Br Mycol Soc*. 1 juin 1981;76(3):397-403.

(67) Aggarwal S, Yamaguchi T, Dana R, Hamrah P. *Exophiala phaeomuriformis* Fungal Keratitis: Case Report and In Vivo Confocal Microscopy Findings. *Eye*

Contact Lens. 29 oct 2015;43(2):e4-e6.

(68) Valenzuela-Lopez N, Cano J, Stchigel AM, Rivero-Menendez O, Alastruey Izquierdo A, Guarro J. *Neocucurbitaria keratinophila*: An emerging opportunistic fungus causing superficial mycosis in Spain. *Med Mycol.* 29 nov 2018;57(6):733-738.

(69) Zou Z, Zhang X, Parks P, du Toit LJ, Van de Wouw AP, Fernando WGD. A New Subclade of *Leptosphaeria biglobosa* Identified from *Brassica rapa*. *Int J Mol Sci.* 3 avr 2019;20(7):1668.

(70) Woudenberg JHC, Meijer M, Houbraken J, Samson RA. *Scopulariopsis* and *scopulariopsis*-like species from indoor environments. *Stud Mycol.* sept 2017;88:1-35.

(71) Sandoval-Denis M, Sutton DA, Fothergill AW, Cano-Lira J, Gené J, Decock CA, et al. *Scopulariopsis*, a poorly known opportunistic fungus: spectrum of species in clinical samples and in vitro responses to antifungal drugs. *J Clin Microbiol.* déc 2013;51(12):3937-43.

(72) Paredes K, Capilla J, Mayayo E, Guarro J. Virulence and Resistance to Antifungal Therapies of *Scopulariopsis* Species. *Antimicrob Agents Chemother.* 25 mars 2016;60(4):2063-8.

(73) Houbraken J, Giraud S, Meijer M, Bertout S, Frisvad J, Meis J, et al. Taxonomy and Antifungal Susceptibility of Clinically Important *Rasamsonia* Species. *J Clin Microbiol.* 17 oct 2012;51.

(74) Lee KC, Kim MJ, Chae SY, Lee HS, Jang YH, Lee S-J, et al. A Case of *Phaeoerythromycosis* Caused by *Exophiala lecanii-corni*. *Ann Dermatol.* juin 2016;28(3):385-7.

(75) English MP. Infection of the finger-nail by *Pyrenochaeta unguis-hominis*. *Br J Dermatol.* juill 1980;103(1):91-3.

(76) Dupont D, Normand A-C, Persat F, Hendrickx M, Piarroux R, Wallon M. Comparison of matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of moulds in the routine

microbiology laboratory. Clin Microbiol Infect. juill 2019;25(7):892-7.

(77) Lacroix C, Gicquel A, Sendid B, Meyer J, Accoceberry I, François N, et al. Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of Candida species. Clin Microbiol Infect. févr 2014;20(2):153-8.

(78) Bader O, Weig M, Taverne-Ghadwal L, Lugert R, Gross U, Kuhns M. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Microbiol Infect. sept 2011;17(9):1359-65.

(79) Bruker. MBT FilamentousFungi Library MALDI Biotyper® [Internet]. 2019. Disponible sur: https://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/Separations_MassSpectrometry/Literature/Brochures/1867577_Fil_Fungi_Library_RUO_03-2019_eBook.pdf

(80) Normand AC, Becker P, Gabriel F, Cassagne C, Accoceberry I, Gari-Toussaint M, et al. Validation of a New Web Application for Identification of Fungi by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. J Clin Microbiol. 2017;55(9):2661-70.

(81) Imbert S, Normand AC, Gabriel F, Cassaing S, Bonnal C, Costa D, et al. Multi-centric evaluation of the online MSI platform for the identification of cryptic and rare species of Aspergillus by MALDI-TOF. Med Mycol. 1 nov 2019;57(8):962-8.

(82) Stein M, Tran V, Nichol KA, Lagacé-Wiens P, Pieroni P, Adam HJ, et al. Evaluation of three MALDI-TOF mass spectrometry libraries for the identification of filamentous fungi in three clinical microbiology laboratories in Manitoba, Canada. Mycoses. oct 2018;61(10):743-53.

(83) Heireman L, Patteet S, Steyaert S. Performance of the new ID-fungi plate using two types of reference libraries (Bruker and MSI) to identify fungi with the Bruker MALDI Biotyper. Med Mycol. 6 févr 2020.

(84) Doern CD, Butler-Wu SM. Emerging and Future Applications of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) Mass

Spectrometry in the Clinical Microbiology Laboratory: A Report of the Association for Molecular Pathology. *J Mol Diagn JMD*. 2016;18(6):789-802.

(85) Maleszka R, Clark-Walker GD. Yeasts have a four-fold variation in ribosomal DNA copy number. *Yeast*. 1993;9(1):53-8.

(86) Chan JF, Lau SK, Yuen K-Y, Woo PC. *Talaromyces* (*Penicillium*) *marneffei* infection in non-HIV-infected patients. *Emerg Microbes Infect*. mars 2016;5(3):e19.

(87) Monod M. [Revision of the dermatophyte species and the nomenclature of these fungi]. *Rev Med Suisse*. 29 mars 2017;13(556):703-8.

(88) de Hoog GS, Dukik K, Monod M, Packeu A, Stubbe D, Hendrickx M, et al. Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. *Mycopathologia*. févr 2017;182(1-2):5-31.

(89) Su H, Packeu A, Ahmed SA, Al-Hatmi AMS, Blechert O, İlkit M, et al. Species Distinction in the *Trichophyton rubrum* Complex. *J Clin Microbiol*. 2019;57(9).

(90) Kong F, Tong Z, Chen X, Sorrell T, Wang B, Wu Q, et al. Rapid identification and differentiation of *Trichophyton* species, based on sequence polymorphisms of the ribosomal internal transcribed spacer regions, by rolling-circle amplification. *J Clin Microbiol*. avr 2008;46(4):1192-9.

(91) Zhan P, Dukik K, Li D, Sun J, Stielow JB, Gerrits van den Ende B, et al. Phylogeny of dermatophytes with genomic character evaluation of clinically distinct *Trichophyton rubrum* and *T. violaceum*. *Stud Mycol*. mars 2018;89:153-75.

(92) James Harris D. Can you bank on GenBank? *Trends ecol evol*. 2003;18(7):317-9.

(93) Nilsson RH, Ryberg M, Kristiansson E, Abarenkov K, Larsson K-H, Kõljalg U. Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: a fungal perspective. *PloS One*. 20 déc 2006;1:e59.

(94) Federhen S. Type material in the NCBI Taxonomy Database. *Nucleic Acids Res*. janv 2015;43(Database issue):D1086-1098.

- (95) Bidartondo MI. Preserving accuracy in GenBank. *Science*. 21 mars 2008;319(5870):1616.
- (96) Xu J. Fungal DNA barcoding. *Genome*. nov 2016;59(11):913-32.
- (97) O'Leary NA, Wright MW, Brister JR, Ciufu S, Haddad D, McVeigh R, et al. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res*. 4 janv 2016;44(D1):D733-745.
- (98) Procop GW, Roberts GD. Emerging fungal diseases: the importance of the host. *Clin Lab Med*. sept 2004;24(3):691-719, vi-vii.
- (99) Friedman DZP, Schwartz IS. Emerging Fungal Infections: New Patients, New Patterns, and New Pathogens. *J Fungi*. sept 2019;5(3):67.
- (100) Seidel D, Graeff LAD, Vehreschild MJGT, Wisplinghoff H, Ziegler M, Vehreschild JJ, et al. FungiScopeTM—Global Emerging Fungal Infection Registry. *Mycoses*. 2017;60(8):508-16.

SERMENT DE GALIEN

Je jure d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer dans l'intérêt de la Santé publique ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'Honneur, de la Probité et du Désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma Profession.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois méprisé de mes Confrères si je manque à mes engagements.

