

Faculté de Médecine

Année 2021

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Médecine

Présentée et soutenue publiquement

le 7 décembre 2021

Par Etienne HERAULT

Né(e) le 9 janvier 1991 à Châtelleraut

MISE EN PLACE DU SEQUENÇAGE EN ROUTINE DANS LE SERVICE DE MYCOLOGIE DU CHU DE LIMOGES POUR LE DIAGNOSTIC DE CHAMPIGNONS D'IDENTIFICATION DIFFICILE

Thèse dirigée par Professeur Marie-Laure DARDE

Examineurs :

Mme. le Pr. Marie-Laure DARDE, Professeur de Parasitologie-Mycoologie, Faculté de Médecine, Université de Limoges

Mme. le Pr. Françoise BOTTEREL, Professeur de Parasitologie-Mycoologie, Faculté de Médecine, Université Paris Est-Créteil

Mme. le Pr. Sylvie ROGEZ, Professeur de Microbiologie, Faculté de Pharmacie Université de Limoges

Mme. le Pr. Sophie ALAIN, Professeur de Bactériologie-Virologie, Faculté de Médecine, Université de Limoges

Mme. le Dr. Marie-Fleur DURIEUX, Assistante hospitalo-universitaire en Parasitologie-Mycoologie, Docteur en Médecine, Université de Limoges



Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Médecine

Présentée et soutenue publiquement

Le 7 décembre 2021

Par Etienne HERAULT

Né(e) le 9 janvier 1991 à Châtelleraut

MISE EN PLACE DU SEQUENÇAGE EN ROUTINE DANS LE SERVICE DE MYCOLOGIE DU CHU DE LIMOGES POUR LE DIAGNOSTIC DE CHAMPIGNONS D'IDENTIFICATION DIFFICILE

Thèse dirigée par Professeur Marie-Laure DARDE

Examineurs :

Mme. le Pr. Marie-Laure DARDE, Professeur de Parasitologie-Mycologie, Faculté de Médecine, Université de Limoges

Mme. le Pr. Françoise BOTTEREL, Professeur de Parasitologie-Mycologie, Faculté de Médecine, Université Paris Est-Créteil

Mme. le Pr. Sylvie ROGEZ, Professeur de Microbiologie, Faculté de Pharmacie Université de Limoges

Mme. le Pr. Sophie ALAIN, Professeur de Bactériologie-Virologie, Faculté de Médecine, Université de Limoges

Mme. le Dr. Marie-Fleur DURIEUX, Assistante hospitalo-universitaire en Parasitologie-Mycologie, Docteur en Médecine, Université de Limoges

DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur **Pierre-Yves ROBERT**

ASSESEURS :
Madame le Professeur **Marie-Cécile PLOY**
Monsieur le Professeur **Jacques MONTEIL**
Monsieur le Professeur **Philippe BERTIN**

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS :

Mis à jour le 15 novembre 2021

ABOYANS Victor (CS)	CARDIOLOGIE
ACHARD Jean-Michel	PHYSIOLOGIE
AJZENBERG Daniel	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE
ALAIN Sophie	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
AUBARD Yves (CS)	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
AUBRY Karine (CS)	O.R.L.
BALLOUHEY Quentin	CHIRURGIE INFANTILE
BERTIN Philippe (CS)	THERAPEUTIQUE
CAIRE François (CS)	NEUROCHIRURGIE
CHARISSOUX Jean-Louis	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
CLAVERE Pierre (CS)	RADIODTHERAPIE
CLEMENT Jean-Pierre (CS)	PSYCHIATRIE D'ADULTES
CORNU Elisabeth	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
COURATIER Philippe (CS)	NEUROLOGIE

DAVIET Jean-Christophe	MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION
DESCAZEAUD Aurélien (CS)	UROLOGIE
DES GUETZ Gaëtan	CANCEROLOGIE
DRUET-CABANAC Michel (CS)	MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL
DURAND-FONTANIER Sylvaine	ANATOMIE (CHIRURGIE DIGESTIVE)
FAUCHAIS Anne-Laure (CS)	MEDECINE INTERNE
FAUCHER Jean-François (CS)	MALADIES INFECTIEUSES
FAVREAU Frédéric	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
FEUILLARD Jean (CS)	HEMATOLOGIE
FOURCADE Laurent (CS)	CHIRURGIE INFANTILE
GAUTHIER Tristan	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
GUIGONIS Vincent	PEDIATRIE
HANTZ Sébastien	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
HOUETO Jean-Luc	NEUROLOGIE
JACCARD Arnaud (CS)	HEMATOLOGIE
JACQUES Jérémie	GASTRO-ENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE
JAUBERTEAU-MARCHAN M. Odile	IMMUNOLOGIE
JESUS Pierre	NUTRITION
JOUAN Jérôme (CS)	CHIRURGIE THORACIQUE ET VASCULAIRE
LABROUSSE François (CS)	ANATOMIE et CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES
LACROIX Philippe	MEDECINE VASCULAIRE
LAROCHE Marie-Laure	PHARMACOLOGIE CLINIQUE
LIENHARDT-ROUSSIE Anne (CS)	PEDIATRIE
LOUSTAUD-RATTI Véronique	HEPATOLOGIE

LY Kim	MEDECINE INTERNE
MABIT Christian (CS CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE)	ANATOMIE
MAGNE Julien	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE DE LA SANTE ET PREVENTION
MAGY Laurent	NEUROLOGIE
MARCHEIX Pierre-Sylvain	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE
MARIN Benoît	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION
MARQUET Pierre (CS)	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE
MATHONNET Muriel	CHIRURGIE DIGESTIVE
MELLONI Boris (CS)	PNEUMOLOGIE
MOHTY Dania	CARDIOLOGIE
MONTEIL Jacques (CS)	BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE
MOUNAYER Charbel (C.S.)	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE
NATHAN-DENIZOT Nathalie (CS)	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
NUBUKPO Philippe	ADDICTOLOGIE
OLLIAC Bertrand	PEDOPSYCHIATRIE
PARAF François (CS)	MEDECINE LEGALE et DROIT de la SANTE
PLOY Marie-Cécile (CS)	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
PREUX Pierre-Marie	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE DE LA SANTE ET PREVENTION
ROBERT Pierre-Yves (CS)	OPHTALMOLOGIE
ROUCHAUD Aymeric	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE
SALLE Jean-Yves (CS)	MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION

STURTZ Franck (CS)	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
TCHALLA Achille	GERIATRIE ET BIOLOGIE DU VIEILLISSEMENT
TEISSIER-CLEMENT Marie-Pierre	ENDOCRINOLOGIE , DIABETE ET MALADIES METABOLIQUES
TOURE Fatouma (CS)	NEPHROLOGIE
VALLEIX Denis (CS)	ANATOMIE CHIRURGIE GENERALE
VERGNENEGRE Alain (CS)	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE DE LA SANTE et PREVENTION (faisant fonction de CS en CANCEROLOGIE)
VERGNE-SALLE Pascale	THERAPEUTIQUE
VIGNON Philippe (CS)	REANIMATION
VINCENT François (CS)	PHYSIOLOGIE
YARDIN Catherine (CS)	CYTOLOGIE ET HISTOLOGIE

PROFESSEUR ASSOCIE DES UNIVERSITES à MI-TEMPS DES DISCIPLINES MEDICALES

BRIE Joël	CHIRURGIE MAXILLO-FACIALE et STOMATOLOGIE
KARAM Henri-Hani	MEDECINE D'URGENCE
MOREAU Stéphane	EPIDEMIOLOGIE CLINIQUE

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

BOURTHOUMIEU Sylvie	CYTOLOGIE et HISTOLOGIE
COUVE-DEACON Elodie	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
DELUCHE Elise	CANCEROLOGIE
DUCHESNE Mathilde	ANATOMIE et CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES
DURAND Karine	BIOLOGIE CELLULAIRE
ESCLAIRE Françoise	BIOLOGIE CELLULAIRE
FAYE Pierre-Antoine	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
FREDON Fabien	ANATOMIE/CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE
LALOZE Jérôme	CHIRURGIE PLASTIQUE
LE GUYADER Alexandre	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO- VASCULAIRE
LIA Anne-Sophie	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
RIZZO David	HEMATOLOGIE
TERRO Faraj	BIOLOGIE CELLULAIRE
WOILLARD Jean-Baptiste	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE

P.R.A.G

GAUTIER Sylvie	ANGLAIS
-----------------------	---------

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES ASSOCIES A MI-TEMPS

SALLE Laurence

ENDOCRINOLOGIE

PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

DUMOITIER Nathalie (Responsable du département de Médecine Générale)

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS DE MEDECINE GENERALE

HOUDARD Gaëtan

LAUCHET Nadège

SEVE Léa

PROFESSEURS EMERITES

ADENIS Jean-Paul

ALDIGIER Jean-Claude

BESSEDE Jean-Pierre

BUCHON Daniel

DARDE Marie-Laure

DESSPORT Jean-Claude

MERLE Louis

MOREAU Jean-Jacques

TREVES Richard

TUBIANA-MATHIEU Nicole

VALLAT Jean-Michel

VIROT Patrice

Assistants Hospitaliers Universitaires – Chefs de Clinique

Le 16 novembre 2021

ASSISTANTS HOSPITALIERS UNIVERSITAIRES

APPOURCHAUX Evan	ANATOMIE CHIRURGIE DIGESTIVE
BUSQUET Clémence	HEMATOLOGIE
HAZELAS Pauline	BIOCHIMIE
DUPONT Marine	HEMATOLOGIE BIOLOGIQUE
DURIEUX Marie-Fleur	PARASITOLOGIE
LABRIFFE Marc	PHARMACOLOGIE
LADES Guillaume	BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE
LEFEBVRE Cyrielle	ANESTHESIE REANIMATION
LOPEZ Stéphanie	MEDECINE NUCLEAIRE
MARTIN ép. DE VAULX Laury	ANESTHESIE REANIMATION
MEYER Sylvain	BACTERIOLOGIE VIROLOGIE HYGIENE
MONTMAGNON Noëlie	ANESTHESIE REANIMATION
PASCAL Virginie	IMMUNOLOGIE CLINIQUE
PLATEKER Olivier	ANESTHESIE REANIMATION
ROUX-DAVID Alexia	ANATOMIE CHIRURGIE DIGESTIVE

CHEFS DE CLINIQUE - ASSISTANTS DES HOPITAUX

ALBOUYS Jérémie	HEPATO GASTRO ENTEROLOGIE
ARGOULON Nicolas	PNEUMOLOGIE
ASLANBEKOVA Natella	MEDECINE INTERNE
AVRAM Ioan	NEUROLOGIE VASCULAIRE
BEAUJOUAN Florent	CHIRURGIE UROLOGIQUE
BERRAHAL Insaf	NEPHROLOGIE
BLANQUART Anne-Laure	PEDIATRIE (REA)

BOGEY Clément	RADIOLOGIE
BONILLA Anthony	PSYCHIATRIE
BOSCHER Julien	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
CAUDRON Sébastien	RADIOLOGIE
CAYLAR Etienne	PSYCHIATRIE ADULTE
CENRAUD Marie	NEUROLOGIE
CHAUBARD Sammara	HEMATOLOGIE
CHAUVET Romain	CHIRURGIE VASCULAIRE
CHROSCIANY Sacha	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE
COMPAGNON Roxane	CHIRURGIE INFANTILE
CURUMTHAULEE Faiz	OPHTALMOLOGIE
DARBAS Tiffany	ONCOLOGIE MEDICALE
DESCLEE de MAREDSOUS Romain	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
DOUSSET Benjamin	CARDIOLOGIE
DUPIRE Nicolas	CARDIOLOGIE
FESTOU Benjamin	MALADIES INFECTIEUSES ET TROPICALES
FIKANI Amine	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE
FORESTIER Géraud	RADIOLOGIE
GEYL Sophie	GASTROENTEROLOGIE
GIOVARA Robin	CHIRURGIE INFANTILE
GUILLAIN Lucie	RHUMATOLOGIE
LAGOUEYTE Benoit	ORL
LAUVRAY Thomas	PEDIATRIE
LEMNOS Leslie	NEUROCHIRURGIE

MAURIANGE TURPIN Gladys	RADIOTHERAPIE
MOHAND O'AMAR ép. DARI Nadia	GYNECOLOGIE OBSTETRIQUE
PEYRAMAURE Clémentine	ONCOLOGIE MEDICALE
PIRAS Rafaela	MEDECINE D'URGENCE
RATTI Nina	MEDECINE INTERNE
ROCHER Maxime	OPHTALMOLOGIE
SALLEE Camille	GYNECOLOGIE OBSTETRIQUE
SANCHEZ Florence	REANIMATION POLYVALENTE
SEGUY ép. REBIERE Marion	MEDECINE GERIATRIQUE
SERY Arnaud	ORL
TARDIEU Antoine	GYNECOLOGIE OBSTETRIQUE
THEVENOT Bertrand	PEDOPSYCHIATRIE
TORDJMAN Alix	GYNECOLOGIE MEDICALE
TRICARD Jérémy	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE
	MEDECINE VASCULAIRE
VAIDIE Julien	HEMATOLOGIE CLINIQUE
VERNAT-TABARLY Odile	OPHTALMOLOGIE

CHEF DE CLINIQUE – MEDECINE GENERALE

BOURGAIN Clément

RUDELLE Karen

PRATICIEN HOSPITALIER UNIVERSITAIRE

CHRISTOU Niki

CHIRURGIE VISCERALE ET DIGESTIVE

COMPAGNAT Maxence

MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION

HARDY Jérémie

CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE

LAFON Thomas

MEDECINE D'URGENCE

SALLE Henri

NEUROCHIRURGIE

A mon Ange et notre mini-nous
qui dort bien au chaud

Remerciements

A Madame le Professeur Marie-Laure DARDE, qui m'a accueilli dans son service et m'a enseigné beaucoup de ce que je sais aujourd'hui. Merci aussi d'avoir voulu être ma directrice de thèse, de me soutenir et merci de toute la confiance que vous avez placée en moi.

A Madame le Professeur Sophie ALAIN, qui m'a permis de travailler sur un projet de séquençage et a accepté d'être la Présidente de mon Jury de thèse.

A Madame le Professeur Sylvie ROGEZ, qui êtes la première biologiste à m'avoir accueilli au CBRS du CHU de Limoges. Merci à vous qui m'avez écouté et soutenu dans mes projets de thèse, d'encadrement de Master 1 (Carolina CODREANU, que je remercie aussi), de projet de Master 2 et des projets d'avenir pour le service de Parasitologie-Mycologie.

A Madame le Professeur Françoise BOTTEREL, qui m'avez accueilli pour faire un stage d'inter-CHU à Henri MONDOR, ce qui m'a permis d'avoir une expérience supplémentaire pour ma thèse et en Parasitologie-Mycologie. Merci aussi de m'avoir soutenu et permis d'intégrer votre équipe de recherche pour mon Master 2.

A Madame le Docteur Marie-Fleur DURIEUX, merci pour ton aide, ton soutien, ton enseignement, ta bonne humeur dans le service, je suis heureux d'être ton premier interne. Merci aussi pour les barbecues, les apéros d'insectes, les échanges d'outils de jardinage et ce qu'on a pu échanger amicalement en dehors du travail.

En dehors de mon Jury, je tiens à remercier le Professeur Daniel AJZENBERG, qui malgré une divergence d'opinion sur certains points m'a beaucoup appris sur la Parasitologie-Mycologie, parfois même autour d'un bon repas. Merci aussi au Docteur Bernard Bouteille pour ces moments de mycologie décontractés mais néanmoins stimulants.

Merci aussi à tous ceux de l'équipe de Parasitologie-Mycologie de Limoges, de m'avoir appris, montré, écouter raconter des bêtises et toujours dans la bonne humeur ... merci à Annabelle, Florence, Hélène, Laure, Valérie, Vicky, Mickael et Mickael pour ce que vous m'avez apporté chacun tant sur le plan de ma formation que personnel.

Merci aussi à toute l'équipe de microbiologie avec qui nous partageons cet étage. Les citer serait trop long mais je remercie toute l'équipe de Bactériologie, Virologie, d'Hygiène et le centre de prélèvement sans oublier la stérilisation, la biologie moléculaire, la sérologie manuelle et automatisée, merci aussi à l'équipe de ménage et aux secrétaires avec qui nous avons échangés de bons moments.

Plus récemment je tiens aussi à remercier l'équipe de Parasitologie-Mycologie de Henri MONDOR, tous les biologistes qui malgré une activité tendue prennent le temps quand il le faut d'expliquer avec bienveillance, mes co-internes surtout Amandine et Hippolyte avec qui nous avons partagés des bons moments, l'ensemble des techniciens pour leur bonne humeur et m'avoir fait passer l'idée que les Parisiens étaient froids et distants. Merci aussi la réception centralisée un peu déjantée mais sympathique, les secrétaires avec toujours un mot gentil, les cadres à l'humour jovial, l'équipe d'envoi des paludismes qui nous voyaient tous les jours ou presque ...

Je remonte le temps et tiens particulièrement à remercier certaines équipes grâce à qui j'ai pu aimer mon parcours et parcourir ce que j'aime : l'équipe de Médecine Interne B au

Cluzeau et à Dupuytren 2 depuis 2019, notamment au Docteur Pauline VITAL et au Professeur Marie Pierre TEISSIER. Je remercie aussi toute l'équipe de Néphrologie qui a déménagé aussi, l'équipe de Diabétologie de Tullès et l'équipe du « MIRMIT » (ou P10 pour les intimes) à Brive. Dans tous ces centres hospitaliers durant ma vie de clinicien, je tiens aussi à remercier les 3 équipes des urgences qui effectuent un travail dur dans des conditions parfois difficiles mais qui savent faire rire les internes à 7 heures du matin, quand le soleil se lève gentiment parce qu'il a dormi lui ...

Que serait une vie d'interne sans tous ses co-internes, tous ses camarades d'internat à Tullès qui font une bataille de pomme de terre et pensent à nettoyer que le lendemain, ces compagnons de comptoir qui connaissent le seul bar de Limoges ouvert le lundi et qui porte le nom de 2 internes du service ! Les co-internes qui ne mangent pas de crustacés et ceux à qui il ne faut surtout pas donner de fruits à coque sous peine d'appeler la réanimation. Les co-internes qui bravent la neige aux portes du Sud. Ainsi que tous les internes, mes co-internes, mes camarades du CBRS, camarades de garde, compagnons de babyfoot (ça me manque) ... de soirées arrosées ou non, d'Halloween, de père Noël secret, de galère administrative, de Beaufferie. Merci à vous qui avez su m'accueillir dans cette terre Limougeaude qui me faisait peur avant ...

Avant car oui, de mes études à Poitiers, la capitale du monde moderne avec le Futuroscope à deux pas. J'ai effectué 5 années merveilleuses dans cette belle ville et 17 autres dans cette région qui m'a vu naître et grandir. Merci à mes amis « d'avant Limoges » qui le restent encore et pour longtemps mes plus vieux amis, certains bientôt 20 ans ... Une simple page ne pourrait accueillir tous les remerciements et l'amitié que je vous porte, de même que de simples regards curieux ne pourraient déceimment lire toutes les bêtises que nous avons pu faire, dire, vivre, échanger au sein de ses années.

Merci à ma famille sans qui je ne serais pas là, principalement ma maman, Maryse, mon papa, Jean-Claude et mon frère Clément ... bien qu'une évidence il est à noter que sans le goût d'apprendre, le goût de la connaissance, le goût d'aider ceux qui en ont besoin ainsi que mon attirance sur le cérébral plutôt que le manuel je ne serais pas là. Merci aussi à ma « nouvelle famille » qui m'a accueillie le 6 mars 2021 et grâce à qui j'ai deux fois plus d'amour à partager.

Merci à mes amis moldus (= non-médecins) Sandra et Tommy... qui ne m'ont pas connu médecin, ni étudiant mais avec qui nous partageons pourtant des passions communes : une cabane à construire au bord d'une piscine, un barbecue, des escapes games autour d'un saucisson ...

Merci à Maud pour ces 5 ans de vie commune entre mon passage sans domicile fixe dans ton appartement rue des Arts, notre premier appartement avec l'arrivée de Moustache (le chat), notre première maison et enfin notre vraie maison à nous 2 ... bientôt 3 grâce à mini-nous qui sera accueilli dans un cocon d'amour. Tu sais à quel point je t'aime et à quel point je ne serais que la moitié vide de moi-même sans toi. Ce papier est trop court pour y coucher tout ce que je pense de toi mais la crapule que tu portes te rappelle chaque jour que je suis auprès de toi.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

I. Introduction	25
II. Généralités	26
II.1. Classification des principaux types de champignons mis en évidence dans le laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Limoges.....	27
II.2. Principaux champignons mis en évidence dans le laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Limoges.....	28
II.2.1. Les levures	28
II.2.2. Les champignons filamenteux	30
II.2.2.1. Les Hyphomycètes.....	30
II.2.2.1.1. Hyalohyphomycètes ou mucédinés	30
II.2.2.1.2. Phaeohyphomycètes ou dématiés	33
II.2.2.2. Les dermatophytes.....	33
II.2.2.3. Les Mucorales.....	34
II.2.3. Les dimorphiques	35
II.2.4. Les champignons atypiques	35
II.3. Mise en évidence et identification des champignons en pratique courante.....	35
II.3.1. Recueil du prélèvement primaire et état frais.....	36
II.3.2. Mise en culture dans différents milieux	36
II.3.3. Identification morphologique, macroscopique et microscopique	37
II.3.4. Identification au spectromètre de masse	38
II.3.5. Identification par PCR.....	40
II.3.6. Identification par séquençage.....	40
II.3.6.1. Principe du séquençage.....	40
II.3.6.2. Choix des régions à séquencer	41
III. Matériels et Méthodes	43
III.1. Matériels	43
III.2. Méthodes	44
III.2.1. Régions et amorces utilisées.....	44
III.2.1.1. Choix de séquencer ITS1 et ITS2 séparément.....	44
III.2.1.2. Choix de séquencer ITS1 et ITS2 ensemble	45
III.2.1.3. Choix des amorces utilisées.....	45
III.2.2. Extraction de l'ADN fongique.....	47
III.2.2.1. Extraction de l'ADN fongique à partir de cellules en culture	48
III.2.2.2. Extraction d'ADN fongique à partir de pièces opératoires.....	48
III.2.3. Amplifications des régions d'intérêts.....	48
III.2.3.1. Amplification des régions <i>ITS1</i> et <i>ITS2</i>	49
III.2.3.2. Amplification de la région <i>ITS</i> globale	50
III.2.3.3. Amplification des régions de la <i>β-tubuline</i> et de la <i>Calmoduline</i>	51
III.2.4. Migration et révélation des produits d'amplifications par PCR.....	52
III.2.5. Purification des produits d'amplification par PCR.....	53
III.2.6. Réalisation de la PCR de séquence	53
III.2.7. Purification des produits de PCR de séquence.....	54
III.2.8. Séquençage SANGER	55
III.2.9. Traitement des données de séquençage.....	56
III.2.9.1. Vérification de la qualité des chromatogrammes par GENEIOUS	56

III.2.9.2. Identification dans une banque de données à partir de la base BLAST	58
III.2.9.3. Identification dans une banque de données à partir de la base MycoBank ..	60
IV. Résultats	62
IV.1. Résultats des extractions	62
IV.2. Résultats des amplifications par PCR et des migrations sur gel d'agarose	63
IV.3. Résultats du séquençage SANGER	65
IV.3.1. Résultats du séquençage ciblant les régions <i>ITS1</i> et <i>ITS2</i>	66
IV.3.2. Résultats du séquençage de la région <i>ITS</i> globale.....	68
IV.4. Application des résultats sur les identifications rendues par le laboratoire	68
V. Discussion	72
V.1. Matrices d'échantillons à séquencer	72
V.2. Choix des méthodes utilisées	72
V.2.1. Choix de la méthode d'extraction pour les cellules fongiques.....	72
V.2.2. Choix du gène cible à séquencer	73
V.2.3. Choix du protocole de séquençage SANGER	73
V.2.4. Choix de la base de données utilisée pour explorer les banques de données.....	73
V.3. Apports du séquençage SANGER dans les cas étudiés dans cette thèse	73
V.3.1. Etude des cas discordants	74
V.4. Indication du séquençage SANGER dans l'identification de champignons	75
V.5. Discussion de l'aspect financier du séquençage SANGER dans l'identification de champignon d'identification difficile	76
V.6. Evoquer d'autres pistes dans l'identification des champignons.....	77
VI. Conclusion et perspectives	79
Références bibliographiques	80
Annexes	84
Annexe 1. Protocole d'extraction de l'ADN fongique de l'étude STEFI.....	85
Annexe 2. Tableau des milieux ensemencés et des températures d'incubations selon la nature de l'échantillon primaire	86
Annexe 3. Protocole retenu pour séquençage dans le service de Parasitologie-Mycologie du CHU de Limoges.....	87
Annexe 4. Serment d'Hippocrate	94

Table des illustrations

Figure 1 : Schéma d'une levure et photo d'un aspect microscopique d'une culture de <i>Candida albicans</i> x40	29
Figure 2 : Photos de <i>Cryptococcus neoformans</i> en examen direct à l'encre de Chine avec bourgeonnement et absence de contraste révélant la capsule x40.....	29
Figure 3 : Schéma d'un <i>Aspergillus sp.</i> et photo d'un aspect microscopique d'une culture d' <i>Aspergillus fumigatus</i> x40	31
Figure 4 : Schéma et photo d'un aspect microscopique d'un <i>Penicillium sp.</i> au grossissement x 40	32
Figure 5 : Répartition des espèces de mucorales en fonction du terrain du patient	34
Figure 6 : Principe du séquençage selon la méthode de Sanger	41
Figure 7 : Représentation schématique de l'ADN ribosomique	46
Figure 8 : Les régions ITS1, ITS2 et la position relative des amorces.....	47
Figure 9 : Composition de la paroi fongique	47
Figure 10: Schéma du programme d'amplification par PCR pour les cibles <i>ITS1</i> et <i>ITS2</i> ...	50
Figure 11: Schéma du programme d'amplification par PCR pour la <i>β-tubuline</i> et <i>Calmoduline</i>	52
Figure 12 : Schéma du programme d'amplification par PCR pour la PCR de séquence	54
Figure 13 : Présentation d'une séquence simple brin de bonne qualité sur Geneious®	56
Figure 14 : Paramètres d'alignement à renseigner dans BLAST®	60
Figure 15 : Présentation de l'outil MycoBank.....	61
Figure 16 : Migration sur gel d'agarose 0,5% du fragment <i>ITS2</i> (PCR, 35 cycles).....	63
Figure 17 : Migration sur gel d'agarose 0,5% du fragment <i>ITS1</i> (PCR, 35 cycles)	63
Figure 18 : Migration sur gel d'agarose 0,5% du fragment <i>ITS1</i> (PCR, 42 cycles).....	63
Figure 19 : Migration sur gel d'agarose 1% des fragments <i>ITS1</i> et <i>ITS2</i>	64
Figure 20 : Migration sur gel d'agarose 0,5% des fragments <i>ITS1</i> et <i>ITS2</i> (PCR, 42 cycles ; Extraction : lyse mécanique et kit QIAamp DNA Mini kit).....	64
Figure 21 : Migration sur gel d'agarose 1% des fragments <i>β-tubuline</i> et <i>Calmoduline</i>	65
Figure 22 : Schéma du programme d'amplification par PCR pour la cibles <i>ITS1</i>	89
Figure 23 : Schéma du programme d'amplification par PCR pour la PCR de séquence	92

Table des tableaux

Tableau 1 : Sensibilités de diverses <i>Aspergillus section fumigati</i> aux Azolés et à l'Amphotéricine B.....	39
Tableau 2 : Nombres d'espèces de moisissures/dermatophytes identifiables par les différentes bases de données disponibles de 2014 à 2020.	39
Tableau 3 : Identifications fongiques avant séquençage des prélèvements utilisés dans ce travail	43
Tableau 4 : Amorces utilisées pour les cibles ITS1, ITS2 et ITS total	46
Tableau 5 : Amorces utilisées pour les cibles β -tubuline et Calmoduline	46
Tableau 6 : Préparation des milieux réactionnels pour les PCR des régions <i>ITS1</i> et <i>ITS 2</i> ..	49
Tableau 7 : Préparation des milieux réactionnels pour les PCR de la région <i>ITS</i> globale	51
Tableau 8 : Préparation des milieux réactionnels pour les PCR de la région <i>β-tubuline</i> et <i>Calmoduline</i>	51
Tableau 9 : Préparation des milieux réactionnels pour les PCR de séquences	54
Tableau 10 : Nucléotides artificiels correspondant à un doute entre plusieurs nucléotides existants	57
Tableau 11 : Tableau des résultats des séquençages par méthode SANGER	66
Tableau 12 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus selon gène amplifié.....	69
Tableau 13: Tableau des résultats finaux pour chaque prélèvement	71
Tableau 14 : Cas discordants entre l'identification sans et avec séquençage	74
Tableau 15 : Prix des kits consommables nécessaires à la réalisation d'un séquençage Sanger dans le CBRS du CHU de Limoges.....	77
Tableau 16 : Conservation préparation + colonie fongique à extraire	87
Tableau 17 : Conservation extraction fongique avant amplification.....	88
Tableau 18 : Préparation des mix pour les PCR.....	89
Tableau 19 : Conservation de l'ADN fongique amplifié	89
Tableau 20 : Conservation de l'ADN fongique amplifié et purifié	91
Tableau 21 : Préparation des milieux réactionnels pour les PCR de séquences.....	91
Tableau 22 : Conservation de l'ADN fongique après amplification de séquence.....	92

Table des abréviations

18S : petite sous-unité de l'Acide Ribonucléique ribosomique

28S : composants 28S de la grande sous-unité de l'Acide Ribonucléique ribosomique

3'OH : l'extrémité hydroxyle en position 3

5'P : l'extrémité phosphate en position 5

5.8S : composants 5.8S de la grande sous-unité de l'Acide Ribonucléique ribosomique

ABPA : Aspergillose Broncho Pulmonaire Allergique

ADN : Acide Désoxyribonucléique

APC : Aspergillose Pulmonaire Chronique

API : Aspergillose Pulmonaire Invasive

ARN : Acide Ribonucléique

ARNr : Acide Ribonucléique ribosomique

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

BPCO : Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive

CBRS : Centre Biologique et Recherche en Santé

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CMC : Chronic Mucocutaneous Candidiasis, Candidoses cutanéomuqueuses chroniques

CNRMA : Centre national de référence des Mycoses invasives et antifongiques

ddNTP : didésoxyribonucléotides triphosphates

dNTP : désoxyribonucléotides triphosphates

IFI : Infection Fongique Invasive

ISHAM : International Society for Human and Animal Mycology

ITS : Région comprenant les gènes non codants « Internal Transcribed Spacer 1 et 2 » ainsi que 5.8S

ITS1 et *ITS 2* : Gènes non codants « Internal Transcribed Spacer 1 et 2 »

LCS : Liquide Cérébro-Spinal

MALDI-ToF : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight

MSI : biological-Mass-Spectrometry-Identification

MGG : May Grünwald Giemsa

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDB : Paires de bases

PNE : Polynucléaire Eosinophile

PNN : Polynucléaire Neutrophile

PPI (eau) : pour préparation injectable (Eau)

RESSIF : RESeau de Surveillance des Infections Fongiques invasives

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

I. Introduction

Les champignons constituent le règne des *Fungi* et représentent après celui des insectes le second taxon en termes de diversité biologique^{1,2}.

En pathologie humaine, les champignons peuvent être responsables d'intoxications ou mycotoxicoses, de pathologies de type immunoallergiques ou d'infections fongiques¹. La biologie médicale dans le laboratoire hospitalier de Parasitologie-Mycologie, traite principalement du versant infectieux des champignons et dans une moindre mesure du versant immuno-allergique de certains champignons comme l'Aspergillose Broncho Pulmonaire Allergique (ABPA), ou l'immunisation due à l'exposition répétée à des antigènes fongiques comme ceux recherchés chez les fermiers. La prise en charge de patients présentant une infection fongique est différente d'un champignon à l'autre et nécessite donc une identification de celui-ci.

L'une des principales activités du service de Parasitologie-Mycologie du CHU de Limoges est l'identification fongique de prélèvements de patients (6 450 demande d'analyses mycologique hors recherche d'antigène et PCR sur un total de 18 750 actes sur le total de l'année 2020³). Cette identification peut se faire de différentes façons, soit à l'examen direct du prélèvement, soit par la culture sur milieux chromogènes ou favorisant la fructification du champignon, soit par analyse du spectre protéique, soit par biologie moléculaire. Malgré tout cet arsenal, il existe des champignons qui ne sont pas identifiables au rang d'espèce, soit car ils ne comportent pas de caractéristiques suffisamment discriminantes au niveau morphologique, soit car les analyses spectrométriques n'ont pas permis leurs identifications.

Depuis quelques décennies, l'approche génomique est utilisée en biologie et une approche d'identification fongique s'est développée à la suite de la première réunion internationale « DNA Barcoding » qui s'est tenue à Londres en 2005⁴. Cette approche de séquençage de l'ADN fongique permet une identification au rang d'espèce avec une technique de séquençage SANGER sur une région exprimée par tous les champignons mais suffisamment discriminante entre les espèces. Il s'agit d'une technique longue de plusieurs jours et même si d'autres services de Parasitologie-Mycologie l'utilisent, nous ne savons pas si elle peut être mise en place dans le service de Parasitologie-Mycologie du CHU de Limoges.

L'objectif principal de ce travail de thèse est de mettre au point une technique de séquençage Sanger pour permettre d'identifier les champignons d'identification difficile afin de l'inscrire en routine dans le service. Pour cela nous réaliserons d'abord les tests nécessaires afin d'analyser si la technique fonctionne et nous l'optimiserons afin qu'elle s'intègre à la routine du service. Puis, nous ferons une analyse des données obtenues et mettrons en place les indications retenues pour son usage. Ensuite, nous approximerons le coût que cela représenterait pour le service. Enfin nous étudierons les autres axes possibles d'amélioration de l'identification fongique.

II. Généralités

Une bonne identification pour une bonne interprétation, c'est primordial dans la prise en charge en biologie médicale, surtout dans le domaine de la microbiologie. La prise en charge globale du patient nécessite une bonne identification du potentiel pathogène, une bonne connaissance de sa virulence et des capacités du patient à résister à cette infection.

Les infections à champignons, les mycoses, peuvent être retrouvées dans tous les domaines de la médecine, dans tous les sites de prélèvements. Elles peuvent présenter une clinique bénigne ou gravissime selon le site infecté et/ou le champignon en cause : un *Candida albicans* dans un prélèvement respiratoire ne sera interprété que comme un contaminant de la flore digestive haute, alors qu'il lui sera attribué jusqu'à 47% de mortalité s'il est retrouvé dans une hémoculture⁵. Les différents sites infectés peuvent l'être par diverses espèces de champignons, ou le même champignon peut infecter des sites différents : les moisissures comme le *Fusarium sp.* peuvent infecter l'œil en cas de traumatisme végétal, l'ongle en cas de dépôt d'une spore (appelée conidie) puis de développement sur l'ongle ou même disséminer en cas de pénétration par une brèche cutanée ou unguéale principalement chez le patient atteint d'hémopathie maligne⁶. Un même champignon peut aussi avoir de multiples formes cliniques pour le même site infectieux. L'*Aspergillus sp.* peut atteindre le poumon par l'inhalation de conidie et n'être que de passage, évacué par les cellules ciliées ou les polynucléaires neutrophiles (PNN). Mais peut aussi entraîner des Aspergilloses Pulmonaire Chroniques (APC) diverses ou encore selon le terrain du patient une Aspergillose Pulmonaire Invasive (API), grave¹.

En dehors des champignons qui causent des infections fongiques, nous pouvons trouver dans des prélèvements biologiques, plusieurs types de champignons qui ne sont pas pathogènes sans pour autant faire partie de notre flore permanente. Les *Penicillium sp.* dans des crachats ne provoqueront pas de symptômes et sont des champignons de l'environnement naturellement inhalés et expirés par le patient. Ils peuvent être recueillis lors du prélèvement. Aussi, le *Saccharomyces cerevisiae*, champignon retrouvé dans l'alimentation, est commensal du tube digestif, il se nourrit de matière organique sans entraîner de spoliation ni de trouble pour l'hôte. Le retrouver dans des selles ne signifie rien de plus qu'une colonisation et cela n'explique pas d'éventuels symptômes.

Les infections fongiques peuvent présenter schématiquement des formes cliniques exclusivement superficielles, les infections cutanéomuqueuses. Celles-ci sont le plus souvent bénignes bien que potentiellement handicapantes sur le plan esthétique (dermatophytose, *Pityriasis versicolor*...), ou douloureuses sur le plan fonctionnel (candidose vaginale, kératite fongique ...). Ces infections superficielles peuvent nécessiter un traitement parfois long. Par opposition, les infections fongiques invasives (IFI) sont le plus souvent graves voire mortelles. Au cours de la dernière décennie en France, l'évaluation de la mortalité à 3 mois des IFI représente environ la moitié des patients^{7,8}. Outre ce coût humain énorme, certaines études anciennes estiment à 20 000 ou 30 000 € le coût d'une IFI avec un coût global annuel approchant les 100 millions d'euros⁹. Ce coût et ce nombre d'IFI a peut-être évolué lors de la pandémie récente SARS-CoV-2. Les patients hospitalisés avec une inflammation respiratoire suite à une infection par le SARS-CoV-2, parfois en réanimation, présentent un terrain pour faire une API^{10,11}. Il convient aussi de dire que certaines pathologies fongiques peuvent toucher la peau et les organes internes lors par exemple d'une dissémination fongique invasive entraînant des embolies septiques sous cutanées ou une porte d'entrée cutanéomuqueuse

évoluant par une dissémination secondaire. Nous n'évoquerons pas dans ce travail les rares pathologies génétiques entraînant des candidoses cutanéomuqueuses chroniques (CMC).

En plus de toutes les atteintes possibles superficielles, profondes, à champignon pathogène ou non, il est possible de mettre en évidence dans des prélèvements non stériles ou prélevés dans des conditions d'asepsie non strictes des champignons de l'environnement, présents dans l'air ou sur le patient lors de son prélèvement. Nous ne ferons qu'évoquer les éventuelles identifications de *Penicillium spp.* qui ne correspondent pas à une infection fongique. Dans ces cas, la mise en évidence d'un champignon de l'environnement à la culture permet de le classer comme un contaminant aérien sans lien avec le patient. Ces champignons non pathogènes peuvent ne pas être identifiés à l'espèce et s'ils sont trouvés dans des prélèvements profonds ou sur des sites stériles de façon chirurgicale il est nécessaire de pousser les investigations afin mettre en évidence un possible lien entre le champignon et les symptômes du patient.

Il existe donc dans tous les types de prélèvements diverses espèces de champignons qui peuvent ou non être pathogènes. Pour pouvoir affirmer la pathogénicité d'un champignon chez un patient, il nous faut l'identifier et de cette identification découlera l'abstention thérapeutique pour les champignons non pathogènes ou les traitements plus ou moins lourds suivant le champignon mis en évidence. Nous allons donc voir ici, les principaux types de champignons que nous pouvons mettre en évidence dans le service de Parasitologie-Mycologie du CHU de Limoges, nous verrons les moyens mis en place pour identifier le champignon et les interprétations que nous pouvons rendre selon le champignon mis en évidence.

II.1. Classification des principaux types de champignons mis en évidence dans le laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Limoges.

Il existe plusieurs classifications des champignons, les classifications phylogéniques à partir d'ancêtres communs, une classification taxonomique et une classification plus pratique utilisée dans le milieu médical pour la prise en charge pratique des patients. Nous ne ferons que les évoquer dans ce travail. Nous n'utilisons en pratique courante que la dernière, basée sur l'aspect morphologique des champignons en culture et observé au microscope. Elle permet de faire une identification entre des différences spécifiques de plus en plus discriminantes, basées sur une démarche dichotomique.

Cette classification morphologique permet de se repérer classiquement en médecine humaine en distinguant plusieurs formes de champignons microscopiques :

- Les levures, qui sont petites et se multiplient par bourgeonnement, peuvent ou non former des pseudo-filaments voir des filaments mycéliens comme les *Candida albicans*.
- Les champignons filamenteux, distingués microscopiquement et macroscopiquement des levures par la formation d'un thalle filamenteux. Celui-ci peut être septé, fin, régulier, avec des ramifications en angle aigu et est appelé Hyphomycète. Ou il peut être plus grossier, épais à bords non parallèles et non septé (il sera alors siphonné) avec un aspect enrubanné et correspondra à la catégorie des Mucorales citée plus haut (parmi les Zygomycètes).
- Parmi ces Hyphomycètes sont distingués les Hyalohyphomycètes (champignons clairs) et les Phaeohyphomycètes (les dématiés, champignons pigmentés). Nous retrouvons dans les Hyalohyphomycètes les *Aspergillus*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Fusarium*,

Scedosporium ... et dans les Phaeohyphomycètes les *Alternaria*, *Bipolaris*, *Cladosporium*, *Exophiala*, *Ulocladium* ...

- Parmi les Mucorales nous avons la famille des Mucoraceae avec la majorité des Mucorales pathologiques en France : *Mucor*, *Rhizopus*, *Rhizomucor* et *Lichthemia*. Il y a aussi d'autres genres de Mucorales, plus rarement retrouvés en clinique courante comme *Cunninghamella* ou *Syncephalastrum* ...

- Nous classons à part parmi les champignons filamenteux les dermatophytes présentant des caractéristiques morphologiques, métaboliques et cliniques à part.

Nous retrouvons aussi dans cette classification, les champignons dimorphiques, qui ont généralement une forme filamenteuse infectante dans le milieu extérieur et en culture, l'Humain se contamine par respiration de spores et le champignon se développe sous forme de levures dans son organisme comme dans le cas de l'histoplasmose à *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*.

Il y a aussi des champignons « atypiques » pour lesquels il n'y a pas encore de classification morphologique simple, nous y retrouvons les Microsporidies et *Pneumocystis jirovecii*, l'agent de la pneumocystose.

Certaines espèces ne peuvent être différenciées morphologiquement et sont appelées « espèces cryptiques », nous verrons des exemples de ces espèces lorsque nous aborderons les *Aspergillus*. Maintenant classés par choix morphologique, nous allons les décrire.

II.2. Principaux champignons mis en évidence dans le laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Limoges

Nous exposerons ici par soucis de logique vis-à-vis de notre démarche en laboratoire, une classification morphologique plus à même d'être utilisée en biologie médicale quotidiennement. Cette classification selon l'aspect morphologique est la base de l'arbre diagnostic permettant une identification morphologique au microscope détaillée par la suite.

II.2.1. Les levures

Les levures sont des champignons unicellulaires ronds ou obovoïdes se reproduisant par bourgeonnement¹. Certaines levures, à force de bourgeonner de façon successive, peuvent former un pseudomycélium. Certaines autres comme *Candida albicans* peuvent former un véritable filament mycélium.

Les levures regroupent plusieurs types de pathogènes ou de champignons non pathogènes retrouvés en clinique médicale, parmi lesquels se trouvent les genres *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia*, *Saccharomyces*, *Saprochaete*, *Trichosporon*, *Rhodotorula*. Nous pouvons en retrouver une grande partie dans notre mycobiome en porteur sain (exemple *Malassezia* sur le mycobiome cutané sain^{12,13}, dans le mycobiome de patients souffrant de certaines situations pathologiques (les patients atteints de mucoviscidose vont avoir tendance à avoir plus de *Candida* ou d'*Aspergillus* dans leur système respiratoire¹⁴ ou encore dans des situations pathologiques directement en rapport avec le champignon (un *Cryptococcus* dans un liquide cérébro spinal (LCS) ne pourra pas être considéré comme un portage asymptomatique)¹⁵).

Genre *Candida* : Les *Candida spp.* sont les principales levures retrouvées dans les prélèvements dans le laboratoire de Parasitologie-Mycologie et dans la majorité des cas le

Candida albicans est le plus souvent retrouvé. *Candida albicans* est un *Candida* commensal du tube digestif et des voies aériennes supérieures¹⁵, il est aussi impliqué dans des processus pathogènes et est même celui le plus impliqué dans les infections fongiques invasives (IFI) en 2019 en France avec plus de la moitié des IFI à levure⁸. Parmi les autres *Candida* retrouvés dans le laboratoire, nous citerons *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* etc ... Avec *Candida albicans*, il s'agit des 5 *Candida* les plus retrouvés dans les IFI des 3648 patients hospitalisés entre 2004 et 2008 au Canada et aux USA¹⁶. Ces données sont corrélées à celles des IFI françaises de 2019⁸. La candidémie à *Candida albicans* représente une mortalité élevée jusqu'à 47%⁵. A noter que le *Candida parapsilosis* présente comme particularité de se retrouver sur la peau de façon commensale et non dans le tube digestif.

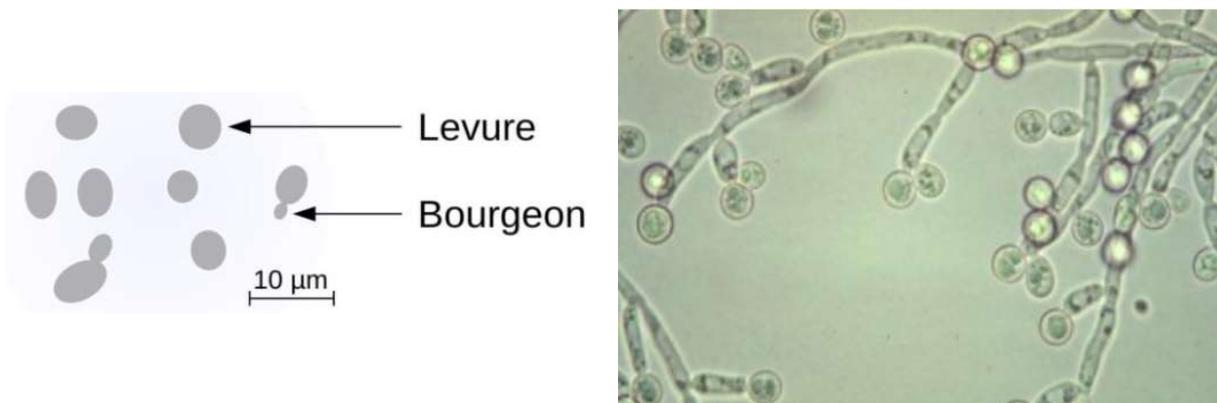


Figure 1 : Schéma d'une levure et photo d'un aspect microscopique d'une culture de *Candida albicans* x40 (Sources : images Google libres de droits)

Genre *Cryptococcus* : Principalement représentée en médecine humaine par *Cryptococcus neoformans*⁸, cette levure cosmopolite présente une capsule polysaccharidique participant à sa virulence¹⁷. Cette capsule peut être mise en évidence de façon négative autour d'une levure lors d'un examen de LCS à l'encre de Chine.

Il s'agit de levure basidiomycète, retrouvée habituellement dans le tube digestif des oiseaux¹⁷ et est principalement retrouvée dans le LCS des patients très immunodéprimés, principalement séropositifs au Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH).

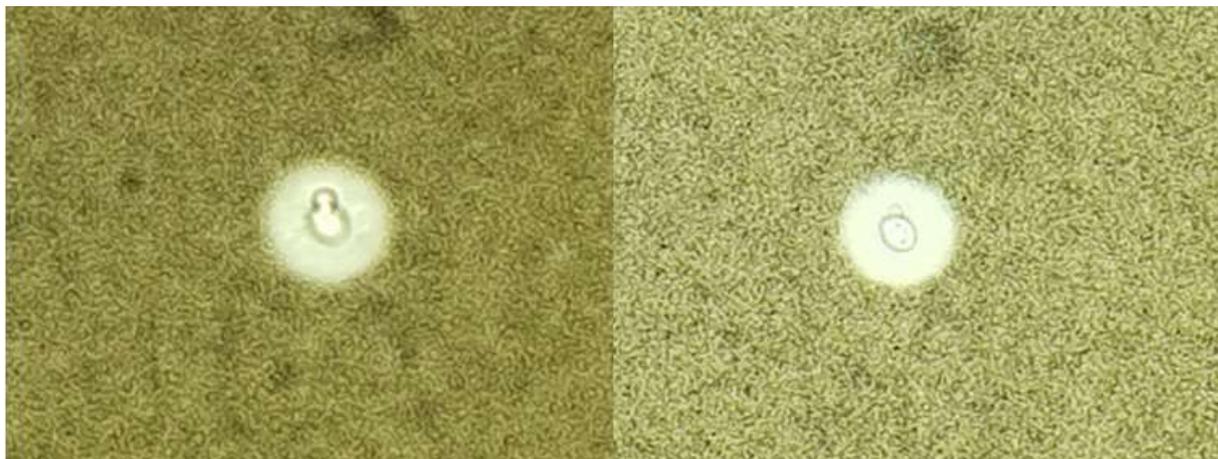


Figure 2 : Photos de *Cryptococcus neoformans* en examen direct à l'encre de Chine avec bourgeonnement et absence de contraste révélant la capsule x40

(Sources : images prises au laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Limoges, photo Sarah MAFI)

Genre *Malassezia* : Levures commensales de l'épiderme du sujet sain, elles sont généralement lipophiles et kératinophiles¹⁸. Elles peuvent être retrouvées sur la peau d'un patient sain ou être retrouvées en plus grande quantité dans le mycobiote cutané de patients atteints de dermatite atopique, de dermatite séborrhéique¹⁵ ou dans le système nerveux central de patients atteints de maladie d'Alzheimer¹⁹. Beaucoup d'études sont en cours sur l'impact d'une dysbiose mycobiotique dans l'origine des maladies ou de celui de la maladie sur une modification du mycobiote. La *Malassezia* est rarement retrouvée dans le cadre d'IFI^{8,18}.

Genre *Saccharomyces* : Levure retrouvée dans la bière, le pain, le vin etc... car utile à la fermentation. Il n'est pas rare de la retrouver dans le tube digestif de patients consommant des aliments contenant du *Saccharomyces cerevisiae* ou qui prennent des probiotiques à base de *Saccharomyces boulardii*. La présence d'anticorps anti-*Saccharomyces cerevisiae* dans le sang du patient, en cas de maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI) est un argument orientant vers une maladie de Crohn²⁰. Dans l'étude ARTEMIS portant sur les fongémies à levure, environ 0.5% des levures incriminées correspond soit à *Saccharomyces*, soit *Saprochaete*, soit *Trichosporon* soit *Rhodotorula*^{18,21}.

Genre *Saprochaete* : Levure retrouvée dans la nature ou l'alimentation, elle est le plus souvent retrouvée dans le tube digestif ou les selles de patients, parfois retrouvée au carrefour aérodigestif²² et n'est qu'exceptionnellement à l'origine de pathologie humaine^{8,18}.

Genre *Trichosporon* : Levure basidiomycète, se développant, comme *Saprochaete* en arthrospore et présentant une résistance naturelle aux echinocandines. Il n'est pas bon de traiter par Amphotéricine B liposomale avant la réalisation d'un antifongogramme (car l'espèce principalement isolée, *Trichosporon asahii*, présente le plus souvent des CMI élevées à l'Amphotéricine B). Dans ce cas de fongémie à *Trichosporon* il convient donc de préférer un traitement probabiliste par Voriconazole. Cette prise en charge particulière n'est qu'un exemple mais permet de comprendre l'importance de l'identification fongique.

Genre *Rhodotorula* : Levure commensale de la peau, très peu retrouvée en biologie médicale impliquée en pathologie¹⁸ mais 2^{ème} IFI parmi les fongémies à basidiomycètes en France en 2019, derrière une grande majorité de *Cryptococcus neoformans*⁸.

II.2.2. Les champignons filamenteux

Parmi les champignons filamenteux, nous ferons le distinguo entre les champignons filamenteux septés, décrits comme Hyphomycètes et regroupant les Hyalohyphomycètes et les Phaeohyphomycètes, puis décrivons les Mucorales.

II.2.2.1. Les Hyphomycètes

Ces champignons filamenteux se distinguent par la présence ou non de mélanine (ou apparenté) qui donne une pigmentation foncée aux champignons de la catégorie des Phaeohyphomycètes et permet de classer dans les champignons hyalins ou Hyalohyphomycètes les champignons dépourvus de ces pigments mélaniques²³.

II.2.2.1.1. Hyalohyphomycètes ou mucédinés

Parmi les plus souvent rencontrés en biologie humaine, nous décrivons ici ceux fréquemment observés dans le service de Parasitologie-Mycologie.

Genre *Aspergillus* : Champignon présentant un thalle filamenteux et septé, avec des ramifications en angle aigu. Certaines ramifications présentent une « tête » aspergillaire constituée d'une vésicule, d'une rangée périphérique de phialides avec parfois des métules entre les deux, ces phialides forment des conidies. Cet ensemble formant la tête aspergillaire est soutenu par un conidiophore le reliant au mycélium constituant les ramifications du thalle de l'*Aspergillus*. L'identification d'espèce ou de section d'espèces peut se faire à l'aide du microscope optique par des caractéristiques propres à chaque section, mais l'appui de la spectrométrie de masse ou de la biologie moléculaire permet une plus grande spécificité quant au diagnostic d'espèce.

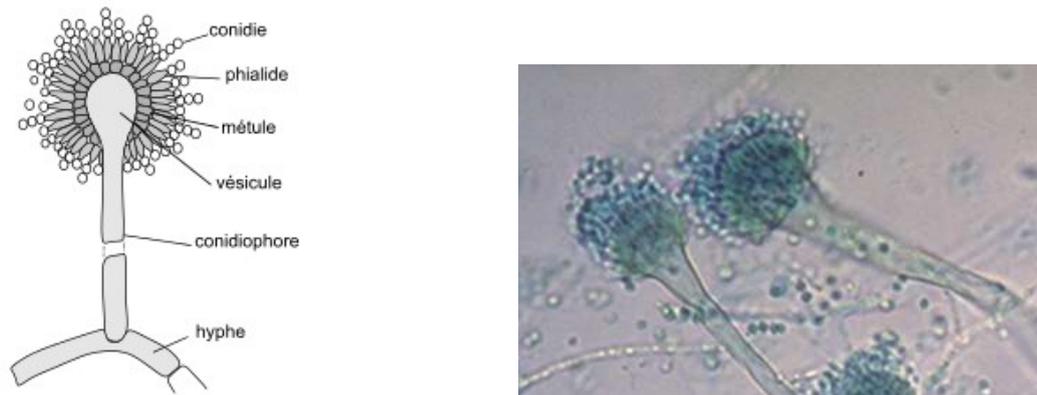


Figure 3 : Schéma d'un *Aspergillus sp.* et photo d'un aspect microscopique d'une culture d'*Aspergillus fumigatus* x40

(Source Haute Autorité de santé_ Actualisation des actes de biologie médicale relatifs au diagnostic des infections à *Aspergillus*_mai 2017 et image tirée du Campus de Parasitologie-Mycologie - Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie (ANOFEL))

L'*Aspergillus* est un champignon filamenteux dont les spores, les conidies, sont présents dans l'air ambiant et nous en respirons chaque jour. L'épithélium bronchique participe à la clairance de ces conidies inhalées et ceci avant la germination et la croissance de celles-ci²⁴. En l'absence de système de filtre ou d'une clairance suffisante, les *Aspergillus* présents dans nos alvéoles pulmonaires peuvent croître, germer et envahir l'épithélium bronchique²⁵ chez des terrains particuliers. Une classification permet d'établir le caractère « possible », « probable » ou « prouvé » d'une aspergillose invasive chez le patient en hématologie, il s'agit de la classification EORTC-MSG des IFI²⁶.

Il s'agit du plus important genre de filamenteux retrouvé dans le laboratoire de Parasitologie-Mycologie, mais aussi celui le plus souvent impliqué dans des IFI à filamenteux avec 1889 API probables ou prouvées déclarées au Centre national de référence des Mycoses invasives et antifongiques (CNRMA) via le Réseau de surveillance des Infections Fongiques invasives (RESSIF) de 2012 à 2018⁸. Dans 78% des cas, il s'agit d'une seule espèce incriminée, l'*Aspergillus fumigatus*⁸.

Genre *Penicillium* : Champignon filamenteux de l'environnement, contaminant des plantes et céréales, il est très répandu dans l'air ambiant et est aussi un contaminant de laboratoire²⁷. Le retrouver dans un prélèvement signifie soit d'une inhalation ou d'une consommation par le patient sans conséquence clinique et sa mise en évidence en culture, soit une contamination lors du prélèvement ou dans le laboratoire. A la différence morphologique des *Aspergillus*, les *Penicillium* ne forment pas réellement de « tête » et les

conidiophores donnent naissance à des métules et des phialides allongées dits en pinceaux, lesquelles produisent des conidies en petites chainettes.

Il est exceptionnel qu'un *Penicillium* soit impliqué dans des pathologies humaines du fait de l'aérocontamination très majoritairement plus fréquente qu'un potentiel pouvoir pathogène inhérent au champignon. Il est nécessaire que le prélèvement et les conditions de conservation soient dans l'asepsie la plus stricte pour envisager une infection à *Penicillium*. Les dites infections à *Penicillium* vraies sont évaluées à une petite centaine de cas depuis 1951 et la revue de cas de G.Lyrtzopoulos²⁸ jusqu'à des cas plus récents en 2014. Pour les anciennes études de cas, les diagnostics d'espèces sont moins fiables que depuis les récentes avancées de la biologie moléculaire²⁹. A noter qu'en dehors de ces extrêmes raretés, il existe une pénicilliose endémique à *Talaromyces marneffe* (anciennement *Penicillium marneffe*) en Asie du Sud Est touchant principalement des patients immunodéprimés par le VIH, mais cette infection n'est pas à proprement parler une infection à *Penicillium*²⁹ et ce champignon n'a jamais été mis en évidence dans le laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Limoges.

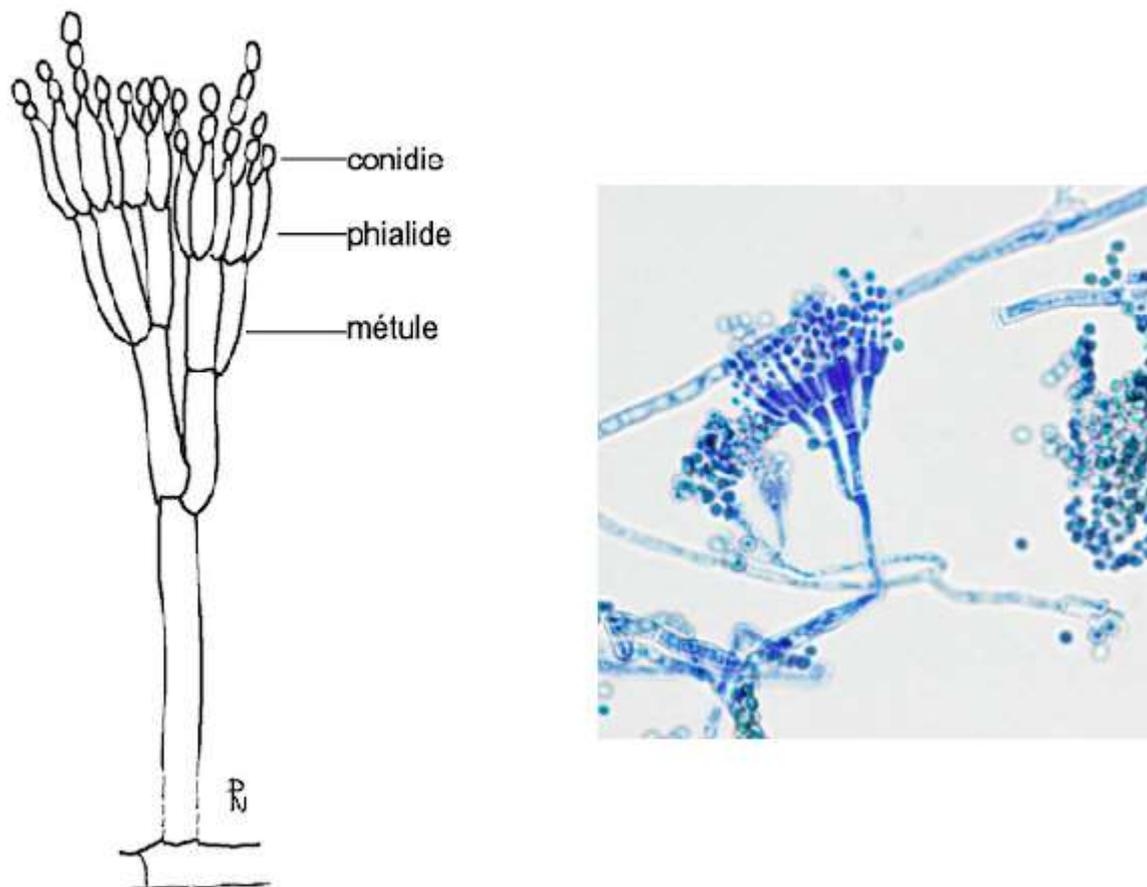


Figure 4 : Schéma et photo d'un aspect microscopique d'un *Penicillium* sp. au grossissement x 40 (Sources : Images Google libres de droits)

Genre *Fusarium* : Champignon filamenteux assez souvent retrouvé dans le laboratoire de Parasitologie-Mycologie, le *Fusarium* est un champignon filamenteux très répandu dans l'environnement et est un aérocontaminant³⁰. La culture de ce champignon dévoile des filaments laineux au verso rosé et une microscopie caractéristique avec plusieurs types de conidies. Il y a les microconidies en amas de « grain de riz » pouvant faire jusqu'à 3 logettes

et apparaissant en 48 heures de pousse pour *Fusarium complexe solani* (le plus fréquemment retrouvé) et il y a les macroconidies en « banane » pouvant faire jusqu'à 6 ou 7 logettes et apparaissant en 2 semaines pour *Fusarium complexe solani*.

Sur le plan pathologique, les *Fusarium* sont très répandus dans la nature et sont des aérocontaminants au même titre que les *Aspergillus* et *Penicillium* précédemment décrits, ce qui fait que pour une mycose unguéale avec suspicion de dermatophytose, si un *Fusarium* est retrouvé, un second prélèvement est nécessaire afin de mettre en place un traitement dans le cas où celui-ci est retrouvé une seconde fois. Le *Fusarium* est aussi impliqué dans des mycoses secondaires à des traumatismes végétaux, notamment en ophtalmologie³¹. Dans de rares cas le *Fusarium* peut être retrouvé dans des IFI⁸. Ceci d'autant plus si le patient est immunodéprimé principalement s'agit d'une hémopathie maligne.

II.2.2.1.2. Phaeohyphomycètes ou dématiés

Parmi les plus souvent rencontrés en biologie humaine, nous décrivons ici ceux fréquemment observés dans le service de Parasitologie-Mycologie.

Genre *Alternaria* : Ces champignons filamenteux se reproduisent de façon asexuée par des conidies pluricellulaires avec des cloisons transversales et longitudinales, celles-ci s'appellent dictyospores. Ces dictyospores forment un « bec » à leur extrémité apicale et à partir de ce bec se développe une autre dictyospore de la même façon. Cette façon dont les spores se forment à partir de la partie apicale de la spore précédente s'appelle « acropète »²³. L'alternariose peut se localiser chez l'humain le plus souvent au niveau cutané et/ou sous cutané³².

Genre *Bipolaris* : A la différence des spores d'*Alternaria*, les phragmospores des *Bipolaris* possèdent une cloison transversale mais pas de cloison longitudinale. Ces conidies ne naissent pas à la suite les unes des autres mais de part et d'autre de la partie terminale du conidiophore²³. *Bipolaris* peut entraîner des phaeohyphomycoses superficielles ou profondes mais restent rares.

Genre *Exophiala* : Champignon filamenteux avec un hyphes septé et brun pâle duquel se développent des petites annelides cylindriques ou légèrement gonflées avec une extrémité éfilée. Ces cellules conidiogènes produisent des conidies ovales uni ou bicellulaires²³.

II.2.2.2. Les dermatophytes

Les dermatophytes sont classés à part parmi les champignons filamenteux car présentent des caractéristiques particulières dans plusieurs domaines :

- morphologique : les dermatophytes sont des mucédinés avec une reproduction par conidies solitaires issus d'éléments préexistants du thalle, ces conidies solitaires sont appelées aleuries. Parmi les mucédinés formant des aleuries, les dermatophytes peuvent avoir des macroconidies et ne possèdent pas d'aleuries intercalaires²³.
- métabolique : les dermatophytes ont une appétence pour la kératine présente uniquement dans l'épithélium cutané, les poils, cheveux et les ongles.
- épidémiologique : les dermatophytes infectant l'humain peuvent être telluriques (*Trichophyton mentagrophytes*, *Nannizzia gypsea*), zoophiles (*Microsporum canis*) ou anthropophiles (*Trichophyton tonsurans*, *Epidermophyton floccosum*)¹.

- clinique : ce sont des champignons filamenteux ne faisant pas d'infection invasive et restant limités aux infections superficielles, sauf rares exceptions.

II.2.2.3. Les Mucorales

Les mucorales sont des champignons cosmopolites quasiment ubiquitaires²³. Ils sont filamenteux et présentent un thalle non septé (ou siphonné), plus large, à bords non parallèles avec un aspect possiblement enrubanné. Ces caractéristiques communes aux principales mucorales diagnostiquées en laboratoire permettent de les distinguer facilement des autres filamenteux. Ils font tous partis du même phylum des Zygomycota, une branche phylogénétiquement plus « primitive » par rapport aux autres filamenteux.

Morphologiquement, les mucorales développent des spores dans son sporocyste qui est lui-même soutenu par un sporocystophore. Afin de distinguer les espèces de mucorales, il est possible de regarder l'apophyse ou la columelle à la base du sporocyste, de regarder si les sporocystophores sont sympodes ou uniques et reliés entre eux par un stolon, la présence de « racines » appelées rhizoïdes permettant l'ancrage dans l'environnement du champignon.

Sur le plan clinique les mucormycoses sont potentiellement très graves, responsables d'IFI ou une extension locorégionale très délabrante jusqu'à pouvoir entraîner le décès. La mucorale est un champignon avec un fort pouvoir angioinvasif et une croissance très rapide et envahissante à 37°C. Parmi les formes cliniques, le terrain du patient est primordial, à la fois dans l'espèce incriminée et dans la présentation clinique. Les principaux terrains favorisant la dissémination invasive restent quand même les hémopathies avec

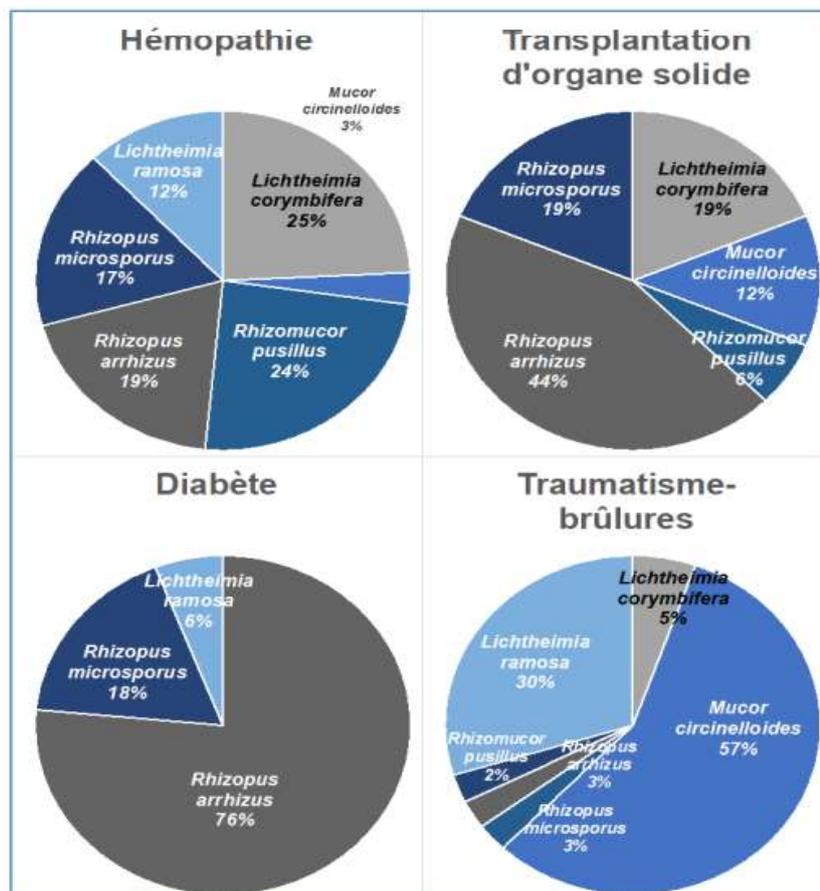


Figure 5 : Répartition des espèces de mucorales en fonction du terrain du patient (Source IFI_RESSIF_rapport 2020 sur l'année 2019)

63.2% des IFI à mucorales contre seulement 7.5 %, 8.3 % et 11.8 % respectivement pour les patients diabétiques, les transplantés d'organes solides et les traumatisés ou grands brûlés⁸.

Parmi les différentes formes cliniques, nous pouvons citer les infections locales chez le patient traumatisé ou brûlé, souvent avec un contact tellurique. La forme rhino-sino-orbitale du patient diabétique qui a une évolution loco régionale dramatique, nécessite un traitement chirurgical et médicamenteux et peut aboutir à une défiguration ou au décès du patient dans un délai rapide. Des formes pulmonaires ou digestives peuvent aussi survenir chez le patient présentant une hémopathie maligne. La mise en évidence du champignon rapidement est donc primordiale pour éviter au maximum toute complication chez le patient.

II.2.3. Les dimorphiques

Nous les évoquons ici car un *Histoplasma capsulatum var. capsulatum* a été mis en évidence dans le laboratoire de parasitologie-Mycologie du CHU de Limoges récemment.

Comme son nom l'indique, les champignons dimorphiques possèdent les deux formes de levure et de champignon filamenteux. L'exemple de l'*Histoplasma capsulatum* est parlant, dans la nature le champignon est sous forme de filamenteux et ses spores sont infectantes si elles pénètrent dans l'organisme. Dans l'organisme, principalement après une inhalation des spores, le champignon se développe et peut être envahissant sous forme de levure dans l'organisme. La pousse de champignons dimorphiques est très lente (surtout pour l'*Histoplasma capsulatum*), elle nécessite un temps d'incubation prolongé comme précisé en Annexe 2. La culture permet de trouver le champignon sous forme filamenteuse et infectante. Cette forme infectante en culture, son aérosolisation et la complexité des traitements curatifs font que les dimorphiques sont généralement des champignons à analyser dans des conditions de type Niveau de Sécurité Biologiques 3¹⁸, comme les cultures de bacilles de la tuberculose ou de VIH.

II.2.4. Les champignons atypiques

Les champignons atypiques regroupent en clinique humaine les *Pneumocystis jirovecii* et les Microsporidies.

Le premier entraîne la pneumocystose chez le patient immunodéprimé, il ne pousse pas sur les milieux standards utilisés au laboratoire et ne peut être mis en évidence dans le service en routine que par l'examen direct (rare, nécessite une forte concentration fongique) ou par la PCR spécifique *Pneumocystis jirovecii*.

Les seconds sont des champignons parasitant le tube digestif du patient, d'évolution spontanément favorables chez l'immunocompétent mais entraînant une diarrhée chronique chez l'immunodéprimé, principalement le transplanté de rein.

II.3. Mise en évidence et identification des champignons en pratique courante

La mise en évidence d'un champignon et son identification dans le but de traiter ou non un patient peut être longue. Le diagnostic clinique, épidémiologique, infectieux, sémiologique peut orienter vers une origine fongique au lit du malade et être faite directement à la vue des symptômes, mais l'identification d'un champignon ne peut être réalisée dès l'arrivée d'un prélèvement au laboratoire.

Initialement et selon le prélèvement, sa nature « précieuse » (prélèvement stérile ou difficulté de prélèvement) ainsi que la quantité totale de prélèvement peuvent permettre de réaliser un examen direct puis une mise en culture ou la réalisation de techniques de biologie moléculaire.

II.3.1. Recueil du prélèvement primaire et état frais

Une fois le prélèvement reçu dans le laboratoire, une partie peut être recueillie et mise directement entre lame et lamelle pour un examen à l'état frais. Dans certains, cas il est nécessaire de fluidifier le prélèvement avec un digesteur ou de réaliser une coloration avec une coloration de May Grünwald Giemsa (MGG) ou de l'encre de Chine afin de mieux voir ce qui est recherché.

Lors d'un état frais d'une collection, il est possible d'observer des levures, indiquant une possible levurose si elles ne sont pas attendues dans les conditions du prélèvement ou selon sa nature. Il en est de même pour la visualisation de filaments mycéliens. Ces filaments peuvent être très fins et terminés par des levures, orientant vers une levurose du genre *Candida*. Ces filaments peuvent aussi être plus épais, à bords parallèles, présentant des ramifications en angle aigu et des septas orientant vers une infection à filamenteux type hyphomycète. Enfin ces filaments peuvent être plus larges, à bords non parallèles, présenter des ramifications à angle droit, des aspects enrubannés et l'absence de septa, pouvant orienter dans ce cas vers la présence de mucorale.

Au cours d'un examen direct avec une coloration *ad-hoc*, il est possible d'observer des champignons particuliers selon la coloration et la mise en évidence :

- *Pneumocystis jirovecii* dans une coloration au MGG d'un prélèvement respiratoire profond
- *Cryptococcus neoformans* dans une coloration à l'encre de Chine d'un prélèvement de LCS
- Filaments ou levures mis en évidence lors d'un examen au noir chlorazole ou au calcofluor d'une recherche de dermatophyte

Ces examens directs et/ou états frais peuvent visualiser des champignons levuriformes ou filamenteux mais pas une identification stricte. La visualisation d'une levure dans un examen de LCS à l'encre de Chine, chez un patient immunodéprimé présentant un méningo-encéphalite oriente vers une infection à *Cryptococcus neoformans* qui sera confirmée par la positivité de la détection d'antigène cryptocoque et permettra la mise en place d'un traitement spécifique. D'autres situations sont moins ciblées et la mise en évidence d'un filament semblable à un champignon filamenteux type hyphomycète dans un prélèvement respiratoire peut orienter vers une aspergillose mais n'est pas spécifique. La mise en place d'un traitement spécifique peut être discutée selon la situation clinico-biologique du patient et l'urgence à mettre en place un traitement probabiliste.

II.3.2. Mise en culture dans différents milieux

En plus de cet examen direct, une partie du prélèvement est mise en culture afin de faire fructifier le champignon, d'observer des aspects permettant l'identification à l'espèce du champignon et permettant d'autres examens utiles à la mise en place d'un traitement pour le patient.

Chromagar® : il s'agit d'un milieu de culture optimisé pour la croissance de levures et permettant de distinguer différents *Candida* selon la couleur de la colonie poussant sur le

milieu (exemple : *Candida albicans* donnera des colonies de vert clair très jeune puis vert foncé, *Candida tropicalis* prendra l'apparence d'un bleu avec parfois une auréole violette entourant la colonie, *Candida krusei* présentera des colonies de grande taille blanche en périphérie puis rose en son centre)³⁴.

Sabouraud chloramphénicol : milieu de croissance historique dans le domaine mycologique, le milieu Sabouraud est composé de protéines dégradées, de glucose, d'agar-agar et d'eau distillée. Il permet la croissance de nombreux mycètes et l'ajout de Chloramphénicol inhibe la croissance des germes bactériens présents dans l'environnement ou dans le prélèvement.

Sabouraud chloramphénicol cycloheximide : l'ajout de cycloheximide permet d'inhiber la croissance de nombreux champignons filamenteux courants (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* ...) mais n'inhibe pas la croissance des Dermatophytes. Il est utilisé pour sélectionner les Dermatophytes dans les cultures de prélèvements superficiels, permettant d'éviter une croissance rapide d'un contaminant potentiel ne permettant pas d'observer un Dermatophyte ayant une croissance plus lente.

MALT : fabriqué à partir de poudre de malt et de d'eau osmosée, ce milieu est pauvre en nutriments absorbés par le champignon, forçant celui-ci à fructifier pour fabriquer des spores afin de se répandre dans son environnement (si nous avons une idée finalistique)³⁵. Cette fructification permet une meilleure reconnaissance et donc une bonne identification du champignon, elle est utilisée pour identifier des champignons ayant une faible croissance sur les milieux Sabouraud initialement utilisés.

Une fois les milieux ensemencés, ceux-ci dépendant du prélèvement initial et des champignons attendus, ils sont conservés à des températures et des durées dépendantes des genres de champignons attendus en Annexe 2.

II.3.3. Identification morphologique, macroscopique et microscopique

Une fois la croissance des champignons constatée morphologiquement, l'identification est possible.

Pour les levures, une orientation diagnostique peut être possible sur les aspects des colonies sur Chromagar[®] mais une confirmation en spectrométrie de masse reste nécessaire.

Pour les filamenteux, l'aspect de la colonie associé à un examen microscopique permet d'observer des caractéristiques spécifiques de chaque champignon selon son aspect décrit plus haut. Pour cela nous utilisons un raisonnement dichotomique permettant de nous orienter sur l'identité du champignon visualisé. Est-il filamenteux ? Septé ou non ? Présente-t-il des têtes ? Des phialides ? En pinceaux ou non ? Des conidies alignées ou en amas ? De quelle forme ? ...

La mise en parallèle d'une identification microscopique, macroscopique et la corrélation attendue avec le prélèvement permet dans une majorité des cas de faire un diagnostic d'espèce. Cependant dans certaines identifications, un doute persiste si des caractères discriminant ne sont pas clairs. L'absence totale de ces caractères ne permet pas l'identification fongique, dans ces cas une analyse complémentaire est nécessaire.

II.3.4. Identification au spectromètre de masse

Parfois l'identification d'espèce selon l'aspect morphologique n'est pas suffisante, elle peut être complétée par une analyse spectrométrique. Le spectromètre de masse de type MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight) permet une identification protéique du champignon étudié. Il est utilisé depuis le début des années 1990 pour l'identification bactérienne, puis celle des levures et depuis les années 2010 celle des champignons filamenteux³⁶. La méthode consiste à déposer une colonie fongique sur une plaque calibrée. A cela une solution d'acide formique à 70% est déposée sur la colonie afin de la lyser, puis une matrice est ajoutée après évaporation de l'acide formique. Après l'évaporation de la matrice, l'échantillon est solidifié. La plaque est déposée dans le spectromètre de masse. Celui-ci envoie un rayon pour ioniser le prélèvement qui se détache donc de la plaque et passe dans un tube fin permettant de laisser passer les protéines ionisées une par une. Puis le passage de chacune d'elle devant un analyseur permet en fonction de sa charge et de son « temps de vol » (donc de son poids moléculaire) d'identifier la protéine ionisée. Puis la somme de toutes les protéines ionisées dans le spectromètre de masse pour une colonie permet d'obtenir un spectre protéique, soit une empreinte de la composition en protéine de la colonie analysée. Ce spectre est comparé dans le spectromètre de masse à une banque de données interne permettant d'identifier avec un indice mesuré l'identité du champignon testé³⁷. Les bases de données d'identification spectrométriques des champignons sont plutôt faibles pour les champignons filamenteux ou rares, mais elles sont en évolution constante³⁸. La base spectrométrique permet un résultat robuste si tant est que le champignon soit dans la base de données. Il est néanmoins nécessaire de garder un œil critique et d'interpréter en tant que biologiste les résultats obtenus³⁶.

La spectrométrie de masse ajoute un niveau de discrimination plus important entre les espèces. En effet, beaucoup de champignons possèdent des espèces cryptiques réunies au sein de complexes d'espèces. Ces espèces cryptiques étaient référencées comme une même espèce initialement car présentaient les mêmes critères morphologiques mais sont bien des espèces différentes. Il est nécessaire de correctement identifier l'espèce car même très proche morphologiquement au sein d'un complexe elle peut avoir des sensibilités différentes.

Prenons pour exemple le complexe des *Aspergillus section fumigati*, dominé par l'espèce *Aspergillus fumigatus*. Certaines espèces comprennent des sensibilités différentes au sein de ce complexe³⁹.

Tableau 1 : Sensibilités de diverses *Aspergillus section fumigati* aux Azolés et à l'Amphotéricine B (Sources : 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*. avr 2008;52(4):1244-51) (dans les colonnes Azolés et Amphotéricine B : **sensible**, **résistant**)

<i>Aspergillus section fumigati</i>	Azolés	Amphotéricine B
<i>A. fumigatus</i>		
<i>A. lentulus</i>		
<i>A. fumigatiaffinis</i>		
<i>A. viridinutans</i>		
<i>A. hiratsukae</i>		

Dans l'exemple ci-dessus, tous ces *Aspergillus section fumigati* sont très proches morphologiquement et ne peuvent être reconnus que par technique spectrométrique avec une bonne base de données ou par séquençage. Leur identification est majeure car permet d'avoir une idée des résistances avant d'avoir les résultats de l'antifongogramme.

Cette simple notion d'espèces cryptiques avec des impacts différents sur le patient et ne pouvant être distinguées morphologiquement induit la nécessité d'effectuer une recherche d'identification plus précise que la simple analyse morphologique.

Au laboratoire de Parasitologie-Mycologie, nous disposons d'un spectromètre de masse de type Vitek MS[®] de BioMérieux[®] (France). La base de données d'identification fongique est propre au fournisseur et le nombre d'espèce de moisissures identifiables est mis à jour régulièrement. Cette base de données, bien que renouvelée n'est pas très fournie en ce qui concerne les identifications de champignons filamenteux, surtout la base de BioMérieux[®] comme indiquée en tableau 2.

Tableau 2 : Nombres d'espèces de moisissures/dermatophytes identifiables par les différentes bases de données disponibles de 2014 à 2020. (Source : Blaize M, Normand AC, Fekkar A, Piarroux R. Identification des moisissures au laboratoire de routine hospitalière. *Revue Francophone des Laboratoires*. févr 2021;2021(529):58-65.)

Fournisseur de base de référence	Avant 2014	2017	2020
Bruker[®]	111	111	189
bioMérieux[®]	26	53	78
MSI	Projet non initié	554	1026

(MSI = biological-Mass-Spectrometry-Identification)

Une étude⁴⁰ de 2018, comparant notamment les résultats d'identification par spectromètre de masse et par séquençage pour 102 isolats cliniques retrouve une identification correcte dans 52 % parmi les identifications réalisées avec la base de données Vitek MS[®]. Par conséquent, bien que plus robuste que l'identification morphologique au

microscope, l'identification par spectrométrie de masse reste à perfectionner soit par optimisation de l'extraction protéique, soit par l'utilisation de bases de données plus fournies et complètes.

II.3.5. Identification par PCR

Une autre technique d'identification en routine, consiste à réaliser une PCR d'espèce dans un prélèvement dans lequel il n'est recherché qu'un seul genre de champignon, comme cela peut être le cas pour la recherche de *Pneumocystis jirovecii* dans un prélèvement respiratoire, la recherche de Microsporidies dans une selle ou celle d'*Aspergillus* spp. ou de mucorales dans du sérum. Cette technique bien que permettant une identification à l'espèce dans chacun des cas dans le prélèvement n'est qu'une multiplication d'ADN fongique sans pour autant permettre l'identification d'autres champignons présents dans le prélèvement, ni de passer outre une infection ancienne ou une colonisation avec certitude dans le cas où les PCR en temps réel retrouvent un Cycle Threshold (seuil de cycle ou CT) élevé. Cette technique n'est pas réalisée pour tous les champignons.

II.3.6. Identification par séquençage

À la suite de l'évolution de la biologie moléculaire et notamment du séquençage nous avons remarqué que certaines identifications n'étaient pas exactes et que certaines espèces forment entre elles des complexes d'espèces. Ces complexes sont regroupés en section qui ne sont que peu voire pas discernable par les méthodes usuelles d'analyse macroscopique ou microscopique et pour lesquelles, parfois, la spectrométrie de masse n'arrive pas à discriminer une espèce³⁶. Dans ce cas-là, l'identification par biologie moléculaire et plus particulièrement par le séquençage peut s'avérer plus utile, pertinente et plus juste.

II.3.6.1. Principe du séquençage

Le séquençage de l'ADN consiste en la détermination de la succession des nucléotides le composant et compris entre deux oligonucléotides spécifiques appelés amorces⁴¹. Pour cela il est nécessaire de passer par plusieurs étapes afin d'avoir un grand nombre de brins à étudier, et donc de l'amplifier par PCR.

La PCR débute par la dénaturation d'ADN double brin en ADN simple brin par forte élévation de la température. L'amplification d'un brin matrice d'ADN par PCR est réalisé par une enzyme, l'ADN polymérase ADN dépendant, est initié par la fixation des amorces, complémentaire du brin d'ADN par diminution de la température à la température optimale d'activation de l'enzyme. Cette enzyme va permettre l'élongation d'un nouveau brin complémentaire au brin matrice dans le sens 5'-3'. L'ADN polymérase permet l'incorporation de nucléotides - des désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) pour une PCR usuelle - libres présents dans le milieu réactionnel par la formation d'un pont phosphodiester entre l'extrémité hydroxyle en position 3 (3'OH) de la chaîne et l'extrémité phosphate en position 5 (5'P) du dNTP suivant.

La réaction de Sanger est réalisée après une PCR permettant d'obtenir plusieurs amplicons et repose sur l'incorporation aléatoire par cette ADN polymérase de didésoxyribonucléotides triphosphates (ddNTP) interrupteurs de chaîne 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, soit un ribose di-désoxydé. 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, les dNTP et les ddNTP sont en compétition. 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 parmi tous les amplicons. Une migration électrophorétique du produit de cette réaction de séquence sur un gel de polyacrylamide très résolutif permet de 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 discriminer les fragments différant entre eux d'une base. Les ddNTP comprennent un marquage par un fluorophore différent pour chaque base. Les fluorophores vont générer des signaux lumineux recueillis par un système informatique qui déterminera la séquence des nucléotides du brin d'ADN simple brin initial.

Bien que les nouvelles techniques de séquençage haut débit soient en phase de révolutionner la biologie par l'ampleur des informations qu'elles sont à même de générer, le séquençage Sanger est encore le standard¹⁸.

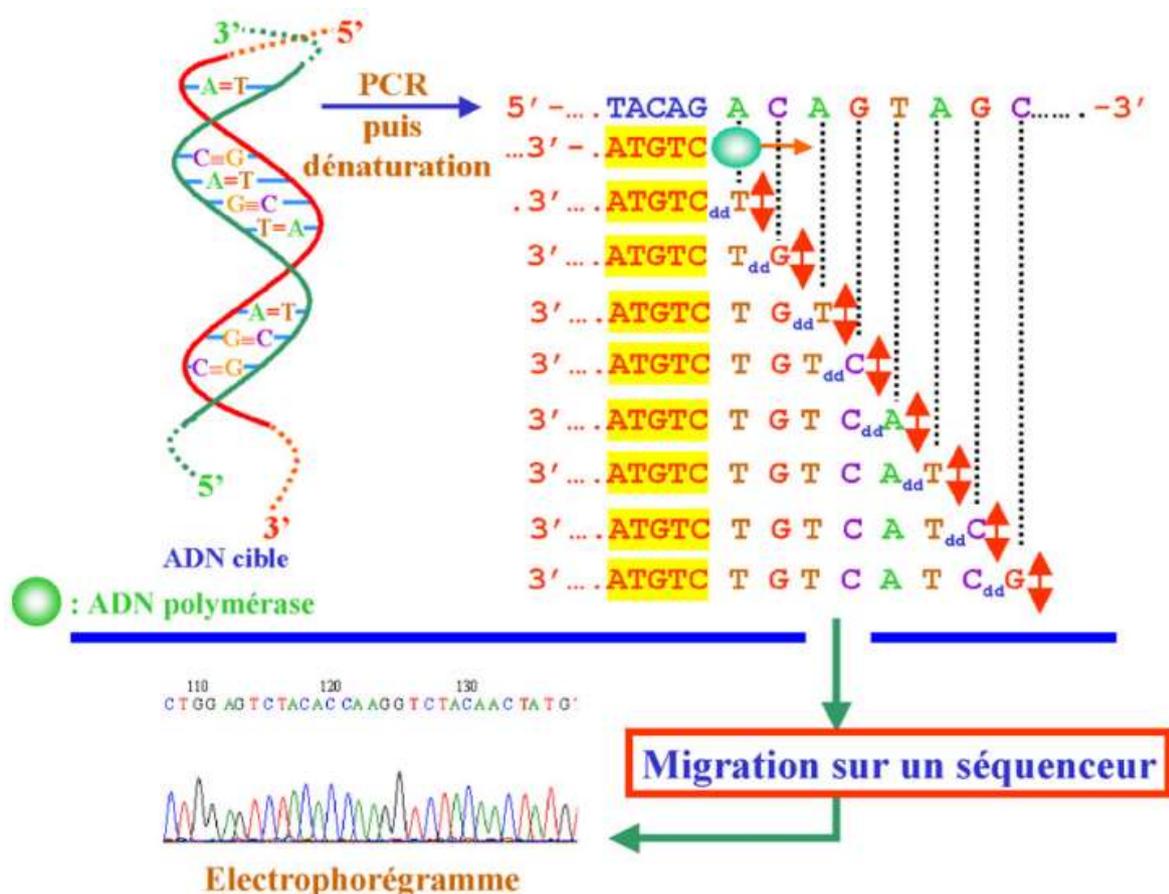


Figure 6 : Principe du séquençage selon la méthode de Sanger

Source : Lamoril J. et al., *Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche.*, 2008

II.3.6.2. Choix des régions à séquencer

L'objectif de la technique est d'identifier au rang d'espèce les champignons pour lesquels l'identification de routine s'est avérée incomplète, inexistante ou pour confirmer la présence d'un champignon rare. Cette approche d'identification s'est développée pour les champignons à la suite de la première réunion internationale « DNA Barcoding » qui s'est tenue à Londres en 2005⁴.

Tout d'abord, il faut déterminer quelles régions du génome permettent de distinguer les différentes espèces entre elles. Ces régions doivent être identiques pour toutes les souches d'une même espèce et suffisamment différentes entre les espèces pour les distinguer⁴². De plus ces régions doivent avoir un point d'ancrage pour les amorces qui soit identique sur tous les champignons testés. Pour ce travail, il est important de choisir des amorces pan-fongiques qui permettent l'amplification des séquences cibles de tous les champignons testés. Parmi les gènes qui présentent un intérêt pour l'identification des champignons et les amorces disponibles pour leur séquençage, nous avons choisi ceux qui correspondent mieux aux critères mentionnés ci-dessus et sont considérés comme pan-fongiques¹⁸.

Chez les champignons, le gène de l'ADN ribosomique présente un grand intérêt dans l'identification des espèces car il présente une structure particulière (Figure 7 et 8)⁴. En effet, ce gène est constitué de régions codantes pour la petite sous-unité (18S) de l'Acide Ribonucléique ribosomique (ARNr), pour la partie 28S grande sous-unité de l'ARNr (28S), composé de la 28S et la 5.8S chez les eucaryotes. Ces unités sont séparées par 2 zones non codantes : Internal Transcribed Spacer 1 (*ITS1*) et Internal Transcribed Spacer 2 (*ITS2*) entourant la région codante pour la partie 5.8S de la grande sous-unité de l'ARNr (5.8S).

On observe que les régions codantes alternent avec les zones non fonctionnelles. Les régions *ITS1* et *ITS2* sont extrêmement variables entre les espèces, tandis que les régions codant pour l'ARNr (18S, 28S et 5.8S) sont connues pour être très conservées⁴². Cela permet de cibler les gènes non fonctionnels, à la fois différents entre chaque espèce et identiques au sein d'une espèce donnée, pour l'identification des espèces et les extrémités des zones codantes comme support pour l'élaboration des amorces universelles⁴. Ces gènes ont l'avantage d'être présents chez tous les champignons et ils ont de nombreuses copies dans le génome⁴³. La région ITS entière est constituée de l'alignement des gènes : *ITS1*, *5.8S* et *ITS2*. La longueur de la région ITS présente une variabilité inter-espèce de 400 à 900 bases (entre 2 amorces ITS5 et ITS4) sur tous les champignons testés⁴⁴.

En 2012, à l'International Fungal Barcoding Consortium, les régions ITS ont été recommandées comme « codages à barres primaires » pour les champignons^{4,18,45}. Ces régions sont très utilisées à travers le monde pour l'identification des champignons, donc les séquences qui leur correspondent se sont très vite répandues dans les bases de données publiques^{4,18}. D'autres régions du génome fongique ont été analysées pour l'identification des champignons. Le gène mitochondrial codant la sous unité 1 du cytochrome c oxydase (COX1) a été exclu, car il est difficilement amplifiable, insuffisamment variable et contient de nombreux introns⁴⁶. Les gènes codant trois autres sous unités provenant de gènes de l'ADN ribosomal nucléaire ont été étudiés, ces gènes codent respectivement pour la grande sous unité de l'ARN polymérase II, pour la petite sous unité de l'ARN polymérase II et pour une protéine de maintien. Le gène de la petite sous unité de l'ARN polymérase II n'est pas performant pour différencier les espèces⁴⁶. Malgré le fait qu'il soit possible d'identifier correctement une souche avec le séquençage de la grande sous unité de l'ARN polymérase II, le taux d'amplification par PCR et le pouvoir de discrimination des espèces sont supérieurs pour la région ITS, ce qui est un avantage en faveur de cette cible⁴.

III. Matériels et Méthodes

Le but de cette thèse étant d'ajouter une nouvelle technique en routine au panel des techniques déjà utilisées pour l'identification de champignons, nous avons procédé en plusieurs étapes. La première consistant à la mise en place de la méthode et la confirmation de son bon fonctionnement, ensuite l'enseignement de la méthode à l'équipe de biologie moléculaire du service de mycologie et pour finir la recherche des indications pour lesquelles nous considérons comme nécessaire l'usage du séquençage pour identifier l'espèce. Toutes les étapes d'extraction, d'amplification, de purification et de séquençage ont été réalisées dans le service commun de microbiologie dédié à la biologie moléculaire, toutes les étapes ont respecté les règles d'hygiène et de stérilité afin de limiter au maximum toute contamination.

Pour cela, j'ai profité de mon stage Inter-CHU au CHU Henri MONDOR à Créteil dans le service du Professeur BOTTEREL pour comparer ce qui se faisait ailleurs puis de tester comment améliorer la technique développée au CHU de Limoges.

III.1. Matériels

Nous avons testé 40 souches de champignons issues de 19 patients prélevés au CHU de Limoges entre octobre 2020 et juin 2021. Ce sont des champignons pour lesquels l'identification a été impossible avec les méthodes habituelles citées dans les Généralités ou des champignons peu fréquents en pratique courante. Les prélèvements proviennent de diverses matrices de plusieurs systèmes comme des prélèvements respiratoires, des prélèvements cutanés, des selles, des biopsies... récapitulés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Identifications fongiques avant séquençage des prélèvements utilisés dans ce travail

Numéro prélèvement	Numéro tube	Prélèvement	Milieu de culture	Identification	Méthode
200345134	1	AB	SC	<i>Acremonium spp.</i>	Microscopie
	2	AB	SC		
	3	AB	SC		
	4	AB	SC		
200359149	1	Squames	SC	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Microscopie
	2	Cheveux	SC		
	3	Cuir chevelu	SC		
200368067	1	Sinus	MALT	CFNI**	
	2	Sinus	SC		
	3	Sinus	Biopsie*		
210035715	1	Ongle hallux	SC	<i>Neoscytalidium spp.</i>	Microscopie
200353575	1	Nez	SC	<i>Aureobasidium pullulans</i>	MALDI-ToF
200379843	1	Expectoration	SC	CNI**	
	2	Expectoration	Chromagar		
	3	Expectoration	Chromagar		
201892858	1	Nez	SC	CFNI**	
210018012	1	Selles	SC	<i>Rhizomucor variabilis</i>	MALDI-ToF
200332118	1	AT	SC	<i>Paecilomyces spp.</i> - <i>Candida albicans</i>	MALDI-ToF et microscopie
	2	AT	SC		
	3	AT	SC		
200337020	1	Expectoration	SC	<i>Paecilomyces variotii</i> - <i>Candida albicans</i>	MALDI-ToF
	2	Expectoration	SC		
	3	Expectoration	MALT		

200356993	1	Nez	SC	<i>Alternaria alternata</i> - <i>Penicillium sp.</i>	MALDI- ToF
	2	Nez	SC		
	3	Nez	SC		
	4	Nez	SC		
200364654	1	Sinus	SC	CFNI**	
	2	Sinus	MALT		
	3	Sinus	Biopsie*		
200330016	1	Sinus	Biopsie*	CNI**	
210012252	1	Ongle hallux	MALT	CFNI** - <i>Penicillium sp.</i>	
	2	Ongle hallux	MALT		
200389912	1	Phanère	MALT	<i>T.rubrum</i> - <i>C.parapsilosis</i> - <i>C.albidus</i> - <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (identifications au MALDI-ToF)	
200376862	1	Expectoration	MALT	<i>Aspergillus fumigatus</i> – CFNI**	
200362635	1	AB	SC	<i>Scedosporium apiorpermum</i> - <i>A. fumigatus</i> – <i>Penicillium sp.</i>	
	2	AB	MALT		
210066990	1	AB	SC	CNI**	
211983825	1	Selles	SC	CFNI**	
	2	Selles	SC		

(AB = Aspiration Bronchique, SC = Sabouraud Chloramphénicol, CFNI = Champignon Filamenteux Non Identifié, CNI = Champignon Non Identifié, AT = Aspiration Trachéale, *analyses réalisées directement à partir de la biopsie, ** absence d'identification malgré la culture, l'analyse morphologie et la spectrométrie de masse)

Pour mettre au point le protocole de séquençage, il nous a paru important de travailler avec des champignons en culture car nous sommes sûrs qu'il y a du matériel génétique fongique dans l'échantillon testé. Pour chaque patient, le prélèvement peut avoir été mis en culture sur différents milieux (cf tableau 3), ceux-ci sont détaillés dans les Généralités. Nous avons également testé 3 pièces opératoires pour voir si la technique est applicable directement pour ce type de prélèvement, sans passer par la culture. Après l'identification de routine décrite en Généralités, le résultat et la technique utilisés sont inscrits dans la dernière colonne du tableau. Les échantillons ont été conservés à une température de 5°C (+/- 2°C) après les techniques usuelles d'identification. Au total nous avons disposé de 37 cultures et 3 biopsies pour lesquelles nous avons pratiqué une identification par séquençage Sanger. De plus, nous avons utilisé un contrôle positif précédemment identifié morphologiquement, microscopiquement et macroscopiquement : un *Aspergillus* section *fumigati* et une souche identifiée comme *Acremonium tubakii* par séquençage SANGER (régions *ITS1* et *ITS2*) en 2014 par Marilyn DUGAT au cours de sa thèse d'exercice⁴³.

III.2. Méthodes

Ce travail nécessite la mise en place d'une technique de séquençage Sanger comme décrite initialement. Cette technique nécessite un choix judicieux des régions amplifiées et amorces utilisées.

Comme vu dans les généralités, la région pan-fongique à utiliser en première intention est l'analyse du séquençage de la région *ITS*.

III.2.1. Régions et amorces utilisées

III.2.1.1. Choix de séquencer *ITS1* et *ITS2* séparément

Nous avons fait le choix initialement de séquencer séparément les régions *ITS1* et *ITS2* pour plusieurs raisons. La première est la taille de la séquence : si la région *ITS* est trop longue

(dépasse 800 bases) il se peut que la qualité du chromatogramme final ne permette pas de distinguer les espèces fongiques testées avec la méthode SANGER. Ensuite, la région 5.8S est hautement conservée et connue pour le risque de formation d'artefacts de PCR⁴⁵. Le fait de ne pas séquencer cette région en entier diminuerait donc ce risque.

III.2.1.2. Choix de séquencer ITS1 et ITS2 ensemble

Au cours de mon semestre de Mycologie dans le service du Professeur BOTTEREL, dans le CHU Henri MONDOR à Créteil, j'ai assisté à des identifications par séquençage de la région ITS avec un protocole très proche de celui testé dans ce travail et ai donc été étonné que la région ITS soit séquencée entièrement avec le gène 5.8S entre le couple d'amorces ITS5 – ITS4 (cf Figure 8). Ce protocole de séquençage fonctionne et permet de réaliser globalement deux fois moins de travail, malgré des publications allant dans le sens qu'il n'était pas réalisable de séquencer la région ITS en une fois^{41,45}. Nous avons pris le parti d'essayer sur 3 nouvelles souches ainsi que sur 7 souches déjà testées afin de vérifier si cette partie du protocole de MONDOR était applicable à nos manipulations et de voir s'il y avait des différences entre le séquençage des ITS 1 et 2 séparément ou ensemble.

III.2.1.3. Choix des amorces utilisées

Le choix des amorces constitue un autre facteur qui peut impacter le séquençage car il peut modifier le taux d'amplification par PCR. Selon une étude *in silico*⁴⁷ qui teste les amorces illustrées dans la Figure 8, les couples ITS5-ITS2 et ITS3-ITS4 ont la meilleure capacité d'amplifier respectivement les régions ITS1 et ITS2. Néanmoins, les couples ITS1 - ITS4, ITS1 - ITS2 sont largement utilisés à travers le monde. Le premier couple d'amorces ITS5 - ITS2 encadre une partie du gène 18S, la région ITS1 et une partie du gène 5.8S. Le deuxième couple ITS3-ITS4 permet de cibler une partie du gène 5.8S, la région ITS2 et l'extrémité du gène 28S. Les séquences des amorces sont disponibles dans le Tableau 4, elles ont des extensions M13F et M13R (séquences en noir) qui permettent l'ancrage des amorces spécifiques pour la PCR de séquence. De plus, nous avons testé sur une souche d'*Aspergillus* section *fumigati* identifié par le service 2 autres couples d'amorces. Ces couples d'amorces ciblent pour le premier les introns des gènes codant pour une protéine de structure : la β -tubuline et pour le second une protéine impliquée dans le métabolisme : la Calmoduline. Ces régions présentent un intérêt parce qu'elles sont courtes (jusqu'à 200 paires de bases) et ont un polymorphisme élevé chez la plupart des champignons d'intérêt médical sans pour autant être pan-fongiques^{18,43}. Elles sont utilisées pour différencier des espèces étroitement apparentées (ex : certaines sections d'*Aspergillus* et les *Scedosporium sp.*)⁴⁸. Les séquences des amorces pour la β -tubuline et la calmoduline sont présentées dans le Tableau 5, elles possèdent aussi des extensions M13F et M13R représentées en noir.

Au cours des essais de séquençage de la région ITS globale, nous avons utilisé les amorces ITS5 – ITS4 pour plusieurs raisons. Tout d'abord, ce sont celles utilisées au CHU Henri MONDOR, deuxièmement nous les avons déjà commandées pour ce travail et savions donc déjà qu'elles s'hybridaient correctement à l'ADN fongique.

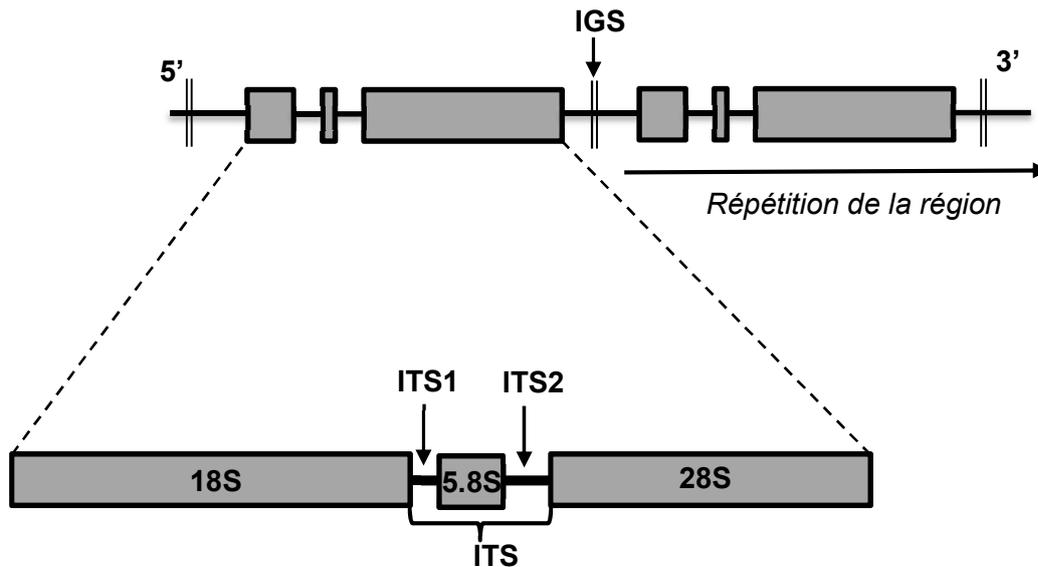


Figure 7 : Représentation schématique de l'ADN ribosomique
(ITS : Internal Transcribed Spacer ; IGS : Intergenic spacer)

Source : Codreanu C. Mémoire DFASP2, *Innovation du séquençage SANGER dans l'identification des champignons responsables d'infections fongiques chez les patients du CHU de Limoges*, Université de Limoges, 2021

Tableau 4 : Amorces utilisées pour les cibles ITS1, ITS2 et ITS total

Cible	Amorces	Séquences
ITS1	ITS5-M13F	GTAGCGCAGCGGCCAGT GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
	ITS2-M13R	CAGGGCGCAGCGATGAC GCTGCGTTCTTCATCGATGC
ITS2	ITS3-M13F	GTAGCGCAGCGGCCAGT GCATCGATGAAGAACGCAGC
	ITS4-M13R	CAGGGCGCAGCGATGAC TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS total	ITS5-M13F	GTAGCGCAGCGGCCAGT GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
	ITS4-M13R	CAGGGCGCAGCGATGAC TCCTCCGCTTATTGATATGC

Tableau 5 : Amorces utilisées pour les cibles β -tubuline et Calmoduline

Cible	Amorces	Séquences
<i>B-tubuline</i>	AFTUB206-M13F	GTAGCGCAGCGGCCAGT TGGTGCCCGCTTTCTGGTA
	AFTUB676-M13R	CAGGGCGCAGCGATGAC AAGTTGTCGGGACGGAATAG
Calmoduline	CMD5-M13F	GTAGCGCAGCGGCCAGT CCGAGTACAAGGARGCCTTC
	CMD6-M13R	CAGGGCGCAGCGATGAC CCGATRGAGGTCATRACGTGG

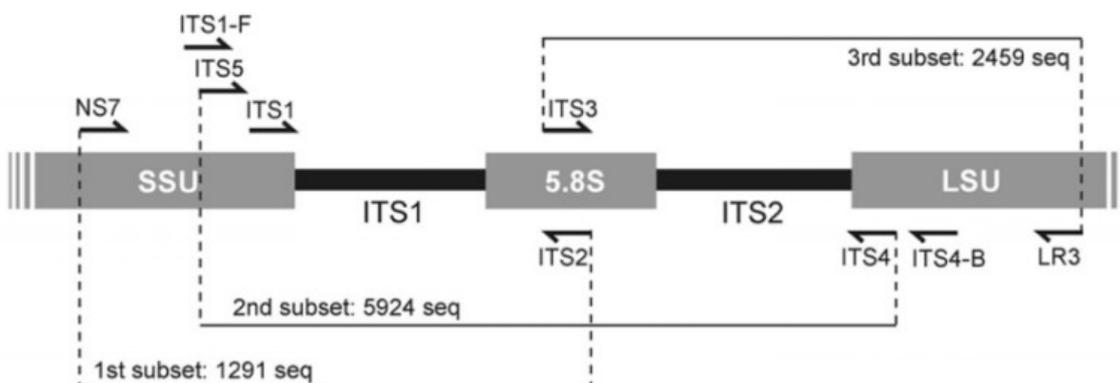


Figure 8 : Les régions ITS1, ITS2 et la position relative des amorces

Source: Bellemain E., Carlsen T., Brochmann C., Coissac E., Taberlet P., Kausrud H. *ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases*. BMC Microbiology. 2010;(10):189-198.

III.2.2. Extraction de l'ADN fongique

La paroi fongique (figure 9) a une structure complexe et rigide, permettant au champignon de pouvoir survivre dans un milieu extérieur et les méthodes d'extraction d'ADN de bactéries et de virus ne sont pas applicables aux champignons⁴⁹.

Afin de lyser complètement la paroi et de pouvoir extraire l'ADN d'un champignon, il convient d'exercer plusieurs types de lyse dont idéalement une lyse thermique et une lyse mécanique.

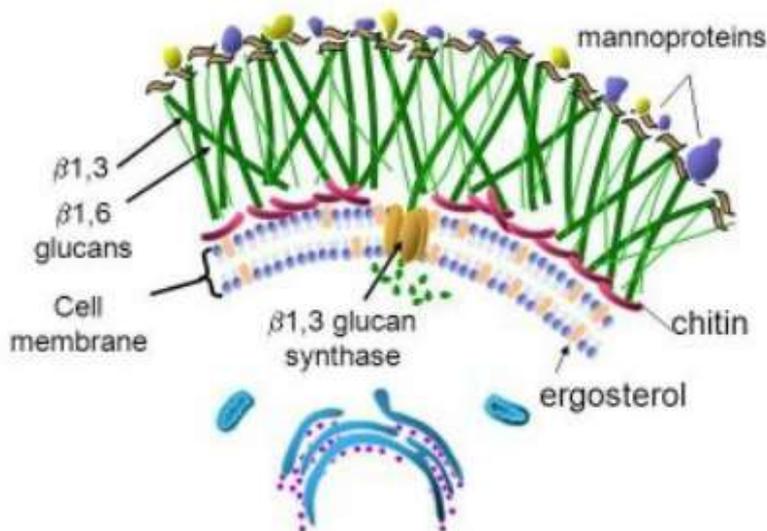


Figure 9 : Composition de la paroi fongique (Source : Image Google libre de droit)

Après avoir repris les travaux du Dr J.B. MURAT du CHU de Limoges sur le séquençage de champignons, nous avons essayé le type d'extraction décrit dans le protocole de l'étude STEFI sur les bactéries du genre *Nocardia*⁵⁰. Bien qu'il s'agisse de l'extraction d'ADN de bactéries du genre *Nocardia*, le Dr J.B. MURAT avait essayé et réussi à extraire de l'ADN fongique dans le service avec ce protocole.

Nous avons ensuite essayé de coupler une partie de la méthode de l'étude STEFI et la méthode déjà utilisée dans le service, en utilisant QIAamp DNA Mini kit (par Quiagen®) après une lyse mécanique au vu de la rigidité de la paroi fongique. Nous avons donc passé l'échantillon au système rupture des cellules Bio 101 FastPrep FP120 (Thermo Scientific, France). Le fragment de culture mis dans 500 µL de la suspension du protocole de l'étude STEFI décrit en Annexe 1, le tout versé dans des tubes contenant la matrice de lyse D FastPrep (MP Miomedicals, France). Nous avons soumis l'échantillon à 1 cycle de broyage de 45 secondes à la vitesse 6,5 mètre/seconde. Nous avons récupéré le lysat et continué l'extraction en suivant le protocole fourni par le fabricant du QIAamp DNA Mini kit. L'extraction avec ce kit repose sur une lyse thermique (30 minutes à 56°C) et chimique dans un tampon de lyse, suivi de lavages et passages successifs au travers des colonnes de silice pour séparer l'ADN du lysat.

Les extractions ont été réalisées soit à partir de cellules en culture, soit à partir de pièces opératoires directement.

Les extractions ont été réalisées dans la salle d'extraction du secteur propre dédié aux extractions d'ADN au CBRS du CHU de Limoges. Les extraits de cultures ou de pièces opératoires ont été mis dans la solution du protocole STEFI sous hotte (PSM 2) dans le laboratoire de mycologie du CHU de Limoges.

III.2.2.1. Extraction de l'ADN fongique à partir de cellules en culture

Les extractions de l'ADN fongique peuvent se faire à partir de cellules en culture, comme décrit dans le protocole STEFI pour les bactéries et étudié par le Dr J.B. MURAT pour les cellules fongiques. Nous avons donc choisi de tester les 2 types d'extraction (type STEFI et via le protocole QIAamp DNA Mini kit) sur des cellules en culture de champignons filamenteux notamment *Acremonium sp.*, quatre souches (200345123, 1-2-3 et 4) identifiées macro et microscopiquement, cultivées sur milieu Sabouraud Chloramphénicol et provenant de lavages bronchiques.

A la suite des premiers résultats, nous n'avons continué qu'à faire les extractions d'ADN fongiques en utilisant le protocole QIAamp DNA Mini kit. Les champignons ont été cultivés sur milieu Sabouraud Chloramphénicol ou MALT selon les modalités de culture habituelles.

III.2.2.2. Extraction d'ADN fongique à partir de pièces opératoires

Les extractions des ADN fongiques issues des pièces opératoires n'ont été faites que selon le protocole QIAamp DNA Mini kit réalisé directement sur les pièces déposées dans la suspension du protocole STEFI.

Nous avons utilisé le même protocole que pour les extractions d'ADN de biopsie classiquement utilisé dans le service. Il prévoit aussi l'utilisation du protocole QIAamp DNA Mini kit, mais auparavant, les biopsies sont lysées chimiquement à l'aide d'un tampon de lyse. De plus la lyse thermique est plus longue (30 minutes à 56° C et 10 minutes à 70° C). Le protocole complet est décrit en Annexe 3.

III.2.3. Amplifications des régions d'intérêts

L'amplification des régions d'intérêt se fait à partir des amorces précédemment citées et dénommées ici ITS-5, ITS-2, ITS-3 et ITS-4 pour l'amplification des régions ITS et

AFTUB206 et AFTUB676 pour l'amplification de la β -tubuline et CMD5 et CMD6 pour l'amplification de la Calmoduline. Chacune de ces amorces est composée d'une structure M13F ou M13R selon qu'elle soit respectivement sens ou antisens et ce pour permettre l'amplification de séquence lors des PCR spécifiques de séquences dans une étape ultérieure de l'identification par séquençage.

III.2.3.1. Amplification des régions *ITS1* et *ITS2*

Afin d'amplifier les régions *ITS1* et *ITS2*, nous avons utilisé le kit Light Cycler Fast Start, DNA Master HybProbe (Roche). La composition du mix de PCR était faite dans la salle des mix du secteur propre dédiée aux préparations de PCR au CBRS du CHU de Limoges. Ces mix ont été réalisés selon la préparation décrite dans le Tableau 6.

Une fois les mix préparés, les ADN fongiques précédemment extraits y ont été rajoutés dans une salle de dépôts des extractions dans le secteur propre dédié aux préparations de PCR au CBRS du CHU de Limoges.

Tableau 6 : Préparation des milieux réactionnels pour les PCR des régions *ITS1* et *ITS2*

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	Volume/PCR (μ L)
H ₂ O	-	-	12,75
Tampon "PCR Reaction Buffer", without MgCl ₂	10 X	1 X	2,5
MgCl ₂ Stock Solution	25 mM	2,5 mM	2,5
Tampon "GC-RICH Solution"	5 X	0,5 X	2,5
dNTP	10 mM	0,2 mM	0,5
Cible <i>ITS1</i> : amorce sens ITS5-M13F ou Cible <i>ITS2</i> : amorce sens ITS3-M13F	10 μ M	0,4 μ M	1
Cible <i>ITS1</i> : amorce antisens ITS2-M13R ou Cible <i>ITS2</i> : amorce antisens ITS4-M13R	10 μ M	0,4 μ M	1
Taq DNA Polymerase	5 U/ μ L	0,2 U/ μ L	0,25
ADN préalablement extrait	-	-	2

Les préparations terminées ont été amplifiées dans un Thermocycleur 2720 (Applied Biosystems) selon le programme détaillé en figure 10. Il est à noter que nous avons réalisé pour la première série 35 cycles d'amplification puis 42 cycles pour les suivantes et ce afin d'augmenter la quantité d'ADN amplifié. Pour chaque série de souches amplifiées nous avons ajouté un contrôle négatif.

Nous n'avons pas testé une amplification en modifiant la température d'hybridation, en l'abaissant par exemple afin de diminuer la spécificité des amorces pour amplifier plus facilement l'ADN fongique car la température d'hybridation était déjà adaptée à la fourchette basse de ce qui est préconisé pour la Taq DNA polymérase utilisée.

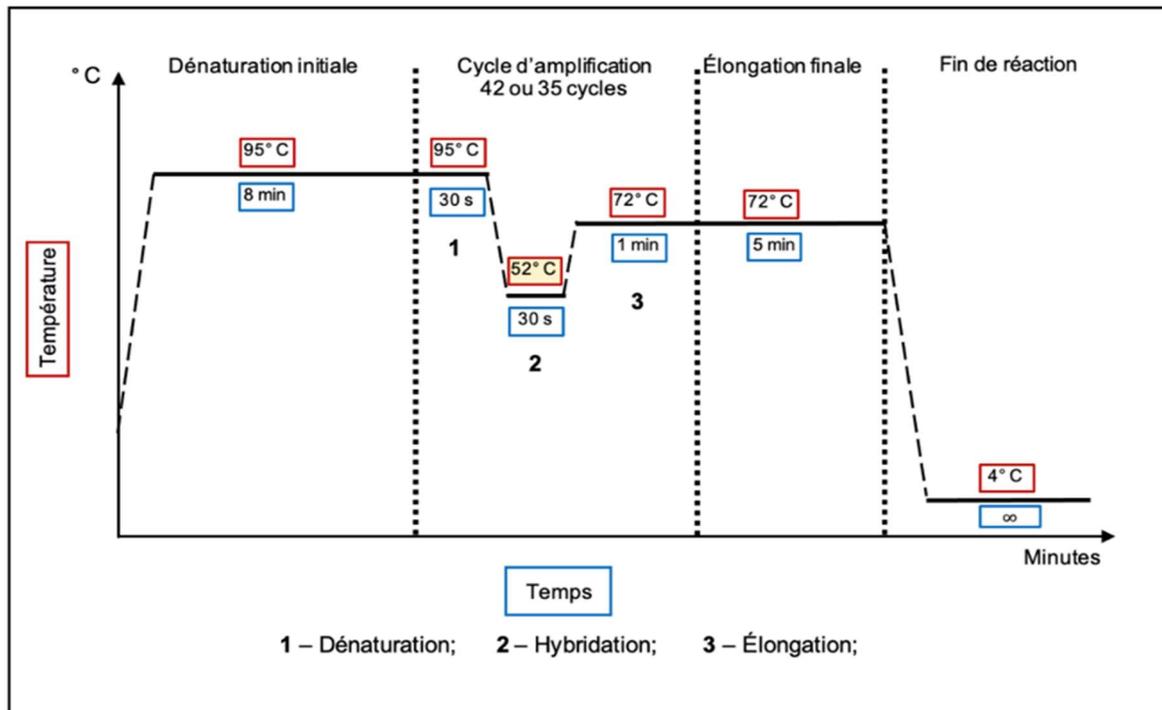


Figure 10: Schéma du programme d'amplification par PCR pour les cibles *ITS1* et *ITS2* (Source : Master 2 Carolina CODREANU_2020-2021)

Nous avons testé avec les mêmes schémas d'amplification les différents modes d'extraction précédemment décrits. Nous avons aussi testé ce schéma de PCR sur une souche déjà extraite en 2014 lors du travail du Dr DUGAT Malirynne puis conservé dans un congélateur du service à -80°C , un *Acremonium tubakii*, identifié par séquençage⁴³ déjà extrait avec le protocole kit Qiagen QIAamp® DNA Minikit.

III.2.3.2. Amplification de la région *ITS* globale

Pour tester les amplifications de la région globale *ITS* nous avons pris l'amorce sens *ITS5*-M13F et antisens *ITS4*-M13R. Nous avons pu faire cela car les protocoles de mix sont identiques, ne modifient pas les concentrations de chacun des composants (cf tableau 7) et que le programme d'amplification reste identique pour les amorces ciblant *ITS-1* et celles ciblant *ITS-2*, à 42 cycles pour augmenter le nombre total d'ADN amplifié.

Tableau 7 : Préparation des milieux réactionnels pour les PCR de la région *ITS* globale

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	Volume/PCR (μL)
H ₂ O	-	-	12,75
Tampon "PCR Reaction Buffer", without MgCl ₂	10 X	1 X	2,5
MgCl ₂ Stock Solution	25 mM	2,5 mM	2,5
Tampon "GC-RICH Solution"	5 X	0,5 X	2,5
dNTP	10 mM	0,2 mM	0,5
Cible <i>ITS</i> : amorce sens ITS5-M13F	10 μM	0,4 μM	1
Cible <i>ITS</i> : amorce antisens ITS4-M13R	10 μM	0,4 μM	1
Taq DNA Polymerase	5 U/μL	0,2 U/μL	0,25
ADN préalablement extrait	-	-	2

III.2.3.3. Amplification des régions de la β -tubuline et de la Calmoduline

L'amplification des cibles de la β -tubuline et de la Calmoduline nécessite aussi l'utilisation du kit Light Cycler Fast Start, DNA Master HybProbe (Roche). La composition du milieu réactionnel est précisée dans le Tableau 8. Nous avons réalisé 2 mélanges réactionnels pour une souche d'*Aspergillus fumigatus*, un contenant les amorces pour le gène de la β -tubuline (amorces AFTUB206F et AFTUB676R) et l'autre pour le gène de la Calmoduline (amorces CMD5-M13F et CMD6-M13R).

Les régions amplifiées ne sont pas des régions considérées comme pan fongiques¹⁸ mais peuvent être utilisées pour différencier au rang d'espèce des souches d'*Aspergillus*.

Tableau 8 : Préparation des milieux réactionnels pour les PCR de la région β -tubuline et Calmoduline

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	Volume/PCR (μL)
H ₂ O	-	-	15,25
Tampon "PCR Reaction Buffer", without MgCl ₂	10 X	1 X	2,5
MgCl ₂ Stock Solution	25 mM	2,5 mM	2,5
dNTP	10 mM	0,2 mM	0,5
β -tubuline : amorce sens AFTUB206F ou Calmoduline : amorce sens CMD5-M13F	10 μM	0,4 μM	1
β -tubuline: amorce antisens AFTUB676R ou Calmoduline: amorce antisens CMD6-M13R	10 μM	0,4 μM	1
Taq DNA Polymerase	5 U/μL	0,2 U/μL	0,25
ADN préalablement extrait	-	-	2

Nous avons ensuite amplifié l'ADN dans un Thermocycleur 2720 (Applied Biosystems, France) selon le programme détaillé dans la Figure 11. Un contrôle négatif a été aussi ajouté à cette série.

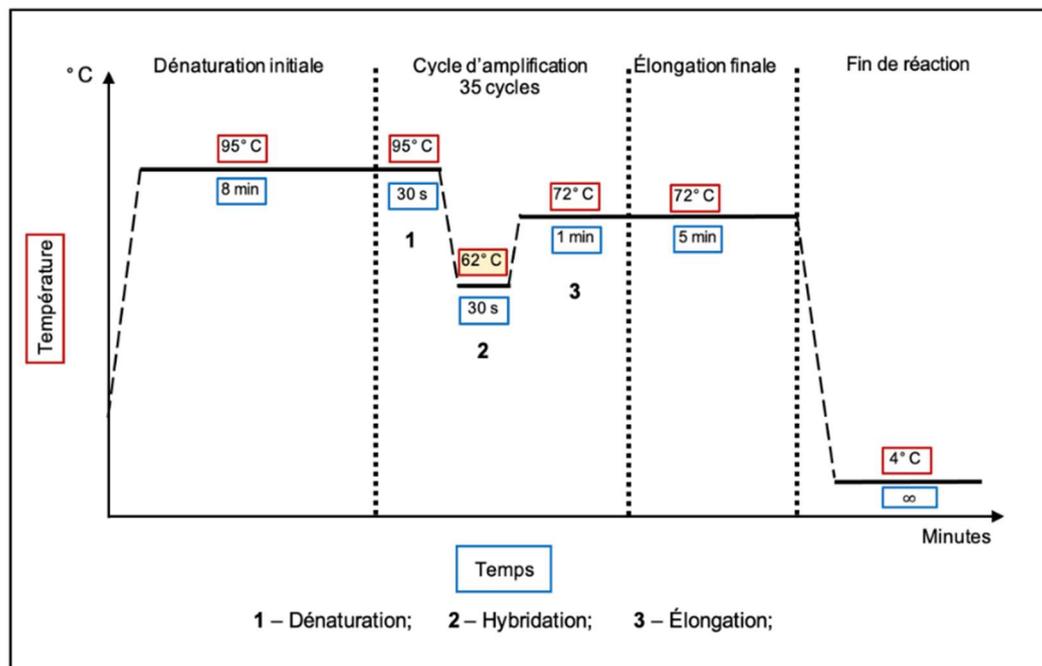


Figure 11: Schéma du programme d'amplification par PCR pour la β -tubuline et Calmoduline (Source : Master 2 Carolina CODREANU_2020-2021)

III.2.4. Migration et révélation des produits d'amplifications par PCR

Une fois l'amplification faite, il nous a fallu la faire migrer dans une cuve électrophorétique puis la révéler afin de voir si l'ADN a bel et bien été amplifié.

Initialement, nous avons fabriqué des gels d'agarose (UltraPure™ Agarose) à 0,5%, puis, nous avons augmenté la teneur en agarose à 1% ce qui a permis d'augmenter le pouvoir de résolution du gel.

Pour fabriquer les gels nous avons dissous une masse de 0.25 g d'agarose dans un volume de tampon TBE (tris borate EDTA) de 50 mL. Le rapport m/V correspond à 0.5 % d'agarose dans le gel. Pour pouvoir visualiser la migration, on rajoute un colorant des acides nucléiques : Midori Green (3 μ L pour 50 mL de gel). Pour la fabrication de gel d'agarose à 1%, il nous a fallu dissoudre 0.5 g d'agarose dans 50 mL d'eau et y ajouter 3 μ L de Midori Green.

Le gel obtenu est placé dans une cuve d'électrophorèse PowerPac™ 300 (Bio-Rad®). On dépose les produits d'amplification, 3 μ L dans chaque puits, auquel nous ajoutons 1 μ L de tampon de charge, pour chaque série de migration nous déposons 5 μ L de marqueur de taille (SmartLadder® 200- 10000 bp).

La migration se déroule sur 30 min à 100 V et nous visualisons les bandes sous UV. L'intensité de la bande est proportionnellement corrélée à la quantité d'ADN qui a été amplifiée.

Les produits de PCR amplifiés, même faiblement, permettent un séquençage. Ceux n'ayant pas migrés ne possèdent pas d'ADN en quantité suffisante permettant leur

séquençage. Dans le cas d'absence d'ADN, il s'agit le plus souvent d'une erreur de manipulation car ont été extraites seulement les colonies mises en culture et les pièces opératoires pour lesquelles nous avons trouvé des filaments en microscopie et donc pour lesquels nous sommes sûrs de la présence du champignon.

Les migrations ont été réalisées dans la salle des gels du secteur dédié aux traitements des prélèvements amplifiés au CBRS du CHU de Limoges. Les révélations ont été faites du côté recherche du CBRS, dans la salle des gels (possédant les outils permettant de numériser et d'enregistrer les gels post migration).

III.2.5. Purification des produits d'amplification par PCR

La purification de produits amplifiés par PCR et révélés se fait à l'aide du kit innuPREP® PCRpure Kit (analytikjena®). C'est celui utilisé par le service de microbiologie du CBRS afin de faire des séquençages SANGER pour les bactéries et virus, ce qui simplifie les éventuelles futures commandes de matériel et de réactifs.

Cette purification consiste initialement à ne garder que l'ADN amplifié (chargé négativement) dans une colonne (chargée positivement) après centrifugation. Ensuite, nous diluons l'ADN avec un tampon d'élution modifiant la charge des parois de la colonne et rejetant l'ADN dans le tube d'élution après une seconde centrifugation. Le volume de tampon d'élution (à l'intérieur duquel est dilué l'ADN amplifié) dépend de l'intensité de la bande obtenue lors de la révélation sur gel d'agarose. Une bande faible correspond à une faible amplification et donc à une moindre quantité d'ADN fongique amplifiée, qui sera diluée dans 35 à 40 µL de tampon d'élution. A l'inverse une bande de forte intensité correspond à une forte amplification et à une plus grande quantité d'ADN fongique amplifiée, qui sera diluée dans 80 µL de tampon d'élution.

Les purifications de PCR ont été réalisées dans la salle post-PCR du secteur propre dédié aux traitements des prélèvements amplifiés au CBRS du CHU de Limoges.

III.2.6. Réalisation de la PCR de séquence

Les PCR de séquences sont effectuées grâce aux amorces universelles (M13F et M13R) se trouvant aux extrémités 5' et 3' des amplicons, soit aux extrémités des amorces initiales et précédemment amplifiées.

Pour chaque souche de champignon, nous avons réalisé 2 PCR de séquence, chacune à partir de la même purification mais la première avec l'amorce M13F (sens) et l'autre avec l'amorce M13R (antisens). L'alignement par la suite de ces 2 séquences aide à confirmer le résultat obtenu et détecter une éventuelle anomalie de séquençage.

Les PCR de séquences sont réalisées avec l'aide du kit Big Dye Terminator v3.1, déjà utilisé par le service de séquençage du CBRS en virologie et en bactériologie. Le mix est préparé selon le tableau 9, dans la salle des mix du secteur propre du CBRS du CHU de Limoges et l'ADN amplifié et purifié est ajouté dans une salle de dépôts du secteur propre dédié aux préparations de PCR au CBRS du CHU de Limoges.

À la suite des premières analyses informatiques de séquence et de l'abondance du bruit de fond correspondant à l'importante quantité d'ADN parasite dans chaque séquence, nous avons suivi le conseil de la personne en charge du service de séquençage et avons diminué la concentration d'ADN amplifié sans modifier les autres concentrations.

Tableau 9 : Préparation des milieux réactionnels pour les PCR de séquences avec ADN purifié concentré à 3 μL puis 2 μL par PCR

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	Volume/PCR (μL) avec ADN concentré	Volume/PCR (μL) avec ADN moins concentré
H ₂ O	-	-	10	11
Tampon "BigDye"	5 X	0,5 X	2	2
BigDye Terminator v3.1 Ready reaction mix	-	-	4	4
Amorce sens M13F	3,4 μM	0,17 μM	1	1
ou Amorce antisens M13R	3,4 μM	0,17 μM	1	1
ADN amplifié et purifié	-	-	3	2

Une fois le mix de PCR fait, nous avons amplifié l'ADN dans un Thermocycleur 2720 (Applied Biosystems, France) selon le programme détaillé dans la Figure 12. Dans celui-ci nous observons que la température d'élongation est plus basse que lors des PCR classiques, cette faible température ralentit la Taq polymérase et déplace l'équilibre pour permettre une meilleure incorporation des ddNTP⁴³. 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 » par le séquenceur.

III.2.7. Purification des produits de PCR de séquence

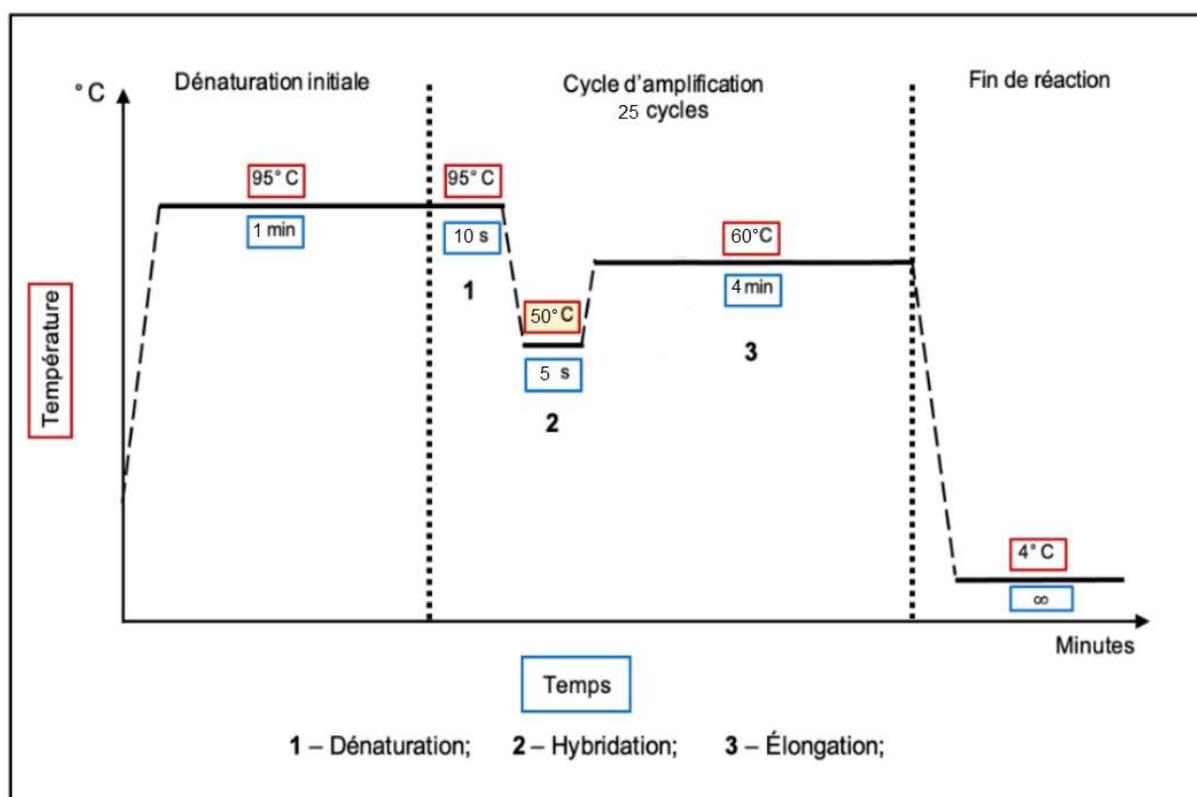


Figure 12 : Schéma du programme d'amplification par PCR pour la PCR de séquence

Nous réalisons cette étape de purification avec 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 (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. Ainsi les petites particules de diamètre inférieur à 20 µm entrent et sont piégées. A l'inverse les grosses particules passent autour et sont éluées rapidement. Les ddNTP libres en excès sont donc piégés. En effet, ces ddNTP libres peuvent parasiter les signaux de fluorescence spécifiques lors du passage dans le séquenceur en créant un bruit de fond.

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 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. Les produits de séquence sont récupérés dans une plaque de recueil 96 puits. Puis nous rajoutons 300 µL d'eau PPI dans chaque puits. La résine gonfle au contact de l'eau et forme des canaux dans lesquels les ddNTP en excès peuvent pénétrer et être piégés. Ces plaques filtrantes permettent de récupérer le produit purifié directement dans une plaque de séquence de 96 puits.

L'efficacité de la purification a un impact direct sur la qualité des séquences traitées c'est pourquoi il est important de respecter rigoureusement le protocole de purification, notamment déposer l'ADN au centre des puits et équilibrer les plaques lors de la centrifugation, étape nécessaire à la purification. Une fois faite, nous marquons par son identité propre la plaque de séquençage de mycologie et la refermons par un système ne permettant pas l'évaporation des dépôts des produits de séquence purifiés mais pouvant laisser pénétrer l'aiguille du séquenceur afin de faire son prélèvement.

Les purifications de PCR de séquences ont été réalisées dans la salle post-PCR du secteur propre dédié aux traitements des prélèvements amplifiés au CBRS du CHU de Limoges.

III.2.8. Séquençage SANGER

Une fois la purification réalisée, nous la descendons dans le service de séquençage du CBRS du CHU de Limoges afin qu'il puisse être pris en charge par le personnel spécialement formé. Pour pouvoir récupérer les résultats informatiquement, nous adjoignons une feuille de demande manuscrite ainsi qu'une demande en format .txt sur le réseau du CBRS.

Le séquenceur est nécessaire de séparer les produits de la PCR de séquence. Nous utilisons pour cela l'analyseur génétique ABI 3500XL, 24 capillaires (Applied Biosystems®, France) et un logiciel pour la collecte et le traitement des données. Les fragments nucléotidiques sont séparés par électrophorèse capillaire sur un support de migration qui est le polymère POP®. Lors de la séparation, un laser excite le fluorophore qui se trouve au bout de chaque fragment et le signal obtenu est analysé par le logiciel intégré. Après l'analyse informatique de ces signaux on obtient la séquence sous forme d'un chromatogramme comme illustré dans la figure 13.

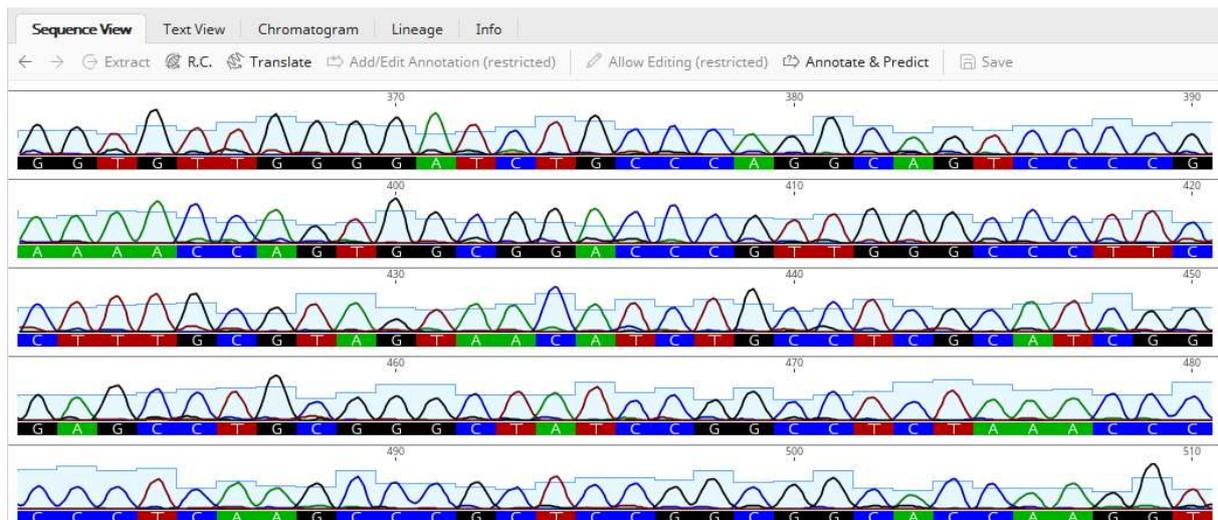


Figure 13 : Présentation d'une séquence simple brin de bonne qualité sur Geneious®

III.2.9. Traitement des données de séquençage

Les séquences ainsi générées et récupérées ne peuvent pas être traitées brutes. Nous les vérifions une à une en sens et en antisens par logiciel, puis nous les associons afin d'avoir la meilleure concordance lors de l'analyse des chromatogrammes de la séquence double brin. Puis nous enregistrons cette séquence proprement traitée et la comparant dans une banque de données. Deux bases de données publiques en ligne sont utilisées pour l'identification par biologie moléculaire des champignons. Ces systèmes d'alignement par paires fonctionnent par la recherche des séquences nucléotidiques les plus similaires avec la nôtre afin d'identifier la souche de champignon à qui appartient la cible séquencée. Nous comparerons ici l'outil de recherche BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) et Mycobank. BLAST interroge la banque de données International Nucleotide Sequence Database (INSD), dont fait partie GenBank, European Molecular Biology Laboratory et DNA databank of Japan. La fiabilité des bases de données est un paramètre à prendre en compte pour ce type de recherche et – dans le cas des champignons - 10 à 21% des séquences disponibles sur INSD comportent des annotations taxonomiques incorrectes ou sont insuffisamment annotées⁵¹, mais il reste le programme bio-informatique le plus utilisé à travers le monde⁵². Mycobank quant à lui est en collaboration avec 9 bases de données, dont les plus pertinentes pour ce travail sont : ITS, UNITE, Fusarium, PasteurYeasts et PasteurMOLDS. C'est une base de données destinée à la communauté mycologique et les séquences sont mieux documentées⁵¹.

III.2.9.1. Vérification de la qualité des chromatogrammes par GENEIOUS

Les séquences obtenues ont été traitées par le logiciel Geneious®. Dans un premier temps, nous vérifions visuellement la qualité des chromatogrammes des séquences sens d'une part et antisens d'autre part. Une séquence de qualité est caractérisée par des pics nets, bien définis, avec un espacement régulier entre eux¹⁸. Il faut pour cela avoir le moins de « bruits de fonds » possible ce qui se traduit par le moins possible de courbes de nucléotide en même temps au même endroit du chromatogramme.

En début de séquence la résolution peut être faible car certains nucléotides ont une intensité fluorescente plus marquée et masquent les pics, tandis que vers la fin de la séquence les pics peuvent se chevaucher car la fluorescence est trop faible. On peut éditer

manuellement le début et la fin de la séquence en les retirant s'ils n'ont pas une bonne lisibilité. Le fait d'utiliser des amorces universelles des régions panfongiques dans des zones stables et très répétitives permet de ne pas retirer de régions variables par cette méthode et donc de ne pas perdre en sensibilité par la suite.

De plus, nous pouvons changer les nucléotides retenus par le logiciel, si nous estimons visuellement que la base retenue par le logiciel ne correspond pas au pic mais qu'elle est un artefact du fluorophore. De même, en cas de doute ne permettant pas de discriminer deux ou plus nucléotides, nous pouvons modifier le nom de la base par celui d'une base artificielle pouvant être mixte, comme celles décrites dans le tableau 10. Le doute sur un nucléotide lors de la comparaison simple brin peut s'estomper lors de l'assemblage des séquences en double brin et un S en face d'un G laissera penser qu'il s'agit bien d'une Guanine sur le brin initialement séquencé.

Tableau 10 : Nucléotides artificiels correspondant à un doute entre plusieurs nucléotides existants

Nucléotides artificiels	Correspondance à un nucléotide existant
R	A ou G
Y	C ou T
K	G ou T
M	A ou C
S	G ou C
W	A ou T
N	A ou T ou C ou G
B	C ou G ou T
D	A ou G ou T
H	A ou C ou T
V	A ou C ou G

Après édition, les séquences sens et antisens sont alignées pour obtenir une séquence consensus qui est vérifiée sur Généious selon le même mode visuel. Le recouplement se fait automatiquement selon les modes suivants afin de privilégier les Gaps ou les mutations avec un certain taux d'incertitude. Les paramètres d'alignement des séquences sont laissés par défaut et correspondent à un alignement présentant le score le plus élevé. Le score d'alignement est calculé de la façon suivante :

- il faut minimum 65% de similarité entre les 2 brins sens et antisens
- lors d'une complémentarité entre nucléotides le score augmente de **5**
- lors d'une incompatibilité entre nucléotides le score diminue de **4**
- lors de l'apparition d'un gap (décalage d'un nucléotide entre les 2 séquences) le score diminue de **8**
- lors de l'augmentation d'un gap après le premier décalage le score diminue de **3** par nucléotides décalés.

Prenons l'exemple des séquences ATCGGTGTACGTG sens et TCACCTAACCGG antisens, voyons ce qui arrive si nous les mettons de prime abord selon l'alignement le plus long sans faire de Gap.

ATCGGTGTACGTG -
 - - GGCCAATCCACT

Nous avons ici un alignement de 7 nucléotides sur les 2 séquences, sans Gap avec le score suivant :

$S = 7 \times 5 - 4 \times 4 = 19$ (les extrémités ne comptent pas s'il n'y a rien à aligner de façon complémentaire)

Puis en introduisant la possibilité de Gap.

ATCGGTGTACGTG -
 - - GGCCA-ATCCACT

Ici nous voyons que l'apparition d'un Gap permet d'augmenter le score d'alignement et donc la complémentarité des séquences :

$S = 9 \times 5 - 2 \times 4 - 1 \times 8 = 29$

Selon le calcul du score d'alignement nucléotidiques laissé par défaut le meilleur alignement est le second, il n'est pas exact car ne permet pas une homologie à 100% mais permet d'en avoir une bonne approche. De plus, après cet alignement, les séquences sont revues manuellement pour voir s'il est nécessaire de procéder à des modifications, comme les nucléotides « multiples » vus précédemment ou des anomalies passées inaperçues à la lecture d'un seul brin.

III.2.9.2. Identification dans une banque de données à partir de la base BLAST

Le système BLAST est accessible à l'adresse : <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> et utilise la dernière version de BLAST+2.12.0. BLAST est une heuristique dans le sens où c'est un outil qui a pour objet les procédures de recherche et de découverte en résolvant des problèmes à partir de connaissances incomplètes. Ce type d'analyse permet d'aboutir en un temps limité à des solutions acceptables mais non optimales⁵³. L'outil BLAST permet de trouver dans une banque de données la ou les séquences qui ressemblent le plus à une séquence donnée⁵³. Le but est de d'aligner la séquence à rechercher (*Query*) avec chaque séquence de la banque (*Subject*), de classer les séquences *Subject* par score décroissant de la plus similaire à la *Query* puis de ne garder les meilleures.

BLAST utilise une matrice de similarité, associant deux acides aminés l'un en face de l'autre (un de *Query* et une de la séquence *Subject* testée) et permet de donner un score de similarité entre ces deux acides aminés pour calculer des scores d'alignement. Cette Matrice n'est utilisée que pour les alignements entre acides aminés⁵³. Pour les alignements entre séquences nucléotidiques, il existe des méthodes complexes d'alignement locale, semi-locale ou globale. BLAST fournit un score (E-value) pour chaque alignement trouvé et utilise ce score pour donner une évaluation statistique de la pertinence de cet alignement, soit la probabilité qu'il soit dû au hasard.

Le principe de fonctionnement de BLAST, peut se décomposer en trois étapes⁵⁴ :

- La décomposition de la séquence *Query* en segments de longueur k , se chevauchant et la recherche pour chacun d'eux de tous les « mots de longueur k » possibles ayant un score d'homologie supérieur à un seuil T donné. BLAST constitue ainsi un dictionnaire de tous les mots de longueur k donnant une homologie locale minimum. (Exemple la séquence *Query* « GAGCAT » contient 3 mots de longueur k avec $k = 4$ nucléotides : « **GAGCAT** », « **GAGCAT** » et « **GAGCAT** ». Cette partie de la recherche dans BLAST va permettre de découper la séquence *Query* en mots de longueur k puis de repérer dans les séquences *Subject* toutes les séquences contenant ces 3 sous-séquences).

- Le balayage de la banque avec le dictionnaire ainsi constitué. Chaque fois que BLAST identifie une coïncidence avec une séquence *Subject* dans la banque, il tente d'étendre l'homologie en amont et en aval du mot de longueur k initialement trouvé (Exemple la séquence *Query* précédente « GAGCAT » contient le mot k de 4 nucléotides « GAGCAT », s'il est trouvé dans une séquence *Subject* BLAST va voir si la séquence est précédée d'un G et si elle est suivie d'un T).

- Après extension de l'homologie, BLAST évalue à partir du score obtenu la probabilité que celle-ci soit due au hasard ou plus exactement son espérance mathématique, la E-value.

Pour des comparaisons de séquences nucléotidiques, il convient d'utiliser la version BLASTN (*Query* = Nucléotides et *Subject* = Nucléotides) et dans ce cas trois programmes de sélection entre *Query* et *Subject* sont utilisables. « Megablast » est destiné à comparer une *Query* à des séquences étroitement liées et fonctionne mieux si le pourcentage d'identité cible est de 95 % ou plus, cette méthode est très rapide. « Discontiguous megablast » utilise une graine initiale qui ignore certaines bases (ce qui permet les mésappariements) et est destiné aux comparaisons entre espèces. « BlastN » est lent, mais permet d'utiliser des mots de taille k allant jusqu'à sept bases. Nous utilisons dans ce travail BLASTN en combinaison avec la méthode « Megablast » qui permet de rechercher des séquences d'ADN très proches. Nous utilisons aussi la Database rRNA/ITS en précisant « Internal transcribed spacer region (ITS) from fungi type and reference material » dans l'onglet de recherche illustré en figure 14. Pour notre objectif, il est intéressant d'interroger les bases de données des séquences ITS des champignons et rechercher les séquences similaires. Les autres paramètres sont laissés par défaut.

Une fois la recherche effectuée, BLAST trie les résultats selon celui qui a le score le plus élevé puis tous les autres résultats avec un score décroissant. Plus ce score maximal est élevé, plus la E-value est faible. Le site permet d'avoir la *Query cover* correspondant à la taille du segment de la *Query* utilisé pour rechercher la similarité entre celui-ci et la séquence du *Subject*, si le segment de la *Query* est plus court que celui de la séquence *Subject* alors il peut avoir une concordance – appelée pourcentage d'identité - de 100% entre la *Query* et plusieurs *Subject* différents. Pour ces raisons et l'acceptation d'une corrélation imparfaite entre deux séquences, l'outil BLAST est considéré comme non optimal, mais il est utile car permet une recherche rapide dans l'une des plus grandes banques de donnée mondiale.

Figure 14 : Paramètres d'alignement à renseigner dans BLAST®

Dans notre étude, nous prenons comme identification du champignon celui qui a le score max le plus élevé. Si plusieurs espèces fongiques ont le score max le plus élevé, une recherche complémentaire est réalisée afin de ne pas prendre comme deux espèces différentes deux nominations de taxonomies différentes. Si les espèces avec le score max ne sont pas identiques, nous prenons celle qui a la plus importante représentativité dans l'onglet « taxonomy » de BLAST. L'identité du champignon jusqu'à l'espèce n'est retenue comme bonne que si le pourcentage d'identité est supérieur à un seuil arbitrairement placé ici. Dans la littérature, un seuil est actuellement manquant pour l'identification au rang d'espèces des champignons⁵⁵. Selon les études, le minimum d'identité accepté est différent, certaines⁵⁶ retiennent un pourcentage d'identité $\geq 99\%$, d'autres^{55,57} admettent une limite $\geq 97\%$ et un taux de recouvrement minimum de 80% . Notre étude a pour but de mettre la technique en place en routine dans le service et de trouver l'identité d'un champignon d'intérêt médical non obtenue par les méthodes usuelles, nous avons donc retenu un minimum de 97% d'identité et 80% de recouvrement pour valider le *Subject* avec le score max.

III.2.9.3. Identification dans une banque de données à partir de la base MycoBank

L'outil MycoBank est un programme de recherche disponible sur <https://www.mycobank.org>, onglet Molecular ID. Ce programme s'est donné pour mission de documenter les nouveautés de la nomenclature mycologique ainsi que les descriptions et illustrations associées^{58,59}.

Pour une séquence donnée, nous avons interrogé toutes les bases de données disponibles sur la plateforme. Puis le tri des résultats selon la similarité se fait de façon sensiblement identique au tri de BLAST⁵⁹. Pour comparer les 2 bases de données, nous avons choisi les mêmes critères de sélection d'identification, soit le score le plus élevé parmi ceux obtenus et, comme pour BLAST, le seuil minimum de 97% d'identité avec un taux de recouvrement minimum acceptable de 80% a été fixé pour valider l'identification.

Pour l'étude des séquences sur MycoBank, nous avons utilisé cet outil sous la forme décrite en figure 15.

Pairwise alignment

Reference database(s)

Select	Name	Location	Status	#Match(s) found
<input checked="" type="checkbox"/>	EF1	https://its.mycologylab.org		
<input checked="" type="checkbox"/>	ITS	https://its.mycologylab.org		
<input checked="" type="checkbox"/>	FunCBS	https://wi.knaw.nl		
<input checked="" type="checkbox"/>	Mycoket	https://wi.knaw.nl		
<input checked="" type="checkbox"/>	UNITE	https://wi.knaw.nl		
<input checked="" type="checkbox"/>	Fusarium	http://www.mycobank.org		
<input checked="" type="checkbox"/>	Morch	http://www.mycobank.org		
<input checked="" type="checkbox"/>	PasteurYeasts	https://fungibank.pasteur.fr		
<input checked="" type="checkbox"/>	PasteurMOLDS	https://fungibank.pasteur.fr		

Paste sequence to align

Séquence à insérer

I have read the disclaimer and I agree with the conditions and limitations associated with the usage of the software

Start alignment

Figure 15 : Présentation de l'outil MycoBank

IV. Résultats

IV.1. Résultats des extractions

Nous ne pouvons analyser les différentes extractions qu'après amplification et révélation sur gel d'agarose.

Nous avons réalisé la première série avec 5 souches (les tubes de culture 1, 2, 3, 4 du patient 200345134 et la souche qui a été identifiée en 2014 comme *Acremonium tubakii* par séquençage SANGER). Les figures 16 et 17 représentent les images des migrations des produits de PCR, respectivement pour les cibles ITS1 et ITS2 avec 35 cycles d'amplification.

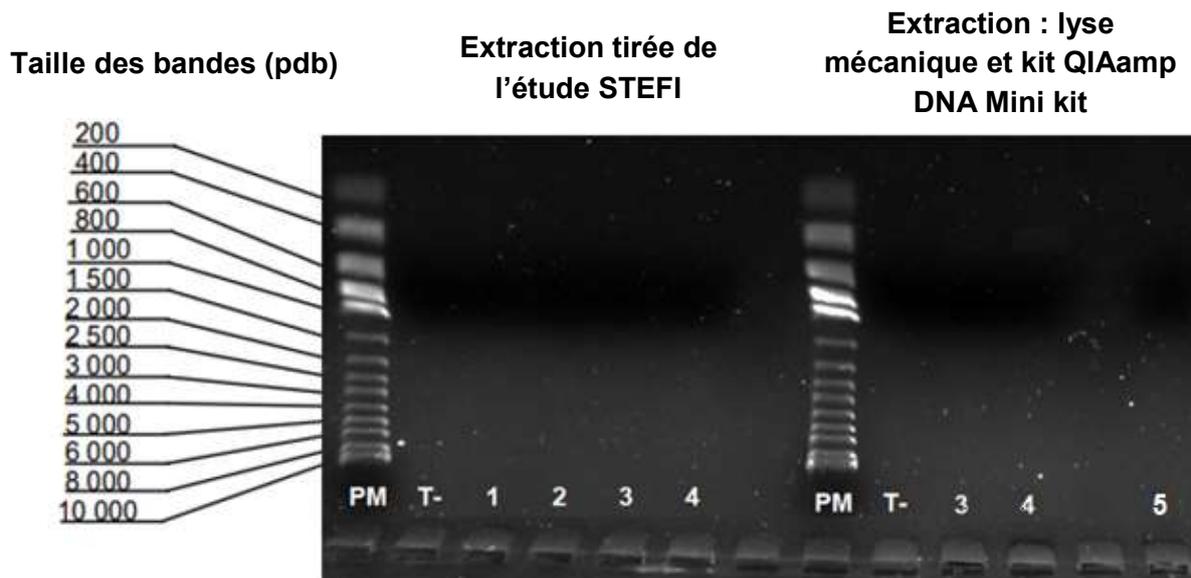


Figure 16 : Migration sur gel d'agarose 0,5% du fragment *ITS1* (PCR, 35 cycles) (PM : marqueur de poids moléculaire ; T- : témoin négatif ; 1 : souche 200345134 tube 1 ; 2 : souche 200345134 tube 2 ; 3 : souche 200345134 tube 3 ; 4 : souche 200345134 tube 4 ; 5 : *Acremonium tubakii*)

L'amplification du fragment *ITS1* avec 35 cycles ne montre aucun fragment, pour les 2 méthodes d'extraction utilisées en figure 16.

Pour l'amplification du gène *ITS2* nous observons des fragments ayant une taille comprise entre 400 et 600 paires de bases. L'extraction réalisée d'après l'étude STEFI a fonctionné pour les 3 souches testées. En revanche, l'extraction avec le kit Qiagen® et une lyse préalable FastPrep® extrait l'ADN fongique des 4 milieux de culture, celui de *Acremonium tubakii* était déjà extrait et conservé à -80°C. De plus, la quantité d'ADN extraite avec ce second protocole est nettement supérieure pour une même amplification. Nous extrairons donc les autres souches uniquement avec le protocole de lyse préalable FastPrep® puis kit Qiagen®.

Taille des bandes (pdb) Extraction tirée de l'étude STEFI Extraction : lyse mécanique et kit QIAamp DNA Mini kit

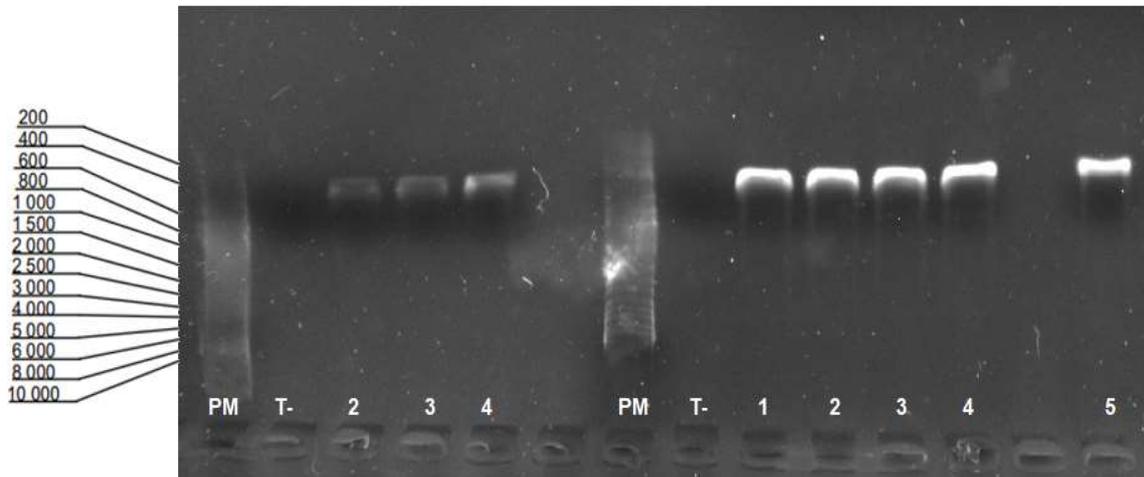


Figure 17 : Migration sur gel d'agarose 0,5% du fragment *ITS2* (PCR, 35 cycles) (PM : marqueur de poids moléculaire ; T- : témoin négatif ; 1 : souche 200345134 tube 1 ; 2 : souche 200345134 tube 2 ; 3 : souche 200345134 tube 3 ; 4 : souche 200345134 tube 4 ; 5 : *Acremonium tubakii*)

IV.2. Résultats des amplifications par PCR et des migrations sur gel d'agarose

Pour pallier l'absence d'amplification du fragment *ITS1*, nous avons réalisé une PCR avec 42 cycles d'amplification pour le tube 3 de la souche 200345134, la souche d'*Acremonium tubakii* et une souche d'*Aspergillus section fumigati*. Cette amplification est décrite en figure 18. Nous avons continué toutes les amplifications qui suivent avec l'ADN extrait par la méthode de lyse mécanique FastPrep® et protocole QIAamp® DNA Mini kit.

Taille des bandes (pdb) Extraction : lyse mécanique et kit QIAamp DNA Mini kit

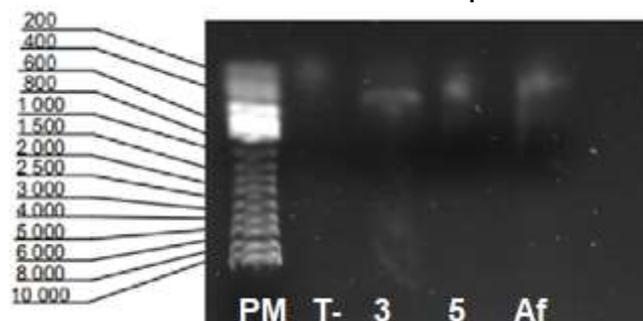


Figure 18 : Migration sur gel d'agarose 0,5% du fragment *ITS1* (PCR, 42 cycles) (PM : marqueur de poids moléculaire ; T- : témoin négatif ; 3 : souche 200345134 tube 3 ; 5 : *Acremonium tubakii* ; Af : souche d'*Aspergillus section fumigati*)

Nous observons que 42 cycles d'amplification permettent de visualiser une faible bande vers 400 paires de bases pour les 3 souches testées. Une faible tache au niveau du témoin négatif correspond au marqueur de migration. Constatant l'amplification réussie des souches extraites avec 42 cycles, nous décidons de poursuivre avec ce nombre de cycles par la suite.

Afin de conforter le fait que l'amplification à 42 cycles permet de visualiser l'ADN amplifié des régions ITS 1 et ITS 2, nous décidons de la répéter sur d'autres souches en figure 19. Le protocole d'amplification fonctionne mais la visualisation des bandes n'est pas optimale surtout pour les bandes faiblement amplifiées en région ITS1, nous décidons alors de modifier le gel d'agarose en le densifiant d'avantage et le passer de 0.5% à 1 % figure 20. Une amplification a été réalisée sur d'autres souches car les séquençages des ITS faiblement visualisés en figure 19 ont permis leur identification.

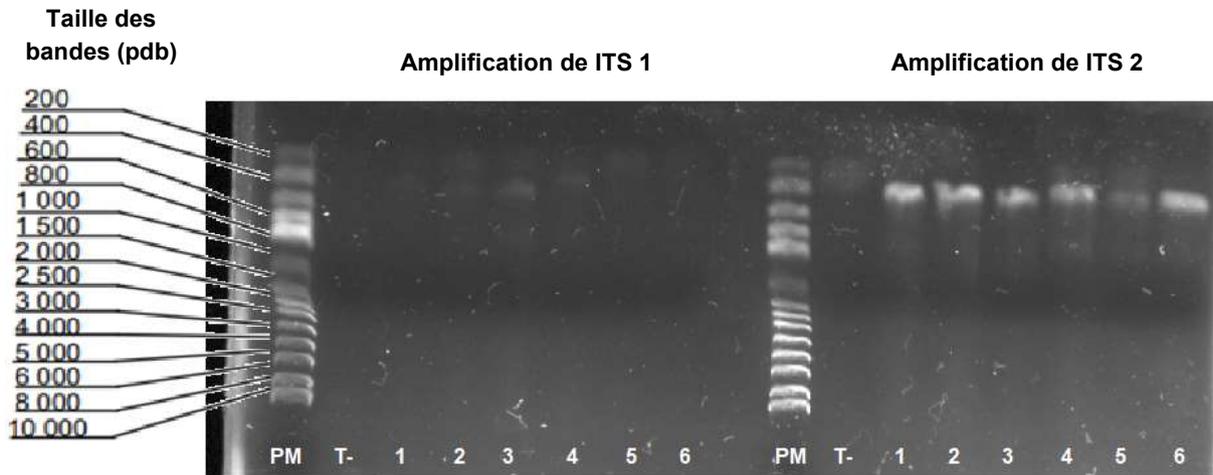


Figure 19 : Migration sur gel d'agarose 0,5% des fragments *ITS1* et *ITS2* (PCR, 42 cycles ; Extraction : lyse mécanique et kit QIAamp DNA Mini kit),(PM : marqueur de poids moléculaire ; T- : témoin négatif ; 1 : souche 200359149 tube 1 ; 2 : souche 200359149 tube 2 ; 3 : souche 200359149 tube 3 ; 4 : souche 200368067 tube 1 ; 5 : souche 200368067 tube 2 ; 6 : souche 210035715 tube 1)

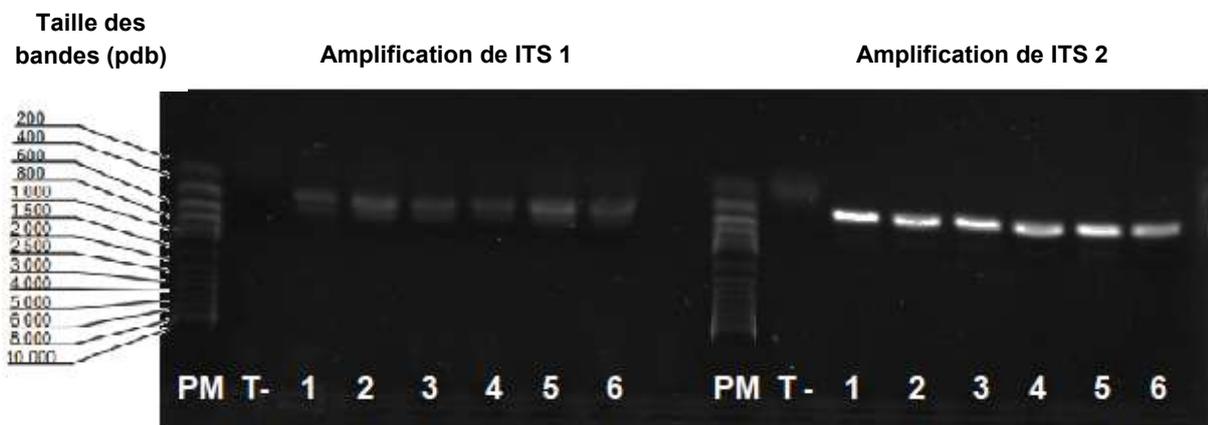


Figure 20 : Migration sur gel d'agarose 1% des fragments *ITS1* et *ITS2* (PM : marqueur de poids moléculaire ; T- : témoin négatif ; 1 : souche 200332118 tube 1 ; 2 : souche 200332118 tube 2 ; 3 : souche 200332118 tube 3 ; 4 : souche 200337020 tube 1 ; 5 : souche 200337020 tube 2 ; 6 : souche 200337020-tube 3)

Bien qu'il ne s'agisse pas de la même série d'amplification ni d'extraction, nous constatons une meilleure visualisation des bandes, même faiblement amplifiées, avec un gel d'agarose à 1% par rapport à celui à 0.5%.

Comme les amplifications précédentes, l'amplification de la région ITS 1 est plus faible que celle de la région ITS 2. Cela peut venir de la qualité des amorces car le reste du protocole

est sensiblement identique. De même les températures d'hybridation de la Taq polymérase sont spécifiques à une région et même si la température de demi-hybridation semble plus élevée entre ITS5, ITS2, ITS3 et l'ADN fongique qu'entre ITS4 et l'ADN fongique⁶⁰, l'étude des séquences obtenues par cette méthode est bonne.

Par la suite, nous continuons l'amplification à 42 cycles sans modification de température d'hybridation et une migration sur gel à 1 % sans modification du temps de migration ni du voltage.

Nous avons essayé le protocole spécifique à l'amplification de la β -tubuline et de la Calmoduline, mais celui-ci a été un échec comme le montre la figure 21.

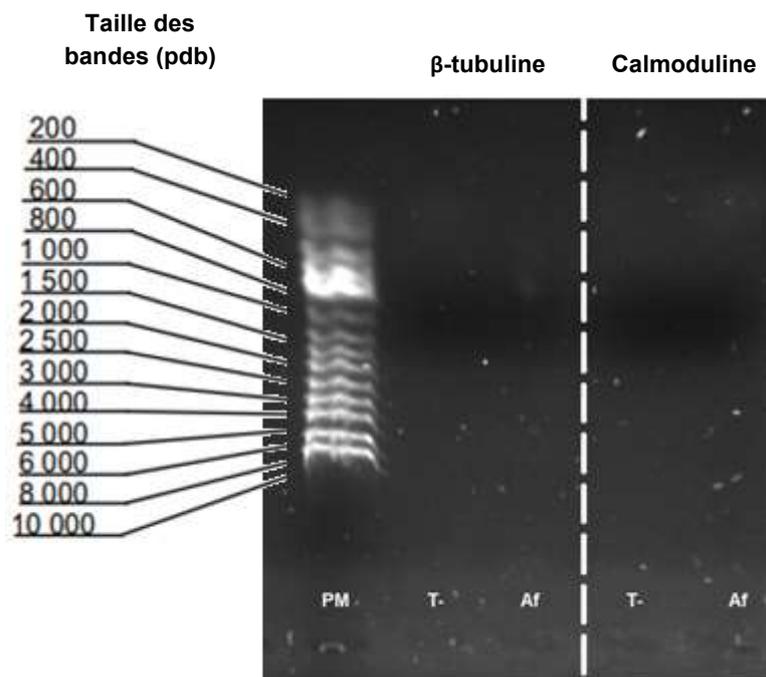


Figure 21 : Migration sur gel d'agarose 1% des fragments β -tubuline et Calmoduline (PM : marqueur de poids moléculaire ; T- : témoin négatif ; Af : *Aspergillus* section *fumigati*)

L'étude des séquences obtenues par amplification de la souche *Aspergillus* section *fumigati* utilisée en Figure 18 a montré qu'une identification à l'espèce était possible simplement avec le séquençage de la région ITS1 et 2. Nous n'avons donc pas poussé plus loin le développement du séquençage de la β -tubuline ni de la Calmoduline.

L'amplification de la région ITS globale, après l'avoir vu faire à Henri MONDOR, a permis de visualiser des bandes plus ou moins bien amplifiées mais ayant toutes permis une identification à l'espèce via le séquençage de la région globale.

IV.3. Résultats du séquençage SANGER

Le séquençage SANGER a permis d'obtenir des séquences pour 38 souches parmi les 40 testées sur 19 patients prélevés (résultats en annexe 4 et 5). A cela s'ajoute le séquençage de la souche d'*Acremonium* du Dr DEGAT et celle d'*Aspergillus fumigatus* testée au laboratoire. Le 19^{ème} patient n'ayant pas eu une amplification de séquence permettant de réaliser une analyse et une identification à l'espèce était celui ayant donné l'échantillon identifié 200389912. Ce prélèvement provient de phanère retrouvant *Rhodotorula mucilaginosa*, *C. parapsilosis*, *C. albidus* et *T. rubrum* en méthodes usuelles. Ce prélèvement n'a pas pu être

convenablement amplifié par la technique de séquençage, probablement dû au fait de la grande quantité d'espèces dans le même prélèvement.

IV.3.1. Résultats du séquençage ciblant les régions ITS1 et ITS2

Le séquençage des régions ITS1 et ITS2 a permis d'obtenir des résultats soit sur Mycobank, soit sur BLAST dans tous les cas où la séquence a été obtenue. Ces séquences ont permis une identification à l'espèce avec $\geq 97\%$ d'identité et $\geq 80\%$ de recouvrement, soit dans l'une, soit dans les deux banques de données.

Comme résumé dans le tableau 11, parmi les 40 échantillons testés, toutes les méthodes et les régions amplifiées n'ont pas donné un résultat similaire.

Tableau 11 : Tableau des résultats des séquençages par méthode SANGER

Numéro prélèvement	N° tube	MYCOBANK		BLAST		
		ITS1	ITS2	ITS1	ITS2	ITS globale
200345 134	1	Abs Amp	<i>Hormographie lla verticillata</i>	Abs Amp	Abs 97%	-
	2	Abs Amp	<i>H. verticillata</i>	Abs Amp	Abs 97%	-
	3	<i>H. verticillata</i>	<i>H. verticillata</i>	Abs 97%	Abs 97%	-
	4	Abs Amp	<i>H. verticillata</i>	Abs Amp	Abs 97%	-
200359 149	1	<i>T. tonsurans</i>	<i>T. tonsurans</i>	<i>T. tonsurans</i>	<i>T. tonsurans</i>	<i>T. tonsurans</i>
	2	<i>T. tonsurans</i>	<i>T. tonsurans</i>	<i>T. tonsurans</i>	<i>T. tonsurans</i>	-
	3	<i>T. tonsurans</i>	<i>T. tonsurans</i>	<i>T. tonsurans</i>	<i>T. tonsurans</i>	-
200368 067	1	<i>A. aureolus</i>	<i>A. aureolus</i>	<i>A. aureolus</i> et <i>A. udagawae</i>	<i>A. udagawae</i>	-
	2	Abs Amp	<i>A. aureolus</i> et <i>A. udagawae</i>	Abs Amp	<i>A. udagawae</i>	-
	3*	Chromatogramme ininterprétable				-
210035 715	1	Abs Amp	<i>Neoscytalidium m dimidiatum</i>	Abs Amp	<i>Neoscytalidium novaehollandiae</i>	-
200353 575	1	<i>Aureobasidium m pullulans</i>	<i>Aureobasidium m pullulans</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>A. pullulans</i> var. <i>melanogeu</i> m	-
200379 843	1	<i>Arthrographis kalrae</i>	<i>A. kalrae</i>	<i>A. kalrae</i>	<i>A. kalrae</i>	-
	2	<i>A. kalrae</i>	<i>A. kalrae</i>	<i>A. kalrae</i>	<i>A. kalrae</i>	-
	3	<i>A. kalrae</i>	<i>A. kalrae</i>	<i>A. kalrae</i>	<i>A. kalrae</i>	-
201892 858	1	<i>Stereum hirsutum</i>	<i>Stereum hirsutum</i>	Abs 97%	Abs 97%	<i>Aleurodiscus thailandicus</i>
210018 012	1	<i>Actinomucor elegans</i>	<i>Actinomucor elegans</i>	Recouvrement < 80%	<i>Mucor laxorrhizus</i>	<i>Mucor laxorrhizus</i>
200332 118	1	<i>Paecilomyces formosus</i>	<i>P. formosus</i>	Abs 97%	<i>P. formosus</i>	-
	2	<i>P. formosus</i>	<i>P. formosus</i>	Abs 97%	<i>P. formosus</i>	-
	3	Chromato. ininterprétable	<i>P. formosus</i>	Chromato. ininterprétable	<i>P. formosus</i>	-
200330 016	1*	Chromato. ininterprétable	<i>Geotrichum candidum</i>	Chromato. ininterprétable	<i>Geotrichum candidum</i>	-
200337 020	1	<i>Paecilomyces variotii</i>	<i>P. variotii</i>	<i>P. variotii</i>	Abs 97%	<i>P. variotii</i>
	2	<i>P. variotii</i>	<i>P. variotii</i>	<i>P. variotii</i>	Abs 97%	-
	3	<i>P. variotii</i>	<i>P. variotii</i>	<i>P. variotii</i>	Abs 97%	-

Numéro prélèvement	N° tube	MYCOBANK		BLAST		
		ITS1	ITS2	ITS1	ITS2	ITS globale
200356 993	1	<i>Penicillium freii</i>	<i>Penicillium freii</i>	<i>Penicillium freii</i>	<i>Penicillium freii</i>	<i>P. hordei</i>
	2	<i>Alternaria alternata</i>	<i>A. alternata</i>	<i>Alternaria. alstroemeriae</i>	<i>A. alstroemeriae</i>	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>
	3	Chromato. ininterprétable	<i>A. alternata</i>	Chromato. ininterprétable	<i>A. alstroemeriae</i>	-
	4	<i>A. alternata</i>	<i>A. alternata</i>	<i>A. alstroemeriae</i>	<i>A. alstroemeriae</i>	-
200364 654	1	Abs Amp	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Abs Amp	<i>P. lilacinus</i>	-
	2	<i>P. lilacinus</i>	<i>P. lilacinus</i>	<i>P. lilacinus</i>	<i>P. lilacinus</i>	-
	3*	Recouvrement < 80%	<i>A. aureolus</i>	Recouvrement < 80%	<i>A. aureolus</i>	<i>A. aureolus</i>
210012 252	1	Abs Amp	<i>Chaetomium subaffine</i>	Abs Amp	<i>C. subaffine</i>	-
	2	<i>Chaetomium globosum</i>	<i>C. subaffine</i>	<i>Chaetomium subglobosum</i>	<i>C. subaffine</i>	-
200389 912	1	Abs Amp				-
200376 862	1	<i>Blastobotrys raffinosifermentans</i>	<i>B. raffinosifermentans</i>	<i>B. raffinosifermentans</i>	<i>B. raffinosifermentans</i>	-
200362 635	1	<i>Cephalotrichum microsporium</i>	<i>C. microsporium</i>	<i>Cephalotrichum cylindricum</i>	<i>C. cylindricum</i>	-
	2	<i>C. microsporium</i>	<i>C. microsporium</i>	<i>C. cylindricum</i>	<i>C. cylindricum</i>	-
210066 990	1	-	-	-	-	<i>Gibellulopsis simanii</i>
211983 825	1	-	-	-	-	<i>G. simanii</i>
	2	-	-	-	-	<i>G. simanii</i>

(Abs Amp = Absence d'amplification permettant la mise en évidence d'une séquence, Abs 97% = Absence de résultat ayant obtenu une similarité $\geq 97\%$, Recouvrement < 80% = Absence de résultat ayant un recouvrement $\geq 80\%$, *étude faite sur une biopsie, - = non testé, **Genre espèce** = identique, **Genre espèce** = pas identique mais pas de modification de prise en charge car champignon de l'environnement)

L'identification fongique à partir de l'amplification de *ITS1* a été testée 37 fois. Pour 24 de ces 37 tentatives, nous avons une identification à l'espèce, dans 8 cas, la PCR initiale n'a pas abouti à une amplification visible à la migration et dans 5 cas il n'a pas été possible d'avoir une identification à l'espèce malgré une amplification du gène. Parmi les 5 cas n'ayant pas permis une identification à l'espèce, dans 4 cas il s'agissait d'une séquence ininterprétable avec un chromatogramme présentant trop de bruit de fond. Le dernier cas, celui de l'échantillon 200364654 tube 3, une biopsie de sinus, le gène a été amplifié convenablement permettant une séquence de celui-ci qui n'a pas posé de problème de lecture, mais l'identification dans Mycobank ou BLAST n'a pas permis de trouver une séquence *Subject* avec $\geq 80\%$ de recouvrement.

Parmi les 24 identifications à l'espèce avec *ITS1*, 24 ont été faites avec Mycobank et 19 avec BLAST. Dans 5 cas des espèces différentes ont été retrouvées selon que ce soit BLAST ou Mycobank qui ait été utilisé. Pour ces 5 cas, les techniques retrouvaient à chaque fois des champignons de même genre. Ces champignons étaient des champignons de l'environnement dans chaque cas et les prélèvements ont été faits dans un nez, sur un ongle d'hallux et une aspiration bronchique.

L'identification fongique à partir de l'amplification de *ITS2* a été testée 37 fois : dans 35 cas nous avons une identification à l'espèce, dans 1 cas la PCR initiale n'a pas abouti à une amplification visible à la migration et dans 1 cas le chromatogramme était ininterprétable et présentait trop de bruit de fond.

Parmi les 35 identifications à l'espèce avec *ITS2*, 35 ont été faites avec Mycobank et 27 avec BLAST. Dans 8 cas, des espèces différentes ont été retrouvées selon que ce soit BLAST ou Mycobank qui ait été utilisé. Parmi ces 8 cas, les techniques retrouvaient dans 7 cas des champignons de même genre. Le 8^{ème} cas retrouvait *Actinomucor elegans* ou *Mucor laxorrhizus* pour l'échantillon 210018012, tube 1. Dans ces 2 cas, la prise en charge du patient n'a pas changé et le prélèvement source correspondait à des selles sans notion d'immunodépression ni de symptômes évoquant une mucormycose digestive.

IV.3.2. Résultats du séquençage de la région *ITS* globale

L'identification fongique à partir de l'amplification totale de la région *ITS* (cf tableau 11) a été testée 10 fois. Parmi ces 10 tentatives, toutes ont permis une identification à l'espèce. Dans 7 cas, ont été trouvées des espèces identiques à celles identifiées par le séquençage de *ITS1* et/ou *ITS2*. Dans les 3 autres cas il y avait :

- dans l'échantillon 201892858 tube 1, un champignon de l'environnement présent dans un nez (comme celui identifié avec *ITS1* et *ITS2*),
- dans l'échantillon 200356993 tube 1, un *Penicillium* différent de celui retrouvé par les autres séquençages sur ce même prélèvement,
- dans le tube 200356993 tube 2, une contamination à *Penicillium* dans un prélèvement pour lequel nous savions déjà qu'il y avait un *Penicillium sp.* alors que les autres séquences correspondent à un *Alternaria*.

Dans aucun cas le compte rendu de laboratoire et la prise en charge médicale n'auraient été modifiés sachant qu'à chaque fois il s'agissait d'un champignon de l'environnement.

IV.4. Application des résultats sur les identifications rendues par le laboratoire

Pour les 19 patients testés, 18 ont bénéficié d'une identification fongique par séquençage. Pour 4, le résultat retrouvé en séquençage est le même que celui retrouvé en identification usuelle, 3 fois par Spectrométrie de masse et une fois par microscopie. Pour 2 cas le résultat a permis de préciser l'espèce alors que l'identification initiale était limitée au genre, lequel était correct. Pour 3 cas, le résultat en séquençage ne retrouve pas le champignon identifié par méthode usuelle mais en trouve un autre, à chaque fois il s'agit d'un champignon de l'environnement dans un prélèvement en contact avec le milieu extérieur.

Parmi les 10 cas restant, par 9 fois le séquençage a permis d'identifier un champignon non identifié par les méthodes initiales et la 10^{ème} fois le séquençage n'a pas pu identifier un champignon sur le prélèvement.

Nous pouvons donc constater que dans ce travail, le séquençage a permis :

- de préciser 11 espèces (9 champignons non identifiés (47 %) et 2 pour lesquels il n'y avait que le genre (9 %), soit 58 %
- de confirmer 4 identifications, soit 21 %

- de modifier l'identification de 3 champignons, soit 16 %
- Il n'a pas permis l'identification dans 1 cas, soit 5 %

Tableau 12 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus selon gène amplifié

Numéro prélèvement	N° tube	ITS1	ITS 2	ITS globale	Identification à l'espèce
200345134	1	Abs Amp		Non Testé	
	2	Abs Amp		Non Testé	
	3			Non Testé	
	4	Abs Amp		Non Testé	
200359149	1				
	2			Non Testé	
	3			Non Testé	
200368067	1			Non Testé	
	2	Abs Amp		Non Testé	
	3	Ininterprétable	Ininterprétable	Non Testé	
210035715	1	Abs Amp		Non Testé	
200353575	1			Non Testé	
200379843	1			Non Testé	
	2			Non Testé	
	3			Non Testé	
201892858	1				
210018012	1				
200332118	1			Non Testé	
	2			Non Testé	
	3	Ininterprétable		Non Testé	
200337020	1				
	2			Non Testé	
	3			Non Testé	
200356993	1				
	2				
	3	Ininterprétable		Non Testé	
	4			Non Testé	
200364654	1	Abs Amp		Non Testé	
	2			Non Testé	
	3	Rec < 80%			
200330016	1	Ininterprétable		Non Testé	
210012252	1	Abs Amp		Non Testé	
	2			Non Testé	
200389912	1	Abs Amp	Abs Amp	Non Testé	
200376862	1			Non Testé	
200362635	1			Non Testé	
	2			Non Testé	
210066990	1	Non Testé	Non Testé		
211983825	1	Non Testé	Non Testé		
	2	Non Testé	Non Testé		

TOTAL	40	- 24 identifications - 3 non testés - 8 Abs Amplification - 5 non identifiés	- 35 identifications - 3 non testés - 1 Abs Amplification - 1 non identifié	- 10 identifications - 30 non testés - 0 Abs Amplification - 0 non identifié	- 38 identifications - 2 non identifiés
--------------	----	---	--	---	--

(Abs Amp = Absence d'amplification permettant la mise en évidence d'une séquence, Rec < 80% = Absence de résultat ayant un recouvrement ≥ 80%, ■ = le séquençage du gène a permis un identification à l'espèce, ■ = la région n'a pas été amplifiée, il n'y a pas eu de séquençage, ■ = l'amplification a fonctionnée mais il n'a pas été permis de mettre en évidence une identification à l'espèce)

Tableau 13: Tableau des résultats finaux pour chaque prélèvement
(CFNI = Champignon Filamenteux Non Identifié, CNI = Champignon Non Identifié, ** absence d'identification malgré recherche microscopique et MALDI-ToF, **en gras** = champignon séquençé)

Numéro prélèvement	Identification sans séquençage	Identification par séquençage	Banque de Données
200345134	<i>Acremonium spp.</i>	<i>Hormographiella verticillata</i>	Mycobank
200359149	<i>Trichophyton tonsurans</i>	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Mycobank, BLAST
200368067	CFNI**	<i>A. aureolus</i>	Mycobank
		<i>A. udagawae</i>	BLAST
210035715	<i>Neoscytalidium spp.</i>	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	Mycobank
		<i>Neoscytalidium novaehollandiae</i>	BLAST
200353575	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Mycobank, BLAST
200379843	CNI**	<i>Arthrographis kalrae</i>	Mycobank, BLAST
201892858	CFNI**	<i>Stereum hirsutum</i>	Mycobank
		<i>Aleurodiscus thailandicus</i>	BLAST
210018012	<i>Rhizomucor variabilis</i>	<i>Actinomucor elegans</i>	Mycobank
		<i>Mucor laxorrhizus</i>	BLAST
200332118	<i>Paecilomyces spp.</i>	<i>Paecilomyces formosus</i>	Mycobank, BLAST
200337020	<i>Paecilomyces variotii</i>	<i>Paecilomyces variotii</i>	Mycobank, BLAST
200356993	<i>Alternaria alternata</i> - <i>Penicillium sp.</i>	<i>Alternaria. Alternata</i>	+ <i>Penicillium freii</i>
		<i>A. alstroemeriae</i>	
200364654	CFNI**	<i>A. aureolus</i> + <i>Paecilomyces lilacinus</i>	Mycobank, BLAST
200330016	CNI**	<i>Geotrichum candidum</i>	Mycobank, BLAST
210012252	CFNI** - <i>Penicillium sp.</i>	<i>Chaetomium subaffine</i>	Mycobank, BLAST
200389912	<i>T.rubrum</i> - <i>C.parapsilosis</i> - <i>C.albidus</i> - <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Absence d'amplification	
200376862	<i>Aspergillus fumigatus</i> – CFNI**	<i>Blastobotrys raffinifermentans</i>	Mycobank, BLAST
200362635	<i>Scedosporium apiospermum</i> - <i>A. fumigatus</i> – <i>Penicillium sp.</i>	<i>Cephalotrichum microsporium</i>	Mycobank
		<i>Cephalotrichum cylindricum</i>	BLAST
210066990	CNI**	<i>Gibellulopsis simanii</i>	BLAST
211983825	CFNI**	<i>Gibellulopsis simanii</i>	BLAST

V. Discussion

V.1. Matrices d'échantillons à séquencer

Parmi les échantillons testés peu présentent un réel intérêt médical dans le diagnostic d'une infection fongique, et ce d'autant plus si les champignons retrouvés sont des contaminants de l'environnement. Trouver une spore de champignon des bois dans un prélèvement, puis des filaments mycéliens dans une culture d'un prélèvement nasal ne changera pas grand-chose à la prise en charge du patient qui a généralement eu un prélèvement à titre systématique. Pour des prélèvements « à l'air libre » ou en contact avec des zones propres à retrouver physiologiquement du champignon nous n'avons pas indiqué de recommandation dans le service à réaliser un séquençage dans le but d'identifier le champignon. Néanmoins dans le cas où le patient a un état clinique compatible à une infection fongique, un prélèvement réalisé dans des conditions d'asepsie stricte et une culture pure, dans ce cas il peut convenir de réaliser un séquençage afin d'identifier précisément l'espèce du champignon.

L'exemple s'est produit lors de mon dernier stage en Parasitologie-Mycologie à Henri MONDOR où un patient immunodéprimé et d'origine africaine présentait une collection sous cutanée volumineuse de 5 centimètres. L'examen direct retrouvait des filaments mycéliens et la culture était fastidieuse. Le séquençage permit d'identifier un *Medicopsis romeroi* et de mettre en place un traitement. Le séquençage était indiqué dans ce cas-là, d'absence d'urgence immédiate, de clinique ou de terrain particulier et d'absence de diagnostic mycologique en culture. Il a permis l'identification à l'espèce du champignon présent dans le liquide ponctionné. Dans cet exemple, la culture était longue et il fallut du temps pour avoir une identification par MALDI-ToF (base MSI) qui n'a fait que confirmer le *Medicopsis romeroi*.

Ceci pour dire même si nous avons ici mis en place des indications précises pour l'identification par séquençage de champignons d'identification difficile, il reste nécessaire d'entretenir un dialogue clinico-biologique et ce dans le meilleur intérêt du patient. Les prélèvements utilisés pour ce travail de thèse n'étaient néanmoins pas idéaux, certains étaient parfois polycolonisés par du champignon. L'analyse a montré que le séquençage fonctionnait mais pouvait ne pas apporter de bénéfice au laboratoire, ni au clinicien, ni au patient s'il est réalisé dans un prélèvement dans lequel il est admis une colonisation fongique.

V.2. Choix des méthodes utilisées

Pour les étapes précédant l'extraction, nous continuerons à faire les examens directs et les cultures comme nous les faisons avant ce travail.

V.2.1. Choix de la méthode d'extraction pour les cellules fongiques

Comme vu dans les figures 16 et 17, nous constatons que l'extraction réalisée à partir de l'étude STEFI est moins rentable que celle réalisée avec le kit Qiagen® DNA QIAamp Mini kit après une lyse mécanique FastPrep®. Nous conservons cette méthode d'extraction pour les colonies en culture. Ces méthodes et ce matériel étant déjà utilisés par le service, il n'est pas déroutant de l'utiliser en plus pour les extractions en mycologie dans le but du séquençage. De plus les techniciens sont déjà formés à ces méthodes et n'ont pas de nécessité d'habilitations supplémentaires.

V.2.2. Choix du gène cible à séquencer

Le choix des gènes à séquencer sera simple, les résultats montrent une identification similaire entre l'identification par *ITS2* ou par la région *ITS* globale. Nous prenons le choix de faire le séquençage de la région *ITS* globale afin d'être le plus large possible sur le nombre de nucléotides séquencés et de limiter les manipulations. En effet faire le séquençage de la région *ITS* globale ne demande que la moitié de ce qui est nécessaire pour le séquençage des régions *ITS1* et *ITS2* séparément.

V.2.3. Choix du protocole de séquençage SANGER

Le protocole de séquençage restera le même que celui utilisé dans ce travail, il est testé et permet d'obtenir des résultats interprétables. De plus l'utilisation de BigDye Terminator V1.1 est répandue à l'ensemble du service de séquençage du CBRS du CHU de Limoges. Les commandes étant centralisées, la disponibilité des produits et la compatibilité du matériel sont assurées. Il n'y a pas d'intérêt à ne pas utiliser le même protocole de séquençage que celui de l'ensemble du Laboratoire.

V.2.4. Choix de la base de données utilisée pour explorer les banques de données

La banque de donnée BLAST est plus couramment utilisée dans le domaine de l'identification de séquences nucléotidiques, elle contient 13 309 séquences d'*ITS*⁶¹. Mycobank, est très riche en taxons fongiques (513 922 taxon fongiques dans la liste des taxa, mise à jour le 8 juin 2021), mais possède moins de séquences *ITS* que BLAST et en contient plus de 4000⁶². Nous avons considéré que nous utiliserons les 2 banques de données afin de comparer et renforcer les résultats systématiquement lors d'une identification par séquençage.

En cas de divergence des résultats entre les 2 banques de données, nous nous reposerons sur celui de Mycobank et ce pour plusieurs raisons :

- la première est que la banque de donnée Mycobank a permis d'identifier plus de champignons dans notre étude que la banque BLAST.

- la seconde est que la banque de donnée Mycobank, utilisant la base de données du bureau central de la biodiversité fongique (Centraalbureau voor Schimmelcultures : CBS) est recommandée par rapport à BLAST dans le cas de l'identification fongique¹⁸. Dans cette recommandation, il est dit notamment que Mycobank est plus spécialisée et fiable mais potentiellement moins complète que BLAST.

V.3. Apports du séquençage SANGER dans les cas étudiés dans cette thèse

L'ajout de cette nouvelle technique dans le service nécessite une analyse de ce qu'elle apporte réellement. Certes nous nous attendons à un impact sur le service rendu au clinicien et par conséquent au patient par une identification plus précise ou une confirmation de champignons rares, mais est-ce réellement le cas.

Il est difficile d'évaluer sur une échelle de temps courte l'apport d'une technique, en rétrospectif et sur seulement 19 patients. Bien que fait de façon rétrospective, il n'y a pas eu d'apport du séquençage dans la prise en charge des patients pour lesquels les échantillons ont été étudiés dans ce travail. Néanmoins et comme vu précédemment il n'est pas exclu qu'elle a une nécessité particulière dans l'étude de champignons à croissance lente, ou d'identification difficile dans des prélèvements plus « précieux ». L'interaction clinico-biologique est et reste primordiale pour une meilleure prise en charge des patients.

L'apport du séquençage pour le laboratoire a néanmoins permis de revoir, confirmer ou identifier des champignons par rapport aux techniques d'identification usuelles (cf tableau 13). Cette confirmation ou précision d'espèce renforce l'expertise du biologiste dans son identification. L'apport d'une identification lorsqu'elle n'était pas obtenue améliore le service rendu en tant que service de Parasitologie-Mycologie au service demandeur.

V.3.1. Etude des cas discordants

Tableau 14 : Cas discordants entre l'identification sans et avec séquençage

Numéro prélèvement	Identification sans séquençage	Identification par séquençage	Banque de Données
200345134	<i>Acremonium spp.</i>	<i>Hormographiella verticillata</i>	Mycobank
210018012	<i>Rhizomucor variabilis</i>	<i>Actinomucor elegans</i>	Mycobank
		<i>Mucor laxorrhizus</i>	BLAST
200362635	<i>Scedosporium apiospermum</i> - <i>A. fumigatus</i> – <i>Penicillium sp.</i>	<i>Cephalotrichum microsporum</i>	Mycobank
		<i>Cephalotrichum cylindricum</i>	BLAST

Dans le cas du prélèvement 200345434, isolé dans une aspiration bronchique, l'identification initiale retrouvait un *Acremonium spp.* *Hormographiella verticillata*, retrouvé uniquement par Mycobank sur le séquençage de la région ITS2 présente une homologie de séquence égale à 100 % d'identité. En effet, les séquences sur une partie tout du moins, correspondent beaucoup entre elles et permettent une bonne identification de *Hormographiella verticillata*. La partie correspondante entre les deux espèces est sûrement celle qui a été séquencée par ITS2 seulement. S'il s'agit certainement d'erreur d'identification du séquençage, mais elle ne serait pas passée avec le séquençage de la région ITS globale car les autres parties de la séquence ne sont pas identiques. La correspondance entre les deux espèces n'est au maximum que de 94.27 % pour la région ITS globale étudiée⁶³. Ce résultat correspond à la similarité maximale obtenue au sein du taxon *Acremonium* (taxid:159075) en recherchant la séquence CNRMA10.949 d'*Hormographiella verticillata* (isolée dans la base ISHAM-ITS et comportant la région globale ITS) dans BLAST. Nous pouvons donc conclure que le séquençage de la région ITS globale, comme préconisé dans ce travail, ne retrouverais pas l'espèce *Hormographiella verticillata*.

Dans le cas du prélèvement 210018012, isolé dans des selles, l'identification initiale retrouvait un *Rhizomucor variabilis*. *Actinomucor elegans*, retrouvé par Mycobank sur le séquençage de la région ITS1 et ITS2 présente une homologie de séquence de 98.43 % d'identité. *Mucor laxorrhizus* retrouvé par BLAST sur le séquençage de la région ITS2 et ITS globale présente une homologie de séquence de 97.81 % d'identité. Ces deux espèces sont deux champignons de la famille des Mucoraceae. Selon les critères d'identifications que préconisons dans cette thèse, nous appuyant sur les recommandations de cet ouvrage¹⁸, nous privilégions la base de données Mycobank. Dans le cas où cette situation se reproduirait à l'avenir, nous pourrions croiser les résultats du séquençage avec d'autres bases de données comme Fungibank (banque de données du CNRMA, Pasteur) ou la base ISHAM (International Society for Human and Animal Mycology, Mycologylab). A noter, par rapport à *Rhizomucor variabilis* identifié sans séquençage, *Mucor laxorrhizus* présente au maximum 93.21 % d'identité et *Actinomucor elegans* présente au maximum 91.91 % pour la région ITS globale étudiée⁶³.

Dans le cas du prélèvement 200362635, isolé dans une aspiration bronchique, l'identification initiale retrouvait un *Scedosporium apiospermum*. *Cephalotrichum microsporium* a été retrouvé par Mycobank sur le séquençage d'ITS1 et ITS2 et *Cephalotrichum cylindricum* a été retrouvé par BLAST sur le séquençage d'ITS1 et ITS2. Ces deux espèces font partie du genre *Cephalotrichum spp.* regroupant des champignons non pathogènes de l'environnement⁶⁴. *Cephalotrichum microsporium* a été retrouvé sur un sol agricole en Allemagne et son identification en ITS est LN850967⁶⁴. *Cephalotrichum cylindricum* a été retrouvé dans le sol en France métropolitaine (identification ITS : KY249251) de Turquie (KY249252) et des Etats Unis d'Amérique (KY249253)⁶⁴, dans du bois de construction à Bekker en Afrique du Sud (LN85096)⁶⁵ et dans des graines de sorgho aux Etats Unis d'Amérique, Texas (LN850965)⁶⁵. Les *Scedosporium* et *Cephalotrichum* font tous deux partie de la même famille, les Microascaceae. En comparant des profils type via Clustal Omega 2.1, nous nous apercevons qu'il y a respectivement 74.57 % et 73.66 % d'identité de séquence entre les régions ITS globales de *C. microsporium* et de *C. cylindricum* par rapport à *Scedosporium apiospermum*. Leur identité maximale est respectivement de 82.81 % et 83.84 % par rapport à *Scedosporium apiospermum* et en utilisant l'heuristique BLAST pour la région ITS globale étudiée⁶³.

V.4. Indication du séquençage SANGER dans l'identification de champignons

Parmi les cas où le séquençage a été utile, nous retiendrons qu'il permet de mettre un nom sur les champignons non identifiés, mais cela est-il toujours utile ? Pour des prélèvements ayant plusieurs champignons, le séquençage ne permet pas toujours de bien trouver un chromatogramme clair du fait qu'il y a plusieurs régions *ITS* amplifiées différentes et donc plusieurs nucléotides possibles sur plusieurs positions des séquences. C'est ce que nous avons retrouvé pour les prélèvements n'ayant pas permis d'obtenir un chromatogramme lisible en *ITS1* ou en *ITS2* : sur les 5 échantillons 2 provenaient de biopsie de sinus, 1 d'aspiration trachéale, 1 d'un prélèvement nasal et 1 de phanère. Pour chacun de ces prélèvements, il s'agit de zones plus ou moins en contact avec le milieu extérieur et donc pluri contaminées par la respiration de spores. Pour illustrer ceci, pour les 2 biopsies il n'y avait pas eu de champignon identifié par méthode classique mais pour les 3 autres prélèvements il y avait au minimum 2 champignons déjà identifiés au rang de genre par les méthodes classiques.

Parmi les 14 autres prélèvements de patient, seuls 4 avaient retrouvé de multiples identifications par les méthodes usuelles et n'avaient pas posé soucis à obtenir un chromatogramme clair ou lisible. Nous préconisons donc pour l'identification par séquençage d'avoir comme point de départ une culture pure.

Afin de réaliser cette technique de séquençage en routine, nous devons tout d'abord préciser ses indications car elle est trop longue pour être réalisée de façon systématique à chaque prélèvement mycologique. Nous nous basons ici sur les indications utilisées par le laboratoire Henri MONDOR pour réaliser ses propres séquençages et nous les adaptions à notre patientèle afin d'apporter une prise en charge adaptée au CHU de Limoges.

En reprenant les indications pour lesquels le service de Parasitologie-Mycologie de Henri MONDOR réalise un séquençage d'*ITS* pour obtenir une identification, nous comptons 3 à 5 identifications par mois avec cette technique. Le service dispose d'un spectromètre de masse et d'une base de données spectrométrique apte à identifier beaucoup de champignons, même des champignons filamenteux. A mettre en opposition à cette technique différente, il faut ajouter que le service cristolien a réalisé 44 951 demandes d'analyses en 2020⁶⁶. Sur ces

44 951 demandes, 13 633 étaient des demandes d'analyses mycologiques (hors biologie moléculaire et PCR) ce qui fait qu'il y a statistiquement plus de champignons à identifier que dans le service limougeaud qui compte 18 750 actes dont 6 450 demandes d'analyses mycologiques (hors antigène et PCR) sur l'année 2020³.

Les indications de séquençage à but d'identification au laboratoire Henri MONDOR sont les suivantes :

- Champignon filamenteux mis en évidence à l'examen direct mais pas en culture dans un prélèvement « précieux ».

- Champignon non identifié par les techniques usuelles, incluant le spectromètre de masse à plusieurs reprises et plusieurs méthodes d'extraction protéique sur des prélèvements « précieux ».

- Confirmation d'identification de champignon rare identifié au spectromètre de masse ou ne correspondant pas à la clinique attendue (ex : *Histoplasma capsulatum*, *Talaromyces marnefei* ...).

→ L'identification par séquençage n'est globalement utilisée que pour les prélèvements précieux et jamais pour les dermatophytes. Les prélèvements dits « précieux » sont normalement stériles : bloc opératoire, LCS, Liquide de dérivation, liquide de redon, drain, biopsie, sang, prélèvement oculaire, liquide de transport ou de conservation d'organe, banque de tissus ... ou difficiles à obtenir : ablation totale d'une zone nécrosée, prélèvement *post mortem*, ponction non chirurgicale...

Le service de Mycologie d'Henri MONDOR réalise ses identifications par séquençage environ une fois par mois et de façon non rythmée formellement. Un biologiste ou un technicien réalise l'extraction puis la première amplification puis un biologiste réalise le reste des manipulations. Il le fait sur 3 à 6 prélèvements à chaque fois selon les besoins et les urgences.

Au CHU de Limoges, le séquençage étant une méthode lente, elle sera réalisée en dehors d'un contexte d'urgence. Elle ne pourra être réalisée en routine qu'une à deux fois par mois. Nous la gardons donc essentiellement pour les cas préconisés précédemment soit, pour les prélèvements précieux de façon générale, pour lesquels il n'y a pas d'identification au microscope ni au spectromètre de masse ou pour confirmer la présence d'un champignon identifiée au MALDI-ToF mais soit rare soit peu probable.

Il va de soi que le dialogue n'est pas fermé avec le clinicien et qu'il est possible de faire des exceptions en cas de nécessité, comme pour la collection sous cutanée décrite en exemple.

V.5. Discussion de l'aspect financier du séquençage SANGER dans l'identification de champignon d'identification difficile

Nous évoquons ici de façon triviale l'estimation du coût d'un seul séquençage. Pour cela nous nous focaliserons sur les étapes les plus importantes et les plus facilement estimables de l'ensemble de la technique. Nous tenterons d'évaluer aussi le temps qu'il faut pour réaliser un seul séquençage dans des conditions de réussite. Il est évident que dans la pratique courante nous ne réaliserons pas de séquençage en routine juste pour un seul prélèvement à la fois, mais que nous regrouperons plusieurs prélèvements afin d'obtenir un meilleur rendement, surtout en ce qui concerne le temps technicien ou biologiste nécessaire à sa réalisation. Ce temps technicien supplémentaire n'est pas extensible. Pour pallier

l'insuffisance de temps de technicien et dans la lancée des travaux de cette thèse, je pourrai en tant que biologiste du service réaliser un séquençage une fois par mois. Nous allons pour la suite de cette question du prix ne pas prendre en compte le matériel à usage unique ni le temps technique consacré au séquençage, mais juste des produits utilisés.

Le prix unitaire d'un séquençage est estimé ici à 14.02 € la séquence (hors consommables à usage unique, billes de FastPrep®, amorces, coup du passage sur le séquenceur ... qui nécessiteraient une analyse financière plus poussée) ... et ce dans l'optique que tout fonctionne au premier essai.

Tableau 15 : Prix des kits consommables nécessaires à la réalisation d'un séquençage Sanger dans le CBRS du CHU de Limoges (Sources : Mmes LARCHER Laure et GUERIN Emilie)

Nom	Tests par kit	Prix Toutes Taxes Comprises (TTC), en €	Prix unitaire, en €
Kit Fast start Roche	480	699.87	1.46
Kit QIAamp DNA mini kit Qiagen	50	190.00	3.80
Kit purification PCR ANALYTIK-JENA innuprep	50	93.91	1.88
Kit Big Dye terminator pour séquençage	5 000	34 405.26	6.88
TOTAL	/	/	14.02

V.6. Evoquer d'autres pistes dans l'identification des champignons

Indépendamment du fait que le séquençage est une technique performante et réalisable en semi-routine au rythme d'une fois par mois environ, il n'empêche de réfléchir à d'autres techniques permettant l'amélioration de la prise en charge ou de l'identification des champignons d'identification difficile dans le service.

Au cours de mon dernier stage en Parasitologie-Mycologie à l'hôpital d'Henri MONDOR, j'ai assisté à une augmentation de l'utilisation du MALDI-ToF pour l'identification des champignons filamenteux avec une base de données Bruker®. J'ai aussi assisté à la mise en évidence de spectres protéiques grâce à une base de données spécifique, la base MSI. Le MALDI-ToF de microbiologie de Limoges est un Vitek MS® de Biomérieux® ce qui est très bien pour l'identification des bactéries et des levures, mais moins efficace pour les champignons filamenteux. Néanmoins, s'il est possible de récupérer les spectres extraits dans le spectromètre et d'interroger une seconde base de données il est possible d'augmenter le succès des identifications fongiques par spectrométrie dans le service de Limoges.

Afin d'améliorer les services globaux du laboratoire de Parasitologie-Mycologie et d'améliorer le service rendu, en plus de la mise en place en semi-routine du séquençage, nous insistons sur l'intérêt de questionner une base externe d'identification fongique par spectrométrie de masse. Pour cela il est nécessaire de pouvoir récupérer les spectres des

champignons analysés au spectromètre de masse et aussi d'avoir l'accord des créateurs de la base biological-Mass-Spectrometry-Identification (MSI).

Dans un avenir plus lointain il sera possible d'implanter au CBRS du CHU de Limoges une technique de séquençage haut débit à visée mycologique permettant une analyse métagénomique d'un prélèvement, d'un échantillon afin d'amplifier sans distinction tout l'ADN présent dans le prélèvement en question et d'analyser chaque élément.

VI. Conclusion et perspectives

En conclusion de ce travail, le séquençage est une technique longue mais permet une identification à l'espèce dans les cas de cultures pures. Le développement de la technique nécessite la mise en place d'un protocole et des indications permettant son utilisation. Ces indications bien que strictes ne bloquent pas le dialogue clinico-biologique nécessaire à toute prise en charge optimale du patient. Ce d'autant plus que l'identification fongique peut avoir un apport majeur pour le clinicien dans le cadre de champignons rares ou d'identification difficile et nécessitant une prise en charge adaptée. Le séquençage apporte un service rendu au laboratoire en confirmant ou améliorant la qualité du résultat rendu et la confiance en celui-ci.

Secondairement à ce travail de mise en place d'une technique, il existe d'autres possibilités d'utiliser le séquençage dans le laboratoire de Parasitologie-Mycologie. La possibilité d'analyser des gènes de résistance ou réaliser des travaux communs à toute la microbiologie comme la métagénomique est envisageable à moyen ou long terme.

En plus de l'analyse en Mycologie de routine, l'apport du séquençage des champignons à l'unité de recherche attachée au service de Mycologie est possible. Elle permettrait de développer la recherche en mycologie au CHU de Limoges, potentiellement lors d'une thèse de science réalisée dans le service.

Références bibliographiques

1. Association française des enseignants et praticiens hospitaliers titulaires de parasitologie et mycologie médicales. Les référentiels des Collèges: Parasitoses et Mycoses des Régions Tempérées et Tropicales. Elsevier Masson. 6e éd. 2019. 6e éd. (Elsevier Masson).
2. Purvis A, Hector A. Getting the measure of biodiversity. *Nature*. mai 2000;405(6783):212-9
3. Rapport d'activité 2020 Service Parasitologie-Mycologie du CBRS du CHU Limoges
4. Xu J. Fungal DNA barcoding. *Canadian Science Publishing*. 2016;(59):913-932.
5. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*. 15 févr 2016;62(4):e1-50.
6. Debourgogne A, Hennequin C. Infection à *Fusarium*. EMC – Maladies infectieuses 2015;12(4):1-8 [Article 8-580-A-10]
7. Grillot R. Mycoses invasives en France : épidémiologie, enjeux diagnostiques et thérapeutiques. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*. 16 avr 2013;12-13 p107
8. Centre National de Référence des Mycoses invasives et des Antifongiques. IFI RESSIF rapport 2020 sur l'année 2019
9. Dodds Ashley E, Drew R, Johnson M, Danna R, Dabrowski D, Walker V, et al. Cost of invasive fungal infections in the era of new diagnostics and expanded treatment options. *Pharmacotherapy*. 2012;32(10):890-901.
10. Saint Leger P , Zarrougui W, Sedrati F , Lambiotte F, El Beki N. Aspergillose pulmonaire invasive chez les patients avec forme sévère de COVID-19 : résultats d'une cohorte monocentrique française CH de Valenciennes, Valenciennes, France. 21es Journées nationales d'infectiologie / Médecine et maladies infectieuses 2020;50:31–S199
11. Pasquier G, Bounhiol A, Robert Gangneux F, Zahar J, Gangneux JP, Novara A, et al. A review of significance of *Aspergillus* detection in airways of ICU COVID-19 patients. *Mycoses*. sept 2021;64(9):980-8.
12. Stewart CJ, Nelson A, Scribbins D, Marrs EC, Lanyon C, Perry JD, et al. Bacterial and fungal viability in the preterm gut: NEC and sepsis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2013;98(4):F298–303
13. Strati F, Cavalieri D, Albanese D, De Felice C, Donati C, Hayek J, et al. Altered gut microbiota in Rett syndrome. *Microbiome*. 2016;4(1):41
14. Tipton L, Müller CL, Kurtz ZD, Huang L, Kleerup E, Morris A, et al. Fungi stabilize connectivity in the lung and skin microbial ecosystems. *Microbiome*. 2018;6(1):12.
15. Tiew PY, Mac Aogain M, Ali NABM, Thng KX, Goh K, Lau KJX, et al. The Mycobiome in Health and Disease: Emerging Concepts, Methodologies and Challenges. *Mycopathologia* [Internet]. 1 janv 2020 [cité 17 nov 2021]; Disponible sur: <http://link.springer.com/10.1007/s11046-019-00413-z>
16. Pfaller M, Neofytos D, Diekema D, Azie N, Meier-Kriesche H-U, Quan S-P, et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective

Antifungal Therapy (PATH Alliance®) registry, 2004–2008. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. déc 2012;74(4):323-31.

17. Site_mycoweb : <http://coproweb.free.fr/mycoweb/texte/163.htm>

18. Association française des enseignants et praticiens hospitaliers titulaires de parasitologie et mycologie médicales. Parasitologie et Mycologie médicales: Guide des analyses et pratiques diagnostiques. Elsevier Masson. 1e éd. 2017. 1e éd. (Elsevier Masson).

19. Alonso R, Pisa D, Fernandez-Fernandez AM, Carrasco L. Infection of fungi and bacteria in brain tissue from elderly persons and patients with Alzheimer's disease. Front Aging Neurosci. 2018;10:159.

20. Collège de la Haute Autorité de Santé. HAS_Guide Médecin_ALD24_Crohn_cg. mai 2008

21. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Meis JF, Gould IM, et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2005: an 8.5-Year Analysis of Susceptibilities of *Candida* Species and Other Yeast Species to Fluconazole and Voriconazole Determined by CLSI Standardized Disk Diffusion Testing. J Clin Microbiol. juin 2007;45(6):1735-45.

22. Site_mycoweb : <http://coproweb.free.fr/mycoweb/fiches09.htm#geotricumcapitum>

23. Biofarma. Cahier de formation biologie médicale: n°25 Les moisissures d'intérêt médicale. mars 2002 (Biofarma)

24. Bigot J, Guillot L, Guitard J, Ruffin M, Corvol H, Balloy V, et al. Bronchial Epithelial Cells on the Front Line to Fight Lung Infection-Causing *Aspergillus fumigatus*. Front Immunol. 22 mai 2020;11:1041.

25. Filler SG, Sheppard DC. Fungal Invasion of Normally Non-Phagocytic Host Cells. PLoS Pathog. 2006;2(12):e129.

26. Collège de la Haute Autorité de Santé. HAS_Actualisation des actes de biologie médicale relatifs au diagnostic des infections à *Aspergillus*. mai 2017

27. Site_mycoweb : <http://coproweb.free.fr/mycoweb/fiches10.htm#penicilliumpurpurogenum>

28. Lyratzopoulos G, Ellis M, Nerringer R, Denning DW. Invasive Infection due to *Penicillium* Species other than *P. marneffeii*. Journal of Infection. oct 2002;45(3):184-95.29. Benmostefa A, Hennequin C. Infection à « *Penicillium* ». EMC – Maladies infectieuses 2017;14(3):1-7 [Article 8-580-A-11].

30. Site_mycoweb : <http://coproweb.free.fr/mycoweb/fiches08.htm#fusariumsolani>

31. Bastides F. Zygomycoses, fusarioses, scédosporioses, trichosporonoses : les nouvelles mycoses émergentes. Réanimation. juin 2010;19(4):319-26.

32. Site_mycoweb : <http://coproweb.free.fr/mycoweb/fiches10.htm#alternariaalternata>

33. Herault E, Durieux MF, Darde ML, Faucher JF, Bouteille B. Central nervous system histoplasmosis mimicking cerebral vasculitis in an immunocompetent young man. non publié.

34. Notice milieu chromagar_BD_July2014_BBL™ CHROMagar™ *Candida* Medium

35. Document Qualité PARA SEA 0005 F_ Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Limoges

36. Blaize M, Normand AC, Fekkar A, Piarroux R. Identification des moisissures au laboratoire de routine hospitalière. *Revue Francophone des Laboratoires*. févr 2021;2021(529):58-65.
37. Suarez S. Microbiologie clinique et spectrométrie de masse. [Thèse pour l'obtention du grade de Docteur]. Université René Descartes - Paris V; 2013.
38. Alanio A. La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF en mycologie clinique : avantages réels, écueils potentiels. *Journal des Anti-infectieux*. 2013;(15):71-82.
39. 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*. avr 2008;52(4):1244-51.
40. Dupont D, Normand A-C, Persat F et al. Comparison of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of moulds in the routine microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25(7):892-7
41. Denis F, Bingen E, Martin C, Ploy MC, Quentin R. Bactériologie médicale. Techniques usuelles. Elsevier Masson. 2e éd. 2011. 2e éd. (Elsevier Masson).
42. Bougnoux ME, Espinasse F. Nouvelles applications des techniques de biologie moléculaire en mycologie médicale. *Revue Française des Laboratoire*. 2003;(351): 67-71
43. Dugat M. Apport de la spectrométrie de masse et de la biologie moléculaire à l'identification des champignons filamenteux au laboratoire de mycologie médicale. [Thèse d'exercice]. Université de Limoges; 2014.
44. Brasileiro BTRV, Coimbra MRM, Morais MA, Oliveira NT. Genetic variability within *Fusarium solani* species as revealed by PCR-fingerprinting based on pcr markers. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2004; (35):205-210
45. Op De Beeck M, Lievens B, Busschaert P, Declerck S, Vangronsveld J, Colpaert JV. Comparison and Validation of Some ITS Primer Pairs Useful for Fungal Metabarcoding Studies. *Plos One*. 2014;(9):e97629.
46. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012; (109):6241-6246.
47. Bellemain E, Carlsen T, Brochmann C, Coissac E, Taberlet P, Kauserud H. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology*. 2010;(10):189-198.
48. Lackner M, Hagen F, Meis JF, Gerrits van den Ende AHG, Vu D, Robert V, et al. Susceptibility and Diversity in the Therapy-Refractory Genus *Scedosporium*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 2014;(58):5877-5885.
49. Gontia-Mishra I, Tripathi N, Tiwari S. A simple and rapid DNA extraction protocol for filamentous fungi efficient for molecular studies. *Indian Journal of Biotechnology*. 2014; (13): 536-539.
50. Provost F, Laurent F, Uzcategui LR, Boiron P. Molecular study of persistence of *Nocardia asteroides* and *Nocardia otitidiscaviarum* strains in patients with long-term nocardiosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997;(35):1157-1160.

51. 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.
52. Disegha G C, Akani NP. Bioinformatic Method for Fungi Identification. *Journal of Biology and Genetic Research*. 2019;(5):1-14.
53. Lopez P. BLAST, cours OBI3, Introduction à l'analyse bio-informatique des séquences, La Sorbonne Université. 2021
54. Dardel F, Kepes F. Bioinformatique. Génomique et post-génomique. Ellipses, Les éditions de l'Ecole polytechnique. 2002. (Ellipses, Les éditions de l'Ecole polytechnique).
55. Raja HA, Miller AN, Pearce CJ, Oberlies NH. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products*. 2017; (80): 756-770.
56. Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassoulian-Barrett SL, Lafe K, Yarfitz SL, et al. Identification of Medically Important Yeasts Using PCR-Based Detection of DNA Sequence Polymorphisms in the Internal Transcribed Spacer 2 Region of the rRNA Genes. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000;(30): 2302-2310.
57. Romanelli AM, Sutton DA, Thompson EH, Rinaldi MG, Wickes BL. Sequence-Based Identification of Filamentous Basidiomycetous Fungi from Clinical Specimens: a Cautionary Note. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010;(48):741-752.
58. Crous PW, Gams W, Stalpers JA, Robert V, Stegehuis G. MycoBank: an online initiative to launch mycology into the 21st century. 2004 ;(52):5.
59. Crous PW, Gams W, Stalpers JA, Cannon PF, Kirk PM, David JC, et al. An Online Database of Names and Descriptions as an Alternative to Registration. *Mycological Research*. nov 2004;108(11):1236-8.
60. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. AMPLIFICATION AND DIRECT SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS. In: PCR Protocols [Internet]. Elsevier; 1990 [cité 17 nov 2021]. p. 315-22. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123721808500421>
61. Site_BLAST, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/targetedloci/> mis à jour le 16 novembre 2021
62. Site_Mycobank, <https://its.mycologylab.org>, mis à jour le 16 novembre 2017
63. Site_BLAST, https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#sort_mark
64. Woudenberg JHC, Sandoval-Denis M, Houbraken J, Seifert KA, Samson RA. Cephalotrichum and related synnematosus fungi with notes on species from the built environment. *Studies in Mycology*. sept 2017;88:137-59.
65. Sandoval-Denis M, Guarro J, Cano-Lira JF, Sutton DA, Wiederhold NP, de Hoog GS, et al. Phylogeny and taxonomic revision of Microascaceae with emphasis on synnematosus fungi. *Studies in Mycology*. mars 2016;83:193-233.
66. Rapport d'activité 2020 Service Parasitologie-Mycologie CHU Henri MONDOR, Créteil

Annexes

Annexe 1. Protocole d'extraction de l'ADN fongique de l'étude STEFI.....	85
Annexe 2. Tableau des milieux ensemencés et des températures d'incubations selon la nature de l'échantillon primaire	86
Annexe 3. Protocole retenu pour séquençage dans le service de Parasitologie-Mycologie du CHU de Limoges	87
Annexe 3.1 Pré extraction	87
Annexe 3.2.1 Extraction à partir d'une colonie	87
Annexe 3.2.2 Extraction à partir de pièce opératoire ou biopsie	87
Annexe 3.3 Récupérer l'extraction du lysat en suivant le protocole QIAamp DNA Mini kit (quel que soit nature prélèvement)	88
Annexe 3.4 Mix PCR	88
Annexe 3.5 Cycles PCR	89
Annexe 3.6 Electrophorèse sur gel d'agarose	90
Annexe 3.7 Purification de PCR	90
Annexe 3.8 Mix PCR séquence	91
Annexe 3.9 Cycle PCR de séquence	91
Annexe 3.10 Préparation plaque de séquence	92
Annexe 3.11 Purification post PCR de séquence	93
Annexe 4. Serment d'Hippocrate	94

Annexe 1. Protocole d'extraction de l'ADN fongique de l'étude STEFI

Basé sur l'Etude STEFI – versant microbiologique

Dans un tube conique (type « Eppendorf ») à fermeture renforcée, placer :

- 650 µL d'eau qualité biologie moléculaire (eau pour préparation injectable = PPI)
- 200 µL de la suspension¹ suivante (qsp 20 mL) :
 - Laurysulfate de sodium (SDS) Sigma [0,1% m/v] soit 20 mg (détergent)
 - Résine Chelex Sigma® C-7901 ou Biorad 1421253 (chélateur de molécules polaires) [15% m/v] soit 3 g
 - Eau PPI :19,6 mL
 - Nonidet® P-40 Sigma [1% v/v], soit 200 mL (détergent)
 - Tween 80® Sigma [1% v/v], soit 200 mL (détergent)
- Ajouter quelques colonies pures (oese) [NDR : environ 2 µL]
- Agiter au vortex
- Chauffer à 100 °C pendant 30 min
- Centrifuger à 14 000 g pendant 10 min
- Diluer le surnageant au 1/3 en plaçant dans un tube conique classique :
 - 200 µL de surnageant
 - 400 µL d'eau PPI

¹ Provost F., Laurent F., Uzcatogui L.R., Boiron P. Molecular study of persistence of *Nocardia asteroides* and *Nocardia otitidiscaviarum* strains in patients with long-term nocardiosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997;(35):1157-1160.

Annexe 2. Tableau des milieux ensemencés et des températures d'incubations selon la nature de l'échantillon primaire

MYCOLOGIE	Chromagar 35°C	Sabouraud chloramphéni col 25°C	Sabouraud chloramphéni col 30°C	Sabouraud chloramphéni col 35°C	Sabouraud Chloramphéni ol Actidione 35°C	Sabouraud Chloramphéni ol Actidione 25°C	Sabouraud Chloramphéni ol Actidione 30°C	Gélose cœur - cervelle 30°C
Uro-génital : urines, , muqueuses génétales, méat...	7 j		21 j Cas particulier : recherche Cryptocoque	21 j Cas particulier : Recherche Cryptocoque				
Tube digestif : gorge, bouche, langue, selles,...	7 j		7 j					
ORL, squames : nez, oreille, plaies, pustules, vésicules, escarres, squames	7 j		21 j	21 j				
Sinus (truffe)	7 j		21 j	21 j				
Prélèvements profonds : drain, bile, liquide d'ascite, liquide péritonéal, pus, biopsies,...	7 j		21 j si biopsie	21 j si biopsie				
Prélèvements respiratoires : expectoration, aspiration bronchique, liquide de lavage broncho- alvéolaire, ...	7 j		21 j	21 j	21 j			
Liquide de conservation d'organes	7 j		14 j	14 j				
Prélèvements oculaires : grattage cornéen, lentille, liquide de lentille	7 j	21 j scalpel	21 j					
Prélèvements oculaires profonds : humeur aqueuse, vitré	7 j		21 j	21 j en fonction du volume				
Système nerveux central : liquide céphalo- rachidien, biopsie cérébrale, ...			28 j	28 j				
Peau, phanères : squames, ongles, cheveux, ...		28 j				28 j	28 j	28 j
Squames Malassezia		28 j				28 j	28 j + huile d'olive	28 j
Recherche mycoses exotiques (histoplasmose...)	Gélose au sang 7 j	6 sem	6 sem					
Poussières...		21 j en nappe sur grandes boîtes						

Annexe 3. Protocole retenu pour séquençage dans le service de Parasitologie-Mycologie du CHU de Limoges

→ Annexe 3.1 Pré extraction :

Premièrement après la croissance sur milieu Sabouraud-Chloramphénicol ou MALT-Agar, il est nécessaire de transporter la culture pour en extraire l'ADN. 1.0 à 1.5 µL de culture sont transportés dans un milieu liquide pour éviter la contamination.

I. Création milieu liquide de transport basé sur l'étude STEFI (qsp 20 mL) :

- > Laurysulfate de sodium (SDS) Sigma [0,1% m/v] soit 20 mg (détergent)
- > Résine Chelex Sigma C-7901 ou Biorad 1421253 (chélateur de molécules polaires) [15% m/v] soit 3g
- > Eau PPI :19,6 mL
- > Nonidet P-40 Sigma [1% v/v], soit 200 mL (détergent)
- > Tween 80 Sigma [1% v/v], soit 200 mL (détergent)

Les milieux sont conservés à température ambiante dans la salle de biologie moléculaire de Parasito-Mycologie. Le mélange peut se faire à température ambiante sous un PSM pour limiter la contamination. Conservation à température ambiante.

II. Préparation d'un échantillon à extraire :

- > Préparer un tube Eppendorf de 500 µL de suspension du milieu de transport basé sur l'étude STEFI sous PSM utilisé pour les cultures de la pièce de Mycologie.
- > Ajouter une colonie sphérique de 1 à 1.5 µL (soit 1 à 1.5 µm de diamètre), ou une biopsie/pièce opératoire de 1.5 à 2 µm de diamètre.

Tableau 16 : Conservation préparation + colonie fongique à extraire

Emplacement	Température	Durée maximale entre préparation et extraction
/	Ambiante	Sans délai
Réfrigérateur salle biologie moléculaire Parasitologie-Mycologie	5°C (+/- 2°C)	Dans la journée
Congélateur salle biologie moléculaire Parasitologie-Mycologie	-20°C (+/-5°C)	Dans les 6 mois
Congélateur salle des congélateurs du CBRS -80°C	-80°C (+/- 7°C)	Pas de limite de temps théoriquement

Le séquençage débutera par l'extraction sur une colonie pure de champignon ou une biopsie avec 2 protocoles d'extraction différents

→ Annexe 3.2.1 Extraction à partir d'une colonie :

Dans la salle d'extraction, les manipulations hors appareils spécifiques se font sous PSM.

- > Vortexer les 500µL de préparation milieu de transport + colonie à extraire (si milieu congelé, attendre sa décongélation à température ambiante)
- > Placer les 500 µL dans tube de matrice de lyse D FastPrep® (MP Miomedicals™, France)
- > Effectuer 1 cycle de broyage de 45 secondes à la vitesse 6,5 m/s dans le système de rupture des cellules Bio 101 FastPrep FP120® (Thermo Scientific®, France)
- > Récupérer le lysat et poursuivre l'extraction en suivant le protocole QIAamp® DNA Mini kit.

→ Annexe 3.2.2 Extraction à partir de pièce opératoire ou biopsie :

Dans la salle d'extraction, les manipulations hors appareils spécifiques se font sous PSM.

-> Vortexer les 500µL de préparation milieu de transport + biopsie/pièce opératoire à extraire (si milieu congelé, attendre sa décongélation à température ambiante).

-> Ajouter tampon ATL + Protéinase K

-> Incuber à 56°C jusqu'à lyse complète (30 minutes minimum)

-> Ajouter tampon ATL et patienter 1 minute

-> Vortexer 15 secondes

-> Incuber 70°C pendant 10 minutes

-> Ajouert éthanol, patienter 1 minute

-> Vortexer 15 seconde

-> Récupérer le lysat et poursuivre l'extraction en suivant le protocole QIAamp® DNA Mini kit.

→ Annexe 3.3 Récupérer l'extraction du lysat en suivant le protocole QIAamp DNA Mini kit (quel que soit nature prélèvement)

Dans la salle d'extraction, les manipulations hors appareils spécifiques se font sous PSM. Il n'y a pas de délai entre l'extraction et la récupération de l'ADN à partir du lysat.

-> Introduire le lysat dans une colonne de filtration et placer cette colonne dans un tube receveur

-> Ajout de binding buffer et homogénéiser

-> Centrifuger 1 minute à 10 000 rpm

-> Jeter tube receveur et en placer un deuxième

-> Nettoyer par buffer AW1

-> Centrifuger 1 minute à 10 000 rpm

-> Jeter tube receveur et en placer un troisième

-> Nettoyer par buffer AW2

-> Centrifuger 1 minute à 10 000 rpm

-> Jeter tube receveur et en placer un Eppendorf receveur

-> Placer dans la colonne un tampon d'éluion (modification de la charge de la colonne, chargée négative alors et laissera passer l'ADN extrait vers le tube receveur).

-> Centrifuger 1 minute à 14 000 rpm

-> Jeter la colonne et garder l'Eppendorf receveur

Tableau 17 : Conservation extraction fongique avant amplification

Emplacement	Température	Durée maximale entre extraction et amplification
/	Ambiante	Sans délai
Réfrigérateur salle propre biologie moléculaire dépôt des extractions	5°C (+/- 2°C)	Dans la journée
Congélateur salle biologie moléculaire Parasitologie-Mycologie	-20°C (+/-5°C)	Dans les 6 mois
Congélateur salle des congélateurs du CBRS -80°C	-80°C (+/- 7°C)	Pas de limite de temps théoriquement

→ Annexe 3.4 Mix PCR :

Dans la salle propre de préparation des mix de PCR, les manipulations hors appareils spécifiques se font sous PSM.

Une fois le mix de PCR réalisé, l'ajout des ADN préalablement extraits se fait en salle propre de biologie moléculaire spécifique au dépôt des extraits d'ADN.

Tableau 18 : Préparation des mix pour les PCR

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	Volume/PCR(μL)
H ₂ O qsp 15	-	-	12,75
Tampon «PCR Reaction Buffer», without MgCl ₂	10X	1X	2,5
MgCl ₂ Stock Solution	25 mM	2,5 mM	2,5
Tampon « GC-RICH Solution »	5X	0,5X	2,5
dNTP	10 mM de chaque	0,2 mM de chaque	0,5
Cible ITS : amorces sens (ITS5-M13F)	10 μM	0,4 μM	2
Cible ITS : anti-sens (ITS4-M13R)	10 μM	0,4 μM	2
Taq DNA Polymerase	5 U/μL	0,2 U/μL	0,25
ADN préalablement extrait	-	-	2 μL

Total 25 μL

→ Annexe 3.5 Cycles PCR :

L'amplification du mix + ADN extraits se fait dans la salle de PCR.

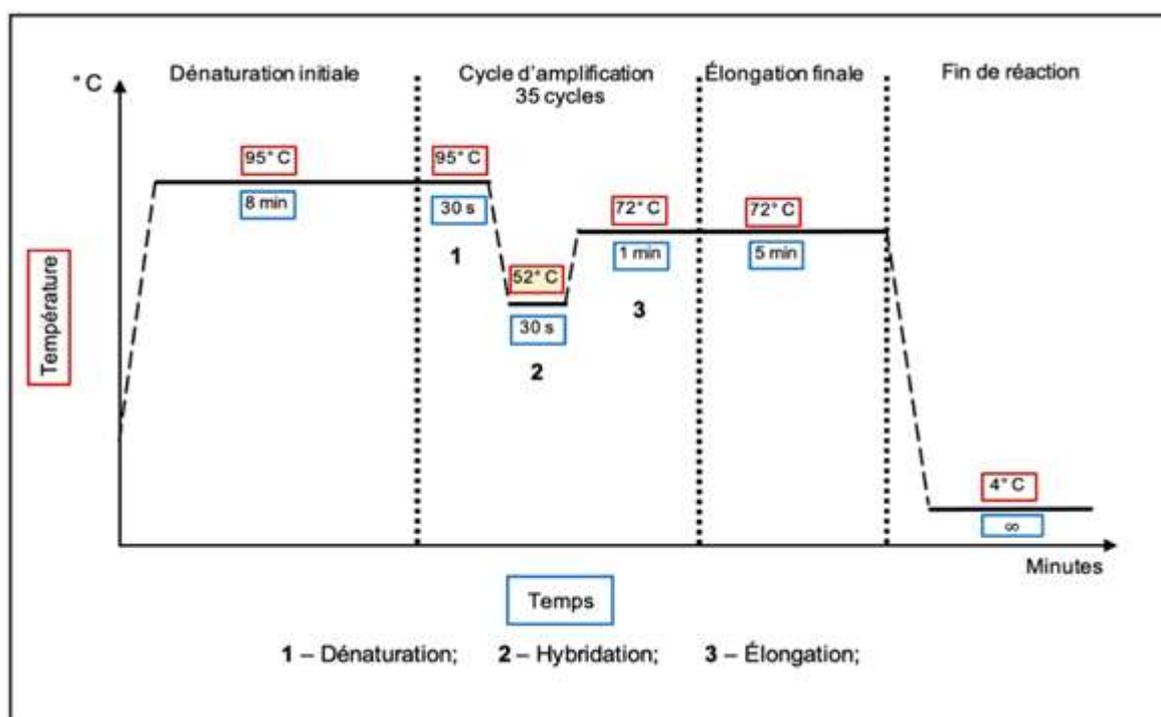


Figure 12 : Schéma du programme d'amplification par PCR pour la cible ITS1

Tableau 19 : Conservation de l'ADN fongique amplifié

Emplacement	Température	Durée maximale entre l'amplification et la migration ou la purification
/	Ambiante	Sans délai
Réfrigérateur salle propre biologie moléculaire dédiée aux PCR	5°C (+/- 2°C)	Dans la journée
Congélateur salle biologie moléculaire Parasitologie-Mycologie	-20°C (+/- 5°C)	Dans les 6 mois
Congélateur salle des congélateurs du CBRS -80°C	-80°C (+/- 7°C)	Pas de limite de temps théoriquement

→ Annexe 3.6 Electrophorèse sur gel d'agarose :

→ Fabrication du gel d'agarose (salle de pesée et salle de migration) :

- UltraPure™ Agarose = 1g
- Diluer dans 100 mL de tampon TBE à 0.5 X
(Prendre TBE 10X et en verser 50 mL dans 1 L d'eau pure à laquelle on a retiré 50 mL)

- Faire chauffer au micro-onde dans un erlenmeyer jusqu'à ébullition puis homogénéisation du mélange chaud

- Ajouter 6 µL de Midori green pour 100 mL et mélanger avec l'embout de pipette

- Verser le mélange dans moule à gel de migration (avec peigne)

- Attendre 20-30 min qu'il refroidisse

- Le démouler et le placer dans le frigidaire de la salle emballé dans du cellophane (à utiliser dans les 48-72 sinon sèche) ou alors utiliser directement

→ Migration (salle de migration) :

- Déposer 5 µL de marqueur de poids moléculaire (à gauche idéalement)

- Déposer 1 µL de tampon de charge dans chaque autre puits

- Déposer témoins négatif (eau PPI) 3 µL dans le deuxième puits

- Déposer 3 µL de chaque produit de PCR dans les puits suivants (il reste 22 µL d'amplicons)

- Mettre dans cuve électrophorétique (attention l'ADN est chargé négativement et migre donc vers la borne positive ...):

- V = 100 Volts

- A = laisser valeur de base

- T = 30 min

→ Révélation (salle de migration) :

- Voir sous l'appareil à UV et noter les migrations qui ont réussi. En cas de migration affective, noter celle révélant une amplification nette et franche de celles qui sont ténues et faibles.

Une fois révélée, replacer l'ADN amplifié (qui a été révélé donc) dans l'emplacement dédié décrit dans le tableau 3 de l'annexe

→ Annexe 3.7 Purification de PCR :

La purification de PCR se déroule dans la salle propre post PCR, elle se base sur l'utilisation du Kit commercialisé par analytikjena® : innuPREP® PCRpure Kit

-> Dans colonne, mettre 500 µL de Binding Buffer, la colonne est dans le Receiver tube>

-> Transférer de la totalité de l'ADN amplifié dans la colonne

-> Centrifuger programme 1 (2' et 12 000 RPM)

-> Vider le Receiver tube et répéter le programme 1 pendant 30''

-> Jeter tout le Receiver tube et mettre la colonne dans le Tube d'élution

-> Ajouter le tampon d'élution en fonction de l'efficacité de la PCR

- > belle bande à la migration -> grosse dilution, soit 80 µL de tampon d'élution

- > faible bande à la migration -> faible dilution, soit 35 µL de tampon d'élution

(NB : Nous avons testé avec 30 µL, les tests ont marché avec toutes les purifications testées mais à ne faire que si c'est vraiment faible sinon risque de ne pas amplifier proprement).

-> Attendre 1'

-> Centrifuger programme 2 (1' et 8 000 RPM)

-> Nommer le Tube d'éluion et jeter la colonne (on garde le tube d'éluion)

Tableau 20 : Conservation de l'ADN fongique amplifié et purifié

Emplacement	Température	Durée maximale entre la purification et l'amplification de séquence
/	Ambiante	Sans délai
Réfrigérateur salle propre biologie moléculaire post PCR	5°C (+/- 2°C)	Dans la journée
Congélateur salle biologie moléculaire post PCR	-20°C (+/-5°C)	Dans les 6 mois
Congélateur salle des congélateurs du CBRS -80°C	-80°C (+/- 7°C)	Pas de limite de temps théoriquement

→ Annexe 3.8 Mix PCR séquence :

Dans la salle propre de préparation des mix de PCR, les manipulations hors appareils spécifiques se font sous PSM. L'ajout des ADN amplifiés et purifiés se fait dans la salle post-PCR sous PSM.

Tableau 21 : Préparation des milieux réactionnels pour les PCR de séquences avec ADN purifié pour les PCR de séquences

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	Volume/PCR (µL) avec ADN moins concentré
H ₂ O	-	-	11
Tampon "BigDye"	5 X	0,5 X	2
BigDye Terminator v3.1 Ready reaction mix	-	-	4
Amorce sens M13F	3,4 µM	0,17 µM	1
ou Amorce antisens M13R	3,4 µM	0,17 µM	1
ADN amplifié et purifié	-	-	2

Une seule amorce M13R ou M13F. F pour Follow (sens) et R pour Revers (anti-sens). Une fois le mix réalisé, il convient de le placer dans la machine d'amplification ou de le placer dans le frigidaire pour le faire le lendemain. Si l'amplification n'est pas réalisée tout de suite il conviendra de réhomogénéiser les puits par vortex puis centrifugation courte avant de le placer dans la machine d'amplification.

→ Annexe 3.9 Cycle PCR de séquence :

Se fait dans la salle Post-PCR.

Tableau 22 : Conservation de l'ADN fongique après amplification de séquence

Emplacement	Température	Durée maximale entre l'amplification de séquence et la purification de séquence
/	Ambiante	Sans délai
Réfrigérateur salle propre biologie moléculaire post PCR	5°C (+/- 2°C)	Dans la journée
Congélateur salle biologie moléculaire post PCR	-20°C (+/- 5°C)	Dans les 6 mois
Congélateur salle des congélateurs du CBRS -80°C	-80°C (+/- 7°C)	Pas de limite de temps théoriquement

→ Annexe 3.10 Préparation plaque de séquence :

Dans salle Post-PCR.

-> Récupérer la plaque noire dans un tiroir de la salle

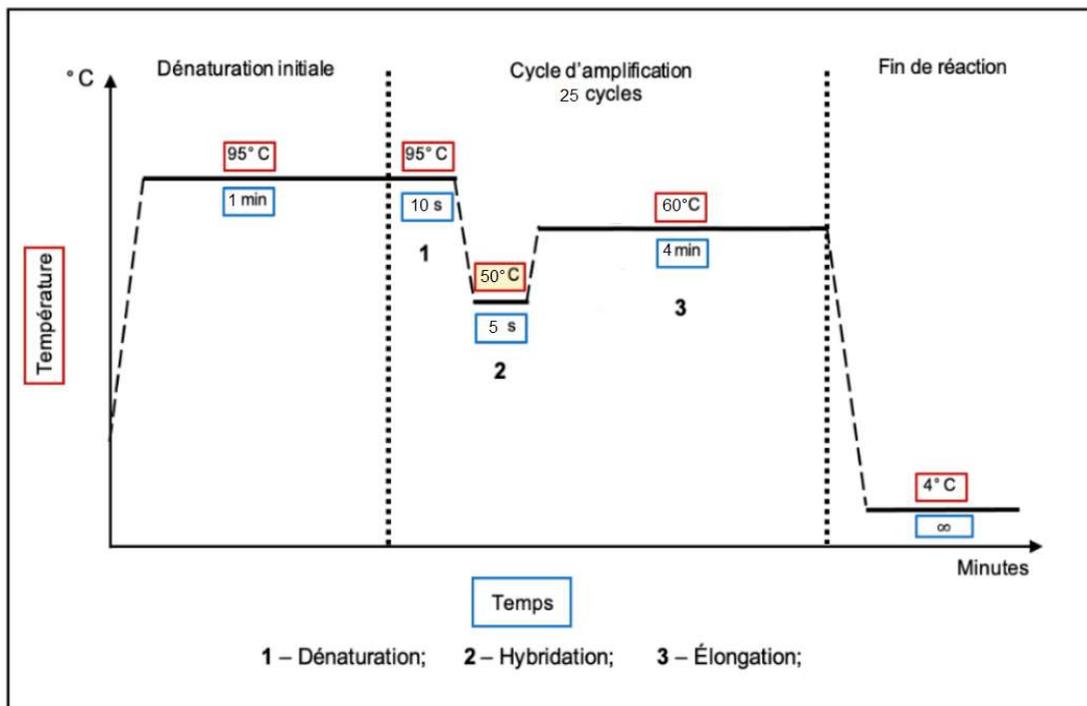


Figure 23 : Schéma du programme d'amplification par PCR pour la PCR de séquence

-> Remplir les trous de Céphadex (dans même tiroir que plaque noire)

-> Poser plaque de séquence à l'envers par-dessus (A, contre A) : plaque multiscreen filter plate

-> Retourner puis tapoter pour faire tomber Céphadex dans les puits de plaque

-> Ajouter 300 µL d'eau PPI dans chaque puits de plaque

-> Faire reposer 30' minimum au frigidaire

-> Faire ensuite tourner programme sur centrifugeuse de plaque (3', 900 RPM et 20 °C)

Possibilité de garder la plaque nommée au réfrigérateur de la salle post-PCR

→ **Annexe 3.11 Purification post PCR de séquence :**

Dans la salle Post-PCR.

- > Déposer 20 µL dans chaque puit (tout le produit de PCR de séquence) dans le même ordre que sur feuille de demande de séquençage
- > Ne pas abimer le Céphadex avec l'embout de la pipette (filtre moins bien)
- > Combler avec de l'eau les puits n'ayant pas d'ADN
- > Faire montage des plaques
- > Faire programme centrifugeuse de plaque (3', 900 RPM et 20°C) après avoir bien équilibré les plaques pour éviter les vibrations
- > Récupérer la plaque de séquence et la boucher avec le « damier gris » dans le tiroir

Descendre plaque et feuille en salle de séquence avec le fichier texte et une feuille de demande.

Annexe 4. 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.

MISE EN PLACE DU SEQUENÇAGE EN ROUTINE DANS LE SERVICE DE MYCOLOGIE DU CHU DE LIMOGES POUR LE DIAGNOSTIC DE CHAMPIGNONS D'IDENTIFICATION DIFFICILE

Les champignons représentent un taxon très important et beaucoup peuvent être responsables de pathologie humaine. Dans la cadre des infections fongiques, une prise en charge spécifique à l'espèce est nécessaire pour traiter au mieux le patient. La juste identification du champignon est alors primordiale. Au sein du service de Parasitologie-Mycologie du Centre Hospitalo Universitaire de Limoges, il existe déjà des techniques morphologiques et spectrométriques qui permettent l'identification des champignons, mais elles peuvent être complétées par une approche d'identification moléculaire plus précise, plus sensible et pouvant renforcer le diagnostic d'identification difficile. Ce travail de thèse a permis d'évaluer l'apport du séquençage Sanger de la région ITS (Internal Transcribed Spicer) en routine pour ces champignons d'identification difficile. Il a permis de trouver les avantages de la technique et d'en estimer la faisabilité.

Mots-clés : Champignon, Identification, Séquençage, Sanger, ITS, Internal Transcribed Spicer

IMPLEMENTATION OF ROUTINE SEQUENCING IN THE MYCOLOGY DEPARTMENT OF THE CHU DE LIMOGES FOR THE DIAGNOSIS OF FUNGI OF DIFFICULT IDENTIFICATION

Fungi represent a very important taxon and many can be responsible of human pathology. In case of fungi infection, species-specific management is necessary for a better treatment. The correct identification of the fungi is then essential. Within the Parasitology-Mycology service of the University Hospital Center of Limoges, the already available techniques for identification rely on morphological and spectrometric techniques. A more precise and sensitive molecular identification approach that can reinforce the diagnosis of difficult identification now exists in some laboratories. This thesis work allowed to evaluate the contribution of Sanger sequencing of the ITS (Internal Transcribed Spicer) region in routine for these fungi of difficult identification. It permitted finding the benefits of the technique and estimating its feasibility.

Keywords : Fungy, Identification, Sequencing, Sanger, ITS, Internal Transcribed Spicer



