

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Faculté de Médecine

ANNÉE 2014

THÈSE N°

**APPORT DE LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE
ET DE LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
À L'IDENTIFICATION DES CHAMPIGNONS FILAMENTEUX
AU LABORATOIRE DE MYCOLOGIE MÉDICALE.**

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

présentée et soutenue publiquement

le 30 septembre 2014

par

Marilyne DUGAT

née le 19 octobre 1983, à Firminy

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

M. le Professeur Philippe VINCENDEAU Président
Mme le Professeur Marie-Laure DARDÉ Juge
Mme le Professeur Sylvie ROGEZ Juge
M. le Docteur Bernard BOUTEILLE Directeur de thèse
Mme le Docteur Jacqueline FAYOL Membre invité

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Faculté de Médecine

ANNÉE 2014

THÈSE N°

**APPORT DE LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE
ET DE LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
À L'IDENTIFICATION DES CHAMPIGNONS FILAMENTEUX
AU LABORATOIRE DE MYCOLOGIE MÉDICALE.**

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

présentée et soutenue publiquement

le 30 septembre 2014

par

Marilyne DUGAT

née le 19 octobre 1983, à Firminy

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

M. le Professeur Philippe VINCENDEAU Président
Mme le Professeur Marie-Laure DARDÉ Juge
Mme le Professeur Sylvie ROGEZ Juge
M. le Docteur Bernard BOUTEILLE Directeur de thèse
Mme le Docteur Jacqueline FAYOL Membre invité



Enseignants de la Faculté de Médecine de l'Université de Limoges

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

ABOYANS Victor	CARDIOLOGIE, Responsable de service
ACHARD Jean-Michel	PHYSIOLOGIE
ADENIS Jean-Paul	OPHTALMOLOGIE
ALAIN Sophie	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
ALDIGIER Jean-Claude	NEPHROLOGIE
ARCHAMBEAUD Françoise	MEDECINE INTERNE, Responsable de service
ARNAUD Jean-Paul	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE et TRAUMATOLOGIQUE
AUBARD Yves	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE, Responsable de service
AUBRY Karine	O.R.L.
BEDANE Christophe	DERMATOLOGIE-VENERELOGIE, Responsable de service
BERTIN Philippe	THERAPEUTIQUE, Responsable de service de RHUMATOLOGIE
BESSEDE Jean-Pierre	O.R.L., Responsable de service
BONNAUD François	PNEUMOLOGIE, Doyen Honoraire
BORDESSOULE Dominique	HEMATOLOGIE, Responsable de service d'HEMATOLOGIE CLINIQUE et THERAPIE CELLULAIRE
CHARISSOUX Jean-Louis	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE et TRAUMATOLOGIQUE
CLAVERE Pierre	RADIOTHERAPIE, Responsable de service
CLEMENT Jean-Pierre	PSYCHIATRIE d'ADULTES, Responsable de service
COGNE Michel	IMMUNOLOGIE, Responsable de service
COLOMBEAU Pierre	UROLOGIE
CORNU Elisabeth	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE
COURATIER Philippe	NEUROLOGIE, Responsable de service
DANTOINE Thierry	GERATRIE et BIOLOGIE du VIEILLISSEMENT, Responsable de service
DARDÉ Marie-Laure	PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE, Responsable de service
DAVIET Jean-Christophe	MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION
DESCAZEAUD Aurélien	UROLOGIE
DESPORT Jean-Claude	NUTRITION
DRUET-CABANAC Michel	MEDECINE et SANTE au TRAVAIL, Responsable de service
DUMAS Jean-Philippe	UROLOGIE, Responsable de service
ESSIG Marie	NEPHROLOGIE, Responsable de service
FAUCHAIS Anne-Laure	MEDECINE INTERNE, Responsable de service
FEUILLARD Jean	HEMATOLOGIE, Responsable de service du Laboratoire d'HEMATOLOGIE
FOURCADE Laurent	CHIRURGIE INFANTILE, Responsable de service
FUNALOT Benoît	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
GAINANT Alain	CHIRURGIE DIGESTIVE
GUIGONIS Vincent	PEDIATRIE
JACCARD Arnaud	HEMATOLOGIE
JAUBERTEAU-MARCHAN M. Odile	IMMUNOLOGIE
LABROUSSE François	ANATOMIE et CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES, Responsable de service
LACROIX Philippe	MEDECINE VASCULAIRE
LAROCHE Marie-Laure	PHARMACOLOGIE CLINIQUE
LASKAR Marc	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE, Responsable de service, Assesseur
LIENHARDT-ROUSSIE Anne	PEDIATRIE, Responsable de service
LOUSTAUD-RATTI Véronique	HEPATOLOGIE
MABIT Christian	ANATOMIE, Responsable de service d'ORTHOPEDIE-TRAUMATOLOGIE
MAGY Laurent	NEUROLOGIE
MARQUET Pierre	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE, Responsable de service
MATHONNET Muriel	CHIRURGIE DIGESTIVE
MELLONI Boris	PNEUMOLOGIE, Responsable de service
MERLE Louis	PHARMACOLOGIE CLINIQUE
MOHTY Dania	CARDIOLOGIE
MONTEIL Jacques	BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE, Responsable de service
MOREAU Jean-Jacques	NEUROCHIRURGIE, Responsable de service, Assesseur
MOUNAYER Charbel	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE
NATHAN-DENIZOT Nathalie	ANESTHESIOLOGIE-RENIMATION, Responsable de service
PARAF François	MEDECINE LEGALE et DROIT de la SANTE, Responsable de service
PLOY Marie-Cécile	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE, Responsable de service
PREUX Pierre-Marie	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION, Responsable de

ROBERT Pierre-Yves	service du SIME, Assesseur
SALLE Jean-Yves	OPHTALMOLOGIE, Responsable de service
SAUTEREAU Denis	MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION, Responsable de service
STURTZ Franck	GASTRO-ENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE, Responsable de service
TEISSIER-CLEMENT Marie-Pierre	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE, Responsable de service
TREVES Richard	ENDOCRINOLOGIE, DIABETE et MALADIES METABOLIQUES
TUBIANA-MATHIEU Nicole	RHUMATOLOGIE
VALLAT Jean-Michel	CANCEROLOGIE, Responsable de service
VALLEIX Denis	NEUROLOGIE
VERGNENEGRE Alain	ANATOMIE, Responsable de service de CHIRURGIE DIGESTIVE et
VERGNE-SALLE Pascale	ENDOCRINIENNE, Doyen
VIGNON Philippe	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION
VINCENT François	THERAPEUTIQUE
VIROT Patrice	REANIMATION, Responsable de service
WEINBRECK Pierre	PHYSIOLOGIE
YARDIN Catherine	CARDIOLOGIE
	MALADIES INFECTIEUSES, Responsable de service
	CYTOLOGIE et HISTOLOGIE, Responsable de service

PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

BUCHON Daniel MEDECINE GENERALE

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS

HOSPITALIERS

AJZENBERG Daniel	PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE
BOURTHOUMIEU Sylvie	CYTOLOGIE et HISTOLOGIE
BOUTEILLE Bernard	PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE
CHABLE Hélène	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
DURAND Karine	BIOLOGIE CELLULAIRE
DURAND-FONTANIER Sylvaine	ANATOMIE
ESCLAIRE Françoise	BIOLOGIE CELLULAIRE
HANTZ Sébastien	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
LE GUYADER Alexandre	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE
LIA-BALDINI Anne-Sophie	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
MARIN Benoît	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION
MOUNIER Marcelle	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE ; HYGIENE HOSPITALIERE
PICARD Nicolas	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE
QUELVEN-BERTIN Isabelle	BIOLOGIE CELLULAIRE
TERRO Faraj	BIOLOGIE CELLULAIRE

PROFESSEURS ASSOCIES

BUISSON Jean-Gabriel	MEDECINE GENERALE
DUMOITIER Nathalie	MEDECINE GENERALE
PREVOST Martine	MEDECINE GENERALE

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE

MENARD Dominique MEDECINE GENERALE

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE des UNIVERSITES

BARRAUD Olivier BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES EMERITES

BONNETBLANC Jean-Marie
VIDAL Elisabeth

Le 09 septembre 2013



Remerciements

Mes remerciements s'adressent avant tout à mon directeur de thèse, le **Docteur Bernard Bouteille**, pour m'avoir fait confiance et pour m'avoir offert la chance de réaliser ce travail. Je lui suis très reconnaissante pour son appui, sa compréhension et sa disponibilité.

Je souhaite remercier les **Professeurs Philippe Vincendeau, Marie-Laure Dardé, Sylvie Rogez** et le **Docteur Jacqueline Fayol** pour m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse et d'avoir accepté de juger mon travail.

J'adresse mes sincères remerciements au **Professeur Marie-Laure Dardé** pour son accueil et ses connaissances.

Je remercie particulièrement le **Professeur Sylvie Rogez** pour sa disponibilité et son écoute tout au long de mon internat.

Je remercie le **Docteur Daniel Ajzenberg** pour ses conseils adaptés au cours de mon travail.

J'exprime tout particulièrement ma gratitude à mes deux appuis pour la réalisation de ce travail. **Mesdames Valérie Ducour et Muriel Matias**, je vous remercie pour votre soutien.

Je tiens à remercier **Annabelle, Hélène, Maryse, Michèle et Mickael**, l'équipe de Parasitologie- Mycologie, pour la réalisation de mon travail dans la bonne humeur.

J'adresse mes remerciements à **Mme Emilie Guérin** pour ses explications pertinentes concernant le séquençage.

Merci à **Joëlle, Delphine, Virginie** et toute l'équipe de Virologie pour leurs conseils.

Je remercie **Marie et Morgane** de Bactériologie pour l'apprentissage de la calibration.

Enfin j'adresse mes remerciements **aux équipes de Biomérieux**, notamment à **Mme Cécile Leblanc, Mr Saint Félix, et Mme Jacqueline Muetton** de la RAD.

Je remercie toutes les personnes du CHU de Limoges qui ont participé à ma formation de biologiste médical.

À mes proches,

*Je ne remercierai jamais assez mes parents **Evelyne** et **Jean-Paul** pour leur présence, leur soutien et leur générosité tout au long de mes études.*

*Merci **Lionel**, mon grand frère, même avec la distance tu as su me soutenir.*

*À **Marinette**, ma grand-mère toujours là pour rigoler.*

*Mon cher et tendre **Cédric**, merci pour tout le temps que tu m'as consacré, pour ton réconfort au jour le jour dans la joie et la bonne humeur. La présence et le bonheur que tu m'apportes permettent mon épanouissement personnel et professionnel.*

*Ma chère **Bérengère**, complice depuis la première année sur les bancs de la faculté stéphanoise, ton amitié compte beaucoup pour moi.*

***Géraldine**, tes conseils et ta sagesse m'ont toujours été utiles, nos chemins se sont croisés en médecine, et notre amitié m'est très chère.*

*À **Mme Maryvonne Bouchard** pour m'avoir encouragée à suivre ce parcours.*

Sommaire

I. Introduction	3
II. Principaux agents fongiques et mycoses associées rencontrés au laboratoire de mycologie médicale	6
III. Identification actuelle au laboratoire de mycologie du CHU de Limoges	26
IV. Travaux personnels : comparaison de l'identification par spectrométrie de masse MALDI–TOF des champignons filamenteux par rapport à l'identification par séquençage et à l'identification classique	39
V. Discussion	79
VI. Conclusion	93
Bibliographie	95
Annexes	103
Table des figures	111
Table des tableaux	112
Table des annexes	114
Table des matières	115

I. Introduction

En médecine, les mycoses se rencontrent dans de nombreuses spécialités. Leur prévalence est en perpétuelle augmentation, ainsi que le nombre de champignons en cause. Le défi est de pouvoir diagnostiquer ces pathologies dès le prélèvement afin d'améliorer la prise en charge des patients.

D'une part les mycoses superficielles, généralement bénignes, représentent un motif fréquent de consultation en dermatologie. Il s'agit principalement de dermatophytoses de la peau, des plis et des phanères.

D'autre part les infections fongiques invasives (IFI) à levures et, de plus en plus, à champignons filamenteux sont de pronostic redoutable. En France, chaque année les IFI concernent environ 3600 personnes hospitalisées dont le tiers décèdera (Bitar et al., 2013). Le taux de mortalité des IFI reste élevé malgré l'existence d'antifongiques. Il faut noter l'impact financier des IFI dont un épisode coûte environ 20000 à 30000 euros. Le coût global de ces infections en France représente environ 100 millions d'euros (Dodds et al., 2012). Les tests prédictifs de détection indirecte de ces mycoses se développent. Le but est d'obtenir un diagnostic rapide pour traiter le plus tôt possible. Les services d'hématologie clinique, d'oncologie, de réanimation, d'oncohématologie pédiatrique, de pathologie respiratoire et d'oto-rhino-laryngologie sont les plus représentatifs. Le succès des traitements des leucémies ou des cancers au cours des deux dernières décennies et les démarches prophylactiques favorisent l'émergence de mycoses opportunistes. La première porte d'entrée des champignons reste l'arbre respiratoire puis les effractions cutanées. Ces mycoses opportunistes peuvent être dues à des champignons qui ont une sensibilité particulière face à certains antifongiques. De fait nous assistons à une modification de l'épidémiologie fongique. Les documentations de fongémies résistantes aux traitements sont en augmentation.

Bien sûr d'énormes progrès thérapeutiques ont vu le jour cette dernière décade, ce qui entraîne l'augmentation du nombre de patients à risque, ainsi que l'augmentation de leur espérance de vie. Avec un taux de survie meilleur, de nouvelles procédures thérapeutiques immunosuppressives et une prise en charge prophylactique, ces malades vivent comme tout le monde, pratiquent des sports et voyagent. La fréquence des mycoses tropicales d'importation augmente, et de nouveaux pathogènes fongiques émergent (Kontoyiannis et al., 2010). Pour ces champignons émergents il n'existe pas toujours de méthodes diagnostiques

indirectes, il est donc nécessaire de recourir à la culture, et à l'observation morphologique mycologique.

L'arrivée de nouveaux médicaments a permis le traitement ainsi que la prophylaxie primaire et secondaire de certaines IFI. Toutefois il ne faut pas omettre les diminutions de sensibilités de certains champignons en raison de cette importante distribution des antifongiques (Denning et Hope, 2010). Certains présentent une résistance naturelle comme *Aspergillus terreus* face à l'amphotéricine B (Arendrup., 2013), et d'autres présentent une résistance acquise comme certains *Aspergillus* de la section Fumigati par rapport aux azolés. La résistance correspond soit à une réduction de la concentration d'antifongique dans la cellule fongique, soit à une modification de la cible. Nous observons aussi une modification du métabolisme pour contrebalancer l'effet du médicament. Des CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) élevées résultent souvent d'une combinaison de plusieurs mécanismes. *Aspergillus fumigatus* peut être résistant aux azolés à la suite de mutation du gène Cyp51A (erg11) codant pour la 14 alpha déméthylase lanostérol (Arendrup et al., 2008).

Afin d'homogénéiser les études cliniques des critères sont établis pour créer des groupes d'infections prouvées, possibles ou probables (Ascioglu et al., 2002). Ce sont les critères de l'EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer) qui sont applicables uniquement aux patients d'hématologie et qui tiennent compte des critères de l'examen mycologique. L'infection fongique est dite possible, quand il y a un critère lié à l'hôte, plus un critère microbiologique ou un critère clinique majeur (ou deux critères cliniques mineurs). Pour être probable il doit y avoir un critère d'hôte, un critère microbiologique et un critère clinique majeur. Enfin une infection est prouvée lorsqu'il y a une lésion tissulaire associée à un examen histologique positif ou s'il y a une culture positive à partir d'un prélèvement, obtenu stérilement, d'un site compatible avec l'infection normalement stérile, et cliniquement ou radiologiquement anormal (à l'exclusion des urines et des muqueuses). Selon ces critères des groupes d'études comme l'ECIL (European Conference of Infection in Leukemia) et l'EFISG (European Fungal Infection Study Group) décident de façon collégiale des conduites diagnostiques et thérapeutiques à suivre pour chaque infection fongique suspectée.

Devant l'augmentation de la fréquence des infections mycologiques, et les avancées technologiques d'identification, l'examen mycologique classique doit être revu et adapté. Les caractères phénotypiques des champignons peuvent ne pas être exprimés correctement, ceci amène à une identification macroscopique et

microscopique difficile. L'identification par spectrométrie de masse a séduit de nombreux laboratoires de microbiologie. Qu'en est-il de l'efficacité de cette technique par rapport à la méthode de référence qui fait appel au séquençage de l'ADN (acide désoxyribonucléique) fongique ? Nous allons présenter les principaux champignons filamenteux d'intérêt médical, puis les problèmes rencontrés quotidiennement pour identifier rapidement les agents responsables des mycoses. Nous ne traiterons pas dans notre travail des mycoses à levures ni des mycétomes, ni des mycoses tropicales à champignons dimorphiques qui peuvent être superficielles ou profondes. Par la suite, notre travail personnel détaillera et discutera les techniques pouvant être mises en œuvre pour optimiser l'examen mycologique, à partir d'un panel de souches de champignons filamenteux disponibles au laboratoire de mycologie du CHU de Limoges.

II. Principaux agents fongiques et mycoses associées rencontrés au laboratoire de mycologie médicale

II.1. Principaux champignons filamenteux

Les champignons sont des organismes eucaryotes uni- ou pluricellulaires. Il existe environ 100000 espèces regroupées en plus de 3000 genres. Une centaine seulement est pathogène, responsable de mycoses systémiques profondes, sous-cutanées ou superficielles (Chabasse et al., 2002).

Le pouvoir pathogène des champignons repose sur divers mécanismes. La production de toxines ou mycotoxines peut être à l'origine d'intoxication alimentaire. Le développement du champignon dans l'organisme humain ou animal peut révéler une colonisation, une invasion ou une dissémination. Nous rencontrons également des pathologies allergiques dues à la réponse immunitaire excessive de l'hôte face aux champignons, notamment les *Aspergillus* sp.

Une des principales caractéristiques des mycètes est leur reproduction. La production d'un grand nombre de spores leur assure un pouvoir de diffusion et donc de contamination considérable dans l'environnement. Les reproductions sexuées et asexuées sont la base de la classification des champignons. L'identification des champignons est encore essentiellement morphologique. Un micromycète peut se présenter sous sa forme sexuée ou téléomorphe et sous sa forme asexuée ou anamorphe. Pour les deux types de formes il existe des noms différents. Si plusieurs aspects coexistent sous la forme asexuée, il s'agit de la forme synanamorphe. Si, dans la même culture, le champignon existe sous ses formes sexuée et asexuée, il s'agit de la forme holomorphe. Lorsqu'une espèce fongique est mise en évidence en culture, elle portera le nom de la forme isolée. Mais si les deux formes coexistent, c'est le nom de la forme sexuée qui sera retenu.

Actuellement nous assistons à une réorganisation taxonomique. La classification de Hawksworth, Sutton et Ainsworth (1970), modifiée par Kwon Chung et Bennett (1992), puis par de Hoog (1995) reste la plus utilisée. Quatre divisions sont décrites selon les modalités de la reproduction sexuée (De Hoog, 2000) :

- **Mastigomycètes**, rarement impliqués en pathologie humaine, répartis en deux classes, les Chytridiomycètes et les Oomycètes. La nomenclature ne retient

actuellement que les Chytridiomycètes caractérisés par des spores munies d'un flagelle et la présence de chitine dans leur paroi.

- **Zygomycètes**, caractérisés par la production de spores sexuées, les zygospores. Leur mycélium végétatif est large, dilaté, très peu cloisonné, avec une reproduction asexuée endogène. Ce sont les Mucorales où les spores sont produites à l'intérieur d'un sac ou sporocyste, et les Entomophtorales où les spores sont produites à l'extrémité de filaments et peuvent être projetées à distance, d'où leur nom de ballistospores.

- **Ascomycètes**, où les spores sont produites à l'intérieur d'un sac appelé asque. Ces asques sont généralement octosporés, ils peuvent être soit libres comme chez les Hémiascomycètes (ou levures ascosporees), ou bien se trouver protégés à l'intérieur d'un ascocarpe comme chez les Ascomycètes. Six ordres se répartissent dans ce groupe et se distinguent par la formation des ascospores. Ce sont les Onygenales, les Eurotiales, les Microascales, les Ophiostomatales, les Sordariales et les Dothidéales.

- **Basidiomycètes**, où le thalle est cloisonné. Les spores sexuées (basidiospores) sont formées par bourgeonnement à l'apex de cellules allongées, les basides. Les Basidiomycètes sont en général des saprophytes de l'environnement, ceux retrouvés en parasites chez l'homme sont des *Cryptococcus* sp. Des levures aux caractères proches des Basidiomycètes sont retrouvées chez l'homme, les *Malassezia* sp., *Rhodotorula* sp. et *Trichosporon* sp.

- **Deutéromycètes** ou champignons imparfaits qui regroupent le plus grand nombre d'espèces d'intérêt médical. Toutes les espèces qui se multiplient sur le mode asexué se trouvent dans ce groupe, et aussi des espèces qui n'expriment pas leur reproduction sexuée en culture. Des travaux de biologie moléculaire ont montré que ces espèces étaient proches des Ascomycètes ou des Basidiomycètes. Ce groupe se divise en trois classes :

- **Blastomycètes** regroupant les champignons levuriformes.
- **Hyphomycètes** regroupant les champignons filamenteux à thalle septé dont les cellules conidiogènes sont libres. Parmi eux, nous distinguons les Hyalohyphomycètes, appartenant à la famille des Moniliaceae qui sont clairs (*Aspergillus* sp., dermatophytes), et les Phaeohyphomycètes ou Dématiés qui sont foncés, appartenant à la famille des Dematiaceae.
- **Coelomycètes** rassemblant les champignons filamenteux dont les cellules conidiogènes sont contenues dans des organes protecteurs appelés pycnides.

II.1.1. Agents fongiques en cause dans les infections profondes

Aspergillus

Les *Aspergillus* sont des contaminants omniprésents dans l'environnement (Warris et Verweij, 2005). Ils se rencontrent aussi bien en milieu rural (foin, céréales ou fruits moisissés, etc.) qu'en milieu urbain, et autant à l'extérieur qu'à l'intérieur des habitations (poussières, faux plafonds, plantes en pots, lieux humides, etc.). Ils sont pourvoyeurs de pathologies hétérogènes, pouvant être parfois nosocomiales, liées aux travaux dans les milieux hospitaliers. Ce sont des pathogènes opportunistes. Ils se développent lorsqu'il existe chez l'hôte des conditions favorables :

- soit locales comme une caverne tuberculeuse, un cancer broncho-pulmonaire ou une BPCO.
- soit générales lors des traitements immunosuppresseurs prolongés, les hémopathies malignes ou les chimiothérapies aplasiantes.

Des facteurs environnementaux se surajoutent, à savoir l'abondance des spores aspergillaires dans l'air inhalé pour les personnes travaillant le foin. De plus les caractéristiques intrinsèques du champignon, comme la petite taille des spores, la thermotolérance, et la sécrétion d'enzymes protéolytiques contribuent à la fréquence des pathologies aspergillaires.

Les *Aspergillus* sp. présentent une croissance rapide sur milieu de Sabouraud additionné d'antibiotiques, à 22-25°C et à 37°C pour les espèces thermophiles. Pour la plupart, ils sont inhibés par le cycloheximide (Actidione[®]), produit antibiotique et antifongique. En général, les colonies apparaissent après 24 à 48 heures de culture, elles sont plates et formées de courts filaments aériens blancs. Les teintes caractéristiques des colonies apparaîtront après la maturation des structures conidiogènes, c'est-à-dire à 48 ou 96 heures. C'est à partir de ces couleurs que l'orientation rapide du diagnostic d'espèce va se faire. Au recto, les colonies seront gris-vert pour *A. fumigatus*, vert-jaune pour *A. flavus* et les espèces du groupe *A. glaucus*, vert foncé à chamois pour *A. nidulans*, brun cannelle pour *A. terreus*, chamois clair, jaune et rose pour *A. versicolor*, jaunes puis noires pour *A. niger*. Elles resteront blanches pour *A. candidus*. Le revers de la colonie est incolore à jaune, mais pourra brunir ou rougir avec l'âge. La fructification des *Aspergillus* sp. peut être stimulée par les repiquages des colonies sur des géloses au malt ou des milieux de Czapek.

Concernant les caractères morphologiques, le thalle est formé de filaments mycéliens hyalins, de diamètre fin et régulier, septés et ramifiés. La mise en évidence des têtes aspergillaires à l'examen microscopique des colonies permettra l'identification du genre *Aspergillus*. À partir des filaments végétatifs, prennent naissance des filaments dressés non cloisonnés, ce sont les conidiophores. Ils se terminent par une vésicule de forme variable sur laquelle reposent les cellules conidiogènes appelées phialides. Chez les *Aspergillus* sp., la conidiogenèse s'effectue sur un mode blastique phialidique. Il y a bourgeonnement à l'apex des phialides d'une série de spores ou conidies qui restent accolées les unes aux autres en chaînes non ramifiées, basipètes, la plus jeune étant à la base de la chaîne. Les spores sont toujours unicellulaires, et de formes variables, globuleuses, subglobuleuses ou elliptiques. Elles peuvent être pigmentées, lisses ou recouvertes d'aspérités. Les phialides sont soit directement insérées sur la vésicule (tête unisériée), soit portées par des métules (tête bisériées). L'ensemble vésicule +/- métules, phialides et conidies constitue la tête aspergillaire.

Le diagnostic d'espèce repose sur des critères macroscopiques et microscopiques. Pour la macroscopie, il faut s'intéresser à la vitesse de pousse et à l'aspect des colonies à maturité. Seront analysés la surface (duveteuse, veloutée, poudreuse ou granuleuse), le relief (colonie plane ou surélevée) et la couleur au recto et au verso. Microscopiquement, nous analysons la taille du conidiophore et son aspect (pigmentation, échinulations), puis la taille et la forme de la vésicule. Ensuite selon l'implantation des phialides sur la vésicule, la tête est dite en colonne, ronde ou radiée. Enfin nous regardons la présence ou non de métules, la pigmentation et la taille des conidies, puis l'existence ou non d'une reproduction sexuée (stade téléomorphe) marquée par la présence de cléistothèce ou de cellules en noisette, « Hülle cells ». Dans le cadre des aspergilloses invasives, l'ECIL (European Conference of Infection in Leukemia) recommande une identification au rang de l'espèce de l'aspergillus en cause pour guider rapidement la thérapeutique (Van der Linden et al., 2011).

Des complexes d'espèces apparaissent avec des sous espèces proches génétiquement mais aux aspects microscopiques et aux profils de sensibilité aux antifongiques différents (Geiser et al., 2007). Les différences phénotypiques microscopiques ne sont pas distinguables visuellement (Balajee et al., 2006). Parmi les *Aspergillus* sp., il y a six sections ou complexes. La section Fumigati (Samson et al., 2007a) contient 33 espèces différentes avec 10 anamorphes et 23 espèces de

Neosartorya. Dans cette section, il est important de retenir la résistance naturelle d'*A. lentulus* (Balajee et al., 2005a) face aux azolés (CMI pour l'itraconazole 0,5 à 1 µg/L, pour le voriconazole 4 µg/L), à l'amphotéricine B (CMI de 1 à 2 µg/L) et à la caspofongine (CMI de 4 à 32 µg/L) (Alcazar- Fuoli et al., 2008). *Neosartorya pseudofischeri* (Balajee et al. 2005b) se différencie également d'*A. fumigatus* par sa production d'ascospores et par des CMI augmentées pour le voriconazole par rapport aux *Aspergillus* sp. plus communs. La section Nigri a été revue récemment en 2004 (Varga et al., 2011). Parmi la section des Versicolores, 18 espèces sont décrites (Jurjevic et al., 2012), dont la plus représentative est *A. versicolor*. Ce sont les analyses génotypiques qui permettent de décrire chaque espèce d'*Aspergillus* sp. (Krimitzas et al., 2013). La spectrométrie de masse montre de plus en plus son efficacité dans l'identification des *Aspergillus* sp (De Carolis et al., 2012). Cette technique pourrait donc permettre un délai d'identification plus court que celui utilisant les techniques de la biologie moléculaire.

Scedosporium

Concernant les *Scedosporium* sp., cinq groupes phylogénétiques sont représentatifs avec des modifications taxonomiques récentes notamment avec le complexe *Pseudallescheria boydii* qui comprend le groupe *S. apiospermum* sensu stricto, le groupe *P. boydii*, et trois espèces de description récente : *S. prolificans*, *S. aurantiacum* et *S. dehoogii*.

Chez les *Scedosporium* sp., la culture est relativement facile sur les milieux usuels, avec inhibition par le cycloheximide. Les colonies prennent un aspect cotonneux, laineux, de couleur blanchâtre au début, puis grise. Le verso quant à lui devient foncé, presque noir. Les *Scedosporium* sp. sont thermotolérants et peuvent pousser jusqu'à 40° C.

L'examen microscopique met en évidence un mycélium hyalin septé. La reproduction asexuée procède selon deux modalités distinctes :

- soit la conidiogenèse s'effectue sur un mode thalique solitaire avec la formation d'aleuries naissant directement sur les côtés des filaments végétatifs, ou bien à l'extrémité de conidiophores fins qui sont dressés à angles droits sur le thalle végétatif. Les conidies sont ovoïdes ou claviformes, brunes et mesurent de 6 à 14 µm de long sur 5 à 6 µm de large.

- soit la conidiogénèse correspond à des groupes d'annélides, les corémies, qui donnent naissance à des conidies hyalines. Celles-ci sont fines, allongées et mesurent de 5 à 7 µm de long sur 2 à 3 µm de large.

La reproduction sexuée correspond à *P. boydii* ; elle est obtenue parfois après 2 à 3 semaines de culture ou sur des milieux pauvres. La caractéristique est la présence de cléistothèces jaunes à bruns, arrondis, au diamètre de 140 à 180 µm et contenant des asques sphériques octosporés de teinte cuivrée.

L'identification correcte au niveau de l'espèce est requise car la pathogénicité est espèce dépendante (Lackner et al., 2012a). Les CMI sont très élevées dans ce groupe de champignons pathogènes (Gilgado et al., 2006). Les espèces de *Pseudallescheria* et *Scedosporium* sont plus résistantes aux antifongiques. Parmi les triazolés, seul le voriconazole peut être utilisé en première ligne car il cible toutes les espèces sauf *S. prolificans*. À ce niveau, la variation phénotypique n'est distinguable ni en macroscopie ni en microscopie, et la difficulté est majorée par la présence des formes synanamorphes.

Fusarium

Pour les *Fusarium* sp., l'examen direct montre des filaments hyalins septés fins, avec des bifurcations à angles aigus, ressemblant aux filaments d'*Aspergillus* sp. Après culture, ce sont les macroconidies qui permettent l'identification mycologique (Nucci et Anaissie, 2007).

Les *Fusarium* sp. poussent sur les milieux de Sabouraud classiques, entre 22° C et 37° C, mais une gélose au malt est plus favorable. L'aspect macroscopique consiste en des colonies duveteuses ou cotonneuses de couleur variant du blanc crème au rose ou au violet, avec parfois une pigmentation de la gélose. Les colonies à croissance rapide, peuvent atteindre un diamètre de 3 cm en une semaine. Microscopiquement, il faut observer le thalle végétatif d'où naissent des conidiophores courts et souvent ramifiés. Ceux-ci portent des phialides qui possèdent un ou plusieurs sites de bourgeonnement pour la production des conidies. Généralement les phialides présentent un site de bourgeonnement unique, appelé monophialide situé à l'extrémité d'un col allongé, comme c'est le cas chez *F. solanii*. Le col peut être court et trapu, c'est le cas de *F. oxysporum*. Chez d'autres espèces les phialides peuvent avoir plusieurs sites de bourgeonnement (polyphialides), c'est le cas de *F. proliferatum*. Deux types de conidies sont produits. Les microconidies, uni ou bi-cellulaires, de 4 à 8 µm de long, allongées, ovales ou cylindriques. Elles

peuvent être isolées ou groupées, disposées en verticilles ou plus rarement en chaînettes, avec *F. moniliforme*. Les macroconidies sont pluricellulaires, cloisonnées transversalement et souvent groupées en paquets. Elles mesurent de 18 à 80 µm de long, fusiformes, courbées, pointues aux extrémités avec la présence d'une cellule podale en forme de talon. Des chlamydospores terminales ou intercalaires peuvent être présentes. C'est sur ces critères que repose le diagnostic d'espèce. En plus des principales espèces de *Fusarium* sp. (*F. oxysporum*, *F. solanii*, *F. moniliforme* et *F. incarnatum*), il existe les espèces suivantes : *F. dimerum*, *F. proliferatum* et *F. subglutinans*. L'observation microscopique permet rarement l'identification au rang de l'espèce pour le genre *Fusarium*. Ces champignons présentent une grande variabilité de sensibilité aux divers antifongiques (Lortholary et al., 2010). C'est pourquoi il est nécessaire d'utiliser la spectrométrie de masse (Dong et al., 2009) ou la biologie moléculaire pour obtenir une identification correcte.

Mucorales

Les Mucorales ont une croissance rapide et extensive sur les milieux traditionnels de mycologie, mais sont inhibés par la cycloheximide. Ce sont des espèces très thermophiles avec des températures de croissance variant de 20° C pour les *Mucor* sp., à 20-25° C pour les *Rhizopus* sp., et même 36° C pour les *Lichteimia* sp. (anciennement *Absidia* sp.). Les colonies présentent un développement aérien important, notamment chez les *Rhizopus* sp., et envahissent la totalité des boîtes ou tubes de culture en 5 à 7 jours.

L'examen direct montre des filaments siphonnés ayant un aspect de ruban, de diamètre large (6 à 16 µm), non ou peu septés, avec des embranchements à angle droit. La mise en évidence peut être facilitée en lumière ultra-violette, avec l'utilisation de Calcofluor[®]. En général, il y a émission de stolons qui courent à la surface de la gélose et adhèrent au substrat par des sortes de racines appelées rhizoïdes. Des stolons partent aussi des filaments dressés, les sporocystophores porteurs des sporocystes. La partie apicale dilatée du sporocystophore représente la columelle, elle fait saillie à l'intérieur du sporocyste globuleux ou piriforme selon les espèces. C'est au cœur des sporocystes que sont produites les spores à surface lisse, striée ou granuleuse. Elles seront libérées à maturité par déchirement de la paroi du sporocyste. Parfois, la paroi peut persister autour de l'apex sous forme de collerette au niveau de la columelle. Chez certains genres comme les *Rhizopus* ou les *Lichteimia*, le sporocystophore présente à son extrémité un élargissement au-

dessous du sporocyste, appelé apophyse. Inversement chez les *Mucor* sp., le sporocystophore possède un étranglement.

Les critères morphologiques à prendre en compte dans la différenciation des familles de Mucorales sont : l'existence ou non de ramifications sur les sporocystophores, la forme des sporocystes, la présence d'une columelle, et l'abondance des spores dans les sporocystes à maturité.

Pour la différenciation au sein des genres, il faut ajouter : l'aspect des sporocystophores et leur groupement, la forme de la columelle et les caractéristiques de sa surface, la présence ou non d'une apophyse et sa taille, la présence ou non de rhizoïdes, et l'abondance des chlamydo-spores (Hoffmann et al., 2013).

Phaeohyphomycètes

Les Phaeohyphomycètes sont caractérisés par la présence de mélanine dans leur paroi. Les hyphes sont alors colorés en noir, il s'agit d'un facteur majeur de pathogénicité. Ce sont des moisissures issues du sol ou de végétaux en décomposition. Ils parasitent fréquemment les plantes et sont de véritables agents opportunistes pour l'homme. Ils se développent rapidement sur les milieux usuels de mycologie, avec une température optimale entre 25° et 30° C. Leur croissance est inhibée par le cycloheximide. Nous rencontrons quatre genres principaux.

Exophiala - Les colonies brunes sont ici à croissance lente. Les espèces isolées en pathologie humaine se développent à 37°C et au-delà, avec l'apparition de colonies levuriformes. Précocement nous pouvons voir des petites levures uni ou bicellulaires. Ensuite les hyphes septés, de couleur brun pâle, donnent naissance à des annélides cylindriques ayant une extrémité effilée. Elles produisent ensuite des conidies hyalines ou brunes, ovales ou cylindriques, uni ou bicellulaires, qui se regroupent à l'extrémité des annélides.

Alternaria - Les colonies duveteuses à laineuses deviennent rapidement foncées (vert ou noir) au recto comme au verso. Les hyphes bruns sont septés et ramifiés. Les conidiophores peuvent être droits ou flexueux. Les conidies sont brunes et pluricellulaires. Leur forme particulière est piriforme ou ovoïde, avec une partie basale arrondie et une extrémité apicale allongée en bec. Ces dictyospores de taille importante (50-100 µm / 3-16 µm) présentent à maturité des cloisons transversales, obliques ou longitudinales.

Cladosporium - Ce sont de fréquents contaminants de laboratoire. Leur croissance n'est pas inhibée par le cycloheximide. Les colonies noires sont veloutées

ou floconneuses, parfois poudreuses. Les hyphes septés et pigmentés produisent des conidiophores. Ensuite les premières conidies formées à l'extrémité du conidiophore sont de grande taille, elles peuvent être pluricellulaires. Des petites conidies unicellulaires peuvent être présentes sur leur paroi, aux extrémités, avec des cicatrices de bourgeonnement. Nous observons alors de longues chaînes acropètes et ramifiées.

Phialophora - Fréquents saprophytes du bois en décomposition, ces champignons présentent des colonies veloutées à laineuses, de couleur brune. Ici, les phialides sont en forme de bouteille, ou cylindriques, et présentent à leur extrémité apicale une collerette. Ceci permet de les différencier des *Exophiala* sp. Les conidies sont globuleuses, pouvant être claires ou noirâtres. Elles s'accumulent en amas à l'extrémité des phialides.

D'autres dématiés se rencontrent en pathologie humaine, comme les *Bipolaris* sp., les *Curvularia* sp., ou les *Aureobasidium* sp.

II.1.2. Agents fongiques en cause dans les infections superficielles

Les acteurs des mycoses superficielles sont principalement les dermatophytes, dont le plus commun est *Trichophyton rubrum*.

Morphologiquement, ils possèdent un thalle septé se multipliant sur un mode sexué et produisant des ascospores. Cette forme sexuée est très difficilement observable en routine dans un laboratoire de mycologie. La classification des dermatophytes repose donc sur la reproduction asexuée ou conidiogénèse. Ils sont alors classés dans le Phylum des Deutéromycètes. La reproduction asexuée s'effectue ici sur le mode thalique solitaire et conduit à la production de deux types de spores, conidies ou aleuries : spore unicellulaire ou microconidie ; et spore pluricellulaire à base tronquée et cloisonnée transversalement ou macroconidie.

Trois genres sont rencontrés parmi ces deutéromycètes, *Epidermophyton*, *Microsporum* et *Trichophyton* (Badillet, 1991).

Epidermophyton - Décrit par Sabouraud en 1907, il comprend une seule espèce : *E. floccosum*. Généralement, *Epidermophyton* est caractérisé par l'absence de microconidies et la présence de macroconidies en forme de massue, et à paroi mince. La croissance des cultures est rapide, avec un début vers le cinquième jour.

Microsporum - Décrit par Gruby en 1843, il compte une dizaine d'espèces, mais nous en retrouvons deux chez l'homme en pratique quotidienne : *M. canis* et *M.*

audouinii. Ce genre est caractérisé par des macroconidies fusiformes de grande taille, à paroi épaisse verruqueuse ou échinulée. Ces macroconidies sont multiseptées. Les microconidies sont piriformes, et parfois rondes. Les hyphes sont pectinés avec un mycélium en raquette, où nous pouvons trouver des chlamydospores et des corps nodulaires. Les cultures sur milieux spéciaux varient selon chaque espèce.

Trichophyton - Décrit en 1845 par Mamsten, il est le plus fréquent. En pratique, une dizaine d'espèces sont capables de parasiter la peau et les phanères de l'homme. Il se définit par la présence de macroconidies en massue, à paroi mince et lisse, avec peu de cloisons internes. Les microconidies sont ici rondes ou piriformes selon les espèces. Lorsque le mycologue observe des gymnothèces fertiles, il s'agit des formes sexuées : *Arthroderma vanbreuseghemii* et *A. benhamiaea*. Ces caractères sont difficilement observables. Les analyses par enzymes de restriction de l'ADN mitochondrial ont montré que les bandes étaient identiques entre *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* et *A. vanbreuseghemii* (Anzawa et al., 2011). Mais lors de l'utilisation de l'ARN ribosomal, il y a bien une distinction entre *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* et *A. vanbreuseghemii*.

D'autres espèces peuvent être à l'origine d'atteinte de la peau et des phanères, comme certaines moisissures (*Aspergillus* sp. et *Fusarium* sp., *Scopulariopsis* sp., *Neoscytalidium* sp.).

II.2. Principales mycoses à champignons filamenteux

II.2.1. Mycoses profondes

Ces dernières années, nous observons dans les services d'hématologie une augmentation des infections fongiques invasives (IFI) après une greffe de moelle, dues à des *Aspergillus* sp. mais aussi à des champignons filamenteux autres qu'*Aspergillus* sp. (Neofytos et al., 2009). Pour être le plus représentatif possible de l'épidémiologie de ces IFI et pour rendre un résultat dans un délai raisonnable, les mycologues doivent documenter au mieux les espèces fongiques en cause, ce qui nécessite d'isoler correctement la souche et d'utiliser les techniques d'identification les plus adéquates. Afin d'orienter les cliniciens, il est nécessaire d'homogénéiser et de standardiser les protocoles d'identification des champignons pour une collaboration clinico-biologique efficace et rapide (Kauffmann-Lacroix et al., 2011).

Les critères d'hôtes favorisant la survenue d'IFI sont : une neutropénie avec un compte cellulaire inférieur à 500 par μL durant plus de dix jours, l'allogreffe de moelle, une corticothérapie prolongée à une posologie supérieure à 0,3 mg/kg/j plus de 3 semaines consécutives, la prise d'un immunosuppresseur cellulaire T dans les 90 jours précédant le diagnostic, ou la présence d'un déficit immunitaire constitutionnel (De Pauw et al., 2008).

Aspergilloses

L'aspergillose invasive, première cause d'infection fongique en hématologie, se caractérise par le développement de filaments fongiques dans les tissus. L'aspergillose invasive représente 17,3 % des IFI en 2012 en France (CNRMA, 2013). Elle survient chez des patients immunodéprimés (Lortholary et al., 2011) (neutropénie, greffe de moelle ou d'organe solide, sida, traitement corticoïde à forte dose, granulomatose septique, etc.). La dissémination à distance par voie hématogène avec formation de thrombose fongique s'explique par l'aptitude angio-invasive des filaments mycéliens. Malgré des hémocultures restant négatives, la dissémination est réelle avec les nombreuses atteintes secondaires : cérébrales, rénales, cutanées, endocardiques, et au niveau de la thyroïde ou du tube digestif. L'isolement d'une souche d'*Aspergillus* sp. n'est effectif que dans 20 % des cas. L'identification de l'espèce est obtenue dans 48 % des cas avec la répartition suivante : *A. fumigatus* (78 %), *A. flavus* (9 %), *A. niger* (9 %) et *Aspergillus* sp. (4 %) (Neofytos et al., 2009).

Moins invasives sont les aspergilloses pulmonaires chroniques nécrosantes, où les filaments envahissent lentement les tissus pulmonaires. Elles surviennent chez des personnes non immunodéprimées présentant des altérations locales ou systémiques des défenses anti-infectieuses de type : éthyliste, tabagisme, diabète, dénutrition, maladie de système, cancer pulmonaire, antécédent d'irradiation pulmonaire et corticothérapie prolongée (inhalee ou systémique). Elles surviennent aussi chez des sujets présentant des maladies broncho-pulmonaires sous-jacentes responsables ou non de cavités pulmonaires ou pleurales résiduelles (tuberculose active ou séquelles tuberculeuses [BPCO], dilatation des bronches, sarcoïdose). En général, il n'y a ni invasion vasculaire, ni dissémination à distance, mais une extension pleurale ou pariétale de contiguïté. La distinction radioclinique avec l'aspergillose invasive est difficile. Histologiquement, nous trouvons de rares

filaments au sein de nodules fibronécrotiques qui détruisent le parenchyme pulmonaire.

Les patients atteints de mucoviscidose produisent un mucus bronchique visqueux, diminuant leur clairance mucociliaire. Ils sont alors plus facilement colonisés par certains microorganismes, particulièrement par certaines moisissures (13 à 60 % des patients atteints de mucoviscidose sont colonisés par des champignons filamenteux). Les espèces dominantes sont *A. fumigatus* (40 à 57 % des patients colonisés), et de nouvelles espèces émergent telles *Scedosporium* sp., *Geosmithia* sp., ou *Exophiala* sp. Cette colonisation est secondaire à la colonisation bactérienne, elle apparaît à l'adolescence. La principale complication est l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique.

Les aspergilloses allergiques regroupent l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique ou maladie de Hinson-Pepys, l'asthme réaginique aspergillaire, l'alvéolite allergique extrinsèque aspergillaire et les sinusites fongiques allergiques.

Enfin, l'aspergillome est une masse arrondie dense constitué d'un maillage de filaments qui se sont développés dans une cavité existante au préalable (caverne tuberculeuse, ou bulle d'emphysème), condition sine qua non pour retenir ce diagnostic. En général, les aspergillomes sont localisés dans les poumons, les sinus ou les cavités pleurales. Dans ce cas, les filaments envahissent lentement les tissus voisins.

Scédosporioses

Les scédosporioses représentent 1,1 % des IFI en France en 2012 (CNRMA, 2013). Ce sont des champignons telluriques présents dans les sols enrichis de débris organiques et dans les eaux boueuses ou polluées (Kaltseis et al., 2009). La contamination est aérienne, avec une atteinte d'abord pulmonaire puis disséminée. Chez l'immunocompétent les *Scedosporium* sp. sont à l'origine de mycétome, d'arthrites, de colonisation et d'infections respiratoires (sinusites, surinfections broncho-pulmonaires). *Scedosporium apiospermum* est à l'origine de mycétomes à grains blancs, suite à une inoculation traumatique de spores. Des atteintes oculaires et profondes ont été décrites. En revanche chez le sujet immunodéprimé, notamment d'hématologie (neutropénie, GVH), c'est l'atteinte disséminée qui prédomine en phase précoce après une greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH), avec des signes pulmonaires, cérébraux, et cutanés. Les *Scedosporium* sp. sont aussi connus comme d'habituels colonisateurs pulmonaires chez les patients atteints de mucoviscidose.

La prise en charge thérapeutique des scédosporioses est difficile. Pour maximiser les chances de survie d'un patient souffrant d'une IFI à *Scedosporium* sp., une thérapie appropriée doit être débutée le plus tôt possible. Il faut savoir que *S. prolificans* est une espèce résistante à tous les antifongiques. La place de la chirurgie est indéniable, d'autant plus si les facteurs d'immunodépression sont contrôlés. Le pronostic est sombre.

Fusarioses

Les fusarioses représentent 1,5 % des fongémies en France en 2012 (CNRMA, 2013). Ce sont des champignons cosmopolites, dont nous distinguons environ une quarantaine d'espèces répandues dans la nature et vivant en saprophytes. Le plus souvent il s'agit d'IFI chez un patient immunodéprimé, avec des facteurs de risques reconnus comme la neutropénie et la GVH (Nucci et al., 2004). Chez l'immunocompétent, nous observons des atteintes cornéennes, cutanées et unguéales. La contamination est aérienne avec une atteinte pulmonaire puis une dissémination, principale forme chez les patients greffés de CSH. La contamination peut aussi être locale par effraction de la barrière cutanée, comme cela peut être le cas chez les patients présentant des brûlures étendues. Au niveau thérapeutique, les *Fusarium* sp. sont très peu sensibles aux antifongiques (Raad et al., 2006). L'espèce est importante à connaître pour conduire le traitement des infections invasives. Par exemple, *F. solanii* est résistant aux triazolés (fluconazole, posaconazole et itraconazole) (Tortorano et al., 2014). La démarche thérapeutique comportera un contrôle des facteurs de risque comme la neutropénie, la résection des tissus infectés, et la mise en place d'un traitement par voriconazole, amphotéricine B ou bien posaconazole.

Zygomycoses (mucormycoses)

Les zygomycoses sont rares en France, 2,8 % des fongémies en 2012 (CNRMA, 2013), mais l'incidence est en augmentation (Bitar et al. 2009), se trouvant au 2^{ème} rang des infections invasives à champignons filamenteux (Pappas et al., 2010).

Les Mucorales sont des champignons cosmopolites, saprophytes du sol. Ils contaminent souvent les denrées alimentaires (fruits et légumes). Ce sont de redoutables agents opportunistes. Les principaux facteurs de risque reconnus sont les pathologies hématologiques (greffe de CSH, GVH, neutropénie, corticoïdes), le

diabète de type 1 avec acidocétose, la transplantation d'organe solide, les traumatismes, les cancers, les brûlures, l'infection par le VIH et la déféroxamine (Roden et al., 2005). La porte d'entrée peut être les voies respiratoires supérieures ou inférieures, la peau ou le tube digestif. La contamination se fait principalement par inhalation, ensuite les filaments sont phagocytés au niveau pulmonaire en fonction de la réponse immunitaire de l'hôte (réaction oxydative, défensines, surexpression TLR2, activation de la voie de signalisation NFκB) (Gil-Lamaignere et al., 2005). La croissance des Mucorales est favorisée par la présence de fer (Ibrahim et al., 2012). Ces champignons sont capables d'utiliser la déféroxamine comme sidérophore en libérant le fer de la transferrine. L'acidose libère le fer de la transferrine, expliquant pourquoi les personnes ayant un diabète non équilibré sont plus susceptibles à développer des mucormycoses. Ainsi il existe des sites primitifs privilégiés en fonction du terrain, par exemple des atteintes cérébrales chez les toxicomanes par voie intraveineuse, des atteintes pulmonaires chez les patients leucémiques et/ ou greffés, des atteintes cutanées chez les grands brûlés ou les personnes ayant subi un traumatisme, enfin des atteintes sinusiennes chez les diabétiques ou les personnes sous déféroxamine.

La pathogénicité de ces champignons repose sur l'angiotropisme et le neurotropisme à l'origine de thrombose et de nécrose. Le pronostic est redoutable car l'extension loco-régionale est très rapide, et la dissémination à distance est pratiquement toujours présente. En effet dans près de la moitié des cas, le diagnostic est fait post-mortem. Les formes rhino-cérébrales et pulmonaires sont les plus fréquentes. Lorsque le diagnostic est posé, le traitement doit être précoce et repose sur la correction des facteurs favorisants, l'exérèse chirurgicale et l'instauration d'un antifongique. Les Mucorales sont sensibles aux polyènes (Lanternier et Lortholary, 2008), et au posaconazole (Van Burik et al., 2006). Résistants in vitro à la caspofungine, l'association polyènes- caspofongine est en cours d'étude (Reed et al., 2008). L'apport de Deferasirox[®] est aussi en évaluation (Cornely et al., 2014).

Phaeohyphomycoses

Les phaeohyphomycoses peuvent se présenter sous différentes formes selon le champignon en cause. Elles sont rarement rencontrées dans les infections disséminées ou profondes à type d'atteinte pulmonaire ou cérébrale. Leur fréquence est actuellement en augmentation. Leur prise en charge est difficile du fait d'une

identification souvent longue et difficile (Chowdary et al., 2014). Nous les voyons plus souvent lors d'atteintes superficielles.

II.2.2. Mycoses superficielles

Dermatophytoses

A côté de ces cas graves, se rencontrent quotidiennement les champignons « de ville », responsables de mycoses superficielles. Ce sont les dermatophytes (Seebache et al., 2008), très communs mais souvent sous-estimés par un défaut de diagnostic. Pourtant, ils jouent un rôle épidémiologique considérable et peuvent entraîner de lourdes complications médicales, notamment chez le patient diabétique, ou sociales (handicap à la marche, perte d'activité, surcoût des chaussures). Les onychomycoses sont vues en médecine de ville et ne sont pas toujours prélevées (Chabasse, 2011). Elles représentent 33 % des infections fongiques cutanées. La prise en charge de ces prélèvements est lourde et demande plusieurs jours ou semaines pour arriver à l'identification mycologique. Différents milieux d'identification sont requis et mis en culture à différentes températures. De surcroît un microscopiste entraîné devra retrouver les éléments morphologiques d'intérêt diagnostique : l'aspect du thalle, l'aspect des spores et le type de formation des conidies allant avec les données macroscopiques (Chabasse et Pihet, 2008).

Les dermatophytes sont des champignons adaptés à la kératine humaine et animale. Les sites privilégiés chez l'homme seront les phanères (ongles, poils, cheveux). Il est nécessaire d'avoir une lésion préexistante pour que le dermatophyte pénètre dans la couche cornée de l'épiderme (Feuilhade de Chauvin, 1998). La spore germe et donne des filaments à croissance centrifuge qui forment une lésion circulaire appelée épidermophytie circinée. La zone active se trouve en périphérie de la lésion et le centre guérit progressivement. De nombreux facteurs sont favorisants telles la chaleur et l'humidité qui stimulent la macération. Des modes de vie favorisent les dermatophytoses comme la pratique de certains sports (judo, marathon), et certaines professions (agriculteurs, vétérinaires, maîtres-nageurs).

Trois sortes de contamination existent:

- les espèces anthropophiles : contamination interhumaine obligatoire (*T. rubrum*, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, *T. soudanense*, *T. tonsurans*, *T. schoenleinii*, *T. violaceum*, *M. ferrugineum*, *M. audouinii*, *E. floccosum*),

- les espèces zoophiles : transmission d'un animal infecté (ou porteur sain) à l'homme par contact direct ou indirect. Ceci à partir d'animaux domestiques tel le chat et le chien pour *M. canis*, ou bien les bovins pour *T. verrucosum* ou le cheval pour *M. equinum*, et de nombreux animaux pour *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*.

- les espèces géophiles ou telluriques : contamination suite à une blessure tellurique. Nous rencontrons ici les espèces suivantes : *M. cookei*, *M. fulvum*, *M. gypseum*, *M. praecox*, *T. ajelloi*, *T. terrestre*.

Les atteintes du cuir chevelu et des poils sont fréquemment rencontrées. Exception faite pour *E. floccosum*, parasite exclusif de l'homme qui détermine des épidermophyties circinées inguinales, axillaires et périanales. Nous le rencontrons également dans les atteintes des plis interdigitoplantaires et des lésions circinées de la peau. L'importance de connaître le dermatophyte en cause est majeure. En effet devant un dermatophyte anthropophile, des mesures d'éviction avant la mise en place du traitement peuvent être nécessaires. Un contrôle de l'entourage du patient est requis. La conduite thérapeutique dépend du champignon isolé.

Atteintes du cuir chevelu et des poils

Nous distinguons les teignes tondantes microsporiques avec des plaques d'alopécie de grande taille (2- 6 cm), qui peuvent fusionner en de vastes placards polycycliques. Les cheveux sont ici cassés courts, engainés au sein de squames blanchâtres. L'examen clinique comportant une observation à la lampe de Wood met en évidence une fluorescence verte correspondant à la gaine de spores entourant les cheveux. Les espèces retrouvées sont *M. canis* et *M. audouinii*.

Dans les teignes tondantes trichophytiques, les plaques d'alopécie sont nombreuses et petites. Les cheveux sont cassés très courts et donc difficiles à prélever à la pince. L'examen à la lampe de Wood n'est pas contributif dans ces cas. Les espèces en cause sont le plus souvent *T. tonsurans*, *T. soudanense* et *T. violaceum*.

Quelquefois les lésions deviennent inflammatoires et suppurent. Il s'agit du sycosis de la barbe et du kérion. Ce sont des lésions érythémateuses d'évolution rapide où les phanères sont expulsés. *Trichophyton verrucosum* et *T. mentagrophytes* sont le plus souvent responsables de ces lésions. Dans le complexe *T. mentagrophytes* (Hirogana, 1979), nous sommes confrontés à des incertitudes d'identification (Fréalles et al., 2007). *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*

est en général l'espèce en cause dans les mycoses cutanées et les onychomycoses anthropophiles. Lorsque la lésion est inflammatoire ou que les données épidémiologiques sont en faveur d'une transmission zoophile, c'est *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* qui est en cause (Georg, 1954).

Onychomycoses

Les onychomycoses se rencontrent dans 6 à 9 % de la population générale (Société française de dermatologie, 2007). Elles représentent seulement 50 % des onychopathies, les autres causes sont représentées par les microtraumatismes, les affections dermatologiques comme le psoriasis ou des causes systémiques comme une sarcoïdose ou des troubles thyroïdiens. Les agents responsables sont le plus souvent les dermatophytes notamment pour les atteintes des ongles des pieds. Au niveau des ongles de la main, nous trouvons plus fréquemment des levures. Enfin dans les deux localisations, les moisissures peuvent être à l'origine de l'atteinte unguéale. Les patients consultent souvent tardivement lorsque l'atteinte devient inesthétique ou si la gêne entraîne une douleur locale.

Nous rencontrons les onychomycoses chez des sportifs (piscine, marathoniens) ou dans certaines professions (militaires, maître-nageur). D'autres facteurs favorisants peuvent être retrouvés tels : un hallux valgus, des chaussures fermées, une atteinte familiale, la corticothérapie, le diabète et les troubles trophiques des membres inférieurs chez les personnes âgées. Il y a quatre types d'atteintes. La plus fréquente est l'onychomycose sous unguéale disto-latérale, causée le plus souvent par les dermatophytes. Ces derniers pénètrent dans l'hyponychium, au niveau du sillon latéral pour atteindre le lit de l'ongle. Il y a alors une hyperkératose sous unguéale et la tablette se détache. Progressivement la zone matricielle proximale sera envahie. L'onychomycose sous unguéale proximale est beaucoup plus rare, causée aussi par les dermatophytes. Le signe clinique est une leuconychie. Cette atteinte polydactylique survient en général chez des patients immunodéprimés. Les leuconychomycoses superficielles traduisent une atteinte de la tablette unguéale de dehors en dedans par des dermatophytes ou des moisissures. Elles sont souvent secondaires à un traumatisme local ou une macération entretenue par un chevauchement d'orteil. L'onychodystrophie totale représente le stade ultime des onychomycoses secondaire à un envahissement progressif détruisant la totalité de la tablette unguéale.

Atteintes de la peau

Les épidermophyties circinées sont dues à des dermatophytes zoophiles et anthropophiles. Elles se manifestent à tout âge sur les zones découvertes : face, cou, mains, avant-bras, jambes et fesses chez le nourrisson. La lésion débutante prurigineuse est arrondie, avec une croissance centrifuge. Il y a une bordure érythémato-vésiculo-squameuse. Le centre est rosé finement squameux ayant tendance à la guérison. Plusieurs lésions peuvent confluer et donnent des lésions polycycliques.

L'atteinte des grands plis se rencontrent par ordre de fréquence au niveau : du pli inguinal, de façon unilatérale ou bilatérale et symétrique, du pli axillaire, du pli sous mammaire ou du pli inter-fessier. La lésion consiste en un placard érythémato-squameux et prurigineux. Elle débute au fond du pli, et s'étend de façon centrifuge sur les bords latéraux. Là aussi, le centre rosé a tendance à guérir. Il s'agit d'une lésion très bien limitée, avec une bordure inflammatoire, squameuse et vésiculeuse. Au niveau des petits plis, la lésion inter-digito plantaire est la plus fréquente. L'atteinte touche préférentiellement le 3ème et le 4ème espace inter-digito-plantaire. En général la lésion débute par un érythème, avec la formation de vésicules ou de bulles. La lésion se fissure et desquame. La peau entourant ces fissures est macérée, blanchâtre puis s'épaissit (hyperkératose). La fissure laisse apparaître une surface à vif, rouge et légèrement suintante. Dans certains cas, la lésion est sèche et squameuse. Le prurit intense est exacerbé par l'eau et la chaleur. Les lésions peuvent s'étendre sur les bords latéraux des 4^{ème} et 5^{ème} orteils et se généraliser aux autres espaces inter-digito-plantaires, à la plante, au dos du pied et aux ongles. L'ensemble de ces lésions est appelé le pied d'athlète.

La lésion inter-digito-palmaire est rare. Elle est généralement sèche, non érythémateuse et peu prurigineuse. Elle peut s'étendre à la paume de la main et aux ongles.

Les atteintes palmaires et plantaires surviennent donc le plus souvent par contiguïté des lésions précédemment décrites.

Traitement

Le traitement d'une dermatophytose est nécessaire et doit être adapté à chaque type de lésion (Lesley F et al., 2014). Il n'y a pas de guérison spontanée et la qualité de vie des patients est compromise. Le prélèvement, recommandé par la Société Française de Dermatologie, est donc primordial. Il mettra en évidence l'agent

fongique responsable de la dermatophytose et pourra éliminer des diagnostics différentiels.

Scytalidioses

Les scytalidioses sont des mycoses superficielles causées principalement par *Neoscytalidium dimidiatum* et *Scytalidium hyalinium*, souvent nommés pseudo-dermatophytes (Machouart et al., 2013). Ce sont des champignons dématiés phytopathogènes dans les zones tropicales, où l'homme se contamine par la marche pieds nus (Badillet, 1988). L'atteinte des extrémités est caractéristique, notamment aux mains avec une kératodermie farineuse localisée aux plis de flexion interphalangiens et palmaires de façon bilatérale. Il y a aussi une atteinte plantaire bilatérale ressemblant aux pieds mocassins dermatophytiques. Ces lésions sont prurigineuses. Un intertrigo est souvent associé. Il existe une onychopathie touchant tous les ongles, étendue et pigmentée, avec une onychodystrophie irréversible et souvent invalidante.

Ce diagnostic difficile dépend de la qualité du prélèvement. Les conséquences multiples de la scytalidiose sont à connaître. À savoir que ces lésions peuvent être la porte d'entrée d'infections bactériennes, ou évoluer vers la formation d'abcès mycotiques post-traumatiques. Enfin chez l'immunodéprimé et le diabétique, l'évolution se fait vers la neuropathie avec des lésions rapidement délabrantes. Les antifongiques ont en général une faible activité (Lacroix et De Chauvin, 2008).

Phaeohyphomycoses

Les phaeohyphomycoses sous cutanées ne sont pas spécifiquement tropicales et peuvent s'observer chez les immunodéprimés. En effet des cas ont été décrits chez des patients présentant un diabète, ou sous corticothérapie et autres immunosuppresseurs. Les agents en cause appartiennent le plus souvent aux genres *Exophiala* et *Phialophora*. L'infection fait suite à un traumatisme avec des végétaux (épines), et les localisations préférentielles sont les extrémités des membres. L'aspect de la lésion est fonction de l'état immunitaire de l'hôte. En principe, il s'agit d'un nodule sous-cutané de petite taille, bien limité, indolore qui évolue en fluctuant. En cas d'immunodépression, la lésion peut être moins bien limitée, en plaque avec un aspect verruqueux, et de localisations multiples. Dans ce cas, la fistulisation est possible. Là encore, seule la culture permet l'identification de l'espèce. Cette identification est nécessaire pour la mise en place d'un traitement. Il

n'y a pas de schéma thérapeutique précis pour les phaeohyphomycoses (Chowdary et al., 2014), face à la grande variété des espèces incriminées.

Les chromomycoses sont dues aussi à des champignons à pigment noirs, principalement *Cladiophialophora carionni* et *Fonsecaea pedrosoii*. Elles s'observent dans les régions tropicales et sub-tropicales, avec des cas rapportés dans les territoires français d'outre-mer. Les lésions nodulo-verruqueuses prédominent aux membres. Les formes cliniques sont multiples, en plaques, ulcérées, pseudotumorales ou cicatricielles. D'évolution chronique, de nombreuses complications peuvent survenir comme des surinfections avec un lymphœdème, un éléphantiasis et même une transformation néoplasique.

III. Identification actuelle au laboratoire de mycologie du CHU de Limoges

Pour une identification correcte, il est nécessaire que les conditions pré-analytiques de chaque analyse soient respectées. Un prélèvement adapté et de bonne qualité donnera un meilleur résultat en matière d'identification. L'examen mycologique est constitué de différentes étapes : l'examen direct, la culture et l'identification.

III.1. Examen direct

Tout commence par l'examen direct entre lame et lamelle de fragments de l'échantillon prélevé mélangés à un liquide éclaircissant (chloral lactophénol). Cet examen rapide au microscope à contraste de phase permet de révéler la présence d'éléments fongiques. La morphologie des filaments peut déjà orienter le diagnostic.

Pour les champignons filamenteux, devant une atteinte pilaire, le mode de parasitisme est très important. Une atteinte endothrix signe le diagnostic de teigne à *Trichophyton* sp., l'atteinte microsporique oriente vers un *Microsporum* sp., l'atteinte microïde pour *T. mentagrophytes*, l'atteinte mégasporique pour *T. verrucosum*, et l'atteinte favique pour *T. schoenleinii*. Dans les squames, des filaments septés ne distinguent pas un dermatophyte d'un *Scytalidium* sp., mais des grosses spores ovoïdes quant à elles orientent vers un *Scopulariopsis*. La couleur de la paroi oriente soit vers un hyalohyphomycète soit vers un phaeohyphomycète.

Dans des prélèvements plus profonds, des filaments septés, réguliers et bifurquant à angle aigu, peuvent conduire au genre *Aspergillus*, mais ne permettent pas de différencier les différentes espèces d'*Aspergillus* sp. rencontrées en pathologie humaine. La distinction avec les autres champignons filamenteux est également difficile, même si la présence de filaments mycéliens vésiculés oriente vers le genre *Fusarium* ou une autre moisissure. La présence de tête aspergillaire dans les squames ou des prélèvements provenant du conduit auditif externe signe une atteinte par *Aspergillus* sp. L'observation de filaments mycéliens peu ou non septés, de diamètre large, en forme de ruban, signe un diagnostic de mucormycose.

La présence de grains évoque le diagnostic de mycétome dont la couleur orientera vers l'espèce en cause. Les cellules fumagoïdes des chromomycoses ne permettent pas d'identifier le champignon (*Cladosporium* sp., *Phialophora* sp.).

III.2. Culture

Comme nous l'avons vu précédemment, une étape essentielle pour l'identification mycologique est la mise en culture des prélèvements. Celle-ci peut se faire sur différents milieux de cultures, le plus souvent en tubes. Les milieux utilisés sont : milieux de Sabouraud additionnés de chloramphénicol, de cycloheximide, ou d'extrait de levure. De plus des milieux spécifiques peuvent être ensemencés comme le milieu de Borelli ou un milieu à base de terre pour une suspicion de dermatophyte, une gélose au malt pour une moisissure, un milieu BHI (Brain Heart Infusion) pour identifier *T. verrucosum*. Les cultures seront incubées à 25° et 30°C, de 8 à 28 jours selon l'origine du prélèvement. Elles seront examinées 2 à 3 fois par semaine pour observer des caractères parfois transitoires.

III.3. Identification

III.3.1. Identification macroscopique

L'identification repose tout d'abord sur la vitesse de croissance du champignon, qui peut être rapide pour les *Aspergillus* sp. et les Mucorales, et plus lente pour les dermatophytes et certains dématiés, voire très lente pour *Onychocola canadensis* (Baeck et al., 2006). Dans la section Fumigati (Frias De Leon et al., 2011), *A. lentulus* diffère par sa vitesse plus lente de croissance et par la forme et la taille de ses vésicules sub-globuleuses. Cette vitesse de pousse dépend souvent de la richesse de l'inoculum. Les aspects macroscopiques et microscopiques en primoculture sont ensuite analysés et comparés à des clés d'identification.

Pour tous les champignons, la couleur de la colonie est une caractéristique majeure, aussi bien au recto qu'au verso, ainsi que la présence éventuelle d'un pigment diffusant dans la gélose. Les hyalohyphomycètes présentent des colonies blanches, ou un peu colorées, tandis que les phaeohyphomycètes deviennent rapidement foncés à noirs. Ensuite, la forme et la texture de la colonie sont notées. Les filamenteux présentent en général des colonies duveteuses, laineuses,

cotonneuses, veloutées, poudreuses, ou granuleuses. S'il y a absence de mycélium aérien, l'aspect de la colonie reste glabre.

Pour les dermatophytes, nous cherchons une colonie ronde ou étoilée, de consistance molle, élastique ou cartonnée. Le relief des colonies est aussi pertinent, il peut être plat, plissé ou cérébriforme. De plus, nous notons la taille des colonies et leur faculté plus ou moins aisée à envahir le tube. Pour certains champignons tels les *Scytalidium* sp. ou les phaeohyphomycètes, les cultures sont longues et difficiles.

III.3.2. Identification microscopique

L'observation microscopique est réalisée à partir d'un ou plusieurs fragments de culture prélevés à l'oëse ou par la technique du drapeau à l'aide de cellophane adhésive transparente, que nous déposons dans un liquide éclaircissant (chloral lactophénol). Cet examen se fait au microscope en contraste de phase, à l'objectif x 20 ou x 40.

L'analyse commence par l'aspect de l'appareil végétatif ou thalle constitué de filaments. Chez les Ascomycètes, les Basidiomycètes et les Deutéromycètes, les filaments ont un diamètre étroit (2 à 5 μm) et régulier avec des bords parallèles. Ils sont séparés par des cloisons, ou septa, en articles uni ou pluricellulaires. Le thalle peut être siphonné chez les Mucorales. Il est constitué d'éléments tubulaires irréguliers, peu ramifiés et de diamètre large (5 à 15 μm). Ensuite nous regardons si la paroi des filaments est mélanisée ou non.

L'examen portera dans un second temps sur les spores. Sont-elles produites de façon endogène ou exogène ? Pour le savoir, il faut déterminer si elles sont produites à l'intérieur d'un sac fermé porté par un filament spécialisé, comme le sporocyste chez les Mucorales, ou si elles proviennent d'un bourgeonnement à partir d'une cellule spécialisée appelée cellule conidiogène. Leur aspect était initialement à la base de la classification des Deutéromycètes. Les spores unicellulaires de petite taille sont les amérospores vues chez *Aspergillus* sp. et *Penicillium* sp. Les spores bicellulaires ou didymospores sont rencontrées chez *Tricothecium* sp. Elles peuvent être pluricellulaires avec des cloisons transversales, ce sont les phragmospores (*Bipolaris* sp., *Curvularia* sp.). Si elles ont des cloisons transversales et longitudinales, ce sont des dictyospores vues chez *Alternaria* sp. et *Ulocladium* sp. Enfin les scolécospores sont étroites, effilées, souvent incurvées et cloisonnées transversalement comme chez *Fusarium* sp.

Chez tous les champignons, des spores de résistance ou chlamydospores se rencontrent. Elles possèdent une paroi épaisse, et sont formées à partir d'un article du filament mycélien ou à son extrémité. Elles ont un intérêt si nous les voyons précocement dans certaines espèces du genre *Fusarium*. Elles apparaissent rapidement, en moins de 10 jours dans les cultures d'*Epidermophyton floccosum*.

Enfin, c'est la conidiogenèse qui sera étudiée. Deux grands modes sont différenciés. Le mode thalique où les spores proviennent d'éléments préexistant du thalle, de manière solitaire ou terminale (dermatophytes, *Chrysosporium* sp. et *Scedosporium* sp.), ou de manière arthrique avec un filament qui se différencie en spores de façon progressive et rétrograde depuis le sommet jusqu'à la base, et les spores formées sont rectangulaires (*Geotrichum* sp., *Scytilidium* sp.). Le mode blastique est le plus répandu, il présente des spores formées par bourgeonnement à partir de cellules conidiogènes différenciées ou non, puis une cloison se forme à l'émergence du bourgeon et la cellule fille ou spore se sépare de la cellule mère. Différents modes blastiques existent. Le mode acropétale, avec principalement les blastospores. Puis le mode basipétale avec des phyalospores et des annélospores. Accessoirement sont mises en évidence des structures protectrices compactes, issues de la reproduction asexuée, comme les pycnides, les acervules, ou de la reproduction sexuée comme les gymnothèces, les cléistothèces et les périthèces.

Parmi les *Aspergillus* sp., *A. fumigatus* est l'espèce responsable d'environ 90 % des aspergilloses humaines. Nous trouvons ensuite par ordre décroissant de fréquence *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* et *A. nidulans*. De nouvelles espèces, comme *A. lentulus*, sont d'identification récente par biologie moléculaire à l'aide du séquençage multilocus (Hong et al., 2005). En effet, l'analyse visuelle sur les critères morphologiques ne permet pas leur identification. *Aspergillus lentulus* ressemble à *A. fumigatus* mais est beaucoup plus lent à sporuler sur les milieux de culture, et présente des sensibilités diminuées aux antifongiques. Il possède des conidies de plus petite taille et n'est pas capable de survivre à 48° C.

La démarche d'identification présente donc certaines difficultés, et nécessite un microscopiste très expérimenté. Ensuite, les fragments observés doivent présenter les caractéristiques précédemment décrites, pour aboutir à un diagnostic mycologique, en s'aidant des clés d'identification. De plus avec les remaniements de la taxonomie, il est souvent difficile de distinguer microscopiquement les espèces du complexe *T. mentagrophytes* par exemple ou bien celles du complexe *Pseudallescheria*, et tous les *Aspergillus* de la section Fumigati. Dans le premier cas,

l'intérêt thérapeutique est de trouver la source de contamination et de prévenir soit une recontamination et un échec thérapeutique soit la contamination de plusieurs personnes. Dans le second, l'identification précise permettra un choix thérapeutique approprié en fonction des sensibilités aux antifongiques de chaque espèce.

III.4. Quelles alternatives ?

Quelle serait la méthode la plus adaptée pour un diagnostic précis d'espèce, peu coûteux, et rapide ?

C'est à partir d'identifications difficiles de champignons que nous avons vu les limites de l'examen mycologique classique. Malgré l'existence d'arbres décisionnels fortement utiles, les champignons peuvent évoluer vers le pléomorphisme. Dans ce cas le champignon devient non identifiable avec les méthodes classiques d'observation macro et microscopiques. Les multiples examens d'observation et repiquages peuvent aussi amener à contaminer les milieux de culture.

Les galeries d'identification ne sont pas fonctionnelles pour les filamenteux. Il faut donc attendre que le champignon fructifie pour observer aisément les sporulations. A l'heure actuelle de l'homogénéisation des pratiques de laboratoires, nous devons avoir une conduite diagnostique standardisée et comparable.

L'identification par spectrométrie de masse est largement utilisée en bactériologie et en mycologie, pour les levures (Bougnoux et al., 2013). Les avantages en termes de coût et de rapidité d'analyse encouragent à l'utiliser pour les champignons filamenteux (Theel et al., 2011). Cependant une identification correcte nécessite une base de données complète et testée. L'élaboration d'une base de données consiste à identifier par séquençage de l'ADN ribosomal tous les champignons contenus dans la base. Le séquençage est la méthode de référence en matière d'identification fongique. Des travaux récents ont permis la distinction par spectrométrie de masse de différentes espèces d'*Aspergillus* de la section Fumigati non distinguables en microscopie optique (Alanio et al., 2010).

Notre travail porte sur l'évaluation de nouvelles méthodes pour le laboratoire de mycologie. Il consiste à comparer les techniques de séquençage de l'ADN ribosomal, et la technique de spectrométrie de masse, en appréciant les limites et les avantages de leur pratique en routine.

III.4.1. Séquençage de l'ADN : méthode de référence

Grâce aux connaissances acquises depuis une trentaine d'années sur les mécanismes de réplication de l'ADN, nous pouvons déterminer aujourd'hui la succession des nucléotides composant un brin d'ADN.

Méthode Sanger

C'est la technique de Sanger qui est utilisée. Le recopiage d'un brin matrice d'ADN par une enzyme, l'ADN polymérase (ADN dépendante), est initié par la fixation d'un oligonucléotide spécifique (amorce), complémentaire du brin matrice. Cette enzyme va permettre l'élongation d'un nouveau brin complémentaire du brin matrice dans le sens 5'- 3'. L'ADN polymérase permet l'incorporation de nucléotides (dNTP: désoxyribonucléotides) libres présents dans le milieu réactionnel par la formation d'un pont phosphodiester entre le 3'OH (hydroxyle) de la chaîne et le 5'P (phosphate) du dNTP suivant. La réaction de Sanger repose sur l'incorporation aléatoire par cette ADN polymérase de didésoxyribonucléotides interrupteurs de chaîne (ddNTP) eux aussi présents dans le milieu réactionnel. Ces ddNTP diffèrent des dNTP par leur extrémité 3'. L'extrémité 3'OH des dNTP est remplacée par une extrémité 3'H. Cette modification empêche la formation de la liaison phosphodiester entre le ddNTP incorporé dans la chaîne et le nucléotide suivant. L'allongement de la chaîne est alors interrompu. Dans le milieu réactionnel, il y a compétition entre les dNTP et les ddNTP. Le rapport spécifique ddNTP/dNTP et l'affinité de l'enzyme pour chaque nucléotide sont optimisés de telle façon qu'un ddNTP soit statistiquement incorporé à toutes les positions possibles. Une migration électrophorétique du produit de cette réaction de séquence sur un gel très résolutif (polyacrylamide) va séparer tous les fragments présents en fonction de leur masse moléculaire. Les plus petits fragments vont migrer plus rapidement que les grands. La grande résolution de ce gel permet de distinguer des fragments différant entre eux d'une paire de base. L'identification du ddNTP présent à l'extrémité 3' de chaque fragment déterminera la séquence nucléotidique du brin matrice initial.

Séquençage des régions ITS 1-2, (ITS 3-4), et Bt2a Bt2b

Depuis une trentaine d'année, la biologie moléculaire est de plus en plus répandue dans les laboratoires de biologie médicale. Souvent référencées comme les gold standards, différentes exploitations du génome sont possibles.

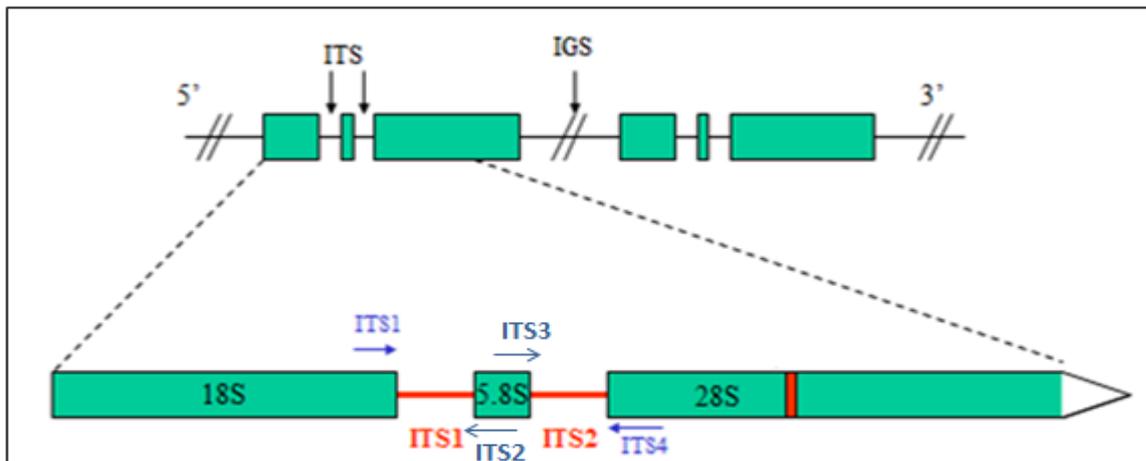


Figure 1. Représentation schématique de l'ADN ribosomal des champignons, avec localisation des régions d'intérêt à amplifier pour l'identification moléculaire des champignons. (ITS : espace interne transcrit, IGS : espace inter-génique).

En microbiologie, c'est l'identification précise de micro-organismes qui est développée par des analyses de polymorphisme de fragments spécifiques, par des détections en PCR (Polymerase Chain Reaction) quantitative en temps réel, des modèles d'hybridation avec des puces à ADN, et bien sûr le séquençage. Différents procédés existent comme : l'étude partielle des séquences des gènes codant pour la bêta tubuline (*benA*), le gène codant pour le cytochrome b mitochondrial (*mtcytb*) (Wang et al., 2000), le gène qui code pour la rodlet A (*rodA*), le gène codant pour la calmoduline et l'actine, le gène codant pour le facteur d'élongation (EF1) ou les gènes codant les espaces se trouvant entre les ARN ribosomiaux 18S, 5,8S et 28S (Figure 1).

Choix de la méthode d'identification moléculaire

Les études phylogénétiques et d'identification moléculaire des champignons se basent sur divers marqueurs génétiques nucléaires, ribosomiaux ou mitochondriaux. Un marqueur fiable doit contenir entre 500 et 800 paires de bases (pb), et doit permettre d'identifier toutes les espèces taxonomiques, par exemple du règne des Eucaryotes. Pour cela, les amorces doivent permettre l'amplification d'une séquence nucléotidique constante et unique de chaque espèce. Ces amorces doivent être courtes (moins de 50 pb), se trouver dans la région d'intérêt et avoir une température d'hybridation comprise entre 45 et 65° C. Enfin, elles doivent posséder un ratio de guanine et cytosine supérieur à 60 % pour éviter les liaisons non spécifiques avec l'ADN polymérase et ne pas provoquer de boucles internes.

Chez les animaux, l'étude du gène mitochondrial codant la sous unité 1 de la cytochrome c oxydase (*cox1*) est la plus utilisée. Pour certains champignons, comme les *Penicillium* sp., *cox1* a montré son efficacité. Cependant pour une grande partie des mycètes, *cox1* ne peut être utilisée car il s'agit d'une région difficile à amplifier, et insuffisamment variable. En effet, cette région peut contenir de nombreux introns, dont le nombre varie d'une espèce à une autre. En conséquence, il y a obtention de séquences de tailles variables, dont certaines parties sont identiques chez plusieurs espèces différentes (Schoch et al., 2012). De plus, il existe des champignons comme *Neocallimastigomycota* qui ne possèdent pas de mitochondrie.

Trois autres sous unités provenant de cistrons de l'ADN ribosomal nucléaire peuvent être utilisées. Elles codent pour la grande sous unité (LSU) de l'ARN polymérase II, pour la petite sous unité (SSU) de l'ARN polymérase II et pour une protéine de maintien. LSU est un marqueur phylogénétique populaire voire très efficace dans certains groupes, notamment ceux ayant divergé au début des lignées. La petite sous unité, SSU, a un faible pouvoir de résolution pour différencier les champignons au niveau de l'espèce. L'ADN ribosomal correspond à des séquences d'ADN codant l'ARN ribosomal. Les ribosomes sont des ensembles de protéines et d'ARN ribosomal qui vont être traduits en ARN messager pour produire des protéines. Chez les Eucaryotes, l'ADN ribosomal se compose d'une répétition en tandem d'un segment comportant les régions suivantes : NTS, ETS, 18S, ITS1, 5,8S, ITS2 et 28S. La plupart des analyses phylogénétiques se basent actuellement sur l'ADN ribosomal nucléaire. Les sites les plus couramment utilisés sont les segments répétitifs de 3 gènes qui codent des ARN ribosomaux 28S, 18S et 5,8S. En mycologie moléculaire, les espaces internes transcrits (ITS) possèdent la plus haute probabilité d'identification et permettent une différenciation à un niveau inter et intra spécifique (White et al., 1990). La région ITS est une région très polymorphe. Elle inclut ITS1 et ITS2 qui sont séparés par le gène 5,8S qui se trouve lui-même entre le gène 18S (SSU) et 28S (LSU). La région ITS est très intéressante pour le séquençage de substrats contenant une faible quantité d'ADN (Iwen et al., 2002). En effet, il existe un grand nombre de copies d'ITS dans les cellules, un nombre maximal de 250 copies est possible. Cependant, certaines équipes n'hésitent pas à séquencer les régions ITS et LSU de façon combinée (Walther et al., 2013)

Pour une partie des Ascomycètes filamenteux, Glass et Donaldson ont proposé d'utiliser d'autres primers (Glass et Donaldson, 1995). Ils cherchaient des primers pouvant amplifier un ou plusieurs introns dans les régions des gènes

conservés. Les gènes codant des protéines structurales et métaboliques sont bien conservés et le sont même plus dans des espèces apparentées que les séquences introniques. Il faut savoir que, pour certains champignons filamenteux, les introns sont généralement très courts, c'est-à-dire qu'ils contiennent entre 50 et 200 pb. Ce sont les produits d'amplification de la bêta tubuline qui permettent d'obtenir le plus haut degré de polymorphisme de taille des produits de PCR chez les Ascomycètes filamenteux. Ceci reflète la grande variabilité du nombre d'introns dans le gène codant la bêta tubuline (Figure 2). C'est donc cette région qui a été choisie pour séquencer les *Aspergillus* sp. et les *Scedosporium* sp. (Lackner et al., 2012b). En effet, il est nécessaire d'utiliser le séquençage de la région de la bêta tubuline pour identifier *P. apiosperma* de *P. boydii*.

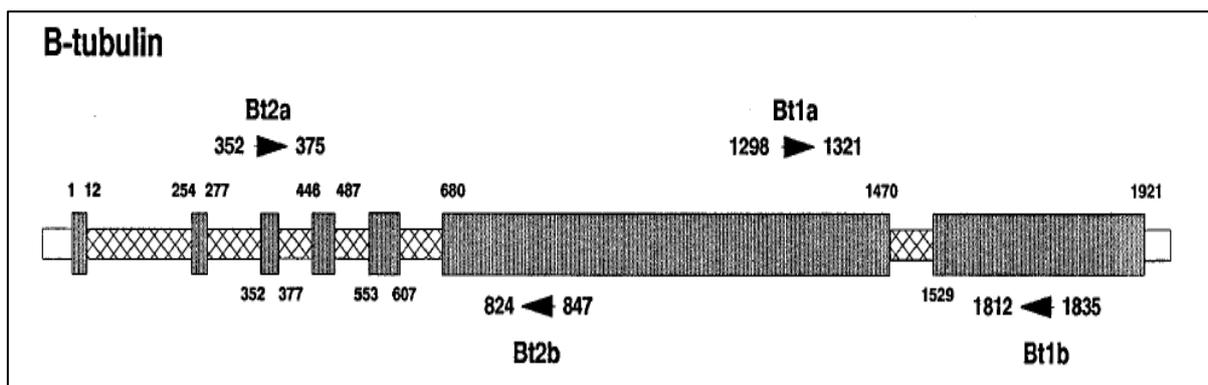


Figure 2. Représentation schématique des amorces Bt2a-Bt2b sur le gène codant la bêta tubuline (Glass and Donaldson).

III.4.2. Méthode MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation Time of Flight) en spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une méthode d'analyse permettant la détection des masses moléculaires des composés analysés. De plus, les masses moléculaires peuvent être identifiées. Le premier spectromètre de masse fut inventé par Francis William Aston en 1919. L'ensemble de l'appareil se compose d'une source, d'un analyseur et d'un détecteur. La source produit des ions. L'analyseur de masse entraîne la séparation des ions formés en fonction du rapport masse sur charge (m/z). La séparation se produit en fonction de l'utilisation de champs électriques et magnétiques. Ensuite, l'analyseur détecte les ions sous forme d'un signal électrique. Ce signal est traité par le logiciel informatique puis présenté sous forme de spectre. Le pic le plus intense du spectre correspond au type d'ions le plus abondant. Il est

appelé le pic de base, son intensité est chiffrée à 100 %. Les intensités des autres pics s'expriment en % de celle du pic de base. L'axe des abscisses correspond au rapport m/z et l'axe des ordonnées à l'intensité relative du signal. En microbiologie, il faut une phase préalable d'extraction des protéines qui se trouvent dans la levure ou le champignon à étudier. Cependant, cette phase d'extraction doit être dénuée de toute dénaturation des protéines, afin de pouvoir les séparer correctement.

La technique MALDI-TOF fut développée en 1980 par Karas, Hillenkamp et Tanaka. Ce dernier et John B. Fenn ont reçu le prix Nobel de chimie en 2002. Le premier automate commercial apparaît en 1991. Très utilisée en bactériologie, la spectrométrie de masse tend à l'être de plus en plus en mycologie. Pour les levures, l'utilisation en routine s'est rapidement développée. De multiples essais sont encore en cours pour l'identification des champignons filamenteux.

Le but de la spectrométrie de masse est de déterminer la masse moléculaire d'ions libres. La technique MALDI-TOF est dite technique de désorption et d'ionisation laser douce assistée par matrice, dans un temps de vol (Figure 3). Un réactif essentiel à la procédure est la matrice. Elle doit posséder une forte absorption à la longueur d'onde du laser utilisé. C'est un composant aromatique, polaire, soluble dans les solvants et adapté aux macromolécules. L'acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA) est le plus souvent utilisé. Cette matrice est saturée à 50 % d'acétonitrile et 2,5 % d'acide trifluoroacétique. Une autre matrice utilisée est l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque ou DHB (eau, éthanol et acétonitrile) (Biomérieux, 2012). Le CHCA est responsable de la formation de petits cristaux sphériques à distribution homogène. Il ne convient pas à certains taxons mais nécessite moins de tirs laser et permet l'obtention de 80 à 150 pics par spectre. Le DHB permet la formation de longs cristaux de la périphérie vers le centre du dépôt, il convient à la majorité des taxons, mais nécessite plus de tirs laser avec obtention de 100 à 200 pics par spectre. La manipulation de la matrice DHB est plus délicate (Figure 4).

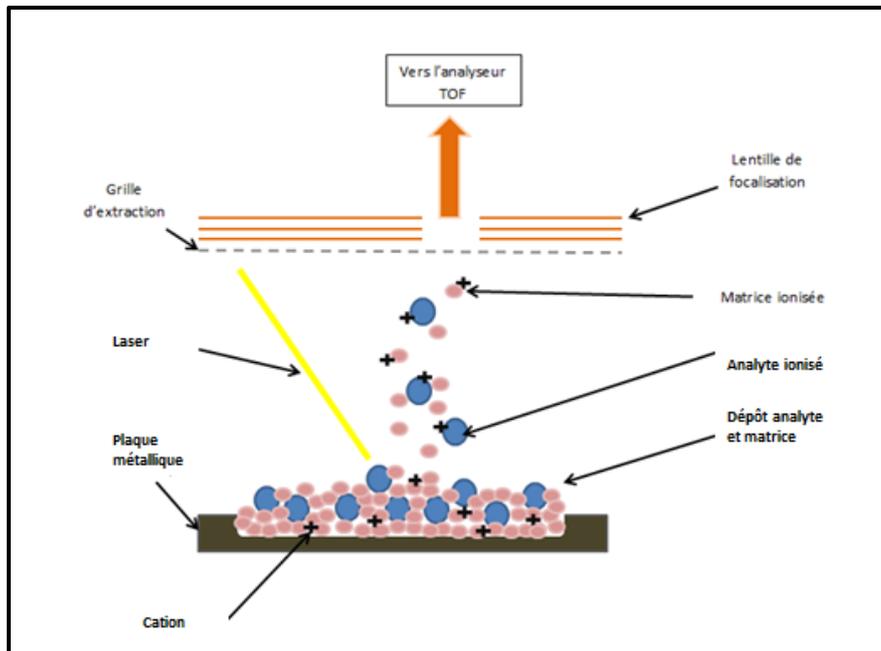


Figure 3. Schéma simplifié de la technique MALDI-TOF.



- **Figure4.** Représentation des dépôts de matrice sur une cible Vitek-MS DS. Matrice DHB à gauche (lignes E et F), matrice CHCA à droite (lignes H et I). (Biomérieux)

Une portion d'échantillon et la matrice sont déposées sur un puits, situé sur un support métallique. Après séchage à l'air ambiant, l'ensemble échantillon et matrice cristallise après l'évaporation des solvants. Après le chargement dans l'automate, le complexe matrice-échantillon cristallisé est soumis à de nombreux tirs laser (337 nm) émettant dans la zone d'absorption de la matrice. C'est un laser à source d'azote qui tire à une fréquence de 50 Hz. Cette irradiation se passe dans une chambre où règne un vide poussé, à l'intérieur du spectromètre de masse. Il faut au moins 100 tirs pour obtenir un spectre (Gravet, 2010).

Le rôle de la matrice est d'absorber l'énergie provenant du laser, ce qui provoque la vaporisation (étape de désorption) de l'échantillon. Celui-ci va alors acquérir une charge électrique (ionisation) permettant ainsi la formation d'ions de masses différentes. Il y a ensuite expansion de la matrice en jet supersonique qui

entraîne avec elle l'analyte. Le résultat est le transfert de charges par collisions entre matrice et analyte dans le nuage d'expansion.

Pendant la phase appelée temps de vol (TOF) les molécules ionisées sont accélérées et séparées dans une colonne de vide mesurant 1,2 m, ou « tube de vol », grâce à l'application d'un champ électrique. La vitesse acquise dans la zone d'accélération est inversement proportionnelle au rapport m/z . Ainsi les molécules de l'échantillon seront individualisées selon leur rapport m/z (Menet, 2011). Les molécules arrivent ensuite au niveau de l'analyseur TOF qui mesure le temps de vol d'un ion, préalablement accéléré, pour traverser une région de champ libre avant d'atteindre le détecteur. Le temps de vol, défini par le rapport m/z , est donc uniquement dépendant de la masse. Les ions formés sont majoritairement mono chargés et traversent le tube sous vide avec une vitesse inversement proportionnelle à leur masse. Les ions de faible masse se déplacent plus vite que les ions de grande masse. Enfin, la détection des molécules s'effectue à l'extrémité de la colonne où se situe un détecteur qui transforme l'énergie (produite par les ions à la fin de leur vol) en un courant électrique. L'information est ensuite amplifiée puis numérisée selon le temps de vol (TOF). Le résultat est un spectre de masses représenté sous la forme d'un graphique. Classiquement, l'axe des abscisses correspond au rapport m/z , et l'axe des ordonnées à l'intensité relative du signal. Ce résultat sous forme de nombreux pics formant un spectre correspond aux différents fragments qui sont libérés des molécules de l'échantillon d'origine. Les composants cellulaires détectés sont principalement des protéines extractibles, solubles, modérément hydrophiles, stables et abondantes. Un signal de haute intensité est favorisé par l'abondance de la protéine, sa stabilité et sa composition en acides aminés arginine (Arg) et lysine (Lys).

La détection peut être faite soit en mode positif (détection de cations), soit en mode négatif (détection d'anions). Le choix du mode de détection dépend de la nature des molécules à analyser. Si les molécules à analyser sont composées de groupements accepteurs de protons (peptides et protéines avec leur fonction amine), le mode d'ionisation à utiliser est le positif. Si les molécules à analyser contiennent des groupements pouvant perdre leurs protons (saccharides et oligonucléotides avec leurs fonctions carboxyle et alcool), il est préférable d'utiliser le mode négatif. La résolution R est la faculté de l'analyseur à séparer deux ions de rapports m/z proches, correspondant à la largeur des pics. M est la masse d'un ion considéré, ΔM la différence minimale entre le pic considéré et son voisin le plus proche dont il peut

être distingué. La résolution correspond à $M/\Delta M$. L'analyse des tracés des fragments permet de déduire la structure des molécules. Les spectres de l'échantillon sont comparés à une base de données de spectres élaborée à partir de nombreuses espèces. Chaque base possède son propre algorithme de fonctionnement. Les spectres de l'échantillon seront interprétés pour fournir des résultats d'identification de l'organisme associés à un niveau de confiance.

Trois systèmes sont actuellement commercialisés : MicroFlex[®] (Bruker Daltonics Inc.), Vitek-MS[®] (Biomérieux) (Figure 5) et Andromas[®] (Andromas SAS). La source laser est différente pour chaque automate, les procédures de dépôt de l'échantillon varient aussi. Pour chacun, les bases de données sont construites de façon différente et les algorithmes ne sont pas identiques.



Figure 5. Représentation du Vitek-MS[®] (Biomérieux) et de la station d'acquisition (Laboratoire de Bactériologie- Virologie- Hygiène, CHU Dupuytren, Limoges).

IV. Travaux personnels : comparaison de l'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF des champignons filamenteux par rapport à l'identification par séquençage et à l'identification mycologique classique.

Après l'isolement du champignon, l'identification est soit génotypique soit phénotypique. L'identification au rang de l'espèce est de plus en plus requise et dans un délai raisonnable, afin d'orienter au mieux le clinicien dans sa démarche thérapeutique. Les antifongiques constituent un important enjeu économique, c'est la première dépense hospitalière en matière d'anti-infectieux. Enfin, l'épidémiologie locale est suivie grâce aux activités du laboratoire afin de mettre en œuvre des mesures de prévention de certaines infections fongiques. Après avoir pris connaissance avec la pratique quotidienne du laboratoire nous verrons pourquoi il est difficile parfois de rendre une identification d'espèce pour certains champignons filamenteux.

De nouvelles techniques telle la spectrométrie de masse avec une analyse en temps de vol (Del Chierico et al., 2012) pourrait pallier les problèmes de l'identification mycologique microscopique. Cette méthode rapide est dorénavant largement utilisée pour les levures (Sendid et al., 2013). Notre travail vise à comparer trois méthodes visant à l'amélioration de l'identification des champignons filamenteux. À savoir, l'examen mycologique standard (macroscopie et microscopie), la spectrométrie de masse et le séquençage. Nous analyserons les différentes méthodes afin de voir laquelle serait la plus efficace et la plus facile à intégrer dans l'activité quotidienne du laboratoire de mycologie médicale du CHU de Limoges.

IV.1. Matériel

IV.1.1. Souches des champignons à analyser

Nous avons recueilli différents échantillons cliniques, provenant de différentes sphères biologiques. Les critères de choix sont la fréquence en pathologie humaine (*A. fumigatus*, *T. rubrum*), et leurs difficultés de reconnaissance retardant le délai d'identification. De façon rétrospective, nous avons repris 139 souches, représentatives de 46 espèces de champignons d'intérêt en mycologie médicale,

identifiées au laboratoire de Mycologie du CHU de Limoges selon les méthodes classiques macro et microscopiques. Notre sélection comporte 41 *Aspergillus* sp., 46 dermatophytes, 13 hyalohyphomycètes, 11 dématiés, 5 zygomycètes, 9 *Penicillium* sp., 4 *Scedosporium* sp., 2 basidiomycètes, et 8 champignons non identifiables avec les techniques usuelles. L'origine des champignons est renseignée en détail dans le tableau en Annexe 1. Des contrôles de qualité externe ont également servi à l'évaluation des trois méthodes. Ces différentes souches ont été conservées à -20° C dans de l'eau glycéinée à 20 %.

IV.1.2. Culture des échantillons à tester

Après décongélation des souches, nous les avons remises en culture sur trois à cinq milieux, à savoir pour les dermatophytes : un Sabouraud, un Sabouraud chloramphénicol, deux Sabouraud chloramphénicol et cycloheximide, dont un contenant de l'extrait de levure, et un milieu «brain heart infusion». L'évaluation macroscopique de la croissance s'est faite quotidiennement. Au bout de 5 jours de croissance en général, un peu moins pour les *Aspergillus* sp. (à 2 jours), nous avons procédé à une observation macro et microscopique des champignons. Nous avons contrôlé la pureté des cultures afin qu'aucune contamination par un champignon environnemental ou par des bactéries ne vienne altérer les analyses. Pour chaque souche, nous avons recueilli un fragment de colonie sur le milieu Sabouraud chloramphénicol pour l'extraction d'ADN. Le reste de la colonie est réservé pour la spectrométrie de masse.

IV.2. Méthodes

IV.2.1. Examen mycologique classique

Nous avons étudié les champignons sélectionnés à partir des cinq tubes ensemencés. Après analyse des critères macroscopiques, nous avons recherché au microscope à contraste de phase, les éléments caractéristiques de chaque champignon afin de vérifier l'identification. Les cultures ont 2 à 5 jours, 15 jours pour les dermatophytes.

IV.2.2. Séquençage

Les séquençages des régions ITS et du gène codant pour la bêta tubuline pour les *Aspergillus* sp. et pour les *Scedosporium* sp. sont retenus en raison de leur présence en grand nombre dans les cellules et de leur grande variabilité inter espèce. Nous avons testé auparavant chaque amorce pour vérifier si nous avons amplifié le bon fragment, en même temps nous avons mis en place le schéma de PCR. Pour visualiser notre amplification, nous avons fait migrer sur un gel d'agarose à 2 % les différents essais (Figure 6). Nous avons testé des *A. fumigatus* avec les amorces Bt2a-Bt2b. Nous obtenons une amplification d'un fragment de 472 paires de bases environ. Pour vérifier les amorces ITS1-2 (Li et al., 2008a), nous avons testé des *T. rubrum*, une souche de *Candida glabrata* ATCC MYA-2950™ et des *A. fumigatus*. Nous obtenons alors des fragments de 250 à 300 paires de bases pour ITS1 et pour ITS2.

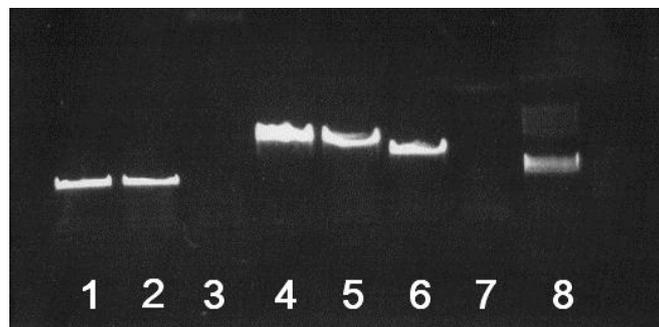


Figure 6. Migration sur gel d'agarose à 2 % des fragments d'amplification. Amplification des amorces Bt2a-Bt2b pour 2 *A. fumigatus* (lignes 1 et 2), amplification des amorces ITS1-2 pour un *Trichophyton rubrum* et les 2 *A. fumigatus* (lignes 4 à 6), témoins négatifs (lignes 3 et 7), témoin de poids moléculaire (ligne 8).

a. Extraction de l'ADN fongique

L'ADN fongique est extrait à l'aide de colonnes du kit Qiagen QIAamp® DNA Minitest (Venlo, Pays-bas). Les étapes sont une lyse thermique (3 heures à 56° C) et chimique dans différents tampons de lyse (ATL et AL), puis des lavages et passages successifs au travers des colonnes. Pour certains échantillons (*Scopulariopsis* sp., *Trichoderma* sp. et *Scedosporium* sp.) nous réalisons un choc thermique et une sonication, nécessaires pour casser la paroi fongique afin de s'approcher du matériel nucléaire fongique. Nous effectuons le dosage de la quantité d'ADN extrait au Nanodrop®.

b. Amplification des régions à séquencer

Dans un premier temps, nous réalisons une PCR amplifiant soit la région ITS 1-2, ITS 3-4, ou la région du gène codant pour la bêta tubuline (Tableau I).

Tableau I. Description des amorces des régions d'intérêt pour le séquençage des champignons filamenteux.

Région d'intérêt	Séquence (5' → 3')	T° m
ITS1	TCCGTAGGGTGAACCTGC	61° C
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	59,4° C
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	59,4° C
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	55,3° C
Bt2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	62,7° C
Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	66,1° C

Pour les amplifications des régions ITS 1-2 et de la bêta tubuline les mélanges réactionnels sont similaires. Pour cela nous avons utilisé le kit Light Cycler® Fast Start, DNA Master HybProbe (Roche applied science, Meylan France) contenant un mix réactionnel, de l'eau pure, du MgCl₂ et de l'UNG (Uracyl N Glycosylase). Voici la composition du mélange réactionnel :

- mix	2 µL
- MgCl ₂	0,8 µL
- amorces à 10 pM	2 µL
- UNG	0,5 µL
- ADN	5 µL
- H ₂ O qsp.	20 µL

L'amplification est réalisée dans un thermocycleur (Light Cycler® Real-Time PCR, Roche), avec une étape de deux minutes à 50° C, puis une étape de dénaturation (5 minutes à 95° C) pour obtenir l'ADN sous forme simple brin suivie de 45 cycles. Chaque cycle est constitué d'une étape de dénaturation de 30 secondes à 95°, puis une étape d'hybridation de 30 secondes à 61° C (Figure 7). Cette étape permet la fixation de l'amorce spécifique sur l'ADN matrice monobrin. Cette amorce permet l'initiation de l'élongation par la Taq polymérase. Enfin, une étape d'élongation de l'ADN par la Taq polymérase de 30 secondes à 72° C. Une fois l'étape de thermocyclage effectuée, il est nécessaire de purifier les produits de PCR.

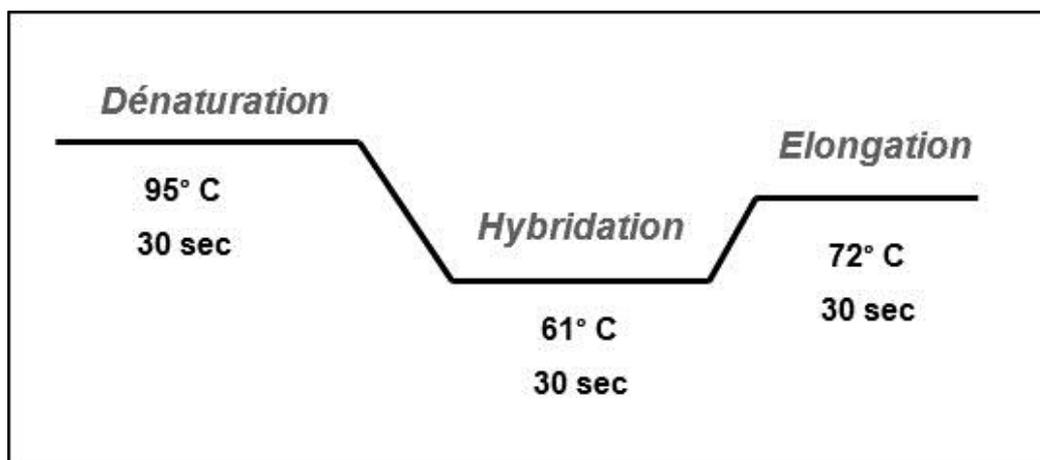


Figure 7. Schéma d'un cycle d'amplification.

Pour l'amplification de la région ITS 3-4, la composition du mélange et la température d'hybridation varient. La quantité de $MgCl_2$ est ici de 1,2 μL . L'hybridation se fait à 57° C.

c. Purification des produits de PCR

Les produits de PCR sont purifiés à l'aide de colonne du kit Nucleoseq[®] (Macherey-Nagel, 67720 Hoerdt, France). Les colonnes sont réhydratées au préalable.

d. PCR de séquence

Les produits de PCR purifiés sont conservés à 4° C. Ils sont ensuite séquencés avec les amorces ITS1, ITS2, ITS3, ITS4, Bt2a, ou Bt2b. Le mélange réactionnel contient :

- Mix Big Dye	2,5 μL
- Tampon Big Dye	2,8 μL
- Amorces	4 μL
- ADN	0,5 μL
- H ₂ O qsp.	20 μL

L'amplification se déroule en 25 cycles comportant chacun 10 secondes de dénaturation à 96° C, suivie de 5 secondes d'hybridation à 50° C, et de 4 minutes d'élongation à 60° C. Cette faible température ralentit la Taq polymérase et déplace l'équilibre pour permettre une meilleure incorporation des ddNTP. La plupart du temps, l'élongation se termine par l'incorporation d'un ddNTP. Il arrive cependant

qu'elle se termine par l'incorporation d'un dNTP. Dans ce cas, l'absence de fluorochromes sur les dNTP ne permet pas de visualiser les faux stops.

e. Purification des produits de séquence

Cette étape de purification est réalisée à l'aide de la résine Séphadex[®] G50 Superfine (Sigma-Aldrich St Louis, MO, USA) constituée de billes perforées dont les trous ont un diamètre déterminé (ici de 20 à 50 μm). Cette résine est placée à l'intérieur de plaques filtrantes Multi Screen HV format HTS (Millipore, Billerica, MA, USA). Il s'agit d'une méthode de chromatographie d'exclusion permettant le piégeage de particules de bas poids moléculaires sur une colonne Sephadex[®] G50. Les petites particules de diamètre inférieur à 20 μm entrent et sont piégées. A l'inverse les grosses particules passeront autour et seront éluées très rapidement. Les ddNTP libres en excès seront alors piégés. En effet ces ddNTP libres non incorporés lors de la réaction pourraient parasiter les signaux de fluorescence spécifiques lors du passage dans le séquenceur. Les sels éventuellement présents sont piégés de la même manière que les ddNTP. La résine sèche doit être mise dans les puits d'une plaque MultiScreen HV format HTS à l'aide du chargeur de colonne de 45 μL . Nous retirons l'excès de résine avec la raclette. Ensuite nous plaçons la plaque MultiScreen HV à l'envers sur le chargeur jusqu'au butoir et nous retournons l'ensemble. En tapant sur le chargeur nous évacuons la résine vers la plaque. Ces plaques filtrantes permettent de récupérer le produit purifié directement dans une plaque de séquence de 96 puits.

f. Séquençage proprement dit

Il s'agit d'une électrophorèse capillaire qui sépare les produits de la réaction de séquence purifiés. L'enregistrement et l'analyse spectrale de la fluorescence spécifique du ddNTP permet d'assigner la base correspondante et détermine ainsi la séquence nucléotidique du brin matrice. Ces différentes étapes de séparation et d'analyse sont réalisées sur l'Analyseur ABI3100 (Applied Biosystem, France) (Figure 8).

Le support de migration est un polymère liquide (pop6-ABI) contenant le polymère de séparation, les sels nécessaires à la migration et l'urée (conditions dénaturantes).

L'utilisation de capillaires permet d'appliquer une différence de potentiel plus importante (12 kV) que pour un appareil à plaques classique (2,5 kV). La migration

des fragments d'ADN sera donc plus rapide. Sur les capillaires l'augmentation de la surface d'échange thermique permet d'utiliser sans danger un voltage plus élevé.



Figure 8. Représentation de l'analyseur ABI 3100, à gauche fermé, à droite ouvert mettant en évidence la plaque de séquence et les capillaires.

Dans les conditions de pH utilisées, les ADN simple brin issus de la réaction de séquence sont chargés négativement. Placés sous une différence de potentiel, ces polyanions vont migrer du pôle négatif (cathode) vers le pôle positif (anode) du circuit électrique.

Seize capillaires sont physiquement associés pour permettre la migration simultanée de 16 échantillons par analyse. Le séquenceur est piloté par une plateforme informatisée commandant pour chaque analyse : le remplissage des capillaires, l'injection des échantillons, la détection et l'analyse.

Au début de chaque analyse, un polymère neuf est injecté sous pression dans les capillaires. Le polymère précédent est chassé dans la cuve qui sert de poubelle. Lors du remplissage le polymère enveloppe la paroi des capillaires. Ainsi, il neutralise les charges positives de la silice dont sont composés les capillaires pour empêcher la fixation de l'ADN monobrin chargé négativement aux parois.

La plaque de séquence, pouvant comporter 96 puits au maximum, est placée sur un plateau articulé. Elle va être présentée aux capillaires pour l'injection des échantillons. Les capillaires descendent dans la plaque contenant les produits de la réaction de séquence. Une différence de potentiel d'injection (1,5 kV) est appliquée pendant 20 à 40 secondes pour permettre aux molécules chargées de migrer dans les capillaires. Les capillaires sont ensuite amenés dans de l'eau pour effectuer un rinçage. Puis le plateau automatisé les apporte dans le tampon de migration. Une différence de potentiel de 12 kV est appliquée entre l'anode et la cathode et permet aux molécules d'ADN de migrer vers l'anode. Enfin, les données de fluorescences

sont récupérées au niveau d'une cellule de détection et transmises vers une caméra CCD pour être analysées.

La cellule de détection est située à distance variable (selon la taille des capillaires) de la zone de dépôt. Un faisceau laser à argon excite les fluorochromes de part et d'autre de la cellule de détection. Les fluorochromes excités réémettent une fluorescence spécifique perpendiculairement. Elle passe à travers un filtre qui sélectionne uniquement la fluorescence provenant des capillaires et élimine la lumière directe provenant du laser. Une lentille concave décompose pour chacun des capillaires la fluorescence entre 500 et 700 nm et dirige chaque faisceau en direction de la caméra CCD. La caméra CCD est une puce en silicium en deux dimensions composée de milliers de cellules photoélectriques (pixels). Chacun de ces pixels accumule une charge électrique proportionnelle à l'intensité de la fluorescence émise. La caméra CCD collecte simultanément les fluorescences des 16 capillaires. Les données brutes sont ensuite extraites et subissent une correction spectrale. Les calibrations spectrales et spatiales de la caméra CCD sont nécessaires pour une collection correcte et précise des données. Ces données seront ensuite traitées par différents logiciels pour obtenir un dendrogramme.

g. Gestion des séquences

Les séquences sont traitées par le logiciel Finch TV Geospiza[®]. Après alignement des séquences sens et antisens, les séquences sont ensuite placées dans des bases de données, Mycobank et Blast. Ceci permet la recherche des séquences les plus similaires possibles. Pour cela, il faut au préalable sélectionner des paramètres comparatifs (Figure 9).

Nous avons sélectionné une similarité de 95 % pour qu'une séquence apparaisse dans les résultats, avec un taux de recouvrement de 90 %. La taille de la chaîne de nucléotides de correspondance exacte entre les 2 séquences que nous avons choisie est de 10 nucléotides. Ce nombre de nucléotides ne doit pas être trop faible, sinon nous risquons d'obtenir trop de séquences candidates par manque de sélectivité. En revanche, si ce nombre est trop grand, il devient très sélectif au prix de passer à côté de la séquence adéquate. Nous avons choisi un tri par similarité : les éléments seront triés d'abord par similarité, puis selon le score et le recouvrement. Nous avons laissé les autres paramètres par défaut (pénalité pour création de «gap», pénalité pour une extension de «gap», pénalité pour un décalage de nucléotides).

Pairwise sequence alignment parameters

Minimum similarity to keep results (0-100%): Gap creation penalty (1-100):

Minimum overlap to keep results (0-100%): Gap extension penalty (1-10):

Minimum overlap for rating reward (0-100%): Word size (1-256):

Maximum alignments to display (1-1000): Penalty for a nucleotide mismatch:

Select sorting mode: Reward for a nucleotide match:

Select the reference(s) file(s) to be used for the alignment:

<input type="checkbox"/>	Name	Location	Status	#Match(s) found
<input type="checkbox"/>		http://www.mycobank.org/	Unavailable	
<input checked="" type="checkbox"/>	FUNSTRAI	http://www.q-bank.eu/Fungi/	Reachable	
<input checked="" type="checkbox"/>	FUNCBS	http://www.cbs.knaw.nl/Collections/	Reachable	
<input checked="" type="checkbox"/>	UNITE	http://www.cbs.knaw.nl/Collections/	Reachable	
<input checked="" type="checkbox"/>	Yeast	http://www.cbs.knaw.nl/Collections/	Reachable	
<input checked="" type="checkbox"/>	Fusarium	http://www.cbs.knaw.nl/Fusarium/	Reachable	
<input checked="" type="checkbox"/>	Calonec	http://www.cbs.knaw.nl/Calonectria/	Reachable	
<input checked="" type="checkbox"/>	Dermato	http://www.cbs.knaw.nl/Dermatophytes/	Reachable	
<input checked="" type="checkbox"/>	Indoor.txt	http://www.cbs.knaw.nl/Indoor/	Reachable	
<input checked="" type="checkbox"/>	ITSSeq	http://www.mycologylab.org/	Reachable	
<input checked="" type="checkbox"/>	FunBOLD	http://www.fungalbarcoding.org/	Reachable	
<input checked="" type="checkbox"/>	PYCC	http://pycc.bio-aware.com/	Reachable	
<input checked="" type="checkbox"/>	Non-redundant GenBank	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	Reachable	

Figure 9. Paramètres à renseigner pour l'alignement de séquences nucléotidiques dans Mycobank.

Mycobank contient différentes bases de données telle une banque spécifique des séquences ITS, une spécifique des dermatophytes, une pour les *Fusarium* sp. Les séquences déposées sur ce site sont vérifiées et donnent de meilleurs résultats que d'autres banques de données (Nilsson et al., 2006).

IV.2.3. Spectrométrie de masse Vitek-MS[®]

Le spectromètre Axima[®] de Shimadzu[®] commercialisé par Biomérieux[®] sous le nom Vitek-MS[®] apparaît comme une technique rapide d'identification de microorganismes. Vitek-MS[®] est un spectromètre de masse par désorption-ionisation laser assistée par matrice en temps de vol (MALDI-TOF MS). L'analyse des échantillons est basée sur la dynamique de particules projetées par un tir laser dans un tube à vide. Le spectre de distribution des masses d'ions qui en résulte sera interprété par rapport à des bases de données développées par BioMérieux[®].

Le Vitek-MS[®] s'utilise de deux façons. Soit en mode recherche qui travaille avec une base de données ouverte Saramis[®]. C'est le mode RUO utilisant les logiciels Target Manager[®], Saramis Premium[®] et Launchpad[®]. Soit en mode de travail de routine, avec une base fermée et commercialisée, c'est le mode IVD utilisant le logiciel Myla[®]. Dans les deux cas, les méthodes de préparation et de

dépôt des échantillons sont les mêmes. La résolution de l'analyse en mode linéaire est estimée à 700 Da pour le Vitek-MS[®]. Les spectres sont enregistrés en mode positif dans une gamme de 3 à 20 kDa.

a. Bases de données Saramis[®] et IVD Biomérieux[®]

Base de recherche RUO Saramis[®] V4.10

La base de données Saramis[®] contient 2 types de spectres : les super-spectres et les spectres. Les super-spectres sont obtenus pour une espèce à partir d'au moins 15 souches différentes. Toutes ces souches sont testées sur des milieux de culture différents et des températures d'incubation différentes. Ces spectres constituent les spectres de référence pour l'espèce en cause. Les super-spectres contiennent les pics les plus fréquents et les plus intenses présents dans les souches d'une même espèce. Ils permettent une identification rapide tout en minimisant l'influence des conditions de culture.

Les spectres correspondent à une souche d'une espèce. Cette souche est cultivée dans des conditions particulières. Chaque taxon est présenté par plusieurs spectres de la même souche ou d'autres souches de la même espèce. Pour un même taxon nous trouvons des spectres de souches types de l'espèce mais également de souches atypiques de la même espèce. En effet, les souches représentatives d'une même espèce présentent des propriétés spécifiques tant phénotypiques que génotypiques ou protéomiques qui les rendent atypiques. Elles restent des représentants d'une seule espèce.

Le logiciel Saramis[®] comparera le spectre obtenu d'abord avec les super-spectres, puis avec les spectres si le pourcentage de similitude parmi les super-spectres est inférieur à 75 %. Il faut pour cela activer la fonction « autoloading » sur l'écran de traitement des résultats.

Au total, la base dont nous disposons, Saramis[®] RUO V4.10, contient 18808 spectres représentant 1202 espèces /genre, réalisés à partir 9620 isolats, avec les moyennes suivantes : 8 isolats/ espèces et 16 spectres/ espèces. Une étude portant sur l'identification des dermatophytes avec cette base donne des résultats comparables au séquençage de la région ITS (Erhard et al., 2008).

Base de données IVD V2.0 fermée commercialisée, marquée CE

Cette base de données a été mise au point par Biomérieux[®] à partir de la base Saramis[®] et de l'importante souchothèque de taxons ayant servi à la validation des bases Vitek[®] et des galeries Api[®]. La base IVD V2.0 contient 755 espèces à savoir : 645 bactéries et 110 levures et moisissures, qui proviennent de 13790 isolats et représentent 29873 spectres. En moyenne 18 isolats représentent une espèce. C'est une base commercialisée, marquée CE-IVD, fermée (personne ne peut ajouter de spectres à la base). Elle est couplée avec le logiciel Myla[®] qui assure la gestion du spectromètre Vitek-MS[®]. Lorsque les spectres testés sont comparés à ceux de la base, un score de confiance est donné. C'est le degré de similitude, de 60 % à 99,9 %. En dessous de 60 % il faut considérer que le microorganisme est non identifié. Entre 60 et 99,9 % nous avons une identification correcte si le système propose un seul choix de microorganisme, sinon il faut procéder à des méthodes complémentaires d'identification.

Base de données IVD V2.1 fermée en cours d'évaluation

Les bases de données précédentes sont limitées car elles peuvent difficilement contenir tous les champignons rencontrés dans un laboratoire de mycologie médicale. Hormis les principaux pathogènes, nous recherchons une technique pouvant identifier des champignons considérés comme des contaminants, ou bien des champignons émergents. Ainsi, des mises à jour fréquentes sont requises pour incrémenter les bases.

La société Biomérieux[®] développe actuellement une base de données plus riche, contenant un nombre plus important de moisissures. Il s'agit de la base IVD V2.1, qui est amené à remplacer la base CE-IVD V2.0 et sera utilisée en mode IVD avec le logiciel Myla[®]. En collaboration avec les services RAD (Recherche et Développement) de Biomérieux[®], nous avons analysé nos souches en mode RUO, puis nous leur avons transmis les spectres obtenus qui ont été testés dans l'algorithme de la base IVD V2.1 en évaluation.

b. Les logiciels de traitement des données

En mode IVD (Figure 10)

C'est le logiciel Myla[®] qui permet l'enregistrement des numéros d'échantillon et la récupération des résultats d'identification. Nous scannons directement le

numéro de la cible VITEK-MS-DS[®]. De plus, le dépôt doit être réalisé correctement sans déborder les limites du puits (Biomérieux[®], Marcy l'étoile, réf. 410893), puis nous attribuons les numéros d'échantillon testés aux puits disponibles sur la cible. Une fois notre liste de travail enregistrée, nous transférons les données au Vitek-MS[®]. C'est un logiciel d'utilisation facile, déjà utilisé dans notre laboratoire pour l'identification des levures par spectrométrie de masse. La récupération des résultats se fait par l'intermédiaire du logiciel Myla[®].

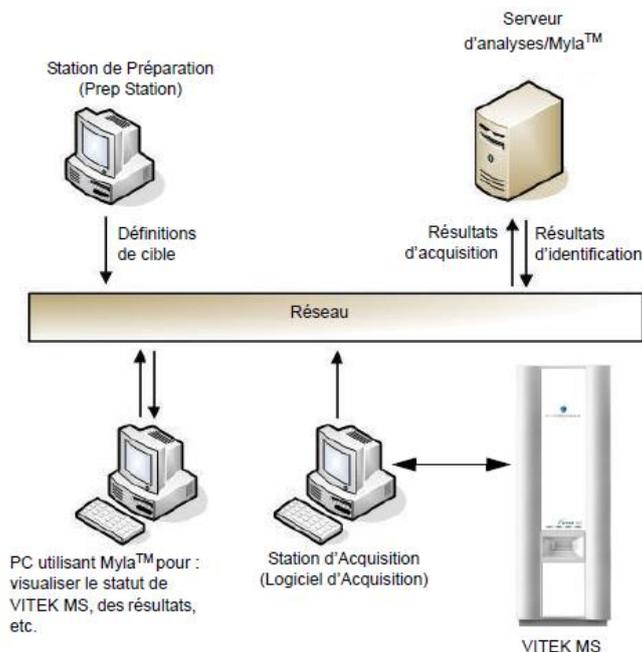


Figure 10. Schéma du déroulement de l'identification par Vitek-MS[®] (Biomérieux[®])

En mode RUO (Figures 11 et 12)

Le logiciel Target Manager[®] permet la saisie des numéros des échantillons à tester. Nous choisissons manuellement les puits de dépôt de nos échantillons sur la cible Vitek-MS-DS. Nous prenons soin d'enregistrer le projet sur le logiciel Target Manager[®], avec le numéro de la cible, le nom du projet, et le nom de chacun des échantillons déposés. Le calibrant est la souche ATCC d'*E. coli* 8739, déposé sur chaque puits correspondant. Une fois la liste de travail enregistrée, nous transférons les données au Vitek-MS[®].

Pour lancer le projet sur Vitek-MS[®], nous devons ouvrir le mode RUO dans la station d'acquisition en se connectant au logiciel « Vitek MS Acquisition Switcher[®] » qui permet de basculer du mode IVD au mode RUO. Nous arrivons dans le logiciel LaunchPad[®] où nous réalisons la calibration et nous lançons notre projet.

Pour la récupération des résultats nous devons utiliser le logiciel Saramis Premium[®]. Il contient la banque de spectres de la base RUO Saramis[®] V4.10, ainsi que les résultats antérieurs. L'utilisation du Vitek-MS[®] requiert une aisance avec l'informatique pour s'adapter aux différents logiciels.

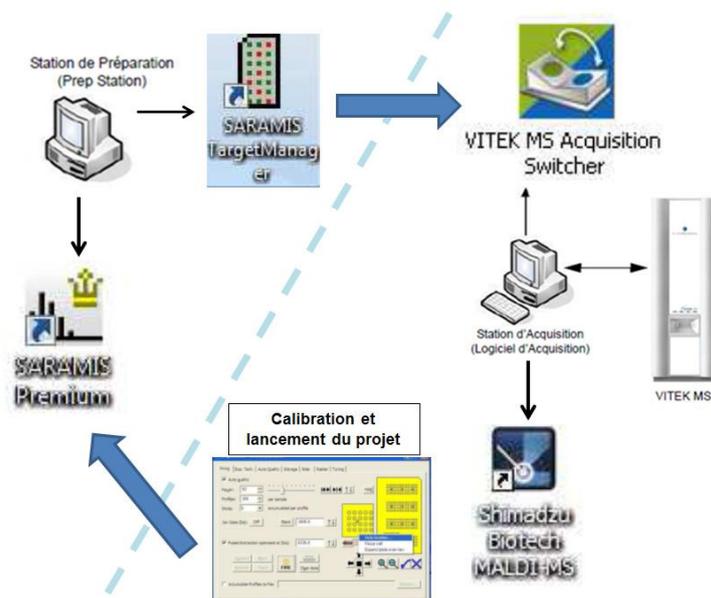


Figure 11. Schéma du déroulement de l'identification en mode RUO Saramis[®] V4.10.

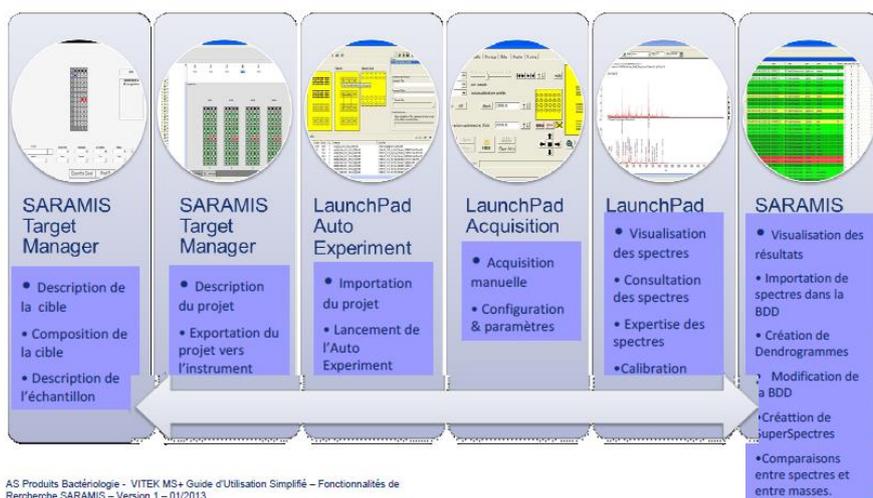


Figure 12. Schéma du flux de travail global en mode RUO Saramis[®] V4.10 (Biomérieux[®]).

c. Matériel nécessaire

Les cibles VITEK-MS-DS[®]. De plus, le dépôt doit être réalisé correctement sans déborder les limites du puits sont des supports métalliques contenant 3 groupes d'acquisition de 16 puits chacun, avec 1 puits de calibrant par groupe d'acquisition (Figure 13).



Figure 13. Représentation d'une cible VITEK-MS-DS[®] (Biomérieux[®]).

Il faut également une souche d'étalonnage (*Escherichia coli* ATCC 8739), de la matrice VITEK MS-CHCA[®] (réf. 411071), de l'acide formique VITEK MS-FA[®] (réf. 411072). Spécifiquement aux moisissures nous avons besoin de la suspension API Medium[®] (réf. 70700/70640/20150), d'acétonitrile, d'éthanol à 99,8 %, d'acide formique pur pour préparer de l'acide formique à 70 %. Enfin il est nécessaire de se munir de tubes Eppendorf[®] de 2 mL, d'écouvillons, d'un vortex, d'oèses calibrées (1 μ L), d'une micropipette de précision (0,5 à 2 μ L), d'embouts de pipette incolores, stériles et sans filtre et d'une centrifugeuse capable d'atteindre 5590 g.

d. Procédure

La procédure suivie est celle conseillée par Biomérieux[®]. Les cultures testées ont entre 2 et 8 jours, en général 5 jours. Les services RAD de la société Biomérieux[®] préconisent jusqu'à 10 à 15 jours d'incubation pour les cultures de dermatophytes. Les souches proviennent de culture sur milieux de Sabouraud

simples ou des milieux de Sabouraud chloramphénicol, et certains sur gélose au malt. Ces dernières sont repiquées sur des milieux de Sabouraud chloramphénicol pour homogénéiser la provenance de nos colonies. L'échantillon est prélevé à l'aide d'un écouvillon humidifié sur une surface de 2 cm² environ. Il est ensuite déposé dans un microtube avec 300 µL d'eau ppi, puis 900 µL d'éthanol sont ajoutés. La préparation est mélangée par vortex. Ensuite, il y a une étape de centrifugation du mélange de 2 minutes à 5590 g. Le surnageant est retiré en veillant à ne pas toucher le culot. L'addition de 40 µL d'acide formique permet de remettre en suspension le mélange après une phase de vortex. L'étape finale consiste en l'addition de 40 µL d'acétonitrile à 70 %, suivie d'une centrifugation de deux minutes à 5590 g. Le dépôt d'1 µl de surnageant est réalisé immédiatement après sur les cibles Vitek MS-DS[®]. Après séchage à l'air ambiant des dépôts, nous ajoutons 1 µL de matrice CHCA. Puis nous laissons sécher avant d'introduire la cible dans le Vitek-MS[®], en plaçant tout d'abord les cibles dans le portoir adaptateur (Figures 14 et 15). La procédure complète doit être réalisée en moins de deux heures.

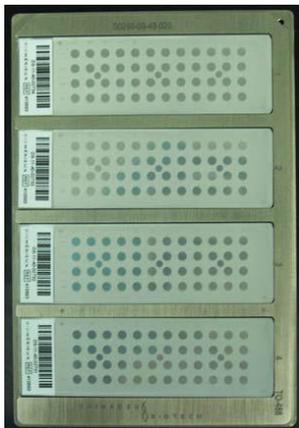


Figure 14. Positionnement des cibles Vitek-MS DS sur le portoir adaptateur (Biomérieux[®]).



Figure 15. Chargement de l'adaptateur de cibles Vitek-MS DS dans le Vitek-MS[®] (Biomérieux[®]).

e. **Calibration du spectromètre de masse Vitek-MS[®]**

En mode IVD

La calibration n'a pas besoin d'une intervention humaine. Le calibrant *E. coli* ATCC 8739 est déposé sur la cible avec l'addition de matrice CHCA. Une fois la cible introduite et le programme démarré, l'automate réalise la calibration, et décide si elle est convenable pour commencer les acquisitions de spectres, ou non.

En mode RUO

La calibration est effectuée quotidiennement avec une souche de référence d'*E. coli* ATCC 8739. Ici, la matrice est également directement déposée sur l'échantillon d'*E. coli* ATCC 8739, déposé au préalable sur la cible. Dans le logiciel LaunchPad[®], nous sélectionnons le puits de calibration et nous lançons automatiquement l'acquisition. Cette calibration permet de comparer notre souche d'*E. coli* ATCC 8739 aux 13 masses de références d'*E. coli* enregistrées dans la base. Les pics du spectre obtenus doivent être de bonne qualité c'est-à-dire que l'intensité doit être comprise entre 20 et 100 mV, avec une somme des intensités supérieures à 3000 mV, et une résolution des pics principaux au moins égale à 600. Nous devons être très vigilants à ces critères qui conditionnent une bonne acquisition des spectres. Une fois l'acquisition terminée nous allons dans l'écran calibration pour vérifier les paramètres et voir combien de masses diffèrent entre le spectre de calibrant et le spectre de référence d'*E. coli*. En principe, nous devons avoir moins de 5 masses de différence. Si tel est le cas, nous sauvegardons la calibration correcte, et nous lançons notre projet transmis auparavant depuis le poste informatique dans la pièce de mycologie via le logiciel Target Manager[®].

f. Acquisition des spectres

L'acquisition est identique pour les 2 modes. C'est la succession de tirs lasers qui permet l'obtention de profils. Ces tirs se font en direction de « sweet spots » au sein de chaque puits de la cible (Figure 16).

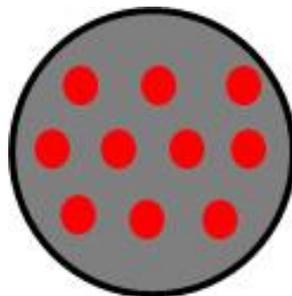


Figure 16. Représentation schématique des "sweet spots" sur un puits de la cible Vitek-MS DS[®].

Il faut 5 tirs lasers pour avoir un profil. Ensuite, il est nécessaire d'avoir un nombre suffisant de profils pour avoir une identification (100 en général). S'il y en a moins, l'automate relance des tirs lasers sur les sweet spots. Lorsque 60 profils consécutifs ne sont pas retenus, il y a arrêt des tirs sur ce spot et passage au suivant. Enfin, quand il y a moins de 30 profils acquis, il s'agit d'un échec d'identification. Dans notre travail, nous avons acquis les spectres en mode RUO au laboratoire de mycologie du CHU de Limoges.

g. Récupération des résultats et des spectres

En mode RUO, les résultats sont transférés de la station d'acquisition du Vitek-MS[®] à la station de préparation dans le logiciel Saramis Premium[®], où ils sont alors sauvegardés. Les résultats d'identification sont présentés sous forme de liste (Annexe 2) avec la famille, le genre et l'espèce du champignon identifié. Ceci s'accompagne d'un indice de confiance d'identification et du nombre de pics du spectre acquis, ou datacount. Le premier niveau d'identification montre la correspondance avec des SuperSpectres et l'indice de confiance correspondant. Pour les indices en dessous de 75 %, une comparaison est automatiquement lancée (mode autoloading) afin de comparer le spectre échantillon à l'ensemble de la base de données. La liste des spectres correspondant à une identification apparaît avec le pourcentage de similarité. Il est possible de choisir une identification.

Pour notre travail, les fichiers des spectres sont envoyés aux services RAD de la société Biomérieux[®] pour qu'ils soient traités aussi dans l'algorithme de la prochaine base de données IVD V2.1 fermée incluant plus de champignons filamenteux, dont les dermatophytes, actuellement en développement. La technique de dépôt étant la même, ils ont effectué une comparaison des masses obtenues au CHU Dupuytren, avec les masses de références contenues dans la nouvelle base de données.

À l'avenir, en mode IVD, les résultats pourront être récupérés à partir du logiciel Myla[®].

IV.3. Résultats

Nous présentons ici les résultats obtenus à partir des trois méthodes que nous avons évaluées. D'abord nous analyserons les résultats bruts, puis nous ferons des analyses en sous-groupes. Enfin, nous présenterons un tableau comparant l'identification par spectrométrie de masse à l'identification par séquençage (annexe 1).

IV.3.1. Examen mycologique classique

L'analyse microscopique des cultures des champignons sélectionnés donne une identification pour 131 cas sur 139. Huit champignons sont classés non identifiables. L'identification au rang de l'espèce est possible pour 97 échantillons sur 139 (70 %). Toutes les espèces d'*Aspergillus* sp. sont identifiées, mais seulement au rang des sections. Les *S. apiospermum* et *S. prolificans* sont identifiés au rang de l'espèce, sans mise en évidence des formes sexuées. Les espèces de *Fusarium* sp. ne sont pas identifiées. Parmi les zygomycètes, une seule espèce *Rhizomucor pusillus* est identifiée par la méthode classique. Pour les *Mucor* sp. et *Lichteimia* sp., le rang de l'espèce ne peut être rendu avec l'examen mycologique standard. Pour les dématiés, l'espèce est identifiée pour les *Neoscytalidium dimidiatum*. Mais *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., *Exophiala* sp. et *Ulocladium* sp. sont rendus au rang du genre. Nos 46 dermatophytes sont identifiés au rang de l'espèce, sans identification des formes téléomorphes. Pour les autres hyalohyphomycètes, nous avons identifié l'espèce pour seulement trois d'entre eux : *Acremonium roseum*, *Trichothecium roseum* et *Scopulariopsis brevicaulis*. *Trichoderma* sp., *Paecylomyces* sp., *Penicillium* sp. *Arthrinium* sp., *Beauveria* sp., *Chrysosporium* sp., et *Verticillium* sp. sont rendus seulement au rang du genre. Les deux *Trichosporon* sp. sont identifiés seulement au niveau du genre. Enfin, nous avons 8 champignons non identifiables avec les méthodes habituelles. L'usage de milieux spécifiques (Borelli, milieu terre, gélose au malt) n'a pas permis l'identification de ces champignons.

IV.3.2. Séquençage

La technique de référence nous a permis d'identifier tous les champignons sélectionnés, y compris ceux non identifiables en pratique courante. Nous

présentons les résultats en Annexe 1. Les identifications obtenues correspondent au séquençage de la région de l'ADN ribosomal codant le gène de la bêta tubuline pour les *Aspergillus* sp. et les *Scedosporium* sp. Pour les autres filamenteux, ce sont les identifications obtenues par le séquençage de la région ITS 1-2 qui sont présentées. Nous avons testé le séquençage de la région de la bêta tubuline pour trois autres champignons : un *Arthrinium* sp, un *Penicillium* sp. et un *Verticillium* sp. Le séquençage a permis d'identifier des espèces au sein des sections aspergillaires. En effet, nous avons identifié deux *Aspergillus* de la section Usti, les critères phénotypiques n'ont pas permis de les identifier par la méthode classique, un *A. calidoustus* et un *A. pseudoustus* (Samson et al., 2011). Dans la section Versicolores, 2 espèces de cette section non identifiées auparavant en routine sont mises en évidence, *A. sydowii* et *A. jensenii*. *Aspergillus clavatus* est identifié par les caractères morphologiques (Varga et al., 2007). Il en est de même pour notre *A. terreus*, et notre *A. ochraceus*. Dans la section Nigri, nous avons deux *A. niger*, cinq *A. tubingensis*, un *A. awamorii* et un *A. sclerotiorum* (Tableau II). Aucun des *Aspergillus* autres qu'*A. niger* n'a été identifié avec la méthode classique.

Tableau II. Identification par la méthode classique et le séquençage des *Aspergillus* de la section Nigri.

N° souche	Examen mycologique classique	Séquençage Bt2a-Bt2b
27	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>
28	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>
29	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>
30	<i>A. niger</i>	<i>A. awamorii</i>
31	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>
32	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>
33	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>
34	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>
35	<i>A. niger</i>	<i>A. sclerotiorum</i>

Parmi les *Scedosporium* sp., nous avons identifié 2 *Pseudallescheria boydii* (Tableau III). Un contrôle de qualité externe *S. prolificans* est identifié correctement, ainsi que notre *S. apiospermum* provenant d'un sinus. Pour les *Fusarium* sp., nous obtenons *F. oxysporum* pour l'échantillon provenant de lentilles visuelles et *F. solanii* pour un ongle (Tableau IV). Pour les zygomycètes, le séquençage a permis l'identification au niveau de l'espèce de nos deux *Mucor* sp., du *Rhizomucor* sp. et du *Lichteimia* sp. (Tableau V). En ce qui concerne les champignons dématiés, ils sont tous identifiés par le séquençage (Tableau VI). Un champignon classé comme

Cladosporium sp. par la méthode conventionnelle est en fait un *Phialophora europaea*.

Tableau III. Identification par la méthode classique et le séquençage des *Scedosporium* sp.

N° souche	Examen mycologique classique	Séquençage Bt2a-Bt2b
91	<i>S. apiospermum</i>	<i>P. boydii</i>
92	<i>S. apiospermum</i>	<i>P. boydii</i>
93	<i>S. apiospermum</i>	<i>S. apiospermum</i>
94	<i>S. prolificans</i>	<i>S. prolificans</i>

Tableau IV. Identification par séquençage des *Fusarium* sp.

N° souche	Examen mycologique classique	Séquençage ITS 1-2
55	<i>Fusarium</i> sp.	<i>F. oxysporum</i>
56	<i>Fusarium</i> sp.	<i>F. solanii</i>

Tableau V. Identification des zygomycètes par la méthode classique et le séquençage.

N° souche	Examen mycologique classique	Séquençage ITS 1-2
57	<i>Lichteimia</i> sp.	<i>Lichteimia corymbifera</i>
66	<i>Mucor plumbeus</i>	<i>Mucor racemosus</i>
67	<i>Mucor</i> sp.	<i>Mucor plumbeus</i>
89	<i>Rhizomucor</i> sp.	<i>Lichteimia corymbifera</i>
90	<i>Rhizomucor pusillus</i>	<i>Rhizomucor pusillus</i>

Tableau VI. Identification des phaeohyphomycètes par la méthode classique et le séquençage.

N° souche	Examen mycologique classique	Séquençage ITS 1-2
49	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
50	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
51	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Phialophora europaea</i>
53	<i>Exophiala</i> sp.	<i>Exophiala dermatitidis</i>
54	<i>Exophiala</i> sp.	<i>Exophiala dermatitidis</i>
43	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Pithomyces chartarum</i>
44	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Alternaria alternata</i>
45	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Alternaria alternata</i>
68	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>
69	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>
138	<i>Ulocladium</i> sp.	<i>Pithomyces chartarum</i>

Concernant les dermatophytes, les identifications obtenues par séquençage de la région ITS 1-2 pour les *Trichophyton* du complexe *mentagrophytes* et les *T. soudanense* sont indiquées dans le Tableau VII. Le séquençage a mis en évidence des formes téléomorphes *Arthroderma vanbreuseghemii* pour les *T. mentagrophytes* identifiés par la technique classique. Nous avons pu correctement identifier les *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* zoophiles et les *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* anthropophiles. Une identification fut corrigée par le séquençage pour un *T. tonsurans* identifié au microscope comme un *T. soudanense*.

Tableau VII. Identification des *Trichophyton* du complexe *mentagrophytes* et *T. soudanense* par la méthode classique et le séquençage.

N° souche	Examen mycologique classique	Séquençage ITS 1-2
96	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i>
97	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i>
98	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>Arthroderma vanbreuseghemii</i>
99	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>Arthroderma vanbreuseghemii</i>
100	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>Arthroderma vanbreuseghemii</i>
101	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i>
102	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>Arthroderma vanbreuseghemii</i>
103	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>mentagrophytes</i>
104	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>Arthroderma vanbreuseghemii</i>
105	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i>
106	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>Arthroderma vanbreuseghemii</i>
107	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i>
125	<i>T. soudanense</i>	<i>T. soudanense</i>
126	<i>T. soudanense</i>	<i>T. tonsurans</i>

Tous les *Penicillium* sp. sont identifiés également au rang de l'espèce (Tableau VIII). Nous avons essayé de séquencer la région de la bêta tubuline pour un *Penicillium* sp., le résultat d'identification est convenable.

Pour les autres hyalohyphomycètes, toutes les espèces ont pu être identifiées (Tableau IX).

Dans le Tableau X, nous présentons les résultats du séquençage pour les champignons classés comme non identifiés par la méthode classique. Ils sont ici tous identifiés au rang de l'espèce.

Enfin, un des *Trichosporon* sp. est identifié comme un *Arthrographis kalrae*, ceci est confirmé par le CNRMA (Pichon et al., 2008). Le second est un *Trichosporon casearum* (Tableau XI).

Tableau VIII. Identification des *Penicillium* sp. par la méthode classique et le séquençage.

N° souche	Examen mycologique classique	Séquençage ITS 1-2
80	<i>Penicillium</i> sp.	<i>P. chrysogenum</i>
81	<i>Penicillium</i> sp.	<i>P. chrysogenum</i> *
82	<i>Penicillium</i> sp.	<i>P. simplicissimum</i>
83	<i>Penicillium</i> sp.	<i>P. roqueforti</i>
84	<i>Penicillium</i> sp.	<i>P. corylophylum</i>
85	<i>Penicillium</i> sp.	<i>P. chrysogenum</i>
86	<i>Penicillium</i> sp.	<i>P. commune</i>
87	<i>Penicillium</i> sp.	<i>P. cecidicola</i>
88	<i>Penicillium</i> sp.	<i>P. islandicum</i>

* : *P. chrysogenum* provient d'une identification par séquençage de la région Bt2a- Bt2b.

Tableau IX. Identification des hyalohyphomycètes par la méthode classique et le séquençage.

N° souche	Examen mycologique classique	Séquençage ITS 1-2
42	<i>Acremonium roseum</i>	<i>Acremonium tubakii</i>
46	<i>Arthrimum</i> sp.	<i>Arthrimum marii</i> *
47	<i>Beauveria</i> sp.	<i>Beauveria pseudobassiana</i>
48	<i>Chrysosporium</i> sp.	<i>Chrysosporium articulatum</i>
78	<i>Paecylomyces</i> sp.	<i>Paecylomyces brunneolus</i>
79	<i>Paecylomyces</i> sp.	<i>Paecylomyces variotii</i>
133	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
134	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma citrinoviride</i>
137	<i>Trichothecium roseum</i>	<i>Trichothecium roseum</i>
95	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>
139	<i>Verticillium</i> sp.	<i>Fusarium proliferatum</i>

* : *Arthrimum marii* est une identification obtenue par le séquençage de la région Bt2a-Bt2b.

Tableau X. Résultats du séquençage des champignons classés dans le groupe non identifiés par la méthode classique microscopique.

N° souche	Origine du prélèvement	Examen mycologique classique	Séquençage ITS 1-2
70	LBA	NI	<i>Phialemonium curvatum</i>
71	ongle pied	NI	<i>Coniosporium epidermidis</i>
72	ongle pied	NI	<i>Lichteimia ramosa</i>
73	squames bras	NI	<i>Sarocladium kiliense</i>
74	ongle pied	NI	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>
75	ongle pied	NI	<i>Ophiostoma proliferum</i>
76	ongle pied	NI	<i>Stereum hirsutum</i>
77	EB	NI	<i>Stereum hirsutum</i>

LBA : Lavage broncho-alvéolaire ; EB : Expectoration bronchique ; NI : Non identifié.

Tableau XI. Identification moléculaire des *Trichosporon* sp.

N° souche	Examen mycologique classique	Séquençage ITS 1-2
135	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>Arthrographis kalrae</i>
136	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>Trichosporon caseorum</i>

IV.3.3. Spectrométrie de masse

a. Base RUO Saramis[®] V4.10

En mode RUO, nous obtenons 53 identifications (38 %) et 86 (62 %) non identifications. Certains champignons sont absents de la base, nous présenterons les résultats en considérant l'identification par séquençage pour dire si le champignon est présent ou non dans la base testée. Parmi les identifications, 35 sont associées à un indice de confiance, et 18 correspondent à des résultats de la comparaison la plus proche, du spectre du champignon étudié par rapport aux spectres contenus dans la base. Pour ces 18 identifications, il n'y a pas d'indice de confiance.

Parmi les 53 identifications, nous avons 6 identifications seulement du genre (Tableau XII), 47 identifications au niveau de l'espèce, dont 37 concordantes (26 %) avec les résultats du séquençage, et 16 non concordantes.

Tableau XII. Champignons identifiés au niveau du genre en mode RUO Saramis[®] V4.10.

N° souche	Examen mycologique classique	RUO Saramis [®] V4.10
44	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp.
61	<i>Microsporum canis</i>	<i>Microsporum</i> sp.
121	<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Trichophyton</i> sp.
136	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>Trichosporon</i> sp.

Parmi les *Aspergillus* sp., 22 ont été identifiés (53,6 %) mais aucun des *A. glaucus* ne l'a été (Tableau XIII). Concernant les trois *Scedosporium* sp., nous obtenons trois identifications sur quatre. Un *Fusarium* sp. sur deux est identifié, il s'agit de *F. solanii*. Pour les Zygomycètes (Tableau XIV), la base Saramis[®] V4.10 a permis d'identifier *Rhizomucor pusillus* et *Lichteimia corymbifera*.

Pour les Dématiés, trois champignons sont identifiés, uniquement au niveau du genre. Il s'agit d'*Alternaria* sp., et deux *Exophiala* sp. Pour les autres hyalohyphomycètes, seuls *S. brevicaulis* et *Chrysosporium* sp. sont identifiés avec la base Saramis[®] V4.10 (Tableau XV). Aucun *Penicillium* sp. n'est identifié avec cette base. Concernant les dermatophytes, la base Saramis[®] V4.10 nous a permis d'identifier 17 dermatophytes (Tableau XVI), dont 2 uniquement au niveau du genre (un *Trichophyton* sp. et un *Microsporum* sp.).

Tableau XIII. Identification des *Aspergillus* sp. en mode RUO Saramis® V4.10.

N° souche	Examen mycologique classique	RUO Saramis® V4.10	N° souche	Examen mycologique classique	RUO Saramis® V4.10
1	<i>A. clavatus</i>	Abs	21	<i>A. glaucus</i>	Abs
2	<i>A. flavus</i>	NI	22	<i>A. glaucus</i>	NI
3	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	23	<i>A. glaucus</i>	NI
4	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	24	<i>A. nidulans</i>	<i>A. ustus</i>
5	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	25	<i>A. nidulans</i>	NI
6	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	26	<i>A. nidulans</i>	<i>A. nidulans</i>
7	<i>A. fumigatus</i>	NI	27	<i>A. niger</i>	NI
8	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	28	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>
9	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	29	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> complexe
10	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	30	<i>A. niger</i>	Abs
11	<i>A. fumigatus</i>	NI	31	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>
12	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	32	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>
13	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	33	<i>A. niger</i>	NI
14	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	34	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>
15	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	35	<i>A. niger</i>	<i>A. sclerotioniger</i>
16	<i>A. fumigatus</i>	NI	36	<i>A. ochraceus</i>	NI
17	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	37	<i>A. terreus</i>	NI
18	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	38	<i>A. ustus</i>	NI
19	<i>A. fumigatus</i>	NI	39	<i>A. versicolor</i>	NI
20	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	40	<i>A. versicolor</i>	Abs
			41	<i>A. versicolor</i>	NI

Abs : Absent de la base ; NI : non identifié.

Tableau XIV. Identification des Zygomycètes avec la base Saramis® V4.10.

N° souche	Examen mycologique classique	RUO Saramis® V4.10
89	<i>Rhizomucor</i> sp.	<i>Lichteimia corymbifera</i>
90	<i>Rhizomucor pusillus</i>	<i>R. pusillus</i>
57	<i>Lichteimia</i> sp.	NI
66	<i>Mucor plumbeus</i> .	Abs
67	<i>Mucor</i> sp.	NI

Abs : Absent de la base ; NI : non identifié.

Tableau XV. Identification des autres hyalohyphomycètes avec la base Saramis® V4.10.

N° souche	Examen mycologique classique	RUO Saramis® V4.10
41	<i>Acremonium roseum</i>	NI
45	<i>Arthrinium</i> sp.	Abs
47	<i>Beauveria</i> sp.	Abs
48	<i>Chrysosporium</i> sp.	<i>C. keratinophilum</i>
78	<i>Paecilomyces</i> sp.	Abs
79	<i>Paecilomyces</i> sp.	NI
95	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	<i>S. brevicaulis</i>
133	<i>Trichoderma</i> sp.	Abs
134	<i>Trichoderma</i> sp.	NI
137	<i>Trichothecium roseum</i>	Abs
139	<i>Verticillium</i> sp.	NI

Abs : Absent de la base ; NI : non identifié.

Tableau XVI. Identification des dermatophytes avec la base Saramis[®] V4.10.

N° souche	Examen mycologique classique	RUO Saramis [®] V4.10	N° souche	Examen mycologique classique	RUO Saramis [®] V4.10
96	<i>T. mentagrophytes</i>	NI	119	<i>T. rubrum</i>	NI
97	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	120	<i>T. rubrum</i>	NI
98	<i>T. mentagrophytes</i>	NI	121	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton</i> sp.
99	<i>T. mentagrophytes</i>	NI	122	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>
100	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	123	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>
101	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	124	<i>T. schoenleinii</i>	NI
102	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	125	<i>T. soudanense</i>	Abs
103	<i>T. mentagrophytes</i>	NI	126	<i>T. soudanense</i>	<i>T. tonsurans</i>
104	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	127	<i>T. tonsurans</i>	NI
105	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. rubrum</i>	128	<i>T. tonsurans</i>	NI
106	<i>T. mentagrophytes</i>	NI	129	<i>T. verrucosum</i>	NI
107	<i>T. mentagrophytes</i>	NI	130	<i>T. verrucosum</i>	NI
108	<i>T. rubrum</i>	NI	131	<i>T. verrucosum</i>	NI
109	<i>T. rubrum</i>	NI	132	<i>T. violaceum</i>	NI
110	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	58	<i>M. audouinii</i>	NI
111	<i>T. rubrum</i>	NI	59	<i>M. audouinii</i>	NI
112	<i>T. rubrum</i>	NI	60	<i>M. canis</i>	NI
113	<i>T. rubrum</i>	NI	61	<i>M. canis</i>	<i>Microsporum</i> sp.
114	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	62	<i>M. canis</i>	NI
115	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	63	<i>M. gypseum</i>	<i>M. gypseum</i>
116	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	64	<i>M. nanum</i>	Abs
117	<i>T. rubrum</i>	NI	65	<i>M. persicolor</i>	NI
118	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	52	<i>E. floccosum</i>	NI

Abs : Absent de la base ; NI : non identifié.

La base Saramis[®] V4.10 ne nous a pas permis d'identifier les champignons considérés comme non identifiables par la technique classique mycologique.

Nous obtenons même des identifications erronées que nous développerons plus loin (paragraphe V.4.4 p. 87) dans les résultats comparatifs avec le séquençage. Ce sont principalement des identifications d'espèces proches.

Nous obtenons 62 % de non identifications avec la base Saramis[®] V4.10, et ceci dans tous les groupes de champignons (Tableau XVII).

Tableau XVII. Champignons non identifiés avec la base RUO Saramis® V4.10.

N° souche	Examen mycologique classique	RUO Saramis® V4.10	N° souche	Examen mycologique classique	RUO Saramis® V4.10	N° souche	Examen mycologique classique	RUO Saramis® V4.10
1	<i>A. clavatus</i>	Abs	59	<i>M. audouinii</i>	NI	96	<i>T. mentagrophytes</i>	NI
2	<i>A. flavus</i>	NI	60	<i>M. canis</i>	NI	98	<i>T. mentagrophytes</i>	NI
7	<i>A. fumigatus</i>	NI	62	<i>M. canis</i>	NI	99	<i>T. mentagrophytes</i>	NI
11	<i>A. fumigatus</i>	NI	64	<i>M. nanum</i>	Abs	103	<i>T. mentagrophytes</i>	NI
16	<i>A. fumigatus</i>	NI	65	<i>M. persicolor</i>	NI	106	<i>T. mentagrophytes</i>	NI
19	<i>A. fumigatus</i>	NI	66	<i>M. plumbeus.</i>	Abs	107	<i>T. mentagrophytes</i>	NI
21	<i>A. glaucus</i>	Abs	67	<i>Mucor sp.</i>	NI	108	<i>T. rubrum</i>	NI
22	<i>A. glaucus</i>	NI	68	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	Abs	109	<i>T. rubrum</i>	NI
23	<i>A. glaucus</i>	NI	69	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	Abs	111	<i>T. rubrum</i>	NI
25	<i>A. nidulans</i>	NI	70	NI	Abs	112	<i>T. rubrum</i>	NI
27	<i>A. niger</i>	NI	71	NI	Abs	113	<i>T. rubrum</i>	NI
30	<i>A. niger</i>	Abs	72	NI	Abs	117	<i>T. rubrum</i>	NI
33	<i>A. niger</i>	NI	73	NI	Abs	119	<i>T. rubrum</i>	NI
36	<i>A. ochraceus</i>	NI	74	NI	Abs	120	<i>T. rubrum</i>	NI
39	<i>A. versicolor</i>	NI	75	NI	Abs	124	<i>T. schoenleinii</i>	NI
40	<i>A. versicolor</i>	Abs	76	NI	Abs	125	<i>T. soudanense</i>	Abs
41	<i>A. versicolor</i>	NI	77	NI	Abs	127	<i>T. tonsurans</i>	NI
42	<i>Acremonium roseum</i>	Abs	78	<i>Paecilomyces sp.</i>	Abs	128	<i>T. tonsurans</i>	NI
43	<i>Alternaria sp.</i>	NI	79	<i>Paecilomyces sp.</i>	NI	129	<i>T. verrucosum</i>	NI
45	<i>Alternaria sp.</i>	Abs	80	<i>Penicillium sp.</i>	NI	130	<i>T. verrucosum</i>	NI
46	<i>Arthrinium sp.</i>	Abs	81	<i>Penicillium sp.</i>	NI	131	<i>T. verrucosum</i>	NI
47	<i>Beauveria sp.</i>	Abs	82	<i>Penicillium sp.</i>	Abs	132	<i>T. violaceum</i>	NI
49	<i>Cladosporium sp.</i>	NI	83	<i>Penicillium sp.</i>	Abs	133	<i>Trichoderma sp.</i>	Abs
50	<i>Cladosporium sp.</i>	NI	84	<i>Penicillium sp.</i>	Abs	134	<i>Trichoderma sp.</i>	NI
51	<i>Cladosporium sp.</i>	NI	85	<i>Penicillium sp.</i>	NI	135	<i>Trichosporon.sp</i>	NI
52	<i>E. floccosum</i>	NI	86	<i>Penicillium sp.</i>	Abs	137	<i>Trichothecium roseum</i>	Abs
55	<i>Fusarium sp.</i>	NI	87	<i>Penicillium sp.</i>	Abs	138	<i>Ulocladium sp.</i>	Abs
57	<i>Lichteimia sp.</i>	NI	88	<i>Penicillium sp.</i>	Abs	139	<i>Verticillium sp.</i>	NI
58	<i>M. audouinii</i>	NI	94	<i>S. prolificans</i>	Abs			

Abs : Absent de la base ; NI : non identifié.

b. Base de données fermée en développement : IVD V2.1

Cette base est limitée en nombre de champignons filamenteux. Elle ne comporte pas tous les champignons que nous avons étudiés.

Nous obtenons 81 identifications sur 139 (58,2 %), dont deux sans indice de confiance et une seule identification uniquement au genre pour *A. alternata* (n°44). Cinquante-huit champignons sont non identifiés dans la base IVD V2.1. Le point critique est le rendu de 3 identifications doubles (Tableau XVIII). Dans un cas, les 2 champignons proposés sont très distincts. Il faut noter que nous avons vérifié la pureté de nos échantillons à tester de façon systématique. Nous ne pouvons pas accepter un résultat proposant deux genres ou deux espèces différentes.

Tableau XVIII. Présentation des identifications doubles avec la base IVD V2.1, en comparaison avec les identifications en mode RUO Saramis[®] V4.10 et le séquençage.

N° souche	Examen mycologique classique	Séquençage ITS 1-2	IVD V 2.1	RUO Saramis [®] V4.10
84	<i>Penicillium</i> sp.	<i>P. corylophyllum</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i> / <i>F. proliferatum</i>	Abs
112	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i> / <i>T. violaceum</i>	NI
121	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i> / <i>T. violaceum</i>	<i>Trichophyton</i> sp.

Abs : Absent de la base ; NI : non identifié.

Nous avons obtenu l'identification de 29 *Aspergillus* sp. avec la base IVD V2.1 (Tableau XIX). Parmi les *A. niger* nous obtenons des résultats imprécis, de type « *Aspergillus niger* complexe ». Aucun de nos *A. glaucus* n'est identifié.

Pour les *Scedosporium* sp. nous identifions trois *Pseudallescheria boydii*, pour trois *S. apiospermum*. *Scedosporium prolificans* n'est pas identifié.

Les deux *Fusarium* sp. sont identifiés en IVD V2.1, il s'agit de *F. oxysporum* et *F. solanii*.

Un zygomycète sur 5 est identifié avec la base IVD V2.1 (Tableau XX).

Cinq dématiés sur onze sont identifiés avec la base IVD V2.1 (Tableau XXI). Deux *Cladosporium* sp. sur trois sont identifiés comme *C. cladosporoides* complexe. Les *Exophiala* sp. sont identifiés au rang de l'espèce, mais *Alternaria* sp. n'est identifié qu'au niveau du genre.

Tableau XIX. Identification des *Aspergillus* avec la base IVD V2.1.

N° souche	Examen mycologique classique	IVD V 2.1	N° souche	Examen mycologique classique	IVD V 2.1
1	<i>A. clavatus</i>	Abs	22	<i>A. glaucus</i>	Abs
2	<i>A. flavus</i>	Abs	23	<i>A. glaucus</i>	Abs
3	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	24	<i>A. nidulans</i>	<i>A. ustus</i>
4	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	25	<i>A. nidulans</i>	<i>A. nidulans</i>
5	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	26	<i>A. nidulans</i>	<i>A. nidulans</i>
6	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	27	<i>A. niger</i>	Abs
7	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	28	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>
8	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	29	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> complexe
9	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	30	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> complexe
10	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	31	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> complexe
11	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	32	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>
12	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	33	<i>A. niger</i>	Abs
13	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	34	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> complexe
14	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	35	<i>A. niger</i>	Abs
15	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	36	<i>A. ochraceus</i>	Abs
16	<i>A. fumigatus</i>	NI	37	<i>A. terreus</i>	<i>A. terreus</i>
17	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	38	<i>A. ustus</i>	<i>A. ustus</i>
18	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	39	<i>A. versicolor</i>	<i>A. sydowii</i>
19	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	40	<i>A. versicolor</i>	Abs
20	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	41	<i>A. versicolor</i>	NI
21	<i>A. glaucus</i>	Abs			

Abs : Absent de la base ; NI : non identifié.

Tableau XX. Identification des zygomycètes avec la base IVD V2.1.

N° souche	Examen mycologique classique	IVD V2.1
57	<i>Lichteimia</i> sp.	NI
66	<i>Mucor plumbeus</i>	NI
67	<i>Mucor</i> sp.	Abs
89	<i>Rhizomucor</i> sp.	<i>Lichteimia corymbifera</i>
90	<i>Rhizomucor pusillus</i>	Abs

Abs : Absent de la base ; NI : non identifié.

Tableau XXI. Identification des dématiés avec la base IVD V2.1.

N° souche	Examen mycologique classique	IVD V 2.1
43	<i>Alternaria</i> sp.	NI
44	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp.
45	<i>Alternaria</i> sp.	NI
49	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Cladosporium cladosporoides</i> complexe
50	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Cladosporium cladosporoides</i> complexe
51	<i>Cladosporium</i> sp.	Abs
53	<i>Exophiala</i> sp.	<i>Exophiala dermatitidis</i>
54	<i>Exophiala</i> sp.	<i>Exophiala dermatitidis</i>
68	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	Abs
69	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	Abs
138	<i>Ulocladium</i> sp.	Abs

Abs : Absent de la base ; NI : non identifié.

En ce qui concerne les dermatophytes, la base IVD V2.1 en identifie 33 sur 46 (72 %) (Tableau XXII). C'est dans ce groupe que nous rencontrons des identifications doubles entre *T. rubrum* et *T. violaceum*. Un *T. interdigitale* est identifié comme *T. rubrum*, ce qui surprend car la méthode classique a correctement discriminé ces 2 espèces.

Tableau XXII. Identifications des dermatophytes avec la base IVD V2.1.

N° souche	Examen mycologique classique	IVD V2.1	N° souche	Examen mycologique classique	IVD V2.1
96	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	119	<i>T. rubrum</i>	NI
97	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	120	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>
98	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	121	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i> / <i>T. violaceum</i>
99	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	122	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>
100	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	123	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>
101	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	124	<i>T. schoenleinii</i>	NI
102	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	125	<i>T. soudanense</i>	<i>T. violaceum</i>
103	<i>T. mentagrophytes</i>	NI	126	<i>T. soudanense</i>	<i>T. tonsurans</i>
104	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	127	<i>T. tonsurans</i>	NI
105	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. rubrum</i>	128	<i>T. tonsurans</i>	<i>T. tonsurans</i>
106	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	129	<i>T. verrucosum</i>	NI
107	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	130	<i>T. verrucosum</i>	NI
108	<i>T. rubrum</i>	NI	131	<i>T. verrucosum</i>	NI
109	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	132	<i>T. violaceum</i>	NI
110	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	58	<i>M. audouinii</i>	NI
111	<i>T. rubrum</i>	NI	59	<i>M. audouinii</i>	NI
112	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i> / <i>T. violaceum</i>	60	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>
113	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	61	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>
114	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	62	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>
115	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	63	<i>M. gypseum</i>	<i>M. gypseum</i>
116	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	64	<i>M. nanum</i>	Abs
117	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	65	<i>M. persicolor</i>	<i>M. persicolor</i>
118	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	52	<i>E. floccosum</i>	<i>E. floccosum</i>

Abs : Absent de la base ; NI : non identifié.

Pour les autres hyalohyphomycètes, nous obtenons 3 identifications sur 11, mais elles ne correspondent pas aux champignons testés (Tableau XXIII). Parmi les *Penicillium* sp. nous obtenons cinq identifications sur neuf. Seulement 3 correspondent à des *Penicillium* sp. Les 2 autres identifications correspondent à des erreurs importantes (Tableau XXIV). La base IVD V2.1 a identifié un *A. ustus* à la place d'un *Penicillium* sp. et laisse le choix entre un *Rhizopus arrhizus* ou un *Fusarium proliferatum* pour un *Penicillium* sp. Les champignons non identifiables par

la méthode classique ont été identifiés dans deux cas, un *Sarocladium kiliense* et un *Sporothrix schenckii* (Tableau XXV). Il y a 58 champignons non identifiés avec la base IVD V2.1 (Tableau XXVI).

Tableau XXIII. Identification des hyalohyphomycètes avec la base IVD V2.1.

N° souche	Examen mycologique classique	IVD V2.1
42	<i>Acremonium roseum</i>	Abs
46	<i>Arthrinium</i> sp.	<i>Lecytophora hofmannii</i>
47	<i>Beauveria</i> sp.	Abs
78	<i>Paecilomyces</i> sp.	Abs
79	<i>Paecilomyces</i> sp.	NI
133	<i>Trichoderma</i> sp.	Abs
134	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Sarocladium kiliense</i>
137	<i>Trichothecium roseum</i>	<i>T. violaceum</i>
139	<i>Verticillium</i>	NI

Abs : Absent de la base ; NI : non identifié.

Tableau XXIV. Identification des *Penicillium* sp. avec la base IVD V2.1.

N° souche	Examen mycologique classique	IVD V2.1
80	<i>Penicillium</i> sp.	<i>P. chrysogenum</i>
81	<i>Penicillium</i> sp.	NI
82	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Aspergillus ustus</i>
83	<i>Penicillium</i> sp.	<i>P. roqueforti</i>
84	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Rhizopus arrhizus / Fusarium proliferatum</i>
85	<i>Penicillium</i> sp.	<i>P. chrysogenum</i>
86	<i>Penicillium</i> sp.	Abs
87	<i>Penicillium</i> sp.	Abs
88	<i>Penicillium</i> sp.	Abs

Abs : Absent de la base ; NI : non identifié.

Tableau XXV. Essai d'identification avec la base IVD V2.1 des champignons non identifiés avec la méthode mycologique classique.

N° souche	Examen mycologique classique	IVD V2.1
70	NI	Abs
71	NI	Abs
72	NI	Abs
73	NI	<i>Sarocladium kiliense</i>
74	NI	Abs
75	NI	<i>Sporothrix schenckii</i>
76	NI	Abs
77	NI	Abs

Abs : Absent de la base ; NI : non identifié.

Tableau XXVI. Non identifications de la base IVD V2.1.

N° souche	Examen mycologique classique	IVD V2.1	N° souche	Examen mycologique classique	IVD V2.1
1	<i>A. clavatus</i>	Abs	72	NI	Abs
2	<i>A. flavus</i>	Abs	74	NI	Abs
16	<i>A. fumigatus</i>	NI	76	NI	Abs
21	<i>A. glaucus</i>	NI	77	NI	Abs
22	<i>A. glaucus</i>	NI	78	<i>Paecylomyces</i> sp.	Abs
23	<i>A. glaucus</i>	NI	79	<i>Paecylomyces</i> sp.	NI
27	<i>A. niger</i>	NI	81	<i>Penicillium</i> sp.	NI
33	<i>A. niger</i>	NI	86	<i>Penicillium</i> sp.	Abs
35	<i>A. niger</i>	NI	87	<i>Penicillium</i> sp.	Abs
36	<i>A. ochraceus</i>	NI	88	<i>Penicillium</i> sp.	Abs
40	<i>A. versicolor</i>	NI	90	<i>Rhizomucor pusillus</i>	Abs
41	<i>A. versicolor</i>	NI	94	<i>S. prolificans</i>	NI
42	<i>Acremonium roseum</i>	NI	95	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	Abs
43	<i>Alternaria</i> sp.	NI	103	<i>T. mentagrophytes</i>	NI
45	<i>Alternaria</i> sp.	Abs	108	<i>T. rubrum</i>	NI
47	<i>Beauveria</i> sp.	Abs	111	<i>T. rubrum</i>	NI
48	<i>Chrysosporium</i> sp.	Abs	119	<i>T. rubrum</i>	NI
51	<i>Cladosporium</i> sp.	Abs	120	<i>T. rubrum</i>	NI
57	<i>Lichteimia</i> sp.	Abs	124	<i>T. schoenleinii</i>	NI
58	<i>M. audouinii</i>	NI	127	<i>T. tonsurans</i>	NI
59	<i>M. audouinii</i>	NI	129	<i>T. verrucosum</i>	NI
63	<i>M. gypseum</i>	NI	130	<i>T. verrucosum</i>	NI
64	<i>M. nanum</i>	Abs	131	<i>T. verrucosum</i>	NI
66	<i>M. plumbeus</i>	NI	132	<i>T. violaceum</i>	NI
67	<i>Mucor</i> sp.	Abs	133	<i>Trichoderma</i> sp.	Abs
68	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	Abs	135	<i>Trichosporon</i> sp.	Abs
69	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	Abs	136	<i>Trichosporon</i> sp.	Abs
70	NI	Abs	138	<i>Ulocladium</i> sp.	Abs
71	NI	Abs	139	<i>Verticillium</i> sp.	NI

Abs : Absent de la base ; NI : non identifié.

IV.4. Résultats comparatifs

IV.4.1. Examen mycologique classique versus séquençage

Lorsque nous comparons la microscopie à l'identification par biologie moléculaire, nous obtenons 122 identifications correctes sur 139 (87 %). 17 identifications sont non concordantes (13 %). Ceci en se limitant au genre, en effet pour de nombreuses espèces, la discrimination visuelle entre espèce ne peut être réalisée. Huit champignons sont non identifiés par la méthode classique. Pour neuf

souches il n'y a pas de concordance par rapport à la technique de référence (Tableau XXVII).

Tableau XXVII. Présentation des identifications non concordantes par la méthode mycologique classique comparée au séquençage.

N° souche	Examen mycologique classique	Séquençage des régions ITS 1-2 et Bt2a-Bt2b
2	<i>A. flavus</i>	<i>A. amstelodami</i>
24	<i>A. nidulans</i>	<i>A. calidoustus</i>
45	<i>Altemaria</i> sp.	<i>Pithomyces chartarum</i>
51	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Phialophora europaea</i>
89	<i>Rhizomucor</i> sp.	<i>Lichteimia corymbifera</i>
126	<i>T. soudanense</i>	<i>T. tonsurans</i>
135	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>Arthrographis kalrae</i>
138	<i>Ulocladium</i> sp.	<i>Pithomyces chartarum</i>
139	<i>Verticillium</i> sp.	<i>Fusarium proliferatum</i>

IV.4.2. Spectrométrie de masse versus séquençage

Nous présenterons les résultats des 2 bases de données IVD V2.1 et RUO Saramis[®] V4.10.

Avec la base IVD V2.1 nous obtenons 58 % d'identifications correctes (81/ 139), et 42 % de non identifications. Cinquante-six identifications sur 81 sont concordantes (69 %), et 25 ne le sont pas (31 %).

Avec la base RUO Saramis[®] V4.10, nous obtenons 38 % d'identifications correctes (53/ 139), et 62 % de non identifications (86/ 139). Nous avons 37 identifications concordantes sur 53 (70 %) et 16 non concordantes (30 %). Certaines non concordances reposent sur des différences entre forme anamorphe ou téléomorphe, et d'autres sur des différences au sein d'une section. Nous considérons une concordance parfaite pour des identifications correctes au niveau de l'espèce et au sein des sections, notamment aspergillaires. En spectrométrie de masse nous voulons pouvoir discriminer les espèces mieux qu'avec la technique classique, et même presque aussi bien qu'avec le séquençage.

Pour les *Aspergillus* sp., avec la base IVD V2.1, nous obtenons 53,6 % (22/ 41) de bonnes identifications. Avec la base RUO Saramis[®] V4.10, nous avons 41,5 % (17/ 41) de bonnes identifications. Nous observons une efficacité convenable de la spectrométrie de masse pour les *A. fumigatus* malgré un échantillon non identifié. Dans les deux bases nous observons des erreurs proches au sein d'un sous-groupe d'espèces comme pour les *Aspergillus* de la section Nigri, ceci concerne 4

échantillons (Tableau XXVIII). Nous retrouvons les mêmes problèmes pour les *A. glaucus*, et les *A. versicolor*. Pour les *Scedosporium* sp., la spectrométrie de masse a mis en évidence uniquement des *P. boydii*, mais ni *S. apiospermum*, ni *S. prolificans*. Les *Fusarium* sp. sont identifiés correctement avec la base IVD V2.1. Pour les dermatophytes nous obtenons un score équivalent de 67 % soit 31 souches identifiées avec succès sur 46, avec la base IVD V2.1 (Tableau XXIX). Vingt et une identifications sont concordantes. Parmi les 10 autres, 6 correspondent à des imprécisions de la base pour déterminer les formes téléomorphes. Dans 2 cas, nous avons le choix entre 2 espèces pour une même souche, le résultat est *T. rubrum* à 50 % / *T. violaceum* à 50 % (n° 112 et n° 121). Enfin les 2 derniers cas sont des identifications erronées, la première donne *T. rubrum* pour un *T. interdigitale* (n° 105). La deuxième correspond à *T. violaceum* pour *T. soudanense* (n° 125).

Le score d'identification avec la base RUO V4.10 est de 37 % (17/46), avec 11 résultats concordants au séquençage. Parmi les non concordants, 2 correspondent à des identifications seulement au genre pour un *Microsporum* sp. (n° 61), et un *Trichophyton* sp. (n° 121). Nous retrouvons la même identification erronée pour la souche n° 105. L'absence de *T. soudanense* dans la base est à signaler. Les *M. canis* ont tous été identifiés avec succès avec la base IVD V2.1, mais pas avec la base RUO V4.10. Aussi il faut noter l'absence de *Neoscytalidium dimidiatum* dans les bases de données Biomérieux[®].

Pour les hyalohyphomycètes autres que les *Aspergillus* sp., nous avons trois identifications incorrectes avec la base IVD V2.1. Avec la base RUO V4.10 nous n'avons pas d'identification pour ces trois champignons. Il s'agit des identifications d'un *Sarocladium kiliense*, d'un *Trichophyton violaceum* et d'un *Lecythophora hofmannii* (Tableau XXX). *Scopulariopsis brevicaulis* est identifié grâce à la base de recherche, de même pour *Chrysosporium keratinophilum*, mais cette identification est erronée par rapport au séquençage (n° 48).

Pour les *Penicillium* sp., la spectrométrie de masse est en défaut. Pour les dématiés, 5 sur 11 champignons sont identifiés avec la base IVD V2.1, et 3 seulement au rang de l'espèce avec la base RUO V4.10. Parmi les zygomycètes, un *Lichteimia corymbifera* sur deux est identifié correctement, et le *Rhizopus pusillus*. La spectrométrie de masse n'a permis l'identification que de deux champignons non identifiés par la méthode classique (Tableau XXXI).

Tableau XXVIII. Identifications des *Aspergillus* sp. avec les différentes méthodes.

	N° souche	Examen mycologique classique	Séquençage Bt2a-Bt2b	IVD V2.1	RUO Saramis® V4.10
<i>A. flavus</i>	2	<i>A. flavus</i>	<i>A. amstelodami</i>	Abs	NI
	3	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>
	4	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>
	5	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>
<i>A. fumigatus</i>	6	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
	7	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	NI
	8	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
	9	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
	10	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
	11	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	NI
	12	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
	13	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
	14	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
	15	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
	16	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	NI	NI
	17	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
	18	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
	19	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	NI
20	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	
<i>A. glaucus</i>	21	<i>A. glaucus</i>	<i>A. pseudoglaucus</i>	Abs	Abs
	22	<i>A. glaucus</i>	<i>A. amstelodami</i>	Abs	NI
	23	<i>A. glaucus</i>	<i>A. amstelodami</i>	Abs	NI
<i>A. nidulans</i>	24	<i>A. nidulans</i>	<i>A. calidoustus</i>	<i>A. ustus</i>	<i>A. ustus</i>
	25	<i>A. nidulans</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. nidulans</i>	NI
	26	<i>A. nidulans</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. nidulans</i>
<i>A. niger</i>	27	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>	Abs	NI
	28	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>
	29	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> complexe	<i>A. niger</i> complexe
	30	<i>A. niger</i>	<i>A. awamorii</i>	<i>A. niger</i> complexe	Abs
	31	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>	<i>A. niger</i> complexe	<i>A. niger</i>
	32	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>
	33	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>	Abs	NI
	34	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>	<i>A. niger</i> complexe	<i>A. tubingensis</i>
	35	<i>A. niger</i>	<i>A. sclerotiorum</i>	Abs	<i>A. sclerotioniger</i>
<i>A. versicolor</i>	39	<i>A. versicolor</i>	<i>A. sydowii</i>	<i>A. sydowii</i>	NI
	40	<i>A. versicolor</i>	<i>A. jensenii</i>	Abs	Abs
	41	<i>A. versicolor</i>	<i>A. versicolor</i>	NI	NI
Autres <i>Aspergillus</i>	36	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. ochraceus</i>	Abs	NI
	37	<i>A. terreus</i>	<i>A. terreus</i>	<i>A. terreus</i>	<i>A. terreus</i>
	38	<i>A. ustus</i>	<i>A. pseudoustus</i>	<i>A. ustus</i>	<i>A. ustus</i>
	1	<i>A. clavatus</i>	<i>A. clavatus</i>	Abs	Abs

Abs : Absent de la base ; NI : non identifié.

Tableau XXIX. Identifications des dermatophytes par les trois méthodes.

N° souche	Examen mycologique classique	Séquençage ITS1- ITS2	IVD V 2.1	RUO Saramis® V4.10
96	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i>	<i>T. interdigitale</i>	NI
97	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i>	<i>T. interdigitale</i>	<i>T. interdigitale</i>
98	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>Arthroderma vanbreuseghemii</i>	<i>T. interdigitale</i>	NI
99	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>Arthroderma vanbreuseghemii</i>	<i>T. interdigitale</i>	NI
100	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>Arthroderma vanbreuseghemii</i>	<i>T. interdigitale</i>	<i>T. interdigitale</i>
101	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i>	<i>T. interdigitale</i>	<i>T. interdigitale</i>
102	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>Arthroderma vanbreuseghemii</i>	<i>T. interdigitale</i>	<i>T. interdigitale</i>
103	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>mentagrophytes</i>	NI	NI
104	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>Arthroderma vanbreuseghemii</i>	<i>T. interdigitale</i>	<i>T. interdigitale</i>
105	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>
106	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>Arthroderma vanbreuseghemii</i>	<i>T. interdigitale</i>	NI
107	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i>	<i>T. interdigitale</i>	NI
108	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	NI	NI
109	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	NI
110	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>
111	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	NI	NI
112	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum/T. violaceum</i>	NI
113	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	NI
114	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>
115	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>
116	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>
117	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	NI
118	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>
119	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	NI	NI
120	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	NI
121	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum/T. violaceum</i>	<i>Trichophyton</i> sp.
122	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>
123	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>
124	<i>T. schoenleinii</i>	<i>T. schoenleinii</i>	NI	NI
125	<i>T. soudanense</i>	<i>T. soudanense</i>	<i>T. violaceum</i>	Abs
126	<i>T. soudanense</i>	<i>T. tonsurans</i>	<i>T. tonsurans</i>	<i>T. tonsurans</i>
127	<i>T. tonsurans</i>	<i>T. tonsurans</i>	NI	NI
128	<i>T. tonsurans</i>	<i>T. tonsurans</i>	<i>T. tonsurans</i>	NI
129	<i>T. verrucosum</i>	<i>T. verrucosum</i>	NI	NI
130	<i>T. verrucosum</i>	<i>T. verrucosum</i>	NI	NI
131	<i>T. verrucosum</i>	<i>T. verrucosum</i>	NI	NI
132	<i>T. violaceum</i>	<i>T. violaceum</i>	NI	NI
58	<i>M. audouinii</i>	<i>M. audouinii</i>	NI	NI
59	<i>M. audouinii</i>	<i>M. audouinii</i>	NI	NI
60	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>	NI
61	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>	<i>Microsporium</i> sp.
62	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>	NI
63	<i>M. gypseum</i>	<i>M. gypseum</i>	<i>M. gypseum</i>	<i>M. gypseum</i>
64	<i>M. nanum</i>	<i>M. nanum</i>	Abs	Abs
65	<i>M. persicolor</i>	<i>M. persicolor</i>	<i>M. persicolor</i>	NI
52	<i>E. floccosum</i>	<i>E. floccosum</i>	<i>E. floccosum</i>	NI

Abs : Absent de la base ; NI : non identifié.

Tableau XXX. Résultats d'identification par les méthodes utilisées dans notre travail des hyalohyphomycètes autres que les *Aspergillus* sp.

N° souche	Examen mycologique classique	Séquençage ITS1- ITS2	IVD V 2.1	RUO Saramis® V4.10
42	<i>Acremonium roseum</i>	<i>Acremonium tubakii</i>	Abs	Abs
46	<i>Arthrinium</i> sp.	<i>Arthrinium marii</i>	<i>Lecytophora hofmannii</i>	Abs
47	<i>Beauveria</i> sp.	<i>Beauveria pseudobassiana</i>	Abs	Abs
48	<i>Chrysosporium</i> sp.	<i>Chrysosporium articulatum</i>	Abs	<i>Chrysosporium keratinophilum</i>
78	<i>Paecylomyces</i> sp.	<i>Paecylomyces brunneolus</i>	Abs	Abs
79	<i>Paecylomyces</i> sp.	<i>Paecylomyces variotii</i>	NI	NI
95	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	<i>S. brevicaulis</i>	Abs	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>
133	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Abs	Abs
134	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	<i>Sarocladium kiliense</i>	NI
137	<i>Trichothecium roseum</i>	<i>Trichothecium roseum</i>	<i>T. violaceum</i>	Abs
139	<i>Verticillium</i> sp.	<i>Fusarium proliferatum</i>	NI	NI

Abs : Absent de la base ; NI : non identifié.

Tableau XXXI. Identification par MALDI-TOF des champignons non identifiés par la méthode classique.

N° souche	Examen mycologique classique	Séquençage ITS1- ITS2	IVD V2.1	RUO Saramis® V4.10
70	NI	<i>Phialemonium curvatum</i>	Abs	Abs
71	NI	<i>Coniosporum epidermidis</i>	Abs	Abs
72	NI	<i>Lichteimia ramosa</i>	Abs	Abs
73	NI	<i>Sarocladium kiliense</i>	<i>Sarocladium kiliense</i>	Abs
74	NI	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	Abs	Abs
75	NI	<i>Ophiostoma proliferum</i>	<i>Sporothrix shenckii</i>	Abs
76	NI	<i>Stereum hirsutum</i>	Abs	Abs
77	NI	<i>Stereum hirsutum</i>	Abs	Abs

Abs : Absent de la base ; NI : non identifié.

IV.4.3. Comparaison des deux bases de données : IVD V2.1 et RUO V4.10

Avec la base de données IVD V2.1, fermée, nous obtenons 81 identifications sur 139 (58 %), contre 53 (38 %), pour la base RUO V4.10, ouverte. En couplant les 2 bases nous avons 87 identifications (62,6 %) en spectrométrie de masse (Tableau XXXII).

Tableau XXXII. Résultats d'identification en spectrométrie de masse avec les 2 bases, IVD V2.1 et RUO Saramis® V4.10.

N° souche	Examen mycologique classique	IVD V 2.1	RUO Saramis® V4.10
3	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>
4	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>
5	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>
6	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
7	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	NI
8	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
9	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
10	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
11	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	NI
12	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
13	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
14	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
15	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
17	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
18	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
19	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	NI
20	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
24	<i>A. nidulans</i>	<i>A. ustus</i>	<i>A. ustus</i>
25	<i>A. nidulans</i>	<i>A. nidulans</i>	NI
26	<i>A. nidulans</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. nidulans</i>
28	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>
29	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> complexe	<i>A. niger</i> complexe
30	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> complexe	Abs
31	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> complexe	<i>A. niger</i>
32	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>
34	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> complexe	<i>A. niger tubingensis</i>
35	<i>A. niger</i>	Abs	<i>A. sclerotioniger</i>
37	<i>A. terreus</i>	<i>A. terreus</i>	<i>A. terreus</i>
38	<i>A. ustus</i>	<i>A. ustus</i>	<i>A. ustus</i>
39	<i>A. versicolor</i>	<i>A. sydowii</i>	NI
44	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp.
46	<i>Arthrinium</i> sp.	<i>Lecythophora hofmannii</i>	Abs
48	<i>Chrysosporium</i> sp.	Abs	<i>Chrysosporium keratinophilum</i>
49	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Cladosporium cladosporoides</i> complexe	NI
50	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Cladosporium cladosporoides</i> complexe	NI
52	<i>E. floccosum</i>	<i>E. floccosum</i>	NI
53	<i>Exophiala</i> sp.	<i>Exophiala dermatitidis</i>	<i>Exophiala</i> sp.
54	<i>Exophiala</i> sp.	<i>Exophiala dermatitidis</i>	<i>Exophiala</i> sp.
55	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium oxysporum</i> complexe	NI
56	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium solanii</i>	<i>Fusarium solanii</i>
60	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>	NI
61	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>	<i>Microsporium</i> sp.
62	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>	NI
63	<i>M. gypseum</i>	NI	<i>M. gypseum</i>

65	<i>M. persicolor</i>	<i>M. persicolor</i>	NI
73	NI	<i>Sarocladium kiliense</i>	Abs
75	NI	<i>Sporothrix shenckii</i>	Abs
80	<i>Penicillium</i> sp.	<i>P. chrysogenum</i>	NI
82	<i>Penicillium</i> sp.	<i>A. ustus</i>	Abs
83	<i>Penicillium</i> sp.	<i>P. roqueforti</i>	Abs
84	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Rhizopus arrhizus / Fusarium proliferatum</i>	Abs
85	<i>Penicillium</i> sp.	<i>P. chrysogenum</i>	NI
89	<i>Rhizomucor</i> sp.	<i>Lichteimia corymbifera</i>	<i>Lichteimia corymbifera</i>
90	<i>Rhizomucor. pusillus</i>	Abs	<i>Rhizomucor pusillus</i>
91	<i>S. apiospermum</i>	<i>P. boydii</i>	<i>P. boydii</i>
92	<i>S. apiospermum</i>	<i>P. boydii</i>	<i>P. boydii</i>
93	<i>S. apiospermum</i>	<i>P. boydii</i>	<i>P. boydii</i>
95	<i>S. brevicaulis</i>	Abs	<i>S. brevicaulis</i>
96	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	NI
97	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	<i>T. interdigitale</i>
98	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	NI
99	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	NI
100	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	<i>T. interdigitale</i>
101	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	<i>T. interdigitale</i>
102	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	<i>T. interdigitale</i>
104	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	<i>T. interdigitale</i>
105	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>
106	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	NI
107	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T.interdigitale</i>	NI
109	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	NI
110	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>
112	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum / T. violaceum</i>	NI
113	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	NI
114	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>
115	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>
116	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>
117	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	NI
118	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i> 80,3 %
120	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	NI
121	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum / T. violaceum</i>	<i>Trichophyton</i> sp.
122	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>
123	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>
125	<i>T. soudanense</i>	<i>T. violaceum</i>	Abs
126	<i>T. soudanense</i>	<i>T. tonsurans</i>	<i>T. tonsurans</i>
128	<i>T. tonsurans</i>	<i>T. tonsurans</i>	NI
134	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Sarocladium kiliense</i>	NI
136	<i>Trichosporon</i>	Abs	<i>Trichosporon</i> sp.
137	<i>Trichothecium roseum</i>	<i>T. violaceum</i>	Abs

Abs : Absent de la base ; NI : non identifié.

IV.5. Résultats statistiques

Pour évaluer la performance de la spectrométrie de masse dans l'identification des champignons filamenteux nous avons calculé le coefficient de concordance (Cc) et le coefficient Kappa. Cc est égal à la somme des résultats concordants sur le nombre total d'exams. Il s'exprime par un nombre entre 0 et 1, mais comporte une part due au hasard. Voilà pourquoi nous utilisons aussi le coefficient Kappa qui exprime la concordance réelle, en éliminant la part due au hasard, par un nombre compris entre -1 et +1. Un coefficient Kappa proche de -1 signifie une discordance complète. S'il est proche de 0, il signifie une concordance moyenne due au hasard. Un coefficient Kappa proche de +1 signifie une concordance absolue. En biologie, un coefficient Kappa correct entre deux techniques doit être supérieur à 0,8. Ceci permet alors d'accepter la méthode évaluée pour une utilisation en biologie médicale.

IV.5.1. Comparaison examen mycologique classique au séquençage

Nous comparons ici la technique mycologique classique utilisée en routine au gold standard le séquençage de l'ADN ribosomal. Nous obtenons 122 identifications correctes au genre sur 139, ce qui correspond à un coefficient de concordance de 0,88 et à un coefficient Kappa de 0,85.

Dans un second temps, en considérant l'identification au niveau de l'espèce, nous obtenons seulement 67 identifications correctes sur 139. Nous avons alors un coefficient de concordance de 0,48 et un coefficient Kappa de 0,33. Ce résultat montre la nécessité d'une amélioration des méthodes utilisées en routine.

IV.5.2. Comparaison de la spectrométrie de masse au séquençage

En considérant tous nos champignons sélectionnés, nous identifions correctement 56 champignons sur 139 avec la base IVD V2.1 en spectrométrie de masse. Nous obtenons un coefficient de concordance à 0,40 et un coefficient Kappa à 0,3. Avec la base RUO Saramis[®] V4.10, nous avons 37 identifications concordantes sur 139, soit un coefficient de concordance de 0,26, et un coefficient Kappa de 0,18.

Afin d'évaluer la base de données IVD V2.1, nous allons considérer uniquement les champignons de notre sélection contenus dans cette base. Les résultats s'améliorent. Le coefficient de concordance Cc est de 0,64 (55 identifications concordantes sur 86) et le coefficient Kappa à 0,56.

En prenant le groupe des *Aspergillus* sp., nous avons 26 échantillons, 23 sont identifiés avec succès, nous obtenons un coefficient de concordance de 0,88 et un coefficient Kappa de 0,81.

Pour les dermatophytes, en s'intéressant seulement à ceux contenus dans la base, nous obtenons 23 identifications concordantes, entre la spectrométrie et le séquençage, sur 33 identifications. Le coefficient de concordance est de 0,61 et le coefficient Kappa de 0,52.

V. Discussion

V.1. Autres systèmes disponibles de spectrométrie de masse

Il est important de comparer notre spectrométrie de masse Vitek-MS[®] aux autres modèles existants sur le marché. Actuellement trois systèmes concurrents sont disponibles, avec des protocoles de préparation des colonies, des bases de données et des algorithmes d'analyse qui leur sont propres.

La principale limite de la méthode MALDI-TOF est la base de données. Suivant son mode de construction nous pouvons identifier ou non les champignons sélectionnés. Pour notre travail, notre souhait était de tester les performances de la base de la société Biomérieux[®] IVD V2.1 qui sera bientôt commercialisée. Des données bibliographiques font part de bons résultats d'identification des champignons filamenteux mais avec d'autres systèmes. De plus les bases utilisées sont souvent de création « maison ». Ce fait est d'une grande praticabilité mais demande un travail conséquent. Il nécessite d'avoir à disposition un grand nombre de souches, de les repiquer régulièrement sur des milieux différents et à température différente. Une identification par biologie moléculaire est essentielle. Ensuite il faut obtenir suffisamment de spectres et de super spectres par souche pour les retenir comme spectres de référence pour l'espèce testée.

V.1.1. Base Bruker[®]

La société Bruker commercialise la base de données des spectres Maldi Biotyper DB[®]. Cette base, marquée CE-IVD, est une base fermée. Les résultats, issus de l'analyse par le logiciel Biotyper[®], sont exprimés en log score allant de 0 à 3, qui correspondent à une similitude avec les spectres de la base de données allant de 0 à 100 %. Le calcul de ce score tient compte de la concordance des pics (même rapport m/z) et de la corrélation d'intensité entre les pics similaires.

Trois niveaux d'identification sont établis : un log score inférieur à 1,7 correspond à une absence d'identification ; un log score compris entre 1,7 et 2 correspond à une identification au niveau du genre ; un log score supérieur ou égal à 2 correspond à une identification au niveau de l'espèce.

Pour chaque dépôt, les deux premières propositions sont d'emblée visibles. Il est possible de visualiser les 8 autres propositions suivantes. Cependant, certains

utilisateurs retiennent des seuils différents validés par leur laboratoire pour l'identification. Ainsi, si un des dépôts présente une identification avec un premier log score supérieur à 2 ou supérieur à 1,7 associé à trois propositions successives identiques, le résultat est validé s'il n'y a pas de discordances avec le deuxième dépôt. L'absence d'identification ou une identification complètement improbable avec un log score inférieur à 1,6 n'est pas considérée comme une discordance mais comme une non-identification.

Selon les données bibliographiques, le MicroFlex[®] (Bruker Daltonics Inc.) permet une identification correcte des champignons filamenteux. En effet, une équipe italienne a obtenu des pourcentages d'identifications proches de 100 % pour les *Aspergillus* sp. et les *Fusarium* sp. avec une distinction précise dans la section Fumigati des *Aspergillus* et dans le complexe *Fusarium solanii* (De carolis et al., 2012). Cependant ces résultats s'obtiennent après une construction « maison » de la base de données.

Concernant la réalisation de la manipulation, la société Bruker[®] préconise un dépôt selon la méthode « smear ». Une partie de colonie d'une culture fraîche (18 à 48 h) est déposée et étalée dans le puits en une fine couche, un μL de matrice (acide α cyano 4 hydroxycinnamic) est déposé, le dépôt est laissé à sécher à l'air libre.

V.1.2. Base Andromas[®]

Le logiciel Andromas[®] comprend trois bases de données distinctes : une base de bactéries, une base de levures et *Aspergillus* et une base pour les mycobactéries. Chaque spectre contenu dans les bases a été obtenu à partir de dix souches représentatives de l'espèce considérée, seuls les pics ayant une intensité supérieure à 7 % de l'intensité du plus haut pic sont retenus comme significatifs. Les souches sont cultivées dans des conditions différentes, sur des milieux différents pour augmenter la robustesse de la méthode. Les résultats d'identification sont donnés en pourcentage de similitude entre le spectre de l'échantillon et un spectre de référence de la base de données.

Une « bonne identification » correspond à un pourcentage de similarité supérieur ou égal à 65 % avec au moins 10 % de différence avec une autre espèce. Pour la méthode de dépôt chez Andromas[®], il est recommandé de déposer 1 μL d'alcool absolu et laisser sécher avant d'ajouter de la matrice. L'extraction est réalisée par le mélange acétonitrile et acide formique. Une colonie est mise en

suspension dans un tube Eppendorf[®] contenant 300 µL d'eau distillée. Neuf cent microlitres d'éthanol absolu sont ajoutés et le mélange est vortexé. Après une centrifugation de 2 minutes à 13000 g, le surnageant est rejeté. Afin d'éliminer au maximum la solution alcoolique, le culot est à nouveau centrifugé 30 secondes à 13000 g et le surnageant est enlevé à l'aide d'une pipette. Le culot est ensuite remis en suspension dans 50 µL d'acide formique à 70 % et 50 µL d'acétonitrile. Après un temps de contact de 15 minutes environ, entre la solution d'extraction et le culot, une dernière centrifugation de 2 minutes à 13000 g est réalisée.

V.1.3. Bases « maison »

Avec les systèmes Bruker[®] et Andromas[®], de nombreuses équipes développent leur propres bases de données de champignons filamenteux.

Pour les *Fusarium* sp., une base fut construite avec le système Bruker[®], l'équipe a identifié 57 isolats sur 62 (91,9%) (Marinach-Patrice et al., 2009). Les auteurs précisent que les espèces non contenues dans la base n'ont pu être identifiées.

Une équipe parisienne a pu avec Andromas[®], obtenir de bons résultats d'identification de dermatophytes à partir de sa propre base (Alshawa et al., 2012). Ces auteurs ont constitué une base à partir de spectres provenant de 12 espèces différentes de dermatophytes habituels et plus rares, et des *Neoscytalidium* sp. Ainsi, ils ont identifié 331 dermatophytes sur 360 (91,9 %) et 18 *Neoscytalidium* sp. sur 21 (85,7 %). Ce travail est cependant très lourd et ne peut pas être réalisé par tous les laboratoires.

V.1.4. Facteurs influençant les résultats obtenus avec le Vitek MS[®]

De nombreux facteurs influençant la technique MALDI-TOF de spectrométrie de masse, l'identification protéomique peut alors en être altérée. Différents procédés existent pour récupérer la colonie de champignons. Cette étape peut être délicate pour les champignons rugueux, très adhérents à la gélose ou pour les Mucorales très aériens. En effet dans ces cas, le prélèvement par écouvillonnage est trop aléatoire. Pour remédier à cet inconvénient, il est possible de découper un morceau de colonies avec un scalpel. Ensuite, il faut le broyer au fond du tube Eppendorf[®].

L'âge de la culture peut modifier les spectres obtenus avec la technique MALDI-TOF. Dans ce cas nous passons à côté du spectre de référence enregistré dans la base de données et n'obtenons pas d'identification.

Le milieu de culture peut apporter des molécules particulières qui altéreront les spectres. Les milieux de Sabouraud sont préconisés. Dans le cas où nous avons des colonies sur des milieux BHI ou malt, nous les avons repiquées sur des milieux de Sabouraud-chloramphénicol.

La préparation de l'échantillon consiste pour les champignons filamenteux comme pour les levures à une étape d'extraction des protéines. Si une étape est oubliée, l'extraction ne sera pas parfaite et l'identification ne sera pas faite.

Ensuite vient le choix de la matrice, la plus utilisée est la CHCA, elle permet un dépôt homogène. Une autre matrice d'utilisation plus récente, l'acide sinapique, permet l'analyse de protéines de plus haut poids moléculaire que le CHCA et le DHB.

La technique de dépôt de l'échantillon à tester peut être différente selon les automates utilisés. Avec le Vitek-MS[®], l'étape d'évaporation à l'air libre est importante et ne doit pas être accélérée par une ventilation quelconque. Si le dépôt est trop sec il se détachera de la cible VITEK-MS-DS[®]. De plus, le dépôt doit être réalisé correctement sans déborder les limites du puits. La quantité déposée est standardisée si nous suivons le protocole filamenteux de la société Biomérieux[®] : 1 µL d'échantillon sur chaque puits. Un dépôt en double est préconisé pour optimiser les chances d'obtenir une identification.

Contrairement aux autres systèmes, le temps de contact n'est pas préconisé par la société Biomérieux[®]. Un microlitre de la suspension d'extrait protéique est déposé sur la cible de la plaque en acier non oxydable. Après séchage à l'air libre du dépôt, 1 µL de matrice CHCA est ajouté sur la cible et le dépôt est séché à l'air libre. Le temps écoulé entre la préparation de l'échantillon et le passage sous le laser dans l'automate doit être inférieur à 2 heures. Nous avons respecté ce délai tout au long de notre travail, malgré un nombre important d'échecs. Le protocole nécessite sans doute certaines améliorations.

Différentes causes d'échecs sont connues. De la plus simple, comme l'oubli de déposer un échantillon, à d'autres plus complexes, telles une contamination ou l'oubli de l'ajout de la matrice. Un dépôt d'un microlitre de matrice est obligatoire sur chaque échantillon. A noter que les cibles VITEK-MS-DS[®]. De plus, le dépôt doit être réalisé correctement sans déborder les limites du puits sont à usage unique, et il

faut travailler avec des gants non poudrés lors des dépôts d'échantillons ainsi que pour le chargement de la cible dans l'automate.

La nature du prélèvement peut engendrer des erreurs d'identification. Notamment les prélèvements contenant de multiples micro-organismes comme les selles ou les prélèvements respiratoires.

La reproductibilité repose sur la méthode, la construction de la base de données, le milieu de culture et l'âge de la culture. Une standardisation est nécessaire pour une utilisation fiable, précise et homogène en routine (Normand et al., 2013). Les méthodes actuelles ne peuvent être utilisées que sur des cultures d'au moins 24 heures.

V.2. Autres méthodes de biologie moléculaire

D'autres méthodes de biologie moléculaire existent. En effet nous avons séquencé les régions ITS1-2 et Bt2a-Bt2b. Nous aurions pu choisir d'autres amorces comme le facteur d'élongation. Ce dernier est bien utilisé pour l'identification des *Fusarium* sp. La méthode de référence pour obtenir une identification sûre repose sur le séquençage. Mais d'autres méthodes comme, la RAPD (Random amplification Polymorphic DNA) sont abandonnées, ou bien en cours d'évaluation comme la RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) et l'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (De baere et al., 2010).

Des PCR en temps réel sont développées, elles permettent un diagnostic direct rapide, notamment pour les *Aspergillus* sp. (Suarez et al., 2008), et certains dermatophytes (Paugam et al., 2013). Avec ce type de méthode, nous devons savoir ce que nous voulons mettre en évidence. Ceci ne répond donc pas à notre problématique de pouvoir identifier des champignons filamenteux en culture. De plus, les kits commerciaux sont rares et sont validés uniquement pour les sérums et les LBA.

V.3. Avantages et inconvénients : coût et durée des analyses

Les coûts suivants s'entendent hors temps de personnel, équipement et maintenance. Le coût du séquençage d'un échantillon comprenant l'extraction d'ADN, les 2 PCR, les 2 purifications de PCR et le passage sur l'automate revient à 9,50 euros par échantillon. L'identification est faite en 2 jours dans la plupart des cas. L'identification peut être faite dès l'apparition d'une colonie mycologique.

Pour la spectrométrie de masse MALDI-TOF, nous passons à une identification en 3 heures mais à partir d'une culture de 3 jours minimum ou plus. Bien sûr le coût est quant à lui dérisoire à côté de la biologie moléculaire, tant en réactif qu'en temps technicien. L'évaluation du coût d'une identification par le Vitek-MS[®] est de l'ordre d'un euros.

La gestion informatique est essentielle, nécessitant une habilitation initiale associée à de fréquentes mises à jour au cours de l'utilisation du Vitek-MS[®] et de ces différents logiciels.

V.4. Résultats

V.4.1. Séquençage

En comparant les résultats de la méthode classique aux résultats du séquençage. Nous avons un coefficient de concordance Cc de 0,48 et un coefficient Kappa de 0,33. Ce résultat montre la nécessité d'une amélioration des méthodes d'identification standards. Mais il est justifié du fait que l'œil ne peut malheureusement pas identifier les champignons jusqu'à l'espèce pour un grand nombre d'entre eux. D'autant plus s'il faut essayer de rendre rapidement un résultat.

Pour cinq champignons, après revue des cultures et des caractères microscopiques, c'est la biologie moléculaire qui était le plus proche de la clinique et des aspects mycologiques. Il s'agit d'un *T. tonsurans* confondu avec un *T. soudanense*, un *Fusarium proliferatum* confondu avec un *Verticillium* sp., un *Rhizomucor* sp. rendu pour un *Lichteimia corymbifera*, et un *Alternaria* sp. confondu avec un *Pithomyces chartarum*.

Enfin, l'apport de la biologie moléculaire pour l'identification des champignons non identifiés par les caractères phénotypiques est indéniable. Tous ont pu être identifiés et des diagnostics de mycoses ont pu être revus. En effet considérés

comme des contaminants, certains de nos champignons non identifiés apparaissent être les pathogènes responsables. C'est le cas d'un *Neoscytalidium dimidiatum* (n° 74), et d'un *Cladosporium* sp. rencontré dans un prélèvement de phanère qui s'avère être un *Phialophora europaea*, potentiel pathogène de la peau.

V.4.2. Spectrométrie de masse

Concernant le Vitek-MS[®], la base IVD V2.1 ne comporte pas certains champignons de notre sélection de champignons filamenteux (Tableau XXXIII), notamment les formes téléomorphes, et beaucoup d'espèces aspergillaires.

Tableau XXXIII. Liste de nos champignons non contenus dans la base IVD V2.1

Espèce	Espèce
<i>Acremonium roseum</i>	<i>Mucor plumbeus</i>
<i>Acremonium tubakii</i>	<i>Rhizomucor pusillus</i>
<i>Aspergillus amstelodami</i>	<i>Microsporium nanum</i>
<i>Aspergillus awamorii</i>	<i>Trichophyton soudanense</i>
<i>Aspergillus calidoustus</i>	<i>Trichoderma citrinoviridae</i>
<i>Aspergillus clavatus</i>	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
<i>Aspergillus glaucus</i>	<i>Trichothecium roseum</i>
<i>Aspergillus jensenii</i>	<i>Trichosporon caseorum</i>
<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Penicillium cecidicola</i>
<i>Aspergillus pseudoglaucus</i>	<i>Penicillium corylophyllum</i>
<i>Aspergillus pseudoustus</i>	<i>Penicillium commune</i>
<i>Aspergillus sclerotioniger</i>	<i>Penicillium islandicum</i>
<i>Aspergillus tubingensis</i>	<i>Penicillium simplicissimum</i>
<i>Arthrinium marii</i>	<i>Paecilomyces brunneolus</i>
<i>Arthrographis kalrae</i>	<i>Phialemonium curvatum</i>
<i>Beauveria pseudobassiana</i>	<i>Phialophora europaea</i>
<i>Chrysosporium articulatum</i>	<i>Ophiostoma proliferum</i>
<i>Coniosporium epidermidis</i>	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>
<i>Lichteimia ramosa</i>	<i>Stereum hirsutum</i>

Cinquante et un champignons (36,7 %) ne sont pas identifiés dans aucune des 2 bases de données utilisées avec la spectrométrie de masse. Devant ce résultat, notre engouement pour une technique d'identification se tournera vers la biologie moléculaire, plus difficile en termes de réalisation, mais comportant moins de risques en nombre de non identifications.

V.4.3. Comparaison spectrométrie de masse et séquençage

Statistiquement, nous obtenons un coefficient de concordance Cc à 0,45 et un coefficient Kappa à 0,49. Ceci n'est pas acceptable pour choisir la spectrométrie de masse.

En se limitant au groupe des *Aspergillus* sp., nous obtenons un coefficient de concordance Cc à 0,88 et un coefficient Kappa à 0,81. Ce dernier résultat permet cependant d'utiliser la méthode MALDI-TOF avec le Vitek-MS[®] pour l'identification des *Aspergillus* sp. Hormis un manque de précision parmi les sous espèces d'*A. niger*, la base de données apparaît robuste pour le genre *Aspergillus*. La méthode s'applique aisément aux cultures précoces d'*Aspergillus* sp., faciles à prélever.

Pour les dermatophytes, le coefficient de concordance Cc est à 0,61 et le coefficient Kappa à 0,52, ce qui ne permet pas d'accepter l'identification par MALDI-TOF pour les dermatophytes, du moins avec la base de données existante.

En analysant les résultats, nous observons des identifications incorrectes. Même si la base de données ne contient pas de spectres de référence pour comparer les spectres obtenus à partir de champignons, nous obtenons des résultats d'identification. Ces résultats sont erronés et peuvent induire en erreur la personne qui récupère les données. Nous allons discuter brièvement de ces erreurs d'identification.

V.4.4. Erreurs d'identification

Tout d'abord le plus surprenant est la double identification donnée par la spectrométrie à deux reprises pour deux *T. rubrum*. Le résultat donne le choix à 50 % pour un *T. rubrum* et 50 % pour un *T. violaceum*, ceci lors du même passage et de façon répétée. De même pour un *Penicillium*, nous avons eu comme résultat 50 % *Rhizopus arrhizus* et 50 % *Fusarium proliferatum*. Pour réussir à obtenir une identification correcte donnant un seul champignon, il faut donc procéder à des repiquages, et à un délai plus long, avec un risque majoré de contamination de la souche de départ. En biologie moléculaire, nous n'avons pas rencontré ce genre de phénomène.

Aussi, il faut retenir l'identification par spectrométrie d'un *Aspergillus ustus*, alors qu'il s'agissait d'un *Penicillium* sp. facilement identifiable en microscopie

classique au niveau du genre. Le pouvoir discriminant au sein du groupe des moisissures contaminantes n'est pas encore optimal.

Une erreur frappante se voit aussi pour l'identification d'un *T. rubrum* qui est un *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*. En principe, l'œil arrive à distinguer facilement ces 2 espèces. De plus, le MALDI-TOF a identifié un *T. violaceum* à la place d'un *T. soudanense*. Cette erreur peut s'expliquer par l'absence de *T. soudanense* dans la base de données. Mais il serait plus juste de n'avoir aucun résultat d'identification que d'obtenir un résultat erroné. Ce type d'erreur se retrouve pour un *Tricothecium roseum* (absent de la base de données IVD V2.1) identifié comme un *T. violaceum* par spectrométrie. De même pour *Trichoderma citrinoviride* (absent de la base de données IVD V2.1) identifié comme un *Sarocladium kiliense*.

Il y a une erreur dans un complexe d'espèces. En effet, un *P. boydii* a été identifié à la place d'un *S. apiospermum* dans un sinus (n°93).

Des résultats médiocres concernent l'identification des dématiés par spectrométrie de masse. Des données bibliographiques discutent du rôle du pigment noir des phaeohyphomycètes dans la baisse d'efficacité de la technique MALDI-TOF, par rapport aux champignons hyalins (Buskirk et al., 2011).

Nous avons été alertés devant l'identification par spectrométrie d'un *Sporothrix shenckii* provenant d'un échantillon de phanère. La biologie moléculaire a permis l'identification d'un *Ophiostoma proliferum*. En effet, *Ophiostoma* est la forme sexuée de *Sporothrix*.

La spectrométrie de masse n'est donc pas encore assez performante pour un usage de routine.

Si nous avions eu le temps de créer notre propre base de données, nous aurions pu présenter des résultats d'identification meilleurs (Pacqueu et al., 2013). En effet, nous aurions pu incorporer les formes anamorphes et téléomorphes de chaque espèce. Nous aurions tenté de créer les spectres d'espèces pléomorphiques. Ceci aurait dû être réalisé sur des milieux de cultures différents et à des temps différents.

En identifiant au niveau de l'espèce, nous avons découvert des champignons ayant des similarités avec ceux identifiés quotidiennement, mais comportant des caractères bien particuliers. C'est le cas de l'*Aspergillus sclerotioniger*, qui nous est apparu comme un *A. niger* à l'identification microscopique. Cependant, les caractères macroscopiques ne ressemblaient en rien aux têtes conidiennes noires. Celles-ci étaient de couleur beige clair à jaune. Le temps de culture était plus long qu'un *A. niger*. Il en est de même pour *A. jenssenii* et *A. sydowii* que nous avons

identifiés en microscopie comme des *A. versicolor*. Ils appartiennent au même groupe Versicolores. *Aspergillus jenssenii* est un contaminant de l'air retrouvé aux USA, notamment dans le Montana. Les conidies possèdent une paroi rugueuse. Le temps de culture est d'environ 10 jours à 25°C. Il n'y a pas de croissance à 37°C. Le pigment est jaune brun à rouge brun. Cet aspergillus possède une caractéristique microscopique qui peut tromper l'œil et orienter vers un autre type de champignon. Les têtes peuvent être fragmentées comme un *Penicillium*. Elles sont ici en général piriformes ou rarement sphériques.

De même pour les *Aspergillus* de la section Nigri, il est impossible de différencier un *A. tubingensis* d'un *A. awamorii*. La phénotypie de ces espèces diffère par d'infimes caractéristiques que l'œil ne peut pas distinguer (Samson et al., 2007b). Plusieurs espèces sont capables de produire des sclérotés, ce sont *A. carbonarius*, *A. ellipticus*, *A. aculeatus*, *A. costaricensis*, *A. piperis*, *A. sclerotioniger*, *A. aculeatinus* et *A. sclerotii carbonarius*. Pour *A. sclerotii carbonarius*, l'aspect macroscopique est remarquable : il produit des sclérotés jaunes-oranges et le revers des colonies est jaune. En revanche, les autres espèces, dont *A. niger*, ne peuvent pas être distinguées par leur caractéristiques macro ou microscopiques. Avec *A. glaucus* nous sommes confrontés au même problème, la méthode de référence identifie *A. amstelodami*.

C'est dans le groupe des *T. mentagrophytes* où l'on rencontre le plus d'imprécisions d'identification. En effet nous avons identifié plusieurs fois la forme téléomorphe, *Arthroderma vanbreuseghemii* contenue dans la base de données Saramis[®] V4.10 mais pas dans la base IVD V.2.1. Toutefois, il n'y a pas de conséquences thérapeutiques dans ces cas-là.

V.4.5. Non identifications

Les non identifications sont fréquentes avec le Vitek-MS[®], et dans tous les genres de champignons (Tableaux XVII p. 64 et XXVI p. 69). Pour de simples contaminants comme les *Penicillium* sp., les bases de données ne les identifient pas tous. Cependant, nos résultats montrent des identifications correctes par MALDI-TOF, la méthode est donc applicable aux filamenteux, mais en s'assurant que la base de données soit complète en champignons d'intérêt médical.

V.4.6. Identifications de champignons non identifiés au laboratoire par macro et microscopie

Grâce à la biologie moléculaire nous avons identifié des champignons jamais identifiés auparavant dans le laboratoire. L'examen mycologique classique ne permet pas certaines distinctions phénotypiques. De plus parmi ces champignons, certains sont de nouveaux pathogènes.

Nous avons identifié 2 *Exophiala* sp. (Tableau XXXIV). Les espèces d'*Exophiala* sp. (Hee et Youn, 2002) sont difficilement identifiables du fait de leur variabilité morphologique et de l'adaptabilité des caractères physiques aux modifications de l'environnement.

Tableau XXXIV. Caractéristiques des deux souches d'*Exophiala* sp.

N° souche	Origine des échantillons	Examen mycologique classique	Séquençage de la région ITS1-ITS2	IVD 2.1	RUO Saramis® V4.10
53	Hémoculture	<i>Exophiala</i> sp.	<i>Exophiala dermatitidis</i>	<i>Exophiala dermatitidis</i>	<i>Exophiala</i> sp.
54	EB	<i>Exophiala</i> sp.	<i>Exophiala dermatitidis</i>	<i>Exophiala dermatitidis</i>	<i>Exophiala</i> sp.

EB : Expectoration bronchique.

Ces champignons dimorphiques appartiennent actuellement aux champignons dits en émergence. La fréquence d'identification augmente, car nous savons de plus en plus les identifier, à l'aide de la biologie moléculaire et de la spectrométrie de masse. En effet, il n'y a pas eu de problème d'identification des *Exophiala* avec le MALDI-TOF pour notre série. Le genre *Exophiala* est présent dans les pays tropicaux et tempérés. Nous le rencontrons dans le sol, les plantes, l'eau et le bois en décomposition. La contamination survient à la suite d'un traumatisme cutané. Deux espèces prédominent, *E. jeanselmei* et *E. dermatitidis*. Macroscopiquement, les *Exophiala* sp. ressemblent à des levures, avec des colonies humides, brunâtres à verdâtres. La texture de la colonie devient finalement veloutée en raison du développement des hyphes courts grisâtres et aériens. Microscopiquement, pour les cultures jeunes, il y a des cellules levuriformes, subsphériques formant des chaînes. En vieillissant, il y a formation d'annélides à partir des hyphes. Ces dernières sont tubulaires, en forme de fusée et se rétrécissent pour former une pointe étroite et allongée. Des conidies unicellulaires, ellipsoïdales sont produites à partir des annélides. Les conidies se regroupent en amas au sommet des annélides. En sachant identifier les espèces d'*Exophiala* sp., nous pourrions améliorer les bilans

épidémiologiques, et voir si la tendance de l'augmentation de leur fréquence se confirme au CHU de Limoges.

Chez une patiente présentant une onychomycose douloureuse du 3^{ème} orteil droit avec un épaissement de la tablette et une leuconychie, nous avons identifié de façon classique un *Fusarium* sp. et par biologie moléculaire un *Coniosporum epidermidis* (Tableau XXXV) (Li et al., 2008b). Ce dernier est un phaeohyphomycète, à l'origine de macules noires des pieds, et souvent considéré comme un contaminant. *Conidiosporum epidermidis* est fréquemment isolé dans les prélèvements dermatologiques au Danemark. C'est un champignon à croissance lente, notamment à 25° C. Cependant la croissance peut être stimulée par une température à 37° C et des rayons ultra-violets. Ceci expliquerait la difficulté à identifier ce champignon avec les conditions standards de culture au laboratoire. Les colonies sont brunes avec un revers noir. Les filaments septés sont noir-olive et forment des arthroconidies comportant des cloisons transversales.

En se basant sur les séquences d'ADN ribosomal SSU, *C. epidermidis* se situe dans le groupe d'espèces de *Phialophora europaea* et de *Cynellophora laciniata*.

Tableau XXXV. Caractéristiques de l'isolement de *Coniosporum epidermidis*.

Origine de l'échantillon	Examen mycologique classique	Séquençage Bt2a-Bt2b	VITEK 2.1.1	RUO Saramis® V4.10
Ongle pied	NI	<i>Coniosporum epidermidis</i>	Abs	Abs

Abs : Absent de la base ; NI : non identifié.

Un *Cladosporium* sp. s'est révélé être un *Phialophora europaea*, potentiellement pathogène. Nous avons donc rétabli un diagnostic, confirmant une onychomycose. Ce champignon à croissance lente produit en faible abondance des cellules conidiogènes.

Le genre *Pithomyces* contient une quinzaine d'espèces. Nous les rencontrons dans le sol. Ces champignons sont souvent pathogènes pour le blé (Toth et al., 2007). Ils produisent des mycotoxines responsables de photosensibilité et d'eczéma facial des moutons et d'autres herbivores. Les colonies sont de croissance rapide, de couleur claire au début et brune avec le temps. Les conidies sont largement elliptiques, piriformes et verruqueuses. Elles comportent un élément caractéristique, le cloisonnement transversal et longitudinal. Le diagnostic microscopique ne pouvait pas discriminer un *Alternaria*, ni un *Ulocladium* d'un *Pithomyces*.

Phialemonium curvatum est actuellement dit champignon « émergent ». Il est rencontré dans des infections fongiques invasives de type fongémie sur cathéter ou endocardite (Rivero et al., 2009). Macroscopiquement il présente des colonies de couleur blanche, plates, étalées et humides, sans mycélium aérien. Microscopiquement, nous pouvons observer des phialides intercalaires et latérales. Les conidies unicellulaires sont claires à paroi lisse. Elles deviennent jaunes avec le temps. Dans notre sélection, il s'agit d'un champignon non identifié par la méthode classique, il provient d'un lavage broncho-alvéolaire.

Sarocladium kiliense antérieurement dénommé *Acremonium kiliense* est un champignon rencontré dans le sol. Pathogène du maïs, il devient un pathogène humain opportuniste. Ce genre *Sarocladium* est très proche du genre *Acremonium* (Summerbell et al., 2011). Il n'existe pas de forme téléomorphe associé au groupe *Sarocladium*. Nous l'avons identifié dans un prélèvement de squames chez un patient présentant un érythème annulaire centrifuge. Le diagnostic dermatologique est un lupus.

Revenons sur l'identification d'*Ophiostoma proliferum* par séquençage d'un champignon classé non identifiable par la méthode classique. En spectrométrie avec la base IVD V2.1 nous avons trouvé *Sporothrix schenckii* qui nous paraissait invraisemblable compte tenu de l'examen clinique qui n'était pas en faveur d'une sporotrichose. En comparant avec les données de la biologie moléculaire, et après revue de la bibliographie, nous allons comprendre ce résultat. Le genre *Ophiostoma* inclus de nombreuses espèces pathogènes du bois et des insectes. Des espèces de *Sporothrix* sp., également trouvées dans le bois, sont associés morphologiquement à certaines espèces d'*Ophiostoma*, mais sont distinctes du point de vue phylogénétique (Aghayeva et al., 2004). En médecine tropicale, la sporotrichose est une maladie dermato-lymphangitique touchant principalement les membres et se présentant par des lésions uniques, verruqueuses ou en plaques. L'aspect clinique et le contexte épidémiologique sont fortement évocateurs. La sporotrichose pulmonaire peut évoquer une tuberculose. Le champignon se rencontre dans le sol et les plantes vivantes ou pourries. Il est introduit le plus souvent à la suite de traumatismes telluriques. *Sporothrix schenckii* est un champignon dimorphique qui ne représente plus la seule espèce en cause. On trouve *S. globosa* de façon cosmopolite, mais aussi *S. brasiliensis* et *S. mexicana* localement. L'examen direct montre habituellement des levures de petite taille pouvant prendre l'aspect de « corps en cigare » mesurant 2 à 3 µm sur 3 à 10 µm. La culture mycologique est en principe

facile et rapide. La microscopie met en évidence des conidies en bouquets insérées sur le filament et des macrospores triangulaires. Il convient dans ce cas de retenir l'identification moléculaire plus proche d'un champignon contaminant que d'une véritable sporothrichose.

Stereum hirsutum est un champignon pathogène des feuillus en Limousin. Nous l'avons trouvé dans une expectoration bronchique et dans un ongle. Nous pouvons le considérer comme un contaminant des prélèvements car aucune mycose humaine due à ce champignon n'a été rapportée jusqu'à présent, à notre connaissance.

V.4.7. Spectrométrie de masse versus examen mycologique classique

Si nous comparons la méthode classique et la nouvelle méthode, à savoir la spectrométrie de masse, par rapport à la méthode de référence le séquençage, nous obtenons dans les 2 méthodes des identifications erronées. Nous avons vu précédemment des erreurs au niveau de l'espèce, comme avec les *Aspergillus* sp. (Tableau XXVIII). L'orientation épidémiologique et thérapeutique peut être modifiée.

Avec la méthode classique, nous pouvons identifier beaucoup de champignons mais rarement jusqu'à l'espèce précise ou la sous espèce. Avec la spectrométrie nous pouvons être très précis dans l'identification, mais nous sommes dépendants de la composition de la base de données. Ainsi, nous avons pu identifier moins de champignons filamenteux qu'avec la méthode classique.

En s'intéressant uniquement à des groupes de champignons comme nous l'avons décrit dans la partie « IV.5 Résultats statistiques », il semblerait que la spectrométrie soit en bonne voie pour être utilisée au laboratoire de mycologie pour les *Aspergillus* sp.

VI. Conclusion

Notre travail consistait à évaluer les nouvelles méthodes d'identification des champignons filamenteux à disposition du laboratoire de mycologie du CHU de Limoges. L'examen macro et microscopique donne à ce jour de bons résultats mais des limites existent. Les limites portant sur la détection au niveau de l'espèce peuvent être améliorées par la spectrométrie de masse. Au niveau de la technique, la spectrométrie de masse apparaît facile et peu coûteuse. Cependant, il faut définir une procédure rigoureuse avec notamment les temps d'attente entre chaque étape et redéfinir le délai maximum de réalisation qui est actuellement de 2 heures.

Selon nos résultats, le séquençage de l'ADN fongique a sa place au laboratoire de mycologie. En effet, il a permis le diagnostic étiologique de certaines mycoses, profondes ou superficielles. Bien entendu, son développement en routine peut sembler monumental. En fait, il suffit de préciser les conditions dans lesquelles nous devons recourir au séquençage. Il va de soi que nous ne chercherons pas à identifier au rang de l'espèce tous les *Penicillium* et autres contaminants. L'utilisation de cette méthode doit donc se limiter à l'identification des champignons isolés lors d'infections invasives, à savoir les aspergillooses invasives, les scédosporioses, les mucormycoses, les fusarioses, ainsi que les phaeohyphomycoses (Figure 17). La conduite à tenir serait de continuer à utiliser le Vitek-MS[®] en mode IVD lorsque la base V2.1 sera commercialisée pour les *Aspergillus* sp. et les *Fusarium* sp. Ceci en parallèle du séquençage afin d'évaluer sur un plus grand nombre d'échantillons la technique MALDI-TOF avec le Vitek-MS[®] pour les champignons filamenteux. Ainsi, au fur et à mesure de l'enrichissement des bases de données, le perfectionnement des procédures permettra une utilisation quotidienne du Vitek-MS[®], et cela pour tout type de champignons filamenteux, pathogènes et contaminants des cultures.

Ensuite, pour les dermatophytes et certains champignons isolés de prélèvements profonds (mucorales et autres filamenteux), il serait judicieux de séquencer les régions ITS (ITS 1-2, et ITS 3-4). Dans ces cas, l'apport de la biologie moléculaire semble être bénéfique, malgré un coût non négligeable. Cette méthode demandera plus de temps mais permettra d'identifier avec précision l'agent pathogène en cause. L'identification au rang de l'espèce ne peut se passer du séquençage d'un ou plusieurs loci (Annexe 3).

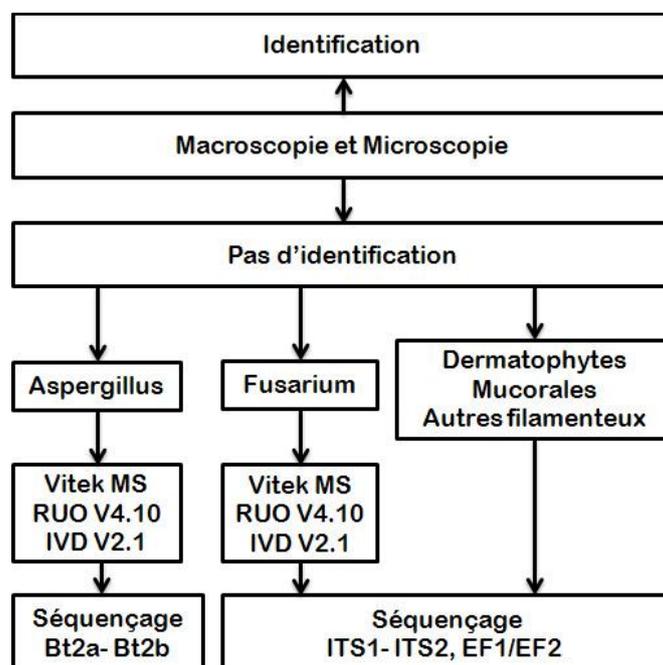


Figure 17. Conduite à tenir pour identifier un champignon filamenteux au laboratoire de mycologie du CHU de Limoges.

Contrairement à la biologie moléculaire, parfois la spectrométrie de masse ne peut pas donner une identification précoce. Il sera nécessaire de recommencer la manipulation avec une colonie de taille suffisante. En effet, la procédure nécessite une quantité importante de champignons (environ 2 cm² de culture), il sera donc souvent nécessaire de repiquer la souche au risque de contaminer la culture de départ.

Pour optimiser et améliorer la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour les filamenteux il est nécessaire de continuer à travailler sur le protocole de préparation de l'échantillon et surtout d'enrichir la base de données avec les différentes formes possibles pour une même espèce de champignon (Gautier et al., 2014). Des erreurs produites par spectrométrie de masse et facilement évitables par les seules analyses macro et microscopiques ne peuvent pas être tolérées. Nous avons cependant obtenu des résultats qui montrent la nécessité de poursuivre les évaluations de la spectrométrie de masse pour un usage futur en routine au laboratoire de mycologie médicale du CHU de Limoges.

Bibliographie

- Aghayeva DN, Wingfield MJ, De Beer ZW, Kirisits T. Two new *Ophiostoma* species with *Sporothrix* anamorphs from Austria and Azerbaijan. *Mycologia*. 2004;**96**:866-78.
- Alanio A, Beretti JL, Dauphin B, Mellado E, Quesne G, Lacroix C, Amara A, Berche P, Nassif X, Bougnoux ME. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for fast and accurate identification of clinically relevant *Aspergillus* species. *Clin Microbiol Infect*. 2010;**17**:750-5.
- Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. *Aspergillus* section Fumigati: antifungal susceptibility patterns and sequence based identification. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;**52**:1244-51.
- Alshawa K, Beretti JL, Lacroix C, Feuilhade M, Dauphin B, Quesne G, Hassouni N, Nassif X, Bougnoux ME. Successful identification of clinical dermatophyte and *Neoscytalidium* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2012;**50**:2277-81.
- Anzawa K, Kawasaki M, Hironaga M, Mochizuki T. Genetic relationship between *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* and *A. vanbreuseghemii*. *Med Mycol J*. 2011;**52**:223-27.
- Arendrup MC Update on antifungal resistance in *Aspergillus* and *Candida*. *Clin Microbiol Infect*. 2013;**20 Suppl 6**:42-8.
- Arendrup MC, Perkhofer S, Howard SJ, Garcia-Effron G, Vishukumar A, Perlin D, Lass-Flörl C. Establishing in vitro-in vivo correlations for *Aspergillus fumigatus*: the challenge of azoles versus echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;**52**:3504-11.
- Ascioglu S, Rex JH, de Pauw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, Denning DW, Donnelly JP, Edwards JE, Erjavec Z, Fiere D, Lortholary O, Maertens J, Meis JF, Patterson TF, Ritter J, Selleslag D, Shah PM, Stevens DA, Walsh TJ. Invasive Fungal Infections Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer; Mycoses Study Group of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis*. 2002;**34**:7-14 (Commentaires in *Clin Infect Dis*. 2004;**38**:1648-9).
- Badillet G. Dermatophytes et immigration. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1988 ;**46**:37-43.
- Badillet G. Dermatophytes et dermatophytes. Atlas clinique et biologique. 3^{ème} ed. Varia. Paris, 1991;303 pages.
- Baek M, Laukes N, Decroix J, Surmont I. Onychomycosis due to *Onychocola canadensis*. *Ann Dermatol Venereol*. 2006;**133**:380-2.
- Balajee SA, Gribskov JL, Hanley E, Nickle D, Marr KA. *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. *Eukaryot Cell*. 2005a;**4**:625-32.
- Balajee SA, Gribskov J, Brandt M, Ito J, Fothergill A, Marr KA. Mistaken identity: *Neosartorya pseudofischeri* and its anamorph masquerading as *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol*. 2005b;**43**:5996-9.

- Balajee SA, Nickle D, Varga J, Marr KA. Molecular studies reveal frequent misidentification of *Aspergillus fumigatus* by morphotyping. *Eukaryot Cell*. 2006;**5**:1705-12.
- Biomérieux. Vitek-MS manuel d'utilisation. 2011-10.
- Biomérieux. Vitek-MS Flux de travail, manuel d'utilisation – usage clinique. Version B3.1. 2012-05.
- Bitar D, Che D, Ancelle T, Fuhrman C. Mycoses invasives en France : épidémiologie, enjeux diagnostiques et thérapeutiques. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*. 2013;**12**:107-28.
- Bitar D, Van Cauteren D, Lanternier F, Dannaoui E, Che D, Dromer F, Desenclos JC, Lortholary O. Increasing incidence of zygomycosis (mucormycosis), France, 1997-2006. *Emerg Infect Dis*. 2009;**15**:1395-401.
- Bougnoux M-E, Angebault C, Leto J, Beretti J-L. Identification des levures par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2013;**450**:63-9.
- Buskirk AD, Hettick JM, Chipinda I, Law BF, Siegel PD, Slaven JE, Green BJ, Beezhold DH. Fungal pigments inhibit the matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of darkly pigmented fungi. *Anal Bioch*. 2011;**411**:122-8.
- Chabasse D, Bouchara JP, De Gentile L, Brun S, Cimon B, Penn P. Les moisissures d'intérêt médical. *Bioforma*. 2002;**25**.
- Chabasse D, Pihet M. Les dermatophytes : les difficultés du diagnostic mycologique. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2008;**406**:29-38.
- Chabasse D. Place du laboratoire dans le diagnostic mycologique d'une onychomycose. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2011;**432**:43-50.
- Chee HY, Kim YK. Molecular analysis of exophiala species using molecular markers. *Mycobiology*. 2002;**30**:1-4.
- Chowdhary A, Meis JF, Guarro J, de Hoog GS, Kathuria S, Arendrup MC, Arikan-Akdagli S, Akova M, Boekhout T, Caira M, Guinea J, Chakrabarti A, Dannaoui E, van Diepeningen A, Freiburger T, Groll AH, Hope WW, Johnson E, Lackner M, Lagrou K, Lanternier F, Lass-Flörl C, Lortholary O, Meletiadis J, Muñoz P, Pagano L, Petrikos G, Richardson MD, Roilides E, Skiada A, Tortorano AM, Ullmann AJ, Verweij PE, Cornely OA, Cuenca-Estrella M. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of systemic phaeohyphomycosis: diseases caused by black fungi. *Clin Microbiol Infect*. 2014;**20 Suppl 3**:47-75.
- CNRMA, Centre National de Référence Mycoses Invasives et Antifongiques, Dromer F., Lortholary O., Bretagne S. Rapport d'activité 2013 de l'année d'exercice 2012. *Institut Pasteur*. 2013.

- Cornely OA, Arikian-Akdagli S, Dannaoui E, Groll AH, Lagrou K, Chakrabarti A, Lanternier F, Pagano L, Skiada A, Akova M, Arendrup MC, Boekhout T, Chowdhary A, Cuenca-Estrella M, Freiburger T, Guinea J, Guarro J, de Hoog S, Hope W, Johnson E, Kathuria S, Lackner M, Lass-Flörl C, Lortholary O, Meis JF, Meletiadis J, Muñoz P, Richardson M, Roilides E, Tortorano AM, Ullmann AJ, van Diepeningen A, Verweij P, Petrikos G. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of mucormycosis 2013. *Clin Microbiol Infect.* 2014;**20 Suppl** 3:5-26.
- De Baere T, Summerbell R, Theelen B, Boekhout T, Vaneechoutte M. Evaluation of internal transcribed spacer 2-RFLP analysis for the identification of dermatophytes. *J Med Microbiol.* 2010 ;**59**:48-54.
- De Carolis E, Posteraro B, Lass-Flörl C, Vella A, Florio AR, Torelli R, Girmenia C, Colozza C, Tortorano AM, Sanguinetti M, Fadda G. Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and Mucorales with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2012;**18**:475-84.
- De Hoog GS Atlas of clinical fungi. Second edition. *Am Soc Microbiol.* 2000;1126 pages.
- De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, Pappas PG, Maertens J, Lortholary O, Kauffman CA, Denning DW, Patterson TF, Maschmeyer G, Bille J, Dismukes WE, Herbrecht R, Hope WW, Kibbler CC, Kullberg BJ, Marr KA, Muñoz P, Odds FC, Perfect JR, Restrepo A, Ruhnke M, Segal BH, Sobel JD, Sorrell TC, Viscoli C, Wingard JR, Zaoutis T, Bennett JE; European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group; National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis.* 2008;**46**:1813-21.
- Del Chierico F, Masotti A, Onori M, Fiscarelli E, Mancinelli L, Ricciotti G, Alghisi F, Dimiziani L, Manetti C, Urbani A, Muraca M, Putignani L. MALDI-TOF MS proteomic phenotyping of filamentous and other fungi from clinical origin. *J Proteomics.* 2012;**75**:3314-30.
- Denning DW, Hope WW. Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. *Trends Microbiol.* 2010;**18**:195-204.
- Dodds AE, Drew R, Johnson M, Danna R, Dabrowski D, Walker V, Prasad M, Alexander B, Papadopoulos G, Perfect J. Cost of invasive fungal infections in the era of new diagnostics and expanded treatment. *Pharmacotherapy.* 2012;**32**:890-901.
- Dong H, Kemptner J, Marchetti-Deschmann M, Kubicek CP, Allmaier G. Development of a MALDI two-layer volume sample preparation technique for analysis of colored conidia spores of *Fusarium* by MALDI linear TOF mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2009;**395**:1373-83.
- Erhard M, Hipler UC, Burmester A, Brakhage AA, Wöstemeyer J. Identification of dermatophyte species causing onychomycosis and tinea pedis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Exp Dermatol.* 2008;**17**:356-61.

- Feuilhade de Chauvin M Mycoses métropolitaines. *Encycl Méd Chir* (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris). Dermatologie. 1998;**12-320-A-10**.
- Fréalte E, Rodrigue M, Gantois N, Aliouat CM, Delaporte E, Camus D, Dei-Cas E, Kauffmann-Lacroix C, Guillot J, Delhaes L. Phylogenetic analysis of *Trichophyton mentagrophytes* human and animal isolates based on MnSOD and ITS sequence comparison. *Microbiology*. 2007;**153**:3466-77.
- Frías-De León MG, Zavala-Ramírez M, Córdoba S, Zúñiga G, Duarte-Escalante E, Pérez-Torres A, Zepeda-Rodríguez A, López-Martínez I, Buitrago MJ, del Rocío Reyes-Montes M. Phenotypic characteristics of isolates of *Aspergillus* section Fumigati from different geographic origins and their relationships with genotypic characteristics. *BMC Infect Dis*. 2011;**11**:116.
- Gautier M, Ranque S, Normand AC, Becker P, Packeu A, Cassagne C, L'Ollivier C, Hendrickx M, Piarroux R. MALDI-TOF mass spectrometry: revolutionising clinical laboratory diagnosis of mould infections. *Clin Microbiol Infect*. 2014 [en ligne], le 4 juillet 2014 [consulté le 21 juillet 2014]. Disponible sur le web <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1469-0691.12750/pdf>.
- 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.
- Georg LK. The relationship between the downy and granular forms of the *Trichophyton mentagrophytes*. *J Invest Dermatol*. 1954;**23**:123-41.
- Gilgado F, Serena C, Cano J, Gené J, Guarro J. Antifungal susceptibilities of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;**50**:4211-3.
- Gil-Lamagnere C, Simitsopoulou M, Roilides E, Maloukou A, Winn RM, Walsh TJ. Interferon- γ and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augment the activity of polymorphonuclear leukocytes against medically important Zygomycetes. *J Infect Dis*. 2005;**191**:1180-7.
- Glass NL, Donaldson GC. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. *Appl Environ Microb*. 1995;**61**:1323-30.
- Gravet A. Spectrométrie de masse et identification bactérienne, l'expérience du laboratoire de microbiologie du CH de Mulhouse. *Spectra Biologie*. 2010;**180**:45-50.
- Hirogana M, Watanabe S. Mating behavior of 334 Japanese isolates of *Trichophyton mentagrophytes* in relation to their ecological status. *Mycologia*. 1980;**72**:1159-70.
- Hoffmann K, Pawłowska J, Walther G, Wrzosek M, de Hoog GS, Benny GL, Kirk PM, Voigt K. The family structure of the Mucorales: a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. *Persoonia*. 2013;**30**:57-76.
- Hong SB, Go SJ, Shin HD, Frisvad JC, Samson RA. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia*, 2005;**97**:1316-29.
- Ibrahim AS, Spellberg B, Walsh TJ, Kontoyiannis DP. Pathogenesis of Mucormycosis. *Clin Infect Dis*. 2012;**54 Suppl 1**:S16-S22.

- Iwen PC, Hinrichs SH, Rupp ME Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Med Mycol.* 2002;**40**:87-109.
- Jurjevic Z, Peterson SW, Horn BW. *Aspergillus* section *Versicolores*: nine new species and multilocus DNA sequence based phylogeny. *IMA Fungus.* 2012;**3**:59-79.
- Kaltseis J, Rainer J, De Hoog GS. Ecology of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species in human dominated and natural environments and their distribution in clinical samples. *Med Mycol.* 2009;**47**:398-405.
- Kauffmann-Lacroix C, Albouy-Llaty M, Migeot V, Contet-Audonnet N; Groupe de travail membres de la SFMM. Enquête sur les conditions analytiques d'un examen de mycologie médicale auprès des membres de la Société française de mycologie médicale. *J Mycol Med.* 2011;**21**:159-68.
- Kontoyiannis DP, Marr KA, Park BJ, Alexander BD, Anaissie EJ, Walsh TJ, Ito J, Andes DR, Baddley JW, Brown JM, Brumble LM, Freifeld AG, Hadley S, Herwaldt LA, Kauffman CA, Knapp K, Lyon GM, Morrison VA, Papanicolaou G, Patterson TF, Perl TM, Schuster MG, Walker R, Wannemuehler KA, Wingard JR, Chiller TM, Pappas PG. Prospective surveillance for IFI in HSCT recipients. *Clin Infect Dis.* 2010;**50**:1091-100.
- Krimitzas A, Pyrii I, Kouvelis VN, Kapsanaki-Gotsi E, Typas MA. A phylogenetic analysis of greek isolates of *Aspergillus* species based on morphology and nuclear and mitochondrial gene sequences. *Biomed Res Int.* 2013; [en ligne], le 9 mai 2013 [consulté le 27 mars 2014]. Disponible sur le web <http://dx.doi.org/10.1155/2013/260395>.
- Lackner M, de Hoog GS, Verweij PE, Najafzadeh MJ, Curfs-Breuker I, Klaassen CH, Meis JF. Species-specific antifungal susceptibility patterns of *Scedosporium* and *Pseudallescheria* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012a;**56**:2635-42.
- Lackner M, Klaassen CH, Meis JF, van den Ende AH, de Hoog GS. Molecular identification tools for sibling species of *Scedosporium* and *Pseudallescheria*. *Med Mycol.* 2012b;**50**:497-508.
- Lacroix C, De Chauvin MF. In vitro activity of amphotericin B, itraconazole, voriconazole, posaconazole, caspofungin and terbinafine against *Scytalidium dimidiatum* and *Scytalidium hyalinum* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2008;**61**:835-7.
- Lanternier F, Lortholary O. AMBIZYGO: phase II study of high dose liposomal amphotericin B (AmBisome) [10 mg/kg/j] efficacy against zygomycosis. *Med Mal Infect.* 2008;**38 Suppl 2**:S90-S91.
- Leslé F, Goldrajch L, Cremer G, Dupouy-Camet J, Paugam A. Actualités des dermatophytoses. *Feuillets de Biologie.* 2014;**314**:23-32.
- Li HC, Bouchara JP, Hsu MM, Barton R, Su S, Chang TC. Identification of dermatophytes by sequence analysis of the rRNA gene internal transcribed spacer regions. *J Med Microbiol.* 2008a;**57**:592-600.
- Li DM, de Hoog GS, Saunte DM, Van den Ende AH, Chen XR. *Coniosporium epidermidis* sp. nov., a new species from human skin. *Stud Mycol.* 2008b;**61**:131-6.

- Lortholary O, Gangneux JP, Sitbon K, Lebeau B, de Monbrison F, Le Strat Y, Coignard B, Dromer F, Bretagne S; French Mycosis Study Group. Epidemiological trends in invasive aspergillosis in France: the SAIF network (2005-2007). *Clin Microbiol Infect*. 2011;**17**:1882-9.
- Lortholary O, Obenga G, Biswas P, Caillot D, Chachaty E, Bienvenu AL, Cornet M, Greene J, Herbrecht R, Lacroix C, Grenouillet F, Raad I, Sitbon K, Troke P; French Mycoses Study Group. International retrospective analysis of 73 cases of invasive fusariosis treated with voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;**54**:4446-50.
- Machouart M, Menir P, Helenon R, Quist D, Desbois N. *Scytalidium* and scytalidiosis: What's new in 2012? *J Mycol Med*. 2013;**23**:40-6.
- Marinach-Patrice C, Lethuillier A, Marly A, Brossas JY, Gené J, Symoens F, Datry A, Guarro J, Mazier D, Hennequin C. Use of mass spectrometry to identify clinical *Fusarium* isolates. *Clin Microbiol Infect*. 2009;**15**:634-42.
- Menet MC. Principes de la spectrométrie de masse. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2011;**41**:41-53.
- Neofytos D, Horn D, Anaissie E, Steinbach W, Olyaei A, Fishman J, Pfaller M, Chang C, Webster K, Marr K. Epidemiology and outcome of invasive fungal infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: analysis of multicenter prospective antifungal therapy (PATH) alliance registry. *Clin Infect Dis*. 2009;**48**:265-73.
- Nilsson RH, Ryberg M, Kristiansson E, Abarenkov K, Larsson KH, Kõljalg U. Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: a fungal perspective. *PLoS One*. 2006;**1**:e59.
- Normand AC, Cassagne C, Ranque S, L'ollivier C, Fourquet P, Roesems S, Hendrickx M, Piarroux R. Assessment of various parameters to improve MALDI-TOF MS reference spectra libraries constructed for the routine identification of filamentous fungi. *BMC Microbiol*. 2013;**13**:76.
- Nucci M, Anaissie E. *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev*. 2007;**20**:695-704.
- Nucci M, Marr KA, Queiroz-Telles F, Martins CA, Trabasso P, Costa S, Voltarelli JC, Colombo AL, Imhof A, Pasquini R, Maiolino A, Souza CA, Anaissie E. *Fusarium* infection in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis*. 2004;**38**:1237-42.
- O'Donnell K, Cigelnik E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol. Phylogenet and Evol*. 1997;**7**:103-116
- Packeu A, Hendrickx M, Beguin H, Martiny D, Vandenberg O, Detandt M. Identification of the *Trichophyton mentagrophytes* complex species using MALDI-TOF mass spectrometry. *Med Mycol*. 2013;**51**:580-5.
- Pappas PG, Alexander BD, Andes DR, Hadley S, Kauffman CA, Freifeld A, Anaissie EJ, Brumble LM, Herwaldt L, Ito J, Kontoyiannis DP, Lyon GM, Marr KA, Morrison VA, Park BJ, Patterson TF, Perl TM, Oster RA, Schuster MG, Walker R, Walsh TJ, Wannemuehler KA, Chiller TM. Invasive fungal infections among organ transplant recipients: results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). *Clin Infect Dis*. 2010;**50**:1101-11.

- Paugam A, L'ollivier C, Vigié C, Anaya L, Mary C, de Ponfilly G, Ranque S. Comparison of real-time PCR with conventional methods to detect dermatophytes in samples from patients with suspected dermatophytosis. *J Microbiol Methods*. 2013;**95**:218-22.
- Pichon N, Ajzenberg D, Desnos-Ollivier M, Clavel M, Gantier JC, Labrousse F. Fatal-stroke syndrome revealing fungal cerebral vasculitis due to *Arthrographis kalrae* in an Immunocompetent patient. *J Clin Microbiol*. 2008;**46**:3152-5.
- Raad II, Hachem RY, Herbrecht R, Graybill JR, Hare R, Corcoran G, Kontoyiannis DP. Posaconazole as salvage treatment for invasive fusariosis in patients with underlying hematologic malignancy and other conditions. *Clin Infect Dis*. 2006;**42**:1398-403.
- Reed C, Bryant R, Ibrahim AS, Edwards J Jr, Filler SG, Goldberg R, Spellberg B. Combination polyene-caspofungin treatment of rhino-orbital-cerebral mucormycosis. *Clin Infect Dis*. 2008;**47**:364-71.
- Rivero M, Hidalgo A, Alastruey-Izquierdo A, Cía M, Torroba L, Rodríguez-Tudela JL. Infections due to *Phialemonium* species: case report. *Med Mycol*. 2009;**47**:766-74.
- Roden MM, Zaoutis TE, Buchanan WL, Knudsen TA, Sarkisova TA, Schaufele RL, Sein M, Sein T, Chiou CC, Chu JH, Kontoyiannis DP, Walsh TJ. Epidemiology and outcome of Zygomycosis: a review of 929 reported cases. *Clin Infect Dis*. 2005;**41**:634-53.
- Samson RA, Hong S, Peterson SW, Frisvad JC, Varga J. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section Fumigati and *Neosartorya*. *Stud Mycol*. 2007a;**59**:147-203.
- Samson RA, Noonim P, Meijer M, Houbraken J, Frisvad JC, Varga J. Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Stud Mycol*. 2007b;**59**:129-45.
- Samson RA, Varga J, Meijer M, Frisvad JC. New taxa in *Aspergillus* section Usti. *Stud Mycol*. 2011;**69**:81-97.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W. Fungal barcoding consortium; Fungal barcoding consortium author list. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;**109**:6241-6.
- Seebache C, Bouchara JP, Mignon B. Updates on the Epidemiology of dermatophyte infections. *Mycopathologia*. 2008;**166**:335-52.
- Sendid B, Ducoroy P, François N, Lucchi G, Spinali S, Vagner O, Damiens S, Bonnin A, Poulain D, Dalle F. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of medically important yeasts in the clinical laboratories of Dijon and Lille hospitals. *Med Mycol*. 2013;**51**:25-32.
- Société française de dermatologie. Groupe de travail recommandations pour la pratique clinique. Onychomycoses: modalité de diagnostic et de prise en charge. *Ann Dermatol Venereol*. 2007;**134**:7-16.
- Suarez F, Lortholary O, Buland S, Rubio MT, Ghez D, Mahé V, Quesne G, Poirée S, Buzyn A, Varet B, Berche P, Bougnoux ME. Detection of circulating *Aspergillus fumigatus* DNA by real-time PCR assay of large serum volumes improves early diagnosis of invasive aspergillosis in high-risk adult patients under hematologic surveillance. *J Clin Microbiol*. 2008;**46**:3772-7

- Summerbell RC, Gueidan C, Schroers HJ, de Hoog GS, Starink M, Rosete YA, Guarro J, Scott JA. *Acremonium* phylogenetic overview and revision of *Gliomastix*, *Sarocladium*, and *Trichothecium*. *Stud Mycol.* 2011;**68**:139-62.
- Theel E, Hall L, Mandrekar J, Wengenck N. Dermatophytes identification using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2011;**49**:4067-71.
- Tortorano AM, Prigitano A, Esposto MC, Arsic Arsenijevic V, Kolarovic J, Ivanovic D, Paripovic L, Klingspor L, Nordøy I, Hamal P, Arikan Akdagli S, Ossi C, Grancini A, Cavanna C, Lo Cascio G, Scarparo C, Candoni A, Caira M, Drogari Apiranthitou M. On the behalf of the ECMM Working Group. European Confederation of Medical Mycology (ECMM) epidemiological survey on invasive infections due to *Fusarium* species in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014;**3** [en ligne], le 3 mai 2014 [consulté le 12 mai 2014]. Disponible sur le web <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10096-014-2111-1>>.
- Toth B, Cso M, Dijksterhuis J, Frisvad JC et Varga J. *Pithomyces chartarum* as a pathogen of wheat. *J Plant Pathol.* 2007;**89**:405-8.
- Van Burik JA, Hare RS, Solomon HF, Corrado ML, Kontoyiannis DP. Posaconazole is effective as salvage therapy in zygomycosis: a retrospective summary of 91 cases. *Clin Infect Dis.* 2006;**42**:e61-e65.
- Van der Linden JW, Warris A, Verweij PE. *Aspergillus* species intrinsically resistant to antifungal agents. *Med Mycol.* 2011;**49 Suppl 1**:S82-S9.
- Varga J, Due M, Frisvad JC, and Samson RA. Taxonomic revision of *Aspergillus* section Clavati based on molecular, morphological and physiological data. *Stud Mycol.* 2007;**59**:89-106.
- Varga J, Frisvad JC, Kocsubé S, Brankovics B, Tóth B, Szigeti G, Samson RA. New and revisited species in *Aspergillus* section Nigri. *Stud Mycol.* 2011;**69**:1-17.
- Walther G, Pawłowska J, Alastruey-Izquierdo A, Wrzosek M, Rodriguez-Tudela JL, Dolatabadi S, Chakrabarti A, de Hoog GS. DNA barcoding in Mucorales: an inventory of biodiversity. *Persoonia.* 2013;**30**:11-47.
- Wang L, Yokoyama K, Miyaji M, Nishimura K. Mitochondrial cytochrome b gene analysis of *Aspergillus fumigatus* and related species. *J Clin Microbiol.* 2000;**38**:1352-8.
- Warris A, Verweij PE. Clinical implications of environmental sources for *Aspergillus*. *Med Mycol.* 2005;**43 Suppl 1**:S59-S65.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. Eds. New York Academic Press Inc. 1990:315-22.

Annexes

Annexe 1. Tableau récapitulatif de nos 139 isolats et leurs identifications par les 3 méthodes différentes.

N°	Origine du prélèvement	Examen mycologique macro et microscopique	Séquençage	Spectrométrie de masse MALDI-TOF (Vitek-MS [®] BioMérieux)	
				IVD V2.1	RUO Saramis [®] V4.10
1	AB	<i>A. clavatus</i>	<i>A. clavatus</i> 99%	Abs	Abs
2	selles	<i>A. flavus</i>	<i>A. amstelodami</i> 100%	Abs	NI
3	LBA	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i> 100%	<i>A. flavus</i> 100%	<i>A. flavus</i> 88,2%
4	EB	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i> 100%	<i>A. flavus</i> 99,9%	<i>A. flavus</i> 100%
5	oreille externe	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i> 100%	<i>A. flavus</i> 100%	<i>A. flavus</i> 99,9%
6	AB	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i> 100%	<i>A. fumigatus</i> 100%	<i>A. fumigatus</i>
7	EB	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i> 100%	<i>A. fumigatus</i> 100%	NI
8	EB	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i> 100%	<i>A. fumigatus</i> 100%	<i>A. fumigatus</i> 89%
9	EB	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i> 100%	<i>A. fumigatus</i> 100%	<i>A. fumigatus</i> 92%
10	EB	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i> 100%	<i>A. fumigatus</i> 100%	<i>A. fumigatus</i> 77,5%
11	AB	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i> 97,3%	<i>A. fumigatus</i> 100%	NI
12	EB	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i> 100%	<i>A. fumigatus</i> 100%	<i>A. fumigatus</i>
13	EB	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i> 100%	<i>A. fumigatus</i> 100%	<i>A. fumigatus</i> 87%
14	oreille	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i> 100%	<i>A. fumigatus</i> 99,9%	<i>A. fumigatus</i> 85,5%
15	AB	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i> 100%	<i>A. fumigatus</i> 99,9%	<i>A. fumigatus</i>
16	oreille externe	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i> 100%	NI	NI
17	AB	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i> 100%	<i>A. fumigatus</i> 99,9%	<i>A. fumigatus</i>
18	EB	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i> 100%	<i>A. fumigatus</i> 100%	<i>A. fumigatus</i> 99,9%
19	EB	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i> 99%	<i>A. fumigatus</i> 100%	NI
20	sinus	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i> 100%	<i>A. fumigatus</i> 99,8%	<i>A. fumigatus</i> 99,8%
21	squames bras	<i>A. glaucus</i>	<i>A. pseudoglaucus</i> 100%	Abs	Abs
22	squames pli inguinal	<i>A. glaucus</i>	<i>A. amstelodami</i> 100%	Abs	NI
23	NR	<i>A. glaucus</i>	<i>A. amstelodami</i> 100%	Abs	NI

24	LBA	<i>A. nidulans</i>	<i>A. calidoustus</i> 100%	<i>A. ustus</i> 100%	<i>A. ustus</i> 99,8%
25	AB	<i>A. nidulans</i>	<i>A. nidulans</i> 99,8%	<i>A. nidulans</i> 100%	NI
26	NR	<i>A. nidulans</i>	<i>A. nidulans</i> 100%	<i>A. nidulans</i> 100%	<i>A. nidulans</i> 50%
27	EB	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i> 99,6%	Abs	NI
28	EB	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> 100%	<i>A. niger</i> 99,9%	<i>A. niger</i> 88,2%
29	lba	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> complexe 99,9%	<i>A. niger</i> complexe 61%
30	NR	<i>A. niger</i>	<i>A. awamorii</i> 99,8%	<i>A. niger</i> complexe 99,9%	Abs
31	ongle main	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i> 100%	<i>A. niger</i> complexe 99,9%	<i>A. niger</i>
32	AB	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i> 99,3%	<i>A. niger</i> 99,9%	<i>A. niger</i> 91,2%
33	selles	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i> 100%	Abs	NI
34	selles	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i> 99%	<i>A. niger</i> complexe 99,9%	<i>A. tubingensis</i>
35	AB	<i>A. niger</i>	<i>A. sclerotiorum</i> 100%	Abs	<i>A. sclerotioniger</i>
36	LBA	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. ochraceus</i> 100%	Abs	NI
37	ongle pied	<i>A. terreus</i>	<i>A. terreus</i> 99,9%	<i>A. terreus</i> 100%	<i>A. terreus</i> 73%
38	LBA	<i>A. ustus</i>	<i>A. pseudoustus</i> 99,4%	<i>A. ustus</i> 100%	<i>A. ustus</i>
39	ongle pied	<i>A. versicolor</i>	<i>A. sydowii</i> 100%	<i>A. sydowii</i> 100%	NI
40	gorge	<i>A. versicolor</i>	<i>A. jensenii</i> 100%	Abs	Abs
41	ongle pied	<i>A. versicolor</i>	<i>A. versicolor</i> 100%	NI	NI
42	NR	<i>Acremonium roseum</i>	<i>Acremonium tubakii</i> 96%	Abs	Abs
43	ongle pied	<i>Alternaria. sp.</i>	<i>Alternaria alternata</i> 99%	NI	NI
44	squames visage	<i>Alternaria. sp.</i>	<i>Alternaria alternata</i> 99%	<i>Alternaria sp.</i> 99%	<i>Alternaria sp.</i> 76,3%
45	ongle pied	<i>Alternaria. sp.</i>	<i>Pithomyces chartaeum</i> 100%	Abs	Abs
46	EB	<i>Arthrimum sp.</i>	<i>Arthrimum marii</i> 99,7%	<i>Lecythophora hofmannii</i>	Abs
47	AB	<i>Beauveria sp.</i>	<i>Beauveria pseudobassiana</i> 99%	Abs	Abs
48	ongle pied	<i>Chrysosporium sp.</i>	<i>Chrysosporium articulatum</i> 99,1%	Abs	<i>Chrysosporium keratinophilum</i>
49	nez	<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i> 100%	<i>Cladosporium cladosporioides</i> complexe 100%	NI
50	nez	<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i> 100%	<i>Cladosporium cladosporioides</i> complexe 100%	NI
51	ongle pied	<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Phialophora europaea</i> 100%	Abs	NI
52	NR	<i>Epidermophyton floccosum</i>	<i>E. floccosum</i> 100%	<i>E. floccosum</i> 100%	NI

53	Hémoculture	<i>Exophiala</i> sp.	<i>Exophiala dermatitidis</i> 100%	<i>Exophiala dermatitidis</i> 99%	<i>Exophiala</i> sp. 99,9%
54	EB	<i>Exophiala</i> sp.	<i>Exophiala dermatitidis</i> 99%	<i>Exophiala dermatitidis</i> 99%	<i>Exophiala</i> sp. 99,9%
55	lentilles	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium oxysporum</i> 100%	<i>F. oxysporum</i> complexe 99,9%	NI
56	ongle pied	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium solanii</i> 100%	<i>F. solanii</i> 99,9%	<i>F. solanii</i> 99,9%
57	nez	<i>Lichteimia</i> sp.	<i>Lichteimia corymbifera</i> 100%	NI	NI
58	cuir chevelu	<i>M. audouinii</i>	<i>M. audouinii</i> 100%	NI	NI
59	cuir chevelu	<i>M. audouinii</i>	<i>M. audouinii</i> 100%	NI	NI
60	ongle pied	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i> 100%	<i>M. canis</i> 100%	NI
61	squames	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i> 100%	<i>M. canis</i> 100%	<i>Microsporium</i> sp.
62	cuir chevelu	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i> 100%	<i>M. canis</i> 100%	NI
63	NR	<i>M. gypseum</i>	<i>M. gypseum</i> 100%	NI	<i>M. gypseum</i>
64	NR	<i>M. nanum</i>	<i>M. nanum</i> 100%	Abs	Abs
65	NR	<i>M. persicolor</i>	<i>M. persicolor</i> 100%	<i>M. persicolor</i> 99,9%	NI
66	liquide pleural	<i>Mucor plumbeus</i> .	<i>Mucor racemosus</i> 97%	NI	Abs
67	ANP	<i>Mucor</i> sp.	<i>Mucor plumbeus</i> 99,1%	Abs	NI
68	ongle pied	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i> 100%	Abs	Abs
69	NR	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i> 99,5%	Abs	Abs
70	LBA	NI	<i>Phialemonium curvatum</i> 100%	Abs	Abs
71	ongle pied	NI	<i>Coniosporum epidermidis</i> 100%	Abs	Abs
72	ongle pied	NI	<i>Lichteimia ramosa</i> 100%	Abs	Abs
73	squames bras	NI	<i>Sarocladium kiliense</i> 99,9%	<i>Sarocladium kiliense</i> 99,9%	Abs
74	ongle pied	NI	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i> 99,8%	Abs	Abs
75	ongle pied	NI	<i>Ophiostoma proliferum</i> 99%	<i>Sporothrix shenckii</i> 99,9%	Abs
76	ongle pied	NI	<i>Stereum hirsutum</i> 98%	Abs	Abs
77	EB	NI	<i>Stereum hirsutum</i> 100%	Abs	Abs
78	LBA	<i>Paecylomyces</i> sp.	<i>Paecylomyces brunneolus</i> 100%	Abs	Abs
79	NR	<i>Paecylomyces</i> sp.	<i>Paecylomyces variotii</i> 100%	NI	NI
80	ongle main	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium chrysogenum</i> 100%	<i>P. chrysogenum</i> 99,9%	NI
81	squames pied	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium chrysogenum</i>	NI	NI

82	EB	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium simplicissimum</i> 100%	<i>A. ustus</i>	Abs
83	ongle m	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium roqueforti</i> 99%	<i>P. roqueforti</i> 99,9%	Abs
84	nez	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium corylophyllum</i> 99,5%	<i>Rhizopus arrhizus</i> / <i>Fusarium proliferatum</i> 50%	Abs
85	selles	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium chrysogenum</i> 100%	<i>P. chrysogenum</i> 99,9%	NI
86	squames main	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium commune</i> 100%	Abs	Abs
87	nez	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium cecidicola</i> 100%	Abs	Abs
88	nez	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium islandicum</i> 100%	Abs	Abs
89	squames mains	<i>Rhizomucor</i> sp.	<i>Lichteimia corymbifera</i> 100%	<i>Lichteimia corymbifera</i> 100%	<i>Absidia corymbifera</i>
90	LBA	<i>Rhizomucor pusillus</i>	<i>Rhizomucor pusillus</i> 100%	Abs	<i>Rhizomucor pusillus</i>
91	EB	<i>S. apiospermum</i>	<i>P. boydii</i> 99%	<i>P. boydii</i> 100%	<i>P. boydii</i> 63,8%
92	EB	<i>S. apiospermum</i>	<i>P. boydii</i> 99%	<i>P. boydii</i> 100%	<i>P. boydii</i> 92,6%
93	sinus	<i>S. apiospermum</i>	<i>S. apiospermum</i> 98%	<i>P. boydii</i> 99,9%	<i>P. boydii</i> 74%
94	Hémoculture	<i>S. prolificans</i>	<i>S. prolificans</i> 100%	NI	Abs
95	ongle pied	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	<i>S. brevicaulis</i> 100%	Abs	<i>S. brevicaulis</i> 99,9%
96	ongle main	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i> var <i>interdigitale</i> 100%	<i>T. interdigitale</i>	NI
97	ongle pied	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i> var <i>interdigitale</i> 100%	<i>T. interdigitale</i> 99,8%	<i>T. interdigitale</i> 77%
98	squames pied	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>Arthroderma vanbreuseghemii</i> 100%	<i>T. interdigitale</i> 99,9%	NI
99	squames jambe	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>Arthroderma vanbreuseghemii</i> 99%	<i>T. interdigitale</i> 99,9%	NI
100	squames main	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>Arthroderma vanbreuseghemii</i> 100%	<i>T. interdigitale</i> 100%	<i>T. interdigitale</i> 75%
101	ongle pied	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i> 100%	<i>T. interdigitale</i> 99,9%	<i>T. interdigitale</i> 85,3%
102	ongle pied	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>Arthroderma vanbreuseghemii</i> 99,3%	<i>T. interdigitale</i> 99,9%	<i>T. interdigitale</i> 87%
103	ongle pied	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>mentagrophytes</i> 100%	NI	NI
104	ongle pied	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>Arthroderma vanbreuseghemii</i> 100%	<i>T. interdigitale</i> 99,9%	<i>T. interdigitale</i> 84%
105	squames IIO	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i> var <i>interdigitale</i> 99,2%	<i>T. rubrum</i> 99,9%	<i>T. rubrum</i> 99,9%
106	ongle pied	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>Arthroderma vanbreuseghemii</i> 100%	<i>T. interdigitale</i> 99,9%	NI
107	squames pied	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i> 99,3%	<i>T. interdigitale</i> 99,9%	NI
108	squames IIO	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i> 99%	NI	NI

109	squames cuisse	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i> 100%	<i>T. rubrum</i> 99%	NI
110	ongle pied	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i> 100%	<i>T. rubrum</i> 99,9%	<i>T. rubrum</i>
111	squames pli inguinal	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i> 100%	NI	NI
112	ongle pied	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i> 97%	<i>T. rubrum</i> 50% / <i>T. violaceum</i> 50%	NI
113	ongle pied	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i> 100%	<i>T. rubrum</i> 99,9%	NI
114	ongle pied	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i> 99,6%	<i>T. rubrum</i> 83,9%	<i>T. rubrum</i> 84%
115	squames pied	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i> 100%	<i>T. rubrum</i> 100%	<i>T. rubrum</i>
116	NR	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i> 100%	<i>T. rubrum</i> 99%	<i>T. rubrum</i>
117	ongle pied	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i> 100%	<i>T. rubrum</i> 100%	NI
118	ongle pied	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i> 100%	<i>T. rubrum</i> 100%	<i>T. rubrum</i> 80,3%
119	squames pli inguinal	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i> 100%	NI	NI
120	ongle pied	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i> 100%	<i>T. rubrum</i> 100%	NI
121	squames pli inguinal	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i> 100%	<i>T. rubrum</i> 50% / <i>T. violaceum</i> 50%	<i>Trichophyton</i> sp. 90%
122	ongle pied	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i> 99%	<i>T. rubrum</i> 100%	<i>T. rubrum</i>
123	ongle pied	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i> 99%	<i>T. rubrum</i> 99%	<i>T. rubrum</i> 81,5%
124	NR	<i>T. schoenleinii</i>	<i>T. schoenleinii</i> 100%	NI	NI
125	cuir chevelu	<i>T. soudanense</i>	<i>T. soudanense</i> 100%	<i>T. violaceum</i> 99,9%	Abs
126	cuir chevelu	<i>T. soudanense</i>	<i>T. tonsurans</i> 100%	<i>T. tonsurans</i> 100%	<i>T. tonsurans</i>
127	cheveu	<i>T. tonsurans</i>	<i>T. tonsurans</i> 100%	NI	NI
128	NR	<i>T. tonsurans</i>	<i>T. tonsurans</i> 100%	<i>T. tonsurans</i> 100%	NI
129	biopsie cutanée	<i>T. verrucosum</i>	<i>T. verrucosum</i> 100%	NI	NI
130	squames joue	<i>T. verrucosum</i>	<i>T. verrucosum</i> 100%	NI	NI
131	cuir chevelu	<i>T. verrucosum</i>	<i>T. verrucosum</i> 100%	NI	NI
132	NR	<i>T. violaceum</i>	<i>T. violaceum</i> 100%	NI	NI
133	NR	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> 100%	Abs	Abs
134	AB	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma citrinoviride</i> 99%	<i>Sarocladium kiliense</i> 99,9%	NI
135	cerveau	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>Arthrographis kalrae</i> 100%	Abs	NI
136	villosités choriales	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>Trichosporon caseorum</i> 99%	Abs	<i>Trichosporon</i> sp.
137	NR	<i>Trichothecium roseum</i>	<i>Trichothecium roseum</i> 100%	<i>T. violaceum</i> 100%	Abs
138	plis	<i>Ulocladium</i> sp.	<i>Pithomyces chartarum</i> 99%	Abs	Abs

139	selles	<i>Verticillium</i> sp.	<i>Fusarium proliferatum</i> 100%	NI	NI
-----	--------	-------------------------	-----------------------------------	----	----

 Séquençage de la région Bt2a- Bt2b

 Séquençage de la région ITS1- ITS2

AB : Aspiration bronchique

Abs : Absent de la base de données

ANP : Aspiration naso-pharyngée

EB : Expectoration bronchique

LBA : Lavage broncho-alvéolaire

NR : Non renseigné

NI : Non identifié

Annexe 2. Exemples de résultats obtenus avec le Vitek-MS[®] de BioMérieux rendus par le logiciel Saramis Premium[®] en mode RUO avec la base de données V4.10

SARAMIS Premium (admin)

File Options

Spectra Results

Identified Files For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

acquisition #	name	sample	%	family	genus	species	t	datacount	matrix	exp	Import	delete	print detail	compare	compare result
14 Mar 2014	DUP_000_0188_113c	140100338-1_05	0.00				61	CHCA							
14 Mar 2014	DUP_000_0188_112c	140101052-2	87.00	Family Arthrodermataceae	Trichophyton	interdigitale	121	CHCA							Show Details
14 Mar 2014	DUP_000_0188_111c	140101052-1	87.00	Family Arthrodermataceae	Trichophyton	interdigitale	118	CHCA							
14 Mar 2014	DUP_000_0188_x161c		99.90	Family I Enterobacteriaceae	Escherichia	coli	136	CHCA							
14 Mar 2014	DUP_000_0187_x1C1		0.00				45	CHCA							
14 Mar 2014	DUP_000_0188_1H4c	140075722-2_02	79.20	Family Arthrodermataceae	Trichophyton	sp.	81	CHCA							
14 Mar 2014	DUP_000_0188_1H3c	140075722-1_02	0.00				81	CHCA							Show Details
14 Mar 2014	DUP_000_0188_1H2c	130409529-2_02	76.20	Family Trichocomaceae	Aspergillus	niger	103	CHCA							
14 Mar 2014	DUP_000_0188_1H1c	130409529-1_02	76.10	Family Trichocomaceae	Aspergillus	niger	100	CHCA							
14 Mar 2014	DUP_000_0188_1G4f	m canis-2	0.00				92	CHCA							No Matches
14 Mar 2014	DUP_000_0188_1G3f	m canis-1	0.00				104	CHCA							No Matches
14 Mar 2014	DUP_000_0188_1G2f	82111-2	0.00				61	CHCA							No Matches
14 Mar 2014	DUP_000_0188_1G1f	82111-1	0.00				50	CHCA							No Matches
14 Mar 2014	DUP_000_0187_x161c		99.90	Family I Enterobacteriaceae	Escherichia	coli	155	CHCA							

SARAMIS Premium (admin)

File Options

Spectra Results

Identified Files For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

acquisition #	name	sample	%	family	genus	species	t	datacount	matrix	exp	Import	delete	print detail	compare	compare result
12 Dec 2013	DUP_000_0136_1H2f	659955b-1	0.00				40	CHCA							No Matches
12 Dec 2013	DUP_000_0136_1H1f	659955-1_02	0.00				102	CHCA							No Matches
12 Dec 2013	DUP_000_0136_1G4f	571654b-1	0.00				27	CHCA							No Matches
12 Dec 2013	DUP_000_0136_1G3f	571654-1_02	0.00				76	CHCA							No Matches
12 Dec 2013	DUP_000_0136_1F3f	396666-1	0.00	Family Arthrodermataceae	Trichophyton	rubrum	76	CHCA							Show Details
12 Dec 2013	DUP_000_0136_1F2f	396666-1	0.00	Family Trichocomaceae	Aspergillus	terreus	91	CHCA							Show Details
12 Dec 2013	DUP_000_0136_1F1f	634112-1_02	0.00				88	CHCA							Show Details
10 Dec 2013	DUP_000_0132_1B4f	b4ds133818030-1	0.00				127	CHCA							Show Details
10 Dec 2013	DUP_000_0132_1A2f	a2ds133818030-1	0.00				125	CHCA							Show Details
5 Dec 2013	DUP_000_0130_2B4f	b4ds131905522-1	0.00				191	CHCA							No Matches
4 Dec 2013	DUP_000_0128_x1C1		79.20	Family I Enterobacteriaceae	Escherichia	coli	139	CHCA							
4 Dec 2013	DUP_000_0128_1L4f	l4ds131905531-1	0.00				49	CHCA							No Matches
4 Dec 2013	DUP_000_0128_1L3f	l3ds131905531-1	75.00	Family VI Streptococcaceae	Streptococcus	sp.	69	CHCA							No Matches
4 Dec 2013	DUP_000_0128_1L2f	l2ds131905531-1	0.00				87	CHCA							No Matches
2 Dec 2013	DUP_000_0126_1G1f	620882-1_02	0.00				90	CHCA							No Matches
27 Nov 2013	DUP_000_0120_1L1f	130600451-1	0.00	Family Arthrodermataceae	Trichophyton		90	CHCA							Show Details
27 Nov 2013	DUP_000_0120_1K4f	130600451-1	0.00	Family Onygenaceae	Chrysosporium		89	CHCA							Show Details
27 Nov 2013	DUP_000_0120_1K3f	130600451-1	0.00	Family Onygenaceae	Chrysosporium		89	CHCA							Show Details
27 Nov 2013	DUP_000_0120_1K2f	130648190-2	77.80	Family Arthrodermataceae	Trichophyton	interdigitale	121	CHCA							No Matches
27 Nov 2013	DUP_000_0120_1K1f	130619137-2	77.90	Family Arthrodermataceae	Trichophyton	interdigitale	127	CHCA							No Matches
27 Nov 2013	DUP_000_0120_1J4c	130603755-2	0.00				169	CHCA							No Matches
27 Nov 2013	DUP_000_0120_1J3c	130603755-1	0.00				147	CHCA							No Matches
27 Nov 2013	DUP_000_0120_1J4c	130603755-2	0.00				18	CHCA							No Matches
27 Nov 2013	DUP_000_0120_1J3c	130603755-1	0.00				21	CHCA							No Matches
27 Nov 2013	DUP_000_0120_1J2c	130640226-2_03	77.80	Family Hypocresaceae	Fusarium	solani	21	CHCA							No Matches

Identification sans score, comparaison du spectre obtenu avec des spectres similaires contenus dans la base ouverte. Pour les visualiser il faut cliquer sur « Show Details ».

Code couleur de l'indice de confiance :

- > 99.9% Vert foncé
- 99.9 - 90.0% Vert clair
- 90.0 - 80.0% Jaune
- 80.0 - 75.0% Blanc
- Résultat en conflit Rouge

Annexe 3. Liste des couples d'amorces utilisés en fonction des genres étudiés, (en plus des régions ITS), CNRMA rapport d'activité année d'exercice 2012.

Espèce	Gène	Amorces
<i>Complexe d'espèces A. fumigatus</i>	β -tubuline	Btub1F/ Btub2R ¹⁸
<i>Complexe d'espèces Fusarium spp</i>	Factor d'élongation (TEF1- α)	EF1 / EF2 ¹⁹
	RNA polymerase II (RPB2)	5F2/ 7CR ²⁰
<i>Complexe d'espèces Pseudallescheria / Scedosporium</i>	β -tubuline	TUB-F/ TUB-R ²¹
<i>Phaeoacremonium spp</i>	β -tubuline	T1 /Bt2b ²²
<i>Coelomycètes Phoma-like</i>	β -tubuline	TUB2-F / TUB4-R ²³
<i>Trichosporon spp.</i>	IGS1 / ADNr	26SF/5SR ²⁴

Table des figures

Figure 1.	Représentation schématique de l'ADN ribosomal des champignons, avec localisation des régions d'intérêt à amplifier pour l'identification moléculaire des champignons	32
Figure 2.	Représentation schématique des amorces Bt2a-Bt2b sur le gène codant la bêta tubuline (Glass and Donaldson)	34
Figure 3.	Schéma simplifié de la technique MALDI-TOF	36
Figure 4.	Représentation des dépôts de matrice sur une cible VITEK-MS DS [®] . Matrice DHB à gauche (lignes E et F), matrice CHCA à droite (lignes H et I)	36
Figure 5.	Représentation du Vitek-MS, et de la station d'acquisition. [®] (Biomérieux)	38
Figure 6.	Migration sur gel d'agarose à 2 % des fragments d'amplification, amplification des amorces Bt2a-Bt2b pour 2 <i>A. fumigatus</i> (lignes 1 et 2), amplification des amorces ITS1-2 pour un <i>Trichophyton rubrum</i> et les 2 <i>A. fumigatus</i> (lignes 4 à 6), témoins négatifs (lignes 3 et 7), témoin de poids moléculaire (ligne 8)	41
Figure 7.	Schéma d'un cycle d'amplification	43
Figure 8.	Représentation de l'analyseur ABI 3100, à gauche fermé, à droite ouvert mettant en évidence la plaque de séquence et les capillaires	45
Figure 9.	Paramètres à renseigner pour l'alignement de séquences nucléotidiques dans Mycobank	47
Figure 10.	Schéma du déroulement de l'identification par Vitek-MS [®] (Biomérieux [®])	50
Figure 11.	Schéma du déroulement de l'identification en mode RUO Saramis [®] V4.10	51
Figure 12.	Schéma du flux de travail global en mode RUO Saramis [®] V4.10 (Biomérieux [®])	51
Figure 13.	Représentation d'une cible VITEK-MS DS [®]	52
Figure 14.	Positionnement des cibles VITEK-MS DS [®] sur le portoir adaptateur	53
Figure 15.	Chargement de l'adaptateur de cibles VITEK-MS DS [®] dans le Vitek-MS [®]	53
Figure 16.	Représentation schématique des "sweet spots" sur un puits de la cible VITEK-MS DS [®]	54
Figure 17.	Conduite à tenir pour identifier un champignon filamenteux au laboratoire de mycologie du CHU de Limoges	94

Table des tableaux

Tableau I.	Description des amorces des régions d'intérêt pour le séquençage des champignons filamenteux	42
Tableau II.	Identification par la méthode classique et le séquençage des <i>Aspergillus</i> de la section Nigri	57
Tableau III.	Identification par la méthode classique et le séquençage des <i>Scedosporium</i> sp.	58
Tableau IV.	Identification par séquençage des <i>Fusarium</i> sp.	58
Tableau V.	Identification des zygomycètes par la méthode classique et le séquençage	58
Tableau VI.	Identification des phaeohyphomycètes par la méthode classique et le séquençage	58
Tableau VII.	Identification des <i>Trichophyton</i> du complexe <i>mentagrophytes</i> et <i>T. soudanense</i> par la méthode classique et le séquençage	59
Tableau VIII.	Identification des <i>Penicillium</i> sp. par la méthode classique et le séquençage	60
Tableau IX.	Identification des hyalohyphomycètes par la méthode classique et le séquençage	60
Tableau X.	Résultats du séquençage des champignons classés dans le groupe non identifiés par la méthode classique microscopique	60
Tableau XI.	Identification moléculaire des <i>Trichosporon</i> sp.	60
Tableau XII.	Champignons identifiés au niveau du genre en mode RUO Saramis [®] V4.10	61
Tableau XIII.	Identification des <i>Aspergillus</i> sp. en mode RUO Saramis [®] V4.10	62
Tableau XIV.	Identification des Zygomycètes avec la base Saramis [®] V4.10	62
Tableau XV.	Identification des autres hyalohyphomycètes avec la base Saramis [®] V4.10	62
Tableau XVI.	Identification des dermatophytes avec la base Saramis [®] V4.10	63
Tableau XVII.	Champignons non identifiés avec la base RUO Saramis [®] V4.10	64
Tableau XVIII.	Présentation des identifications doubles avec la base IVD V2.1, en comparaison avec les identifications en mode RUO Saramis [®] V4.10 et le séquençage	65
Tableau XIX.	Identification des <i>Aspergillus</i> avec la base IVD V2.1	66

Tableau XX.	Identification des zygomycètes avec la base IVD V2.1	66
Tableau XXI.	Identification des dématiés avec la base IVD V2.1	66
Tableau XXII.	Identification des dermatophytes avec la base IVD V2.1	67
Tableau XXIII.	Identification des hyalohyphomycètes avec la base IVD V2.1	68
Tableau XXIV.	Identification des <i>Penicillium</i> sp. avec la base IVD V2.1	68
Tableau XXV.	Essai d'identification avec la base IVD V2.1 des champignons non identifiés avec la méthode mycologique classique	68
Tableau XXVI.	Non identifications de la base IVD V2.1	69
Tableau XXVII.	Présentation des identifications non concordantes par la méthode mycologique classique comparée au séquençage	70
Tableau XXVIII.	Identifications des <i>Aspergillus</i> sp. avec les différentes méthodes	72
Tableau XXIX.	Identifications des dermatophytes par les trois méthodes	73
Tableau XXX.	Résultats d'identification par les méthodes utilisées dans notre travail des hyalohyphomycètes autres que les <i>Aspergillus</i> sp.	74
Tableau XXXI.	Identification par MALDI-TOF des champignons non identifiés par la méthode classique	74
Tableau XXXII.	Résultats d'identification en spectrométrie de masse avec les 2 bases, IVD V2.1 et RUO Saramis [®] V4.10	75
Tableau XXXIII.	Liste de nos champignons non contenus dans la base IVD V2.1	85
Tableau XXXIV.	Caractéristiques des deux souches d' <i>Exophiala</i> sp.	89
Tableau XXXV.	Caractéristiques de l'isolement de <i>Coniosporum epidermidis</i>	90

Table des annexes

Annexe 1.	Tableau récapitulatif de nos 139 isolats et leurs identifications par les 3 méthodes différentes	103
Annexe 2.	Exemples de résultats obtenus avec le Vitek-MS [®] de BioMérieux rendus par le logiciel Saramis Premium [®] en mode RUO avec la base de données V4.10	109
Annexe 3.	Liste des couples d'amorces utilisés en fonction des genres étudiés, (en plus des régions ITS), CNRMA rapport d'activité année d'exercice 2012	110

Table des matières

Sommaire	1
I. Introduction	3
II. Principaux agents fongiques et mycoses associées rencontrés au laboratoire de mycologie médicale	6
II.1. Principaux champignons filamenteux	6
II.1.1. Agents fongiques en cause dans les infections profondes	8
II.1.2. Agents fongiques en cause dans les infections superficielles	14
II.2. Principales mycoses à champignons filamenteux	15
II.2.1. Mycoses profondes	15
II.2.2. Mycoses superficielles	20
III. Identification actuelle au laboratoire de mycologie du CHU de Limoges	26
III.1. Examen direct	26
III.2. Culture	27
III.3. Identification	27
III.3.1. Identification macroscopique	27
III.3.2. Identification microscopique	28
III.4. Quelles alternatives ?	30
III.4.1. Séquençage de l'ADN : méthode de référence	31
III.4.2. Méthode MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation Time of Flight) en spectrométrie de masse	34
IV. Travaux personnels : comparaison de l'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF des champignons filamenteux par rapport à l'identification par séquençage et à l'identification mycologique classique	39
IV.1. Matériel	39
IV.1.1. Souches des champignons à analyser	39
IV.1.2. Culture des échantillons à tester	40

IV.2. Méthodes	40
IV.2.1. Examen mycologique classique	40
IV.2.2. Séquençage	41
a. Extraction de l'ADN fongique	41
b. Amplification des régions à séquencer	42
c. Purification des produits de PCR	43
d. PCR de séquence	43
e. Purification des produits de séquence	44
f. Séquençage proprement dit	44
g. Gestion des séquences	46
IV.2.3. Spectrométrie de masse Vitek-MS [®]	47
a. Bases de données Saramis [®] et IVD Biomérieux [®]	48
b. Les logiciels de traitement des données	49
c. Matériel nécessaire	52
d. Procédure	52
e. Calibration du spectromètre de masse Vitek-MS [®]	53
f. Acquisition des spectres	54
g. Récupération des résultats et des spectres	55
IV.3. Résultats	56
IV.3.1. Examen mycologique classique	56
IV.3.2. Séquençage	56
IV.3.3. Spectrométrie de masse	61
a. Base RUO Saramis [®] V4.10	61
b. Base de données fermée en développement : IVD V2.1	65
IV.4. Résultats comparatifs	69
IV.4.1. Examen mycologique classique versus séquençage	69

IV.4.2.	Spectrométrie de masse versus séquençage	70
IV.4.3.	Comparaison des deux bases de données : IVD V2.1 et RUO V4.10	74
IV.5.	Résultats statistiques	77
IV.5.1.	Comparaison examen mycologique classique au séquençage	77
IV.5.2.	Comparaison de la spectrométrie de masse au séquençage	77
V.	Discussion	79
V.1.	Autres systèmes disponibles de spectrométrie de masse	79
V.1.1.	Base Bruker [®]	79
V.1.2.	Base Andromas [®]	80
V.1.3.	Bases « maison »	81
V.1.4.	Facteurs influençant les résultats obtenus avec le Vitek MS [®]	81
V.2.	Autres méthodes de biologie moléculaire	83
V.3.	Avantages et inconvénients : coût et durée des analyses	84
V.4.	Résultats	84
V.4.1.	Séquençage	84
V.4.2.	Spectrométrie de masse	85
V.4.3.	Comparaison spectrométrie de masse et séquençage	86
V.4.4.	Erreurs d'identification	86
V.4.5.	Non identifications	88
V.4.6.	Identifications de champignons non identifiés au laboratoire par macro et microscopie	89
V.4.7.	Spectrométrie de masse versus examen mycologique classique	92
VI.	Conclusion	93
	Bibliographie	95
	Annexes	103
	Table des figures	111

Table des tableaux	112
Table des annexes	114
Table des matières	115



SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je dispenserai mes soins sans distinction de race, de religion, d'idéologie ou de situation sociale.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser les crimes.

Je serai reconnaissant envers mes maîtres, et solidaire moralement de mes confrères. Conscient de mes responsabilités envers les patients, je continuerai à perfectionner mon savoir.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir de l'estime des hommes et de mes condisciples, si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

Apport de la spectrométrie de masse et de la biologie moléculaire à l'identification des champignons filamenteux au laboratoire de mycologie médicale

Résumé

L'identification classique des champignons filamenteux repose sur des caractères phénotypiques culturels macroscopiques et microscopiques. Cette méthode est longue. Elle est limitée par la morphologie similaire d'espèces différentes entraînant des erreurs d'identification ou l'absence de fructification en culture rendant l'identification impossible. De plus, les remaniements taxonomiques sont fréquents, conséquence de l'évolution de la biologie moléculaire. Pourtant il est nécessaire d'identifier au rang de l'espèce les champignons filamenteux. En effet, le nombre d'infections fongiques invasives est en augmentation et il existe des différences de sensibilité aux antifongiques au sein même des espèces. Le séquençage de l'ADN ribosomal reste la méthode d'identification de référence. Une nouvelle technique plus rapide et moins coûteuse tend à s'imposer en microbiologie : la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. Les spectres obtenus à partir des protéines ribosomiques sont comparés à une banque de spectres. L'efficacité de la spectrométrie repose donc sur la qualité des bases de données. Dans une démarche d'homogénéisation des pratiques de biologie médicale dans le cadre de l'accréditation des laboratoires, nous avons testé 139 champignons filamenteux. L'identification classique a été réalisée à partir de cultures fongiques sur des milieux de Sabouraud. Nous avons utilisé le séquençage des régions ITS 1-2 et de la bêta tubuline comme méthode de référence. Nous avons utilisé le Vitek-MS[®] (Biomérieux[®]) pour la spectrométrie de masse MALDI-TOF dans ses deux modes de fonctionnement : le mode « recherche » avec la base de données ouverte Saramis[®] V4.10 et le mode « IVD » avec une base fermée IVD V2.1 actuellement en développement. Avec la méthode classique mycologique, nous avons pu identifier 131 (94,2 %) champignons au rang du genre, et seulement 97 (70 %) au rang de l'espèce. Le séquençage des régions ITS 1-2 et de la bêta tubuline a permis d'identifier tous nos champignons. Le Vitek-MS[®] a permis en mode RUO l'identification de 53 (38,1 %) champignons et de 81 (58,3 %) en mode IVD. Statistiquement, le coefficient Kappa est de 0,85 pour l'examen mycologique classique versus le séquençage, de 0,18 avec la base Saramis V4.10 et de 0,56 avec la base IVD V2.1. Pour les *Aspergillus* sp., nous obtenons un coefficient Kappa de 0,81 acceptable pour l'utilisation en routine. Mais pour les dermatophytes Kappa est à 0,52, nettement insuffisant. Notre travail montre la nécessité d'améliorer l'identification des champignons filamenteux. La spectrométrie de masse MALDI-TOF, utilisant le Vitek-MS[®], est une méthode prometteuse mais elle ne peut pas encore remplacer le séquençage de l'ADN ribosomal. Les insuffisances actuelles de la spectrométrie de masse reposent sur des bases de données beaucoup trop incomplètes. En revanche, le séquençage a sa place au laboratoire de mycologie dans le cas d'identification de champignons filamenteux isolés de prélèvements profonds ou de dermatophytes pléomorphisés. Le séquençage nous a aussi permis l'identification de possibles pathogènes non identifiés par l'étude mycologique microscopique. L'évaluation de la spectrométrie de masse est donc à poursuivre pour les champignons filamenteux, principalement en complétant les bases de données spectrales. C'est à ce prix que la spectrométrie de masse deviendra une méthode performante pour l'identification en routine des champignons filamenteux.

Mots-clés

Champignons filamenteux ; culture ; macroscopie ; microscopie ; séquençage ADN ribosomal ; spectrométrie de masse ; MALDI-TOF.

Contribution of mass spectrometry and molecular biology to the identification of filamentous fungi in the laboratory of medical mycology

Summary

The classical identification of filamentous fungi is based on phenotypic, macroscopic and microscopic cultural characters. This method is long. It is often limited by the similar morphology of different species leading to misidentification or, more frequently, by the lack of fructifications in culture making identification impossible. In addition, taxonomic rearrangements are frequent as consequence of the evolution of molecular biology. Yet it is necessary to identify the filamentous fungi at the species level. Indeed, the number of invasive fungal infections is increasing and there are differences in sensitivity to antifungal even within species. The ribosomal DNA sequencing remains the reference identification method. A new faster and less expensive technique tends to impose itself in microbiology: MALDI-TOF mass spectrometry (MS) where the spectra obtained from the ribosomal proteins are compared to a database of spectra. The effectiveness of MS is therefore based on the quality of databases. In a process of homogenization of practices in the clinical laboratory and in the context of laboratory accreditation, we tested 139 filamentous fungi. The classical identification was made from fungal cultures on Sabouraud medium. We used sequencing of the ITS 1-2 regions and beta tubulin as the gold standard. We used the Vitek-MS[®] (Biomérieux[®]) for MALDI-TOF MS in two modes: the "search" mode with the open database Saramis[®] V4.10 and the "IVD" mode with the closed base IVD V2.1 currently in development. With the classical mycological method, we identified 131 (94.2%) fungi at the genus level, and only 97 (70%) at the species level. The sequencing of the ITS 1-2 regions and beta tubulin have identified all our fungi. The Vitek-MS[®] allowed identification of 53 (38.1%) fungi with the "search" mode and 81 (58.3%) in IVD mode. Statistically, the Kappa coefficient is 0.85 for the mycological microscopic examination versus sequencing, 0.18 for Saramis V4.10 and 0.56 for IVD V2.1. For *Aspergillus* sp. we get a Kappa coefficient of 0.81 acceptable for routine use. But for dermatophytes Kappa is 0.52, clearly insufficient. Our work shows the need to improve the identification of filamentous fungi. The MALDI-TOF MS using the Vitek-MS[®] is a promising method but cannot replace the ribosomal DNA sequencing. The current defects of MS are based on databases far too incomplete. In contrast, sequencing has a place in mycology laboratory in the case of identification of filamentous fungi isolated from deep samples or for dermatophytes lacking fructifications. Sequencing also allowed us to identify potential pathogens not identified by mycological microscopic examination. The evaluation of the MS is to be pursued for identifying filamentous fungi, primarily by supplementing the spectral databases. This is at this price that MS will become powerful for the identification of filamentous fungi routinely.

Key words

Filamentous fungi; culture; macroscopy; microscopy; ribosomal DNA sequencing; mass spectrometry; MALDI-TOF.